

痕量有机污染物 DDT 和 PCBs 复合共存时对农田土壤氧化还原酶活性的影响

姚超英^{1,2}

(1. 杭州职业技术学院化工系, 浙江 杭州 310018; 2. 浙江大学环境科学系, 浙江 杭州 310029)

摘 要:在模拟实验条件下研究了痕量有机污染物 DDT、PCBs 对土壤中两种重要酶——过氧化氢酶和脱氢酶活性的影响。结果表明,不同浓度配比 DDT 和 PCBs 对土壤酶均有不同程度的抑制,过氧化氢酶活性在第 7 d 抑制作用较明显,脱氢酶活性则在第 21 d 抑制作用较强,但到 28 d 都会有不同程度的恢复。研究表明,痕量 DDT 和 PCBs 对土壤生态的影响不存在协同效应,而 DDT 的浓度对微生物及酶活性的抑制率起着主导作用。

关键词:农田土壤; DDT; PCBs; 过氧化氢酶; 脱氢酶

中图分类号:S154.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-0909-05

Influence of Coexisting Trace Organic Pollutants, DDT and PCBs on the Activity of Oxidation Reduction Enzyme in Farmland Soil

YAO Chao-ying^{1,2}

(1. Hangzhou Vocational & Technical College, Hangzhou 310018, China; 2. Department of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: This paper studied the influence of trace organic pollutants DDT and PCBs on the activity of catalase and the dehydrogenase, two important enzymes in soil, under simulating conditions. The result indicated that DDT and PCBs with different concentrations tended to produce different suppressions over soil enzyme. The activity of catalase decreased obviously on the 7th day, while, the activity of dehydrogenase suffered strong suppression on the 21st day, they both made recoveries to some degree on the 28th day. Synergistic effect did not exist in the influence of trace DDT and PCBs on soil ecology, and the concentration of DDT had a determinant effect on its suppression rate over microorganisms and enzyme activities.

Keywords: agriculture soil; DDT; PCBs; catalase; dehydrogenase

土壤中存在多种酶,它是土壤新陈代谢的催化剂,土壤酶的活性改变将影响作物的生长。而有机氯农药(OCPs)、滴滴涕(DDT)和多氯联苯(PCBs)是难降解并具有潜在毒性(致癌、致突变)的典型有机污染物。目前 DDT、PCBs 等含氯有机污染物在土壤中残留都属于痕量水平,由于它们具有高毒性、持久性、强脂溶性的特征,它们对土壤生态环境的影响可通过土壤酶和微生物来评价^[1],但迄今为止,国内外在 DDT 和 PCBs 的复合污染对土壤微生物的生态效应影响方面的研究甚少。

土壤酶的活性对外来化学物质具有相当的敏感性,许多学者将其作为一项生态毒理学指标,用以判断外来化学物质对土壤的污染程度及可能对土壤生态环境造成的影响。土壤中微生物及酶(尤其是脱氢酶)的活性,对 DDT 和 PCBs 等有机污染物的毒效有很好的指示作用^[2]。应用土壤酶作为监测指标,评价农药的生态毒理学效应已成为环境科学领域的研究热点之一。土壤中的 DDT 和 PCBs 虽然不能直接影响人体健康,但作为污染的主要储存库,土壤中 DDT 和 PCBs 的残留状况不仅能够表征污染物的污染水平、环境行为,而且土壤/植物界面的生物富集使其成为食品安全控制的重要一环,是当今持久性有机污染物研究的重要内容之一。本文以浙东农产品生产基地乔

司农场的黄泥(水田)的实际环境中 DDT 和 PCBs 的残留水平为基础,用土壤中两种酶——过氧化氢酶和脱氢酶活性为指标,研究了痕量的 DDT、PCBs 对土壤微生物活性影响的动态变化趋势,进而分析痕量 DDT、PCBs 与酶活性指标之间的剂量效应关系及其对土壤微生物生态的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采集乔司农场的黄泥(0~15 cm),风干,过 2 mm 筛,于 4 ℃条件下保存备用。

