

甲苯对土壤脲酶活性影响的实验研究

和文祥^{1,2}, 蒋新¹, 朱茂旭¹, 王芳¹ (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环系, 陕西杨凌 712100, E-mail: hewenx @public.xa.sn.cn)

摘要: 通过脲酶受甲苯作用的研究, 结果表明甲苯对洋刀豆脲酶活性的影响极其微弱, 但可显著增强土壤的脲酶活性, 7 个土样的增幅为 1.48 ~ 3.96 倍, 且甲苯在较低浓度和较短处理时间内可完成对土壤脲酶的作用, 灭菌土壤吸附洋刀豆脲酶后活性变幅小于 3.98%, 这主要是由于甲苯可能将土壤微生物毒害或致死, 释放胞内脲酶, 并将脲酶等固定在土壤有机-无机胶体上所致. 同时揭示出国内外学者研究结果差异的原因可能是土壤 pH 等理化性质及其造成的微生物区系不同.

关键词: 甲苯; 土壤脲酶活性; 土壤

中图分类号: S154.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2001)06-04-0091

Effect of Toluene on Urease Activity of Lou Soil

He Wenxiang^{1,2}, Jiang Xin¹, Zhu Maoxu¹, Wang Fang¹ (1. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Department of Resource and Environmental Science, Northwestern Agricultural Forestry University of Science & Technology, Yangling Shaanxi 712100, China E-mail: hewenx @public.xa.sn.cn)

Abstract: Urease activity affected by toluene studying results showed as follows: Toluene had little action on Jackbean urease activity, but can remarkably increase soil urease activity in lower toluene concentrations and shorter time, the increasing variation was 1.48 ~ 3.96 times than without toluene treatment in seven soil samples tested. The variation was less than 3.98% when sterilized soil samples adsorbed the Jackbean urease. It may be because toluene can kill soil microorganism, release urease within cell and subsequently urease fixed into soil organic-inorganic colloidal. Different soil pH and microbiology can lead to vary differently for urease activity.

Key words: toluene; soil urease activity; Lou soil

自 Conrad(1935) 首先发现能够水解尿素的土壤脲酶以来, 国内外学者^[1~5]对其来源、性质等进行了研究, 获得了较满意的结果. 同时甲苯作为一种广泛应用的有机溶剂和农药等在土壤中降解的中间产物, 一方面污染土壤, 降低土壤质量; 另一方面不可避免地会与土壤脲酶等发生作用, 导致酶活性改变. 所以甲苯与土壤脲酶间关系研究在理论和实践上均具有重要意义. 但甲苯在脲酶活性测定方面^[6]被用作土样的前处理试剂后, 其对脲酶活性影响^[6~13]的报道却大相径庭, 如 R. C. Dalal(1975)^[7]等认为甲苯降低脲酶活性, Tabatabai(1972)^[8]却发现活性增加. 本文拟通过对不同状态脲酶活性受甲苯影响的研究, 探讨二者间关系, 为环境保护

提供依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

洋刀豆脲酶(Jackbean urease) 由英国 BHD 化学有限公司生产, 活性为每 mg 脲酶 35℃下 30 min 水解 3 mg 尿素, 活性值为 1.7 EU; 采用 1000 ml pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解 0.200g 后备用.

土样采自西北农林科技大学资环系 1977

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(GI999011801-3); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-401).

作者简介: 和文祥(1968~), 男, 博士后, 主要研究方向为土壤生化及生态毒理.

收稿日期: 2000-11-07

年开始的长期肥料定位试验地,采样时先去除 0~5 cm 表层,5 点法取 5~20 cm 土样,风干后过 1 mm 筛,保存.其培肥方案和有机质含量见表 1.

