

土壤反硝化酶活性测定方法及影响因素研究^{*}

和文祥, 魏燕燕, 蔡少华

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 借助土壤酶学的基本原理, 初步建立了一种底物(KNO_3)最佳浓度为 10 g/L , 土样不需二次离心的土壤反硝化酶活性测定方法——硝态氮剩余量法, 并对其影响因素进行了研究。结果表明, 该测定方法简便、快速、灵敏; 有机肥的加入可显著提高土壤反硝化酶的活性, 有机肥和化肥的共施是最佳的培肥措施; 种植作物也可提高土壤反硝化酶活性; 甲苯对土壤反硝化酶活性有明显的抑制作用, 且土壤肥力水平越高, 抑制幅度越大。

[关键词] 土壤反硝化酶; 测定方法; 有机肥; 甲苯

[中图分类号]

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)01-0121-04

随着世界人口的急剧增加, 粮食需求不断增大, 肥料和农药作为农作物增收防病的主要措施而被广泛施用。我国氮肥的损失严重, 利用率不足 40%, 较发达国家低 10%。氮肥损失的主要途径是氨化和反硝化, 其结果一方面是引起产品品质下降, 如蔬菜中的硝态氮大量累积; 另一方面是对环境质量造成威胁, 如水体富营养化等。在氮肥损失的 2 个生化途径中, 特别值得人们关注的是反硝化过程, 其产生的 N_2O 温室效应是 CO_2 的 200 倍^[1-3], 并且对臭氧层有破坏作用, 导致 1980~1990 年间地球紫外线辐射大约增强了 6%。尽管施入土壤的氮素仅有 0.5%~1.5% 转化成 N_2O , 但全球每年纯氮的消耗量高达 $93.5 \times 10^6 \text{ t}$, 使得 N_2O 总量仍以每年 0.25% 的速率递增^[4-7], 其仍在不停地破坏着人类生存的环境。故近三、四十年来, 土壤的反硝化问题一直是农业和环境科研工作者关注的热点问题之一。土壤酶^[8]作为土壤重要组成部分, 参与了土壤中所有生化反应过程。反硝化过程也是在土壤反硝化酶

(土壤吸附的酶和微生物分泌的酶)作用下来完成的。目前反硝化酶活性常用的测定方法^[9-10]是在厌氧密闭条件下, 加入一定量的硝态氮和碳源物质等, 充吸 3 次氮气后加入乙炔, 培养后采用气相色谱分析氧化亚氮的量。该测定方法设备条件要求较高, 不易操作, 很难大范围地推广应用。为此本试验借助土壤酶学的基本理论, 初步建立一种测定土壤反硝化酶活性的方法——硝态氮剩余量法, 以期比较不同条件下土壤反硝化能力的强弱, 提高氮肥利用率及保护环境等提供可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 供试土样

土样于 2002-09 采自西北农林科技大学资源环境学院 1977 年开始的长期定位试验地, 共 7 份, 编号依次为 1, 2, ..., 7, 其培肥方案见表 1。采样时先除去 0~5 cm 表层土, 五点法采集 5~20 cm 深的土样, 风干后过孔径 1 mm 的筛, 备用。

表 1 供试土壤的培肥方案

Table 1 Experimental design of soils tested

土样编号 No.	处理 Treatment	尿素 Urea	过磷酸钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	秸秆 Straw	厩肥 Manure
1	无肥 No-fertilizer	0	0	0	0
2	化肥 Chemical fertilizer	450	525	0	0
3	休闲 Fallow	450	525	9 375	0
4	低秸 Low straw	450	525	9 375	0
5	中秸 Middle straw	450	525	18 750	0
6	高秸 High straw	450	525	37 500	0
7	厩肥 Manure	450	525	0	37 500

[收稿日期] 2005-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40301022); 国家重点基础研究发展计划(973)子项目(2004CB418506); 国家自然科学基金重点项目(20337010)

[作者简介] 和文祥(1968-), 男, 陕西黄龙人, 副教授, 博士, 主要从事土壤生物化学和生态毒理研究。E-mail: W xhe1968@163.com

1.2 方法

1.2.1 土壤反硝化酶活性测定原理 土壤反硝化反应需要在厌氧环境中进行。加入三角瓶中的硝态氮的去向只能是作物利用、淋失、土壤吸附和反硝化 4 个方面之一。本试验中, 1 g 土样被溶液完全淹没, 处于厌氧环境, 其硝态氮也不可能淋失, 加之其又是一种阴离子, 土壤对其的吸附量很小。所以, 培养结束后硝态氮的损失只能是反硝化作用的结果。因此, 本试验拟通过测定反应后 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的损失量, 来表征土壤反硝化酶活性。

