

棉酚渣对尿素水解及土壤氨挥发的影响

陈 敏¹, 李高生², 冼建鸿², 王 炜², 阎 晶², 董倩雯², 卢其明^{2*}

(1. 华南农业大学公共基础课实验教学中心, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学材料与能源学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 采用棉酚渣、尿素和土壤混合培养, 测定剩余尿素量及氨气吸收量的方法, 探究棉酚渣对尿素水解及土壤氨挥发的影响。结果表明, 随尿素中棉酚渣的用量增加, 尿素残余量增加, 氨气检测量减少。与对照相比, 培养时间为 4 d 时尿素残留差异率达 78.81%, 氨气挥发抑制率可达 80.40%。土壤含水率变化对脲酶和产生脲酶的微生物的活性有较大影响, 在活性高时, 棉酚渣对尿素水解和氨挥发的抑制作用更加明显。随着培养温度的升高, 尿素水解增加, 氨挥发迅速增加。35℃时, 棉酚渣对尿素水解的抑制效果最好, 尿素残留差异率达 79.72%, 30℃时, 棉酚渣对氨气挥发抑制效果最好, 氨挥发抑制率达 55.34%。上述结果表明, 棉酚渣对尿素水解及土壤氨挥发具有较强的抑制作用, 具有推广应用的潜力。

关键词: 棉酚渣; 尿素水解; 氨挥发; 土壤脲酶; 脲酶抑制作用

尿素是目前世界农业生产中应用最广泛、使用量最大的肥料品种, 是土壤肥力的主要来源之一^[1]。尿素施入土壤后, 只有少量以分子态的形式被土壤胶体吸附, 而绝大部分被土壤中的脲酶催化迅速水解为碳酸铵, 容易造成氨挥发、硝化-反硝化等途径的损失, 导致尿素的利用率低^[2]。脲酶是土壤微生物体内与氨转化密切相关的一种水解酶, 广泛存在于植物、细菌、真菌、藻类和无脊椎动物中, 脲酶活性强弱直接影响土壤氨挥发损失^[3-4]。在尿素中添加脲酶抑制剂能够抑制土壤脲酶的活性, 抑制脲酶对尿素的水解作用, 减缓尿素向铵态氮转化, 抑制氨的挥发, 从而提高尿素的利用率, 对提高作物产量、保护环境等方面起到了积极作用^[5-7]。

现今国内外发现的脲酶抑制剂主要有重金属盐类、酚醌类、磷胺类和杂环类等, 但在众多种类的脲酶抑制剂当中, 很难找到廉价、低毒、无污染的脲酶抑制剂。N-丁基硫代磷酸三胺(NBPT)是目前使用较广泛且增长速度最快的脲酶抑制剂^[8], 但其价格较高, 且人们对其安全性仍存疑虑。所

以, 研制新型的高效脲酶抑制剂将会是今后的重要研究方向之一^[9]。

我国是产棉大国, 绝大部分棉花品种的棉仁、棉根皮中棉酚含量很高, 目前除少量作为避孕药物外, 绝大部分作为有害物质去除, 未得到有效利用。有研究显示, 棉酚及其衍生物对土壤脲酶活性具有一定的抑制作用, 为废弃棉酚的利用提供了有效途径^[10-12]。近年棉籽加工使用溶剂萃取法逐步增多, 主要工艺是先将棉仁用溶剂汽油萃取出棉籽油, 再用甲醇萃取出棉酚。甲醇萃取液中富含棉酚和被甲醇溶解的有机物, 在蒸发回收甲醇的过程中产生大量棉酚渣。棉酚渣中除含有棉酚及其二聚、三聚产物和各种衍生物外, 还含糖类、游离脂肪酸等, 成份复杂。除了棉酚, 棉酚渣中的其他各种有机物对尿素水解及氨挥发也会产生不同程度的影响^[13]。本文以棉酚渣为添加剂, 通过实验室模拟探究棉酚渣对尿素水解及氨挥发的影响, 为利用棉籽加工废弃物提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采自广州五山华南农业大学树木园内, 为红壤, 基本理化性质: 有机质含量为 19.1 ~ 37.5 g/kg, 全氮含量为 0.87 ~ 1.58 g/kg, 全磷含量为 0.61 ~ 0.64 g/kg, pH 值为 5.0 ~ 5.5。土壤采集后铺平风干, 过 0.15 mm 筛, 装袋备用。

