

低浓度硫丹对棕壤中主要酶活性及细菌群落结构的影响

郭鹏鹏¹, 朱鲁生^{1*}, 王 军^{1*}, 王金花^{1,2}, 王 婷³

(1. 山东农业大学资源与环境学院, 山东省高校农业环境重点实验室, 山东 泰安 271018; 2. 南开大学环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071; 3. 山东水利职业学院, 山东 日照 276826)

摘 要: 为了解硫丹对棕壤生态系统的毒性影响, 采用室内避光培养模拟实验, 设定硫丹在土壤中的浓度分别为 0.1、1、10 mg·kg⁻¹, 取样时间为 7、14、21、28 d, 测定土壤中脲酶、脱氢酶和 β -葡萄糖苷酶活性的变化, 同时采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分子指纹技术研究硫丹在不同培养时间对土壤中细菌群落结构的影响。结果表明: 土壤脲酶活性与对照相比无显著差异; 脱氢酶活性受到显著抑制, 且随着硫丹浓度增大, 抑制作用增强; 土壤 β -葡萄糖苷酶活性则被显著激活。经 BLAST 程序与 GenBank 数据库进行比对分析, 低浓度硫丹处理在培养周期 28 d 内, 对棕壤中细菌群落结构没有产生显著的干扰作用。

关键词: 硫丹; 土壤酶; 有机氯农药; PCR-DGGE

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)11-2149-06 doi:10.11654/jaes.2014.11.012

Effects of Low Concentration Endosulfan on Some Enzymatic Activities and Bacterial Community Structure in Brunisolic Soil

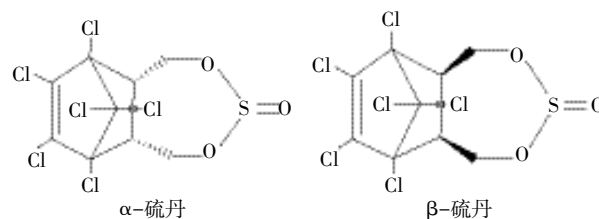
GUO Peng-peng¹, ZHU Lu-sheng^{1*}, WANG Jun^{1*}, WANG Jin-hua^{1,2}, WANG Ting³

(1. College of Resource and Environmental, Key Laboratory of Agricultural Environment in Universities of Shandong, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Nankai University), Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Shandong Water Conservancy Institute of Occupational, Rizhao 276826, China)

Abstract: A laboratory experiment was performed to evaluate the toxicological effects of endosulfan on some enzymes (urease, dehydrogenase and β -glucoside) and microbial community structure diversity in a brunisolic soil at different concentrations (0, 0.1, 1 mg and 10 mg endosulfan per kg soil) on the 7th, 14th, 21st and 28th day of treatment. Endosulfan did not influence soil urease activity, but significantly inhibited dehydrogenase with stronger suppression at higher concentrations. However, the activity of β -glucoside enzyme was steadily and significantly enhanced by endosulfan. The DGGE data showed that endosulfan at 0~10 mg·kg⁻¹ had no toxic effects on soil bacterial community structure and activities. In conclusion, endosulfan did not impact bacterial community structure in the brunisolic soil.

Keywords: endosulfan; soil enzymes; organochlorine pesticide; PCR-DGGE

硫丹是一种环戊二烯类广谱性有机氯杀虫剂, 工业硫丹是由 α -硫丹、 β -硫丹两种异构体组成的混合物, 含量比一般为 7:3, 其在丙酮中的溶解度为 33%。分子结构式如下:



收稿日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(21277083, 41071164, 41001152, 21377075); 山东省自然科学基金(ZR2013DQ007); 环境污染过程与基准教育部重点实验室(南开大学)开放课题基金

