

汪 杏, 沈根祥, 胡双庆, 等. 铬(VI)和菲单一及复合污染对土壤微生物酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(7): 1300–1307.

WANG Xing, SHEN Gen-xiang, HU Shuang-qing, et al. Effects of single and joint pollution of chromium(VI) and phenanthrene on microbiological enzyme activities in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(7): 1300–1307.

铬(VI)和菲单一及复合污染对土壤微生物酶活性的影响

汪 杏¹, 沈根祥², 胡双庆^{2*}, 顾海蓉², 崔春燕¹, 朱明远³, 赵晓祥¹

(1. 东华大学环境科学与工程学院, 上海 201620; 2. 上海市环境科学研究院, 上海 200233; 3. 华东理工大学中德工学院, 上海 200237)

摘 要: 采集上海青浦现代农业园区稻田土壤, 通过室内模拟试验, 研究铬(VI)和菲单一及复合暴露对土壤微生物过氧化氢酶和脱氢酶活性的影响及交互作用方式。铬(VI)和菲单一及复合暴露对两种酶活性的影响表现出明显的浓度-效应关系, 整体上随污染物浓度升高, 酶活性降低, 但低浓度菲对过氧化氢酶表现出略微激活效应。以暴露第7 d 为评价终点, 铬(VI)暴露对土壤过氧化氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 分别为 203.61、471.48 mg·kg⁻¹, 菲暴露对土壤过氧化氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 分别为 299.89 mg·kg⁻¹ 和大于 800.00 mg·kg⁻¹, 复合暴露对土壤过氧化氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 分别为 116.14、349.28 mg·kg⁻¹; 铬(VI)暴露对土壤脱氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 都小于 50.00 mg·kg⁻¹, 菲暴露对土壤脱氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 分别为 113.63、223.49 mg·kg⁻¹, 复合暴露对土壤脱氢酶 EC₁₀ 和 EC₂₀ 都小于 100.00 mg·kg⁻¹。表明脱氢酶比过氧化氢酶更加敏感。采用酶活性净变量法评价交互作用方式, 结果表明铬(VI)和菲复合污染对土壤微生物过氧化氢酶和脱氢酶的交互作用方式均表现为拮抗作用。

关键词: 铬; 菲; 复合污染; 过氧化氢酶; 脱氢酶

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)07-1300-08 doi:10.11654/jaes.2016.07.011

Effects of single and joint pollution of chromium(VI) and phenanthrene on microbiological enzyme activities in soil

WANG Xing¹, SHEN Gen-xiang², HU Shuang-qing^{2*}, GU Hai-rong², CUI Chun-yan¹, ZHU Ming-yuan³, ZHAO Xiao-xiang¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China; 2. Shanghai Academy of Environmental Sciences, Shanghai 200233, China; 3. Sino-German College of Technology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Soils have suffered from single or combined pollution by various pollutants including heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs). However, the interactive and toxic effects of chromium(VI) and phenanthrene on soil microbiological enzymes activities remain unknown. In an indoor simulation test, the effects of single and co-exposure of chromium(VI) and phenanthrene on soil catalase and dehydrogenase activities were examined in a paddy soil collected from Qingpu modern agricultural park in Shanghai. There were significant correlations between enzyme activity and concentrations of chromium(VI) and phenanthrene. Basically, the enzymatic activities decreased with increasing pollutant concentrations. However, at low concentrations of phenanthrene, the activity of catalase was promoted. For catalase, the 7 d-EC₁₀ and 7 d-EC₂₀ values of chromium(VI) were 203.61 mg·kg⁻¹ and 471.48 mg·kg⁻¹, respectively, while those of phenanthrene were 299.89 mg·kg⁻¹ and over 800.00 mg·kg⁻¹, respectively. For dehydrogenase, the 7 d-EC₁₀ and 7 d-EC₂₀ values of chromium(VI) were both less than 50.00 mg·kg⁻¹, whereas those of phenanthrene were 113.63 mg·kg⁻¹ and 223.49 mg·kg⁻¹, respectively. These results indicated that dehydrogenase was more sensitive to both chromium(VI) and phenanthrene pollution than catalase was. The interaction of chromium(VI) and phenanthrene showed antagonistic effects on catalase and dehydrogenase activities. The present findings would provide useful information for ecological risk assessments of combined pollution of soils.

Keywords: chromium(VI); phenanthrene; combined pollution; catalase; dehydrogenase

收稿日期: 2015-12-25

基金项目: 上海市 2014 年度“科技创新行动计划”社会发展领域项目(14231200500); 上海市自然科学基金(15ZR1401500)

作者简介: 汪 杏(1992—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 从事生态毒理研究。E-mail: wangxingsusu@163.com