收稿日期: 2018-10-17; 录用日期: 2018-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(31272241); 广东省科技计划项目(2013B090200008)。

作者简介: 陈敏(1967-), 女, 广东揭阳人, 高级实验师, 硕士, 研究方向为生态学。E-mail: chenmin@scau.edu.cn。

通讯作者: 卢其明, E-mail: qmlu@scau.edu.cn。

供试棉酚渣为中棉紫光棉籽加工工艺的残渣：先用己烷为主要成份的溶剂浸出棉籽油，再用 85% 甲醇水溶液提取棉酚，通过薄膜蒸发甲醇提取液后的残余物即为棉酚渣。

1.2 主要仪器和试剂

TDZ5-WS 型医用离心机，QYC 型全温控空气摇床，7200 型可见分光光度计，所用试剂均为市售分析纯试剂。

1.3 试验方法

1.3.1 试剂的配制

测试尿素残留差异率（二乙酰一肟法）^[14]：
（1）二乙酰一肟（DAM）溶液：称取 2.50 g 二乙酰一肟溶于 50 mL 烧杯中，搅拌直到完全溶解，定容 100 mL；（2）氨基硫脲（TSC）溶液：称取 0.25 g 氨基硫脲溶于 50 mL 烧杯中，搅拌直到完全溶解，定容 100 mL；（3）混酸溶液：在 500 mL 烧杯中加入 100 mL 水，缓慢加入 85% 磷酸 300 mL 和 98% 浓硫酸 10 mL，在冰水浴中缓慢搅拌，定容 500 mL；（4）显色剂：量取 25 mL 二乙酰一肟溶液和 10.0 mL 氨基硫脲溶液，加入至 500 mL 混酸溶液中，摇晃使其均匀，现配现用；（5）缓冲液：称取 22.25 g 磷酸氢二钠和 17.00 g 磷酸二氢钾于装有 800 mL 水的烧杯中，定容至 2 L，摇晃均匀；（6）10% 尿素溶液：尿素与水按质量比 1:9 混合均匀，称取 50℃ 烘箱干燥后的尿素 50.0 g 溶于 450 mL 水中，装于 500 mL 试剂瓶中备用。

测试氨挥发量^[15]：（1）2% 硼酸溶液：称取 6.00 g 硼酸置于 1 000 mL 烧杯中，加入 294 mL 蒸馏水溶解备用；（2）1% 甲基红溶液：称取 0.50 g 甲基红溶于 50 mL 无水乙醇中，装于棕色瓶内备用；（3）1% 溴甲酚绿溶液：称取 0.50 g 溴甲酚绿溶于 50 mL 无水乙醇中，装于棕色瓶内备用；（4）混合指示剂：溴甲酚绿 - 甲基红，体积比 3:2。

1.3.2 尿素水解抑制试验

将一定量棉酚渣与 10.0 g 风干土放入 250 mL 锥形瓶中，混合均匀，加入 50 mL 缓冲液和 10.0 mL 10% 尿素溶液，摇匀。放入设定好温度的全温控空气摇床中培养。一段时间后取出锥形瓶，对溶液进行离心。将离心后的溶液定容至 250 mL。用移液枪取 1.00 mL 溶液到 50 mL 容量瓶内，加 30 mL 显色剂，轻摇容量瓶 2 s 后放入沸水浴中加热 30 min，然后立即在流动的自来水中降温 15 min，再用水定容至 50 mL。用分光光度计在 520 nm 波长处