作者简介: 郭鹏鹏(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为污染修复工程

* 通信作者: 朱鲁生 E-mail: lushzhu@sdau.edu.cn

王 军 jwang@sdau.edu.cn

硫丹具有触杀和胃毒作用, 曾广泛用于棉花、果树、蔬菜和茶叶等作物虫害的防治。世界卫生组织(WHO)估测 1984 年全世界的硫丹生产量为 10 000 t。我国从 1994 年开始生产和使用硫丹, 多年的施用使得我国大部分地区土壤和水体中都有不同程度的硫丹残留和积累^[1-4]。在环境中, 硫丹具有较高的持久

性和迁移潜力,在土壤中的半衰期一般为3~6个月。由于硫丹具有生物毒性,高浓度硫丹残留会对微生物和土壤酶活性有较强的毒害作用,抑制了土壤微生物和酶对硫丹的降解,其降解速率会随初始浓度的增加而减慢^[5]。

土壤生态系统的活力是农业可持续发展的首要前提,土壤质量被认为是评价环境质量、食品安全和经济活力的综合指标。因此,土壤常被作为土地可持续管理的潜在评价指标。土壤酶是土壤新陈代谢的重要因素,它与活着的微生物细胞一起推动物质转化。土壤生物化学反应几乎都是由土壤酶驱动的,在C、N、S、P等元素的生物循环中都有土壤酶的作用。土壤微生物在生态系统物质循环和能量转化中占有特别重要的地位,几乎所有的土壤过程都直接或间接地与土壤微生物有关^[6-7],因此,微生物在土壤中的分布与活动,能反映土壤各因素对微生物的生态分布、生物特性以及对其功能的影响和作用,揭示土壤生态系统的现状和趋向。土壤微生物群落对于土壤特性的变化非常敏感,故土壤微生物群落变化可以作为评价土壤生态系统可持续性的生物学指标^[8]。

硫丹在土壤中的残留势必影响土壤酶活性,目前研究涉及的土壤酶有脱氢酶、荧光素二乙酸酯水解酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、固氮酶、芳基硫酸酯酶和 β -D-葡萄糖苷酶等^[9-10],但硫丹对棕壤中微生物群落及酶活性的影响鲜见报道。本实验以低浓度(0~10 mg·kg⁻¹)硫丹染毒土壤,分别测定棕壤中脲酶、脱氢酶和 β -葡萄糖苷酶的变化,并且通过从土壤中抽提微生物总DNA,扩增细菌16S rDNA特异性片段,应用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE),分析土壤细菌特异基因多态性,旨在揭示低浓度硫丹对棕壤中细菌群落结构的影响,并且为进一步探究硫丹对土壤生态系统的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤与主要试剂

以采自山东农业大学试验田(36°10'N,117°9'E)的棕壤为供试土壤,五点法取样,采集时除去土壤表面的杂草、枯叶和1 cm左右的表层土,采集深度为0~15 cm,过2 mm筛。土壤的基本理化性质见表1。

表1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of soil studied

土壤类型	pH	有机质/g·kg ⁻¹	有效氮/mg·kg ⁻¹	有效磷/mg·kg ⁻¹	速效钾/mg·kg ⁻¹	粘粒<0.002 mm/%	砂粒>0.05 mm/%	最大持水量/%
棕壤	7.6	17.6	132.3	18.4	125.7	10.4	57.7	42.4

据调查,本实验中供试棕壤没有有机氯类农药使用历史,本实验前,采用气相色谱法^[11]测定了供试棕壤中硫丹含量,结果为未检出。

实验用硫丹原药购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度为96%;丙酮、氯化2,3,5-三苯基四唑(TTC)、硝基酚等试剂均为分析纯。

1.2 土壤染毒

熊伯炼等^[17]研究表明, α -硫丹、 β -硫丹在土壤中的半衰期分别为32~99 d和69~116 d,随硫丹初始浓度不同而发生改变。Kong等^[11]研究表明,当硫丹初始浓度为54.54 mg·kg⁻¹时, α -硫丹、 β -硫丹的半衰期分别为53.3 d和70.7 d。本实验参考以上研究结果,设定实验硫丹浓度分别为0.1、1、10 mg·kg⁻¹,并设溶剂(丙酮)对照,实验设定3次重复。培养时间分别为7、14、21、28 d。土壤含水量控制为田间最大持水量的60%,每隔3 d调节一次土壤含水量。

