

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20170529003

王金燕, 孙华忠, 卜元卿, 等. 毒死蜱对紫金山森林土壤酶活力及微生物毒性影响研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 210-218

Wang J Y, Sun H Z, Bu Y Q, et al. Effect of chlorpyrifos on enzyme activities and microbial activity in Zijin Mountain Forest Soil [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(4): 210-218 (in Chinese)

毒死蜱对紫金山森林土壤酶活力及微生物毒性影响研究

王金燕¹, 孙华忠¹, 卜元卿^{1,*}, 宋宁慧¹, 董琰^{1,2}, 谭丽超¹

1. 环境保护部南京环境科学研究所/国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室, 南京 210042

2. 河海大学, 南京 210098

收稿日期: 2017-05-29 录用日期: 2017-09-06

摘要: 毒死蜱是有机磷类农药, 对乙酰胆碱酯酶具有抑制作用, 在农业虫害防治中应用广泛。为掌握毒死蜱对森林土壤酶活力和土壤微生物生态效应, 选择紫金山森林土作为受试土壤, 采用室内培养法, 研究了毒死蜱对土壤蔗糖酶、脲酶、酸性磷酸酶和过氧化氢酶, 以及土壤呼吸强度和氮素硝化作用的影响。结果表明: 试验期间, 1.25 mg a.i.·kg⁻¹、12.5 mg a.i.·kg⁻¹和 125 mg a.i.·kg⁻¹ 毒死蜱对土壤脲酶、酸性磷酸酶总体表现为抑制作用; 对土壤蔗糖酶和过氧化氢酶的影响与暴露剂量和暴露时间有关, 在 60 d 时, Z1 低剂量处理组(1.25 mg a.i.·kg⁻¹)蔗糖酶和过氧化氢酶可恢复, Z100 高剂量处理组(125 mg a.i.·kg⁻¹)抑制作用不能解除。试验初期, 毒死蜱对土壤呼吸强度有一定刺激作用随后逐渐恢复; 对土壤氮硝化作用影响表现为先促进后抑制, 且抑制作用有长期影响。由此可知, 毒死蜱使用对紫金山森林土的土壤酶活性和土壤微生物产生毒性效应, 具有一定生态风险。

关键词: 毒死蜱; 土壤; 酶活性; 呼吸强度; 硝化速率

文章编号: 1673-5897(2017)4-210-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Chlorpyrifos on Enzyme Activities and Microbial Activity in Zijin Mountain Forest Soil

Wang Jinyan¹, Sun Huazhong¹, Bu Yuanqing^{1,*}, Song Ninghui¹, Dong Yan^{1,2}, Tan Lichao¹

1. State Environmental Protection Key Laboratory of Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control, Nanjing Institute of Environmental Sciences, MEP, Nanjing 210042, China

2. Hohai University, Nanjing 210098, China

Received 29 May 2017 accepted 6 September 2017

Abstract: Chlorpyrifos is a phosphoorganic insecticide with a cholinesterase inhibition, which is widely used to control pest in agriculture. The objective of this study was to determine the impact of chlorpyrifos on enzyme (i.e., invertase, urease, acid phosphatase and catalase) activities and its microbial ecological effects (i.e., respiratory intensity and nitrogen transformation) in forest soil at Zijin Mountain under laboratory condition. Results showed that the soil urease and acid phosphate enzymes were inhibited by chlorpyrifos at doses of 1.25, 12.5 and 125 mg a.i.·kg⁻¹ respectively at given study period. It also showed inhibitory effect on soil invertase and catalase activities with

基金项目: 中央级公益性科研院所 2016 年基本科研业务专项(农药环境污染防治监管制度研究); 环境保护部农村与农业环境保护监管事业费项目

作者简介: 王金燕(1990-), 女, 山西晋中人, 硕士, 研究方向为农药生态毒理学, E-mail: 67372728@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: byq@nies.org

both dose and time dependent pattern. However, the inhibitory effect on these enzymes could be relieved at low dose Z1 treatment ($1.25 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$) after 60 d, but maintained at high dose Z100 treatment ($125 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$). In addition, chlorpyrifos could stimulate soil respiration and nitrification at the initial stage. But the soil respiration were recovered and the nitrification were inhibited respectively at the late stage during the experimental period. All these data suggest chlorpyrifos has certain ecological risk.

Keywords: chlorpyrifos; soil; enzyme activities; respiratory intensity; nitrification rate

毒死蜱, 化学品名: O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸, 是非内吸性广谱有机磷类杀虫剂、杀螨剂。毒死蜱可通过触杀、胃毒和熏蒸作用杀死多种害虫, 常用于食用作物、非食用作物和公共卫生等领域的虫害防治, 应用范围十分广泛^[1]。毒死蜱在环境中广泛存在, 土壤残留期较长, 最长土壤降解半衰期超过 240 d^[2]。农药在土壤中积累后会以不同方式改变土壤生态功能^[3]。过去毒死蜱多用于农田虫害防治, 学者评估毒死蜱对土壤酶活性影响也多采用农田土壤, 而较少关注其对森林土壤生态功能的影响。森林是陆地生态系统的主体和最大的碳氮元素储库, 森林土壤在调节森林生态系统碳、氮循环中起着重要作用, 因此, 开展农药对森林土壤生态功能的影响, 揭示人为干扰下森林土壤生态系统的变化规律, 有利于不同土壤生态监测和保护工作, 也可为农药生态风险评估提供更丰富的科研数据。