测定吸光度，进行尿素残留量检测，计算尿素残留差异率。

$$\text{尿素残留差异率}(\%) = \frac{R-R_0}{R_0} \times 100$$

式中： R 为添加棉酚渣的土壤尿素剩余量， R_0 为未添加棉酚渣的土壤尿素剩余量。

1.3.3 土壤氨挥发抑制试验

将 40.0 g 过筛后的土壤与一定量的棉酚渣混匀，放入 1 L 广口瓶中，加入 4.00 g 尿素固体，摇匀；将装有 20 mL 含 2% 硼酸溶液及酸碱指示剂（2 ~ 3 滴）吸收液的无盖称量瓶放入广口瓶中，密封广口瓶，置于培养箱中培养。24 h 后取出，用硫酸标准滴定溶液滴定至终点，记录所需硫酸体积。在不考虑气体扩散速率和溶液吸收速率不同的情况下，可认为氨气的释放量与滴定所需的硫酸体积成正比，检测氨气的吸收量，计算氨挥发抑制率。所用装置如图 1 所示。

$$\text{氨挥发抑制率}(\%) = \frac{n_0-n}{n_0} \times 100$$

式中： n_0 为未加棉酚渣的土壤氨气释放量， n 为添加棉酚渣的土壤氨气释放量。

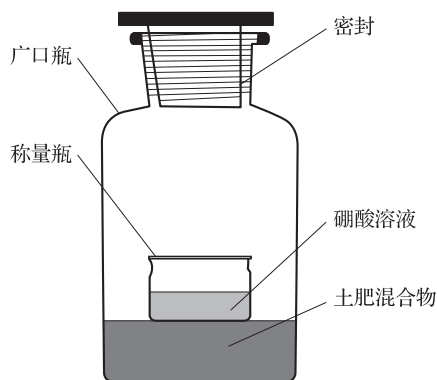


图 1 氨气吸收装置示意图

1.4 数据统计分析

采用 Origin 8.6 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 棉酚渣施用量对尿素水解和氨挥发量的影响

2.1.1 棉酚渣施用量对尿素水解的影响

35℃ 条件下，设定棉酚渣用量分别为 0、6、8、10、12 g，其中用量 0 g 为对照，比较不同棉酚渣用量对土壤脲酶活性的抑制效果。缓冲液加入量

为 50 mL, 10% 尿素用量为 10 mL; 每组分 5 批次分别于 2、4、6、8、12 d 取出, 测定尿素剩余量, 结果见图 2。

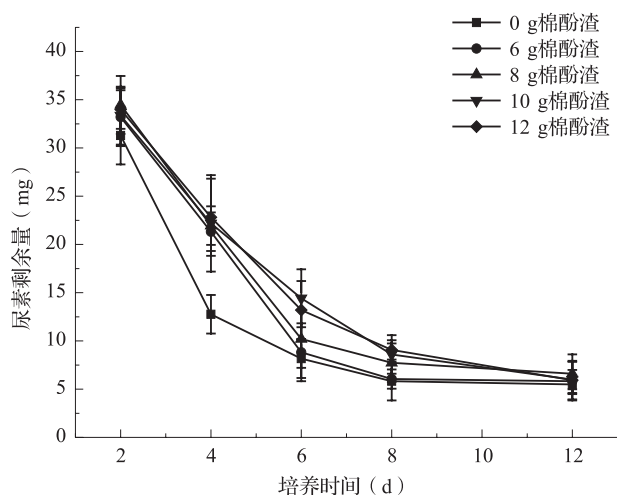


图2 棉酚渣施用量对尿素水解的影响

从图2中曲线可以看出, 随着培养时间的延长, 试验组和对照组的尿素剩余量均逐渐减少, 不同棉酚渣用量在 4 ~ 8 d 时段内尿素剩余量差异明显。在 2 和 12 d 时, 由于尿素残留量太多或太少而差异不明显。如果用尿素残留差异率分析, 在第 4 d 时试验组的尿素残留差异率都达到了试验期间的最大值, 6 ~ 12 g 棉酚渣用量的试验组的尿素残留差异率在 67.02% ~ 78.81%。整体上来看, 棉酚渣的加入对尿素水解有明显的抑制作用, 且在培养 4 ~ 8 d 期间能够有效抑制尿素水解。