供试土壤的基本理化性质见表 1。

DDT 标液:p,p'-DDE:p,p'-DDD:p,p'-DDT= 4:1:4;

PCBs 标液:Aroclor 1242:Aroclor1254= 1:1;

过氧化氢,硫酸,高锰酸钾,葡萄糖,三(羟甲基)氨基甲烷,盐酸,甲苯,红四氮唑等试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

UV-2450 紫外分光光度计,LD5-2A 离心机, TZH-C 恒温振荡器,HH-4 数显恒温水浴锅,DRP-9272 电热恒温生化培养箱,KQ-100 型超声波清洗器等。

实验数据使用统计软件 statistica5.5 处理。

1.3 试验方法

1.3.1 模拟实验方法

分别称取风干土样 100 g 于一组烧杯中,用蒸馏水调至 40%田间含水量,25 ℃预培养 7 d 后,将烧杯分成 7 组(浓度配比见表 2),每组设 2 个处理,在烧杯中加蒸馏水至土壤含水量为 50%,每一处理设 3 个重复。将烧杯用保鲜膜封住且扎一些小孔,将烧杯放置 25 ℃培养箱中培养。在 7、14、21、28 d 测定土壤中脱氢酶和过氧化氢酶活性(数据取 3 个平行的平均值),作出其变化动态图,确定其影响效应。

其中土壤中所加的 DDT 浓度以乔司农场土壤中平均浓度 20 μg·kg⁻¹ 为起点,PCBs 的浓度为 30 μg·kg⁻¹,与 Arantzazu Urzelaia^[3]计算的风险浓度以及一般的土壤残留量相当。

表 2 DDT 和 PCBs 交互作用-动态模拟实验浓度设置

Table 2 The concentration of DDT and PSBs interaction in dynamic simulating experiment

PCBs/μg·kg ⁻¹	DDT/μg·kg ⁻¹		
	A ₁ (0)	A ₂ (20)	A ₃ (100)
B ₁ (0)	A ₁ B ₁ *	—	A ₃ B ₁
B ₂ (30)	—	A ₂ B ₂	A ₃ B ₂
B ₃ (80)	A ₁ B ₃	A ₂ B ₃	A ₃ B ₃

注:* 为空白甲醇液(1.5 mL 甲醇)。

1.3.2 土壤过氧化氢酶的测定^[4]

称取 2 g 过 1 mm 筛的风干土样,于 150 mL 三角瓶中,加蒸馏水 40 mL,0.3%过氧化氢 5 mL,同时设置对照。于 120 r·min⁻¹ 恒温振荡器上振荡 30 min。加 1.5 mol·L⁻¹ 硫酸 5 mL,用滤纸过滤。取滤液 25 mL,用 0.02 mol·L⁻¹ 高锰酸钾溶液滴定至微红色。

土壤过氧化氢酶活性,以单位土重的 0.02 mol·L⁻¹ 高锰酸钾毫升数表示。

1.3.3 土壤脱氢酶的测定^[5]

称取经 5 mm 筛的风干土样 5 g,于带塞试管中,加 5 g·L⁻¹ 红四氮唑(TTC)5 mL,0.1 mol·L⁻¹ 葡萄糖 2 mL,充分振荡,同时设置对照(0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液代替 TTC)。在 37 ℃放置暗处培养 12 h。加 2 滴浓硫酸中止反应,加甲苯 5 mL,在恒温振荡器上浸提 30 min,静置 3 min。于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。取上层溶液在紫外分光光度计上 486 nm 处测定吸光度值。

土壤脱氢酶活性以每小时 TTC 的还原产物三苯基甲醛(TF)形成量 TF μg·g⁻¹·h⁻¹ 表示。

2 结果与分析

2.1 土壤中 DDT-PCBs 复合污染对过氧化氢酶活性的影响

土壤过氧化氢酶促进过氧化氢的分解,能有效地防止土壤及生物体在新陈代谢过程中产生的过氧化氢对其毒害。土壤的过氧化氢酶活性与土壤呼吸强度和土壤微生物活动息息相关,过氧化氢酶活性的变化如图 1 所示,在培养期内,土壤中的过氧化氢酶活性

