

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.05.015

邓青梅, 余文静, 江文宇, 等. 不同污染方式下铅对茶园土壤氮素转化及其相关微生物和酶活性的影响. 土壤, 2023, 55(5): 1054–1061.

# 不同污染方式下铅对茶园土壤氮素转化及其相关微生物和酶活性的影响<sup>①</sup>

邓青梅<sup>1</sup>, 余文静<sup>1</sup>, 江文宇<sup>1</sup>, 孙依萌<sup>1</sup>, 王泽楷<sup>1</sup>, 葛高飞<sup>2\*</sup>

(1 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036)

**摘要:** 为探讨不同污染方式的 Pb 对茶园土壤氮素转化的影响, 采用盆栽试验对累积和一次性添加不同浓度 Pb 条件下茶园土壤中氮素含量、相关微生物和酶活性进行了研究。结果表明: 累积污染处理的土壤中 Pb 全量和有效态含量高于一次污染处理。Pb 污染对土壤、茶苗植株的氮含量影响表现为: 增加土壤中全氮和 <sup>15</sup>N 含量, 减少茶苗地上部全氮和 <sup>15</sup>N 含量。添加 Pb 浓度为 900 mg/kg 时, 累积污染处理促进根系全氮和 <sup>15</sup>N 含量, 一次污染则显著抑制; 累积污染处理的茶苗根和地上部中的氮含量显著高于一次污染 ( $P<0.05$ )。Pb 污染对氮循环相关微生物的影响表现为: 氨化细菌、自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌的数量减少, 反硝化细菌的数量增加。Pb 的不同污染方式对茶园土壤与氮循环相关微生物数量的影响不显著 ( $P>0.05$ )。Pb 污染抑制脲酶、亚硝化还原酶和硝酸还原酶活性, 对蛋白酶活性存在“低促高抑”现象; 高浓度 Pb(900 mg/kg) 污染时, 累积处理显著增加土壤羟胺还原酶活性, 一次处理则显著抑制。两种污染方式对土壤脲酶、硝酸还原酶和羟胺还原酶活性的影响因 Pb 污染浓度的不同而存在较大差异。相关分析表明, 氮转化相关微生物数量(除反硝化细菌), 蛋白酶、亚硝酸还原酶和硝酸还原酶的活性与茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量均呈极显著的负线性关系 ( $P<0.01$ )。

**关键词:** 铅; 污染方式; <sup>15</sup>N; 微生物数量; 酶活性

**中图分类号:** S154.1 **文献标志码:** A

## Effects of Lead on Nitrogen Transformation and Related Microorganisms and Enzyme Activities in Tea Garden Soil Under Different Pollution Modes

DENG Qingmei<sup>1</sup>, YU Wenjing<sup>1</sup>, JIANG Wenyu<sup>1</sup>, SUN Yimeng<sup>1</sup>, WANG Zekai<sup>1</sup>, GE Gaofei<sup>2\*</sup>

(1 School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 Biotechnology Center of Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** A pot experiment was conducted to study nitrogen content, related microorganisms and enzyme activities in tea garden soil under different lead (Pb) concentrations under accumulation and one-time addition. The results showed that the total and available Pb contents in soil under accumulation treatment were higher than that under one-time addition. The effects of Pb pollution increased the contents of total nitrogen and <sup>15</sup>N in soil, but decreased the contents of total nitrogen and <sup>15</sup>N in overground part of tea plant. When Pb concentration was 900 mg/kg, the contents of total nitrogen and <sup>15</sup>N were promoted under accumulation treatments, and significantly decreased under the one-time treatments. The nitrogen contents in roots and shoots of tea seedlings under accumulation treatment was significantly higher than that under one-time addition ( $P<0.05$ ). The effects of Pb pollution decreased the numbers of ammonifying bacteria, azotobacter, nitrite bacteria and nitrate bacteria, but increased the number of denitrifying bacteria. The number of microorganisms related with nitrogen cycling were not significantly affected by different Pb addition modes ( $P>0.05$ ). Pb pollution inhibited the activities of urease, nitrifying reductase and nitrate reductase, and showed a phenomenon of “low promotion and high inhibition” on protease activity. When high concentrations of Pb (900 mg/kg) were added in soil, the cumulative treatment significantly increased the activity of soil

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41401278)、安徽省自然科学基金面上项目(2008085MC97)和安徽农业大学省级大学生创新训练基金项目(S202110364249)资助。

\* 通讯作者(gegaofei@ahau.edu.cn)

作者简介: 邓青梅(1997—), 女, 四川广安人, 硕士研究生, 主要从事农业土壤生态方面的研究。E-mail: 2873997378@qq.com

hydroxylamine reductase, while one-time treatment significantly inhibited it. The effects of two pollution modes on soil urease, nitrate reductase and hydroxylamine reductase activities varied greatly depending on the concentration of Pb pollution. Correlation analysis showed that the number of microorganisms related to nitrogen transformation (excluding denitrifying bacteria), nitrite reductase and nitrate reductase were significantly negatively correlated with the total and available Pb content in tea garden soil ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** Lead; Pollution mode;  $^{15}\text{N}$ ; Number of microorganisms; Enzyme activity