* 通信作者: 胡双庆 E-mail: husq@saes.sh.cn

自然界中污染发生常常具有综合性,重金属和多环芳烃都是环境中的微量持久性污染物,往往同时或先后进入环境形成复合污染^[1]。通常认为含碳有机物的不完全燃烧可形成多环芳烃,石油泄漏也会增加环境中多环芳烃的含量^[2]。这些污染物质进入大气环境中,绝大部分通过大气沉降进入土壤,据估计,有90%的多环芳烃在土壤表面残留^[3]。刘增俊等^[4]研究发现,苏州和嘉兴农田土壤中15种多环芳烃的总量范围分别为45.4~3703 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和9.0~2421 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,其中,菲、荧蒽、苯并[b]荧蒽为两个地区土壤中多环芳烃的主要成分。菲在污染环境中的含量高,而且有着与致癌多环芳烃类似的区域结构,所以菲成为多环芳烃研究中的模式化合物^[5]。土壤重金属污染主要源于农业生产中化肥、农药的过量施用,长期污水灌溉以及人类活动造成的大气沉降等^[6]。王京^[7]对崇明岛主要公路路边土壤研究发现,Cr(VI)的浓度范围为72.1~309.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,平均含量为110.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,且局部污染严重。近年来,随着工农业生产的快速发展,铬的用途越来越多,铬污染风险越来越大^[8]。

土壤中微生物酶的种类繁多,胞外酶过氧化氢酶和胞内酶脱氢酶都属于氧化还原酶,在土壤有机质的氧化和腐殖质的形成方面起着重要作用。土壤酶对土壤环境质量的变化反应迅速,常被用来作为指示土壤环境质量的生物学指标^[9]。曾有学者研究重金属、多环芳烃对土壤酶活性的影响^[10-11],提出了脱氢酶活性是表征重金属和多环芳烃污染的一项重要指标。过氧化氢酶被看作是好氧微生物的指示物,其活性与好氧微生物的数量、土壤肥力有密切联系^[12]。研究发现,土壤中有有机污染物与重金属复合污染对土壤酶活性的影响随着污染物浓度以及培养时间的变化而有所不同^[13-14]。

目前研究主要集中在单一重金属、多环芳烃,以及重金属和农药复合污染对土壤酶活性的影响方面,铬(VI)和菲复合污染对土壤酶活性的影响尚无报道。本文采用上海青浦现代农业园区稻田土,以土壤脱氢酶和过氧化氢酶活性作为指标,通过室内模拟试验,研究了铬(VI)和菲单一及复合污染对脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响,并通过浓度-效应关系评价两种污染物的联合作用类型,以期对环境标准制定和复合污染的生态风险评价提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验土壤

试验土壤为上海青浦现代农业园区稻田土,土壤

质地为青紫泥,采集0~20 cm表层土样,剔除植物残根及石砾等杂物,经风干、磨碎后过1 mm筛,保存备用。常规方法测定土壤基本理化性质^[15-16],见表1。

表1 试验土壤理化性质

Table 1 Physical-chemical properties of soil tested

深度/cm	pH	含水率/%	有机碳/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	CEC/ $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$	容重/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
0~20	7.0	51	4.3	19.2	1.12

1.1.2 试剂和仪器

试剂:过氧化氢、盐酸、高锰酸钾、草酸钠、葡萄糖、甲醇均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;重铬酸钾、菲、硫酸、三-羟甲基-氨基甲烷、三苯甲腈均为分析纯,购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

仪器:紫外分光光度计(UV-7504,上海欣茂仪器有限公司),人工气候箱(MLR-352-PC,松下健康医疗器械株式会社),电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9246A,上海精宏实验设备有限公司),振荡器(HY-2,国华电器有限公司),pH计(S220,梅特勒-托多仪器(上海)有限公司),电子天平(YP2001N,上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 铬(VI)和菲单一及复合暴露试验

根据污染场地中铬(VI)监测浓度^[7]设计暴露浓度范围(0~800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),铬污染土样配置方法为:将重铬酸钾溶于去离子水中,配制成不同浓度梯度的溶液,然后加入到称量好的过筛土样中,使得铬(VI)污染浓度(以纯铬计,下同)分别为0、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

按照酶活性净变化量(ΔI)^[17]的计算要求,复合污染物浓度比为1:1,因此菲的暴露浓度范围也是0~800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。菲污染土样配置方法为:将菲溶于少量有机溶剂丙酮中,配制成不同浓度梯度的溶液,加入到称量好的过筛土样中,充分混匀,放入通风橱中,待丙酮完全挥发,使得菲污染浓度分别为0、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

铬和菲复合污染土样采用上述相同方法配置,使得复合污染土壤中铬(VI)和菲的污染浓度分别为0、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和0、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

添加污染物后,反复搅拌,使污染物在100 g过筛干土中均匀分布,再用去离子水调节至最大持水量的60%。将处理好的土样移入到150 mL的小烧杯中,覆盖无菌封口膜,防止水分过量蒸发,然后放在24℃人

工气候箱中恒温培养。分设空白对照组和助溶剂对照组,每组设有3个平行。分别在处理后第1、3、5、7、10 d取样,测定过氧化氢酶和脱氢酶活性以及土样的含水率。所有结果均以每克土壤干重表示,鲜重按照烘干法测得的湿度换算成干重。

1.2.2 脱氢酶和过氧化氢酶活性测定

脱氢酶的测定采用TTC比色法^[18]。称取3.0 g土样置于100 mL三角瓶中,加入4 mL TTC-葡萄糖-Tris缓冲液,置于37℃人工气候箱黑暗条件下培养24 h;取出后用10 mL左右甲醇提取,定性滤纸过滤,再用50 mL比色管定容;滤液即刻用紫外分光光度计在485 nm波长下测定吸光度。脱氢酶活性以土样中TPF $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。