1.3 土壤酶活性测定

1.3.1 土壤脲酶

本实验用靛酚蓝比色法^[12],通过测定反应产生的氨量,计算土壤脲酶的活性。以每克干土培养24 h后NH₄⁺-N的微克数(μ g NH₄⁺-N·g⁻¹ soil·h⁻¹)表征。

1.3.2 土壤脱氢酶

脱氢酶的活性用Tabatabai介绍的TTC分光光度法测定^[13]:称取20.0 g土壤置于50 mL三角瓶中,加2.0 mL 1%氯化2,3,5-三苯基四唑(TTC)溶液,再加水至土壤最大持水量的90%,充分混匀后塞上塞子,放入37℃的恒温培养箱中培养24 h。培养结束后,加25 mL甲醇,振荡5 min,先用塞有脱脂棉的玻璃漏斗过滤,再用甲醇多次洗涤滤斗上的土壤,直至获得无色滤液。合并滤液和洗液,甲醇定容至100 mL,摇匀后在485 nm下比色测定其吸光值。酶活性单位为 μ g TTC·g⁻¹·h⁻¹。

1.3.3 土壤 β -葡萄糖苷酶

本实验用硝基酚- β -D-葡萄糖苷作底物,采用硝基酚比色法^[14],测定土壤中 β -葡萄糖苷酶活性。

1.4 土壤细菌群落结构的PCR-DGGE分析和系统发育树的构建

1.4.1 土壤微生物总DNA提取

采用POVERSOIL土壤DNA提取试剂盒(上海生

工),称取 0.5 g 于-20 ℃保存的染毒土样,按操作步骤提取土壤微生物总 DNA。采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对粗提 DNA 进行纯化。将提取纯化得到的 DNA 样品与 1 μL 6 $\times$ Loading Buffer 混合,加入 1.2%的琼脂糖凝胶的样品孔中, λ -Hind digested Marker 加入一端点样孔中,对提取的 DNA 进行电泳检测,在 Bio-Rad 的 GelDoc XR 凝胶成像系统中观察纯化效果。

1.4.2 PCR 扩增

扩增采用可检测环境中数量较低微生物的巢式 PCR(Nested PCR)扩增策略。第一次 PCR 引物为 27 F 和 1492 R,第二次 PCR 引物为细菌 16S rDNA V3 区的 338 F-GC 和 518 R^[18]。扩增体系为 50 μL ,其中:10 $\times$ PCR Buffer 5 μL ; Mg^{2+} 5 μL ; dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 μL ; Primers(27 F, 1492 R; 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 $\mu\text{L} \times 2$; 模板 DNA 1 μL ; Taq 酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL ; ddH₂O 32 μL 。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,58 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,25 个循环;72 ℃,10 min,最后于 4 ℃恒定保存。

1.4.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

取 PCR 产物 35 μL 进行 DGGE 分析,变性剂梯度范围为 30%~60%,自配的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%(100% 的变性剂为 7 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 40% 的去离子甲酰胺)。在 1 $\times$ TAE 缓冲液中,70 V、60 ℃缓冲液中电泳 14 h。电泳后采用银染法进行染色,染色完成后,小心转移凝胶至凝胶成像系统,采用 BIO-RAD 公司的 GelDoc XR 凝胶成像系统,在紫外光下成像,拍照,分析指纹图谱。

1.4.4 DGGE 条带的切割回收

对 DGGE 图谱上的优势条带进行割胶回收。对于选定的每个条带,只选择中间部分进行切割,回收的条带转移到 1.5 mL 离心管中,用枪头挤碎,加入 60 μL 灭菌的 ddH₂O,4 ℃过夜处理,释放 DNA。次日 12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液。取 1 μL 上清液为模板,以不含 GC 夹的引物(338 F 和 518 R)按照 1.4.2 中的 PCR 反应体系和程序再次进行 PCR 扩增。

