

土壤脲酶活性与底物浓度定量关系研究

和文祥^{1,2}, 刘恩斌³, 朱铭莪¹

(1. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨陵 712100; 2 中国科学院南京土壤研究所, 江苏南京 210008; 3. 延安市农业学校, 陕西延安)

摘 要: 通过对陕西 7 种类型 19 个土样脲酶活性与底物浓度关系的研究, 表明 $Y = a \times b \times x / (1 + b \times x)$ 模型能较好地表征二者的关系, 并得到了最大表观脲酶活性 U_{max} , 同时揭示出酶促反应存在着吸附机制; 除水稻土和黄褐土外, 其余土样的 U_{max} 值均呈现高肥力大于低肥力的规律性变化, 相关分析发现在不同生态区中土壤脲酶特征截然不同, 其 U_{max} 值有明显差异, 故在分析时需区分开来; 只有同一生态区中土壤脲酶的 U_{max} 与肥力密切相关, 可作为土壤肥力指标之一。

关键词: 土壤脲酶; 尿素浓度; 定量关系

中图分类号: S154. 2 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2001)01-0062-05

The Study on Quantitative Relationship between Soil Urease Activity and Substrate Concentration

HE Wen-xiang^{1,2}, LIU En-bin³, ZHU Ming-e¹

(1. College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling Shaanxi 712100; 2. The Institute of Soil Science, China Academia Sinica, Nanjing Jiangsu 210008; 3. Agricultural School of Yan'an, Yan'an Shaanxi)

Abstract The relationship was studied between soil urease activity and urea concentrations in nineteen samples of seven soil types in Shaanxi Province. It shows as follows The model $Y = a \times b \times x / (1 + b \times x)$ can be better expressed their relationship because the equation is the most significant correlation, acquired the maximum apparent urease activity U_{max} when urea concentration is infinity, there is a adsorption mechanism in enzyme reaction; The urease U_{max} of higher fertility samples are greater than that of lower fertility except paddy soil and Yellow cinnamon soils, It must be distinguished to analyses because soil urease has apparent polarity characteristics under different ecology environments, urease U_{max} can be an index of soil fertility because it is remarkable correlation with soil fertility level by correlation analyses in the same ecology.

Key words Soil urease activity; Urea concentration; Quantitative relationship

土壤酶作为土壤主要组成部分, 其在营养元素转化、土壤肥力提高、污染物的生物修复及监测等方面发挥着十分重要的作用。其中脲酶是一种可水解尿素肥料为氨和二氧化碳的土壤酶类, 一方面氨进入空气, 降低了氮素的利用率 (据统计挥发量约占 50%)^[1], 另一方面在干旱地区碱性土壤中氨又会发生硝化作用而生成 NO_2 , 危害作物

根系、幼苗及微生物的生长。故国内外学者对脲酶进行了较深入的研究^[2~10, 14], 在来源、性质及应用等方面取得了比较一致的看法, 但在底物浓度与酶活性定量关系方面国内外鲜见报道。为此, 本文拟通过对陕西 7 种主要土壤类型 19 个土样脲酶活性的测定, 了解脲酶活性与尿素浓度间的定量关系, 探讨肥力水平对二者关系的影响。

收稿日期: 2000-10-20

基金项目: 国家教委博士点基金项目资助 (批准号 900703)

作者简介: 和文祥 (1968-), 男, 博士后, 主要从事土壤生物化学及生态毒理学研究。联系电话: (029) 7092319。

1 材料与方法

供试土样 采自陕西南部的黄褐土、水稻土(安康市) 6个样品,陕西中部和北部的塿土(杨陵区)、褐土(黄龙县)、黑垆土(洛川县)、黄绵土(延安市)和风沙土(榆林市) 13个土样,共 7种类型 19个土样,各土样均采自 5~ 20 cm 土层,风干过 1 mm 筛,保存备用。