过氧化氢酶的测定采用高锰酸钾滴定法^[19]。称取3.0 g土样置于100 mL三角瓶中,加入40 mL蒸馏水和5 mL 0.3%过氧化氢溶液;将三角瓶放在振荡器上振荡20 min后,加入5 mL 3.0 mol·L⁻¹硫酸,用以稳定未分解的过氧化氢;将瓶中悬液用定性滤纸过滤,量取25 mL滤液,用0.1 mol·L⁻¹高锰酸钾滴定至淡粉红色终点。过氧化氢酶活性以单位干土消耗的0.1 mol·L⁻¹高锰酸钾的毫升数表示。

1.2.3 数据分析与联合作用评价

试验数据为3次平行试验的算术平均值,数据采用Excel进行初步计算及处理。采用SPSS统计分析软件对数据进行单因素方差分析。

酶活性抑制率计算^[20]:

$$R = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

式中: R 为抑制(激活)率; a 为对照组测定值; b 为处理组测定值。

采用计算酶活性净变化量(ΔI)^[17]的方法来判断

铬(VI)和非对土壤酶活性的联合作用:

$$\Delta I = (I_{\text{Cr(VI)+Phe}} - I_{\text{CK}}) - (I_{\text{Cr(VI)}} - I_{\text{CK}}) - (I_{\text{Phe}} - I_{\text{CK}})$$

式中: $I_{\text{Cr(VI)+Phe}}$ 、 $I_{\text{Cr(VI)}}$ 、 I_{Phe} 和 I_{CK} 为同时或分别加入铬(VI)和非土壤的酶活性以及空白对照土样的酶活性。

$\Delta I=0$,铬(VI)和非之间无交互作用; $\Delta I>0$,铬(VI)和非之间存在拮抗作用; $\Delta I<0$,铬(VI)和非之间存在协同作用。

2 结果与讨论

2.1 菲单一暴露对脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

以菲的暴露时间为横坐标,以脱氢酶及过氧化氢酶的活性为纵坐标作图,如图1。随着暴露时间的延长,各处理组土样中脱氢酶活性出现一定波动,时间-效应关系不明显,只有最高暴露浓度(800.00 mg·kg⁻¹)酶活性随着暴露时间的增加而明显降低。暴露浓度为50.00 mg·kg⁻¹和100.00 mg·kg⁻¹时,对脱氢酶的抑制作用不显著。从整体来看,随着菲暴露浓度的增加,脱氢酶活性逐渐降低,其浓度-效应关系明显,当暴露第10 d时,高浓度处理组中土壤脱氢酶活性抑制率达到64.38%。

在暴露的第1 d,暴露浓度为50.00 mg·kg⁻¹时过氧化氢酶活性有略微升高,表现出激活作用;从整体来看,过氧化氢酶的活性随着菲暴露浓度的增加而降低,暴露浓度为400.00 mg·kg⁻¹和800.00 mg·kg⁻¹时,菲对过氧化氢酶的抑制率达到了极显著差异($P<0.01$)。菲对过氧化氢酶活性影响并未表现出明显的时间-效应关系,而是出现波动变化,过氧化氢酶抑制率最高仅为20%左右。

多环芳烃对土壤酶的影响与其浓度有关,低浓度的菲对两种土壤酶活性并无抑制作用,反而表现出一定的激活作用,主要是微生物对污染物的适应或是利

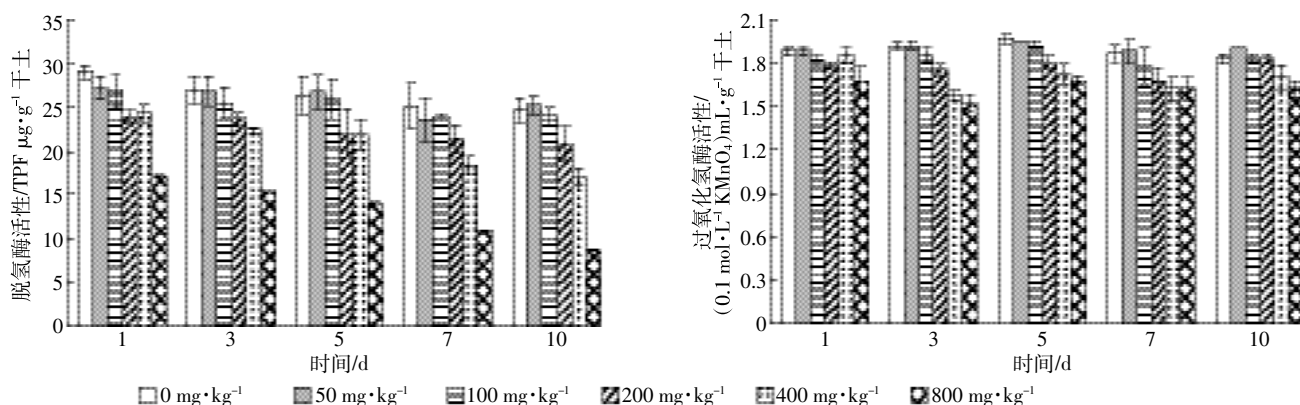


图1 菲单一暴露对土壤脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

Figure 1 Effects of single phenanthrene on dehydrogenase and catalase activities in soil

