

## 高浓度铀污染对农田土壤酶活性及微生物代谢的短期影响

黄森<sup>1</sup> 陈晓明<sup>1,2</sup> 张谷禹<sup>1</sup> 黄佳丽<sup>1</sup> 张莉丽<sup>1</sup> 徐宇轩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010)

<sup>2</sup>(核废物与环境安全省部共建协同创新中心 绵阳 621010)

**摘要** 为了探究铀污染对农田土壤微生态的短期影响,本研究考察了4种参与土壤关键过程的酶活性( $\beta$ -葡萄糖苷酶、脲酶、磷酸酶和芳基硫酸酯酶),并通过Biolog EcoPlate技术分析了微生物代谢活性、碳利用能力和多样性在短期(3 d、13 d、20 d)铀处理(0 mg/kg、50 mg/kg、200 mg/kg、500 mg/kg)下的变化。结果表明:除脲酶外,铀污染抑制了其他3种土壤酶的活性,尤其是磷酸酶在20 d U500处理组中酶活性降低了75.9%;微生物代谢活性也受到了铀污染的抑制作用,但随处理时间的延长抑制效果表现出下降趋势;微生物对Eco板中的6大类碳源的利用能力均表现抑制作用,但微生物对氨基酸、碳水化合物和多聚物类碳源的利用能力在U50处理组中与时间呈正相关;通过多样性指数和PCA分析发现,微生物多样性随铀污染的影响不大。因此,铀污染会抑制农田土壤微生物的代谢活动,尤其是碳、磷、硫的循环过程,这也为农田土壤铀污染的生态修复工作提供了一个方向。

**关键词** 铀污染,农田土,土壤酶,Biolog EcoPlate,微生物多样性

**中图分类号** X53, X591

**DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2022-0022

### Short-term effects of high-concentration uranium pollution on soil enzyme activity and microbial metabolism in farmland soil

HUANG Sen<sup>1</sup> CHEN Xiaoming<sup>1,2</sup> ZHANG Guyu<sup>1</sup> HUANG Jiali<sup>1</sup> ZHANG Lili<sup>1</sup> XU Yuxuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

<sup>2</sup>(National Co-Innovation Center for Nuclear Waste Disposal and Environmental Safety, Mianyang 621010, China)

**ABSTRACT** To explore the short-term impact of uranium pollution on the microecology of farmland soil, this study investigated the activities of four enzymes involved in key soil processes ( $\beta$ -glucosidase, urease, phosphatase, and arylsulfatase) and analyzed the changes in microbial metabolic activity, carbon utilization capacity, and diversity using Biolog EcoPlate under short-term (3 d, 13 d, and 20 d) uranium treatments (0 mg/kg, 50 mg/kg, 200 mg/kg, and 500 mg/kg). The results showed that the activities of the three soil enzymes, except that of urease, were inhibited by uranium pollution, especially phosphatase activity, which was reduced by 75.9% in the 20-day U500 treatment group. In addition, microbial metabolic activity was inhibited by uranium pollution. However, the inhibition effect showed a downward trend with the extension of the treatment time. The carbon metabolism capacity of microorganisms was inhibited. By contrast, the ability of microorganisms to utilize amino acids, carbohydrates, and

第一作者: 黄森,男,1995年6月出生,2018年于西南科技大学获得学士学位,目前为研究生

通信作者: 陈晓明,教授, E-mail: 877753845@qq.com

收稿日期: 初稿 2022-03-07; 修回 2022-05-11

First author: HUANG Sen (male) was born in June 1995, and obtained his bachelor's degree from Southwest University of Science and Technology in 2018. Now he is a graduate student

Corresponding author: CHEN Xiaoming, professor, E-mail: 877753845@qq.com

Received 07 March 2022; accepted 11 May 2022

polymer carbon sources was positively correlated with time in the U50 treatment group. The results of diversity indices analysis and sho principal component analysis wed little effect on the microbial diversity of uranium contamination. Therefore, uranium pollution inhibited the metabolic activities of farmland soil microorganisms, especially the carbon, phosphorus, and sulfur cycles. This study provides a direction for the ecological restoration of farmland soil uranium pollution.

**KEYWORDS** Uranium pollution, Farmland soil, Soil enzymes, Biolog EcoPlate, Microbial diversity

**CLC** X53, X591

随着人类社会的快速发展,能源消耗的速度也越来越快,对铀元素的需求也在不断增加。据世界核协会报道,仅2020年全球铀消耗为 $6.824 \times 10^7$  kg,国内的铀需求为 $9.834 \times 10^6$  kg。在铀矿开采过程中从矿井排出的废水也含有镭等放射性核素,这些废水将会无可避免地排放到地表,进而对当地土壤生态和地下水系统造成破坏<sup>[1]</sup>,使土壤功能弱化<sup>[2-4]</sup>。土壤具有维持植物生产力、维持或改善水和空气质量、促进动植物健康等生态功能<sup>[5]</sup>,对生态系统平衡及全球气候变化具有极其重要的意义。为此,评估污染物对土壤生态的影响有助于探究工业化进程可持续发展的解决方案<sup>[6]</sup>。