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil tested

pH	有机碳/mg·g ⁻¹	全N/mg·g ⁻¹	全P/mg·g ⁻¹	砂粒/%	粉粒/%	粘粒/%	CEC/mmol·kg ⁻¹
6.3	22.1	2.3	0.8	26.4	11.6	42.0	182.5

处于抑制状态,第 7 d 抑制表现为最强烈,到第 14 d 时各处理的过氧化氢酶活性均有明显的提高。这是由于有机污染物能部分提供微生物生长所需的碳源和能源,微生物代谢旺盛,释放出来的酶的数量和活性均有一定的增加。14 d 后,土壤过氧化氢酶的活性有所下降,是由于经过长时间的培养,土壤中的通气恶化,可提供的土壤中其他营养物质的消耗和有害代谢产物的积累,使得土壤微生物及其酶的活性降低。到了第 28 d 处理土样的过氧化氢酶活性基本趋于恢复。

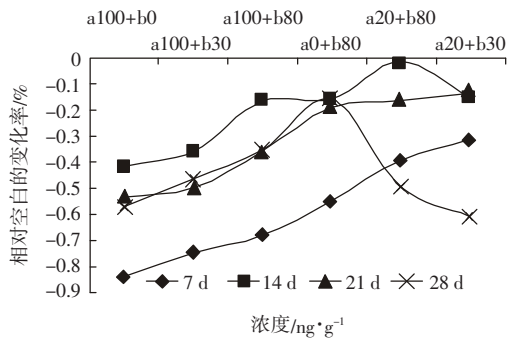


图 1 过氧化氢酶活性随 DDT 和 PCBs 浓度配比的变化趋势

Figure 1 Trend of catalase activity along with the change of DDT and PCBs concentration

在过氧化氢酶活性的 6 个浓度处理中 DDT 浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 相对于 DDT 浓度为 $0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的处理土样, PCBs 浓度均为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, DDT 浓度由 0 增加到 $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 而第 7 d 和第 14 d 的过氧化氢酶活性相对于空白的变化率却分别从 -0.546% 增加到 -0.390% , -0.154% 增加到 -0.008% , DDT 浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的处理土样的过氧化氢酶表现出一定的拮抗作用。从 DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 3 个处理的土样, DDT 浓度相同都为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 而 PCBs 浓度逐渐增大, 过氧化氢酶活性逐渐增大, 也表现出拮抗现象。

此外, 从 7、14、21 d 的总体趋势而言, 各浓度之间过氧化氢酶的抑制率为 DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ > DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ > DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ > DDT 浓度为 $0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ > DDT 浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,

由于 PCBs 的浓度 ($0 \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 对土壤过氧化氢酶的影响较小, 而 DDT 的浓度对过氧化氢酶抑制率起主导作用, 因此, 在本实验条件下, DDT 和 PCBs 对土壤过氧化氢酶活性的影响不存在协同效应。

2.2 土壤中 DDT-PCBs 复合污染对脱氢酶活性的影响

脱氢酶是土壤中的主要酶之一, 它是一类蛋白质, 能够激活某些特殊的氢原子, 使这些氢原子被适当的受氢体转移而将原来的物质氧化。在氧化过程中, 脱氢酶是作用在代谢物上的第一个酶, 脱氢酶参与生物反应为生物体提供必不可少的能量和还原当量。微生物脱氢酶是微生物降解有机污染物、获得能量的必需酶。生物体的脱氢酶活性在很大程度上反映了生物体的活性状态, 能直接表示生物细胞对其基质降解能力的强弱^[6]。因而脱氢酶活性是用来衡量土壤微生物活动的常用方法^[3], 且细胞体内的脱氢酶对土壤污染物非常的敏感^[7-9]。此外, 脱氢酶活性也和土壤呼吸息息相关^[10]。Megharajetal M^[11]报道了实验培养条件下掺料土壤中 DDT 及其代谢物对酶活性的影响, 得出 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 DDT 及其代谢物都不会抑制脱氢酶的活性, 而 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 DDT 及其代谢物却都能不同程度地抑制脱氢酶的活性。Megharajetal M^[12]等在长期监测野外受不同水平 DDT 污染的土壤研究中得出, 脱氢酶活性在中度污染的土壤 ($20 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 中比轻微污染 ($< 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的土壤高, 但是脱氢酶活性在严重污染的土壤 ($> 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 中反而比在轻微污染的土壤低。由于试验中设置的 DDT 浓度较低, 因此最初的 14 d 内都有不同程度的激活状态, 而浓度相对较高的 DDT 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ + PCBs 浓度为 $80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 处理则在 14 d 以后表现出抑制作用, 可能是由于 DDT 与 PCBs 的交互作用引起了对脱氢酶活性的影响。