土壤酶活力和土壤微生物活性是评估外源污染物对土壤生态功能影响的重要生态毒理学指标^[4-5]。土壤酶是植物营养元素的活性库, 土壤微生物是土壤有机物转化的执行者^[6], 其在促进森林生态系统碳、氮物质循环和能量传递中发挥了显著作用, 是植被与土壤养分相连接的关键桥梁^[7]。本文以 $480 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱乳油为供试物, 以江苏南京紫金山森林土为受试土壤, 研究不同剂量毒死蜱对土壤酶活性、土壤微生物呼吸强度和氮素硝化作用的影响, 以掌握毒死蜱农药在森林虫害防治应用中的生态效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 供试物

$480 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱乳油, 由南京太化化工有限公司提供。 $480 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱乳油制剂田间推荐使用量为 $1.25 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$, 根据田间使用量设置常量处理组(Z1)、10 倍量处理组(Z10)和 100 倍量处理组(Z100)。

1.2 试验土壤

土壤样品采自江苏省南京市城区紫金山, 地理位置为 $118^{\circ} 48' 24'' \sim 118^{\circ} 53' 04'' \text{E}$, $32^{\circ} 01' 57'' \sim 32^{\circ} 16' 15'' \text{N}$ 。土壤土类型为黄棕壤。取土壤表面以下 0~20 cm 的新鲜土样, 封口并立即带回实验室, 除去粗大枝叶、动物躯壳等, 4°C 保藏。取一部分新鲜土样, 过 2 mm 筛, 检测土壤理化性质。土壤有机质含量, 总氮、总磷、总钾含量, 速效氮、速效磷、速效钾含量及 pH 见表 1。

1.3 土壤酶活性影响试验设计

称取 500 g 新鲜土壤于 1.5 L 培养瓶中, 分别吸取 $13 \mu\text{L}$ 、 $130 \mu\text{L}$ 和 $1300 \mu\text{L}$ 的 $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱母液(原液稀释 10 倍)均匀滴入石英砂中混匀, 再将含有药液的石英砂与土壤搅拌均匀, 使土壤中毒死蜱农药浓度分别为 $1.25 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $12.5 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $125 \text{ mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在 25°C 培养箱中培养, 定期补水, 维持含水量为最大持水量的 60%, 分别在 0 d、3 d、10 d、20 d、30 d 和 60 d 时取样。设置蒸馏水对照组; 对照组及每一处理组均设 3 个重复。

表 1 试验土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of soil used in the experiment

土壤 Soil	有机质含量 $/(g \cdot kg^{-1})$	pH	总氮 $/(g \cdot kg^{-1})$	总磷 $/(g \cdot kg^{-1})$	总钾 $/(g \cdot kg^{-1})$	速效氮 $/(mg \cdot kg^{-1})$	速效磷 $/(mg \cdot kg^{-1})$	速效钾 $/(mg \cdot kg^{-1})$
	Organic matter $/(g \cdot kg^{-1})$		Total-N $/(g \cdot kg^{-1})$	Total-P $/(g \cdot kg^{-1})$	Total-K $/(g \cdot kg^{-1})$	Available N $/(mg \cdot kg^{-1})$	Available P $/(mg \cdot kg^{-1})$	Available K $/(mg \cdot kg^{-1})$
黄棕壤 Yellow brown soil	77.58	6.22	0.44	1.16	5.70	152.25	8.91	118.76

1.3.1 蔗糖酶测定方法

采用3,5-二硝基水杨酸比色法^[8]。酶活力定义为每克土壤 37 °C 培养 24 h 后生成葡萄糖的量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$)。

1.3.2 脲酶测定方法

采用靛酚蓝比色法^[9]。酶活力定义为每克土壤 24 h 产生 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$)。

1.3.3 酸性磷酸酶测定方法

采用为磷酸苯二钠比色法^[10]。酶活力定义为每克土壤 24 h 水解 1 mg 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)的量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$)。

1.3.4 过氧化氢酶测定方法

采用高锰酸钾显色法^[11]。酶活力定义为每克土壤 20 min 分解过氧化氢的量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (20 \text{ min})^{-1}$)。

1.4 毒死蜱乳油对土壤微生物毒性影响试验设计

1.4.1 土壤微生物毒性呼吸强度 CO_2 测定方法^[12-13]

在标本瓶中放置 2 只小烧杯,一只盛放试验土壤,另一只盛放 NaOH 碱液用于吸收土壤微生物呼吸释放的 CO_2 。试验土壤中毒死蜱浓度分别为 1.25 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Z1)、12.5 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Z10)和 125 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Z100),将标本瓶密闭置于(25 ± 1) °C 的黑暗条件下培养。试验开始后分别在 0 d、3 d、10 d、20 d、30 d 和 60 d 时取样。盐酸滴定法测定土壤 CO_2 释放量。呼吸强度以每千克土壤释放的 CO_2 的毫克数表示,单位 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;呼吸强度影响率(%)=(处理组 CO_2 释放量-对照组 CO_2 释放量)/对照组 CO_2 释放量。