重金属污染因其存在的普遍性和难治理性而受到广泛关注。铅(Pb)作为五毒金属之一, 由于岩石的风化<sup>[1]</sup>, 工农业污水的排放<sup>[2]</sup>, 矿山的开采、冶炼<sup>[3]</sup>以及含 Pb 物质的使用, 环境中 Pb 逐步积聚, 浓度越来越高, 对人类造成了难以估量的损害。

茶叶作为中国主要的经济作物和出口产品, 其产量和品质受到越来越多的关注<sup>[4]</sup>。据相关报道, 茶叶中的 Pb 含量呈现逐年增加的趋势<sup>[5]</sup>。茶树作为叶用型经济作物, 对氮素的需求非常大, 氮不仅参与植物体内蛋白质、核酸、叶绿素、酶、维生素和生物碱的组成, 还能促进植物光合作用从而促进植物叶片生长, 因此茶叶的产量和品质与氮素供应密切相关<sup>[6]</sup>。土壤作为一个巨大的氮素存储库, 是植物氮素的主要来源。然而土壤中的氮绝大部分以有机态形式存在, 无机态只占全氮的 1%~5%, 绝大多数有机态氮只能转变为无机态氮才能被生物吸收利用<sup>[7]</sup>。土壤中氮素的转化过程离不开土壤微生物和酶的参与<sup>[8]</sup>。因此研究 Pb 污染对茶园土壤中氮转化相关微生物数量和酶活性具有重要意义。

有关茶叶与 Pb 污染方面的研究已有不少报道, 但主要集中在 Pb 污染对茶叶的生长及生理指标的影响以及茶园土壤中 Pb 形态的研究<sup>[9-10]</sup>。对于茶园土壤氮循环相关微生物和酶的研究较少, 且没有模拟茶园土壤低浓度 Pb 累积方面的研究。本文采用盆栽试验, 模拟 Pb 在茶园土壤中的累积过程, 探讨 Pb 不同污染方式(累积和一次性添加)对茶园土壤中氮素转化及其相关微生物数量和酶活性的影响, 为研究 Pb 对茶园土壤中氮转化的作用机理以及提高土壤 N 素的生物利用率提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试茶苗品种为舒茶早茶苗, 供试土壤采自安徽省六安市大别山附近种植 30 a 茶树的茶园, 土壤类型为黄棕壤。将采回的土壤混合均匀作为供试土壤, 取一部分混合均匀的土, 风干, 磨碎, 过筛后测定土壤基本理化性质<sup>[11]</sup>。土壤 pH 为 3.93, 有机质 22.9 g/kg,

全氮 1.25 g/kg, 水解氮 120.37 mg/kg, 阳离子代换量 1.98 cmol/kg, 全量 Pb 背景值为 9.84 mg/kg。盆栽试验于 2020 年 9—12 月在安徽农业大学大棚中进行。

### 1.2 试验设计

2020 年 9 月, 每盆称取供试风干土壤 3.5 kg, 培养 2 周后视为新鲜土, 移植茶苗 4 株/盆。向土壤中施入 Pb, 进行 Pb 胁迫处理, Pb 以  $\text{PbCl}_2$  形式添加。添加方式分为一次性添加(一次污染)和均匀地分 10 次添加(累积污染)。一次性添加分别称取 0.472 1、1.416 4、4.249 3 g  $\text{PbCl}_2$ , 将其均匀地混合到茶园土壤中, 得到土壤 Pb 浓度系列分别为 100 mg/kg(OL)、300 mg/kg(OM)和 900 mg/kg(OH)。累积添加每次分别称取 0.047 2、0.141 6、0.425 0 g  $\text{PbCl}_2$ , 溶于 50 mL 蒸馏水中, 添加 10 次, 每次间隔 10 d, 土壤中 Pb 的叠加累积施入的最终浓度系列分别为 100 mg/kg (ML)、300 mg/kg(MM)、和 900 mg/kg(MH)。其中不施加外源 Pb 为对照(CK), 共 7 个处理, 每个浓度处理设置 3 个重复, 共计 21 盆。在茶苗盆栽初始, 向每盆土壤施加  $^{15}\text{N}$  含量为 30% 的尿素 0.5 g/kg, 磷钾肥(磷酸二氢钾)0.44 g/kg。

2021 年 1 月取样, 去除土壤中根系和其他非土壤物质, 混合均匀, 一部分鲜土装入已灭菌的自封袋, 4 °C 冰箱中保存, 用于测定土壤微生物数量; 一部分土壤经风干, 磨碎, 过 2 mm 的筛后放入 4 °C 冰箱中保存, 用于土壤酶活性的测定。

### 1.3 测定方法

**1.3.1 有效 Pb 含量** 采用电感耦合等离子发射光谱仪(iCAP 7000 Series, Thermo, 德国)进行测定, 用 EDTA 溶液作为提取剂<sup>[11]</sup>。具体步骤: 称取 5.000 g 土样, 加入 25 mL 0.05 mol/L 的 EDTA 溶液, 振荡 2 h 后放入离心机, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液用水系滤膜(13 mm × 0.22 μm)过滤, 上机测定。