2.1.2 棉酚渣施用量对土壤氨挥发的影响

在温度 35℃, 风干土 40.0 g, 加水量为 10 mL 的条件下, 比较不同棉酚渣用量 (0、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 g) 对土壤氨挥发的影响。由图 3 可知, 随着棉酚渣施用量的增加, 氨气检测量逐渐减少, 表明氨挥发量减少。由图 4 可知, 氨挥发抑制率逐渐升高, 在棉酚渣用量为 2.0 g 时, 氨挥发抑制率达到 80.40%。棉酚渣能有效降低土壤氨挥发量, 并且抑制效果随着棉酚渣施用量的增加而增强。除了棉酚渣抑制尿素水解的原因外, 可能加入棉酚渣对 NH_4^+ 具有吸附作用或对水解后的土壤溶液 pH 变化具有缓冲作用。

2.2 土壤含水量变化对棉酚渣抑制尿素水解及土壤氨挥发的影响

2.2.1 加水量对棉酚渣抑制尿素水解的影响

分别加 0、5、10、30、50 mL 缓冲液于 10.0 g 风

干土中, 各自再加入 10.0 g 棉酚渣, 10% 尿素溶液 10 mL, 培养温度为 35℃, 培养 2 d 后取出测定剩余尿素量, 以不加棉酚渣的处理为对照组, 结果如图 5。