土壤酶活是土壤生态质量和生态功能的影响因素之一<sup>[7]</sup>,它们的活性与土壤物理化学性质、微生物群落结构、植被管理、演替、土地利用、气候和土壤剖面深度有关。它可以非常敏感地响应土壤的质量变化,土壤生态中微小的环境变化都可以在土壤酶活中反映出来。酶活性可代表土壤中生化反应的速率,这使它们成为生物活动、能量转移、污染物解毒、重金属固定化、植物生产和物质循环的理想指标<sup>[8]</sup>。Pankaj等<sup>[9]</sup>通过构建不同功能基因与其相应酶活性的数学模型,发现土壤微生物群落功能基因丰度可以预测碳降解酶活性的变化。Nicholas等<sup>[10]</sup>通过测量干旱10个月后土壤中 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶等生物酶,得出了水势的变化可能从根本上改变热带土壤的功能潜力和活动的结论。土壤中含有大量参与碳、氮、磷、硫这4类主要营养元素循环的生物酶,其中 $\beta$ -葡萄糖苷酶、脲酶、磷酸酶和芳基硫酸酯酶活性分别对应了4种循环的关键过程<sup>[11-12]</sup>,探究环境变化对这4类酶活性的影响,可在一定程度上从侧面反映出土壤肥力随环境因子的变化关系。

微生物新陈代谢是其体内发生的所有生化反应的总和,为微生物的生长、发育以及活动提供了所需的能量。碳是构成生物体的最主要元素,所有微生物都必须获得足够的碳源作为代谢底物以维持其生长发育。Biolog EcoPlate技术正是基于微生

物对碳源的需求而设计的一种探究环境微生物群落的方法,Eco板类似于常规的96孔酶标板,其底部含有连接有四唑类显色物质的碳源,板内共包含31种碳源(每种碳源具有3个重复),并被人为划分为6大类(碳水化合物、酚酸、氨基酸、胺、羧酸和多聚物),通过计算微生物对不同碳源的利用能力获得环境微生物的代谢活性和群落多样性<sup>[13]</sup>。

本研究设计了一个铀污染土壤模拟实验,其中铀处理浓度分别为0 mg/kg、50 mg/kg、200 mg/kg和500 mg/kg,并且在铀处理第3天、第13天和第20天时分别采集土壤样品,考察其中 $\beta$ -葡萄糖苷酶、脲酶、磷酸酶和芳基硫酸酯酶活性的变化,通过Biolog EcoPlate技术考察了铀污染对土壤微生物代谢活性、碳利用能力和微生物多样性的影响,旨在探究高浓度铀污染对农田土壤微生态的影响,并对后期农田土壤的铀污染修复工作提供指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 铀污染模拟小区的构建

模拟小区通过3×7个聚丙烯塑料制成的箱子(长×宽×高=25 cm×25 cm×60 cm,未封顶)组成,铀污染土壤为25 kg(干重)。

#### 1.1.1 土壤采集点介绍

模拟小区中所使用的土壤采集于四川省绵阳市涪城区青义镇附近农田(31°32'44"N, 104°41'24"E),采样点周边区域日照充足、植被丰富。土壤本体为棕色土,其铀含量为0.133 mg/kg,pH为6.39,有机质为20.775 g/kg,属于肥沃的农田土壤。

#### 1.1.2 实验供土采集与预处理

用铁锹除去土壤表面植被后,挖取适量土壤自然风干,随后过2 mm筛。随后向土壤中添加外源铀,具体操作如下:取适量的硝酸铀酰( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , AR,北京华威瑞科)配置为500 mL水溶液,并仔细混入表层土中,为了比较低浓度和高浓度铀

污染对土壤微生态影响的差异,具体的铀添加量为 0 mg/kg、50 mg/kg、200 mg/kg 和 500 mg/kg(干土),其中 0 处理为对照组(即仅有 ddH<sub>2</sub>O),并分别记作 U0、U50、U200 和 U500。称取适量的硝酸铀酰,并配置成 500 mL 的铀酰溶液,随后以喷雾的形式缓慢地将铀酰溶液逐层加入至表层土中,混合均匀后便装入模拟小区中,每个浓度的铀处理重复 3 次。将模拟小区置于玻璃房内,并用空调将室内温度维持在 25 °C,每天向每个小格中均匀撒入 50 mL ddH<sub>2</sub>O,以防止水分过度挥发。铀处理 3 d、13 d 和 20 d 时分别用无菌采样器采集模拟小区中的土壤样品,样品 4 °C 保存并迅速测量。

## 1.2 土壤酶活性的测量

为了探究铀污染对农田土壤养分循环的影响,选择了 4 种参与土壤养分循环的关键酶活性,即  $\beta$ -葡萄糖苷酶(碳循环)、脲酶(氮循环)、磷酸酶(磷循环)和芳基硫酸酯酶(硫循环)。其具体测量过程如下: $\beta$ -葡萄糖苷酶和磷酸酶活性由荧光法测得,即分别以 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶代谢、4-甲基伞形酮-磷酸酯为底物,当底物被酶水解后会释放出 4-甲基伞形酮为产物,通过多功能全波长酶标仪在 360 nm 波长激发后,能够在 460 nm 波长下检测出荧光值,最后通过释放的荧光值计算出 4-甲基伞形酮的含量。酶活性表示为 1 g 干土在 1 h 内生成 4-甲基伞形酮的摩尔数<sup>[14]</sup>。脲酶测量的过程中使用尿素作为其测量底物,反应 6 h 后用苯酚钠-次氯酸钠测定体系中的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的含量,脲酶的活性以 1 g 干土在 6 h 内生成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的质量(mg)表示<sup>[15]</sup>。土壤芳基硫酸酯酶则是通过对硝基苯基连接的底物进行测量,即以硝基苯基硫酸酯钾盐作为酶促反应底物<sup>[12]</sup>,在缓冲液体体系中反应 1 h 后测量体系中对硝基苯酚的生成量,芳基硫酸酯酶的活性以 1 g 干土在 1 h 内生成的对硝基苯酚的质量( $\mu$ g)表示。

