

# 脲酶抑制剂氢醌对土壤脲酶动力学行为的调控效应

隽英华<sup>1</sup>, 陈振华<sup>2</sup>, 张玉兰<sup>2</sup>, 张丽莉<sup>2</sup>, 陈利军<sup>2</sup>

(1. 辽宁省农业科学院植物营养与环境资源研究所, 辽宁 沈阳 110161;

2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 研究了不同温度条件下脲酶抑制剂氢醌 (HQ) 对东北 3 种典型土壤 (白浆土、棕壤、褐土) 脲酶动力学参数的影响。结果表明, 土壤类型、培养时间、培养温度及其相互作用均显著影响土壤脲酶动力学参数。与对照相比, 加入 HQ 使土壤脲酶米氏常数 ( $K_m$ ) 增加, 最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 降低, 表明 HQ 对土壤脲酶的作用机理属于混合型抑制。与白浆土相比, 棕壤和褐土脲酶动力学参数受 HQ 的影响程度较大, 表明高肥力土壤生物学活性较稳定。随着培养时间延长, 土壤脲酶  $K_m$  降低,  $V_{max}$  和  $V_{max}/K_m$  增加。随着温度升高, 土壤脲酶  $K_m$  和  $V_{max}$  增加,  $V_{max}/K_m$  无规律性变化。相关性分析表明, 土壤脲酶动力学参数  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $V_{max}/K_m$  与 pH 值、有机质、全氮、碱解氮和质地组成之间存在显著相关关系。

**关键词:** 混合型抑制; 动力学参数; 脲酶抑制剂; 脲酶

**中图分类号:** S154.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-6257 (2015) 04-0053-06

脲酶是土壤中与氮转化密切相关的一种水解酶<sup>[1]</sup>, 由于其具有调控尿素氮在土壤转化过程中的作用而受到广泛关注。到目前为止, 尿素氮转化的脲酶抑制剂调节被认为是最有前景的一种生物化学调控方法之一<sup>[1-2]</sup>。氢醌 (HQ) 作为一种酚类脲酶抑制剂, 能有效地抑制脲酶活性, 延缓尿素水解, 但由于易被氧化而大大影响了其应用前景。然而, 与其它脲酶抑制剂相比, HQ 的经济性和少量施入后对土壤污染小的优点显得尤为突出, 因而在调控尿素氮转化过程中仍受到了广泛关注, 但这多集中在抑制脲酶活性及延缓尿素水解等方面<sup>[3-5]</sup>, 有关其对土壤脲酶动力学特性影响的研究, 特别是温度对其抑制土壤脲酶动力学特征的影响鲜有报道。

研究土壤脲酶酶促反应动力学特征, 对于了解土壤中的尿素转化过程十分重要。同时, 土壤脲酶动力学参数不仅可以显示土壤中酶含量的高低, 而且可以反映酶与底物、有机-无机复合体之间的紧密程度及作用过程, 探索土壤酶的来源及其存在状

态以及各种外界因素对酶促反应不同阶段催化特性的影响, 因此土壤脲酶动力学参数被国内外学者认为是酶促反应动力学理想的研究指标<sup>[6-7]</sup>。目前, 关于土壤脲酶动力学特征的研究多集中在矿质颗粒、腐殖质等单因子影响的吸附态酶方面<sup>[8-9]</sup>, 而对多因素共同作用下的研究鲜有报道。为此, 以东北 3 种典型土壤为研究对象, 采用室内模拟研究了不同温度条件下脲酶抑制剂 HQ 对土壤脲酶动力学特征的影响, 以期揭示 HQ 对土壤脲酶的酶促反应机理。

## 1 材料与试验方法

### 1.1 试验地概况

供试土壤为白浆土、棕壤和褐土, 分别采自黑龙江八五三农场 (46°27'N, 132°56'E), 沈阳农业大学长期肥料试验田 (41°82'N, 123°57'E) 和辽宁朝阳土肥站试验田 (41°41'N, 120°33'E)。采样时, 先去除表层杂物, 五点法采集 5~20 cm 土样, 混匀, 风干, 磨碎并过 2 mm 筛, 保存备用。供试土样的基本理化性质见表 1。