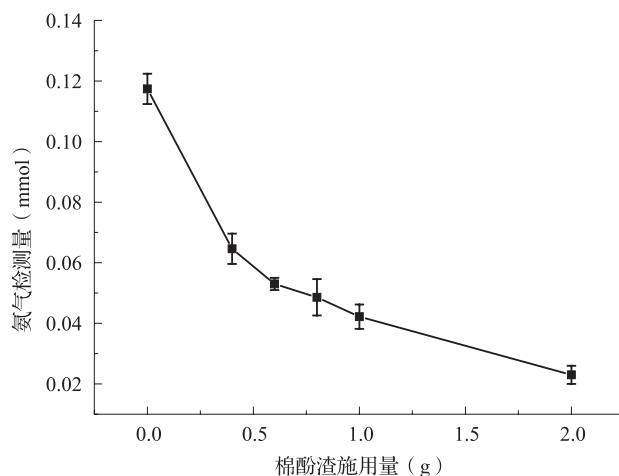


图3 棉酚渣施用量对氨气挥发量的影响

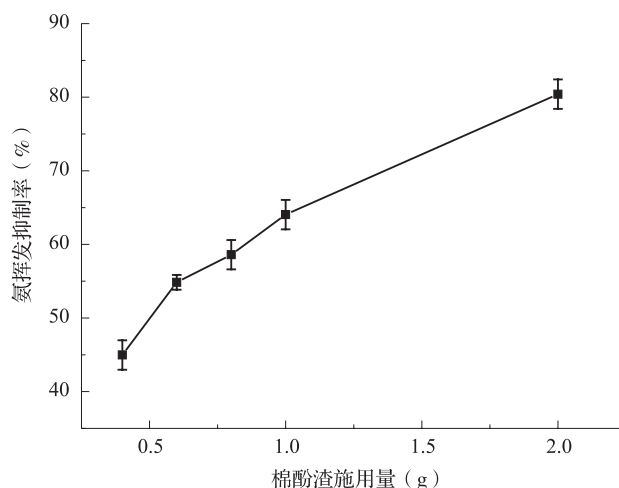


图4 棉酚渣施用量对氨挥发的抑制率的影响

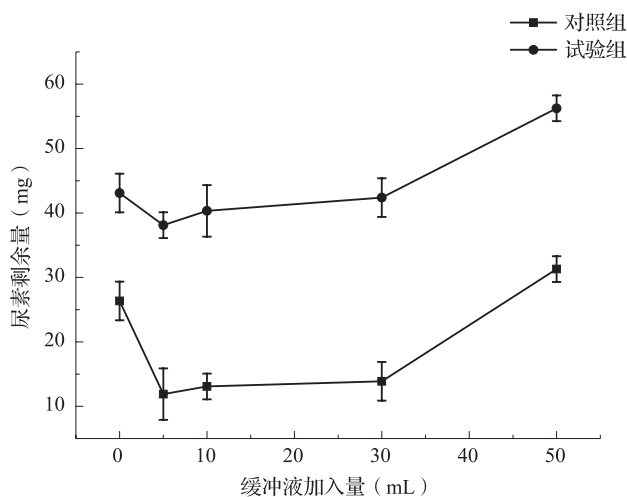


图5 缓冲液加入量对尿素水解的影响

由图 5 可知,在全部缓冲液加入量范围内,水土比依次为 1.0、1.5、2.0、4.0、6.0 (包括尿素溶液加入的水分),棉酚渣对尿素水解均显示有较强的抑制作用,差异较小。但随着缓冲液加入量的增加,无论有无棉酚渣,尿素残余量均出现先降后升的趋势,即尿素的水解量呈现先上升后下降的变化趋势。可能加入一定量的缓冲液,严格控制土壤 pH 值,有利于脲酶发挥作用。但随着缓冲液用量的继续增加(水土比为 2.0 以上),由于水对尿素和脲酶的稀释作用,尿素的剩余量逐渐增加。

2.2.2 加水量对棉酚渣抑制土壤氨挥发的影响

分别加水 0、5、10、15、20、25、30 mL 于 40.0 g 风干土壤中,土壤含水率分别为 3.5%、14.2%、22.8%、29.8%、35.0%、40.6%、44.9% (湿基),在棉酚渣用量 0.40 g 的条件下,考察不同加水量对棉酚渣抑制土壤氨挥发的影响。

从图 6 可以看出,随加水量的增大,氨气检测量先增加后减少,在加水量 10 mL (土壤含水量 22.8%) 时,氨气检测量最大。加水量增大可能增强脲酶活性和产酶微生物的活性,但继续增加土壤含水量会导致水解产生的 NH_4^+ (或 NH_3) 溶解在土壤溶液中而减少挥发。棉酚渣的抑制作用显示在图 7 中,加水量少时可能由于脲酶活性低或棉酚渣分散较差的原因,并无明显的抑制作用,随着加水量的增加(土壤含水量 22.8% 以上),棉酚渣对氨挥发的抑制率增大,达到 45% 以上。