**1.3.2 全量 Pb 含量** 采用电感耦合等离子发射光谱仪(iCAP 7000 Series, Thermo, 德国)进行测定。称取 0.1000 g 土壤于消解管中, 加入 5 mL 硝酸、3 mL 双氧水、2 mL 氢氟酸, 将消解管放入消解仪中, 分别在 120、160 和 190 °C 消解 10、10 和 30 min; 消

解结束后, 揭下盖子, 放入赶酸仪中, 加入 1 mL 高氯酸, 在 160 °C 赶酸至近干, 转入 25 mL 容量瓶中定容。用水系滤膜(13 mm × 0.22 μm)过滤, 上机测定。

**1.3.3 微生物数量** 氨化细菌和自生固氮菌数量采用稀释涂布平板法测定<sup>[12]</sup>; 亚硝酸细菌、硝酸细菌和反硝化细菌数量采用最大或然数(MPN)稀释法测定<sup>[12]</sup>。

**土壤悬液制备:** 称取 10.00 g 新鲜土壤, 加入 90 mL 无菌水, 置于摇床上振荡(160 r/min, 30 min), 取出静置 5 min, 为 10<sup>-1</sup> 土壤悬液。取 10<sup>-1</sup> 土壤悬液 1 mL 加 9 mL 无菌水振荡均匀为 10<sup>-2</sup> 土壤悬液, 以此类推配制 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>...10<sup>-8</sup> 土壤悬液。

**涂布平板法:** 选择细菌合适的土壤悬液, 将悬液摇晃均匀, 吸取 100 μL, 加入相应培养基中, 用涂布器涂布均匀, 倒置于培养箱中, 28 °C 培养。每盆土壤做 3 个重复(氨化细菌和自生固氮菌都选取 10<sup>-2</sup> 土壤悬液)。

**MPN 稀释法:** 将配好的土壤悬液摇晃均匀, 分别选取 5 个不同浓度的土壤悬液, 每个浓度吸取 1 mL, 加入到装有 5 mL 无菌水的试管中, 置于 28 °C 恒温培养箱, 培养 14 h 后, 统计结果(硝酸细菌选取 10<sup>-2</sup>~10<sup>-6</sup> 土壤悬液; 硝酸细菌和反硝化细菌选取 10<sup>-4</sup>~10<sup>-8</sup> 土壤悬液)。

**1.3.4 土壤酶活性** 土壤蛋白酶<sup>[13]</sup>、脲酶<sup>[14]</sup>、亚硝酸还原酶<sup>[15]</sup>和羟胺还原酶<sup>[16]</sup>活性均参考相关文献, 用比色法进行测定。硝酸还原酶<sup>[17]</sup>活性参考相关文献采用全自动间断化学分析仪(EASYPLUS, Systea, 意大利)进行测定。

**1.3.5 茶苗和土壤的全氮和 <sup>15</sup>N 含量** 土壤和茶苗

的全氮和 <sup>15</sup>N 含量采用稳定同位素质谱仪(Flash EA Isolink CN - Delta V Advantage, Thermo, 美国)测定。

## 1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行单因素方差和一元线性回归分析, 多重比较采用 LSD 法。采用 Origin 2019 进行统计分析与作图。

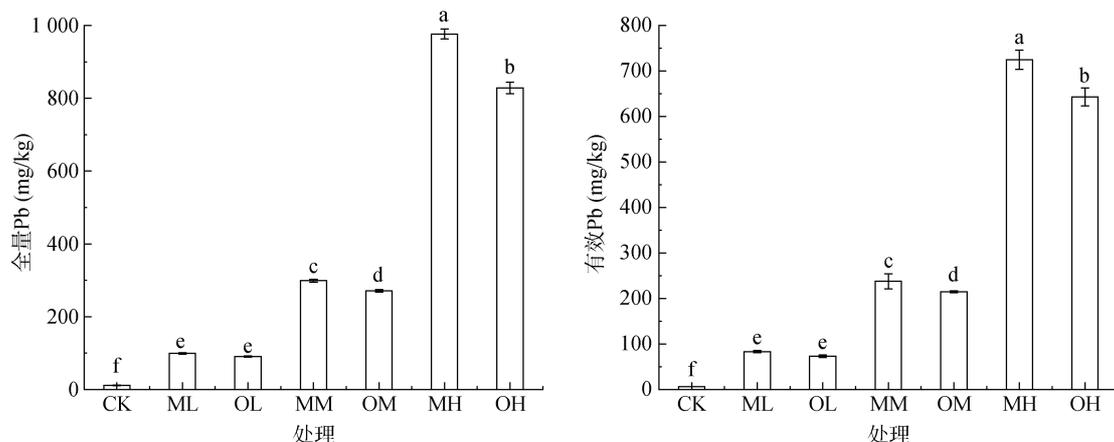
## 2 结果与分析

### 2.1 不同污染方式下茶园土壤 Pb 全量和有效态含量

不同方式添加 Pb 污染对茶园土壤 Pb 全量和有效态含量的影响如图 1 所示, 添加 Pb 对茶园土壤 Pb 全量和有效态含量影响趋势一致, 随着 Pb 浓度的增加, 土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量增加。Pb 浓度为 100、300 和 900 mg/kg 时, 累积污染处理下的茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量均高于一次污染, 且 Pb 浓度为 300 和 900 mg/kg 时, 差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。累积污染处理下茶园土壤有效 Pb 含量占总施入量的 79%~84%, 一次污染处理下茶园土壤有效 Pb 含量占总施入量的 71%~74%。不同方式添加 Pb 污染茶园土壤有效 Pb 含量占全量 Pb 的 74%~84%。