### 1.2 试验设计

称取定量风干土 (<2 mm) 于培养皿中, 加入干土重量 15% 的蒸馏水 (一方面, 此含水量与取样时农田土壤含水量相近, 能够为土壤微生物功能的快速恢复创造有利的水分环境条件; 另一方面, 此含水量与培养试验水分含量有一个适当差距,

收稿日期: 2014-05-27; 最后修订日期: 2014-09-15

基金项目: 国家自然科学基金 (41301253); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划 (2014018); 辽宁省博士启动基金 (20121145)。

作者简介: 隽英华 (1979-), 男, 山东莒南人, 副研究员, 博士, 主要从事作物营养与土壤氮素转化的生物化学调控研究。E-mail: juanyong\_001@sohu.com。

表 1 供试土壤的理化性质

	白浆土	棕壤	褐土
pH 值	5.74	5.84	7.25
有机质 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	35.42	14.84	16.25
全氮 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	1.84	0.89	1.02
碱解氮 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	48.42	30.14	38.79
砂粒 (0.05 ~ 2 mm) (%)	16.6	29.0	45.4
粉粒 (0.002 ~ 0.05 mm) (%)	64.8	50.8	35.7
粘粒 (<0.002 mm) (%)	18.6	20.2	18.9
质地	粉壤土	粉壤土	砂壤土

有利于最终水分含量的调节), 待水分浸透均匀, 放入 25℃ 的恒温培养箱中恒温培养 21 d, 使其恢复生物学活性。预培养期间每天透气并补充损失的水分。

称取定量预培养土壤, 以溶液形式加入 HQ ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 以干土计), 混匀, 调节水分含量至 20% (取样时 3 种农田土壤含水量均在 20% 左右, 所以培养试验含水量定为 20%), 放入不同温度 (10、20、30℃) 的恒温培养箱中恒温培养, 在培养后的第 1、10 和 30 d 取样测定脲酶活性。培养期间每天补充水分并保持水分含量不变。

2014 年 2 月 15 日开始预培养土壤, 4 月 6 日全部试验结束。

### 1.3 测定指标及分析方法

#### 1.3.1 基本理化性质测定<sup>[10]</sup>

土壤全氮采用凯氏定氮法测定; 土壤碱解氮采用碱解扩散法测定; pH 值采用奥立龙 Model 868 pH 计测定 (水: 土 = 2.5: 1); 土壤质地采用比重计法测定; 有机质采用岛津总有机碳分析仪 (TOC - 5000A) 测定。

#### 1.3.2 脲酶活性测定

土壤脲酶活性采用尿素残留量法测定<sup>[11]</sup>。具

体方法为: 称取相当于 5 g 干土重的培养土壤 (< 2 mm), 放置于 150 mL 具塞三角瓶中, 加入 5 mL 不同浓度的尿素溶液 (5、10、15、25、35 和 45  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 混匀, 塞上瓶塞。在 37℃ 下恒温培养 5 h。培养结束后, 加入 50 mL  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl - 乙酸苯汞溶液, 盖上瓶塞后振荡 1 h, 过滤, 用连续流动分析仪测定尿素残留量, 进而计算脲酶活性。脲酶活性以单位时间内单位土壤水解尿素态氮的量来表示。每个处理重复 3 次。并设无土壤和无抑制剂两个对照。

#### 1.3.3 酶促反应动力学参数测定

米氏常数  $K_m$  和最大反应速率  $V_{max}$  可根据 Michaelis - Menten 方程转化形式 Lineweaver - Burk 法求得。Lineweaver - Burk 方程形式如下:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

以  $1/[V] \propto 1/[S]$  作图, 求出截距  $1/V_{max}$  和斜率  $K_m/V_{max}$ , 从而计算出  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

#### 1.4 数据处理及统计分析

所有数据采用 Excel 2000 和 SPSS 11.5 进行统计分析; 试验数值采用 Duncan's 法进行多重比较; 采用 GLIM (generalized linear interactive modeling) 进行多因素方差分析; 采用 Pearson 系数进行不同水平 ( $p < 0.01$  和  $p < 0.05$ ) 的相关分析; 数值采用平均值  $\pm$  标准差的形式表示。