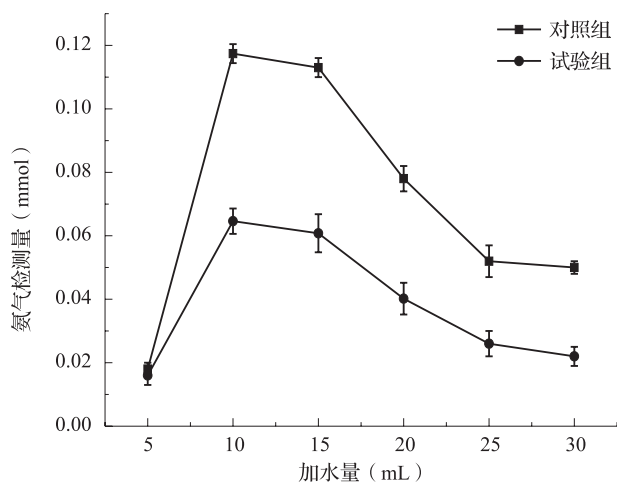


图 6 加水量对氨气挥发量的影响

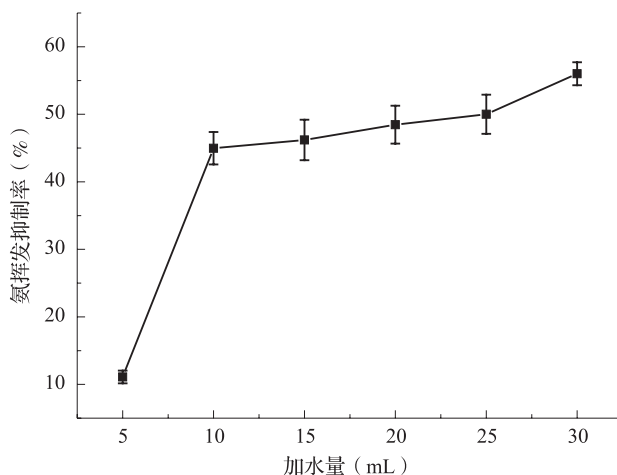


图 7 加水量对氨挥发抑制率的影响

2.3 培养温度对棉酚渣抑制尿素水解及土壤氨挥发的影响

2.3.1 培养温度对棉酚渣抑制尿素水解的影响

在 10.0 g 棉酚渣的使用量保持不变的情况下,探究不同培养温度对棉酚渣抑制尿素水解的影响。设置 20、25、30、35、40 °C 5 个处理,每个处理均设置不添加棉酚渣的对照。向锥形瓶中依次加入 10.0 g 风干土, 50 mL 缓冲液, 10% 尿素溶液 10 mL (水土比 6.0), 培养 2 d 后,取出样品测定尿素残余含量,计算尿素残留差异率,如图 8 所示。

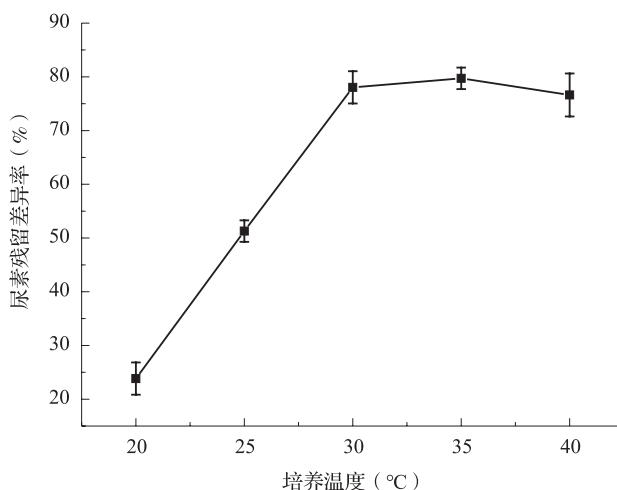


图 8 培养温度对尿素残留差异率的影响

随着培养温度的升高,尿素残留差异率逐渐增加,培养温度为 35 °C 时,尿素残留差异率达到最大,达到了 79.72%;当培养温度继续升高至 40 °C 后,尿素残留差异率仍有 76.62%。培养温度降低时尿素残留迅速下降,在 20 °C 时只有 23.83%。因

此,棉酚渣的加入能够有效减缓尿素的水解,在高温段尿素水解加快,棉酚渣的作用突显。

2.3.2 培养温度对棉酚渣抑制土壤氨挥发的影响

在棉酚渣用量 0.40 g,加水量为 10 mL 的条件下,考察不同培养温度(20、25、30、35、40℃)对棉酚渣抑制土壤氨挥发的影响,结果如图 9、图 10 所示。

由图 9 可知,随着培养温度的升高,氨气的释放量逐渐增加,表明氨气的挥发量受温度的影响较大,温度升高促进氨的挥发。由图 10 可知,棉酚渣对土壤氨挥发的抑制率呈现先上升后下降的趋势,在 30℃ 时棉酚渣对土壤氨挥发的抑制率最大,达到 55.34%,而其它温度时的氨挥发的抑制率在 36.67% ~ 44.97%。从抑制率的角度看,在适宜的温度下效果明显,可能是在产酶菌活性高的条件下,棉酚渣对土壤氨挥发表现出较强的抑制作用。