## 1.3 Biolog EcoPlate 操作流程

Biolog EcoPlate 技术主要是用于分析环境微生物的代谢活性,通过微生物对不同碳源的利用能力可分析环境微生物的代谢多样性指数,该技术对土壤微生态研究有着重要意义。Biolog EcoPlate 的具体操作流程如下:向无菌三角瓶中称取 6 g 新鲜土样,并向其中加入 54 mL 无菌水(将土样稀释 10 倍),于 30 °C 120 r/min 的恒温摇床中放置 30 min,制得土壤悬液。随后用无菌水将土壤悬液稀释 100

倍,并移取稀释后的液体于 Biolog Eco 板中(每孔 150  $\mu$ L, Biolog, 美国),将含有土壤悬液的 Eco 板放置于 30 °C 恒温培养箱中,每隔 24 h 通过 Microstation (Biolog, 美国)测量其 590 nm 处吸光值。

## 1.4 数据处理

Biolog EcoPlate 的数据计算、ANOVA 方差分析、微生物多样性计算、PCA 分析均由 R 语言完成,数据可视化工作由 R 和 Graph Pad 8 共同完成。微生物对不同类型碳源的利用能力、微生物群落多样性和 PCA 分析均选择 72 h 的数据进行分析。

### 1.4.1 微生物代谢活性

Biolog EcoPlate 中每个微孔均含有一种链接有四唑类显色物质的碳源,接种环境样本之后,微生物以微孔中的碳源为底物进行新陈代谢,并且使四唑类物质显色,代谢活性越高,颜色越深。通过分光光度计读取不同时间的吸光度,可反映微生物的代谢活性<sup>[13]</sup>。本研究中,微生物代谢活性由孔的平均颜色变化(Average well color development, AWCD, 变量记为  $A_{wcd}$ )表示,其含义是计算 Eco 板中所有孔在 590 nm 处吸光值变化的平均值,用公式(1)计算。

$$A_{wcd} = \frac{1}{31} \sum_{i=1}^{31} (C_i - R) \quad (1)$$

式中: $C_i$ 为每孔在 590 nm 处的吸光值; $R$ 为对照孔在 590 nm 处的吸光值;31 表示 Eco 板中的 31 种碳源。

土壤微生物对每一类碳源的利用能力是通过计算 Eco 板在每类碳源的  $A_{wcd}$  值实现的,用公式(2)计算。

$$A_{wcd} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (C_m - R) \quad (2)$$

式中: $C_m$ 为每类碳源在 590 nm 处的吸光值; $n$ 表示 Eco 板中存在  $n$  种该类碳源。

### 1.4.2 微生物多样性

由 Biolog EcoPlate 技术计算的微生物碳代谢能力可以从一定程度上研究微生物代谢多样性,众多学者以此为基础推导出一系列用 Eco 板数据计算微生物群落多样性的公式,其中应用非常广泛的包括 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )<sup>[16]</sup>、Shannon 均匀度指数( $E$ )<sup>[17]</sup>和 Simpson 多样性( $D$ )<sup>[18]</sup>,用公式(3)~(6)计算。

$$H' = \sum P_i \cdot \ln P_i \quad (3)$$

$$E = \frac{H'}{\ln S} \quad (4)$$

$$D = 1 - \sum P_i^2 \quad (5)$$

$$P_i = \frac{C_i - R}{\sum (C_i - R)} \quad (6)$$

式中： $S$ 表示Eco板中碳源总数(31)。

## 2 结果与分析

### 2.1 铀污染对土壤酶活性的影响

$\beta$ -葡萄糖苷酶、脲酶、磷酸酶和芳基硫酸酯酶等4种土壤酶的活性对土壤养分循环过程中都具有关键的作用,其酶活性对土壤生态具有重要意义。铀污染对其酶活性的影响如图1所示,对照组的酶活性在不同处理时间均出现了显著性差异,这表明在

铀处理过程中还存在其他环境因子对土壤酶活性造成了一定的影响。铀污染对4种酶活性均产生了一定的影响,但4种酶对铀污染的响应方式却存在一定差异。

$\beta$ -葡萄糖苷酶活性在不同铀处理下均受到了抑制作用,在第20天时受抑制程度达到最大(43.7%~67.7%)。脲酶活性在3个铀处理周期中对铀污染的响应方式变化较大,其活性在第13天时与铀处理浓度表现为极显著的负相关( $p < 0.001$ ),而在第3天、20天时,铀污染则显著促进了脲酶活性( $p < 0.05$ )。磷酸酶则在第3天时,U50处理组促进了其酶活性,其他处理组则对酶活性表现为抑制作用。在第13天时,各处理组未与对照组表现为显著性差异,当时间延长至20 d时,则所有处理组均对磷酸酶活性具有显著的抑制作用,尤其是U500处理组使其活性降低了75.9%。同时期内各处理组的芳基硫酸酯酶活性差异不大( $\leq 20.8\%$ ),在第3天时,U50处理组具有显著的促进作用,而在第13天、第20天时芳基硫酸酯酶活性均受到铀污染的抑制。