测定方法 常规方法测定理化性质^[11],靛酚蓝比色法分析脲酶活性^[12](以 N H₂- N 计),据此

表 1 供试土样的理化性质及脲酶活性

Table 1 The physical-chemical properties and urease activities of soils tested										
土样 Soil sample	肥力水平 Fertility	物理性粘粒 Physical clay (%)	有机质	全氮	全磷	碱解氮 Alkali hydro- lyzable N (mg /kg)	阳离子 交换量 CEC (cmol/kg)	pH	CaCO ₃ (g /kg)	脲酶活性 Urease activity
			O. M.	Total N	Total P					
g /kg										
水稻土	高 high	59.25	29.9	1.92	1.12	149.1	35.10	6.17	0	373
Paddy soil	低 Low	52.43	28.7	1.79	1.05	122.9	34.08	6.76	0	350
黄褐土	高 1 high 1	50.60	10.5	0.69	0.82	44.10	35.65	7.07	0	200
Yellow	高 2 high 2	29.81	11.4	0.77	0.80	56.35	32.29	6.91	0	214
cinnamon	高 3 high 3	54.85	11.1	0.95	0.82	57.40	35.06	6.87	0	232
soil	低 Low	51.55	8.2	0.43	0.72	59.85	34.61	6.59	0	159
黄绵土	高 high	18.92	16.0	0.80	1.35	65.10	25.56	8.20	78.3	864
Loess soil	低 1 Low 1	29.44	7.6	0.40	1.05	26.60	26.40	8.47	97.2	455
	低 2 Low 2	23.41	7.7	0.60	1.06	28.70	26.15	8.45	104.7	355
黑垆土	高 high	29.77	11.2	0.77	1.17	39.20	28.29	8.25	29.90	800
Regur soil	低 1 Low 1	4.37	9.8	0.53	1.24	35.35	28.80	8.31	29.30	691
	低 2 Low 2	36.92	8.2	0.63	1.19	34.30	29.59	8.30	30.10	618
风沙土	高 high	12.58	8.3	0.36	0.89	31.50	14.00	8.50	35.30	682
Wind sand	低 1 Low 1	6.31	6.4	0.40	0.82	25.06	13.23	8.94	10.10	464
soil	低 2 Low 2	10.41	3.2	0.14	0.71	12.60	13.48	8.69	39.80	191
褐土	高 high	38.75	17.9	1.43	1.42	99.40	30.07	8.06	95.60	1500
Drab soil	低 Low	37.64	16.5	1.09	1.33	76.30	28.13	8.30	121.3	1100
塿土	高 high	47.44	17.8	1.27	1.24	74.90	31.05	8.14	50.40	1255
Lou soil	低 Low	46.19	13.9	0.81	1.15	54.60	30.03	8.13	51.80	891

2 结果与讨论

2.1 土壤脲酶活性与尿素浓度的定量关系式

采用多种数学模型对 30℃时尿素浓度 (x)与土壤脲酶活性 (y)进行拟合,结果(表 2)发现, $y = \frac{a \times b \times x}{1 + b \times x}$ 模型的相关系数均大于 0.960^{*},达极显著相关,表明其可较好表征脲酶活性与尿素浓度间的定量关系。

此模型与描述土壤吸附解吸的 Langmuir 方程^[13]的形式相似,但在 Langmuir 吸附方程中, a 代表最大吸附量, b 为吸附强度, x 为添加溶液的平衡浓度, y 是一定浓度下的吸附量;而在此模型中 x 为添加尿素浓度, y 是以脲酶活性表征的尿素吸附量,故 y 的含义不同于一般酶活性,称为土壤表观脲酶活性。相应 a 为最大表观脲酶活性,意

分为高、低 2 个肥力水平〔表 1,表中脲酶活性测定温度为 37℃,尿素浓度 10%,单位为 μg/(g 土 × h)〕。

试验方法 5.00 g 土样加入 1 ml 甲苯, 15 min 后添加 10 ml 不同浓度 (0.005、0.010、0.050 和 0.100 mol/L) 尿素溶液和 20 ml (pH 6.7) 柠檬酸缓冲液,不同温度水浴培养,定时取样测定脲酶活性。各处理重复 3 次,并设无土壤处理及无基质处理作为对照。

