

---

## EFFECTS OF Pb AND Cd ON MICROBIOLOGICAL AND ENZYMATIC SOIL ACTIVITY - LABORATORY EXPERIMENT

**Boyka Malcheva**

University of Forestry, Sofia, Bulgaria, Boika.Malcheva@gmail.com

**Abstract:** A laboratory experiment was conducted to investigate the effect of different concentrations of Pb and Cd (individually and in combinations) on the microbiological and enzymatic activity of agrogenic soil, unpolluted, not fertilized, without vegetation, from the field of town Elin Pelin. The combined effect of Pb and Cd limits the microbiological activity of the soil to a greater extent than the action of these heavy metals individually. This trend is proportional to the increasing concentrations of the elements. For the variants with the separate addition of lead and cadmium, it is also found that soil biogenicity decreases with increasing concentration of the heavy metals studied, this trend being more pronounced under the influence of cadmium. Non-spore-forming bacteria, followed by the bacilli, play a major role in the composition of the total microflora. With increasing concentrations of Pb and Cd, spore-forming bacteria (bacilli) survive better and their amount increases. Actinomycetes and micromycetes are the least represented in the composition of the total microflora and most strongly suppressed by the influence of the analyzed heavy metals. The amount of bacteria digesting mineral nitrogen decreases with increasing concentrations of lead and cadmium. The rate of degradation of organic matter in soil is represented by calculating a mineralization coefficient as a ratio between the group of bacteria digesting mineral nitrogen and the amount of ammonifying bacteria (non-spore and bacilli). The values of the mineralization coefficient show that, compared to the control, the degradation of organic substances is difficult with the addition of lead and cadmium, in proportion to the increase of their concentrations. A higher rate of soil organic matter mineralization is found in the variants with lead than in these with cadmium. The degradation of carbohydrates in soil is represented by the study of enzymes: cellulase, amylase and invertase. The combined effect of Pb and Cd inhibits the enzyme activity of the soil to a greater extent than the action of these heavy metals individually. This tendency is proportional to the increase of their concentrations and correlates with the tendencies in the development of the microorganisms. In the variants with the separate addition of lead and cadmium, it was found that, compared to the control, the cellulase activity decreased under the influence of Cd, to the highest extent with the addition of the highest element concentration. While lead-added variants show increased cellulase activity. Amylase activity increased almost twice when the lowest Pb concentration was added compared to the control sample, but high concentrations began to suppress enzyme activity. A reverse tendency was observed for this enzyme when cadmium was added - suppressed at the lowest added Cd concentration and poor activation with increasing concentrations, the values of the enzyme being close to the controls. Invertase activity is suppressed under the influence of both heavy metals separately, to a greater extent with the addition of cadmium. Possibly better development of microorganisms in the samples with Pb than in samples with Cd leads to an increase in their enzymatic activity, and consequently an increased mineralization of the organic substances (confirmed by the mineralization coefficient values) and the initiation of self-purification processes of the soil from Pb.

**Keywords:** lead, cadmium, soil microorganisms, enzymes

## ВЛИЯНИЕ НА РЪИ СД ВЪРХУ МИКРОБИОЛОГИЧНА И ЕНЗИМНА ПОЧВЕНА АКТИВНОСТ – ЛАБОРАТОРЕН ЕКСПЕРИМЕНТ

**Бойка Малчева**

Лесотехнически университет, България, Boika.Malcheva@gmail.com

**Резюме:** Проведен е лабораторен експеримент за изследване влиянието на различни концентрации на Рb и Cd (поотделно и в комбинации) върху микробиологичната и ензимна активност на агрогенна почва, незамърсена, неторена, без растителност, от полето на град Елин Пелин. Комбинираното влияние на Рb и Cd лимитира в по-висока степен микробиологичната активност на почвата в сравнение с действието на тези тежки метали поотделно. Тази тенденция е пропорционална с увеличаване концентрациите на елементите. При вариантите с отделно добавяне на олово и кадмий също се установява, че биогенността на почвата намалява с увеличаване на концентрацията на изследваните тежки метали, като тази тенденция е по-силно изразена под влиянието на кадмий. Основен дял в състава на общата микрофлора при всички варианти заемат неспорообразуващите бактерии, следвани от бацилите. С увеличаване