## 2 结果与讨论

土壤脲酶动力学参数的多因素方差分析表明, 培养时间、培养温度、土壤类型及其交互作用对土壤脲酶动力学参数米氏常数 ( $K_m$ )、最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 和  $V_{max}/K_m$  均有极显著的影响 (表 2)。

表 2 土壤脲酶动力学参数的多因素方差分析

因素	$K_m$		$V_{max}$		$V_{max}/K_m$	
	F	P	F	P	F	P
A	10.654	0.000***	259.879	0.000***	72.403	0.000***
B	2858.566	0.000***	3513.402	0.000***	113.077	0.000***
C	97.352	0.000***	32.302	0.000***	77.577	0.000***
AB	7.355	0.000***	47.060	0.000***	20.104	0.000***
AC	6.042	0.000***	6.036	0.000***	9.418	0.000***
BC	48.844	0.000***	58.241	0.000***	101.380	0.000***
ABC	14.048	0.000***	7.555	0.000***	3.689	0.000***

注: A、B 和 C 分别代表培养时间、培养温度和土壤类型; \*\*\* 代表  $p < 0.001$ 。

## 2.1 米氏常数

米氏常数 ( $K_m$ ) 是表征酶与底物之间结合牢固程度的特征指标, 其随土壤类型、肥力高低而差异较大<sup>[6,12]</sup>。 $K_m$  值越小, 酶与底物结合越牢固, 酶促反应越容易发生<sup>[6]</sup>。与对照相比, HQ 在培养初期增加了  $K_m$  值 (表 3)。这是因为, 一方面, HQ 本身及其氧化产物 (苯醌) 通过作用于对酶促反应有重要作用的巯基 ( $-SH$ )<sup>[13]</sup>, 可与尿素竞争于脲酶的结合位点; 另一方面, 通过引起酶蛋白三级结构的改变而产生位阻效应, 阻碍了酶活性中心与底物的结合<sup>[14]</sup>。总体看来, 3 种对照土壤脲酶  $K_m$  值之间相差不大, 如不同温度条件下, 白浆土、棕壤和褐土脲酶  $K_m$  值分别在 61.99 ~ 248.15, 64.11 ~ 241.57 和 57.40 ~ 257.56  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间, 这是由于脲酶来源较单一 (微生物) 的缘故。

HQ 引起土壤脲酶  $K_m$  值的增加幅度因土壤类型而异。与对照相比, 在培养后第 1 d, 白浆土、棕壤和褐土脲酶  $K_m$  值在 10℃ 分别增加了 21.05%、27.69% 和 36.72%, 在 20℃ 分别增加了 15.31%、19.98% 和 17.81%, 在 30℃ 分别增加了 10.08%、21.11% 和 20.05%, 表明 HQ 在低肥力土壤 (棕壤、褐土) 引起  $K_m$  的增加幅度大于在高肥力土壤 (白浆土), 这也佐证了以前的研究结果<sup>[15]</sup>, 这是由于高肥力土壤中的有机质和粘粒引起的。一方面, 土壤有机质、粘粒吸附固定酶分子后, 可以减弱或避免土壤酶受外界不良环境条件的破坏, 即对酶有保护作用<sup>[16]</sup>; 另一方面, 土壤有机质、粘粒及一些离子等会对进入土壤的抑制剂分子产生吸附、固定等作用, 降低其对酶的影响, 即对抑制剂有高缓冲性<sup>[6]</sup>。除此以外, 白浆土的质地较重, 而棕壤和褐土的质地较轻 (表 1)。质地越轻, 土壤颗粒对酶分子的吸附性越弱, 土壤酶被破坏的可能性越大, 最终表现其相关特性在外界因素的影响下变化较大。

随着培养时间延长, 土壤脲酶  $K_m$  值降低, 大概在培养第 10 d 回到对照水平。表明在培养初期 HQ 对土壤脲酶的抑制作用较强, 大大阻碍了酶活性中心与底物的结合, 中间活化络合物的形成速率较慢; 随着培养时间延长, 由于 HQ 的氧化使其浓度逐渐减小, 迁移速率减慢, 同时引起微环境和微生物区系的变化导致其对脲酶的抑制作用减弱, 酶与底物的接触机率增加。HQ 处理土壤脲酶  $K_m$  值在整个培养过程中的变化情况还表明, HQ 对土壤脲酶的抑制效力大约持续 10 d, 但与环境因素有关系。