### 2.2 Pb 对土壤和茶苗氮含量的影响

Pb 污染导致茶园土壤中全氮和 <sup>15</sup>N 的含量增加(表 1)。与对照相比, Pb 浓度为 900 mg/kg 和一次性添加 Pb 浓度为 300 mg/kg 时显著增加土壤中的全氮含量; Pb 浓度为 300 和 900 mg/kg 时显著增加了土壤 <sup>15</sup>N 的含量。Pb 浓度相同时, 一次污染土壤中全氮和 <sup>15</sup>N 的含量高于累积污染(100 mg/kg 的 <sup>15</sup>N 的含量除外), 但差异均未达到显著水平( $P > 0.05$ )。



(图中小写字母不同表示处理间差异显著( $P < 0.05$ ), 下同)

图 1 不同处理对茶园土壤 Pb 全量和有效态含量的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on total and available Pb contents in tea plantation soil

表 1 不同处理对茶园土壤、根系和地上部的全氮和  $^{15}\text{N}$  含量的影响  
Table 1 Effects of different treatments on contents of total nitrogen and  $^{15}\text{N}$  in soil, roots and shoots of tea plant

处理	土壤全氮含量(g/kg)	土壤 $^{15}\text{N}$ 含量(mg/g)	根全氮含量(g/kg)	根 $^{15}\text{N}$ 含量(mg/g)	地上部全氮含量(g/kg)	地上部 $^{15}\text{N}$ 含量(mg/g)
CK	0.78 ± 0.14 c	0.031 ± 0.007 e	16.2 ± 1.2 ab	1.41 ± 0.14 ab	28.0 ± 2.10 a	2.49 ± 0.513 a
ML	0.84 ± 0.02 c	0.035 ± 0.001 cde	16.1 ± 3.6 ab	1.21 ± 0.42 ab	26.5 ± 0.54 a	2.08 ± 0.226 a
OL	0.85 ± 0.08 c	0.034 ± 0.003 de	16.9 ± 2.1 ab	1.25 ± 0.16 ab	27.0 ± 1.21 a	2.06 ± 0.114 a
MM	0.87 ± 0.04 bc	0.036 ± 0.002 bcd	15.1 ± 4.6 bc	1.11 ± 0.50 b	26.6 ± 1.76 a	2.03 ± 0.445 a
OM	0.95 ± 0.08 ab	0.038 ± 0.003 bc	15.9 ± 1.0 ab	1.10 ± 0.08 b	26.3 ± 1.84 a	2.13 ± 0.276 a
MH	0.97 ± 0.05 a	0.040 ± 0.002 ab	19.2 ± 0.8 a	1.58 ± 0.13 a	27.5 ± 1.26 a	2.17 ± 0.129 a
OH	1.00 ± 0.07 a	0.043 ± 0.003 a	12.1 ± 0.1 c	0.39 ± 0.00 c	18.6 ± 1.48 b	1.14 ± 0.082 b

注:  $n=6$ , 结果为平均值 ± 标准差; 同列数据小写字母不同表示处理间差异显著( $P<0.05$ ), 下表同。

不同添加方式 Pb 污染对茶苗根系和地上部全氮和  $^{15}\text{N}$  含量影响结果如表 1 所示。累积污染处理下茶苗根系全氮和  $^{15}\text{N}$  含量在 Pb 浓度为 100 mg/kg(ML) 和 300 mg/kg(MM) 时减少, 在 Pb 浓度为 900 mg/kg(MH) 时增加并达到最大, 分别为 19.2 g/kg 和 1.58 mg/g; 一次污染处理下, Pb 污染降低了茶苗根系全氮和  $^{15}\text{N}$  含量, 且随着 Pb 浓度的增加, 茶苗根系全氮和  $^{15}\text{N}$  含量呈一直减少的趋势, 在 Pb 浓度为 900 mg/kg(OH) 时最小, 分别为 12.1 g/kg 和 0.39 mg/g。Pb 污染降低了茶苗地上部全氮和  $^{15}\text{N}$  含量, 当 Pb 浓度为 100 mg/kg 和 300 mg/kg 时, 不同方式添加 Pb 对茶苗根系和地上部全氮和  $^{15}\text{N}$  含量影响差异不显著; Pb 浓度为 900 mg/kg 时, 累积污染处理下的茶苗根系和地上部的全氮和  $^{15}\text{N}$  含量均显著高于一次污染( $P<0.05$ )。

### 2.3 Pb 对茶园土壤氮转化微生物的影响

不同方式添加 Pb 污染对茶园土壤中 5 种可培养氮转化微生物的影响如表 2 所示。Pb 污染条件下茶园土壤氨化细菌数量与对照相比差异均不显著( $P>0.05$ )。Pb 污染降低了茶园土壤中自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌的数量, 相比于对照, Pb 浓度为 900 mg/kg 时自生固氮菌的数量显著降低; Pb 浓度为 300 mg/kg 和 900 mg/kg 时, 亚硝酸细菌的数量