用外源污染物作为碳源和能量所致^[21]。这与宫璇等^[22]的研究结果相似,土壤中过氧化氢酶的活性也没有显著变化,可以认为向土壤中添加菲对土壤中好氧微生物的影响不大。高浓度的多环芳烃会抑制土壤中多种酶活性,菲对土壤过氧化氢酶和脱氢酶产生抑制作用的原因可能是其经转化后参与酶促反应过程,进而影响微生物的生长和代谢。

2.2 铬(VI)单一暴露对脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

以铬(VI)的暴露时间为横坐标,以脱氢酶及过氧化氢酶的活性为纵坐标作图,如图2。随着铬暴露浓度的升高,铬(VI)对脱氢酶的抑制作用总体来看逐渐增加,表现出一定浓度-效应关系。整个暴露阶段,不同浓度组铬(VI)对脱氢酶的抑制作用都非常明显,即使最低浓度暴露组($50.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),脱氢酶活性也受到较强影响(最低抑制率为81.69%)。

随着暴露时间的延长,各处理组过氧化氢酶活性出现一定波动,但时间-效应关系不明显。在暴露的第3 d和第5 d,暴露浓度为 $50.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,过氧化氢酶的活性高于各自的空白对照组,表现出一定程度的激活作用。这与魏威等^[23]的研究结果相似,低浓度铬(VI)处理对过氧化氢酶有一定刺激作用。从整体来看,随着暴露浓度的增加,铬(VI)对过氧化氢酶的抑制作用逐渐增加,且浓度-效应关系明显。高浓度处理组中过氧化氢酶活性抑制率最高为47.56%,与段雄伟等^[24]的研究结果相似,较高浓度铬(VI)处理显著降低了过氧化氢酶活性。但是随着暴露时间的延长,高浓度暴露组($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对过氧化氢酶活性的抑制率降低,这可能与土壤中部分铬(VI)转变为铬(III)有关。

低浓度铬(VI)暴露对过氧化氢酶产生激活作用的原因一方面可能是土壤有机质对土壤酶的保护作

用和对铬的吸附缓冲作用,导致其对土壤酶毒害较小,表观上表现为激活作用;另一方面可能由于酶作为蛋白质,重金属离子作为辅基,有利于酶活性中心与底物的配位结合,使酶分子与酶活性中心保持一定的专性结构,改变酶促反应的平衡性和酶蛋白的表面电荷,从而增强酶活性^[25]。较高浓度重金属对过氧化氢酶的抑制作用是因为重金属离子与酶分子的-SH, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ 等官能团形成牢固的共价键,使酶的立体结构变形,酶活性部位封闭,酶活性得以抑制^[26]。

铬(VI)对脱氢酶活性产生抑制作用,其机理可能是因酶分子中的活性部位——巯基和含咪唑的配位结合,形成较稳定的络合物,产生了与底物的竞争性抑制作用,或者可能是由于重金属通过抑制土壤微生物的生长和繁殖,减少体内酶的合成和分泌,最终导致酶活性下降^[27]。有研究表明,铜、汞、银离子通过蛋白质凝固来破坏细胞结构,使细胞灭活,对细菌有直接毒害作用,而重金属铬(VI)也常被用于制造农药杀菌剂。高秀丽等^[28]指出过氧化氢酶、脱氢酶活性可以用于表征土壤重金属污染的程度。这表明脱氢酶对土壤铬(VI)污染特别敏感,可以作为土壤铬(VI)污染的重要指标。

2.3 铬(VI)和非复合暴露对脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

以复合污染的暴露时间为横坐标,酶活性为纵坐标作图,如图3。随着暴露时间的延长,各处理组土壤过氧化氢酶活性出现一定波动,但时间-效应关系不明显。从整体来看,铬(VI)和非复合暴露对过氧化氢酶活性影响的浓度-效应关系明显,即随着暴露浓度的增加,过氧化氢酶活性逐渐降低,最高复合暴露浓度为 $1600.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,过氧化氢酶活性抑制率约为30%。

