

一氯苯对土壤脲酶活性特征的影响

王聪颖^{1,2}, 和文祥¹, 刘海轮³, 来航线¹, 邓小成⁴

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国科学院 南京土壤研究所, 江苏 南京 210008;

3 陕西省烟草公司, 陕西 西安 710004; 4 陕西省陇县烟草公司, 陕西 陇县 721200)

【摘要】【目的】研究一氯苯对土壤脲酶活性特征的影响, 为环境保护和监测提供参考依据。【方法】以 塿土和红壤为研究对象, 采用室内模拟方法, 研究不同体积分数(0, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0% 和 10%) 一氯苯对土壤脲酶活性及酶促反应动力学特征参数($V_{\max}$, K_m 和 k) 的影响。【结果】一氯苯对土壤脲酶有明显的激活作用, 其中 4 个土壤脲酶活性与一氯苯体积分数间的关系可以用线性方程进行拟合。供试土壤轻度污染时的一氯苯临界浓度为 34.0 g/kg。随一氯苯体积分数的增大, 塿土的最大反应速率 $V_{\max}$ 增大, $V_{\max}/K_m$ 、 K_m 和 k 的变化规律性不明显, 红壤的各特征参数受一氯苯的影响较小。【结论】土壤脲酶在一定范围内可表征红壤受一氯苯污染的程度; 一氯苯加速了土壤脲酶和尿素复合物的解离; 一氯苯与土壤脲酶之间的关系较为复杂, 其机理有待进一步研究。

【关键词】 一氯苯; 脲酶; 动力学参数; 临界剂量

【中图分类号】 S154.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0171-05

Effect of monochlorobenzene on soil urease activity characteristics

WANG Cong-ying^{1,2}, HE Wen-xiang¹, LIU Hai-lun³,

LAI Hang-xian¹, DENG Xiao-cheng⁴

(1 College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 3 Tobacco Company of

Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 4 Tobacco Company of Long County, Longxian, Shaanxi 721200, China)

Abstract: 【Objective】The relationship between monochlorobenzene and soil urease activity characteristics was studied in order to supply basis for environmental protection and mointor. 【Method】An indoor simulation experiment was carried out to study the effect of different monochlorobenzene concentrations (0, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10%) on urease activity and urease kinetic parameters of Lou soil and red soil. 【Result】Monochlorobenzene could activate soil urease activity significantly and the equation of $U = \beta_1 \times C + \beta_0$ could well describe their relationship in four soil samples. Meanwhile, the critical concentration was 3.4% when soils were slightly polluted by monochlorobenzene. The kinetic parameter $V_{\max}$ of Lou soil increased as the concentration of monochlorobenzene added. The $V_{\max}/K_m$ and k did not change remarkably, and the monochlorobenzene had little impact on red soil enzyme kinetic parameters. 【Conclusion】Soil urease activities could be an index of soil polluted by monochlorobenzene. Monochlorobenzene could accelerate the dissociation of enzyme-substrate complex. There was a complex interaction between Monochlorobenzene and urease, which needs further study.

Key words: monochlorobenze; soil urease; kinetic parameter; critical dose

* [收稿日期] 2008-10-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40301022); 陕西省烟草专卖局科技重大专项“陕西省基本烟田综合治理工程”; 西北农林科技大学“青年学术骨干人才支持”计划项目

[作者简介] 王聪颖(1981—), 女, 陕西西安人, 在读博士, 主要从事土壤生态毒理及环境污染修复研究。

[通信作者] 和文祥(1968—), 男, 陕西黄龙人, 副教授, 博士, 博士生导师, 主要从事土壤生态毒理及土壤生物化学研究。

E-mail: wxhe1968@163.com

有机氯农药是一类高效广谱的杀虫剂,在 20 世纪 60 年代前,由于农业生产、卫生防疫等方面的需要,此类农药曾被广泛应用,但由于其难分解、易积累,导致近年来在世界各地土壤中仍有检出^[1-4]。有机氯农药具有神经毒性和细胞毒性,脂溶性大,极易在人体和动物体内累积。因此,此类农药在环境中的微量残留也会对人、畜健康造成巨大威胁。一氯苯是有机氯类农药生产和有机合成精细化工中间体的重要原料,也是多氯苯类在土壤环境中逐级降解的重要中间代谢产物,因此其对土壤质量的影响备受各国政府和研究机构的关注。