表 1 供试土样的理化性质及脲酶活性

义是与尿素浓度足够大时相对应的脲酶活性 (U_{max}),可作为土壤酶活性研究中的一个参数,有助于探讨一般试验中难以确定的最大脲酶活性特征值。因为在酶促反应中,随尿素浓度的增加,酶活性中心饱和度增大,酶活性升高。但由于尿素饱和是一个渐进过程,加之土壤结构、酶结构及构象等存在的对尿素的位阻效应,很难完全饱和脲酶活性中心,同时产物的形成等又会抑制酶促反应,故在试验中很难得到某一条件下的最大脲酶活性,而通过它们的定量关系式可解决此问题。

从机理上分析,土壤脲酶大部分是以吸附态固定在土壤有机无机复合体上^[1],作为底物的尿素只有吸附到土壤颗粒上并和活性部位结合才能完成整个酶促反应,即脲酶复合体与尿素间存在着吸附机制,因此此模型是合理可行的。

表 2 还显示土壤脲酶的 $U_{\max}$ 与 $V_{\max}$ 变化规律^[11]相似,其相关系数为 0.938^{*},表明 $U_{\max}$ 具有表征脲酶动力学 $V_{\max}$ 参数的作用。其原因可从米氏方程进行分析, $V_0 = V_{\max} [S] / K_m + [S]$ 可转化为 $V_0 = \{V_{\max} \times 1 / K_m \times [S]\} / \{1 + 1 / K_m \times [S]\}$, 与 Langmuir 方程 $q = q_{\max} \cdot bc / (1 + bc)$ ($u = U_{\max} \cdot bc / (1 + bc)$) 形式相似,其中 $b = 1 / K_m$ 反映出米氏方程实际上是以 $V_0 - [S]$ 形式表征尿素被脲酶

复合体吸附所显示的脲酶活性 (u) 与底物浓度 $[S]$ 关系的方程,即米氏方程虽属经典酶动力学方程,实际上包含吸附方程的基本特征,而 Langmuir 方程也具有表征酶动力学特征的作用,显然 $V_0 - [S]$ 与 $u - [S]$ 两方程差异的关键在于前述 V_0 是脲酶酶促反应初速度,而 u 则是平均脲酶活性,亦佐证了模型应用的合理性。

表 2 供试土样脲酶的拟合结果 (30℃)

Table 2 The soil urease regression results of soils tested

土样 Soil sample	肥力水平 Fertility	$U_{\max}$	相关系数 Correlation coefficients		$V_{\max}^*$ mmol/L [°] g [°] h
			R1	R2	
水稻土 Paddy soil	高 high	71.699	0.999	0.996	0.039
	低 Low	81.631	0.999	0.997	0.057
黄褐土 Yellow cinnamon soil	高 1 high 1	37.123	0.997	0.986	0.023
	高 2 high 2	38.619	0.999	0.997	0.017
	高 3 high 3	36.544	1.000	0.999	0.043
	低 Low	31.553	0.994	0.971	0.017
黄绵土 Loess soil	高 high	203.822	0.998	0.996	0.081
	低 1 Low 1	146.456	0.992	0.981	0.056
	低 2 Low 2	116.832	0.996	0.988	0.057
黑垆土 Regur soil	高 high	210.780	0.994	0.985	0.102
	低 1 Low 1	143.814	0.997	0.992	0.071
	低 2 Low 2	161.343	0.995	0.988	0.068
风沙土 Wind sand soil	高 high	69.120	1.000	0.999	0.033
	低 1 Low 1	53.880	0.997	0.989	0.024
	低 2 Low 2	26.400	0.982	0.934	0.014
褐土 Drab soil	高 high	367.291	0.998	0.995	0.142
	低 Low	290.173	1.000	0.999	0.115
瘠土 Lou soil	高 high	345.104	0.997	0.992	0.173
	低 Low	229.898	0.996	0.990	0.117