концентрациите на Рbи Сdпо-добре оцеляват спорообразуващите бактерии (бацили) и тяхното количество нараства. Actinomicetите и micromicetите са най-слабо представени в състава на общата микрофлора и най-силно подтиснати от влиянието на анализирани тежки метали. Количеството на бактериите, усвояващи минерален азот намалява с увеличаване концентрациите на олово и кадмий. Скоростта на деградация на органичните вещества в почвата е представена чрез изчисляване на минерализационен коефициент като съотношение между групата на бактериите, усвояващи минерален азот и количеството на амонифициращите бактерии (неспорообразуващи и бацили). Стойностите на коефициента на минерализация показват, че спрямо контролата разграждането на органичните вещества е затруднено при прибавянето на олово и кадмий, пропорционално на увеличаването на концентрациите им. По-висока скорост на минерализация на органиката в почвата се установява при вариантите с олово спрямо тези с кадмий. Разграждането на въглехидратите в почвата е представено чрез изследване на ензимите: целулаза, амилаза и инвертаза. Комбинираното влияние на Рbи Сdпотиска в по-висока степен ензимната активност на почвата в сравнение с действието на тези тежки метали поотделно. Тази тенденция е пропорционална с увеличаване на концентрациите им и корелира с тенденциите при развитието на микроорганизмите. При вариантите с отделно добавяне на олово и кадмий се установява, че спрямо контролата целулазната активност намалява под влиянието на Сd, в най-висока степен при добавянето на най-високата концентрация на елемента. Докато при вариантите с добавяне на олово се установява повишена активност на целулазата. Амилазната активност се увеличава почти двойно при добавянето на най-ниската концентрация на Рbв сравнение с контролната проба, но високите концентрации започват да подтискат активността на ензима. Обратна тенденция се наблюдава за този ензим при добавянето на кадмий – подтиснат при най-ниската добавена концентрация на Сd и слабо активиране с увеличаване на концентрациите, като стойностите на ензима са близки до контролните. Инвертазната активност е подтисната под влиянието и на двата тежки метала поотделно, в по-висока степен при добавянето на кадмий. Вероятно по-доброто развитие на микроорганизмите при пробите с Рb, отколкото при тези с Сd води и до увеличаване на тяхната ензимна активност, и съответно до повишена минерализация на органичните вещества (потвърдено и от стойностите на минерализационния коефициент) и започване на процеси на самоочистване на почвата от Рb.

**Ключови думи:** олово, кадмий, почвени микроорганизми, ензими

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Замърсяването на почвите оказва негативно въздействие върху количеството, качествения състав, микробната биомаса и ензимната активност на почвените микроорганизми. Те са чувствителни индикатори при настъпващи промени в почвите. Доказана е и тяхната роля в процесите на самоочистване на почвите от вредни вещества въз основа на техните механизми за адаптация при по-продължително замърсяване. Тежките метали инхибират ензимната и микробиологична активност в почвата поради промени в състава на микрофлората и активността на отделните ензими, което намалява разграждането на органичните вещества (Adam Łukowski and Dorota Dec, 2018). При изследване на микробиологична активност на почви от природна, агро- и урбоекосистема Наскова (2016) установява най-ниска биогенност при урбогенните почви около натоварените градски кръстовища, при които по принцип се отчитат повишени концентрации на тежки метали в повърхностните слоеве на почвите (Bloemen et al., 1995). Според проучване на рекултивирани терени с високо съдържание в насипите основно на мед и кадмий, Стефанова и Петров (2019) установяват, че развитието на общата микрофлора в почвите е по-високо в повърхностните слоеве, но в дълбочина количеството на микроорганизмите намалява поради инхибиращия ефект на замърсителите (тежки метали) и промяна във физико-химичните условия. Тези автори отбелязват пигментиране при бактериите като тяхна реакция спрямо създадените екстремни условия в процеса на все още формираща се микробиоценоза. Ли и кол. (2018) в свое изследване определят, че при замърсяването с Рb, Zn, Сdи Сd количеството на почвените микроорганизми намалява, особено популациите на гъби и актиноmiceti, както и активността на почвените ензими (уреаза, инвертаза и целулаза), но в обработваемите ниви микробиологичната и ензимна активност е значително по-висока, отколкото в необработените полета. Yang и кол. (2017) подчертават важността и положителния ефект на ризосферата върху съдържанието на хранителни вещества в почвата, ензимната активност и бактериалното изобилие при замърсяване с тежки метали. Според изследване на Хи и кол. (2019) замърсяването с Рbи Сd инхибира както развитието на микроорганизмите (в по-висока степен гъбичната популация, отколкото бактериите), така и микробната биомаса. Според тези автори тежките метали водят до изменения в състава на почвените микробни общности и тяхната активност, което впоследствие оказва неблагоприятно въздействие върху имобилизацията на въглерода с микробен произход в почвата. Поради металния стрес почвените микроорганизми променят управлението на енергията чрез отклоняване на повече ресурси за поддържане, отколкото за растеж (Tripathy и кол., 2014).