1.2.2 铵态氮含量的测定 取 1, 3, 4 号土样用靛酚兰比色法^[12]测定铵态氮含量。

1.2.3 硝态氮含量的测定 称取 4 份土样, 每份 1.00 g, 均置于 50 mL 的三角瓶中, 分别加 10 g/L 葡萄糖和 10 mL 不同浓度(1, 5, 10, 20 g/L)的硝酸钾(底物)溶液, 加塞后 37 °C 培养 48 h, 4 000 r/min 离心 20 min, 用紫外分光光度法测硝态氮的含量(OD 值)^[11], 含量以转化 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的量表示。同时设置灭菌土壤, 无底物, 无土壤处理作为对照。

1.2.4 最佳底物浓度的确定 取 5 号土样, 按 1.2.3 的方法测定其硝态氮含量, 每处理重复测 4 次, 求其平均值, 标准差及变异系数(Cv), 检验其重现性, 以确定底物(硝酸钾)的最佳浓度。

1.2.5 离心次数的确定 对供试土壤在 1 次离心后再作第 2 次离心, 测定其 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量, 以确定需要离心的次数。

1.2.6 供试土壤反硝化酶活性的测定 测定 1~7 号土样的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量, 比较不同培肥土壤的反硝化酶活性。

1.2.7 甲苯对土壤反硝化酶活性的影响 向 1.00

g 土样中加入 0.2 mL 甲苯, 混匀后静置 15 min, 分别加入 10 g/L 的葡萄糖和 10 g/L 的硝酸钾溶液, 加塞培养后, 测定其土壤反硝化酶活性。

2 结果与分析

2.1 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 含量的测定

有学者^[13]认为, 水稻土中存在着硝酸盐异化还原成铵的过程。为了了解塋土中是否也存在此过程, 本试验测定了反应结束后土壤溶液中氨态氮的含量。由表 2 可知, 土壤培养离心液中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的含量很低, 检出的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 含量仅占加入 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量的 1.103%~3.607%, 平均为 2.363%, 故可认为塋土中基本不存在此异化还原过程。

表 2 土壤上清液中铵态氮的含量

Table 2 Content of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ in soil supernatant fluid

土样 编号 No.	$\text{NH}_4^+ \text{-N}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\text{NO}_3^- \text{-N}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\text{NH}_4^+ \text{-N}/$ $\text{NO}_3^- \text{-N}$)/%
1	32.95	1 384.905	2.379
3	15.28	1 384.905	1.103
4	49.95	1 384.905	3.607

2.2 最佳硝酸钾浓度的确定

由表 3 可知, 各处理 4 次重复间 OD 值差异均较小, 标准差为 0.004 7~0.013 5, 变异系数最大为 3.069%, 其对应的 KNO_3 浓度为 1 g/L; 变异系数最小为 0.318%, 其对应的 KNO_3 浓度为 10 g/L。变异系数和标准差的大小可以说明重复数值的离散程度, 即离平均值的远近程度, 变异系数和标准差越小, 说明试验结果的准确性越高, 重现性越好^[14]。由此可知, 当硝酸钾浓度为 10 g/L 时, 此测定方法的准确性最高。因此, 最佳的硝酸钾浓度为 10 g/L。

表 3 不同浓度硝酸钾对测定结果的影响

Table 3 Effect of different KNO_3 concentrations on tested results

处理 Treatment	KNO_3 浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) KNO_3 concentration	OD 值 OD value				标准差 Standard error	变异系数/% Cv
		1	2	3	4	平均 Mean	
I	1	0.190	0.195	0.188	0.181	0.189	3.069
II	5	0.839	0.845	0.849	0.842	0.844	1.599
III	10	1.471	1.476	1.482	1.479	1.477	0.318
IV	20	2.09	2.10	2.08	2.11	2.095	0.616

2.3 离心次数的确定

土壤培养液离心 2 次后的硝态氮含量见表 4。由表 4 可知, 经 2 次离心后土壤培养液的比色值很小, 采用标准曲线计算的硝态氮含量均为负值, 这表明在酶活性测定中, 采用 1 次离心即可完全获得土

壤中的硝态氮, 故在测定时不需要进行第 2 次离心。

2.4 无底物对照试验结果

对照试验(无底物处理)的结果见表 5。由表 5 可知, 供试土样的硝态氮含量均无法检出, 表明土壤本身的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的含量很低。这也佐证了土壤中硝