2.2 供试土样的最大表观脲酶活性

表 3 显示,供试土样的最大表观脲酶活性值差异明显,如 40℃ 时,陕南地区的高肥力水稻土脲酶 $U_{\max}$ 值为 120.74^μg/(g土[°]h),低肥力水稻土比高肥力的高 15.10%,而低肥力黄褐土的 $U_{\max}$ 值仅为高肥力水稻土的 44.04%;关中、陕北地区最高的 $U_{\max}$ 值为高肥力褐土 412.78^μg/(g土[°]h),低肥力风沙土最低为 59.52^μg/(g土[°]h),二者相差 6.94 倍,高、低肥力土样 $U_{\max}$ 值均呈现褐土>瘠土>黑垆土、黄绵土>风沙土的规律性变化。

由表 3 还看出,除黄褐土和水稻土外,同一土壤类型中其余土样脲酶 $U_{\max}$ 值高肥力大于低肥力,表明高肥力土样含有较高的有机质和粘粒含量等,是吸附固定脲酶的数量较多所致^[1];初步揭示出脲酶的 $U_{\max}$ 与土壤肥力关系密切。随温度升高,土壤最大表观脲酶活性增加,这主要是,一方

面土壤脲酶的热稳定性较高,另一方面温度改变了土壤脲酶分子的三级结构,加速了脲酶酶促反应的速度^[15]。

2.3 土壤最大表观脲酶活性与肥力关系

为进一步探讨最大表观脲酶活性 $U_{\max}$ 与土壤肥力的关系,对其与土壤理化性质、脲酶活性 (37℃) 进行相关分析。结果(表 4,表中陕南地区:自由度为 $n - 2 = 4$, $r_{0.05} = 0.811$, $r_{0.01} = 0.917$;关中、陕北地区:自由度为 $n - 2 = 11$, $r_{0.05} = 0.553$, $r_{0.01} = 0.684$;供试土壤:自由度为 $n - 2 = 17$, $r_{0.05} = 0.456$, $r_{0.01} = 0.575$)表明,在 10~40℃ 范围内,所有供试土壤的 $U_{\max}$ 仅与脲酶活性、全磷呈极显著相关,而与其它土壤的肥力因子相关性不显著。

但当将供试土样以秦岭为界,考虑土壤所处的生态环境,划分为陕南和关中、陕北两地区后,相关分析发现,陕南地区土样(秦岭以南)除 20℃ 和 30℃ 外, $U_{\max}$ 与有机质、全氮、碱解氮、全磷、脲

表 3 供试土壤脲酶的 $U_{\max}$
Table 3 The urease activity $U_{\max}$ of soils tested

土样 Soil sample	肥力水平 Fertility	温度 (°C) Temperature			
		10	20	30	40
水稻土 Paddy soil	高 high	56.38	57.40	71.70	120.74
	低 Low	53.97	51.63	81.63	142.21
黄褐土 Yellow cinnamon soil	高 1 high 1	28.44	34.90	37.12	58.74
	高 2 high 2	36.20	58.56	68.62	78.14
	高 3 high 3	37.05	45.44	56.54	68.34
	低 Low	33.12	37.17	41.55	53.17
黄绵土 Loess soil	高 high	111.24	152.90	203.82	184.57
	低 1 Low 1	85.63	107.94	146.46	134.44
	低 2 Low 2	99.42	111.83	116.83	164.41
黑垆土 Regur soil	高 high	105.00	111.60	210.78	207.24
	低 1 Low 1	100.08	107.80	143.81	177.27
	低 2 Low 2	103.92	106.36	136.34	135.44
风沙土 Wind sand soil	高 high	49.62	64.37	69.12	82.02
	低 1 Low 1	45.66	53.57	53.88	64.86
	低 2 Low 2	26.40	29.35	42.78	59.52
褐土 Drab soil	高 high	173.04	300.66	367.29	412.78
	低 Low	120.66	154.23	290.17	285.06
瘠土 Lou soil	高 high	146.10	133.62	312.10	345.14
	低 Low	94.74	97.38	229.90	280.08