培养温度越高, (除褐土 30 d 时 20℃ 小于 10℃ 外) 土壤脲酶  $K_m$  值越大 (表 3)。这或许因为, 温度升高加快了酶分子的热运动<sup>[17]</sup>, 虽然增加了酶活性中心与底物分子之间的碰撞几率, 但却减少了中间活化络合物的形成; 也就是说, 温度升高对热运动的影响远远大于对亲合力的影响。

## 2.2 最大反应速率

最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 可表征酶-底物复合体解离为酶和产物的速率<sup>[7,12]</sup>。由表 3 可以看出, 抑制剂 HQ 对土壤脲酶  $V_{max}$  的影响过程因土壤类型、培养时间和培养温度而异。与对照相比, 除白浆土 20℃ 的 10 d、30 d、30℃ 的 30 d, 棕壤 20℃ 的 10 d 和褐土 20℃ 的 10 d、30 d 外, HQ 使土壤脲酶  $V_{max}$  值降低, 表明添加 HQ 能有效降低酶促反应速率, 这是因为抑制剂与底物竞争于脲酶的活性中心而减缓了酶-底物复合体形成和解离。

土壤脲酶  $V_{max}$  值的变化受土壤类型的影响。在 10℃ 和 20℃ 时, 3 种土壤脲酶  $V_{max}$  值相差不大, 而在 30℃ 时, 白浆土脲酶  $V_{max}$  值大于棕壤和褐土。表明, 在低温条件下 (<20℃), 温度对土壤脲酶动力学特性的影响起主导作用。随着温度升高, 土壤类型的作用强度逐渐显现, 且高肥力土壤 (白浆土) 脲酶  $V_{max}$  值大于低肥力土壤 (棕壤、褐土)。这是因为, 一方面, 高肥力土壤含有较好的营养条件, 为微生物提供了充足的碳、氮源, 促进了微生物的繁殖, 使其分泌到土壤中的酶量增多<sup>[18]</sup>; 另一方面, 高肥力土壤的有机质和粘粒能够吸附的酶量较多, 最终表现为有较高保护酶活性的能力<sup>[19]</sup>。

除棕壤 20℃ 的 30 d 小于 10 d 外, 土壤脲酶  $V_{max}$  值随着培养时间延长而增大, 表明 HQ 对土壤脲酶的抑制作用逐渐减弱。在培养的第 30 d, 除白浆土 20、30℃, 褐土 20℃ 外, HQ 处理土壤脲酶  $V_{max}$  值仍略小于对照土壤, 这是由于抑制剂的转化产物残留在土壤中对脲酶起作用的缘故。

温度对土壤脲酶  $V_{max}$  值有显著的正影响 (表 3)。这是因为, 一方面, 温度升高加剧了酶分子的热运动<sup>[17]</sup>, 进而降低了酶活性中心与底物分子形成复合体时的能级障碍<sup>[20]</sup>; 另一方面, 温度升高加快了 HQ 的分解转化, 减弱了其对脲酶的抑制作用, 加快了酶-底物复合体的形成和解离。

