

改良靛酚蓝比色法测土壤脲酶活性

黄娟, 李 稔, 张 健

(东南大学 市政工程系, 南京 210096)

摘要:土壤脲酶活性的测定有多种方法,其中靛酚蓝比色法由于测量结果精确性较高,重现性较好,应用最为广泛。但也有培养后土壤过滤液浑浊、带色、脲酶活性受底物浓度影响较大等缺点。以此方法为基础,针对过滤方式、培养时间、底物浓度及缓冲液选择等4个重要参数进行了对比试验,以期进一步改进靛酚蓝比色法的测定准确性。结果表明,培养时选择5%的底物浓度、pH10.0的硼酸盐缓冲液、培养24 h后再经KCl溶液浸提过滤比色测定,其结果比传统靛酚蓝比色法高约2.46倍,改良靛酚蓝比色法的测定结果更接近土壤真实脲酶活性。

关键词:靛酚蓝比色法;土壤脲酶活性;尿素;改良

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2012)01-0102-06

Improvement of Indophenol Blue Colorimetric Method on Activity of Urease in Soil

HUANG Juan, LI Zhen, ZHANG Jian

(Department of Municipal Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, P. R. China)

Abstract: Among all the measurement methods on activity of urease, indophenol blue colorimetric method, higher accuracy of the measurement results and better reproducibility, is the most widely used measurement method on activity of urease. However, this kind of method also owns some drawbacks, for examples, filtered fluid of cultivated soil is muddy and concentration of substrate has a great influence on the activity of urease. Based on the former measurement methods, four crucial parameters was taken to, such as method of filtration, time of cultivation, concentration of substrate and choice of buffer solution, the comparative tests in order to improve the accuracy of the measurement results of indophenol blue colorimetric method. The result of improved method is closer to the real activity of urease in soil with the conditions that choosing 5% concentration of substrate and pH10.0 borate buffer solution during the cultivation, extracting and filtrating with potassium chloride solution after 24-hours cultivation. The result of improved indophenol blue colorimetric method is 2.46 times better than the traditional method.

Key words: indophenol blue colorimetric method; activity of urease in soil; urea; improvement

土壤脲酶是由简单蛋白质构成的生物催化剂,一般认为是由土壤中微生物产生,是存在于土壤中能催化尿素分解、具有氨化作用的高度专一性的水解酶^[1-4],其活性稳定,受干燥、辐射及一定范围温度

变化(-60~22℃)的影响较小^[2]。在土壤酶中,脲酶是唯一对一种重要的矿质肥料——尿素的往后转化和作用具有重大影响的酶^[5-6]。因此,它比其他的土壤酶类研究更多,有关文献资料也最为丰富。研

收稿日期:2011-05-08

基金项目:国家自然科学基金(50909019,51079029);东南大学创新基金(3205001503)

作者简介:黄娟(1980-),女,副教授,主要从事水污染控制研究,(E-mail)seu070703@163.com。

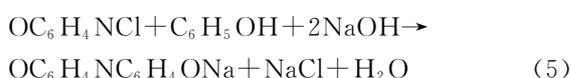
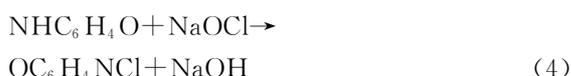
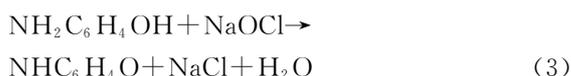
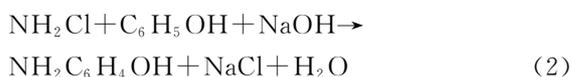
究发现土壤脲酶活性,与土壤的微生物数量、有机物质含量、全氮和速效磷含量呈正相关,在土壤氮元素的循环与转化过程中扮演了重要角色^[7-8],因此土壤脲酶活性作为表征土壤氮素状况,评价土壤生产力及土壤质量的指标一直以来备受科研工作者的重视。

Rotini 首先提出测定土壤脲酶^[9]。测定脲酶常用的方法有:比色法、扩散法、尿素剩余量测定法、电极法、CO₂ 量度法等^[9-11]。其中比色法由于操作简单且对仪器设备要求不高而广泛应用。比色法原理是以尿素为底物,经培养后根据脲酶酶促产物——氨(忽略硝化过程造成的氨氮损失^[12]) 在碱性介质中:1)与纳氏试剂作用生成黄色的碘化双汞铵,该生成物数量与氨量相关。2)与苯酚、次氯酸钠作用生成蓝色的靛酚。该生成物数量与氨浓度成正比。后者即称为靛酚蓝比色法,其结果精确性较高,重现性较好,在脲酶活性测定中的应用最为广泛。