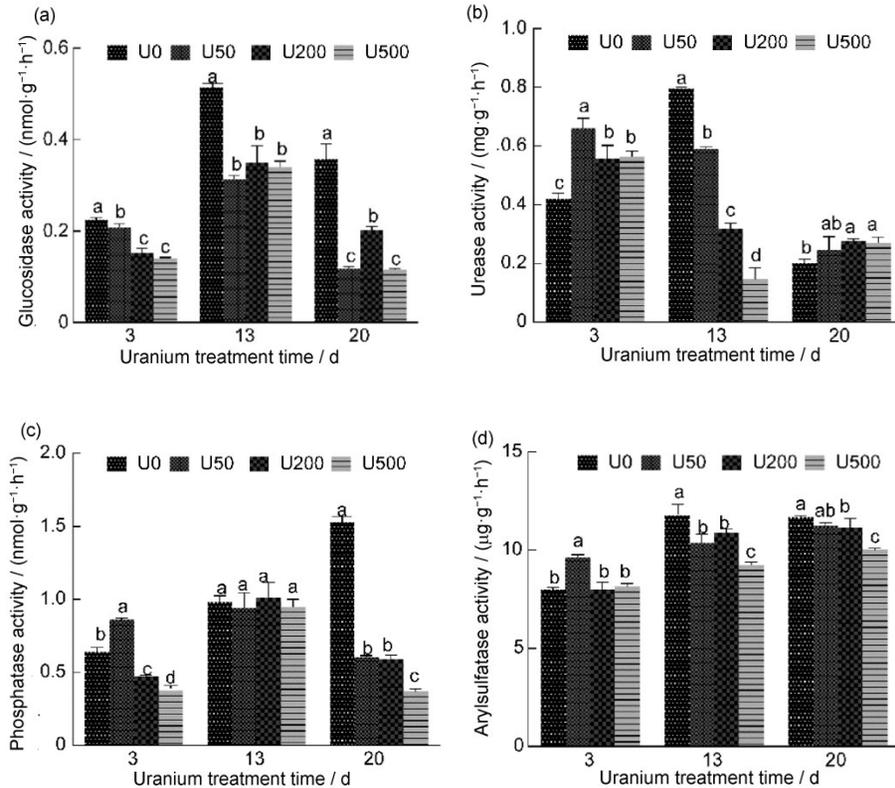


图1 铀污染对土壤酶活性的影响:(a)  $\beta$ -葡萄糖苷酶;(b)脲酶;(c)磷酸酶;(d)芳基硫酸酯酶; 同时间段内图柱上方不同小写字母表示不同处理组间的显著性差异( $p < 0.05$ )

Fig.1 Effects of uranium pollution on soil enzyme activity: (a)  $\beta$ -glucosidase; (b) urease; (c) phosphatase; (d) arylsulfatase; different lowercase letters above the bars in the same time period indicate significant differences among different treatments ( $p < 0.05$ )

### 2.2 铀污染对土壤代谢活性的影响

为了探究铀污染后土壤微生物代谢活性的整体变化,通过 Biolog EcoPlate 技术对土壤样品进行了分析。结果如图 2 所示,土壤微生物在 Eco 板中的生长过程总体呈现出“S”型曲线,其中 0~24 h 是微生物生长的适应期,由于土壤悬液中的微生物数量较少,同时微生物还需要适应 Eco 板中的生长环境,故而在适应期阶段的微生物代谢速度比较缓慢。24~96 h 则是土壤微生物的对数生长期,这一阶段的特征是营养物质充足、微生物数量呈指数倍增长,故而微生物的代谢速率最快。在 Eco 板中培养 96 h

之后,由于 Eco 板孔内的营养物质被逐渐耗尽,微生物内部竞争加剧,导致微生物的生长也进入了平台期和衰亡期,微生物代谢也开始不断降低。

在第 3 天时,  $A_{wcd}$  值在 0~24 h 内的斜率大于第 13 天、第 20 天的斜率,表明该阶段内微生物代谢速率较高。同时, U50 处理组在第 3 天时的土壤样品中  $A_{wcd}$  值在平衡后仅为 1.29,显著低于其他土壤样品 (1.47~1.74),表明微生物代谢活性受到铀污染的抑制作用。但随着铀处理时间的延长,其抑制效果不断降低,直至第 20 天时, U50 处理组中平衡后的  $A_{wcd}$  值达到了 1.58,并显著高于其他处理组,表明在该条件下微生物代谢活性受到了铀的促进作用。

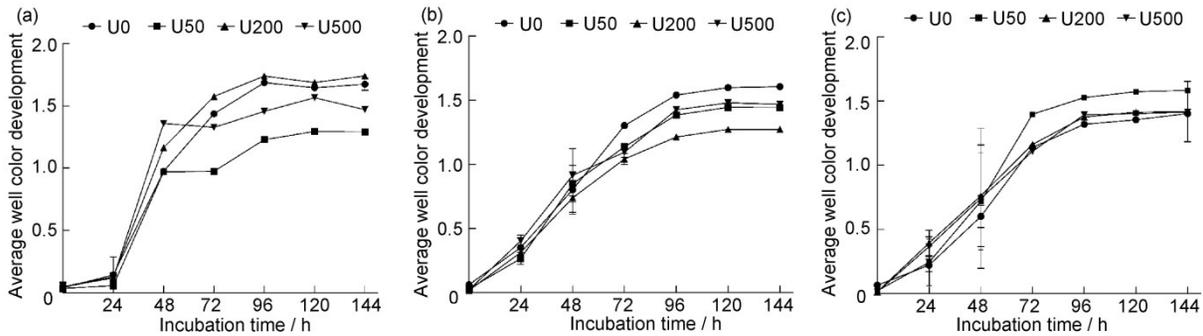
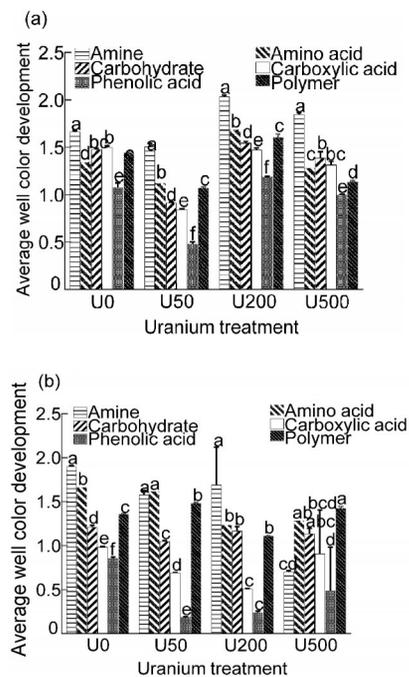