## 2.3 最大反应速率/米氏常数

最大反应速率/米氏常数 ( $V_{max}/K_m$ ) 是衡量酶催化能力的重要指标<sup>[6]</sup>。从表 3 看出, 与对照相

表 3 土壤脲酶的动力学参数

	10°C						20°C						30°C					
	CK		HQ		CK		HQ		CK		HQ		CK		HQ			
	1 d	30 d	10 d	30 d	1 d	30 d	10 d	30 d	1 d	30 d	10 d	30 d	1 d	30 d	10 d	30 d		
<i>K<sub>m</sub></i>	白浆土	61.99 <sup>aA</sup> (5.19)	75.04 <sup>abB</sup> (6.31)	67.92 <sup>bAB</sup> (7.64)	62.68 <sup>abA</sup> (4.53)	101.89 <sup>bAB</sup> (9.07)	117.49 <sup>aB</sup> (11.98)	91.44 <sup>bA</sup> (7.40)	95.70 <sup>aB</sup> (18.10)	248.15 <sup>aA</sup> (8.44)	275.00 <sup>aB</sup> (12.01)	222.54 <sup>aA</sup> (23.59)	237.23 <sup>aA</sup> (17.96)					
	棕壤	64.11 <sup>aA</sup> (5.95)	81.86 <sup>bB</sup> (3.81)	61.47 <sup>bA</sup> (15.93)	58.06 <sup>abA</sup> (5.26)	137.42 <sup>cA</sup> (7.79)	164.78 <sup>bC</sup> (1.88)	151.02 <sup>cB</sup> (7.04)	146.21 <sup>bA</sup> (6.71)	241.57 <sup>aA</sup> (5.46)	292.57 <sup>aB</sup> (11.34)	253.45 <sup>aAB</sup> (12.83)	262.87 <sup>aB</sup> (9.80)					
	褐土	57.40 <sup>aA</sup> (1.84)	78.48 <sup>bB</sup> (3.46)	63.07 <sup>bA</sup> (3.29)	66.43 <sup>bA</sup> (4.28)	76.79 <sup>aA</sup> (4.43)	90.47 <sup>aB</sup> (3.74)	73.12 <sup>aA</sup> (8.53)	62.34 <sup>aA</sup> (10.74)	257.56 <sup>aA</sup> (8.78)	310.41 <sup>bB</sup> (9.23)	255.39 <sup>aA</sup> (12.02)	252.54 <sup>aA</sup> (20.46)					
	白浆土	264.33 <sup>aC</sup> (2.56)	204.27 <sup>bA</sup> (7.14)	240.75 <sup>abB</sup> (7.36)	245.95 <sup>aB</sup> (11.81)	471.73 <sup>aB</sup> (27.61)	300.36 <sup>aA</sup> (10.34)	479.58 <sup>aB</sup> (27.04)	479.73 <sup>aB</sup> (29.22)	1157.41 <sup>bC</sup> (80.19)	738.89 <sup>bA</sup> (24.06)	997.22 <sup>bB</sup> (70.01)	1239.39 <sup>bC</sup> (52.49)					
	棕壤	267.58 <sup>aB</sup> (4.43)	223.12 <sup>cA</sup> (13.51)	253.49 <sup>bB</sup> (9.41)	262.51 <sup>aB</sup> (9.26)	519.36 <sup>abB</sup> (40.14)	347.56 <sup>bA</sup> (7.73)	542.55 <sup>bC</sup> (30.51)	514.00 <sup>abB</sup> (11.47)	1090.74 <sup>bC</sup> (35.28)	698.42 <sup>abA</sup> (27.49)	790.60 <sup>aA</sup> (37.01)	914.14 <sup>aB</sup> (83.45)					
	褐土	259.83 <sup>aC</sup> (5.77)	177.53 <sup>aA</sup> (1.81)	228.39 <sup>aB</sup> (4.35)	253.21 <sup>aC</sup> (3.20)	556.63 <sup>bB</sup> (17.06)	445.10 <sup>dA</sup> (11.91)	576.91 <sup>cB</sup> (22.73)	562.39 <sup>cB</sup> (23.91)	941.13 <sup>aB</sup> (51.05)	637.75 <sup>aA</sup> (45.48)	842.51 <sup>aB</sup> (64.82)	927.52 <sup>aB</sup> (86.74)					
<i>K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub></i>	白浆土	4.33 <sup>aB</sup> (0.67)	2.28 <sup>aA</sup> (0.24)	2.75 <sup>aA</sup> (0.16)	2.41 <sup>aA</sup> (0.29)	4.64 <sup>bB</sup> (0.16)	2.57 <sup>bA</sup> (0.18)	5.28 <sup>bB</sup> (0.42)	5.10 <sup>bB</sup> (0.69)	4.66 <sup>bC</sup> (0.16)	2.69 <sup>aA</sup> (0.13)	4.49 <sup>bC</sup> (0.22)	3.92 <sup>abB</sup> (0.24)					
	棕壤	4.20 <sup>aA</sup> (0.37)	3.34 <sup>aA</sup> (0.92)	3.68 <sup>abA</sup> (0.66)	3.37 <sup>bA</sup> (0.11)	3.78 <sup>aB</sup> (0.12)	2.12 <sup>aA</sup> (0.10)	3.59 <sup>aB</sup> (0.06)	3.79 <sup>abB</sup> (0.13)	4.17 <sup>abC</sup> (0.05)	2.56 <sup>aA</sup> (0.03)	3.13 <sup>aB</sup> (0.29)	3.48 <sup>aB</sup> (0.28)					
	褐土	4.66 <sup>abB</sup> (0.90)	3.04 <sup>aA</sup> (0.22)	3.13 <sup>aA</sup> (0.15)	3.83 <sup>bAB</sup> (0.30)	7.26 <sup>cAB</sup> (0.39)	6.33 <sup>cA</sup> (0.41)	7.93 <sup>cBC</sup> (0.60)	9.16 <sup>cC</sup> (1.23)	3.65 <sup>aB</sup> (0.06)	2.41 <sup>aA</sup> (0.24)	3.31 <sup>aB</sup> (0.10)	3.67 <sup>abB</sup> (0.12)					

