

# 杀虫双对土壤脲酶活性特征的影响<sup>\*</sup>

和文祥<sup>1,2</sup> 蒋 新<sup>1</sup> 余贵芬<sup>1</sup> 卞永荣<sup>1</sup>

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

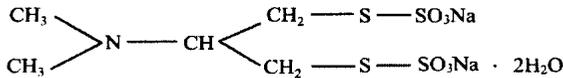
(2 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

**摘 要** 通过模拟方法研究杀虫双对土壤脲酶活性特征参数的影响。结果表明: 不同生态区域土壤脲酶特征具有明显差异。杀虫双明显抑制脲酶活性, 且随浓度增加, 脲酶活性、酶促反应的  $V_{max}$ 、 $V_{max}/K_m$ 、 $k$  减小,  $K_m$  增大, 除 6 号土样的  $K_m$  处理外均达到显著或极显著相关, 揭示出脲酶特征参数可从不同角度表征杀虫双对土壤脲酶活性的影响, 获得其作用机理为混合型抑制。脲酶活性  $ED_{50}$  值与土壤有机质、全氮和全磷呈现显著或极显著正相关关系, 表明高有机质含量的土壤可明显减轻杀虫双的污染。

**关键词** 土壤脲酶, 杀虫双, 酶动力学参数

**中图分类号** S154.2

杀虫双<sup>[1]</sup> 是 70 年代由我国自行研制开发的农药新品种, 属沙蚕毒素类农药, 是取代六六六类的重要品种, 分子式为:



生产上常用来防治水稻、蔬菜、果树等上的包括螟虫、苞虫、蚜虫在内的多种害虫, 效果较好。但在实际应用中, 由于有效率较低, 约 80% 的施用量直接进入土壤等环境中, 加之水溶性强, 使用后极易淋溶, 故其产生的负面效应如土壤残留污染、地下水污染及农产品品质下降等已引起人们广泛关注。

土壤脲酶是唯一可转化尿素肥料的土壤酶类, 活性高低与土壤营养物质转化能力、肥力水平、污染状况密切相关<sup>[2-4]</sup>。近年来国内外学者<sup>[5,6]</sup> 开展了土壤酶与农药关系研究, 但结果随农药种类、土壤类型等有所差异, 且研究手段较为单一, 多为仅测定酶活性变化值, 鲜见杀虫双与土壤酶作用机理的报道。为此本研究通过对杀虫双人工模拟污染土壤脲酶活性参数的测定分析, 探讨二者作用机理及变化规律, 最终为农药污染监测及环境保护提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

杀虫双标样由江苏省农药质量监测中心提供。

土样采自以我国秦岭为界划分的南、北两个生态区的各三个土样: 北方土(西北农林科技大学资源环境学院试验地)和南方红壤(江西鹰潭中国科学院红壤生态实验站)。采样时, 先去除 0~5 cm 表层, 采集 5~20 cm 土样, 风干, 过 1 mm 筛, 保存备用。

### 1.2 测定方法

常规方法<sup>[7]</sup> 测定土壤理化性质, 其中 pH 测定的水土比为 2.5:1, 并据土样有机质、全氮含量将土和红壤划分为高、中、低三个肥力水平, 编为 1~6 号, 土样基本性质等见表 1。

### 1.3 试验方法

5.00 g 土样中加入 1 ml 甲苯混匀, 静置 15 min 后, 分别添加 5 ml (0.00, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00,

<sup>\*</sup> 中国科学院知识创新工程重要方向项目(编号 KZCXZ-401)和国家重点基础研究发展规划项目(G1999011801-3)  
收稿日期: 2002-01-14; 收到修改稿日期: 2002-07-01