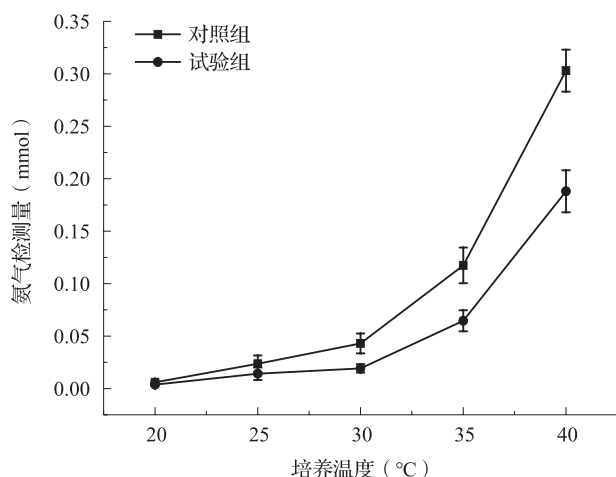


图 9 培养温度对氨气挥发量的影响

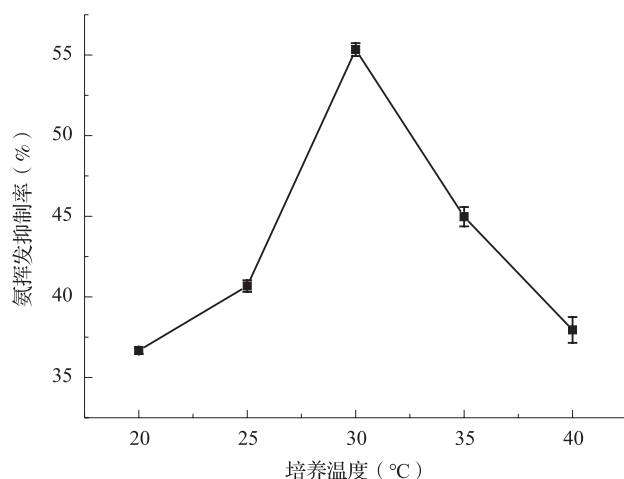


图 10 培养温度对氨挥发抑制率的影响

3 结论与讨论

棉酚渣中除了棉酚及其聚合物、衍生物外,还有糖类、游离脂肪酸等有机物,棉酚及其部分衍生物对土壤脲酶有较强的抑制作用^[12],其他有机物也可能有类似腐植酸的抑制作用^[13]。另一方面,有机物有可能成为产酶微生物的营养物质,有利于微生物的繁殖。在本试验范围内,棉酚渣的存在对尿素水解及土壤氨挥发显示较强的抑制作用,可视为抑制作用占主导。

土壤的含水量的变化,对棉酚渣抑制尿素水解作用的影响不明显,但对棉酚渣抑制氨挥发的影响大。随着土壤含水量的增加,棉酚渣对土壤氨挥发的抑制率逐渐增大。在土壤含水率 22.8% 以上时,棉酚渣对氨挥发的抑制剂达 45% 以上。由于溶解的原因,土壤含水率大时氨挥发量较小,对棉酚渣的抑制效果有所掩盖。

温度的变化对脲酶活性的影响较大,对土壤产酶菌的影响也很大,从而影响了棉酚渣的使用效果。在适宜的温度下棉酚渣对尿素水解的抑制效果比较明显,但高温下氨易挥发,掩盖了棉酚渣的抑制效果。棉酚渣的脲酶抑制作用可能和大多脲酶抑制剂一样属于混合性抑制^[11, 16],抑制机理有待进一步研究。

整体来看,棉酚渣对尿素水解及土壤氨挥发具有一定抑制作用,但还需要进一步通过盆栽试验和田间试验对其抑制效果进行综合评价。

参考文献:

- [1] Zhong Y, Yan W, Shangguan Z. Soil carbon and nitrogen fractions in the soil profile and their response to long-term nitrogen fertilization in a wheat field [J]. *Catena*, 2015, 135: 38-46.
- [2] 张文学, 孙刚, 何萍, 等. 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田氨挥发的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19 (6): 1411-1419.
- [3] Phongpan S, Freney J R, Keerthisinghe D G. Use of urease inhibitors to reduce ammonia loss from broadcast urea and increase grain yield of flooded rice in Thailand [J]. *Soil Sci & Plant Nutr*, 1997, 43 (sup1): 1057-1060.
- [4] 孙凯宁, 袁亮, 李絮花, 等. 增值尿素对氨挥发和土壤脲酶活性的影响 [J]. *山东农业科学*, 2010, (6): 60-62.
- [5] 张嘉月, 吕毅, 王玲莉, 等. 稳定性尿素中脲酶抑制剂作用效果的快速检测方法 [J]. *中国土壤与肥料*, 2014, (5): 95-99.