1.4.2 土壤微生物毒性硝化作用硝酸盐测定法^[13-14]

将毒死蜱剂量为 1.25 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、12.5 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 125 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的试验土壤分别置于烧杯中, (20 ± 2) °C 黑暗条件下培养,试验期间保持土壤最大持水量 45%~55%。试验开始后分别在 3 d、10 d、20 d、30 d 和 60 d 时取样。利用氯化钾溶液提取-分光光度法测定土壤硝酸盐含量。硝化作用速率以每天每千克干重土壤产生硝酸盐的毫克数表示,单位为 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。硝化作用速率影响率(%)=(处理组硝酸盐转化率-对照组硝酸盐转化率)/对照组硝酸盐转化率。

1.5 数据处理和统计分析

应用 SPSS22.0 软件对试验所得数据进行分析。利用邓肯氏多重比较测验(Duncan's multiple range test)进行对照组及处理组间的差异显著性分析,不同字母表示在相同暴露时间组间差异显著($P < 0.05$)。

2 结果 (Results)

2.1 毒死蜱乳油对土壤酶活性的影响

2.1.1 毒死蜱乳油对土壤蔗糖酶活性的影响

蔗糖酶(又称转化酶)不仅是评价土壤熟化程度和肥力的重要指标,也是表征土壤生物学活性强度的重要参数^[15]。图 1 显示紫金山森林土添加毒死蜱乳油后,土壤蔗糖酶活性随着毒死蜱暴露剂量的增加和暴露时间的延长发生显著变化。暴露 3 d 时,与对照相比处理组蔗糖酶活性均有激活,其中 Z10 处理组的土壤蔗糖酶活性显著高于对照,并在 60 d 的暴露期内一直维持较高水平;低剂量 Z1 处理组在暴露初期(3 d)和暴露末期(60 d)土壤蔗糖酶活性显著高于对照组($P < 0.05$),但在暴露中期则没有显著激活作用;毒死蜱高剂量 Z100 处理组对土壤蔗糖酶有抑制作用,暴露 60 d 时,抑制作用达到显著水平($P < 0.05$)。

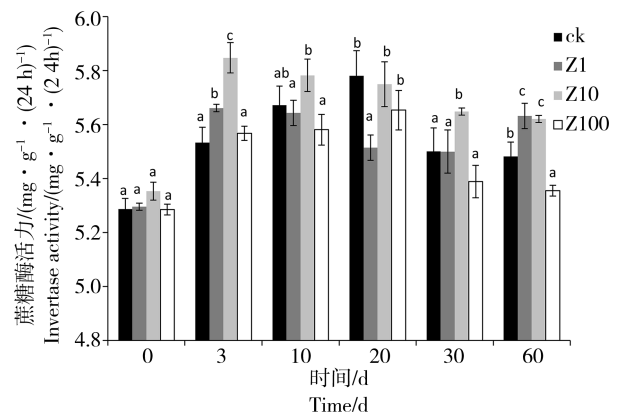


图 1 不同剂量毒死蜱对土壤蔗糖酶活力影响的动态变化

注:Z1, Z10 和 Z100 表示毒死蜱浓度为 1.25 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、12.5 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 125 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组;不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 The dynamic effects of chlorpyrifos doses on soil invertase activities

Note: Z1, Z10 和 Z100 stand for 1.25 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$, 12.5 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ and 125 $\text{mg a.i.} \cdot \text{kg}^{-1}$ chlorpyrifos treatment.

Different letters indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P < 0.05$).

2.1.2 毒死蜱乳油对土壤脲酶活性的影响

脲酶是土壤中唯一对尿素(酰胺态氮肥)转化及利用有重大影响的酶,土壤脲酶活性常被用于表征土壤的氮素状况^[16]。图 2 显示不同剂量毒死蜱作用对森林土脲酶活性均有显著抑制作用。暴露 3 d 时,随着毒死蜱暴露剂量的增加土壤脲酶活性显著

降低,表现为 Z100 处理组 < Z10 处理组 < Z1 处理组;当暴露时间延长到第 10 天时,较低剂量 Z1 处理组脲酶活性持续下降($52.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$),与中等剂量 Z10 处理组脲酶活性无显著差异,较高剂量 Z100 处理组脲酶活性则显著低于 Z1 处理组和 Z10 处理组;暴露 30 d~60 d 时,与对照组相比,处理组土壤脲酶活性仍表现为抑制状态,暴露末期,Z1、Z10 和 Z100 处理组脲酶活性分别为 $13.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 、 $14.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 和 $11.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$,均显著低于对照组($P < 0.05$)。