注:  $K_m$  和  $V_{max}$  单位分别为  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和水解尿素态氮  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 同一列数据后不同小写字母表示处理间差异达 5% 显著水平 (邓肯检验); 括号中数据为动力学参数标准偏差。同一行数据后不同大写字母表示处理间差异达 5% 显著水平 (邓肯检验)。

比, HQ 在培养初期降低了  $V_{max}/K_m$ , 表明在施用初期 HQ 能够降低土壤脲酶的酶催化能力, 这是由于 HQ 引起  $K_m$  增加和  $V_{max}$  降低共同作用的结果。

HQ 处理土壤脲酶  $V_{max}/K_m$  受土壤类型和培养温度影响无规律性变化, 这是因为在土壤这一复杂的异质体系中, 酶-底物复合体的解离和酶与底物之间的亲合力发生非同步变化的结果。随着培养时间延长, 土壤脲酶  $V_{max}/K_m$  值增加, 表明脲酶的酶催化强度逐渐增大, 这是由于土壤中 HQ 含量的降低导致对脲酶的抑制作用减弱引起的。

#### 2.4 土壤脲酶动力学参数与土壤理化性质的相关关系

从土壤类型角度分析土壤脲酶动力学参数与土壤理化性质的相关关系, 结果表明 (表 4), 白浆土脲酶动力学参数  $K_m$  在 10℃ 时与有机质、全氮、碱解氮和粘粒含量呈极显著负相关, 而在 20℃ 和 30℃ 时与理化性质没有显著负相关; 棕壤 30℃ 和褐土 20~30℃ 脲酶动力学参数  $K_m$  与理化性质没有显

著相关。

土壤脲酶动力学参数  $V_{max}$  与 pH 值呈正相关, 与粉粒含量呈显著或极显著负相关 (棕壤 30℃ 未达显著水平), 而与碱解氮、砂粒含量 (棕壤 30℃ 除外) 和粘粒含量呈正相关。说明, 作为土壤氮库中的重要组成部分, 碱解氮也能对与氮转化有关的脲酶的酶促反应速率产生正向影响。土壤脲酶动力学参数  $V_{max}/K_m$  在 10℃ 时与白浆土、褐土碱解氮、粘粒含量呈极显著正相关, 与棕壤碱解氮、粘粒含量呈正相关。与砂粒含量呈负相关, 而与有机质、全氮呈正相关; 白浆土在 30℃ 时与理化性质没有显著相关性。

土壤脲酶动力学参数与土壤理化性质的相关性表明, 土壤脲酶动力学参数  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $V_{max}/K_m$  与土壤理化性质密切相关, 可以作为评价土壤肥力高低的指标; 同时也佐证了在分析不同土壤类型的动力学参数时, 各种类型土壤有其固定的脲酶活性水平, 分析时应区分开来。