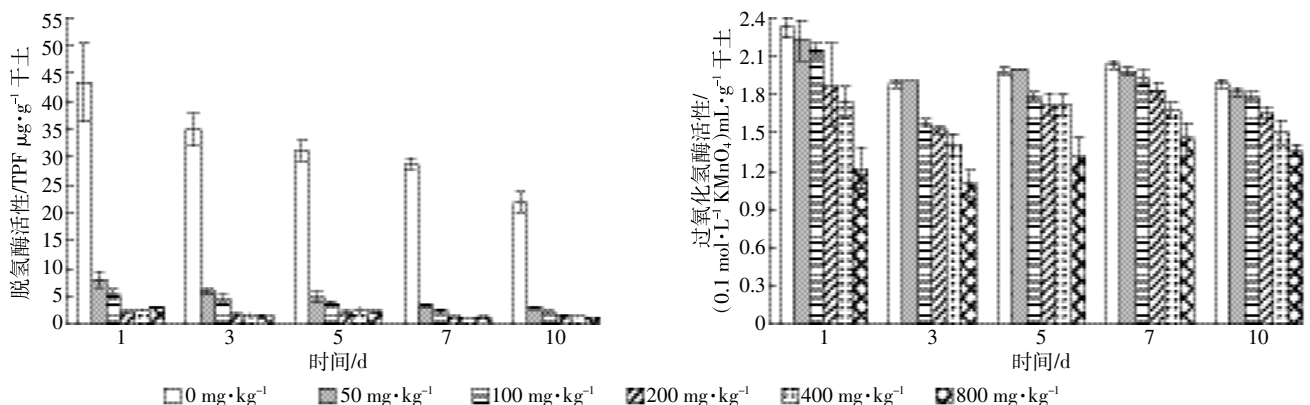


图2 铬(VI)单一暴露对土壤脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

Figure 2 Effects of single Cr(VI) on dehydrogenase and catalase activities in soil

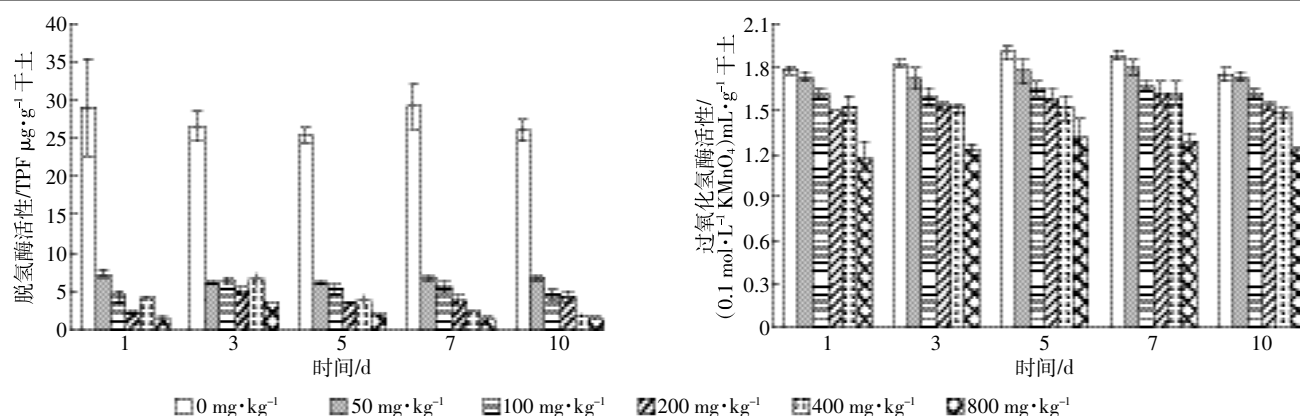


图 3 铬(VI)和菲复合暴露对土壤脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响

Figure 3 Effects of Cr(VI) and phenanthrene in combination on dehydrogenase and catalase activities in soil

相比而言,脱氢酶活性受到明显抑制,从整体来看,随着暴露浓度的增加,铬(VI)和菲复合暴露对脱氢酶的抑制作用逐渐增加,其浓度-效应关系明显。最高复合暴露浓度为 $1\,600.00\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,脱氢酶活性抑制率最高达到 95.02%。随着暴露时间的延长,各处理组土样脱氢酶活性出现一定波动,但时间-效应关系不明显。

铬(VI)和菲单一及复合暴露条件下对土壤脱氢酶的影响都高于过氧化氢酶。脱氢酶是一种仅在细胞内有活性的酶,因此其活性更能反映污染物对土壤微生物的影响^[29-30]。铬(VI)对土壤酶活性的影响高于菲,因为菲属于有机物,低浓度的菲可被细菌作为碳源和能量。在存在铬(VI)污染条件下,酶活性都会受到明显抑制,并且铬(VI)对脱氢酶活性的影响明显大于过氧化氢酶活性。

2.4 铬(VI)和菲单一及复合暴露条件下两种酶活性抑制率与污染物的浓度-效应关系

在暴露第 7 d 时,酶活性变化基本达到稳定,所以选择暴露第 7 d 作为评价终点。铬(VI)和菲单一及复合污染条件下,对土壤过氧化氢酶和脱氢酶活性抑制率与其相应浓度进行 Probit 拟合,如表 2。可见,两种土壤酶活性变化率与其浓度对数之间存在较好的线性关系,而且从其 EC_{10} 和 EC_{20} 可以看出,土壤脱氢酶比过氧化氢酶敏感。

在《农用地土壤环境质量标准(二次征求意见稿)》^[31]中,提出水田($6.5 < \text{pH} \leq 7.5$)总铬的限值为 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。对照本研究结果可知,该值低于铬(VI)单一及复合污染对过氧化氢酶的 EC_{20} 值,因而在限值条件下对土壤过氧化氢酶不会产生显著影响;但高于对脱氢酶的 EC_{20} 值,因此在最大限值浓度时会对土壤

表 2 铬(VI)和菲单一及复合暴露对土壤过氧化氢酶和脱氢酶活性浓度-效应关系统计结果

Table 2 Statistical analysis of concentration-effect relationship of catalase and dehydrogenase activities exposed separately or jointly to Cr(VI) and phenanthrene