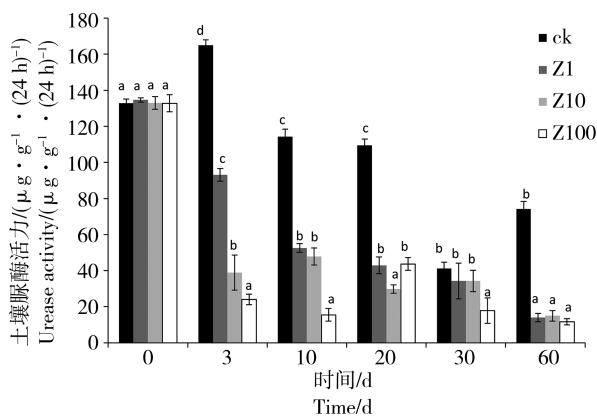


图 2 不同剂量毒死蜱对土壤脲酶活力影响的动态变化
注:不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 The dynamic effects of chlorpyrifos doses on soil urease activities

Note: Different letters indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P < 0.05$).

2.1.3 毒死蜱乳油对土壤酸性磷酸酶活性的影响

土壤磷酸酶在磷素循环中起重要作用,其活性高低直接影响着土壤中有有机磷的分解转化及其生物有效性^[17]。毒死蜱对紫金山森林土壤酸性磷酸酶活性的动态影响如图 3 所示。土壤酸性磷酸酶对毒死蜱响应迅速,在暴露初期(0 d)处理组土壤酸性磷酸酶活性即受到显著抑制($P < 0.05$)。暴露 3 d 时,处理组酸性磷酸酶活性显著低于对照组,高剂量 Z100 处理组酶活性高于 Z1 和 Z10 处理组,但随后高剂量 Z100 处理组酶活力显著降低($P < 0.05$),并在整个暴露期内均显著低于对照组和 Z1、Z10 处理组。毒死蜱低剂量 Z1 处理组在暴露 10~30 d 时,土壤磷酸酶活性有所增加,暴露 20~30 d 时显著高于对照组和 Z10、Z100 处理组,但在暴露末期(第 60 天)Z1 处理组酶活性有所下降,显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.1.4 毒死蜱乳油对土壤过氧化氢酶活性的影响

土壤过氧化氢酶能酶促分解生物呼吸和有机物的氧化反应产生的过氧化氢,从而消除过氧化氢对土壤生物体的毒害作用,是土壤重要的解毒酶之一^[18]。暴露期间,Z1 处理组和 Z10 处理组过氧化氢酶活力总体表现为激活-恢复-激活;而 Z100 处理组过氧化氢酶活力则表现为激活-抑制。在暴露 0 d 时,毒死蜱处理组的酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$),暴露第 3 天时,Z10 处理组和 Z100 处理组酶活性显著高于对照组和低剂量 Z1 处理组($P < 0.05$),当暴露时间延迟到 10 d~20 d,Z1 处理组酶活性比对照组有所上升,而 Z10 处理组酶活性则下降,但与对照组无显著差异。

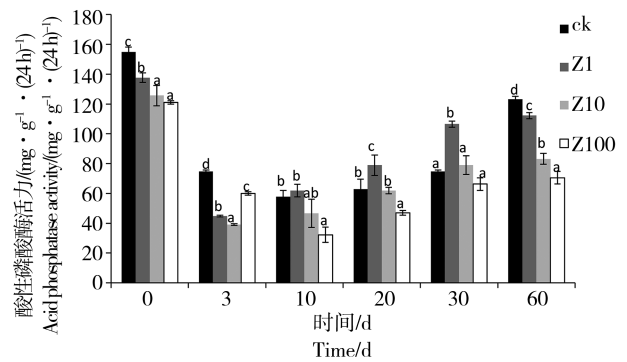


图 3 不同剂量毒死蜱对土壤酸性磷酸酶影响的动态变化
注:不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 The dynamic effects of chlorpyrifos doses on soil acid phosphatase activities

Note: Different letters indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P < 0.05$).

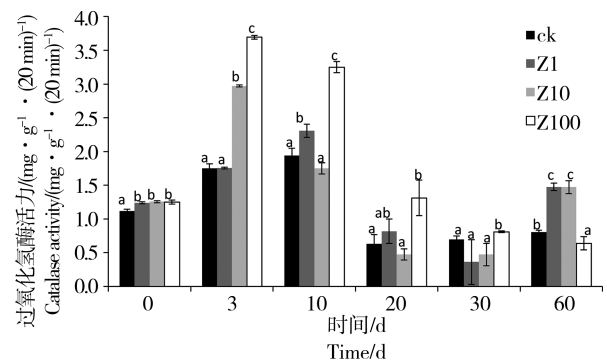


图 4 不同剂量毒死蜱对土壤过氧化氢酶活力影响的动态变化
注:不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 4 The dynamic effects of chlorpyrifos doses on soil catalase activities

Note: Different letters indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P < 0.05$).