将上述 PCR 产物连接到 pMD18-T Vector 载体(Takara,大连)上,转化到 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞中,然后用移液器吸取一定体积已转化的感受态细胞,加到 LB 固体琼脂培养基(Amp⁺)上,用无菌的涂布棒轻轻的将细胞均匀涂开,挑取单菌落,37 ℃、180 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 10~12 h,取 1 μL 的 LB 液体培养基为模板,按照 1.4.2 中的细菌扩增的反应体系和程序

进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检验连接效果。连接效果检测呈阳性的菌液,包装后送生工生物工程有限公司(上海)进行测序。

1.4.5 序列分析

根据测序结果,将所得序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行同源性比对分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),获得与本实验所得序列相似性最高的序列,确定硫丹污染导致数量和种类发生变化的细菌种类,使用 MEGA 软件中的 Kimura 双参数修正模型进行系统发育树的构建。

1.5 数据处理

用 Microsoft Excel 2003 进行基本的数据处理和作图,用 SPSS 17.0 进行统计分析与显著性检测。

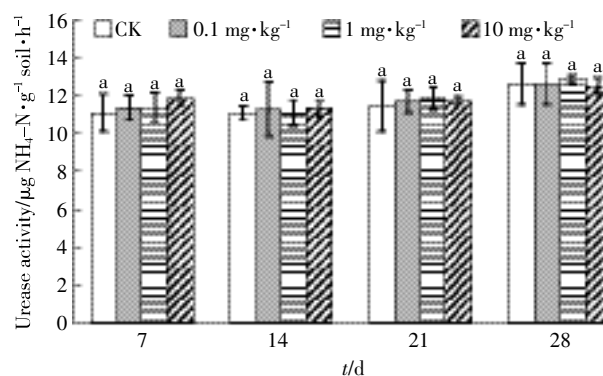
2 结果与分析

2.1 硫丹对土壤酶活性的影响

硫丹对土壤脲酶活性的影响如图 1 所示。土壤脲酶的活性变化不显著,在整个实验处理周期中,处理组与对照组相比,脲酶活性没有出现显著性差异($P < 0.05$),说明本实验浓度下硫丹对棕壤中脲酶活性没有显著影响。

硫丹对土壤脱氢酶活性的影响如图 2 所示。在整个实验处理周期中,与对照组相比,硫丹处理组棕壤中脱氢酶的活性明显下降,呈现显著性差异($P < 0.05$)。且这种抑制作用随着硫丹染毒浓度的升高、培养时间的延长越为显著,说明土壤脱氢酶的活性受硫丹影响较大。

