

# 一种测定土壤反硝化酶的改进方法

韩建刚, 白红英, 朱咏莉, 李世清, 曲 东

(西北农林科技大学资源与环境科学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**介绍了一种新的测定土壤反硝化酶的装置,使土壤反硝化酶(硝酸还原酶、亚硝酸还原酶)的测定更加简便、灵敏、准确。对3种不同质地的土壤从影响土壤反硝化酶活性的3种关键因素:培养时间、称样量和真空度方面进行了研究。结果表明,土壤反硝化酶的最佳培养时间为24—27 h,称样量与真空度因酶而异。

**关键词:**硝酸还原酶;亚硝酸还原酶;培养时间;称样量;真空度

**中图分类号:**X833 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-0267(2002)04-0349-03

## An Improved Method for Determination of Denitrifying Enzymes in Soil

HAN Jian-gang, BAI Hong-ying, ZHU Yong-li, LI Shi-qing, QU Dong

(Collage of Resources and Environment Science, Northwestern Sci - Tech University of Agriculture & Forestry, Yang ling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** A simple and improved method for determination of denitrifying enzymes (nitrate reductase and nitrite reductase) in soil. In comparison with the previous methods, it is characterized by more simple, sensitive and accurate. Three affecting factors including incubation period, sample weight and vacuum have been optimized through selection of three soils. It has been indicated that the optical incubation period time was 24—27 hours, but sample weight and vacuum for the test were variable based on enzymes.

**Keywords:** Nitrate reductase; nitrite reductase; sample weight; incubation period; vacuum

土壤在嫌气条件下,其硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR)作为专性酶参与了土壤硝态氮的进一步还原过程。研究其特性对于土壤氮素的反硝化损失和氮素痕量气体,尤其 $N_2O$ 和NO对环境的影响具有重要的意义。但是到目前为止,有关土壤反硝化酶的测定几乎都是参照哈兹耶夫的测定方法,而该方法中土壤反硝化酶随不同质地土壤在培养时间和称样量上应有的差异性及其培养嫌气程度的不确定性,使其已难以适应土壤反硝化酶定性的比较和定量的研究。为此,有研究者曾试图将植物硝酸还原酶的测定方法引入到土壤测定中<sup>[1]</sup>,但最终因其本身所具有的局限性而未能得到广泛的认可。本文在哈兹耶夫测定方法的原理基础上,介绍了一种新的测定土壤反硝化酶的装置,并应用此装置从测定土壤反硝化酶时培养的真空度、培养时间和称样量的差异性上,对哈兹耶夫测定方法进行了改进,使其更加适合研究土壤反硝

化酶的特性及其环境效应。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试土壤为陕西关中塿土,洛川黑垆土和米脂黄绵土,均采自耕层。土壤质地从粘到砂不等,使用前每种土壤都风干、磨细,过1 mm筛,基本性状如表1。

### 1.2 测定方法

测定原理、试剂配制参照文献[2];硝态氮采用流动注射分析测定;亚硝态氮采用对氨基苯磺酸—甲萘胺,520nm比色测定;土壤理化性状分析参照文献[3]。

步骤:取过1 mm筛的风干土壤样品于80 mL硬质试管,加入20 mgCaCO<sub>3</sub>和1 mL 1% KNO<sub>3</sub>(或1% NaNO<sub>2</sub>) (基质),混匀,加入1 mL 1%的葡萄糖(氢供体),用橡胶塞塞紧。将此混合液利用图1测定装置抽至一定负压(真空度),置于30℃恒温培养箱中培养。用160℃—170℃下灭菌4—6 h的土壤加试剂作为对照。培养结束后,向试管中加入50 mL蒸馏水、1 mL明矾饱和水溶液(消除浑浊),摇匀,将土壤悬液

收稿日期:2001-08-07

基金项目:国家自然科学基金部分资助(39970151)

作者简介:韩建刚(1976—),男,陕西杨凌人,硕士研究生,主要从事土壤肥力与农业环境保护方面的研究工作。

表 1 供试土壤基本性状

Table 1 Physical and chemical properties of the tested soil

项目	有机质 /g · kg <sup>-1</sup>	CaCO <sub>3</sub> /g · kg <sup>-1</sup>	容重 /g · cm <sup>-3</sup>	pH /1:1; 0.01molCaCl <sub>2</sub>	质地 名称	粘粒组成/g · kg <sup>-1</sup>	
						<0.001 mm	<0.01 mm
关中土	12.6	92.6	1.32	7.89	重壤土	210	490
洛川黑垆土	10.4	56.4	1.28	7.74	中壤土	150	360
米脂黄绵土	8.9	118.4	1.30	8.20	轻壤土	70	131