25.00 g L<sup>-1</sup>) 杀虫双溶液 30 min 后<sup>[8]</sup>, 加入 10 ml 不同浓度(0.010、0.025、0.050、0.100 mol L<sup>-1</sup>) 尿素溶液和 20 ml pH 6.7 磷酸盐缓冲液共计 60 个处理, 37℃ 水浴培养, 定时取样, 靛酚蓝比色法<sup>[9]</sup> 测定脲酶活性, 单位以每克土样每小时形成的 NH<sub>3</sub>-N 量表示。每处理重复三次, 并设无底物(尿素)和无土壤处理作为对照, 以分别检验土样和试剂中混杂的 NH<sub>3</sub>-N 量。各处理的酶活性为减去对照的酶活性后所得。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 The physical and chemical properties of soils tested

土壤 Soil	编号 No	粘粒 < 0.002mm Clay (%)	粉粒 0.002~0.050mm Silt (%)	砂粒 > 0.050mm Sand (%)	有机质 O. M. (g kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total N (g kg <sup>-1</sup> )	全磷 Total P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g kg <sup>-1</sup> )	阳离子代换量 CEC (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	pH
土	1	17.5	76.0	6.5	27.70	1.62	2.51	15.06	8.16
	2	19.4	72.3	8.3	19.30	1.12	1.97	14.08	8.25
	3	18.4	76.5	5.1	16.20	0.75	1.71	13.24	8.48
红壤	4	37.0	43.6	19.4	13.30	0.72	1.48	11.60	4.91
	5	32.3	39.4	28.3	11.40	0.67	1.23	10.10	5.07
	6	27.8	39.3	32.9	10.90	0.59	0.95	8.56	5.53

## 1.4 数据处理

1.4.1 土壤酶动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ <sup>[10,12]</sup> 的计算 土壤酶促反应的初速度  $V_0$ , 经典米氏方程为:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

数学变换后得到:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} = -\frac{1}{K_m} \times \frac{[S_0] - [S]}{t} + \frac{V_{max}}{K_m}$$

式中,  $t$  为酶促反应时间,  $[S_0]$  和  $[S]$  为初始和  $t$  时间时的底物浓度。

将不同时间的  $\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]}$  和  $\frac{1}{t}([S_0] - [S])$  值进行线性拟合, 即可求得  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

1.4.2 土壤酶促反应速度常数  $k$ <sup>[11]</sup> 的计算:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{V_a}{V_a - V_t}$$

其中  $V_a$ 、 $V_t$  分别为最大产气量和  $t$  时间的产氮量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 杀虫双对土壤脲酶活性的影响

供试土壤脲酶活性(表 2) 显示, 未添加杀虫双处理的酶活性最大。当供试土样按照南、北两区域划分后呈现肥力水平越高, 脲酶活性越大的规律性变化, 佐证了作者的结论<sup>[3,12]</sup>。此外 土脲酶活性大于红壤, 这主要是由于 土形成于少雨、干旱、偏碱等环境中, 有利于分泌脲酶微生物(适宜好氧、中性偏碱等条件)的生长发育, 而红壤则相反, 同时 土含有较高的有机质, 能够固定吸附较多的游离态脲酶, 最终造成上述结果。

添加杀虫双后土壤酶活性急剧降低, 表明其对脲酶具有显著的抑制作用, 且随浓度增加, 酶活性降幅增大。为此对酶活性( $U$ ) 和杀虫双浓度( $C$ ) 进行线性拟合, 方程均达到显著或极显著负相关(表 3), 表明无论是南方还是北方土壤, 脲酶活性在一定程度上均可表征土壤中杀虫双污染程度的高低。

表 2 杀虫双对土壤脲酶活性的影响<sup>1)</sup>Table 2 Effect of dimethypo on urease activity of soils tested ( $\text{NH}_3 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

土壤 Soil	编号 No	杀虫双浓度 Dimethypo concentration( $\text{g L}^{-1}$ )					
		0.00	2.50	5.00	10.00	20.00	25.00
土	1	21.55	21.38	16.15	8.10	4.96	2.17
	2	10.50	8.45	6.26	4.45	2.32	1.58
	3	9.91	7.38	5.39	3.37	1.63	1.09
红壤	4	7.14	5.33	3.62	2.94	0.99	0.58
	5	4.65	2.97	2.52	1.22	0.49	0.38
	6	4.03	2.48	1.64	0.99	0.45	0.31