2.2 毒死蜱乳油对土壤微生物的毒性影响

2.2.1 毒死蜱乳油对土壤微生物呼吸作用的影响

土壤微生物呼吸强度不仅可比较各种农药对土壤微生物的相对毒性,还可预测田间用药后对土壤微生物的实际危害程度^[19]。从表2中CO₂释放量数据可以看出,在培养0~1 d时,Z100处理组和Z10处理组CO₂释放量显著高于Z1处理组($P<0.05$);培养1~3 d、3~10 d时,不同剂量处理组的CO₂释放量均有显著差异;随着培养时间的延长,处理组和对照组土壤微生物CO₂释放量呈增加趋势,在培养10~20 d时处理组和对照组均分别达到最大值,在培养末期(30~60 d),中剂量处理组和低剂量处理组CO₂释放量与对照组无显著差异。表2中CO₂释放量影响率数据显示,培养期内毒死蜱对土壤微生物呼吸强度的影响均表现为促进作用。在培养较早期(0~1 d、1~3 d、3~10 d),毒死蜱处理组CO₂释放量受到的影响率较高,显示毒死蜱乳油对土壤微生物呼吸作用的促进作用在暴露初期最为显著,随着培养时间延长(10~20 d、20~30 d),CO₂释放量的影响率逐渐减低,毒死蜱对土壤微生物呼吸强度的影响

逐渐减小。根据农药对土壤微生物呼吸作用毒性分级标准^[13],在15 d内Z1处理组(推荐施用量)、Z10处理组(10倍量)、Z100处理组(100倍量)中毒死蜱乳油均未对土壤微生物CO₂释放量产生抑制作用,可判断毒死蜱乳油对土壤微生物呼吸作用的影响是低毒性。

2.2.2 毒死蜱乳油对土壤微生物硝化作用的影响

硝化作用因其对污染物的敏感性以及在氮循环中的重要作用,常用来指示土壤污染对微生物的活性影响^[20]。表3数据显示,毒死蜱乳油对土壤硝化作用影响表现为初期激活,随后则表现为抑制作用。在培养初期(0~3 d),Z100处理组和Z10处理组硝化作用速率显著高于Z1处理组($P<0.05$);培养时间延长到3~10 d时,Z100处理组的硝化作用速率显著降低($P<0.05$);随着培养时间的进一步延长,各处理组的硝化作用速率均维持较低水平,不同处理组间无显著差异。根据农药对土壤微生物氮转化影响划分标准^[13],试验28 d内,Z1处理组(推荐施用量)与对照组的差异大于25%,可判定毒死蜱乳油对土壤微生物硝化作用具有长期影响。

表2 不同剂量毒死蜱对土壤微生物呼吸强度影响的动态变化

Table 2 The dynamic effect of chlorpyrifos doses on soil microbial respiration intensity

指标 Index	处理 Treatments	0~1 d	1~3 d	3~10 d	10~20 d	20~30 d	30~60 d
CO ₂ 释放量/(mg·kg ⁻¹)	CK	26.3±3.9a	11.6±3.98a	50.2±5.3a	150.0±10.5a	55.3±17.1a	63.2±5.5a
	Z1	37.4±13.2ab	28.9±2.6b	108.4±9.2b	168.4±25.0a	65.8±7.9ab	76.3±1.3ab
CO ₂ emission/(mg·kg ⁻¹)	Z10	74.7±14.5c	65.3±7.9c	195.3±17.1c	289.5±21.1b	89.5±5.3c	81.6±26.3ab
	Z100	55.8±5.3b	77.4±2.6d	109.5±7.9b	336.8±5.3c	81.6±5.3bc	86.8±23.7c
影响率/%	Z1	42.0	150.0	115.9	12.3	19.0	20.8
	Z10	184.0	463.6	288.9	93.0	61.9	29.2
Effect rate/%	Z100	112.0	568.2	118.0	124.6	47.6	37.5

注:同列不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P<0.05$).

表3 不同剂量毒死蜱对土壤硝化作用影响的动态变化

Table 3 The dynamic effect of chlorpyrifos doses on soil nitrification

指标 Index	处理 Treatments	0~3 d	3~10 d	10~20 d	20~30 d	30~60 d
硝化速率/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	CK	0.355±0.161a	0.210±0.040b	1.145±0.516b	0.645±0.194c	0.387±0.161b
	Z1	0.677±0.016ab	0.258±0.153b	0.097±0.016a	0.081±0.145a	0.065±0.050a
Nitrification rate/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	Z10	1.468±0.363c	0.323±0.032b	0.032±0.008a	0.097±0.016a	0.065±0.051a
	Z100	1.065±0.274c	0.032±0.016a	0.032±0.032a	0.194±0.065b	0.065±0.049a
影响率/%	Z1	90.9	23.1	-91.5	-87.5	-83.3
	Z10	313.6	53.8	-97.2	-85.0	-83.3
Effect rate/%	Z100	200.0	-84.6	-97.2	-70.0	-83.3

注:同列不同字母表示相同时间不同处理组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference between the different treatments at the same time ($P<0.05$).