Според изследване на Sardar и кол. (2007) степента на инхибиране на ензимите каталаза, алкална фосфатаза и дехидрогеназа се увеличава значително с увеличаване на нивото на олово и кадмий в почвата и варира с инкубационните периоди. Най-значима промяна в структурата на почвената бактериална общност е наблюдавана в пробите с високо ниво на Cd. При изследване на ензимна активност в почва Yangi кол. (2006) установяват, че оловото не оказва значителен инхибиращ ефект върху активността на каталаза, уреазата, инвертаза и алкална фосфатаза, и дори има защитна роля върху активността на калатазата в комбинираното присъствие на Cd, Zn и Pb; кадмият значително ги инхибира, а цинкът подтиква само активността на уреазата и калатазата. Уреазната активност се инхибира повече от комбинациите на посочените тежки метали, отколкото от дейностите на металите самостоятелно и е най-чувствителна на влиянието им. Дейностите на интертазата и алкалната фосфатаза значително намаляват само с увеличаване на концентрацията на Cd в почвата. Дехидрогеназната активност в почвата е най-силно подтисната под влияние на Zn, Cd и Cu според изследване на Łukowski и Dec (2018). При проучване на ензимни активности (алкална фосфатаза, целобихидролаза и L-левцин-аминопептидаза) на почви замърсявани в продължение на 150 години с тежки метали (As, Pb, Cr, Cu, Zn и V) Hagmann и кол. (2015) установяват най-високи ензимни активности при пробите с най-високи концентрации на тежки метали. Според тези автори резултатите им могат да показват ефектите от дългосрочната адаптация на почвените съобщества в замърсени с тежки метали почви.

## 2. ОБЕКТ И МЕТОДИ

За лабораторния експеримент е пробонабрана в стерилена пликагрогенна почва, от повърхностния почвен слой (0-15cm), обработваема, неторена, незамърсена (с концентрации на тежките метали под фоните за страната), без растителност, от полето на град Елин Пелин. При микробиологичния анализ на почвата (транспортирана и съхранявана при 4 °C) е използван методът на пределните разреждания, последващи плътни посеви и с изготвяне на ямки, култивиране в термостат и преизчисляване към 1 g абсолютно суха почва, за определяне на следните групи микроорганизми: неспорообразуващи бактерии и бацили (на обикновен агар), микромицети (на Чапек-Доксагар), актиномицети и бактерии, усвояващи минерален азот (на Actinomycete isolation agar). Ензимната активност на почвата е определена чрез изследване на ензими, разграждащи въглехидрати (целулаза, амилаза и инвертаза) по метод на Градова и кол. (2004). Към пробите в ямките са добавяни различни концентрации на олово – Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и кадмий - Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, поотделно и в комбинации. Инкубирането е съгласно използваните методи – време за култивиране на неспорообразуващи бактерии и бацили 48 ч. при 27 °C, актиномицети, плесенни гъби (микромицети) и бактерии, усвояващи минерален азот – 10 дни при 27 °C; целулаза, амилаза и инвертаза – 48 ч. при 37 °C. Анализирани са следните варианти:

- ▶ Контролна проба (почва без добавяне на Pb и Cd);
- ▶ Проба + Pb 50 µg/g;                                   ▶ Проба + Cd 1 µg/g;                                   ▶ Проба + Pb 50 µg/g и Cd 1 µg/g;
- ▶ Проба + Pb 200 µg/g;                                   ▶ Проба + Cd 5 µg/g;                                   ▶ Проба + Pb 200 µg/g и Cd 5 µg/g;
- ▶ Проба + Pb 600 µg/g;                                   ▶ Проба + Cd 20 µg/g;                                   ▶ Проба + Pb 600 µg/g и Cd 20 µg/g.