1) 尿素浓度为  $0.100 \text{ mol L}^{-1}$

表 3 土壤脲酶活性与杀虫双浓度的线性关系<sup>1)</sup>

Table 3 Regression equations between soil urease activity and dimethypo concentration

土壤 Soil	编号 No	$U = \beta_0 + \beta_1 \times C^{2)}$	相关系数 <sup>3)</sup>	ED <sub>50</sub>
			Correlation coefficient	( $\text{g L}^{-1}$ )
土	1	$U = 20.747 - 0.8025 \times C$	-0.955 <sup>**</sup>	25.850
	2	$U = 9.031 - 0.3302 \times C$	-0.951 <sup>**</sup>	13.676
	3	$U = 8.111 - 0.3181 \times C$	-0.931 <sup>**</sup>	12.751
红壤	4	$U = 5.896 - 0.2364 \times C$	-0.944 <sup>**</sup>	12.469
	5	$U = 3.603 - 0.1503 \times C$	-0.911 <sup>**</sup>	11.982
	6	$U = 2.930 - 0.1228 \times C$	-0.872 <sup>*</sup>	11.928

1) 尿素浓度为  $0.100 \text{ mol L}^{-1}$ ; 2)  $\beta_0$  为不添加农药时的土壤酶活性,  $\beta_1$  为每单位杀虫双浓度引起的土壤酶活性变化值; 3) \* 和\*\* 分别代表 5% 和 1% 显著水平

由拟合方程可计算脲酶活性降低 50% 时所需杀虫双的量, 即脲酶生态剂量 ED<sub>50</sub> (Ecological dose)<sup>[13]</sup>。表 3 看出, 土脲酶活性 ED<sub>50</sub> 值远大于红壤, 这是由于土有机质吸附固定的脲酶较多<sup>[9]</sup>, 有机质等可与农药发生吸附等反应, 使得农药的形态等发生变化, 引起其对土壤酶等生物体毒性的改变<sup>[14]</sup>所致, 即有机质可减弱杀虫双的毒性的缘故。

同一类土壤随肥力水平升高, 土壤脲酶 ED<sub>50</sub> 值增大。相关分析显示 ED<sub>50</sub> 值与有机质、全氮和全磷的相关系数分别达到 0.919<sup>\*\*</sup>、0.931<sup>\*\*</sup> 和 0.832<sup>\*</sup>, 佐证了有机质对脲酶的保护和对杀虫双毒性的缓冲作用, 反映出肥力水平较高的土壤, 酶受杀虫双的影响幅度较小。

此外应注意的是一般施用农药时期正是农田作物生长发育最快的阶段, 此时杀虫双加入后会降低脲酶活性, 也就减缓了尿素转化速率, 使得作物的营养需求出现亏缺, 在一定程度上导致肥料利用率降低, 所以如何协调好二者关系有待进一步研究。

## 2.2 杀虫双对土壤脲酶动力学参数的影响

在酶促反应动力学研究中<sup>[16, 17]</sup>, 米氏常数  $K_m$  值表征酶与底物结合的牢固程度,  $K_m$  值越小, 酶与底物结合越牢固, 亲和力愈大; 最大反应速度  $V_{\text{max}}$  反映酶-底物复合物解离为酶和产物的速率, 对土壤来讲<sup>[17]</sup>, 它是实现某种酶促过程土壤潜在能力的容量指标。