表 4 土壤脲酶动力学参数与土壤理化性质的相关分析

		10℃			20℃			30℃		
		白浆土	棕壤	褐土	白浆土	棕壤	褐土	白浆土	棕壤	褐土
$K_m$	pH 值	0.281	0.532	-0.135	-0.234	-0.799**	-0.343	0.628*	-0.053	-0.265
	有机质	-0.789**	-0.500	-0.582*	0.393	0.009	0.455	-0.191	0.258	0.207
	全氮	-0.728**	-0.517	-0.504	0.388	-0.041	0.392	-0.128	0.290	0.135
	碱解氮	-0.831**	-0.194	-0.621*	0.092	-0.397	0.417	-0.196	0.055	0.010
	砂粒	0.724**	0.690*	0.278	-0.406	-0.397	-0.530	0.514	-0.199	-0.252
	粘粒	-0.813**	-0.054	-0.578*	0.034	-0.446	0.515	-0.349	-0.114	0.027
	粉粒	-0.281	-0.754**	0.162	0.532	0.728**	0.388	-0.408	0.340	0.287
$V_{max}$	pH 值	0.518	0.595*	0.715**	0.532	0.372	0.436	0.772**	0.557	0.618*
	有机质	0.146	-0.021	0.008	-0.281	-0.261	-0.316	-0.120	0.460	-0.045
	全氮	0.134	-0.016	0.000	-0.310	-0.328	-0.376	-0.127	0.460	-0.087
	碱解氮	0.560	0.400	0.445	0.159	0.147	0.094	0.299	0.786**	0.362
	砂粒	0.138	0.306	0.359	0.460	0.401	0.459	0.511	-0.065	0.359
	粘粒	0.659*	0.500	0.562	0.347	0.319	0.302	0.345	0.809**	0.489
	粉粒	-0.601*	-0.682**	-0.784**	-0.765**	-0.729**	-0.738**	-0.868**	-0.445	-0.751**
$V_{max}/K_m$	pH 值	0.011	-0.358	0.376	0.440	0.592*	0.627*	0.256	0.534	0.657*
	有机质	0.697**	0.469	0.511	-0.418	-0.181	-0.587*	0.017	0.387	-0.107
	全氮	0.639*	0.487	0.449	-0.426	-0.206	-0.570	-0.038	0.380	-0.121
	碱解氮	0.880**	0.313	0.709**	0.0003	0.269	-0.269	0.411	0.737**	0.329
	砂粒	-0.501	-0.594*	-0.129	0.518	0.443	0.774**	0.107	-0.028	0.413
	粘粒	0.870**	0.203	0.722**	0.145	0.404	-0.206	0.574	0.795	0.436
	粉粒	-0.036	0.524	-0.399	-0.745**	-0.809**	-0.848**	-0.513	-0.489	-0.782**

注: \* 和 \*\* 分别代表  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ 。

### 3 结论

综上所述, 脲酶抑制剂 HQ 对土壤脲酶动力学参数的影响因土壤类型、培养时间和培养温度而

异。与对照相比, HQ 使土壤脲酶  $K_m$  值增加,  $V_{max}$  值降低, 表明 HQ 对土壤脲酶的作用机理属于混合型抑制。与高肥力土壤 (白浆土) 相比, 低肥力土壤 (棕壤、褐土) 对 HQ 抑制土壤脲酶动力

学参数的影响程度较大,表明在低肥力土壤上施用氢醌能够取得较好的脲酶抑制效果。培养时间对土壤脲酶  $K_m$  有负向影响,而对  $V_{max}$  和  $V_{max}/K_m$  则有正向影响。随着温度升高,土壤脲酶  $K_m$  和  $V_{max}$  显著增大。土壤脲酶  $K_m$  与有机质、全氮、碱解氮和粘粒含量呈极显著负相关,与  $V_{max}/K_m$  的相关性正好与此相反; $V_{max}$  与 pH 值呈显著正相关,与粉粒含量呈显著负相关。可见,土壤脲酶动力学参数与土壤理化性质密切相关,可以作为评价土壤肥力高低的指标。