酶活性呈显著或极显著正相关,关中、陕北地区土样(秦岭以北)则与土壤物理性粘粒含量、有机质、全氮、碱解氮、阳离子代换量、pH呈极显著相关,其中pH为负相关。表明在不同生态区中,由于土壤所处环境的巨大差异,加之土壤成土过程和因素中,气候(南方多雨潮湿,北方干旱少雨)、土壤母质等造成土壤性质包括土壤粘土矿物^[16]、粘粒的种类数量、微生物区系等产生明显差异,使得黄褐土和水稻土为酸性土壤,粘土矿物主要以水云母—蛭石—高岭石为主。关中陕北地区土壤为石

灰性碱性土壤,粘土矿物主要是水云母—蛭石。同时由于不同粘土矿物(蒙脱石、高岭石、蛭石、水云母等)对土壤酶的吸附能力和数量有明显差别^[5,6],最终导致存在于土壤有机无机复合体上的酶活性特征截然不同,故在分析时须区分开才能获得较好的结果。

此外,在同一生态区中,土壤最大表观脲酶活性与土壤理化性质等关系极为密切,可作为土壤肥力指标之一。

表 4 脲酶 $U_{\max}$ 与土壤因子的相关系数(r)
Table 4 The correlation coefficients between urease $U_{\max}$ and soil properties

温度 Temperature	地区 Region	物理性粘粒 Physical clay	有机质 O. M	全氮 Total N	碱解氮 Available N	全磷 Total P	阳离子 交换量 CEC	pH	CaCO ₃	脲酶活性 Urease activity
10°C	陕南 South	0.356	0.969	0.959	0.976	0.954	-0.081	-0.700	-	0.957
	关中陕北 Middle and north	0.689	0.858	0.934	0.868	0.923	0.857	-0.842	0.486	0.788
	供试土壤 Soil tested	-0.021	0.233	0.308	0.182	0.917	0.102	0.420	-	0.911
20°C	陕南 South	0.356	0.969	0.712	0.606	0.652	-0.011	-0.444	-	0.706
	关中陕北 Middle and north	0.499	0.766	0.847	0.870	0.825	0.621	-0.697	0.568	0.744
	供试土壤 Soil tested	-0.054	0.201	0.290	0.215	0.827	0.063	0.351	-	0.868
30°C	陕南 South	-0.081	0.788	0.809	0.736	0.742	-0.492	-0.359	-	0.812
	关中陕北 Middle and north	0.769	0.937	0.968	0.944	0.856	0.768	-0.832	0.494	0.864
	供试土壤 Soil tested	-0.076	0.273	0.342	0.233	0.857	0.123	0.361	-	0.952
40°C	陕南 South	0.383	0.961	0.964	0.898	0.936	-0.014	-0.466	-	0.958
	关中陕北 Middle and north	0.757	0.655	0.961	0.921	0.804	0.757	-0.823	0.459	0.868
	供试土壤 Soil tested	0.146	0.374	0.449	0.334	0.844	0.179	0.281	-	0.930

3 结 论

综上所述,土壤脲酶活性与底物浓度间的关系可采用 Langmiur模型予以定量表征,表明酶促反应中存在吸附机制,并得到了土壤最大表现脲酶活性值 ($U_{\max}$)这一参数,其是当尿素浓度极大时的脲酶活性;除水稻土和黄褐土外高肥力土壤的 $U_{\max}$ 大于低肥力;在不同生态环境中土壤脲酶特征截然不同,只有在同一生态区中 $U_{\max}$ 才与土壤肥力因子显著或极显著相关,可作为土壤肥力的指标之一。

参 考 文 献:

[1] Terman G L. Volatilization losses of nitrogen as ammonia from surface applied fertilizers, organic amendments and crop residues[J]. *Advances in Agronomy*, 1979, 31: 189~223.