由表 4 看出, 供试土壤脲酶的  $K_m$  均处于同一数量级 (其中相差最大为 3.52 倍), 主要是由于土壤脲酶来源较为单一 (微生物)<sup>[15]</sup>。对照处理 土脲酶  $K_m$  值范围是  $0.934 \sim 2.176 \text{ mmol L}^{-1}$  尿素, 红壤为  $2.451 \sim 3.286 \text{ mmol L}^{-1}$  尿素, 可见红壤脲酶  $K_m$  高于 土, 表明红壤脲酶酶促反应过程中酶与底物的亲和力较小, 不利于酶促反应进行。

表 4 供试土壤脲酶的动力学参数  
Table 4 The soil urease kinetic parameter

动力学参数 Dynamic parameter	杀虫双浓度(g L <sup>-1</sup> ) Dimethypo concentration	土样 Soil sample					
		1	2	3	4	5	6
$K_m$	0.0	1.298	2.176	0.934	2.578	3.286	2.451
	2.5	1.834	2.583	1.138	3.114	4.503	1.916
	5.0	2.869	3.425	1.215	3.439	3.950	2.958
	10.0	2.435	4.966	1.218	7.412	6.971	8.101
	20.0	4.327	15.161	1.310	5.791	9.291	15.011
	25.0	5.373	18.005	1.761	6.318	13.004	14.830
$V_{max}$	0.0	86.1	42.5	39.0	28.4	19.5	14.5
	2.5	82.6	32.3	28.3	20.8	13.7	8.4
	5.0	81.0	26.5	21.9	15.4	8.5	6.6
	10.0	36.3	20.1	13.7	13.4	6.1	5.8
	20.0	16.1	16.6	6.3	4.2	2.4	3.6
	25.0	10.3	8.3	5.1	2.9	2.2	2.4
$V_{max}/K_m$	0.0	66.33	19.53	41.78	11.02	5.93	5.92
	2.5	45.04	12.51	24.87	6.68	3.04	4.38
	5.0	28.23	7.74	18.03	4.48	2.15	2.23
	10.0	14.91	4.05	11.25	1.81	0.88	0.72
	20.0	3.72	1.10	4.81	0.73	0.26	0.23
	25.0	1.92	0.46	2.90	0.46	0.17	0.16

注:  $K_m$ 、 $V_{max}$  的单位分别是  $(NH_2)_2CO$  mmol L<sup>-1</sup>、 $(NH_2)_2CO$  mmol L<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>

杀虫双污染导致土壤脲酶  $K_m$  值增大, 且随浓度升高, 脲酶  $K_m$  值持续递增。相关分析显示, 除 6 号土样外, 其余均达到显著或极显著正相关(表 5)。揭示出杀虫双的添加, 部分掩盖或占据了脲酶的活性中心, 进而阻止了尿素与活性中心的结合, 导致酶促反应速度减缓, 可见作用机理中包含有竞争性抑制。

在相同杀虫双浓度处理下, 总体上除 3 号外, 其余土样的  $K_m$  呈现肥力水平越高, 变幅越小的规律性变化, 如杀虫双浓度从 0.00 增加至 25.00g kg<sup>-1</sup>, 1、2 号土样(土)脲酶  $K_m$  增幅 4.14 和 8.27 倍, 4、5、6 号(红壤)为 2.45、3.96 和 6.05 倍, 揭示出肥力水平越高, 土壤对酶保护及杀虫双缓冲的作用越强, 脲酶与尿素的亲和力越大, 杀虫双的生态毒害相对越轻。

供试土壤脲酶  $V_{max}$  值差异较大, 其中未添加杀虫双处理的 1 号土样脲酶  $V_{max}$  为 0.0861 mmol L<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, 6 号土样为 0.0145 mmol L<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, 二者相差达 5.94 倍, 且土脲酶  $V_{max}$ (0.039~0.0861 mmol L<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) 总体上大于红壤的(0.0145~0.0284 mmol L<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), 表明土脲酶-底物复合物可较快解离成酶和产物。在同一区域土壤脲酶  $V_{max}$  值呈现肥力水平越高,  $V_{max}$  越大的规律性变化, 揭示出高肥力土壤中脲酶与底物可形成较多的酶-底物复合物, 并能较快地解离。