图 2 铀污染对土壤微生物代谢活性的影响,铀处理:(a) 第 3 天;(b) 第 13 天;(c) 第 20 天  
Fig.2 Effects of uranium pollution on soil microbial metabolic activity, the (a) 3rd; (b) 13th; and (c) 20th days of uranium treatment

### 2.3 微生物碳利用能力对铀污染的响应

Biolog EcoPlate 中共有 31 种碳源,根据这些碳源的结构和性质相似性,它们又被划分为 6 大类,分别是碳水化合物类、羧酸类、胺类、氨基酸类、酚酸类和多聚物类。通过计算微生物对数生长期中 6 大类碳源的  $A_{wcd}$  值,则可以在一定程度上了解微生物群落对不同碳源利用能力的变化。结果如图 3 所示,在本研究中土壤微生物对胺类物质的利用能力在绝大多数情况下都显著高于其他碳源物质,对酚酸的利用能力则均为最低。在 U50 处理组中,微生物对氨基酸、碳水化合物和多聚物的利用能力随铀处理时间而不断提升,而碳水化合物在 U500 处理组中则有完全相反的变化趋势。在第 3 天时,微生物对 Eco 板中 6 大类碳源的利用能力均受到了显著的抑制作用,并显著低于其他铀处理组。在第 20 天时,铀处理组中微生物对多聚物类碳源的利用能力随浓度上升而降低,但均高于对照组。



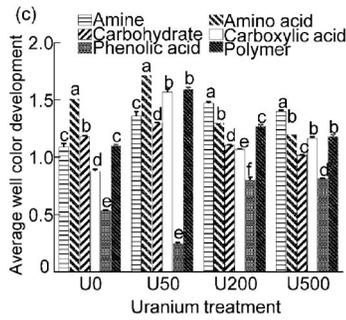


图3 铀污染对土壤微生物碳代谢能力的影响,铀处理:(a)第3天;(b)第13天;(c)第20天;同组图柱上方不同小写字母表示不同处理间差异显著( $p < 0.05$ )

Fig.3 Effects of uranium pollution on soil microbial carbon metabolism capacity: the (a) 3rd; (b) 13th; and (c) 20th days of uranium treatment; different lowercase letters above the columns in the same group indicate significant differences among different treatments ( $p < 0.05$ )

#### 2.4 铀污染对土壤微生物群落多样性的影响

土壤微生物代谢多样性是反映土壤肥力和生态功能的重要指标,通过微生物对不同碳源利用情况计算得到的微生物多样性指数如表1所示。首先这3个多样性指数表现出了极显著的相关性( $p < 0.001$ ),在不同处理组中它们均表现出一致的变化趋势。在整个研究中,土壤微生物群落多样性均未出现较大幅度的变化,其中 Shannon-Wiener 多样性和 Shannon 均匀度指数的变化幅度均为 4.6%,而 Simpson 指数的变化幅度仅为 0.8%。U50 处理组的微生物群落多样性指数在第3天时受到了抑制作用,且显著低于其他处理组( $p < 0.05$ ),而在第20天时却并未与对照组表现出显著性差异( $p > 0.05$ )。

表1 铀污染对土壤微生物群落多样性的影响  
Table 1 Impact of uranium pollution on the diversity of soil microbial communities

处理时间 / d	铀处理浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	$H'$	$E$	$D$
Time	Concentration			
3	0	$3.30 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$
	50	$3.17 \pm 0.01^b$	$0.92 \pm 0.00^b$	$0.96 \pm 0.00^b$
	200	$3.30 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$
	500	$3.30 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$
13	0	$3.23 \pm 0.01^b$	$0.94 \pm 0.00^b$	$0.96 \pm 0.00^b$
	50	$3.23 \pm 0.00^b$	$0.94 \pm 0.00^b$	$0.96 \pm 0.00^b$
	200	$3.22 \pm 0.00^b$	$0.94 \pm 0.00^b$	$0.96 \pm 0.00^b$
	500	$3.29 \pm 0.01^a$	$0.96 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$
20	0	$3.29 \pm 0.00^{ab}$	$0.96 \pm 0.00^{ab}$	$0.96 \pm 0.00^a$
	50	$3.31 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$	$0.96 \pm 0.00^a$
	200	$3.32 \pm 0.00^a$	$0.97 \pm 0.00^a$	$0.97 \pm 0.00^a$
	500	$3.27 \pm 0.03^b$	$0.95 \pm 0.01^b$	$0.96 \pm 0.00^a$

注:同列数据中不同小写字母表示存在显著差异( $p < 0.05$ )。  
Note: different lowercase letters in the same column represented significant difference ( $p < 0.05$ ).