土壤酶是推动土壤新陈代谢的重要因素,参与包括物质循环、营养代谢等在内的许多土壤生物化学过程^[5]。脲酶是土壤中氮素循环的关键酶类,能将尿素水解成氨,为作物提供氮素营养,且常作为土

壤响应外界环境干扰的重要指标之一^[6-8]。近年来,国内外学者对农药与土壤酶活性之间的关系进行了一系列研究^[9-12],但有关一氯苯的酶效应鲜见报道。为此,本试验采用室内模拟方法,对一氯苯与土壤脲酶活性的关系进行了研究,以期为环境保护和监测提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试土样

供试土样采自陕西杨凌地区(楼土)和江西鹰潭中科院红壤试验站(红壤),共 6 个样品。采样时,先去除 0~5 cm 表土,取 5~20 cm 土样,混匀风干,过孔径 1 mm 的筛备用。采用常规方法分析土样的理化性质,结果见表 1。

表 1 供试土样的理化性质

Table 1 Physical-chemical properties of tested soil

土样 Soil sample	样品编号 No.	粘粒/ (g · kg ⁻¹) Clay	粉粒/ (g · kg ⁻¹) Silt	砂粒/ (g · kg ⁻¹) Sand	有机质/ (g · kg ⁻¹) OM	全氮/ (g · kg ⁻¹) TN	全磷/ (g · kg ⁻¹) TP	碱解氮/ (mg · kg ⁻¹) Alk-hydroly zabe N	pH	CEC/ (cmol · kg ⁻¹)
楼土 Lou soil	1	341.2	436.2	222.6	23.66	1.78	1.59	141.28	7.99	16.91
	2	319.0	335.4	345.6	18.68	2.11	1.65	136.44	8.02	15.63
	3	355.7	300.6	343.7	22.07	1.56	1.56	75.55	7.90	16.99
红壤 Red soil	4	360.8	171.6	467.6	20.02	1.43	0.66	126.70	6.22	14.48
	5	426.6	165.9	407.5	8.22	0.69	0.45	61.85	5.49	6.23
	6	458.2	174.9	366.9	9.60	0.83	0.34	57.38	5.65	13.22

注:全磷以磷计。
Note: Total phosphate's unit was described by phosphat.

1.2 试验方案

取 5.00 g 土样,加入 1 mL 甲苯,静置 15 min 后,添加 5 mL 不同体积分数(0.0%,0.5%,1.0%,2.5%,5.0%和 10.0%)的一氯苯溶液混匀,作用 30 min^[13]后,加入 10 mL 不同浓度(0.001,0.025,0.050和 0.100 mol/L)的尿素溶液和 20 mL pH 6.7磷酸盐缓冲液。37 ℃培养,定期取样,用靛酚蓝比色法测定脲酶活性^[14],每处理重复 3 次,并设无底物、无土壤处理为对照(CK)。