杀虫双的加入导致土壤脲酶  $V_{max}$  减小, 且随浓度增加脲酶  $V_{max}$  持续降低, 其间达到显著或极显著负相关(表 5)。反映出土壤脲酶  $V_{max}$  值也可表征土壤受杀虫双污染程度的大小; 杀虫双阻止了尿素-脲酶复合物的解离, 即机理中含有非竞争性抑制。

表 5 土壤脲酶特征参数与杀虫双的相关系数

Table 5 Correlation coefficient between soil urease characteristic parameter and dimethypo concentration

脲酶参数 Urease parameter	土样 Soil sample					
	1	2	3	4	5	6
$K_m$	0.957**	0.980**	0.897*	0.974**	0.978**	0.745
$V_{max}$	-0.960**	-0.937**	-0.931**	-0.862*	-0.894*	-0.953**
$V_{max}/K_m$	-0.900*	-0.887*	-0.884*	-0.864*	-0.841*	-0.866*
$k$	-0.956**	-0.927**	-0.903*	-0.874*	-0.867*	-0.901*

\* 和\*\* 分别代表 5% 和 1% 显著水平

有学者认为<sup>[17]</sup>, 在较大范围内,  $V_{\max}/K_m$  是酶促反应初速度最重要的指标。由表 4 可见, 土壤脲酶活性  $V_{\max}/K_m$  值随杀虫双的变化与土壤脲酶  $V_{\max}$  值基本类似, 只是对  $V_{\max}/K_m$  影响更明显, 幅度更大, 这主要是杀虫双导致  $K_m$  增大,  $V_{\max}$  减小所致。相关分析发现  $V_{\max}/K_m$  与杀虫双浓度达到显著负相关。表明杀虫双的加入, 降低了土壤脲酶酶促反应的初速度。

脲酶酶促反应常数  $k$  是指当反应物浓度为 1 时的反应速度, 其值大小决定一个反应在本质上是快还是慢, 与底物浓度无关。表 6 反映出 土酶促反应速度常数大于红壤, 杀虫双导致  $k$  值减少, 随杀虫双浓度增加脲酶  $k$  值降低, 其间也达到了显著或极显著负相关, 表明杀虫双从本质上抑制了土壤脲酶酶促反应的速度。

表 6 土壤脲酶反应速度常数  $k$

Table 6 Soil urease reaction velocity constant  $k$  ( $\times 10^{-3} h^{-1}$ )

土壤 Soil	编号 No	杀虫双浓度 Dimehypo concentration (g L <sup>-1</sup> )					
		0.00	2.50	5.00	10.00	20.00	25.00
土	1	16.61	14.51	11.63	5.42	3.12	1.05
	2	6.84	4.69	3.90	2.67	0.82	0.65
	3	8.48	5.56	4.13	2.59	1.16	0.83
红壤	4	3.90	2.56	1.78	0.97	0.37	0.23
	5	2.31	1.35	0.91	0.46	0.16	0.11
	6	2.09	1.34	0.85	0.41	0.18	0.11

综上所述, 不同生态区域土壤脲酶活性特征截然不同, 土酶活性大于红壤, 表明土壤成土条件及气候等因素对土壤酶特征具有重要影响, 其中有机质的作用十分重要。杀虫双可显著抑制土壤脲酶活性, 随杀虫双浓度增加, 土壤脲酶活性、最大反应速度  $V_{\max}$ 、 $V_{\max}/K_m$  和酶促反应速度  $k$  值减小,  $K_m$  增大, 表明杀虫双对土壤脲酶的作用为混合型抑制(mixed inhibitory), 即抑制作用既包含竞争性抑制, 又含有非竞争性抑制。土壤脲酶活性可表征土壤杀虫双污染程度的大小。土脲酶的  $K_m$ 、 $V_{\max}$ 、 $k$  均大于红壤, 说明酶活性的高低是它们共同作用的结果, 反映出各动力学参数是从不同角度来反映酶促反应特征的, 其是一致的, 相互补充说明的。脲酶活性  $ED_{50}$  值与土壤有机质、全氮和全磷呈现显著或极显著正相关关系, 证明了高有机质含量的土壤可明显减轻杀虫双的污染。