### 参考文献:

- [1] Byrnes B H, Freney J. Recent development on the use of urease inhibitor in the tropics [J]. *Fertility Research*, 1995, 42 (1/3): 251-259.
- [2] Sanz-Cobena A, Misselbrook T H, Arce A, et al. An inhibitor of urease activity effectively reduces ammonia emissions from soil treated with urea under Mediterranean conditions [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2008, 126 (3-4): 243-249.
- [3] 汤树德,徐凤花,隋文志,等.脲酶抑制剂氢醌对土壤脲酶活性,氨挥发和硝化的抑制动态 [J]. *生物技术*, 1993, 3 (1): 32-36.
- [4] 徐星凯,周礼恺, Van Cleemput O. 脲酶抑制剂/硝化抑制剂对土壤中尿素氮转化及形态分布的影响 [J]. *土壤学报*, 2000, 37 (3): 339-345.
- [5] 王玉琪,李瑞红,巫光宏,等.脲酶抑制剂氢醌对小白菜光合特性和氮代谢的影响 [J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 27 (1): 36-38.
- [6] 和文祥,朱铭菽. 陕西土壤脲酶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.
- [7] 杨春璐,孙铁珩,和文祥,等.温度对汞抑制土壤脲酶动力学影响研究 [J]. *环境学报*, 2007, 28 (2): 278-282.
- [8] 陈利军,史奕,李荣华,等.脲酶抑制剂和硝化抑制剂的协同作用对尿素氮转化和  $N_2O$  排放的影响 [J]. *应用生态学报*, 1995, 6 (4): 368-372.
- [9] 隽英华,陈利军,武志杰,等. N-丁基磷酰三胺对淹水土壤脲酶动力学特征的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2012, (2): 18-22.
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [11] Tabatabai M A. Soil enzymes [A]. Weaver R W, Angle J R, Bottomley P S. *Methods of soil analysis. Part 2: microbiological and biochemical properties* [M]. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1994. 775-833.
- [12] Juan Y H, Chen L J, Wu Z J, et al. Kinetics of soil urease affected by urease inhibitors at contrasting moisture regimes [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2009, 9 (2): 125-133.
- [13] Van Cleemput O, Wang Z P. Urea transformation and urease inhibitors [J]. *Trends in Soil*, 1991, 1: 45-52.
- [14] Ciurli S, Marzadori C, Benini S, et al. Urease from the soil bacterium *Bacillus Pasteurii*: immobilization on Ca-polygalacturonate [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28 (6): 811-817.
- [15] 隽英华,陈利军,武志杰,等.氢醌对淹水土壤脲酶动力学特征的影响 [J]. *土壤通报*, 2011, 42 (5): 1120-1124.
- [16] 和文祥,蒋新,朱茂旭,等.甲苯对矮土脲酶活性影响的实验研究 [J]. *环境科学*, 2001, 22 (6): 91-94.
- [17] Lai C M, Tabatabai M A. Kinetic parameters of immobilized urease [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24 (3): 225-228.
- [18] 和文祥,朱铭菽. 陕西土壤脲酶与土壤肥力关系分析 [J]. *土壤学报*, 1997, 34 (4): 392-398.
- [19] 和文祥,韦革宏,武永军,等.汞对土壤酶活性的影响 [J]. *中国环境科学*, 2001, 21 (3): 279-283.
- [20] Carmona G, Christianson C B, Byrnes B H. Temperature and low concentration effects of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) on ammonia volatilization from urea [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, 2: 933-937.

### Regulation effects on soil urease kinetics as affected by urease inhibitor hydroquinone

JUAN Ying-hua<sup>1</sup>, CHEN Zhen-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yu-lan<sup>2</sup>, ZHANG Li-li<sup>2</sup>, CHEN Li-jun<sup>2</sup> (1. Institute of Plant Nutrition and Environmental Resources, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang Liaoning 110161; 2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang Liaoning 110016)

**Abstract:** The effect of urease inhibitor quinhydrone (HQ) on kinetic parameters of urease in three typical soils (i. e. albic soil, brown soil, cinnamon soil) in Northeast China under different temperature conditions. The results showed that, soil type, incubation time, incubation temperature and their interactions significantly influenced soil urease kinetics. Compared with control,  $K_m$  increase and  $V_{max}$  decrease in the soils with HQ and it showed HQ was mixed inhibition to soil urease. Compared with albic soil, in brown soil and cinnamon soil the influence on kinetic parameters of soil urease as affected by HQ was greater, which indicated that high fertility soils could have stable biological characteristics. With incubation time increasing,  $K_m$  decreased, but  $V_{max}$  and  $V_{max}/K_m$  increased. With incubation temperature increasing,  $K_m$  and  $V_{max}$  increased,  $V_{max}/K_m$  changed irregularly. Statistical analysis indicated that,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $V_{max}/K_m$  of soil urease had significantly correlations with pH, organic matter, total nitrogen, alkali-hydrolyzed nitrogen and texture structure.

**Key words:** mixed inhibition; kinetic parameters; urease inhibitor; urease