#### 2.5 土壤微生物碳代谢能力的主成分分析

为了解铀污染浓度和时间对土壤微生物群落的影响,使用主成分分析法对土壤微生物在 72 h 的碳代谢能力进行深度分析。对微生物碳利用能力进行主成分分析后,共得到 6 个主成分,其中前两个主成分各自的方差贡献率分别为 51.4% 和 23.5%。对前两个主成分进行可视化分析的结果如图 4 所示。

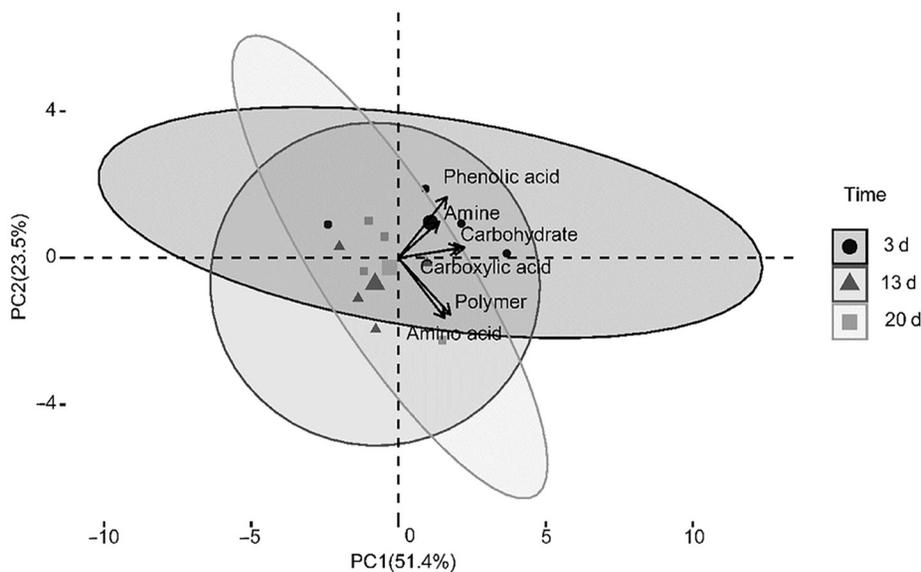


图4 土壤微生物碳代谢能力的主成分分析  
Fig.4 Principal component analysis of soil microbial carbon metabolism capacity

### 3 讨论

#### 3.1 微生物代谢活动对土壤铀污染的反应

铀污染对生态环境不仅存在化学毒性(重金属污染),还存在一定的放射性毒性<sup>[19]</sup>。本研究结合土壤酶活性及 Biolog EcoPate 技术分别从“点”和“面”的角度探究了铀污染对土壤微生物代谢活动的影响。结果表明,微生物的整体代谢活性受到铀污染的抑制作用,土壤酶活性同样遭受了抑制作用(图1、图2)。这说明在高浓度铀污染的早期,土壤微生物的整体代谢活性会受到一定的抑制作用,该现象与前人的研究结果具有一致性。例如,Stefanowicz 等<sup>[20]</sup>的研究结果表明,重金属污染对土壤微生物生物量、酶活性等代谢活动产生了负面影响。Mukherjee 等<sup>[19]</sup>发现微生物为了抵抗铀的放射性污染,会在铀胁迫的 15 min 内,大量降解其体内的 RNA,并且使转录和翻译过程终止,然而在 1 h 之后细胞体内的 RNA 恢复了铀处理前的水平。这一系列的连锁应对机制均会使微生物的代谢活动处于一个上下波动的情况,但仅在极短的时间内会出现这种变化。因此,有学者认为铀污染对微生物的影响主要是取决于化学毒性,而不是放射性毒性<sup>[21]</sup>。

在环境因子突然发生剧烈变化时,微生物活动和代谢过程对环境胁迫十分敏感<sup>[22]</sup>,原本相对稳定的土壤微生物群落难以快速适应当前的环境变化,导致微生物体内的功能紊乱、蛋白质变性或细胞膜被破坏,同时重金属还能与细胞表面结合并影响微生物的物质交换过程<sup>[23]</sup>,进而导致微生物代谢缓慢、休眠,甚至是死亡,从而导致整体代谢水平降低。另外绝大多数重金属离子能与生物酶的活性中心相结合,并降低酶活性<sup>[24]</sup>。例如,铀元素可抑制呼吸过程中的氧化磷酸酶活性,减少烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和三磷酸腺苷的产生,从而影响细胞的生命活动。高浓度重金属污染通过以上两种方式作用于土壤微生物,使微生物的整体代谢活性在污染早期受到了严重的抑制<sup>[25]</sup>。在放射性污染环境中,电离辐射可能会导致 DNA 序列断裂<sup>[26]</sup>,使得 DNA 复制发生错误,并进一步影响微生物的转录和翻译过程。另外,蛋白质作为一种生物大分子物质,电离辐射还可能会诱导蛋白质的表达、活性、氧化还原能力发生变化<sup>[27]</sup>。但对于铀尾矿周边环境而言,铀的放射性污染程度较低<sup>[28]</sup>,微生物可在短时间内完成自我修复。

随着铀污染时间的延长,微生物的整体代谢活性具有恢复的趋势(图2),但具体代谢活动之间的差异性不断增大(图1、图3)。该现象也证实了土壤微生物即便在如此之大的污染环境中仍具有较强调节作用,这对土壤实现其生态功能具有十分重要的意义。土壤中拥有数量庞大、种类繁多的微生物,这些微生物在基因或功能层面具有复杂的冗余现象<sup>[29]</sup>,使得土壤生态在长期遭受外界环境胁迫时,能在微生物的协助下不断恢复生态功能<sup>[30]</sup>。虽然微生物能使土壤代谢整体上得到恢复,但不同的微生物对重金属污染的适应能力、具体的代谢活动必然存在较大的差异。因此,导致土壤整体代谢在恢复的过程中各种土壤过程的变化趋势会出现较大的差异性。