用致密滤纸过滤,待测。硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的活性以 24 h 后 10 g 干土 (105 °C 烘干 24 h) 中被还原的硝态氮和亚硝态氮的毫克数表示。

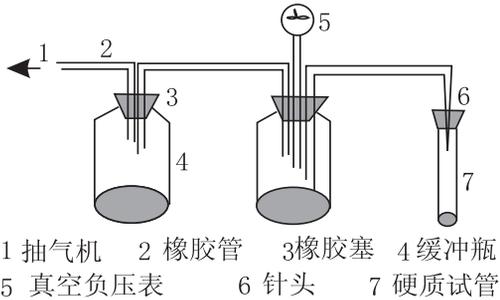


图 1 土壤反硝化酶测定装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of measuring the soil denitrifying enzymes' activity

### 1.3 值得注意的几点

(1) 土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 与 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 待测液保存时环境温度应小于 4 °C, 高于 4 °C 的温度易引起土壤微生物的活动; (2) 土壤灭菌的温度勿大于 180 °C; (3) 硬质试管的体积应不小于 50 mL, 避免培养过程中气体分压的变化对酶活性产生影响; (4) 对于石灰性土壤而言, 称样时 CaCO<sub>3</sub> 就无须加入, 土壤本身的 CaCO<sub>3</sub> 量足以满足微生物的最适 pH(7—8.5)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养时间对 NR、NiR 活性的影响

一般认为, 测定酶活性的最佳培养时间应是在酶促反应呈零级反应的状态下测定<sup>[4, 5]</sup>, 此状态的时间段内反应产物的生成速率或底物的减少速率为一定值, 尽量避免土壤增殖酶的产生与参与。而测定酶活性的时间则选择此时间段的最小值。3 种土壤的 NR、NiR 酶活性 (底物的减少速率) 与培养时间的关系曲线如图 2、图 3 所示。

可以看出, 土壤 NR、NiR 酶活性随培养时间的变化可分为 4 个反应阶段: I 启动阶段; II 快速反应阶段 (一级反应阶段); III 反应稳定阶段 (零级反应阶段); IV 反应结束阶段。3 种不同质地的土壤对此 4

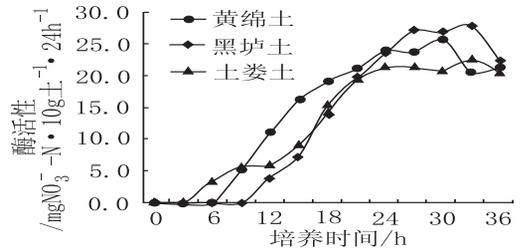


图 2 培养时间对土壤 NR 活性的影响

Figure 2 Effects of incubating time on the activity of nitrite reductase

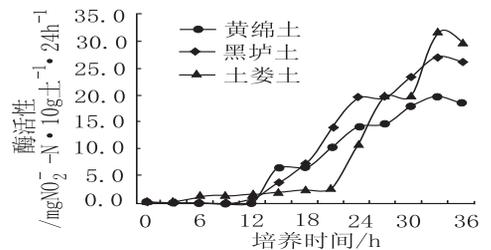


图 3 培养时间对土壤 NiR 活性的影响

Figure 3 Effects of incubating time on the activity of nitrate reductase

个反应阶段的响应时间是不同的: 含粘粒较多的土娄土启动得最早, 但启动期持续时间最长; 经历一级反应阶段之后, 3 种土壤 NR 分别在 24—30 h (土娄土), 27—33 h (黑垆土), 24—27 h (黄绵土) 进入零级反应阶段; 而 NiR 则在 27—30 h (土娄土), 24—27 h (黑垆土), 24—27 h (黄绵土) 进入零级反应阶段; 此后随着培养时间的延长, 酶活性逐渐下降。其反映了不同土壤的测定中存在培养时间上的差异性。对于最佳培养时间的选择, 3 种土壤两种酶的测定建议以 27 h 为宜。