表 1 供试土样的培肥方案和有机质含量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Table 1 The experiment programs and organic matter content of soils tested

编号	施肥种类/ $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$				有机质 ¹⁾ O. M
	尿素	过磷酸钙	玉米秸秆	厩肥	
1	0	0	0	0	13.00
2	450	525	0	0	14.70
3	450	525	9375	0	14.10
4(休闲)	450	525	9375	0	16.50
5	450	525	18750	0	18.28
6	450	525	37500	0	18.79
7	450	525	0	37500	20.40

1) 有机质是 1999 年测定的结果

1.2 测定方法

对 5.00 g 土样或 2.0 ml 洋刀豆脲酶溶液分别作如下处理:①不同数量(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml) 甲苯溶液 15 min;②不同作用时间(0、1、2、3、4、5、10、15、20、25 min);③土样加入甲苯后添加 10 ml 蒸馏水在摇床上浸提 60 min,离心 5 min(转速为 1000 r/min),将上清液和土样分离;④土样 121℃ 灭菌 40 min 后加入 2 ml 洋刀豆脲酶溶液,然后添加 10 ml 10% 尿素溶液和 20 ml 蒸馏水,37℃ 培养,定时取样加入 50 ml 2.0 mol/L KCl-PMA(醋酸苯基汞)溶液,振荡后采用靛酚蓝比色法测定脲酶活性.

各处理均重复 3 次,并设无土壤(或洋刀豆脲酶)和无尿素处理作为对照.脲酶活性以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 计,分别为 $\mu\text{g}\cdot(\text{ml}\cdot\text{h})^{-1}$ (纯酶)或 $\mu\text{g}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$ (土壤脲酶)表示.

2 结果与讨论

2.1 甲苯对脲酶活性的影响

添加 1.0 ml 甲苯对土壤脲酶活性影响见图 1.可看出甲苯显著增大了土壤脲酶活性,且不同土样间增幅有所差别,7 个土样的增幅为 1.48~3.96 倍.

洋刀豆脲酶活性的结果(表 2)反映出当加入 1.0 ml 甲苯时,酶活性仅降低 $32.28\mu\text{g}\cdot(\text{ml}\cdot\text{h})^{-1}$,幅度为 4.28%.表明甲苯对洋刀豆脲酶的影响极微弱,即其并没有改变洋刀豆脲酶构型等;比照土壤脲酶的变化可看出,甲苯可能通过其它方面来增强土壤酶活性的.

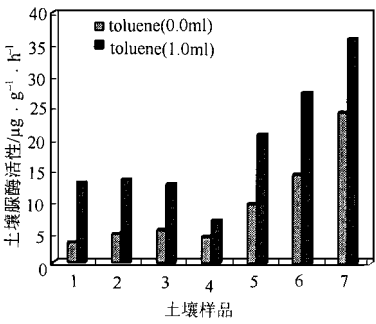


图 1 甲苯对土壤脲酶活性的影响
Fig.1 Soil urease activity affected by toluene

此结果与许多学者的研究不尽一致,如 R. C. Dalal(1975)^[7]向土样中加入 20% 甲苯后土壤脲酶活性降低,同时甲苯不加速尿素的水解,认为此时测得的土壤脲酶活性主要是固定在土壤有机-无机复合体上的胞外酶活性;P. B. May 等(1976)^[13]向 pH4.5~8.9 的 5 个土样(3.0 g)添加 0.5 ml 甲苯后土样脲酶活性变化很小;Galstyan(1965)^[14]等也得出类似结论.

而 Tabatabai 等(1972)^[8]的试验反映出甲苯增强土壤脲酶活性,认为是土壤微生物(活的但无增殖能力及已致死的微生物)细胞中尿素和反应产物的通透性增加,尿素水解速度加快所致.

土壤中存在 2 种状态的脲酶^[3]:与有机质-粘粒结合的吸附态(胞外酶)和微生物细胞中游离态(胞内酶)的脲酶.甲苯对脲酶的可能影响包括:①甲苯在短时间内将吸附态脲酶溶解成为游离态,从而增加活性;②作为杀菌剂和质壁分离剂,甲苯加入导致微生物细胞破裂,胞内酶外泄,最终提高酶活性;③土壤中存在可利用甲苯(碳源和能源)的微生物,添加的尿素提供氮源,微生物即可迅速良好生长,结果使脲酶活性