硫丹对土壤中 β -葡萄糖苷酶活性的影响如图 3 所示。在整个实验处理周期中,与对照组相比,硫丹处理



不同字母表示同一暴露时间内不同浓度硫丹处理组脲酶活性的显著性差异($P < 0.05$)。下同

图 1 硫丹对土壤中脲酶活性的影响

Figure 1 Effect of endosulfan on urease activity in soil

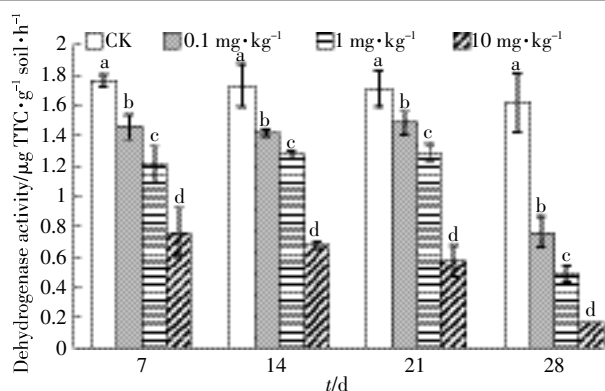


图2 硫丹对土壤中脱氢酶活性的影响

Figure 2 Effect of endosulfan on dehydrogenase activity in soil

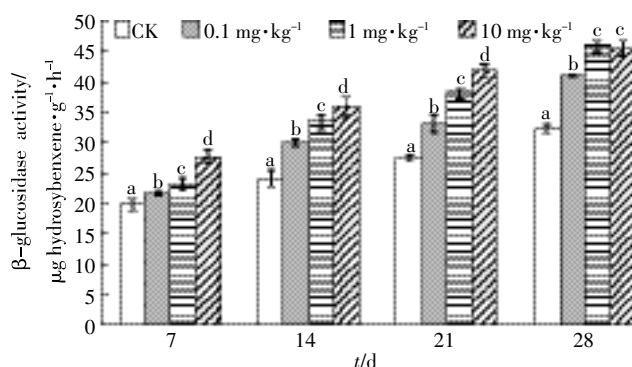


图3 硫丹对土壤中β-葡萄糖苷酶活性的影响

Figure 3 Effect of endosulfan on activity of β-glucosidase in soil

组土壤β-葡萄糖苷酶的活性增加,出现显著性差异($P < 0.05$)。在处理7、14、21 d时随着硫丹浓度的增加,

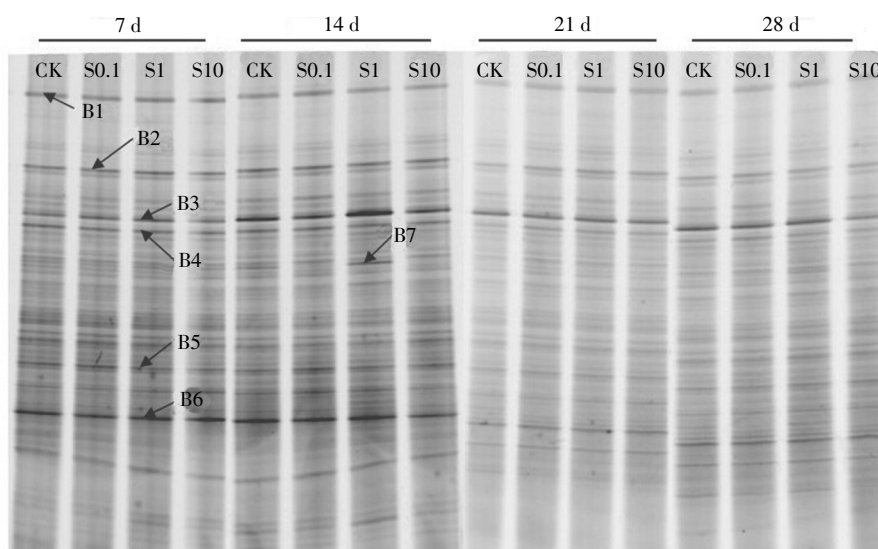
β-葡萄糖苷酶的活性增加;在28 d, 1、10 mg·kg⁻¹硫丹处理组之间没有显著差异。总体来说,土壤β-葡萄糖苷酶的活性受硫丹影响较大。

总体来说,低浓度硫丹对棕壤脲酶活性没有显著影响,低浓度硫丹处理对棕壤脱氢酶活性和β-葡萄糖苷酶活性则呈现出一种完全相反的作用。低浓度的硫丹可以抑制土壤脱氢酶的活性,刺激棕壤β-葡萄糖苷酶的活性,抑制和刺激作用均随着硫丹浓度增大和培养时间的延长而增大。

2.2 硫丹对棕壤细菌群落结构多样性的影响

低浓度硫丹对棕壤细菌群落结构影响的DGGE指纹图谱如图4所示。不同的泳道代表不同的处理天数及不同硫丹处理浓度下的样品,泳道中条带数目的多少反映样品中细菌群落的多样性。从图4可以看出:7 d时,硫丹处理组与对照相比仅条带B5亮度变暗;14 d时,1 mg·kg⁻¹硫丹处理组中条带B3和B7与对照组相比亮度增加;21 d和28 d时,从条带亮度来看,硫丹处理组与对照相比,没有显著差异。总体来看,0~10 mg·kg⁻¹的低浓度硫丹处理对棕壤中细菌群落结构没有产生强烈的干扰作用。