### 2.2 称样量对 NR、NiR 活性的影响

土壤用量的选择通常与培养基浓度相关。如图 4、图 5, 在基质浓度一定的前提下, 3 种土壤 NR 测定的称样量在 0—0.5 g 范围内, 与酶活性呈线性正相关; 而 0.5—5 g 的称样量却与酶活性呈线性负相关。对 NiR 而言, 3 种土壤 0—1 g 和 1—5 g 的称样量分别与酶活性呈正相关和负相关。

结合上培养曲线及称样量曲线可以看出, 土壤 NR 酶活性要高于 NiR 酶活性, 并且酶活性与称样量

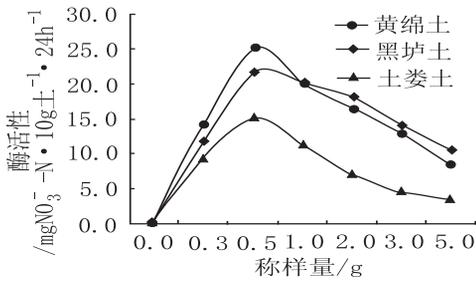


图 4 称样量对土壤 NR 活性的影响

Figure 4 Effects of sample weight on the activity of nitrite reductase

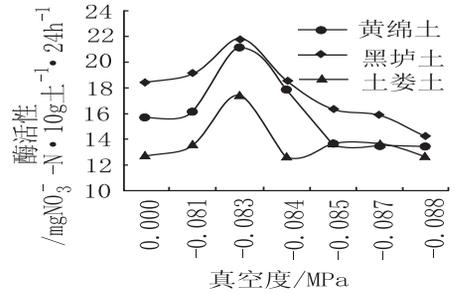


图 6 真空度对土壤 NR 活性的影响

Figure 6 Effects of vacuum on the activity of nitrite reductase

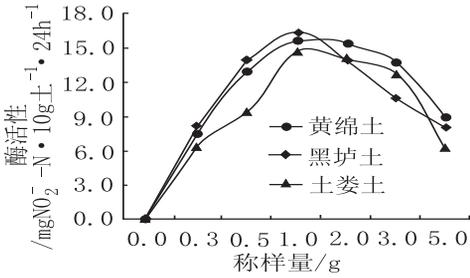


图 5 称样量对土壤 NiR 活性的影响

Figure 5 Effects of sample weight on the activity of nitrate reductase

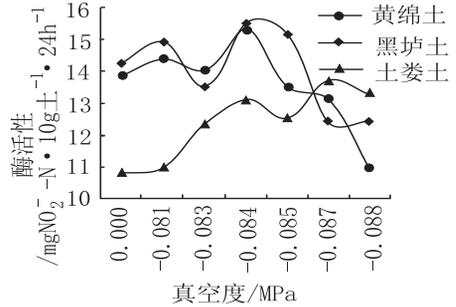


图 7 真空度对土壤 NiR 活性的影响

Figure 7 Effects of vacuum on the activity of nitrate reductase

之间的负相关表明, 基质分子数在反应终了前已无法饱和该称样量土壤中所含有的全部酶分子, 导致了酶活性的下降。对于最佳土壤称样量的选择, 建议 NR 以 0.5 g 土壤为宜; 而 NiR 则以 1 g 为宜。

### 2.3 真空度对 NR、NiR 活性的影响

土壤反硝化酶活性只有在一定的真空度下才可得以启动并准确测定, 哈兹耶夫测定法中对此比较含糊。3 种土壤真空度对酶活性的影响曲线如图 6、图 7 所示。

可以看出, 随着真空度的变化土壤反硝化酶的活性具有较大的差异性。土壤 NR 活性在真空度为 -0.083 MPa 时达到最高, 而土壤 NiR 活性则要达到 -0.084 MPa 的真空度。过高的真空度则影响到了体系的微生物活性, 导致酶活性逐渐下降。

## 3 结论

(1) 提出了一套使用简便、易于操作的测定土壤

反硝化酶的新装置。

(2) 土壤反硝化酶的测定培养时间以 24—27 h 为宜; NR 活性测定称样量和真空度分别为 0.5 g 和 -0.083 MPa, 而 NiR 则为 1 g 和 -0.084 MPa。

### 参考文献:

- [1] Abdelmagid H M. 伍期途译. 土壤中硝酸还原酶活性[J]. 土壤学进展, 1989, (3): 48-53.
- [2] Ф X 哈兹耶夫. 土壤酶活性[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [3] 李西开. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [4] 土壤微生物研究会[日]. 土壤微生物实验法[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [5] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.