脱氢酶活性变化如图 2 所示, 在土壤培养期内,

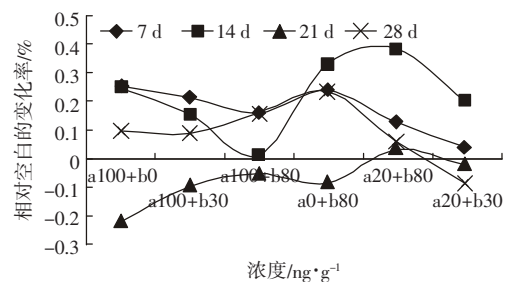


图 2 脱氢酶活性随 DDT 和 PCBs 浓度配比的变化趋势

Figure 2 Changes of dehydrogenase activity along with the concentration of DDT and PCBs

随着时间的延长各浓度处理对脱氢酶活性的作用波动性较大,但共同的趋势是:激活-抑制-恢复。7、14 d 时,脱氢酶处于激活状态,且其激活率 DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ >DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $30\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ >DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $80\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当 21 d 时,脱氢酶处于抑制状态,其抑制率仍为 DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ >DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $80\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$,这相似的趋势表明 DDT 和 PCBs 都表现出对土壤脱氢酶具有影响,但其影响不具有加和效应。28 d 后,脱氢酶的变化趋于平稳,DDT 浓度为 $0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +PCBs 浓度为 $80\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 DDT 浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ +

PCBs 浓度为 $80\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的激活率相对较大,而 PCBs 的影响效应反应相应较慢,在后期才开始体现。

2.3 DDT-PCBs 对土壤酶活性的复合效应

将过氧化氢酶和脱氢酶的实验结果(参数值和与对照相比的变化百分率)和统计结果(成组数据 *t* 检验值)进行双因素方差分析,所得的结果列于表 3。从表中的结果得知,不同配比 DDT、PCBs 加入土壤其过氧化氢酶,在第 7 d 时 DDT 和 PCBs 主效应以及二者交互作用都呈显著影响;对于脱氢酶,DDT 和 PCBs 主效应和二者交互作用除少数时间外一直都呈显著影响。

表 3 正交实验方差分析结果
Table 3 Variance analysis of experimental results

土壤酶种类		培养期/d			
		7	14	21	28
过氧化氢酶	F _A	48.819**	1.288	3.625	1.884
	F _B	8.847**	—	2.638	1.264
	F _{AB}	6.428**	2.904	3.681*	1.121
脱氢酶	F _A	12.579**	21.568**	9.199**	16.568**
	F _B	1.768	8.789**	12.626**	11.879**
	F _{AB}	7.522**	2.958	12.263**	5.263*

注:F_A为 A 因素(DDT)的 *F* 检验值;F_B为 B 因素(PCBs)的 *F* 检验值;F_{AB}为 DDT-PCBs 的 *F* 检验值;“—”代表 *F* 值小于 1;“*”和“**”分别表示 *t* 检验显著水平,α=0.05 和 α=0.01。
Note: F_A—*F* value for factor A(DDT); F_B—*F* value for factor B(PCBs); F_{AB}—*F* value for interaction of factor A and B(DDT-PCBs); “—” indicates *F* value less than 1; “*” and “**” indicates significant level for *t* test, α=0.05 and α=0.01.