态氮吸附量较小的结论。

表 4 离心 2 次后土壤中 NO₃⁻-N 的含量

Table 4 Content of NO₃⁻-N concentration in the second centrifugal liquids

土样编号 No.	OD 值 OD value	NO ₃ ⁻ -N/ (μg·mL ⁻¹)
1	0.055 3	- 0.322 8
2	0.053 8	- 0.327 5
3	0.037 3	- 0.438 3
4	0.037 0	- 0.439 9
5	0.074 5	- 0.199 3
6	0.037 3	- 0.438 3
7	0.036 0	- 0.446 3

表 5 对照处理的土壤硝态氮含量

Table 5 Soil NO₃⁻-N content in control treatment

土样编号 No.	OD 值 OD value	NO ₃ ⁻ -N/ (μg·mL ⁻¹)
1	- 0.011	- 0.748 0
2	0.021	- 0.542 6
3	0.008	- 0.626 1
4	0.027	- 0.504 1
5	0.026	- 0.486 9
6	0.011	- 0.510 5
7	0.028	- 0.463 9

由以上结果可知,通过测定反应后硝态氮的剩余量来表征土壤反硝化酶活性的方法是可行的,且具有简便、快速、灵敏的特点。

2.5 不同培肥土壤的反硝化酶活性

不同培肥土壤的反硝化酶活性见图 1。由图 1 可知,不同培肥处理的酶活性有较大差别,施用有机肥土壤(4、5、6、7 号)的反硝化酶活性较高,为 206.06~239.73 μg/(g·h),施用化肥和休闲处理土壤的(2 和 3 号)反硝化酶活性中等,分别为 158.37 和 189.19 μg/(g·h);无肥处理(1 号)土壤反硝化酶活性最低,仅为 37.24 μg/(g·h),只是高秸和化肥处理的 15.53% 和 23.51%。由此可见,土壤反硝化酶活性与土壤培肥措施基本一致。主要原因可能是肥力较高的土壤,一方面其有机质含量较高,对反硝化酶的吸附固定容量较大;另一方面其营养物质丰富,微生物数量和种类较多,反硝化微生物数量也多,最终导致反硝化酶活性增强。因此,肥力较高的土样酶活性也较高。

3 与 4 号土样的培肥方案一样,但其区别在于是否种植作物。由图 1 可知,种植作物后的 4 号土样反硝化酶活性较高,为 217.25 μg/(g·h),休闲的 3 号土样反硝化酶活性为 189.19 μg/(g·h),二者相差 28.06 μg/(g·h),这表明作物对反硝化酶活性

具有明显的增强作用。这是由于作物在生长过程中,分泌出大量的营养物质和生长刺激素类物质,这些物质促进了微生物的生长,使其数量大大增加,最终使土壤反硝化活性增强。从土壤反硝化酶活性角度来看,有机肥加化肥是最佳的培肥方式。此外如何调节培肥和提高肥料利用率之间的关系,还有待进一步研究。

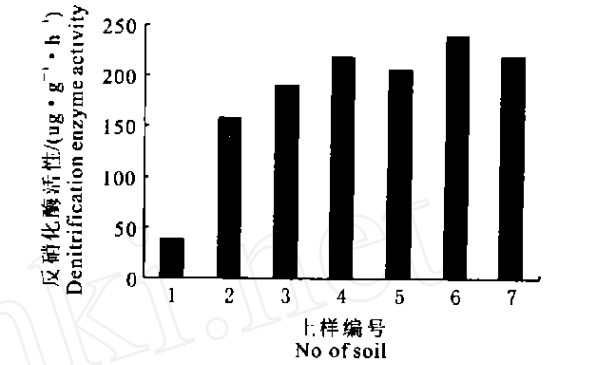


图 1 供试土壤反硝化酶活性

Fig. 1 Denitrification enzyme activities of soils tested

2.6 甲苯对土壤反硝化酶活性的影响

甲苯作为一种应用广泛的有机溶剂,也是一些农药等有机物在土壤中降解的中间产物,在水解酶活性测定方面常被用作前期处理试剂。所以本试验对甲苯与土壤反硝化酶活性关系进行了探讨。甲苯处理前后供试土样硝态氮含量见表 6。

表 6 甲苯处理前后土壤离心液中的 NO₃⁻-N 含量

Table 6 NO₃⁻-N concentration in soil centrifugal liquid μg/mL

土样编号 Soil sample No.	未添加甲苯 No-toluene treatment	添加甲苯 Toluene treatment	差值 Difference
1	6.369 3	8.463 2	2.093 9
2	5.182 1	8.983 0	3.800 9
3	4.119 9	8.676 5	4.556 6
4	3.681 9	8.895 8	5.213 9
5	3.980 3	8.925 8	4.944 5
6	3.160 4	8.914 0	5.753 6
7	3.871 9	9.116 2	5.244 3