1.3 数据处理

土壤酶动力学参数米氏常数(K_m)、最大反应速度(V_{max})和酶促反应速率常数(k),参考文献[15]的方法进行计算。

2 结果与分析

2.1 一氯苯对土壤脲酶活性的影响

尿素浓度为 0.100 mol/L 时,不同体积分数一氯苯对土壤脲酶活性的影响结果见表 2。由表 1 和

表 2 可知,同类型的土壤,有机质、全氮、全磷等养分总体水平越高,脲酶活性越大,这与许多学者得到的脲酶活性可表征土壤肥力水平的结论一致^[16-18];除个别处理外,一氯苯的加入整体上导致土样脲酶活性增加,表明一氯苯可激活土壤脲酶活性;一氯苯体积分数为 0 时,2~6 号土样脲酶活性分别为 21.44,4.66,20.98,3.03 和 3.34 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$;当一氯苯体积分数增加为 10.0%时,脲酶活性分别增至 22.49,5.81,22.21,4.33 和 3.74 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$,其中 5 号土样的增幅最大,达 42.90%。其原因可能是,一氯苯农药加入土壤后,杀死一部分土壤微生物,从而释放出一些胞内酶,增加了土壤中脲酶的数量,导致土壤脲酶活性升高。

采用 $U=\beta_1 \times C+\beta_0$ 对一氯苯体积分数(C)和土壤脲酶活性(U)进行拟合,结果见表 3。从表 3 可以看出,3~6 号土样一氯苯体积分数与土壤脲酶活性间均呈显著正相关,表明在一定程度上土壤脲酶活性可表征一氯苯污染的程度。在生态毒理研究

中,酶活性降低 10% 所需的污染物浓度 (ED_{10}),可表征土壤轻微污染时的污染物浓度^[19]。由拟合方程计算得到供试土壤脲酶的 ED_{10} 为 34.0~110.1 g/kg。根据剂量最小,影响最大的原则,本试验将 34.0 g/kg 一氯苯作为供试土壤轻度污染的临界值。

表 2 不同体积分数一氯苯对土壤脲酶活性的影响

Table 2 Soil urease activities affected by monochlorobenze of different concentrations		$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$					
土样 Soil	样品编号 No.	土壤脲酶活性 Soil urease activity					
		0.0%	0.5%	1.0%	2.5%	5.0%	10.0%
楼土 Lou soil	1	23.43	22.74	22.41	24.43	23.17	24.06
	2	21.44	21.90	20.66	22.45	22.32	22.49
	3	4.66	5.25	4.91	5.50	5.63	5.81
红壤 Red soil	4	20.98	19.93	20.66	21.30	21.98	22.21
	5	3.03	3.59	3.68	3.82	4.02	4.33
	6	3.34	3.06	3.31	3.56	3.56	3.74

注:尿素浓度为 0.100 mol/L.
Note: Urea concentration is 0.100 mol/L.

表 3 一氯苯体积分数(C)与土壤脲酶活性(U)的拟合方程

Table 3 Regression equations between monochlorobenze concentration and urease activity				
土壤 Soil	土壤编号 Soil sample	拟合方程 Regression equations	相关系数 Correlation coefficient	$ED_{10}/$ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
楼土 Lou soil	1	$U=0.099\ 7+23.058C$	0.493	—
	2	$U=0.118\ 6+21.501C$	0.629	—
	3	$U=0.096\ 2+4.989C$	0.829 *	51.9
红壤 Red soil	4	$U=0.186\ 9+20.585C$	0.839 *	110.1
	5	$U=0.100\ 5+3.427C$	0.871 *	34.0
	6	$U=0.052\ 6+3.262C$	0.831 *	62.0

注:自由度 $n-2=4$, $r_{0.05}=0.811$, $r_{0.01}=0.917$,下表同;* .表示显著相关。
Note: Freedom $n-2=4$, $r_{0.05}=0.811$, $r_{0.01}=0.917$,the following table is the same;* . Means significant correlation.