酶种类	污染物	拟合方程	R^2	$EC_{10}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$EC_{20}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
过氧化氢酶	铬(VI)	$y=1.206x-4.067$	0.91	203.61	471.48
	菲	$y=0.588x-2.737$	0.89	299.89	>800.00
	复合	$y=0.920x-3.181$	0.95	116.14	349.28
脱氢酶	铬(VI)	$y=0.501x+0.399$	0.86	<50.00	<50.00
	菲	$y=1.498x-4.360$	0.90	113.63	223.49
	复合	$y=0.745x-0.574$	0.92	<100.00	<100.00

脱氢酶产生毒性。目前农田土壤环境尚未制定菲的限值标准,参考《上海市场地土壤环境健康风险评估筛选值(试行)》中敏感用地菲的土壤健康风险筛选值($381\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),发现筛选值均高于菲单一或复合污染对两种酶的 EC_{10} 值,表明土壤中菲污染在不引起健康风险时,也不能忽视其可能存在的生态环境风险。

2.5 铬(VI)和菲复合暴露条件下对两种酶活性影响的交互作用

采用计算酶活性净变量(ΔI)的方法来判断铬(VI)和菲复合污染对土壤过氧化氢酶活性的影响是否存在交互作用,计算结果见表 3。从整体来看,铬(VI)和菲对土壤过氧化氢酶活性的交互作用表现为拮抗。随着污染物浓度的升高,拮抗效应有增强趋势;随着样品暴露时间的延长,相应浓度下的拮抗效应减弱。

由表 4 可知,从整体来看,铬(VI)和菲复合污染对土壤脱氢酶活性的交互作用表现为拮抗作用。随着污染物浓度的升高,铬(VI)和菲的拮抗效应更加明显。但随着样品暴露时间的延长,相应浓度下的拮抗效应减弱。

表3 铬(VI)和菲1:1复合暴露下土壤过氧化氢酶活性的 ΔI

Table 3 Net change of catalase activity in soil co-exposed to Cr(VI) and phenanthrene at concentration ratio of 1:1

暴露时间/ d	铬(VI)和菲1:1混合浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$				
	100	200	400	800	1600
1	0.05	0.07	0.27	0.36	0.70
3	-0.12	0.16	0.24	0.52	0.59
5	-0.13	0.01	0.11	0.13	0.39
7	-0.04	-0.02	0.13	0.35	0.23
10	-0.03	-0.03	0.01	0.47	0.21

铬(VI)和菲复合暴露对土壤过氧化氢酶和脱氢酶的交互作用都表现为拮抗作用。这与沈国清等^[14]研究重金属Zn和多环芳烃苯并[a]芘的交互作用结果相似,其对脲酶和脱氢酶也都表现出拮抗作用。Moreau等^[32]认为,菲对Zn的拮抗作用可能是因为菲改变了溶酶体膜的稳定性及功能,从而解除Zn的毒害作用。Teisseire等^[33]认为,敌草隆与铜之间的拮抗作用是由于前者可消除由Cu诱导产生的氧化胁迫,同时敌草隆还可促进酶活性(如谷胱甘肽还原酶、抗过氧化物酶等),提高了细胞抗氧化能力。谷盼妮等^[34]认为,重金属与有机物复合污染的联合毒性效应产生机理可能是竞争结合位点、影响微生物及酶活性、干扰生物生理活动及生物大分子的合成等。

分析铬(VI)和菲发生拮抗作用的机理,可能是铬以六价离子态存在于土壤溶液中,易被静电吸附,降低土壤表面负荷,促进土壤对菲的吸附固定,从而减弱铬(VI)与菲的生物有效性。此外,铬(VI)具有强氧化性,添加到土壤中后,可被其中的还原剂如有机质还原,部分铬(VI)会转变成铬(III)^[35]。同时,土壤pH值、氧化还原电位等因素也会影响污染物形态和微生物活性。Liao等^[36]研究发现在高pH值土壤中,微生物能有效修复土壤中的铬(VI)污染。潘胜强等^[37]研究发现土壤理化性质如黏土矿物、土壤pH值、土壤有机质、土壤质地、土壤氧化还原电位会对土壤酶活性产生一定影响。因此在复合暴露条件下,菲的添加也可能引起土壤肥力和理化性质的变化。但由于复合暴露的作用机制受污染物种类与浓度、污染物结构与性质、土壤肥力等多种因素的影响,铬(VI)和菲复合暴露具体的联合作用致毒机理还有待于进一步研究。

3 结论

(1)铬(VI)和菲单一及复合暴露对土壤微生物过氧化氢酶和脱氢酶活性的影响表现出明显的浓度-效

表4 铬(VI)和菲1:1复合暴露下土壤脱氢酶活性的 ΔI

Table 4 Net change of dehydrogenase activity in soil co-exposed to Cr(VI) and phenanthrene at concentration ratio of 1:1

暴露时间/ d	铬(VI)和菲1:1混合浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$				
	100	200	400	800	1600
1	15.50	15.50	19.66	20.59	24.59
3	8.73	11.43	14.76	17.82	21.71
5	6.50	7.90	11.60	11.69	17.73
7	4.42	4.17	4.94	6.43	14.11
10	-0.73	0.82	2.69	3.99	12.16