根据实验棕壤中细菌群落的DGGE图谱,选择B1、B2、B3、B4、B5、B6和B7共七个亮度清晰明显的条带进行切胶回收,并运用BLAST程序与GenBank数据库进行比对分析,确定相似菌种。BLAST相似菌株分析结果如表2所示,16S rDNA分析测序结果构



CK为0 mg·kg⁻¹处理组;S0.1为0.1 mg·kg⁻¹处理组;S1为1 mg·kg⁻¹处理组;S10为10 mg·kg⁻¹处理组,标记条带用于切胶、回收、测序。CK, S0.1, S1 and S10 represent soil contaminated by endosulfan at 0, 0.1, 1, and 10 mg·kg⁻¹, respectively. The labeled bands were excised from the gel, preamplified, and subjected to sequence analysis

图4 硫丹处理土壤中细菌DGGE电泳DNA指纹图谱

Figure 4 DGGE profiles of bacteria in soil samples amended with endosulfan for different incubation time

表 2 切胶回收细菌 DGGE 条带的测序结果

Table 2 Comparison of genomic sequences in excised DGGE bands by sequencing and BLAST

条带 编号	Genebank 登录号	最近种属 (登记号)	相似 度/%
B1	FJ264784	Uncultured bacterium clone so4B4	98
B2	HM186666	Uncultured bacterium clone HDB-SIOT883	96
B3	FM956225	Uncultured bacterium clone t30d34L39	94
B4	EU135567	Uncultured bacterium clone FFCH1818	94
B5	FJ712411	Uncultured bacterium clone KZNMV-0-B16	96
B6	DQ811950	Uncultured bacterium clone MSB-4E2	96
B7	EF602496	Uncultured bacterium clone Zplanc135	93

建的系统发育树如图 5 所示。结果表明,条带 B1、B5 和 B6 属于厚壁菌门,且相似性在 96%以上;条带 B2、B3 和 B4 属于变形菌门,且相似性在 94%以上;条带 B7 属于放线菌门,且相似性为 93%。

3 讨论

3.1 低浓度硫丹对棕壤中主要酶活性的影响

在适宜的温度、含水量和 pH 值条件下,土壤酶具有促进土壤养分溶解、提高各种生物化学过程反应速率、加快微生物代谢过程等显著作用。Nasreen 等^[15-16]的研究表明,硫丹施用量为 10~75 mg·kg⁻¹ 时对黑粘土中脲酶起激活作用;熊佰炼等^[17]的研究表明硫丹施用量为 10~100 mg·kg⁻¹ 时可抑制紫色土中脲酶活性。本研究中发现硫丹处理浓度为 0.1~10 mg·kg⁻¹ 对棕壤中脲酶活性无显著影响,说明硫丹对土壤脲酶活性的影响与土壤类型有关。这与 Giri 等^[18]研究的在草甘膦或百草枯的作用下,不同类型土壤中脲酶活性出现被抑制和激活两种截然不同的结果相一致。在本研究中土壤脱氢酶活性随着硫丹染毒浓度的增加而降低,说明硫丹的生物毒性较强,不易被降解转

化,而且在一定程度上用土壤酶活性表征土壤污染程度比用生物表征更敏感。硫丹影响土壤酶活性可长达数月,作用结果表现为持续抑制、持续激活、激活与抑制作用随时间变化等 3 种形式^[19]。本研究中硫丹的施入对棕壤中参与碳循环的 β -葡萄糖苷酶的活性有激活作用,且随着浓度升高,激活作用增强。这与沈芳芳等^[20]的研究结果一致,其原因是土壤 β -葡萄糖苷酶作为参与土壤中碳水化合物水解的一类重要的酶,与土壤有机质的转化关系密切^[21],低浓度硫丹可以作为碳源促进土壤中有机质的转化。