2.2 一氯苯对土壤脲酶动力学特征的影响

在酶促反应动力学中^[15], K_m 表征酶与底物结合的牢固程度,其值越小,则酶与底物的结合越牢固,二者的亲和力越强,反之越弱; $V_{\max}$ 是总酶量的量度,可反映酶-底物复合物解离为酶和产物的速率;对土壤来讲,其是实现某种酶过程的土壤潜在能力的容量指标; k 指当反应物浓度为 1 时的酶促反应速度,其值大小决定酶促反应在本质上的快慢,与底物浓度无关。

6 种供试土壤的脲酶活性特征参数见表 4。由表 4 可看出:(1)对照处理中,红壤的 K_m 值远大于楼土,红壤和楼土的 K_m 分别为 9.13~15.03 和 3.02~6.60 mmol/L,6 号土样的 K_m 是 1 号土样的 4.98 倍。这表明红壤在酶促反应过程中,脲酶与底物的亲和力远小于楼土,不利于酶促反应的进行,这与和文祥等^[9]的研究结论类似。(2)加入一氯苯后,同一土样脲酶的 K_m 值变化较小,基本处于同一数量级,表明一氯苯对土壤脲酶活性位点与底物的亲合力影响较小。(3)未添加一氯苯时,有机质含量高的土壤脲酶 $V_{\max}$ 大于有机质含量低的土壤,表明有机质含量较高的土壤其脲酶与底物可较快地解

离,这与一些学者认为土壤脲酶最大反应速度可表征土壤肥力水平的结论类似。(4)一氯苯的加入导致楼土 1 号和 2 号土样脲酶的 $V_{\max}$ 增大,其中 1 号土样的 $V_{\max}$ 值与一氯苯体积分数呈显著正相关($r=0.948$),2 号土样未达到显著相关水平,从总体上看一氯苯加速了脲酶-尿素复合物的解离。红壤的 $V_{\max}$ 随一氯苯体积分数的增加呈波动性变化,可见一氯苯对红壤脲酶复合物的解离速度影响较小。总体来看,一氯苯对土壤脲酶与底物解离的影响规律性不明显,其机理有待于进一步研究。

$V_{\max}/K_m$ 是反映酶促反应初速度大小的最主要指标。由表 4 可以看出:(1)1 号和 4 号土样脲酶的 $V_{\max}/K_m$ 分别大于 2 号和 3 号土样,且均大于 5 号和 6 号土样,这是由于有机质含量高的土样,不仅脲酶含量较高,而且对脲酶的保护作用较强的缘故。(2)随一氯苯体积分数的增大,1 号和 2 号土样脲酶的 $V_{\max}/K_m$ 值均呈减小的趋势,3 号土样呈增大的趋势,4~6 号土样的变化规律不明显,提示土壤脲酶活性与一氯苯的关系较为复杂,影响因素较多。(3)随一氯苯体积分数的增加,2 号与 1 号土样脲酶 $V_{\max}/K_m$ 的差距减小,一氯苯体积分数为 0.0%,

0.5%,1.0%,2.5%.5.0%和10%时,1号土样 $V_{\max}/K_m$ 分别为2号土样的1.35,1.68,1.41,1.38,1.21和1.08倍,而其他土样并未呈现相似的规律。 k 值的变化与 $V_{\max}$ 相似,有机质含量高的土样,其 k 值均大于有机质含量低的土样;除3号土样外,搂土的 k 值均大于红壤,表明其酶促反应速度大于红壤。随一氯苯体积分数的增加,各土样脲酶 k 值变化幅度均较小,表明一氯苯对土壤脲酶酶促反应速度的影响较小。