应关系,整体上随污染物浓度升高,酶活性降低,但低浓度菲对过氧化氢酶表现出略微激活效应。

(2)以暴露第7d为评价终点,铬(VI)暴露对土壤过氧化氢酶 EC_{10} 和 EC_{20} 分别为203.61、471.48 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,菲暴露对土壤过氧化氢酶 EC_{10} 和 EC_{20} 分别为299.89 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和大于800.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;铬(VI)暴露对土壤脱氢酶 EC_{10} 和 EC_{20} 都小于50.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,毒性效应较强,菲暴露对土壤脱氢酶 EC_{10} 和 EC_{20} 分别为113.63、223.49 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

(3)铬(VI)对土壤微生物酶活性的影响高于菲,铬(VI)和菲单一及复合污染条件下对脱氢酶的影响都高于过氧化氢酶。

(4)铬(VI)和菲复合暴露对土壤微生物过氧化氢酶和脱氢酶的交互作用均表现为拮抗作用。

参考文献:

- [1] 沈国清, 陆贻通, 周培. 土壤环境中重金属和多环芳烃复合污染研究进展[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2005, 23(1): 102-106. SHEN Guo-qing, LU Yi-tong, ZHOU Pei. Advances of research on combined pollution of heavy metals with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil environment[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 2005, 23(1): 102-106.
- [2] 马恒亮, 占新华, 张晓斌, 等. 小麦/苜蓿套作对菲污染土壤酶活性的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(12): 3684-3690. MA Heng-liang, ZHAN Xin-hua, ZHANG Xiao-bin, et al. Enzymatic activities of phenanthrene contaminated soil in wheat and clover intercropping system[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3684-3690.
- [3] Wild S R, Jones K C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary and budget[J]. *Environmental Pollution*, 1995, 88(1): 91-108.
- [4] 刘增俊, 滕应, 黄标, 等. 长江三角洲典型地区农田土壤多环芳烃分布特征与源解析[J]. 土壤学报, 2010, 47(6): 1110-1117. LIU Zeng-jun, TENG Ying, HUANG Biao, et al. Distribution and sources analysis of PAHs in farmland soils in areas typical of the Yangtze River Delta, China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(6): 1110-1117.
- [5] 夏颖. 多环芳烃菲对微生物生态毒理研究、菲降解菌的分离鉴定

- 及降解基因克隆与表达[D]. 杭州:浙江大学, 2004:2-3.
- XIA Ying. Studies on microbial ecology toxicity of phenanthrene and isolation, characterization of phenanthrene degrader as well as cloning and expression of degradation genes[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004:2-3.
- [6] Huang Y Z, Hu Y, Liu Y X. Heavy metal accumulation in iron plaque and growth of rice plants upon exposure to single and combined contamination by copper, cadmium and lead[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(6):320-326.
- [7] 王 京. 崇明岛主要公路重金属污染研究[D]. 上海:华东师范大学, 2007:20-21.
- WANG Jing. Heavy metal pollution in high way of Chongming island[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007:20-21.
- [8] 李晶晶, 彭恩泽. 综述铬在土壤和植物中的赋存形式及迁移规律[J]. 工业安全与环保, 2005, 31(3):31-33.
- LI Jing-jing, PENG En-ze. Summarization on the existing form and transferring rules of chromium in soil[J]. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2005, 31(3):31-33.
- [9] 边雪廉, 岳中辉, 焦 浩, 等. 土壤酶对土壤环境质量指示作用的研究进展[J]. 土壤, 2015, 47(4):634-640.
- BIAN Xue-lian, YUE Zhong-hui, JIAO Hao, et al. Soil enzyme indication on soil environmental quality: A review[J]. *Soils*, 2015, 47(4):634-640.
- [10] 龚 平, 李培军, 孙铁珩. Cd、Zn、非和多效唑复合污染土壤的微生物生态毒理效应[J]. 中国环境科学, 1997, 17(1):58-62.
- GONG Ping, LI Pei-jun, SUN Tie-heng. Ecotoxicological effects of Cd, Zn, phenanthrene and MET combined pollution on soil microbe[J]. *China Environmental Science*, 1997, 17(1):58-62.
- [11] 蔡少华, 和文祥, 呼 蕾, 等. 六价铬对土壤脱氢酶活性的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5):208-214.
- CAI Shao-hua, HE Wen-xiang, HU Lei, et al. Soil dehydrogenase activity affected by chromium(VI)[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(5):208-214.
- [12] Margesin R, Walder G, Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation(diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil[J]. *Acta Biotechnologica*, 2000, 20:313-333.
- [13] Wang M E, Zhou Q X. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144(2):572-580.
- [14] 沈国清, 陆贻通, 洪静波. 重金属和多环芳烃复合污染对土壤酶活性的影响及定量表征[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4):479-482.
- SHEN Guo-qing, LU Yi-tong, HONG Jing-bo. Quantitative expression and effect of combined pollution of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on soil enzyme[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11(4):479-482.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1997:25-151.
- BAO Shi-dan. Soil agro-chemical analysis [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1997:25-151.
- [16] 刘兆云, 章明奎. 杭嘉湖平原典型水耕人为土的碳库构成与 ^{13}C 稳定性同位素分布特征[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2010, 36(3):275-281.
- LIU Zhao-yun, ZHANG Ming-kui. Components of organic carbon pool and profile distribution of $\delta^{13}\text{C}$ values in typical stagnic anthrosols from Hangzhou-Jiaxing-Huzhou Plain[J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science*, 2010, 36(3):275-281.
- [17] 周启星. 复合污染生态学[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1995.
- ZHOU Qi-xing. Combined-pollution ecology[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1995.
- [18] Chander K, Brookes P C. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1991, 23(10):909-915.
- [19] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社, 1986.
- GUAN Song-yin. Soil enzyme and its research method[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1986.
- [20] 傅丽君, 刘智任, 杨 磊. 镉、铜、铅复合污染对枇杷园土壤微生物的生态毒理效应[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(6):881-888.
- FU Li-jun, LIU Zhi-ren, YANG Lei. Ecotoxicological effect of Cd-Cu-Pb compound pollution on loquat soil microbe[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(6):881-888.
- [21] Baran S, Bielinska J E, Oleszczuk P. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Geoderma*, 2004, 118(3/4):221-232.
- [22] 宫 璇, 李培军, 张海荣, 等. 非对土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5):981-984.
- GONG Xuan, LI Pei-jun, ZHANG Hai-rong, et al. Effects of phenanthrene contamination on enzyme activity in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(5):981-984.
- [23] 魏 威, 王 丹, 王松山, 等. 铜铬复合污染对有、无作物种植的土壤酶活性影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10):1971-1978.
- WEI Wei, WANG Dan, WANG Song-shan, et al. Eco-toxicology effects of Cu-Cr co-contamination on soil enzymes with and without plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10):1971-1978.
- [24] 段雄伟, 刘亚玲, 黎华寿, 等. 高氯酸盐和铬复合污染对土壤酶活性及微生物数量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(2):322-331.
- DUAN Xiong-wei, LIU Ya-ling, LI Hua-shou, et al. Effects of combined pollution of perchlorate and hexavalent chromium on soil enzyme activities and microbial population[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(2):322-331.
- [25] Mazadori C, Ciavatta C, Montecchio D, et al. Effects of lead pollution on different soil enzyme activities[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1/2):53-58.
- [26] 孟庆峰, 杨劲松, 姚荣江, 等. 单一及复合重金属污染对土壤酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2012, 21(3):545-550.
- MENG Qing-feng, YANG Jin-song, YAO Rong-jiang, et al. Influence of single and combined pollutions of heavy metal on soil enzyme activity[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(3):545-550.
- [27] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京:科学出版社, 1987:118-159.
- ZHOU Li-kai. Soil enzymology[M]. Beijing: Science Press, 1987:118-