显著降低; 一次性添加 300 mg/kg 或者 Pb 浓度达到 900 mg/kg, 硝酸细菌的数量显著降低( $P<0.05$ )。Pb 浓度相同时, 不同方式添加 Pb 污染对茶园土壤中氨化细菌、自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌数量的影响均不显著。累积污染 Pb 浓度为 900 mg/kg 时显著增加了茶园土壤中反硝化细菌的数量, 其他浓度 Pb 处理的反硝化细菌数量与对照相比差异不显著( $P>0.05$ )。

土壤 Pb 与氮素转化微生物数量的 Pearson 相关性分析如表 3 所示, 茶园土壤中 Pb 全量与有效态含量间呈现极显著的正相关关系。氨化细菌、自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌的数量与茶园土壤中 Pb 全量和有效态含量间呈现极显著的负相关关系, 而反硝化细菌的数量与茶园土壤中 Pb 全量和有效态含量间呈现极显著的正相关关系( $P<0.01$ )。

### 2.4 Pb 对茶园土壤氮转化酶活性的影响

由表 4 可知, 蛋白酶活性与茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量间均呈现出极显著的负相关关系( $P<0.01$ )。Pb 浓度为 100 mg/kg 时, 蛋白酶活性增加; Pb 浓度为 300 和 900 mg/kg 时, 其活性显著降低, 且随着 Pb 浓度增大, 蛋白酶活性下降幅度越大(表 5)。Pb 浓度相同时, 污染方式对茶园土壤蛋白酶活性影响差异不显著( $P>0.05$ )。

表 2 不同处理对茶园土壤氮素转化微生物数量的影响  
Table 2 Effects of different treatments on number of nitrogen transforming microorganisms in tea plantation soil

处理	氨化细菌( $10^5$ cfu/g)	自生固氮菌( $10^5$ cfu/g)	亚硝酸细菌( $10^5$ 个/g)	硝酸细菌( $10^5$ 个/g)	反硝化细菌( $10^5$ 个/g)
CK	7.11 ± 1.26 ab	4.79 ± 1.65 a	0.48 ± 0.10 a	15.37 ± 5.56 a	1.08 ± 0.00 b
ML	7.17 ± 3.15 ab	3.88 ± 1.02 ab	0.35 ± 0.04 a	13.54 ± 1.44 ab	0.92 ± 0.36 b
OL	7.30 ± 0.81 a	4.23 ± 0.96 ab	0.42 ± 0.12 a	14.51 ± 3.37 ab	0.89 ± 0.35 b
MM	6.58 ± 1.00 ab	3.29 ± 0.75 ab	0.20 ± 0.10 b	10.91 ± 1.43 abc	2.02 ± 1.00 b
OM	7.42 ± 0.40 a	4.13 ± 1.11 ab	0.17 ± 0.03 bc	9.79 ± 1.91 bc	0.92 ± 0.36 b
MH	5.87 ± 0.97 ab	2.79 ± 0.54 b	0.12 ± 0.03 bc	9.21 ± 0.74 bc	7.50 ± 2.68 a
OH	5.49 ± 1.09 b	2.33 ± 0.69 b	0.06 ± 0.02 c	7.27 ± 2.60 c	0.50 ± 0.00 b

注:  $n=3$ , 结果表示为平均值 ± 标准差, 下同。

表 3 土壤 Pb 全量和有效态含量与氮素转化微生物数量的 Pearson 相关性分析

Table 3 Pearson correlation analysis between total and available Pb contents in soil and the number of nitrogen-transforming microorganisms

	有效 Pb	全量 Pb	氨化细菌	自生固氮菌	亚硝酸细菌	硝酸细菌	反硝化细菌
有效 Pb	1						
全量 Pb	0.999**	1					
氨化细菌	-0.630**	-0.624**	1				
自生固氮菌	-0.635**	-0.628**	0.418	1			
亚硝酸细菌	-0.805**	-0.792**	0.575**	0.584**	1		
硝酸细菌	-0.666**	-0.653**	0.310	0.457*	0.619**	1	
反硝化细菌	0.576**	0.601**	-0.174	-0.250	-0.312	-0.222	1

注: \* 表示相关性达  $P < 0.05$  显著水平; \*\*表示相关性达  $P < 0.01$  显著水平。

表 4 土壤 Pb 全量和有效态含量与氮素转化酶活性的关系方程

Table 4 Relation equations between total and available Pb contents and activity of nitrogen invertase

氮素转化酶	一元回归方程	$R^2$	$P$
蛋白酶活性	$y = 7.465 - 0.006x_1$	0.726	0.000 0
	$y = 7.413 - 0.004x_2$	0.713	0.000 0
脲酶活性	$y = 0.292 - 0.000 05x_1$	0.185	0.125
	$y = 0.291 - 0.000 04x_2$	0.171	0.142
亚硝酸还原酶活性	$y = 0.440 - 0.000 1x_1$	0.523	0.000 2
	$y = 0.439 - 0.000 1x_2$	0.506	0.000 3
硝酸还原酶活性	$y = 0.569 - 0.001x_1$	0.706	0.000 2
	$y = 0.564 - 0.001x_2$	0.693	0.000 2
羟胺还原酶活性	$y = 0.157 + 0.000 04x_1$	0.098	0.166
	$y = 0.156 + 0.000 04x_2$	0.115	0.132