Избраните концентрации са съобразени да бъдат съответно над фоните, максимално допустимите и интервенционните концентрации на двата елемента за страната, съгласно Наредба №3 от 2008 г. за нормите за допустимо съдържание на вредни вещества в почвите.

## 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Биогенността на изследваните варианти е представена на следващата таблица 1.

**Таблица 1. Количество и качествен състав на почвените микроорганизми**

Варианти	Неспорообразуващи бактерии	Бацили	Микромицети	Актиномицети	Бактерии, усвояващи минерален азот	Обща микрофлора	Минерализационен коефициент
Контрол	2920	1940	180	160	4040	5200	0,83
Pb50	2660	2220	140	120	3980	5140	0,82
Pb200	2220	2320	120	100	3660	4760	0,81
Pb600	2140	2360	100	80	3500	4680	0,78
Cd1	2080	2040	80	60	3100	4260	0,75
Cd5	2000	2120	60	60	2920	4240	0,71

Cd20	1900	2180	40	40	2740	4160	0,67
Pb50+Cd1	1860	1960	60	40	2400	3920	0,63
Pb200+Cd5	1780	1980	40	20	2220	3820	0,59
Pb600+Cd20	1680	2020	20	20	2080	3740	0,56

Резултатите показват, че общото количество микроорганизми е по-високо в контролния вариант спрямо пробите с добавяне на Рbи Cd. В сравнение с контролата биогенността намалява с увеличаване концентрацията на елементите: до 1,1 пъти за вариантите с Pb(600 µg/g), до 1,25 пъти при вариантите с Cd (20 µg/g) и до 1,4 пъти при комбинираното влияние на двата тежки метала (Pb 600 µg/gи Cd 20 µg/g). Основен дял в състава на общата микрофлора при замърсените проби заемат неспорообразуващите бактерии (до 52%) и бацилите(до 54%), като количеството на спорообразуващите бактерии (бацили) нараства с увеличаване концентрацията на олово и кадмий. Докато при контролната проба процентното съотношение неспорообразуващи бактерии:бацили е 59:35. Вероятнобацилите, образувайки спори, оцеляват в по-висока степен при екстремни условия. Най-слабо представени в състава на общата микрофлора са микромицетитеи актиномицетите(3% при контролната проба и от 0,5 до 2% при останалите варианти). С изключение на бацилите, количеството на другите изследвани групи микроорганизми намалява с увеличаване концентрациите на елементите. Комбинираното въздействие на Рbи Cd подтиква най-силно развитието на микроорганизмите, следва самостоятелното влияние на Cd и най-слабо лимитира количеството на микробите добавянето само на Рb.

Минерализационният коефициент, изчислен като съотношение между бактериите, усвояващи минерален азот и амонифициращите бактерии (неспорообразуващи бактерии и бацили), намалява с увеличаване концентрациите на тежките метали. Скоростта на разграждане на органичните вещества е най-силно подтиксната при комбинираното добавяне на олово и кадмий. Следва лимитиращият ефект от самостоятелното добавяне на кадмий и по-близки до контролата са стойностите на коефициента на минерализация при внасянето само на олово.

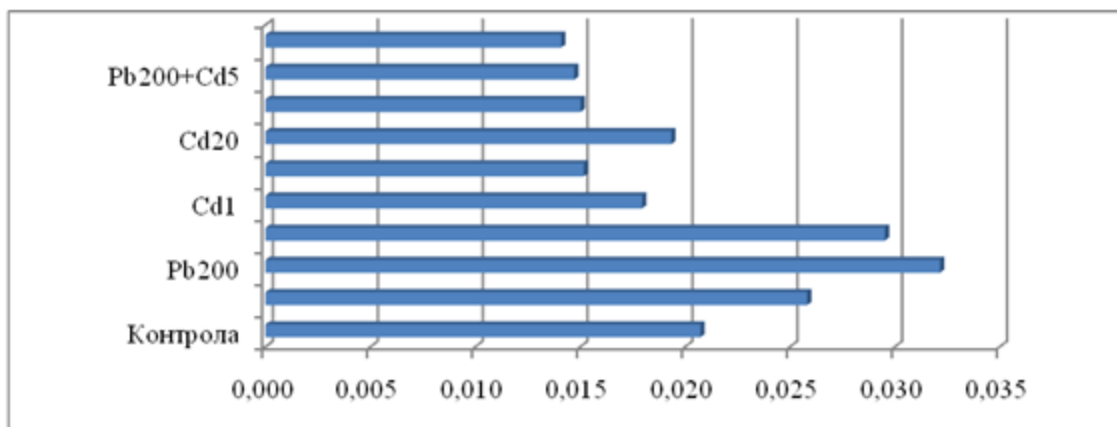
Отчетените стойности (mm) на стерилните зони около ямките с поставените тежки метали потвърждават посочените по-горе тенденции, че тези елементи подтиксат развитието на микроорганизмите (табл. 2).