- 159.
- [28] 高秀丽, 邢维芹, 冉永亮, 等. 重金属积累对土壤酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(3):331-336.
- GAO Xiu-li, XING Wei-qin, RAN Yong-liang, et al. Effects of accumulation of heavy metals in soils on enzyme activities[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(3):331-336.
- [29] Brookes P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19(4):269-279.
- [30] Xie W, Zhou J, Wang H, et al. Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization[J]. *Agriculture Eco-systems and Environment*, 2009, 129(4):450-456.
- [31] 环境保护部和国家质量监督检验检疫总局. GB 15168—2015 农用地土壤环境质量标准(二次征求意见稿)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- Ministry of Environmental protection of PRC and general administration of quality supervision, inspection and quarantine of PRC. GB 15168—2015 Soil environmental quality standard for agricultural land (The second draft)[S]. Beijing: China Standards Press, 2015.
- [32] Moreau C J, Klerks P L, Haas C N. Interaction between phenanthrene and zinc in their toxicity to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 37(2):251-257.
- [33] Teisseire H, Couderchet M, Vernet G. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination[J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 1998, 40(3):194-200.
- [34] 谷盼妮, 王美娥, 陈卫平. 环草隆与镉复合污染对城市绿地重金属污染土壤有机氮矿化量、基础呼吸和土壤酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4):65-87.
- GU Pan-ni, WANG Mei-e, CHEN Wei-ping. Combined effects of siduron and cadmium on organic nitrogen mineralization, basal respiration and enzyme activities in heavy metal polluted urban soil[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(4):65-87.
- [35] 闫 峰. 影响土壤中 Cr(VI)吸持与 Cr(III)氧化的主要土壤理化性质分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- YAN Feng. Environmental behavior of Cr(VI) uptake and Cr(III) oxidation as affected by soil properties[D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2010.
- [36] Liao Y P, Min X B, Yang Z H, et al. Physicochemical and biological quality of soil in hexavalent chromium-contaminated soils as affected by chemical and microbial remediation[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21:379-388.
- [37] 潘胜强, 王 铎, 吴 山, 等. 土壤理化性质对重金属污染土壤改良的影响分析[J]. 环境工程, 2013, 31(增刊):600-603.
- PAN Sheng-qiang, WANG Duo, WU Shan, et al. Impact of soil properties on improvement of heavy metal contaminated soil[J]. *Environmental Engineering*, 2013, 31(Suppl):600-603.