由表 6 可知,未添加甲苯时,供试土样的硝态氮含量与土壤反硝化酶活性成反比。而添加甲苯后却增加了土壤中 NO₃⁻-N 的含量,即甲苯抑制了土壤反硝化酶的活性。这可能是由于甲苯杀死了反硝化微生物,从而使得作用于反硝化过程的微生物数量减少,导致反硝化反应速率降低,结果使 NO₃⁻-N 含量增加。

由表6还可知,甲苯对土壤反硝化酶活性影响的幅度随土壤肥力水平的降低而减小。其中甲苯对厩肥(7号)、低秸(4号)和高秸(5号)土样反硝化酶活性的影响较大,硝态氮含量的差值均大于 $5.20\mu\text{g/mL}$;甲苯对化肥处理(2号)的影响较小,硝态氮含量差值为 $3.8009\mu\text{g/mL}$;甲苯对无肥处理(1号)的抑制作用最小,硝态氮含量差值仅为 $2.0939\mu\text{g/mL}$,与6号土样相比,只是其36.36%。这是因为随着土壤肥力水平的提高,微生物数量增大,甲苯的加入导致反硝化微生物死亡,最终表现为甲苯对反硝化酶活性的抑制幅度较大。不同秸秆施入量处

理土壤的反硝化酶活性受甲苯影响较大,但表现出的规律性不明显。

3 结 论

本研究结果表明: (1) 采用硝态氮剩余量法测定土壤反硝化酶活性是可行的; (2) 10 g/L 硝酸钾溶液是酶促反应最适底物浓度; (3) 有机肥的加入可显著提高反硝化酶活性, 有机肥加化肥是最佳的培肥模式; 种植作物也可增强土壤反硝化酶活性; (4) 甲苯对土壤反硝化酶活性有抑制作用, 土壤肥力水平越高, 抑制幅度越大。

[参考文献]

- [1] 赵其国. 发展与创新现代土壤科学[J]. 土壤学报, 2003, 40(3): 321-327.
- [2] Sombroek W G, Gommers R. The climate change - Agriculture conundrum [C]//Kaiser H M, Drennen T E. Agricultural dimension of global climate change Delray Beach, (Florida): Lucie Press, 1993: 67-86.
- [3] 刘小兰, 李世清. 土壤的氮素和环境[J]. 干旱地区农业研究, 1998, 16(1): 36-43.
- [4] Crutzen P J. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, Including nitrous oxide [C]//DeWiche C C. Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxides New York: John Wiley & Sons Inc, 1981: 17-44.
- [5] Lloyd D. Microbial processes and the cycling of atmospheric trace gases [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1995, 10: 476-478.
- [6] Prinn R G, Cunnold D, Rasmussen R, et al. Atmospheric emissions and trends of nitrous oxide deduced from 10 years of ALE-GAGE data [J]. J Geophys Res, 1990, 95: 18369-18385.
- [7] 李振高, 俞 慎. 土壤硝化-反硝化作用研究进展[J]. 土壤, 1997(6): 281-286.
- [8] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] Jordan T E, Weller D E, Correll D L. Denitrification in surface soils of a riparian forest: effects of water, nitrate and sucrose additions[J]. Soil Biol & Biochem, 1998, 30: 833-843.
- [10] White J R, Reddy K R. Influence of nitrate and phosphorus loading on denitrifying enzyme activity in everglades wetland soils[J]. Soil Sci Soc Am J, 1999, 63: 1945-1954.
- [11] 水和废水监测分析方法编委会编. 水和废水监测分析方法[M]. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1997: 272-274.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 54-56.
- [13] 蔡祖聪. 尿素和硝酸钾对水稻土无机氮转化过程和产物的影响 II. N_2O 生成过程[J]. 土壤学报, 2003, 40(3): 414-419.
- [14] 袁志发, 孟德顺. 多元统计分析[M]. 陕西杨陵: 天则出版社, 1993.

Study on assaying method and affecting factors of soil denitrification enzyme activity

HE Wen-xiang, WEI Yan-yan, CAI Shao-hua

(College of Resource and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: By means of soil enzymatic basic theory, a simple, quick and sensitive method was established to analyze soil denitrification enzyme activity (DEA) and affecting factors. The results showed that organic fertilizer could remarkably increase soil DEA. The mixing of organic fertilizer and chemical fertilizer was the best way to improve soil fertility. Plant growth also enhanced soil DEA. Toluene significantly inhibited DEA, and the inhibition grew with the increase of soil fertility.

Key words: denitrification enzyme; assaying method; organic fertilizer; toluene