3 讨论 (Discussion)

化学农药是不可缺少的植物保护产品,但仅有不足 10% 的农药作用在防治靶点,其余大部分农药进入环境,土壤成为农药的主要汇集地。通过研究农药对土壤酶和微生物的影响,评价土壤生态环境,或将其作为一项生态毒理学指标,判断农药对土壤的污染程度以及可能对生态环境造成的影响,是近年来活跃的研究领域^[19]。

蔗糖酶广泛存在于土壤中,与多种物质的转化有关,对促进土壤中易溶性营养物质增加有重要作用。周世萍等^[21]研究 $0.96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 毒死蜱对红壤、黄壤和棕壤蔗糖酶活性的影响发现,在最初阶段(3 d 内)均表现为激活作用,但随着作用时间的延长(20 d),毒死蜱对蔗糖酶活性主要表现为抑制作用。单敏^[22]研究了毒死蜱对杭州蔬菜大棚土壤(轻壤土)蔗糖酶的影响,发现 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 毒死蜱处理组均对土壤蔗糖酶有抑制作用,暴露 30 d 后毒死蜱对土壤蔗糖酶的抑制作用解除。本研究结果显示毒死蜱对土壤蔗糖酶有抑制作用,培养末期(60 d)较低剂量($<12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)处理组蔗糖酶活性抑制作用解除,与前人研究结果基本一致,但高剂量($125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)处理组蔗糖酶活性则一直受到抑制,推测蔗糖酶活性与土壤毒死蜱暴露剂量有关。

脲酶是评估土壤中营养物质转化能力和肥力水平的重要指标^[23]。Rain 等^[24]比较了毒死蜱对土壤纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、脱氢酶和脲酶活力的影响,发现脲酶和脱氢酶对毒死蜱最为敏感。张心明等^[25]研究了不同毒死蜱剂量($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $25.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对江苏农田土壤脲酶活性影响,从 50 d 的培养过程看,毒死蜱对土壤脲酶活性表现为抑制作用。赵志强等^[26]研究了 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 毒死蜱对土壤脲酶活性影响,也发现不同剂量毒死蜱均可抑制土壤脲酶活性。本研究结果显示,在培养期间 60 d 内,毒死蜱对土壤脲酶也表现出抑制作用,试验末期(60 d)抑制作用仍未解除,认为毒死蜱对土壤脲酶有较大影响。

土壤磷酸酶能促进有机磷化合物水解,农药类型影响磷酸酶的活性,而不同土壤的磷酸酶活性有一定差异^[27-28]。研究发现,甲基托布津、代森锰锌、戊唑醇、克菌丹、丙草胺施入土壤后,土壤磷酸酶活性受到明显抑制,试验期间(35 d)抑制作用未见恢

复^[19,29-31];重复施用毒死蜱和啶硫 2 种农药后土壤磷酸酶活性也表现为持续的抑制作用^[32],但杀灭菊酯和阿维菌素处理的土壤,磷酸酶活性变化则呈现“抑制-恢复-激活”趋势^[19]。土壤磷酸酶活性对农药响应速度快,施入农药第 0 天时土壤磷酸酶活性就表现出较大差异^[19],本研究也发现毒死蜱处理组中土壤酸性磷酸酶活性响应较快,在毒死蜱农药加入后 24 h 内(第 0 天时),毒死蜱不同剂量处理组间的酶活性就表现出了显著的差异。

土壤过氧化氢酶能有效防止过氧化氢对生物体的毒害,具有解毒和抗逆的功能,是土壤重要的解毒酶类^[33]。胡佳月等^[34]研究了二甲戊灵对新疆棉田土壤过氧化氢酶活性的影响,发现 0~10 cm 土层过氧化氢酶活性呈现先抑制后激活的趋势;而荆瑞勇等^[35]研究发现 60 d 试验期内,乙草胺对土壤过氧化氢酶活性影响较小,认为土壤过氧化氢酶活性对乙草胺不敏感。本研究发现当毒死蜱进入土壤后,在暴露前期(3~10 d)处理组的过氧化氢酶呈现激活状态,中期(20~30 d)高剂量组酶活性显著激活,但到末期(60 d)中、低剂量处理组($<12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)酶活性则显著激活。以上研究显示不同农药、不同暴露剂量对土壤过氧化氢酶的活性影响差异较大。

本研究发现毒死蜱进入土壤后,CO₂ 释放量增加,土壤微生物呼吸作用增强,随着培养时间的延长,土壤微生物群落结构发生变化对毒死蜱胁迫逐渐适应,呼吸作用也逐步恢复。农药可以作为土壤微生物的外源碳源和氮源,因此大多数农药最终可被微生物利用。土壤硝酸盐含量变化可以用来表征土壤硝化作用^[36],研究发现苯菌灵、克菌丹、精甲霜灵、高效甲霜灵农药施用后土壤硝酸盐含量增加,认为以上杀菌剂农药对土壤硝化过程有促进作用^[37-39]。与杀菌剂农药不同,杀虫剂农药施用对土壤硝化多表现为抑制作用,王芝山等^[40]研究了 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 多噻烷对土壤硝化作用的影响,发现抑制率分别为 23.9%、34.7% 和 51.1%,郑祥洲等^[41]发现吡虫啉和毒死蜱对土壤硝化作用均可产生一定的抑制作用。本研究发现,毒死蜱处理组在试验初期土壤硝酸盐含量显著上升,而在末期土壤硝酸盐含量降低,显示毒死蜱对土壤硝化作用影响是先促进后抑制,对土壤微生物硝化作用有长期影响。农药进入土壤中可能会对土壤氮素的转化过程产生影响,但不同类型农药对土壤