#### 3.2 短时环境胁迫对土壤微生物多样性的影响

微生物多样性指数分析和 PCA 主成分分析结果均表明(表1、图4),在短期铀污染环境中,土壤生物多样性未发生较大变化。该现象与大多数现有研究结果都相反。Yan 等<sup>[31]</sup>对北山县铀尾矿分析后发现放射性核素和重金属污染降低了当地的微生物群落多样性。Zeng 等<sup>[32]</sup>的研究结果也表明,铀污染降低了污泥中的细菌丰富度。然而本研究中微生物群落多样性未出现较大的变化。首先,本研究使用的背景土中有机质含量较高,有大量的研究表明,土壤有机质能够提升土壤微生物对重金属污染的抗性;Nwuche 等<sup>[33]</sup>通过模拟实验发现,植物基质能够提升使微生物抵抗重金属污染;Yu 等<sup>[34]</sup>则通过对不同性质的土壤分析后,发现土壤有机质可抵消重金属对酶活的毒性效应;在营养物质充分的环境中,土壤微生物对重金属污染的耐受性更强<sup>[20,35]</sup>,因此土壤微生物多样性受重金属污染的影响较低。其次,因为铀污染处理的时间较短,土壤中原有的微生物群落结构还未发生较大的改变;Frossard 等<sup>[36]</sup>的研究结果表明,短期(30 d)汞污染未对土壤细菌和真菌的群落结构造成影响;土壤重金属胁迫使微生物产生耐受性需要在数月内才能完成,而土壤微生物形成稳定的群落结构则可能需要数年时间<sup>[37]</sup>;因此,需要在适当范围内延长观测时间(以月或者年作为观察单位),用以明确铀污染对土壤微生物多样性的影响。最后,Biolog EcoPlate 技术仅在微生物的整体代谢层面考察了土壤微生物的变化,不能深入地考察铀污染对微生物群落结构和功能的影响,为此,可结合宏基因组测序等前沿技术对其进

行深层次的研究。

## 4 结论

本研究通过土壤酶测定技术和 Biolog EcoPlate 微平板技术考察了铀污染对农田土壤微生物代谢的短期影响。结果发现: 铀污染对  $\beta$ -葡糖苷酶、磷酸酶和芳基硫酸酯酶均表现出较强的抑制作用, 而脲酶则仅在第 13 天时表现出较强的抑制作用, 在第 3 天和第 20 天时则表现为促进作用。铀污染抑制了土壤微生物的代谢活性, 但随时间的延长, 抑制效果逐渐降低。其中, 胺类物质是 Eco 板中的优势碳源, 铀污染对 6 大类碳源均表现出了抑制作用, 然而微生物对氨基酸、碳水化合物和多聚物类碳源的利用能力在 U50 处理组中随处理时间的延长而升高。与众多观点不同的是, 根据多样性指数和 PCA 分析发现, 土壤微生物多样性受铀污染的影响甚微。因此后续研究中需进一步延长铀处理时间并结合宏基因组测序技术, 更深入地探讨长期和短期铀污染对土壤微生态的影响, 可用于从生态学的角度指导后期铀污染土壤的修复工作。

**作者贡献声明** 黄森负责论文撰写、实验操作、稿件的修改和校对; 陈晓明负责论文检查; 张谷禹、黄佳丽、张丽莉、徐宇轩参与实验。全体作者均已阅读并同意最终的文本。

## 参考文献

- 1 马尧, 胡宝群, 孙占学. 浅论铀矿山的三废污染及治理方法[J]. 铀矿冶, 2007, **26**(1): 35-39. DOI: 10.13426/j.cnki.yky.2007.01.012.
- 2 Xiao S Q, Zhang Q, Chen X M, *et al.* Speciation distribution of heavy metals in uranium mining impacted soils and impact on bacterial community revealed by high-throughput sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 1867. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01867.
- 3 Gongalsky K B. Impact of pollution caused by uranium production on soil macrofauna[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2003, **89**(2): 197-219. DOI: 10.1023/a:1026031224658.
- 4 Antunes S C, Pereira R, Marques S M, *et al.* Impaired microbial activity caused by metal pollution: a field study in a deactivated uranium mining area[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, **410/411**: 87-95. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.003.
- 5 Doran J W. Soil health and global sustainability: translating science into practice[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, **88**(2): 119-127. DOI: 10.1016/S0167-8809(01)00246-8.
- 6 钟晓兰, 周生路, 赵其国. 城乡结合部土壤污染及其生态环境效应[J]. 土壤, 2006, **38**(2): 122-129.
- 7 ZHONG Xiaolan, ZHOU Shenglu, ZHAO Qiguo. Soil contamination and its eco-environmental impacts in the urban-rural marginal area[J]. *Soils*, 2006, **38**(2): 122-129.
- 8 Nannipieri P, Trasar-Cepeda C, Dick R P. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, **54**(1): 11-19. DOI: 10.1007/s00374-017-1245-6.
- 9 Liu G M, Zhang X C, Wang X P, *et al.* Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, **237**: 274-279. DOI: 10.1016/j.agee.2017.01.004.
- 10 Trivedi P, Delgado-Baquerizo M, Trivedi C, *et al.* Microbial regulation of the soil carbon cycle: evidence from gene—enzyme relationships[J]. *The ISME Journal*, 2016, **10**(11): 2593-2604. DOI: 10.1038/ismej.2016.65.
- 11 Bouskill N J, Wood T E, Baran R, *et al.* Belowground response to drought in a tropical forest soil. I. Changes in microbial functional potential and metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**: 525. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00525.
- 12 Adetunji A T, Lewu F B, Mulidzi R, *et al.* The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2017, **17**(3): 794-807. DOI: 10.4067/s0718-95162017000300018.
- 13 Piotrowska-Długosz A, Siwik-Ziomek A, Długosz J, *et al.* Spatio-temporal variability of soil sulfur content and arylsulfatase activity at a conventionally managed arable field[J]. *Geoderma*, 2017, **295**: 107-118. DOI: 10.1016/j.geoderma.2017.02.009.
- 14 Stefanowicz A. The biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006, **15**(5): 669-676.
- 15 Dick R P, Dick L K, Deng S P, *et al.* Cross-laboratory comparison of fluorimetric microplate and colorimetric