但笔者经实验观察发现此法存在以下问题:土样经培养后过滤液浑浊、带色;脲酶活性受底物浓度影响较大,底物溶液经培养后释放的氨氮有时竟高于无底物土样释放的氨氮。为解决以上问题,本研究以靛酚蓝比色法为基础,针对此法的过滤方式、培养时间、底物浓度及缓冲液选择4个重要参数进行对比试验,以期进一步提高靛酚蓝比色法的准确性。

1 实验原理

传统靛酚蓝比色法原理是根据脲酶水解尿素时生成的氨态氮在强碱介质中和苯酚钠及次氯酸钠反应,形成蓝色靛酚,该生成物数量与氨浓度成正比。因此可根据蓝色靛酚的比色结果表征土壤中脲酶的活性大小。反应过程如下^[9]:



测定方法如下^[9]:称取5g过20目风干土于50mL磨口三角瓶中,加5~10滴甲苯,盖好,15min后加10mL 10%尿素和20mL pH6.7柠檬酸盐缓冲液,摇匀后,在37℃恒温箱中培养24h。培养结

束后过滤,取滤液3mL于50mL比色管中,加蒸馏水至20mL,再加入4mL苯酚钠溶液和3mL次氯酸钠溶液,边加边摇匀。20min后定容,在分光光度计波长578nm处比色(1cm比色皿)。反应生成的靛酚蓝能在60min内稳定。每一土样需设置用水代替底物(即尿素)的对照,以除掉土壤中氨态氮引起的误差。还再设无土(尿素+柠檬酸盐)对照。

经试验观察及与其他脲酶测定方法比较,得出此方法中的一些重要参数有待于进一步斟酌:

1)过滤方式。培养结束后直接过滤,但是尿素水解生成的NH₄⁺-N为正离子,很容易被带负电的土壤胶体吸附^[13],所以滤液中的氨氮含量降低,导致测定结果偏小。为了将吸附在土壤颗粒上的氨离子置换出来,试验采用2mol/L的KCl溶液浸提过滤。与直接过滤对比检测不同过滤方式对脲酶活性的影响。

2)培养时间。使用24h的培养时间,但有的脲酶测定方法需培养48h^[14],还有的只需2~3h^[2,5]。因此有必要检测脲酶活性大小随培养时间的变化,以确定较为合适的培养时间。试验选择3、24、48h 3种不同培养时间对比研究。

3)底物浓度。使用底物为10%的尿素,浓度约1.6mol/L,但参照其他脲酶测定方法,有的是0.2mol/L^[2],有的只有0.08mol/L。经试验观察也发现10%尿素的无土对照经24h培养后释放的氨氮浓度较高,有时竟然超过了个别土样释放的氨氮量(若采取直接过滤方式的话)。因此本研究选择了10%、5%、1% 3种不同浓度的尿素溶液做底物,探究底物浓度对脲酶活性测定的影响。

4)缓冲液的选择。相关文献^[5]指出脲酶的最适pH约为7,故方法中选择的缓冲液pH为6.7,以保证培养时脲酶活性最大程度的释放。但是生成的氨氮需要在强碱介质中与苯酚钠和次氯酸钠显色反应。若反应体系中碱性不强,会影响药品显色,故有的方法中使用的缓冲液pH值为10.0^[2]。也有相关报道表明硼酸根会抑制土壤中尿素的水解^[15],考虑到尿素溶液的自行水解作用总是很强,本研究选用pH10.0的硼酸盐缓冲液与方法中的pH6.7的柠檬酸盐缓冲液对照试验,考察缓冲液的不同对脲酶活性测定的影响。

2 材料与方法

2.1 供试土壤

土壤取自南京市环境科学研究院旁的四明山,自然风干后过20目筛,含水率为1.89%。水土比

为5:1时土壤pH为4.8。

2.2 培养与测定

将风干后的土样充分搅拌均匀,放置在4℃冰箱中备用。分别称取5g土壤置于3个50mL三角瓶中,标号为1、3、5。同样称取5g土壤置于3个100mL三角瓶中,标号为2、4、6。加5~10滴甲苯,盖好,15min后1、2号加入10mL10%尿素,3、4号加入10mL5%尿素,5、6号加入10mL1%尿素,所有样品再加入20mLpH6.7柠檬酸盐缓冲液。所有操作设3组重复。置于37℃恒温培养箱中培养,在培养第3、24、48h后各将一组土样取出测定。其中单数号1、3、5直接离心(转数4000r/min,20min)。偶数号2、4、6取出后加入20mL的S2mol/LKCl溶液,用摇床摇动30min后再离心(转数4000r/min,20min)。将离心得到的上清液用无氮滤纸过滤,取滤液3mL于50mL比色管中,之后测定方法不变。同时不同浓度尿素溶液各做1份无土对照。整个操作还需1份无基质(尿素)对照,无基质对照也需分直接过滤和浸提过滤2种。实验设计如表1所示。