注:  $x_1$  为 EDTA 可提取态 Pb 含量;  $x_2$  为全量 Pb 含量。

表 5 不同处理对茶园土壤氮素转化酶活性的影响

Table 5 Effects of different treatments on soil nitrogen invertase activities in tea plantation

处理	蛋白酶(NH <sub>3</sub> -N, μg/g)	脲酶(NH <sub>3</sub> -N, mg/g)	亚硝酸还原酶(NO <sub>2</sub> -N, mg/g)	硝酸还原酶(NO <sub>3</sub> -N, mg/g)	羟胺还原酶(NH <sub>2</sub> OH, mg/g)
CK	7.05 ± 0.58 a	0.32 ± 0.01 a	0.48 ± 0.03 a	0.84 ± 0.03 a	0.19 ± 0.01 b
ML	7.90 ± 0.48 a	0.29 ± 0.00 ab	0.41 ± 0.02 bc	0.54 ± 0.04 b	0.15 ± 0.02 bc
OL	7.85 ± 0.90 a	0.29 ± 0.01 ab	0.44 ± 0.03 ab	0.35 ± 0.00 c	0.15 ± 0.02 bc
MM	5.39 ± 1.00 b	0.30 ± 0.00 ab	0.40 ± 0.01 bcd	0.26 ± 0.01 d	0.15 ± 0.01 bc
OM	5.89 ± 0.35 b	0.22 ± 0.03 c	0.38 ± 0.03 cd	0.27 ± 0.01 d	0.16 ± 0.03 bc
MH	3.83 ± 0.66 c	0.28 ± 0.00 b	0.36 ± 0.04 cd	0.06 ± 0.00 e	0.24 ± 0.02 a
OH	3.53 ± 0.60 c	0.24 ± 0.00 c	0.36 ± 0.02 d	0.03 ± 0.00 e	0.14 ± 0.02 c

脲酶活性与茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量间的相关性均不显著( $P > 0.05$ )(表 4)。Pb 污染抑制了茶园土壤脲酶活性,且随着 Pb 浓度的增加抑制作用增强(表 5)。一次性添加 300 mg/kg 的 Pb 或者添加 Pb 浓度达到 900 mg/kg 时会导致茶园土壤脲酶活性的显著降低。Pb 浓度为 300 mg/kg 和 900 mg/kg 时,污染方式显著影响脲酶活性,累积污染显著高于一次污染( $P < 0.05$ )。

亚硝酸还原酶活性与茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量间的相关性均达到极显著水平( $P < 0.01$ )(表 4)。Pb 污染显著降低了茶园土壤亚硝酸还原酶活性,且随着

Pb 浓度的增加抑制作用增强(表 5)。Pb 浓度相同时,污染方式对茶园土壤亚硝酸还原酶活性的影响不显著( $P > 0.05$ )。

硝酸还原酶活性与茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量间均呈极显著相关关系( $P < 0.01$ )(表 4)。Pb 污染显著降低了土壤硝酸还原酶的活性,且随着 Pb 浓度的增加,酶活性下降幅度增大(表 5)。Pb 浓度达到 900 mg/kg 时,硝酸还原酶的活性被抑制程度最大。土壤 Pb 浓度为 100 mg/kg 时,污染方式对硝酸还原酶活性具有显著影响,累积污染显著高于一次污染( $P < 0.05$ ); Pb 浓度为 300 和 900 mg/kg 时,累积污染

土壤的硝酸还原酶活性高于一次污染,但处理间差异不显著。

羟胺还原酶活性与茶园土壤中全量 Pb 和有效 Pb 含量均无显著相关性( $P>0.05$ )(表 4)。Pb 污染浓度为 100 和 300 mg/kg 时,对羟胺还原酶活性没有显著影响(表 5); Pb 污染浓度为 900 mg/kg 时,不同污染方式对羟胺还原酶活性影响不同,累积污染显著促进羟胺还原酶活性,一次污染则表现为明显的抑制效果( $P<0.05$ )(表 5)。

### 3 讨论

Pb 浓度增加,土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量增加,重金属由于其在环境存在时间长不易降解且具有累积性,因此添加 Pb 总量是影响茶园土壤 Pb 全量和有效态含量的最主要因素,这与钟晓兰等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。不同方式添加 Pb 污染对茶园土壤全量 Pb 和有效 Pb 含量的影响有差异。研究发现 Pb 的有效态随着时间的推移而减少<sup>[19]</sup>。累积污染 Pb 在土壤的老化时间较短,从而导致累积污染有效 Pb 含量高于一次污染。