升高,如 David 等(1979)^[9]将 34 种真菌、担子菌和细菌接种在含有 0.1 %和 0.05 %甲苯(唯一碳源)的培养基上培养,发现有 19 种能够良好生长;S. P. Kale 等(1982)^[10]的试验显示甲苯不能使土壤达到完全灭菌的目的,原因主要是存在可降解甲苯的微生物。

由不同甲苯浓度下脲酶活性值(表 2)可看出:在供试甲苯浓度范围内,洋刀豆脲酶活性(以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 计)的变量最高达到 $67.55\mu\text{g}\cdot(\text{ml}\cdot\text{h})^{-1}$

$\text{h})^{-1}$,但变异系数较小为 8.95 %;而土样在加入甲苯后酶活性急剧增加,0.5 ml 浓度时增幅为 59.6 %~350.2 %之间,之后当甲苯浓度继续增加到 2.5 ml,除 4、7 号土样增幅为 98 %和 35 %外,其余土壤酶活性变幅不明显,均小于 20.22 %,表明甲苯对土壤脲酶活性的作用是极强的,少量甲苯即可使得土壤脲酶活性有一个大的增加。这可能主要是甲苯能迅速杀死并将微生物破壁后,其中的脲酶等释放出来的缘故。

表 2 甲苯浓度对脲酶活性的影响

Table 2 Urease activity effected by toluene concentrations

洋刀豆脲酶		土壤脲酶(以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 计)/ $\mu\text{g}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$						
甲苯/ml (以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 计)								
	/ $\mu\text{g}\cdot(\text{ml}\cdot\text{h})^{-1}$	1	2	3	4	5	6	7
0	754.32	3.21	4.53	5.23	4.18	9.45	14.19	24.05
0.5	686.77	14.45	13.65	13.84	7.13	20.44	29.45	38.38
1.0	722.04	12.72	13.20	12.55	6.72	20.42	27.12	35.78
1.5	747.15	13.92	12.62	12.55	8.16	20.22	27.03	38.02
2.0	713.67	13.62	14.80	13.19	9.70	19.66	30.39	54.78
2.5	732.80	14.98	16.41	14.92	14.11	20.96	28.10	51.93

图 2 显示在处理时间内,加入甲苯后的较短时间内土壤脲酶活性便急剧增加,随时间延长,脲酶活性增幅减缓,揭示甲苯对微生物中脲酶的释放作用可在瞬时完成,佐证了甲苯毒性较强的结论。

- 3.28 %~3.98 %,表明土壤酶的载体(有机质和粘粒)对甲苯与脲酶活性间关系的影响作用较弱。

表 3 灭菌土壤加入纯酶后的酶活性¹⁾/ %

Table 3 Urease activity of sterilized soils after addition with jackbean urease

甲苯/ml	土样		
	1	3	7
0.0	100.00	100.00	100.00
0.5	100.40	95.90	102.28
1.0	97.59	98.36	103.41
1.5	99.60	96.72	102.62
2.0	99.20	95.90	103.87
2.5	98.80	97.54	103.98

1) 土壤脲酶活性以对照为 100 %的比值来表示

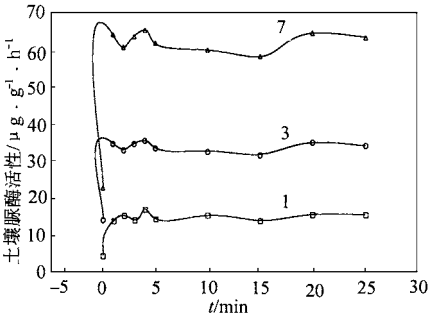


图 2 不同甲苯处理时间的土壤脲酶活性

Fig. 2 Soil urease activity influenced by toluene time

2.2 灭菌处理下甲苯对脲酶活性的影响

土样灭菌后加入 2 ml 洋刀豆脲酶溶液进行培养分析土壤脲酶活性,酶活性比值见表 3。其显示出不同土样脲酶活性变化极小,变幅仅为

表 4 可清楚地看出,经过振荡离心后上清液没有检测到脲酶活性,剩余土样酶活性随甲苯浓度的变化规律与原始土样基本类似,表明在本地区土壤上,甲苯既没有将土壤中吸附态脲酶溶解下来,也没有在培养过程中出现能利用甲苯的微生物,因为如果不是这样的话,在