**Таблица 2. Стерилни зони около замърсителите (mm)**

Варианти	Неспорообразуващи бактерии	Бацили	Микромицети	Актиномицети	Бактерии, усвояващи минерален азот
Pb50	5	4	6	6	5
Pb200	6	4	8	7	7
Pb600	8	5	9	10	8
Cd1	7	6	9	9	7
Cd5	9	7	11	10	9
Cd20	10	8	12	12	10
Pb50+Cd1	9	8	10	11	10
Pb200+Cd5	12	10	12	13	12
Pb600+Cd20	14	11	15	15	14

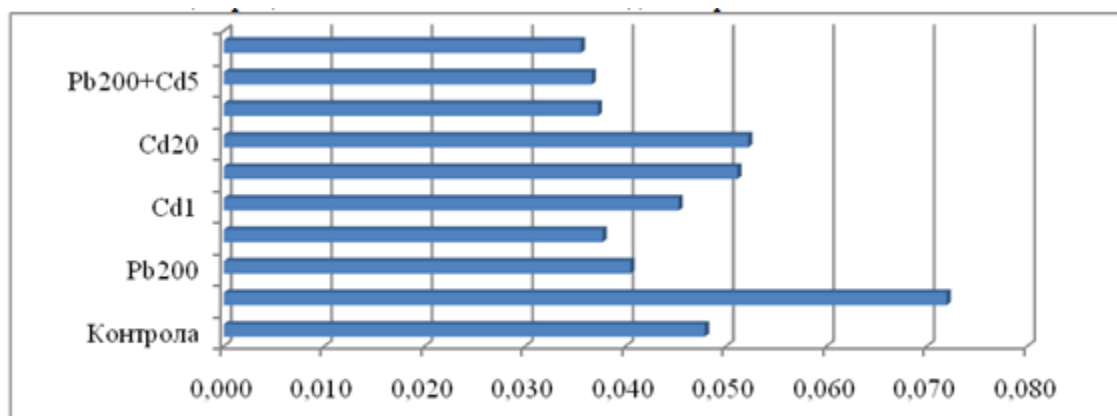
Най-силно влияние оказва комбинираното добавяне на тежки метали върху микромицетите и актиномицетите (стерилна зона до 15 mm), следват групите на неспорообразуващите бактерии и бактериите, усвояващи минерален азот (стерилна зона до 14 mm). Добавянето на олово оказва по-слабо подтикскащо въздействие върху микроорганизмите, отколкото добавянето на кадмий. Негативното влияние върху микрофлората на тези тежки метали, самостоятелно или в комбинации, нараства с увеличаване на концентрациите им. Отново се потвърждава, че при всички варианти най-слабо подтикскащо въздействие се установява при бацилите(стерилна зона до 11 mm).

Целулазната активност най-силно намалява при комбинираното влияние на Рb и Cd (до 1,5 пъти спрямо контролата), като отрицателното въздействие нараства с увеличаване на концентрациите им (фиг. 1).