表 4 一氯苯对土壤脲酶活性动力学参数的影响
Table 4 Kinetic parameters of urease of tested soil

参数 Kinetic parameter	一氯苯体积分数/% Concentration	土样编号 No.					
		1	2	3	4	5	6
$K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.0	3.02	3.75	6.60	10.87	9.13	15.03
	0.5	3.03	5.25	4.64	7.43	15.48	11.71
	1.0	3.68	5.26	9.59	11.58	6.81	7.81
	2.5	3.57	3.66	4.93	8.78	7.39	5.44
	5.0	4.67	5.06	1.59	9.07	12.95	8.00
	10.0	5.54	5.13	1.68	9.02	25.08	16.35
$V_{\max}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0.0	77.12	71.34	20.06	98.34	9.47	12.43
	0.5	76.11	78.81	15.89	76.88	11.69	10.84
	1.0	80.81	82.04	22.98	97.21	8.77	12.86
	2.5	77.75	79.66	16.78	90.91	8.89	11.29
	5.0	83.32	74.82	10.67	65.11	4.94	10.23
	10.0	90.70	77.76	12.53	68.82	6.26	13.61
$(V_{\max}/K_m)/(\times 10^{-3})$	0.0	25.57	19.01	3.04	9.04	1.04	0.83
	0.5	25.16	15.01	3.43	10.34	0.76	0.93
	1.0	21.97	15.59	2.39	8.39	1.29	1.65
	2.5	21.76	15.76	3.40	10.35	1.20	2.08
	5.0	17.83	14.79	6.71	7.18	0.38	1.28
	10.0	16.39	15.16	7.48	7.63	0.25	0.83
$k/(\times 10^{-3})$	0.0	9.93	8.16	1.78	5.56	0.59	0.55
	0.5	9.77	7.25	1.69	5.64	0.50	0.58
	1.0	9.26	7.53	1.58	5.40	0.68	0.93
	2.5	9.19	7.19	1.65	5.99	0.64	1.01
	5.0	8.39	7.36	1.82	4.18	0.22	0.71
	10.0	8.23	7.12	2.16	4.38	0.17	0.56

3 结果与讨论

本研究结果表明,搂土的脲酶活性大于红壤;一氯苯对土壤脲酶有明显的激活作用,这主要是一氯苯进入土壤后能杀死微生物,释放胞内酶,导致土壤中脲酶含量增高所致,二者之间的关系可用线性方程较好拟合。搂土和红壤脲酶的ED₁₀分别为51.9和34.0 g/kg。供试土壤轻度污染时,一氯苯的临界浓度为34.0 g/kg。除个别处理外,搂土脲酶动力学参数 $V_{\max}$ 、 $V_{\max}/K_m$ 和 k 大于红壤,表明2类土壤脲酶酶促反应机理有所差异。一氯苯的加入使搂土 $V_{\max}$ 增大,表明其加速了脲酶-尿素复合物的解离;红壤的 $V_{\max}$ 受一氯苯影响较小。2种土壤的 $V_{\max}/K_m$ 和 k 随一氯苯体积分数的增加变化不明显,说明一氯苯与土壤脲酶活性之间的关系较为复杂,其作用机理还有待进一步研究。供试2类土壤的性质、成土母质、成土过程差异较大,这可能是造

成2类土壤脲酶活性对一氯苯农药反应差异较大的原因之一。

[参考文献]

[1] Bidleman T F, Leone A D. Soil-air exchange of organochlorine pesticides in the Southern United States [J]. Environmental Pollution, 2004, 128(1/2): 49-57.

[2] Jong H K, Alistair S. Distribution of organochlorine pesticides in soils from South Korea [J]. Chemosphere, 2001, 43: 137-140.

[3] Ricardo D V, Dores D C, Leandro C, et al. Dissipation of DDT in a heavily contaminated soil in Mato Grosso, Brazil [J]. Chemosphere, 2006, 64(4): 549-554.

[4] Badal B, Kumar S S, Nilanjana M. Organochlorine pesticide residues in sediments of atropical mangrove estuary, India: implications for monitoring [J]. Environment international, 2003, 29(5): 587-592.

[5] 鲁赫鸣, 闫颖, 王文思, 等. 农药对土壤过氧化氢酶活性的影响 [J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 2004, 36(4): 93-97.