- bench-scale soil enzyme assays[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **121**: 240-248. DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.12.020.
- 15 李冰, 李玉双, 陈琳, 等. 沈北新区不同利用类型土壤脲酶活性及其影响因素分析[J]. *生态科学*, 2019, **38**(3): 1-8. DOI: 10.14108/j.cnki.1008-8873.2019.03.001.
- LI Bing, LI Yushuang, CHEN Lin, *et al.* Change characteristics and influencing factors of soil urease activity in different types of land in Shenyang North New Area[J]. *Ecological Science*, 2019, **38**(3): 1-8. DOI: 10.14108/j.cnki.1008-8873.2019.03.001.
- 16 Keylock C J. Simpson diversity and the Shannon-Wiener index as special cases of a generalized entropy[J]. *Oikos*, 2005, **109**(1): 203-207. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2005.13735.x.
- 17 Strong W L. Biased richness and evenness relationships within Shannon-Wiener index values[J]. *Ecological Indicators*, 2016, **67**: 703-713. DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.03.043.
- 18 Ge Z W, Du H J, Gao Y L, *et al.* Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by BIOLOG ECO microplates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, **9**: 1375. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01375.
- 19 Mukherjee A, Wheaton G H, Blum P H, *et al.* Uranium extremophily is an adaptive, rather than intrinsic, feature for extremely thermoacidophilic *Metallosphaera* species [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(41): 16702-16707. DOI: 10.1073/pnas.1210904109.
- 20 Stefanowicz A M, Kapusta P, Zubek S, *et al.* Soil organic matter prevails over heavy metal pollution and vegetation as a factor shaping soil microbial communities at historical Zn-Pb mining sites[J]. *Chemosphere*, 2020, **240**: 124922. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124922.
- 21 Kudryasheva N S, Rozhko T V. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2015, **142**: 68-77. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2015.01.012.
- 22 Guttman D S, McHardy A C, Schulze-Lefert P. Microbial genome-enabled insights into plant — microorganism interactions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, **15**(12): 797-813. DOI: 10.1038/nrg3748.
- 23 Wang X, Cui Y X, Zhang X C, *et al.* A novel extracellular enzyme stoichiometry method to evaluate soil heavy metal contamination: evidence derived from microbial metabolic limitation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, **738**: 139709. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139709.
- 24 Aponte H, Meli P, Butler B, *et al.* Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, **737**: 139744. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139744.
- 25 Gao N, Huang Z H, Liu H Q, *et al.* Advances on the toxicity of uranium to different organisms[J]. *Chemosphere*, 2019, **237**: 124548. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124548.
- 26 Ward J F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability[J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1988, **35**: 95-125. DOI: 10.1016/S0079-6603(08)60611-X.
- 27 Reisz J A, Bansal N, Qian J, *et al.* Effects of ionizing radiation on biological molecules: mechanisms of damage and emerging methods of detection[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, **21**(2): 260-292. DOI: 10.1089/ars.2013.5489.
- 28 Carvalho F P, Madruga M J, Reis M C, *et al.* Radioactivity in the environment around past radium and uranium mining sites of Portugal[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2007, **96**(1/2/3): 39-46. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2007.01.016.
- 29 Taubert M, Stähly J, Kolb S, *et al.* Divergent microbial communities in groundwater and overlying soils exhibit functional redundancy for plant-polysaccharide degradation[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(3): e0212937. DOI: 10.1371/journal.pone.0212937.
- 30 Lourenço K S, Suleiman A K A, Pijl A, *et al.* Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and to temporary bacterial invasion[J]. *Microbiome*, 2018, **6**(1): 142. DOI: 10.1186/s40168-018-0525-1.
- 31 Xun Y, Zhang X J, Chen C L, *et al.* Comprehensive evaluation of soil near uranium tailings, Beishan City, China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2018, **100**(6): 843-848. DOI: 10.1007/s00128-018-2330-8.
- 32 Zeng T T, Mo G H, Hu Q, *et al.* Microbial characteristic and bacterial community assessment of sediment sludge upon uranium exposure[J]. *Environmental Pollution*, 2020, **261**: 114176. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114176.
- 33 Nwuche C O, Ugoji E O. Effect of co-existing plant

- specie on soil microbial activity under heavy metal stress [J]. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2010, **7**(4): 697-704. DOI: 10.1007/BF03326179.
- 34 Xian Y, Wang M E, Chen W P. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties[J]. *Chemosphere*, 2015, **139**: 604-608. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.12.060.
- 35 Boteva S, Radeva G, Traykov I, *et al.* Effects of long-term radionuclide and heavy metal contamination on the activity of microbial communities, inhabiting uranium mining impacted soils[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2016, **23**(6): 5644-5653. DOI: 10.1007/s11356-015-5788-5.
- 36 Frossard A, Donhauser J, Mestrot A, *et al.* Long- and short-term effects of mercury pollution on the soil microbiome[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **120**: 191-199. DOI: 10.1016/j.soilbio.2018.01.028.
- 37 Azarbad H, Niklińska M, Nikiel K, *et al.* Functional and compositional responses in soil microbial communities along two metal pollution gradients: does the level of historical pollution affect resistance against secondary stress? [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, **51**(7): 879-890. DOI: 10.1007/s00374-015-1033-0.