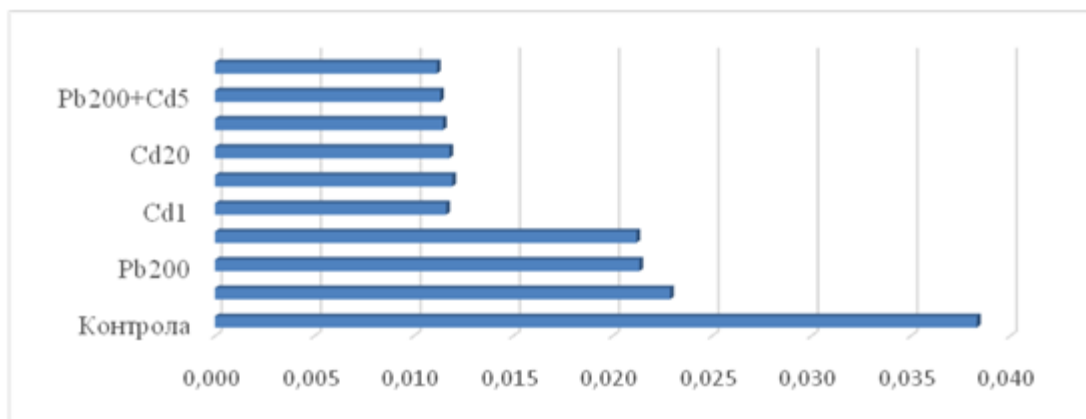
Фиг. 1. Целулазна активност (mg глюкоза/g почва)

Установява се, че добавянето само на Рbне подтиска разграждането на целулозата, дори стойностите на ензима са 1,6 пъти увеличени спрямо контролата при прибавянето на 200 µg/голово. При добавянето на най-високата концентрация на олово (600 µg/g) целулазната активност започва да намалява, но остава по-висока от тази при контролата. Очевидно не винаги и не единствено количеството на микроорганизмите определя тяхната активност. Влияние оказват и други фактори – температура, влажност, рН, механичен състав на почвата, запасеност с хранителни елементи, както и наличието или отсъствието на растителност. Добавянето на кадмий самостоятелно подтиска активността на целулазата в следния низходящ ред: Cd20>Cd1>Cd5. Амилазната активност (фиг. 2) също е най-силно подтисната при комбинирано добавяне на олово и кадмий, като активността на ензима намалява с увеличаване на концентрацията им. Най-ниската добавена концентрация на Рb (50 µg/g) не подтиска амилазата, дори активността на ензима е 1,5 пъти по-висока отколкото при контролата. По-високите концентрации на олово подтискат разграждането на скорбялата в почвата – стойностите на амилазата намаляват до 1,3 пъти в сравнение с контролната проба. Установява се подтискане на амилазната активност при добавяне на 1 µg/gCdи слабо увеличаване на активността на ензима при по-високите концентрации – стойностите са по-близки до контролните.



Фиг. 2. Амилазна активност (mg глюкоза/g почва)

Инвертазната активност е най-силно подтисната под влиянието на изследваните тежки метали (фиг. 3).



Фиг. 3. Инвертазна активност (mg глюкоза/g почва)

При добавянето на олово активността на инвертазата намалява с увеличаване на концентрацията му до 1,8 пъти спрямо контролата. Кадмият оказва по-силно лимитиращо влияние върху инвертазната активност – разграждането на захарозата намалява до 3,3 пъти в сравнение с контролната проба. Инвертазната активност е най-силно подтисната под влияние на комбинираното въздействие на Pb и Cd, като стойностите на ензима са близки до тези при добавянето само на кадмий.

Сходни резултати за по-силно отрицателно влияние върху почвената микробиологична и ензимна активност на Cd спрямо Pb установяват и други автори (Yangi кол., 2006; Sardar и кол., 2007; Łukowski и Dec, 2018; Shi и Ma, 2017).

#### 4. ИЗВОДИ

Биогенността при изследваната почва намалява с увеличаване концентрациите на Pb и Cd, като по-висок лимитиращ ефект се установява при вариантите с кадмий, отколкото с Pb, независимо от по-ниски концентрации на Cd. Основен дял в състава на общата микрофлора заемат неспоробразуващите бактерии и бацилите. Най-слабо представени и най-силно подтиснати от добавянето на олово и кадмий са актиномицетите и микромицетите. Установява се прегрупиране на микроорганизмите – количеството на бацилите нараства с увеличаване концентрациите на олово и кадмий, и е по-високо отколкото при контролния вариант. Докато при всички други изследвани групи микроорганизми тенденцията е обратна – количеството им намалява с увеличаване концентрациите на Pb и Cd. Следователно бацилите, образувайки спори, оцеляват в по-висока степен при наличие на замърсяване с тези два тежки метала.