- [6] Serna M D, Banuls J, Quinones A, et al. Evaluation of 3, 4 dimethylpyrazole phosphate as a nitrification inhibitor in a citrus cultivated soil [J]. *Biol Fertil Soils*, 2000, 32: 41–46.
- [7] Grant C A, Ji S, Brown K R, et al. Volatile losses of urea from surface applied urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitor NBPT [J]. *Can J Soil Sci*, 1996, 76: 417–419.
- [8] Cantarella H, Otto R, Soares J R, et al. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review [J]. *Journ Advanced Research*, 2018, 13: 19–27.
- [9] Demirbas U, Mentese E, Sokmen B B, et al. Synthesis of some new Methoxy Bridged Benzimidazolyl-Substituted phthalocyanines as potent inhibitors of urease [J]. *J Organometallic Chem*, 2018, 873: 86–90.
- [10] 陈轶雄, 陈敏, 张宗毅, 等. 醋酸棉酚对土壤脲酶活性的抑制作用 [J]. *水土保持学报*, 2012, 26 (1): 219–222.
- [11] 陈轶雄, 吴佩琪, 陈敏, 等. 醋酸棉酚对土壤脲酶动力学特性的影响 [J]. *水土保持学报*, 2013, 27 (3): 265–268.
- [12] 廖俊健, 倪铁林, 廖浩然, 等. 4-取代基苯胺棉酚席夫碱的合成及脲酶抑制作用研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2015, 42 (4): 627–631.
- [13] 王平, 付战勇, 李絮花, 等. 腐植酸对土壤氮素转化及氨挥发损失的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2018, (4): 28–33.
- [14] 卫志东. 稳定性肥料中尿素残留差异率的测定方法 [J]. *安徽化工*, 2016, 42 (4): 127–131.
- [15] 廖俊健, 钱永盛, 黄焯轩, 等. 茶叶对土壤脲酶的抑制作用 [J]. *南方农业学报*, 2015, 46 (12): 2117–2122.
- [16] 隽英华, 陈利军, 武志杰. 温度和脲酶抑制剂影响下的土壤脲酶动力学行为 [J]. *辽宁工程技术大学学报 (自然科学版)*, 2009, 28 (6): 1021–1025.

Effect of gossypol residue on urea hydrolysis and ammonia volatilization in soil

CHEN Min¹, LI Gao-sheng², XIAN Jian-hong², WANG Wei², YAN Jing², DONG Qian-wen², LU Qi-ming^{2*}

(1. Center of Experimental of Teaching for Basic Courses, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642;

2. College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract: The effects of gossypol residue on urea hydrolysis and ammonia volatilization in soil were explored by the method of mixed culture with gossypol residue, urea and soil, and measuring the amount of residual urea and ammonia absorbed. The results showed that the residual urea increased and the detected ammonia decreased with the increase of gossypol residue. Compared with the control, the urea residue difference rate reached 78.81%, and the inhibition rate of ammonia volatilization reached 80.40%. Changes in soil water content had a great impact on the activity of urease and urease-producing microorganisms, and the inhibitory effect of gossypol residue on urea hydrolysis and ammonia volatilization was more obvious when the activity was high. As the culture temperature increased, urea hydrolysis increased and ammonia volatilization increased rapidly. Gossypol residue had the best inhibitory effect on urea hydrolysis at 35℃, the urea residue difference rate reached 79.72%. Gossypol residue had the best inhibitory effect on ammonia volatilization at 30℃, and the inhibition rate reached 55.34%. These results indicated that the gossypol residue has strong inhibitory effect on urea hydrolysis and ammonia volatilization, and has potential for application.

Key words: gossypol residue; urea hydrolysis; ammonia volatilization; soil urease; urease inhibition