高浓度的 Pb 胁迫干扰植物氮的代谢过程,推测一方面重金属抑制了茶树吸收土壤中的  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NH}_4^+$ ,另一方面重金属降低了茶树氮代谢同化过程的一些关键酶的活性,从而导致茶树根和茎中全氮和  $^{15}\text{N}$  含量减少<sup>[20]</sup>。但植物对重金属也具有一定的耐性,主要通过避免过量重金属进入植物体内,如把重金属固定在细胞壁或者转移到液泡中<sup>[21]</sup>;以及自身耐性机制减轻重金属的毒害作用如一些有机酸和蛋白质与重金属螯合<sup>[22]</sup>。在一定的重金属胁迫下,植物可以通过自身防御机制减轻重金属对自身的毒害作用。因此相比于累积添加和低浓度的一次性添加,只有在一次性添加高达 900 mg/kg 的外源 Pb 才会对植物根和茎中全氮和  $^{15}\text{N}$  含量产生显著影响。高浓度的重金属影响了生物体对于氮的吸收消耗,导致留在土壤中氮含量的增加。

Pb 胁迫减少了可培养氨化细菌、自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌数量;降低了蛋白酶、脲酶、硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的活性。Oliveira 和 Pampulha<sup>[23]</sup>研究了长期受污染问题地区的土壤,发现污染土壤样品中不同微生物类群的可培养总数明显减少。当环境中的重金属超过一定浓度时,会通过改变大分子的特异性、诱导活性氧产生、破坏细胞膜、损伤 DNA 结构以及与酶活性位点结合等途径对微生物和酶产生毒害作用<sup>[24]</sup>,从而导致微生物数量的减

少和酶活性的降低。本文研究结果表明:重金属对反硝化作用比硝化作用的影响更小,相比于硝化菌,反硝化菌更能耐受重金属胁迫,可能反硝化菌对重金属污染的适应发生得比硝化菌快得多,适应率可能与微生物多样性和生长速率有关,因为与生长缓慢和多样性较低的自养硝化种群相比,异养反硝化种群具有更大的多样性和生长速率<sup>[25]</sup>。Pb 不同添加方式对茶园土壤与氮循环相关微生物数量的影响不显著,可能是因为两种污染方式下同一污染浓度的有效 Pb 含量差异相对较小,土壤中与氮循环相关的微生物群落适应了该浓度范围的重金属毒性,因而同一污染浓度不同污染方式下土壤微生物数量差异不大。群落适应可以通过耐受群体的选择性增长和敏感群体的选择性衰退来解释<sup>[26]</sup>;也有研究发现微生物群落可以通过改变其组成和结构来快速适应重金属变化<sup>[27]</sup>。

重金属对土壤酶活性的影响因酶种类的不同而存在差异。低浓度的外源 Pb 会增加蛋白酶活性。王涵等<sup>[28]</sup>研究 Cd、Pb 严重污染的土壤中蛋白酶活性的变化,也得出了相似的结果。重金属不仅作为某些酶的重要辅因子影响酶活性,还可以通过影响底物间接影响酶活性。印杰等<sup>[29]</sup>研究崇明东滩湿地发现土壤中  $\text{Pb}^{2+}$  浓度为 100~500 mg/kg 时,硝酸还原酶活性会被抑制。Pb 胁迫下硝酸还原酶活性降低,可能是因为重金属破坏了土壤的硝化过程导致土壤中植物可利用的硝酸盐含量少,硝酸还原酶可利用底物减少,使得其活性降低。高浓度的 Pb 胁迫对于茶园土壤羟胺还原酶有一定的激活作用,其原因可能是高浓度的 Pb 促进了亚硝酸盐的还原或者氨的氧化过程,产生较多的羟胺,刺激了羟胺还原酶的活性。脲酶对重金属污染敏感,通常用脲酶活性作为判断土壤重金属污染程度的生化指标<sup>[30]</sup>。本研究结果表明,与其他酶相比,脲酶对茶园土壤 Pb 污染的敏感度并不高,可能是因为土壤理化性质和种植作物不同。李雨桐等<sup>[31]</sup>研究发现土壤理化性质和环境是影响土壤微生物的重要因素。Deng 等<sup>[32]</sup>评估了 37 个环境因素对土壤微生物群落的不同影响,也发现除了重金属,土壤 pH、土壤质地和氮被认为在塑造土壤微生物群落方面具有重要作用。本研究的结果表明: Pb 的不同添加方式对茶园土壤氮转化酶活性的影响不同,累积污染和一次污染对茶园土壤蛋白酶和亚硝酸还原酶活性影响无显著差异;对于硝酸酶还原酶、脲酶和羟胺还原酶则表现为浓度不同显著性不同。产生这样结果的原因是不同种类的酶对重金属 Pb 的耐受性不同。

## 4 结论

1) Pb 浓度相同时, 累积污染处理土壤中 Pb 全量和有效态含量显著高于一次污染。Pb 污染增加了茶园土壤中全氮和  $^{15}\text{N}$  含量, 降低了茶苗植株的全氮和  $^{15}\text{N}$  含量(MH 除外)。污染方式对茶园土壤中全氮和  $^{15}\text{N}$  含量没有显著影响, 高浓度 Pb 污染(900 mg/kg) 条件下, 累积污染处理的茶苗植株全氮和  $^{15}\text{N}$  含量显著高于一次污染。

2) 反硝化细菌能耐受较高浓度的 Pb 污染。氨化细菌、自生固氮菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌的数量与茶园土壤中全量和有效 Pb 含量间呈现极显著的负相关关系, 反硝化细菌的数量则与土壤全量和有效 Pb 含量间呈现极显著的正相关关系。