#### 参考文献

1. 靳伟. 杀虫双在稻田的残留动态. 土壤, 1992, 24(5): 252~ 259
2. 关松荫, 沈桂琴, 孟昭鹏, 等. 我国主要土壤剖面土壤酶活性. 土壤学报, 1984, 21: 368~ 381
3. 和文祥, 朱铭莪. 陕西主要土壤脲酶活性与肥力关系研究. 土壤学报, 1997, 34(4): 392~ 398
4. Marador C, Ciavatta D, Montecchio D, *et al.* Effect of lead pollution on different soil enzyme activities. Biol. Fertil. Soil, 1996, 22: 53~ 58
5. 关松荫. 农药对土壤酶活性的抑制作用. 土壤通报, 1992, 23(5): 232~ 233
6. Liliana G, Filomena S, Antonio V. Pesticide effects on the activity of free immobilized and soil invertase. Soil Biol. Biochem., 1995, 27(9): 1 201~ 1 208
7. 南京农学院编. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社, 1982
8. Tabatabai M A. Effect of trace elements on urease activity in soils. Soil Biol. Biochem., 1977, 9: 9~ 13
9. 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1987
10. Malcolm D, Edwin C.W. Enzymes. London: Laongmans, Green and Co. Ltd., 1958. 62~ 181
11. 复旦大学编. 物理化学实验(上册). 北京: 人民教育出版社, 1979. 117~ 119
12. 和文祥, 朱铭莪. 陕西土壤脲酶活性与土壤肥力关系研究 II. 土壤脲酶的动力学特征. 土壤学报, 1997, 34(1): 42~ 52

13. Moreno J L, Garcia C, Landi L, *et al.* The ecological dose value ( $ED_{50}$ ) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33: 483~ 489
14. Guenzi W D 著. 夏祿增, 张莉译. 土壤和水中的农药. 北京: 科学出版社, 1985
15. Burn R C. *Soil Enzymes*. New York: Academic Press, 1978
16. Dalal R C. Distribution, salinity, kinetic and thermodynamic characteristics of urease activity in a vertisol profile. *Aust. J. Soil Res.*, 1985, 23: 49~ 60
17. Aliyev S A, Gadjiyev D A, Mikailov F D. Kinetic and thermodynamic characteristics of enzyme invertase and urease in azarbaijan soils. , 1984, (11): 55~ 66

## EFFECT OF DIMEHYPO ON SOIL UREASE ACTIVITY

He Wen-xiang<sup>1,2</sup> Jiang Xin<sup>1</sup> Yu Gui-fen<sup>1</sup> Bian Yong-rong<sup>1</sup>  
 (1 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)  
 (2 *College of Resources and Environmental Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100 China*)

### Summary

The relationship between the concentration of dimehypo and soil urease activity parameters was studied in this paper. The results showed that the characteristics of soil urease had remarkable divergence among the tested soils from different ecological zones. Dimehypo inhibited soil urease activity very significantly and the characteristic parameters of soil urease, such as its activity, maximum reaction velocity  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$  and velocity constant  $k$  excluding  $K_m$ , were decreased with increasing dimehypo concentrations. The correlation of urease activity and dimehypo concentration was in very significant level with few exceptions. To a certain extent, urease activity can be used as an index to characterize the soil polluted by dimehypo. The enzymatic reaction mechanism was mixed inhibitory between soil urease and dimehypo. It was concluded from  $ED_{50}$  values that the high content of organic matter as well as total N and total P alleviated the ecological toxicity of dimehypo in soils.

**Key words** Soil urease, Dimehypo, Enzyme kinetic parameter