[2] Pettit N M, Smith A R, Freedman R B, *et al.* Soil urease activity, stability and kinetic properties [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1976, 8: 479~ 484.

[3] Ber V, Brar S S. Urease activity in subtropical alkaline soils of India[J]. *Soil Sci.*, 1978, 126: 330~ 335.

[4] 关松荫.我国主要土壤剖面酶活性状况 [J]. *土壤学报*, 1984, 21: 368~ 381.

[5] Manunza B, Deiana S, Pintore M, *et al.* The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phos-

phoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study [J]. *Soil Biol& Biochem*, 1999, 31: 789~ 796.

[6] Gianfreda L, Rao M A, Violante A. Adsorption, activity and kinetic properties of urease on montmorillonite aluminium hydroxide and $Al(OH)_3$ Montmorillonite complexes [J]. *Soil Biol. & Biochem*, 1992, 24(1): 51~ 58.

[7] Lai C M, Tabatabai M A. Kinetic parameters of immobilized urease [J]. *Soil Biol & Biochem*, 1992, 24(3): 225~ 228.

[8] 和文祥,朱铭莪,童江云,等.有机肥对土壤脲酶活性特征的影响.西北农业学报, 1997, 6(2): 73~ 75.

[9] 韦革宏,和文祥,毕银丽,等.不同条件下脲酶磁效应研究.西北农业学报, 1999, 8(2): 94~ 96.

[10] 陈会明,马耀华,和文祥,等.外源铜作用下土壤脲酶活性与缓冲性及时间关系的模型研究.西北农业学报, 2000, 9(3): 59~ 62.

[11] 南京农学院主编.土壤农化分析 [M].北京: 农业出版社, 1982.

[12] 关松荫.土壤酶及其研究方法 [M].北京: 农业出版社, 1987. 274~ 328.

[13] 蒋以超,张一平编著.土壤化学过程的物理化学 [M].北京: 中国科技出版社, 1993. 347~ 362.

[14] 和文祥,朱铭莪.陕西土壤脲酶活性与土壤肥力关系研究 II 土壤脲酶的动力学特征 [J]. *土壤学报*, 1997, 34(1): 42~ 52.

[15] Moyo C C, Kissel D E, Cabrera M L. Temperature effects in soil urease activity [J]. *Soil Biol& Biochem*, 1989, 21: 935~ 938.

[16] 中国科学院南京土壤研究所主编.中国土壤 [M].北京: 科学出版社, 1979.

(上接第 54页)

参 考 文 献:

[1] 殷震,刘景华著.动物病毒学(第二版) [M].北京: 科学出版社, 1997. 757~ 762.

[2] Sieglinde L, Friedrich L, Francois L *et al.* Anteraspan transmembrane protein, renders cdlls susceptible to canine distemper virus [J]. *Virol. Jan*, 1997.

[3] Appel M J G, Robson D S. A microneutralization test for canine distemper [J]. *Am J Vet Res*, 1973, 34: 1459~ 1463.

[4] Potgieter L N, Ajidagba P A. Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using protein A and monoclonal antibody capture [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1989, 1: 110~ 115.

[5] Wright N G, Cornwell H J, Thompson H J, *et al.* Canine

distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis [J]. *Vet Rese.*, 1974, 94: 86~ 92.

[6] 袁书智,夏咸柱.犬瘟热荧光抗体技术的应用研究 [J]. *中国兽医学报*, 1994, 14: 146~ 149.

[7] 刘鼎新,华国荫,李君阁,等.应用酶标 SPA 染色法对犬瘟热快速诊断的研究 [J]. *家畜传染病*, 1986, (1): 22~ 24.

[8] 乔贵林,夏咸柱.犬瘟热病毒抗体检测方法的比较研究 [J]. *中国兽医学报*, 1997, 17: 26~ 29.

[9] Chomczynski, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-choloroform extraction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156~ 159.

[10] Innis M A, Gelfand D H. PCR protocols: A guide in methods and applications [M]. Academic Press, INC, 1990. 3~ 12.