3 结论

(1)在 DDT-PCBs 复合体系中,不同配比的 DDT、PCBs 对土壤过氧化氢酶活性有不同影响,在试验的培养期经历了抑制-激活-恢复 3 个阶段,DDTs 和 PCBs 主效应以及二者交互作用都呈显著影响。DDT 的浓度越高,对土壤过氧化氢酶活性的影响越大,最终会影响土壤的生态环境。
(2)在 DDT-PCBs 复合体系中,不同配比的 DDT、PCBs 对土壤脱氢酶活性的抑制作用最为明显,脱氢酶也是生态效应中最为敏感的指标,在试验的培养期经历了激活-抑制-恢复 3 个阶段,对于脱氢酶,DDT 和 PCBs 作用和两者交互作用在大部时间内呈现显著相关,其抑制作用的时间相对较长。DDT 和 PCBs 的浓度越高,对土壤脱氢酶活性的影响也越大,使土壤脱氢酶活性降低也越明显。
(3)在农药与土壤微生物的相互关系中,农药会对土壤微生物产生一定的作用。反过来,土壤微生物又

能适应、转化或降解分布于土壤中的农药。在模拟实验中,PCBs 在 $0\sim80\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的浓度范围内对土壤过氧化氢酶的影响较小,而 DDT 的浓度对酶活性的抑制率起主导作用,其抑制程度与 DDT 浓度基本成正比,DDT 和 PCBs 对土壤氧化还原酶活性的影响不存在协同效应。

参考文献:

[1] 毕新慧,储少岗,徐晓白.多氯联苯在土壤中的吸附行为[J]. 中国环境科学, 2001, 21(3): 284-288.
BI Xin-hui, CHU Shao-gang, XU Xiao-bai. The adsorption behavior of polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil [J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(3): 284-288.
[2] 逢焕成,严慧峻,闵九康.土壤有机氯污染的生物修复和土壤酶活性的关系[J]. 土壤肥料, 2002, 1: 30-33.
PANG Huan-cheng, YAN Hui-jun, MIN Jiu-kang. Study on bioremediation of organochlorinic contaminated soil and its relation to soil enzyme activity[J]. *Soils and Fertilizers*, 2002, 1: 30-33.
[3] Arantzazu Urzelaia, Milagros Vegab, Eduardo Angulo. Deriving ecological risk-based soil quality values in the Basque Country [J]. *The Sci-*

ence of the *Total Environment*, 2000, 247:279–284.

- [4] 中国科学院南京土壤研究所微生物室.土壤微生物研究法[M].北京: 科学出版社,1985. 48–52.

Microbial department of CAS Nanjing Institute of Soil. Researching of Soil Microbe [M]. Beijing: Science Press,1985. 48–52.

- [5] 朱南文, 闵 航. TTC–脱氢酶测定方法的探讨[J].中国沼气, 1996, 14 (2): 3–5.

ZHU Nan-wen, MIN Hang. The study of determination on TTC– Dehydrogenase activity[J]. *China Biogas*, 1996, 14(2): 3–5.

- [6] 秦 华, 林先贵, 陈瑞蕊, 等. DEHP 对土壤脱氢酶活性及微生物功能多样性的影响[J].土壤学报, 2005, 42(5): 829–834.

QIN Hua, LIN Xian-gui, CHEN Rui-rui, et al. Effects of DEHP on Dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(5):829–834.

- [7] Doelman P, Haanstra L. Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1979, 11: 475–479.

- [8] Rossel D, Tarradellas J. Dehydrogenase activity of soil microflora: significance

in ecotoxicological tests[J]. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 1991, 6: 17–33.

- [9] Megharaj M, Singleton I, McClure N C. Effect of pentachlorophenol pollution towards microalgae and microbial activities in soil from a former timber processing facility[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1998, 61: 108–115.

- [10] Brookes P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19: 269–279.

- [11] Megharaj M, Boul H L, Thiele J H. Effect of DDT and its metabolites on soil algae and enzymatic activity[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 130–134.

- [12] Megharaj M, Kantachote D, Singleton I, et al. Effects of long-term contamination of DDT on soil microflora with special reference to soil algae and algal transformation of DDT[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 109:35–42.