3) 蛋白酶、亚硝酸还原酶和硝酸还原酶与茶园土壤中全量和有效 Pb 含量间均呈极显著的负相关关系。两种污染方式对土壤脲酶、硝酸还原酶和羟胺还原酶活性的影响因 Pb 污染浓度的不同而存在较大差异。土壤硝酸还原酶更易受到茶园土壤 Pb 胁迫的影响, 其活性作为预测茶园土壤 Pb 污染程度的主要生化指标具有一定的可行性。

### 参考文献:

- [1] Lee P K, Kang M J, Jeong Y J, et al. Lead isotopes combined with geochemical and mineralogical analyses for source identification of arsenic in agricultural soils surrounding a zinc smelter[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 382: 121044.
- [2] Karimi A, Naghizadeh A, Biglari H, et al. Assessment of human health risks and pollution index for heavy metals in farmlands irrigated by effluents of stabilization ponds[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(10): 10317–10327.
- [3] Wen H J, Zhang Y X, Cloquet C, et al. Tracing sources of pollution in soils from the Jinding Pb-Zn mining district in China using cadmium and lead isotopes[J]. *Applied Geochemistry*, 2015, 52: 147–154.
- [4] Li W B, Cheng H Y, Mu Y J, et al. Occurrence, accumulation, and risk assessment of trace metals in tea (*Camellia sinensis*): A national reconnaissance[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 792: 148354.
- [5] 姜红艳, 龚淑英. 茶叶中铅含量现状及研究动态[J]. *茶叶*, 2004, 30(4): 210–212.
- [6] 周德超. 氮、磷、钾在植物体中的主要生理作用及植物对养分的吸收[J]. *生物学通报*, 1983, 18(5): 7–8.
- [7] Landesman W J, Dighton J. Response of soil microbial communities and the production of plant-available nitrogen to a two-year rainfall manipulation in the New Jersey Pinelands[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10): 1751–1758.
- [8] Gruber N, Galloway J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 293–296.
- [9] 夏建国, 兰海霞, 吴德勇. 铅胁迫对茶树生长及叶片生理指标的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(1): 43–48.
- [10] 石元值, 韩文炎, 马立锋, 等. 不同茶园土壤中外源铅的形态转化及其生物有效性[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6): 1117–1124.
- [11] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [12] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [13] 隋跃宇, 陈一民, 焦晓光, 等. 土壤蛋白酶的测定方法: CN105784695B[P]. 2019-03-26.
- [14] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [15] 武志杰, 孙志梅, 张丽莉. 一种检测土壤亚硝酸还原酶活性的分析方法: CN1979134A[P]. 2009-06-03.
- [16] 武志杰, 史云峰, 陈利军, 等. 一种检测土壤中羟胺还原酶活性的分析方法: CN101082567A[P]. 2007-12-05.
- [17] 刘涛, 褚贵新, 雷雨. 一种土壤硝酸还原酶活性测定的新方法: CN110643676A[P]. 2020-01-03.
- [18] 钟晓兰, 周生路, 黄明丽, 等. 土壤重金属的形态分布特征及其影响因素[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(4): 1266–1273.
- [19] 田园, 王晓蓉, 林仁漳, 等. 土壤中镉铅锌单一和复合老化效应的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1): 156–159.
- [20] 祖艳群, 李元, Bock L, 等. 重金属与植物 N 素营养之间的交互作用及其生态学效应[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1): 7–14.
- [21] Leita L, De Nobili M, Cesco S, et al. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1996, 19(3/4): 527–533.
- [22] 孙瑞莲, 周启星. 高等植物重金属耐性与超积累特性及其分子机理研究[J]. *植物生态学报*, 2005, 29(3): 397–404.
- [23] Oliveira A, Pampulha M E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(3): 157–161.
- [24] Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18(2): 321–336.
- [25] Feng B, Fang Z, Hou J C, et al. Effects of heavy metal wastewater on the anoxic/aerobic-membrane bioreactor bioprocess and membrane fouling[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 32–38.
- [26] Diaz-Ravina M, Baath E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2970–2977.
- [27] Zhao X Y, Tan W B, Peng J J, et al. Biowaste-source-dependent synthetic pathways of redox functional groups

- within humic acids favoring pentachlorophenol dechlorination in composting process[J]. *Environment International*, 2020, 135: 105380.
- [28] 王涵, 高树芳, 罗丹, 等. Cd Pb 污染土壤中蛋白酶酸性磷酸酶脱氢酶活性的变化[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(3): 500–505.
- [29] 印杰, 范弟武, 徐莎, 等. 崇明东滩湿地土壤中  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 和  $\text{Cd}^{2+}$  对硝酸还原酶的Hormesis效应[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2016, 40(2): 21–26.
- [30] 洪春来, 贾彦博, 王润屹, 等. 铅污染对土壤微生物及酶活性的影响[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(12): 304–307.
- [31] 李雨桐, 杨杉, 张艺, 等. 不同地区土壤古菌群落对重金属污染的响应[J]. *环境科学*, 2021, 42(9): 4481–4488.
- [32] Deng S Q, Ke T, Li L T, et al. Impacts of environmental factors on the whole microbial communities in the rhizosphere of a metal-tolerant plant: *Elsholtzia haichowensis* Sun[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 1088–1097.