Целулазната активност е подтисната при вариантите с добавяне на кадмий, докато прибавянето на олово не лимитира активността на ензима. Вероятно за тази тенденция влияние оказва също по-високата токсичност на кадмия за развитието на почвените микроорганизми и оттам забавяне на процесите на самоочистване на почвата спрямо този елемент. При прибавянето само на кадмий амилазната активност е със стойности по-близки до контролния вариант. Докато при вариантите с олово най-ниската добавена концентрация активира ензима, а с увеличаване количеството на този тежък метал амилазната активност се подтиска.

Инвертазната активност е най-силно подтисната при добавянето на Pb и Cd поотделно, в по-висока степен под влиянието на кадмий. Следователно активността на инвертазата може да служи като най-чувствителен индикатор при замърсяване на почви с олово и кадмий. Като цяло с увеличаване на концентрациите на Pb и Cd инвертазната активност намалява.

Комбинираното влияние на Pb и Cd оказва по-силно и нарастващо с увеличаване на концентрациите им отрицателно влияние върху микробиологичната и ензимна активност на изследваната почва, отколкото при прибавяне на елементите поотделно.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Този научен доклад беше подкрепен от проекта: BG05M2OP001-2.009-0034 „Подкрепа за развитието на научния капацитет в Лесотехнически университет“.

#### ЛИТЕРАТУРА

Bloemen, M., Markert, B., Lieth, H. (1995). The distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in top soil of Osnabrück in relation to land use. *Sci. Total Environ.*, 48: 166-187.

- Градова, Н., Бабусенко, Е., Горнова, И. (2004). Лабораторны практикум по общей микробиологии, изд. ДеЛи принт, Москва, 144с.
- Hagmann, D., Goodey, N., Mathieu, C., Evans, J., Aronson, M., Gallagher, F., Krumins, J. (2015). Effect of metal contamination on microbial enzymatic activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 91: 291-297.
- Li, Q., Hu, Q., Zhang, Ch., Jin, Zh. (2018). Effects of Pb, Cd, Zn, and Cu on Soil Enzyme Activity and Soil Properties Related to Agricultural Land-Use Practices in Karst Area Contaminated by Pb-Zn Tailings. *Pol. J. Environ. Stud.*, 27(6):2623–2632.
- Lukowski, A., Dorota D. (2018). Influence of Zn, Cd, and Cu fractions on enzymatic activity of arable soils. *Environ Monit Assess*, 190(5), p. 278.
- Наскова, П. (2016). Сезонна и годишна динамика на микробиологичната активност в почви от природна, агро и урбоекосистема. *Научни трудове на Русенския университет, том 55, серия 1.2*: 249-257.
- Sardar, K., Qing, C., Abd El-Latif, H., Yue, X., Ji-zheng, H. (2007). Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences* 19: 834–840.
- Shi, W., Ma, X. (2017). Effects of heavy metal Cd pollution on microbial activities in soil. *Ann Agric Environ Med.*, 24(4):722–725.
- Stefanova, V., Petrov, P. (2019). Soil development and properties of microbial biomass succession in reclaimed sites in Bulgaria. *International conference on innovations in science and education march 20-22, 2019, Prague, Czech republic*: 1-9.
- Tripathy, S., Bhattacharyya, P., Mohapatra, R., Som, A., Chowdhury, D. (2014). Influence of different fractions of heavy metals on microbial ecophysiological indicators and enzyme activities in century old municipal solid waste amended soil. *Ecol. Eng.*, 70: 25-34.
- Xu, Y., Seshadri, B., Bolan, N., Sarkar, B., Ok, Y., Zhang, W., Rumpel, C., Sparks, D., Farrell, M., Hall, T., Dong, Zh. (2019). Microbial functional diversity and carbon use feedback in soils as affected by heavy metals. *Environment International*, Vol. 125: 478-488.
- Yang, Y., Dong, M., Cao, Y., Wang, J., Tang, M., Ban, Y. (2017). Comparisons of Soil Properties, Enzyme Activities and Microbial Communities in Heavy Metal Contaminated Bulk and Rhizosphere Soils of *Robinia pseudoacacia* L. in the Northern Foot of Qinling Mountain. *Forests*, 8 (11), 430:1-18.
- Yang, Zh., Liu, Sh., Zheng, D., Feng, Sh. (2006). Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences* 18(6):1135-41.