Lu H M, Yan Y, Wang W S, et al. Influence of two pesticides

- on hydrogen peroxidase activity in soil [J]. Journal of North-east Normal University: Natural Science Edition, 2004, 36(4): 93-97. (in Chinese)
- [6] Tejada M, Gonzalez J L, Hernandez M T, et al. Application of different organic amendments in agasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 2872-2880.
- [7] Shen G Q, Lu Y T, Zhou Q X, et al. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme [J]. Chemosphere, 2005, 61(8): 1175-1182.
- [8] Hinojosa M B, Carreira J A, Rodríguez-maroto J M, et al. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: Ecological dose-response model [J]. The Science of the Total Environment, 2008, 396(2/3): 89-99.
- [9] 和文祥, 蒋新, 余贵芬, 等. 杀虫双对土壤脲酶活性特征的影响 [J]. 土壤学报, 2003, 40(5): 750-755.
He W X, Jiang X, Yu G F, et al. Effect of Dimehypo on soil urease activity [J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(5): 750-755. (in Chinese)
- [10] Gundi V A K B, Viswanath B, Chandra M S, et al. Activities of cellulase and amylase in soils as influenced by insecticide interactions [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 68: 278-285.
- [11] Xiao H Y, Min H, Lü Z H, et al. Influence of acetamiprid on soil enzymatic activities and respiration [J]. European Journal of Soil Biology, 2006, 42: 120-126.
- [12] Sannino F, Gianfreda L. Pesticide influence on soil enzymatic activities [J]. Chemosphere, 2001, 45(4/5): 417-425.
- [13] Tabatabai M A. Effect of trace elements on urease activity in soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1977, 9(1): 9-13.
- [14] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.
Guan S Y. Soil enzyme and its research methods [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1986. (in Chinese)
- [15] 和文祥, 朱铭莪. 陕西土壤脲酶与土壤肥力关系研究 II. 土壤脲酶的动力学特征 [J]. 土壤学报, 1997, 34(1): 42-52.
He W X, Zhu M E. Study on relation between urease and fertility of soils in Shaanxi II. soil urease kinetic characteristics [J]. Acta Pedologica Sinica, 1997, 34(1): 42-52. (in Chinese)
- [16] 薛冬, 姚槐应, 何振立, 等. 红壤酶活性与肥力的关系 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1455-1458.
Xue D, Yao H Y, He Z L, et al. Relationships between red soil enzyme activity and fertility [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(8): 1455-1458. (in Chinese)
- [17] 樊军, 郝明德. 长期施用化肥对黑垆土酶活性影响 [J]. 土壤肥料, 2003(5): 34-37.
Fan J, Hao M D. Effect of long-term fertilization on soil enzyme activities in black loessial [J]. Soils and Fertility, 2003(5): 34-37. (in Chinese)
- [18] 刘建新. 不同农田土壤酶活性与土壤养分相关关系研究 [J]. 土壤通报, 2004, 35(4): 523-525.
Liu J X. Correlative research on the activity of enzyme and soil nutrient in the different types of farmland [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2004, 35(4): 523-525. (in Chinese)
- [19] Doelman P, Haanstra L. Short-and long-term effects of heavy metals on phosphatase activity in soils: An ecological dose-response model approach [J]. Biology and Fertility of Soils, 1989, 8(3): 235-241.
-
- (上接第 170 页)
- [12] 秦义, 师俊玲, 樊明涛, 等. 富锌灵芝液体种子培养条件的优化 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(1): 153-156.
Qin Y, Shi J L, Fan M T, et al. Optimization of cultivation conditions for liquid seed of Zn-riching ganoderma lucidum [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(1): 153-156. (in Chinese)
- [13] Arranz I M, Derbyshire K, Kroeger, et al. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: interlaboratory study [J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 518-525.
- [14] 陈岩. 欧盟抬高果汁标准国内企业难招架 [J]. 食品科技, 2004(11): 84.
Chen Y. European Union enhancing the standard of fruit juice causes great a great challenge to national industries [J]. Food Technology, 2004(11): 84. (in Chinese)
- [15] Andersen B J, Smedsgaard, Frisvad J C. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(8): 2421-2428.