1000r/min,5 min 分离条件下游离态脲酶和微生物便会留在上清液中,这样上清液的酶活性就应增加,但是试验结果却相反.表明在本地区石灰性土壤上,甲苯与土壤脲酶的作用机理是甲苯导致微生物细胞破裂,将包括脲酶等在内的胞内酶释放出来,并迅速固定在土壤有机-无机颗粒上,转化为吸附态脲酶,最终使得脲酶活性增加.

表 4 浸提后土壤与上清液的酶活性

Table 4 The urease activity of upper solution and soil after extraction

取样 部位	甲苯 / ml	土 样		
		1	3	7
上清液	0.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	1.0	0	0	0
	1.5	0	0	0
土 壤	0.0	2.38	6.33	18.12
	0.5	8.67	18.22	26.14
	1.0	7.56	25.94	27.25
	1.5	7.80	18.55	29.44

可见甲苯对土壤脲酶影响的本质是通过微生物来完成的.而国内外学者在此方面研究结果的不一致主要原因可能是土壤类型和理化性质如 pH 等的不同导致土壤微生物区系差异所造成的,如 Dalal 试验的是酸性土样,pH 范围为 4.0~6.8;其它一些学者的土样的 pH 则较宽,酸碱性土样均有;本实验使用的则是碱性土样.

3 结 论

甲苯对纯脲酶(洋刀豆脲酶)的活性影响较小;甲苯在较低浓度和较短时间内可显著增强土壤脲酶活性值,主要可能通过对土壤微生物的抑制或毒害;国内外学者研究结果的差异可

能是土壤类型和理化性质如 pH 等及其土壤微生物区系不同所致.

参考文献:

1 Manunza B,Deiana S,Pintore M et al. The binding mechanism of urea,hydroxamic acid and N(Nbutyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biol & Biochem*, 1999,**31**:789~796.

2 Dalal R C. Distribution,salinity,kinetics and thermodynamic characteristics of urease activity in vertisol profile, *Aust.J. Soil Res.*, 1985,**23**:49~60.

3 Pettit N M,Smith A R J,Freedman R B, Burns R G. Soil urease :activity, stability and kinetic properties. *Soil Biol. & Biochem.*, 1976,**8**:479~484.

4 Burns R G. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. & Biochem.*, 1982,**12**:423~427.

5 和文祥,朱铭莪. 陕西主要土壤脲酶活性与土壤肥力关系的研究. *土壤学报*, 1997,**34**(4):392~398.

6 Zantua M I, Bremner J M. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol & Biochem*, 1975,**7**:291~295.

7 Dalal R C. Efficient of toluene on the energy barriers in urease activity of soils. *Soil Science*, 1975,**120**(4):256~260.

8 Tabatabai M A, Bremner J M. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. & Biochem.*, 1972,**4**:479~487.

9 Elmar R,Altwickler. The destruction and removal efficiency of toluene in combustion and related processes. *Chemosphere*, 1989,**19**(8/9):1233~1241.

10 Kale S P, Rachu K. Efficacy of different soil sterilization methods. *Chemosphere*, 1982,**11**(12):1243~1247.

11 David L, Kaplan, Roy Hartensten. Problems with toluene and the determination of extracellular enzyme activity in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 1979,**11**:335~338.

12 Perez M, Mateos, Gonzalez carcedo. Accion del tolueno sobre la localizacion de actividad ureasica en fracciones granulometricas de suelos. *Agrochimica*, 1988,**32**(1):81~89.

13 May P B, Douglas L A. Assay for soil urease activity. *Plant and Soil*, 1976,**45**:301~305.

14 Galstyan A S. A method of determining the activity of hydrolytic enzymes in soil. *Soviet Soil Sci.*, 1965,**2**:170~175.