3.2 低浓度硫丹对棕壤细菌群落结构的影响

目前,DGGE 指纹图谱技术已经被广泛用于分析不同基质中的细菌、真菌等微生物的群落结构变化。基于细菌 16S rDNA 具有的保守特点^[22-23],本文选择两种土壤细菌的通用型引物 338 F and 518 R^[24],研究硫丹染毒后土壤中细菌群落结构多样性的变化。本研究中细菌的 DGGE 指纹图谱显示,在培养时间内硫丹对土壤细菌菌落组成结构没有显著的影响,系统发育树结果表明,土壤中变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*),另有少量为放线菌门(*Actinobacteria*)对硫丹污染相对敏感。总体来说,硫丹对土壤细菌群落结构有一定的影响,但是影响不明显。

4 结论

(1)低浓度硫丹处理条件下,与对照相比,棕壤中脲酶活性在四个取样时间中均没有表现出显著差异;随硫丹污染浓度增大,在各个取样时间中,土壤脱氢酶活性被显著抑制, β -葡萄糖苷酶活性被显著激活。

(2)DGGE 图谱的分析结果表明,变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和少量放线菌门(*Actinobacteria*)中部分细菌对硫丹污染相对敏感,总体来说硫丹对土壤细菌群落结构的影响不明显。

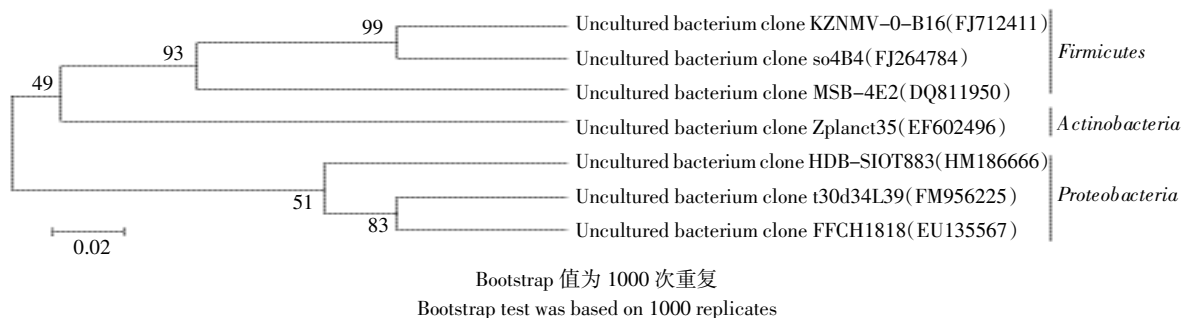


图 5 细菌 DGGE 条带及其相似序列的 16S rDNA-V3 序列的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA-V3 fragments retrieved from DGGE bands and their close relatives in the GenBank

参考文献:

- [1] Jia H, Li Y F, Wang D, et al. Endosulfan in China 1: Gridded usage inventories[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2009, 16(3): 295–301.
- [2] Jia H, Sun Y, Li Y F, et al. Endosulfan in China 2: Emissions and residues[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2009, 16(3): 302–311.
- [3] 迭庆杞, 聂志强, 黄启飞, 等. 珠江三角洲土壤中有机氯农药的分布特征[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(2): 298–304.
DIE Qing-qi, NIE Zhi-qiang, HUANG Qi-fei, et al. Organochlorine (OCPs) in soils of Pearl River Delta, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(2): 298–304.
- [4] 王兴琴, 花日茂, 潘锦勇, 等. 安徽农田表层土壤中有机氯农药的分布及其组成[J]. 应用生态学报, 2012, 22(12): 3285–3292.
WANG Xing-qin, HUA Ri-mao, PAN Jin-yong, et al. Distribution and composition of organochlorine pesticides in farmland top soils of Anhui Province[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 22(12): 3285–3292.
- [5] Awasthi N, Ahuja R, Kumar A. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(11): 1697–1705.
- [6] Preston S, Wirth S, Ritz K, et al. The role played by microorganisms in the biogenesis of soil cracks: Importance of substrate quantity and quality[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12): 1851–1858.
- [7] Lejon D P H, Chaussod R, Ranger J, et al. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France)[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 50(4): 614–625.
- [8] Bauhus J, Khanna P K. Carbon and nitrogen turnover in two acid forest soils of southeast Australia as affected by phosphorus addition and drying and rewetting cycles[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 17(3): 212–218.
- [9] Defo M A, Njine T, Nola M, et al. Microcosm study of the long term effect of endosulfan on enzyme and microbial activities on two agricultural soils of Yaounde-Cameroon[J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, 6(9): 2039–2050.
- [10] Kalyani S S, Sharma J, Dureja P, et al. Influence of endosulfan on microbial biomass and soil enzymatic activities of a tropical alfisol[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 84(3): 351–356.
- [11] Kong L F, Zhu S Y, Zhu L S, et al. Colonization of *Alcaligenes faecalis* strain JBW4 in natural soils and its detoxification of endosulfan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1407–1416.
- [12] Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S, et al. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1980, 44: 1011–1016.
- [13] Tabatabai M A. Soil enzymes[M]. Madison: Soil Science Society of America, 1994.
- [14] 袁颖红, 樊后保, 刘文飞, 等. 模拟氮沉降对杉木人工林土壤酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. 土壤, 2013, 45(1): 120–128.
- [15] YUAN Ying-hong, FAN Hou-bao, LIU Wen-fei, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on soil enzyme activities and microbial community functional diversities in a Chinese fir plantation[J]. *Soils*, 2013, 45(1): 120–128.
- [16] Nasreen C, Mohiddin G J, Srinivasulu M, et al. Interaction effects of insecticides on enzyme activities in black clay soil from groundnut (*Arachis hypogaea* L.) fields[J]. *Environmental Research, Engineering and Management*, 2012, 60(2): 21–28.
- [17] Nasreen C, Mohiddin G J, Srinivasulu M, et al. Responses of soil enzymes to insecticides in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivated black soil[J]. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 8(2): 163–168.
- [18] 熊佰炼, 张进忠, 代娟, 等. 硫丹及其主要代谢产物对紫色土中酶活性的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(15): 4649–4657.
XIONG Bai-lian, ZHANG Jin-zhong, DAI Juan, et al. Influence of endosulfan and its metabolites on enzyme activities in purple soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(15): 4649–4657.
- [19] Giri P K, Saha M, Halder M P, et al. Effect of pesticides on microbial transformation of sulphur in soil[J]. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 2011, 2(4): 97–102.
- [20] Hussain S, Siddique T, Saleem M, et al. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions[J]. *Advances in Agronomy*, 2009, 102: 159–200.
- [21] 沈芳芳, 袁颖红, 樊后保, 等. 氮沉降对杉木人工林土壤有机碳矿化和土壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(2): 517–527.
SHEN Fang-fang, YUAN Ying-hong, FAN Hou-bao, et al. Effects of elevated nitrogen deposition on soil organic carbon mineralization and soil enzyme activities in a Chinese fir plantation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(2): 517–527.
- [22] Bandick A K, Dick R P. Field management effects on soil enzyme activities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(11): 1471–1479.
- [23] 薛冬, 姚槐应, 黄昌勇. 茶园土壤微生物群落基因多样性[J]. 应用生态学报, 2007, 18(4): 843–847.
XUE Dong, YAO Huan-ying, HUANG Chang-yong. Genetic diversity of microbial communities in tea orchard soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(4): 843–847.
- [24] 刘绍雄, 王明月, 王娟, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1405–1412.
- [25] LIU Shao-xiong, WANG Yue-ming, WANG Juan, et al. Analyzing soil microbial community structure diversity from Jian Wetland Lakeside zone using PCR-DGGE technique[J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2013, 32(7): 1405–1412.
- [26] Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 982–988.