硝化作用影响不同,其生态效应和影响机制有待深入研究。

通讯作者简介:卜元卿(1977-),女,博士,研究员,主要研究方向为农药生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Pope C, Karanth S, Liu J, et al. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: Uses and misuses of a common mechanism of action [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19(3): 433-446
- [2] Zhang X, Shen Y, Yu X Y, et al. Dissipation of chlorpyrifos and residue analysis in rice, soil and water under paddy field conditions [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 78(2): 276-280
- [3] Jastrzębska E. The effect of chlorpyrifos and teflubenzuron on the enzymatic activity of soil [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2011, 20(4): 903-910
- [4] Yang L J, Li T L, Li F S, et al. Fertilization regulates soil enzymatic activity and fertility dynamics in cucumber field [J]. *Scientia Horticulturase*, 2008, 116(1): 21-26
- [5] 黄益宗, 王斐, 钟敏, 等. O₃浓度升高对麦田土壤碳、氮含量和酶活性的影响[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(6): 871-878
Huang Y Z, Wang F, Zhong M, et al. Effects of elevated ozone on carbon, nitrogen content and soil enzymes activities in a winter wheat field [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(6): 871-878 (in Chinese)
- [6] Dick R P. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health [M]//Pnkrst C, Doube B M, Gupta V V S R. *Biological Indicators of Soil Health*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 1997: 121-156
- [7] 杨万勤, 王开运. 森林土壤酶的研究进展[J]. *林业科学*, 2004, 40(2): 152-159
Yang W Q, Wang K Y. Advances in forest soil enzymology [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2004, 40(2): 152-159 (in Chinese)
- [8] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 293-376
Guan S Y. *Soil Enzymes and Its Methodology* [M]. Beijing: Agricultural Press, 1986: 293-376 (in Chinese)
- [9] 李昌满, 王贵学, 王慧超, 等. 灰棕紫泥土脲酶动力学及反应条件研究[J]. *土壤通报*, 2010, 41(1): 68-71
Li C M, Wang G X, Wang H C, et al. Studies on kinetic and reaction conditions of urase in Gray-brown-purple-mud soil [J]. *Journal of Soil Science*, 2010, 41(1): 68-71 (in Chinese)
- [10] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 249-261
Lin X G. *Principles and Methods of Soil Microbiology Research* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2010: 249-261 (in Chinese)
- [11] 杨兰芳, 曾巧, 李海波, 等. 紫外分光光度法测定土壤过氧化氢酶活性[J]. *土壤通报*, 2011, 42(1): 207-210
Yang L F, Zeng Q, Li H B, et al. Measurement of catalase activity in soil by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Journal of Soil Science*, 2011, 42(1): 207-210 (in Chinese)
- [12] OECD. OECD/OCDE No. 217, OECD guidelines for the testing of chemicals, soil microorganisms: Carbon transformation test [R/OL]. (2000-01-21) [2017-05-29]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-217-soil-microorganisms-carbon-transformation-test_9789264070240-en
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 31270.16—2014 化学农药环境安全评价试验准则第16部分: 土壤微生物毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014
- [14] OECD. OECD/OCDE No. 216, OECD guidelines for the testing of chemicals, soil microorganisms: Nitrogen transformation test [S/OL]. (2000-01-21) [2017-05-29]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-216-soil-microorganisms-nitrogen-transformation-test_9789264070226-en
- [15] 马彦霞, 郁继华, 张晶, 等. 设施蔬菜栽培茬口对生态型无土栽培基质性状变化的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(14): 4071-4079
Ma Y X, Yu J H, Zhang J, et al. Effect of different rotation systems on the characteristic change of ecotype soil-less culture media for vegetables in greenhouse environments [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(14): 4071-4079 (in Chinese)
- [16] 郭明, 尹亚梅, 何良荣, 等. 农用化学物质对土壤脲酶活性的影响[J]. *农业环境保护*, 2000, 19(2): 68-713
Guo M, Yin Y M, He L R, et al. Effects of agricultural chemicals on soil urease activity [J]. *Agro-Environmental Protection*, 2000, 19(2): 68-713 (in Chinese)
- [17] 严昶升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 187
Yan C S. *Soil Fertility Research Methods* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1988: 187 (in Chinese)
- [18] 张学鹏, 宁堂原, 杨燕, 等. 不同浓度石灰氮对黄瓜连作土壤微生物生物量及酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(10): 3073-3082
Zhang X P, Ning T Y, Yang Y, et al. Effects of different application rates of calcium cyanamide on soil microbial

- biomass and enzyme activity in cucumber continuous cropping [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(10): 3073-3082 (in Chinese)
- [19] 傅丽君, 杨文金. 4种农药对枇杷园土壤磷酸酶活性及微生物呼吸的影响[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(6): 113-116
- Fu L J, Yang W J. Effects of pesticides on soil phosphatase activity and respiration of soil microorganisms in loquat orchard [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(6): 113-116 (in Chinese)
- [20] Smolders E, Brans K, Coppens F, et al. Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20: 2469-2474
- [21] 周世萍, 段昌群, 韩青辉, 等. 毒死蜱对三种供试土壤的蔗糖酶活性的影响[J]. 生态环境, 2005, 14(5): 672-674
- Zhou S P, Duan C Q, Han Q H, et al. Effects of chlorpyrifos on sucrase activity in three tested soils [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2005, 14(5): 672-674 (in Chinese)
- [22] 单敏. 毒死蜱、百菌清、丁草胺对土壤微生物和土壤酶的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 21-24
- Shan M. Effect of chlorpyrifos, chlorothalonil, machette on enzyme activities and microbial activity in soil [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006: 21-24 (in Chinese)
- [23] Bending G D, Turner M K, Ayns F, et al. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(11): 1785-1792
- [24] Rain M S, Lakshmi K V, Devi P S. Impact of chlorpyrifos on soil enzyme activities in agriculture soil [J]. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Science, 2008, 10: 295-300
- [25] 张心明, 刘贤进, 余向阳, 等. 毒死蜱对土壤中三种酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(3): 196-199
- Zhang X M, Liu X J, Yu X Y, et al. Effect of pesticide chlorpyrifos on activities of three soil enzymes [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2007, 23(3): 196-199 (in Chinese)
- [26] 赵志强, 侯宪文, 李勤奋, 等. 毒死蜱和丁硫克百威对香蕉根际土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(增刊): 98-103
- Zhao Z Q, Hou X W, Li Q F, et al. Effects of chlorpyrifos and carbosulfan on soil enzymes activity in banana rhizosphere [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(z1): 98-103 (in Chinese)
- [27] 关松荫, 沈桂琴, 孟昭, 等. 我国主要土壤剖面酶活性状况[J]. 土壤学报, 1984, 21(4): 368-381
- Guan S Y, Shen G Q, Meng Z, et al. Enzyme activities in main soils in China [J]. Acta Pedologica Sinica, 1984, 21(4): 368-381 (in Chinese)
- [28] Tu C M. Effects of four experimental insecticides on enzyme activities and levels of adenosine triphosphate in mineral and organic soils [J]. Environmental Science and Health, Part B, 1990, 25(6): 787-800
- [29] Saha A, Pipariya A, Bhaduri D. Enzymatic activities and microbial biomass in peanut field soil as affected by the foliar application of tebuconazole [J]. Environmental Earth Sciences, 2016, 75(7): 558-571
- [30] Chen S K, Edwards C A. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: Comparisons of two soil types [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(14): 1981-1991
- [31] Kalam A, Tah J, Mukherjee A K. Pesticide effects on microbial population and soil enzyme activities during vermicomposting of agricultural waste [J]. Journal of Environmental Biology, 2004, 25(2): 201-208
- [32] Pandey S, Singh D K. Soil dehydrogenase, phosphomonoesterase and arginine deaminase activities in an insecticide treated groundnut (*Arachis hypogea* L.) field [J]. Chemosphere, 2006, 63: 869-880
- [33] Zimmermann S, Frey B. Soil respiration and microbial properties in an acid forest soil: Effects of wood ash [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34: 1727-1737
- [34] 胡佳月, 金前, 贾会娟, 等. 二甲戊灵对棉田土壤酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3): 57-63
- Hu J Y, Jin Q, Jia H J, et al. Effect of pendimethalin on soil enzyme activities in cotton field [J]. Journal of South China Agricultural University, 2017, 38(3): 57-63 (in Chinese)
- [35] 荆瑞勇, 王丽艳, 王彦杰, 等. 乙草胺对土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(6): 1302-1305
- Jing R Y, Wang L Y, Wang Y J, et al. Effect of acetochlor application on soil microorganism number and enzymes activities [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(6): 1302-1305 (in Chinese)
- [36] Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. Biochemical and microbial soil functioning after application of the insecticide imidacloprid [J]. Journal of Environment Sciences, 2015, 27: 147-158
- [37] Chen S K, Edwards C A, Subler S. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant

- growth [J]. *Applied Soil Ecology*, 2001, 18(1): 69-82
- [38] Monkiedje A, Ilori M O, Spiteller M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(12): 1939-1948
- [39] Monkiedje A, Spiteller M. Effects of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, on the microbiological properties of a sandy loam and a sandy clay soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(6): 393-398
- [40] 王芝山, 王家玲. 新农药多噻烷的土壤生态毒性研究 [J]. *同济医科大学学报*, 1994, 23(3): 184-186
- Wang Z S, Wang J L. Study on soil ecotoxicity of polythromine in new pesticide [J]. *Acta Universitatis Medicinae Tangji*, 1994, 23(3): 184-186 (in Chinese)
- [41] 郑祥洲, 丁洪, 雷俊杰, 等. 吡虫啉和毒死蜱对尿素氮在土壤中转化的影响 [J]. *农药学报*, 2013, 15(6): 648-654
- Zheng X Z, Ding H, Lei J J, et al. Effects of imidacloprid and chlorpyrifos on transformation of urea nitrogen in soil [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2013, 15(6): 648-654 (in Chinese) ◆