表1 实验设计

序号	培养时间/h	缓冲液pH	尿素浓度/%	过滤方式	无土对照标号	无底物(尿素)对照标号
1	3/24/48	6.7	10	直接过滤	a1	z1(直接过滤) k1(KCl浸提过滤)
2	3/24/48	6.7	10	浸提过滤		
3	3/24/48	6.7	5	直接过滤	a2	
4	3/24/48	6.7	5	浸提过滤		
5	3/24/48	6.7	1	直接过滤	a3	
6	3/24/48	6.7	1	浸提过滤		

pH10.0硼酸盐缓冲液取代pH6.7柠檬酸盐缓冲液重复上述操作,以考察缓冲液的不同对脲酶活

性测定的影响。

2.3 结果计算

土壤脲酶活性以培养时间内每克土释放的氮的毫克数来表示。

土壤脲酶活性=土样培养后测得的总氮含量(mg/g土)—无土对照的氮含量(mg)—无底物对照的氮含量(mg/g土)

其中直接过滤土样的氮含量(mg/g土)= $a \times 10/5 \times 0.001$

KCl浸提过滤土样的氮含量(mg/g土)= $a \times 50/15 \times 0.001$

式中a为比色液吸光值在标准曲线上对应的浓度,单位为($\mu\text{g}/50\text{mL}$)。

3 结果与讨论

同一土样,在不同变量参数下(不同培养时间、底物浓度,缓冲液、过滤方式)测得的脲酶活性如表2所示:

3.1 合理过滤方式的确定

培养24h后不同底物浓度的土样直接过滤与浸提过滤测得的脲酶活性如图1所示,可见土样培养24h后浸提过滤所测得的脲酶活性明显高于直接过滤测得的脲酶活性。培养3h和培养48h的土样测得的结果也是如此(如表2)。原因是土壤胶粒带负电,很容易吸附尿素水解生成的 NH_4^+-N ,若培养结束后直接过滤则吸附在土壤颗粒上的氮过滤不出,导致脲酶测定结果偏小。此时加入KCl溶液则 K^+ 会将土壤中的 NH_4^+ 置换出来,NaCl盐溶液也可达到同样效果。加入量可参考土:水=1:4的量,故5g土壤可加入20mL浸提液浸提。

表2 不同变量参数下测得的脲酶活性

/(mg/g土)

培养时间/h	缓冲液pH	底物浓度/%					
		10		5		10	
		直接过滤	KCl浸提过滤	直接过滤	KCl浸提过滤	直接过滤	KCl浸提过滤
3	6.7	0.080	0.114	0.076	0.098	0.069	0.104
	10	0.117	0.278	0.131	0.334	0.106	0.211
24	6.7	0.285	0.560	0.394	0.625	0.406	0.509
	10	0.319	0.595	0.401	0.701	0.431	0.690
48	pH6.7	0.055	0.347	0.341	0.665	0.578	0.936
	pH10	0.293	0.551	0.410	0.724	0.498	0.797

实验过程中也发现浸提后再离心的土样比直接离心得到的离心液更清澈,过滤速度更快,且滤液几近无色。而直接离心的土样的滤液则有些浑浊,且

培养时间越长滤液越浑浊,至培养48h后得到离心液已经很浑浊,不易过滤,滤液颜色为深棕色(土壤颜色),也影响比色结果的准确性。相比之下同样培

养 48 h 后经 KCl 溶液浸提过的土样的离心液仍很清澈,且几近无色。

故测定土壤脲酶活性时,土样经培养后不应直接过滤,用 KCl 溶液浸提后过滤测定更能反映土壤释放的真实氨氮含量,且滤液澄清,不影响比色。

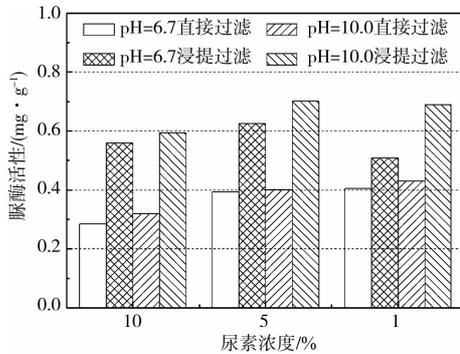


图 1 培养 24 h 后不同底物浓度的土样测得的脲酶活性

3.2 最佳培养时间的确定

不同底物浓度的土样在培养 3、24、48 h 后经浸提过滤后测得脲酶活性如图 2 所示,可见同一土样随培养时间的延长测得的脲酶活性随之增加。不同底物浓度的土样在培养 3 h 时测得的脲酶活性较低且彼此没有明显区别,培养 24 h 后脲酶活性得到较大幅度提升,不同底物浓度之间也无明显差别,经 48 h 培养后除 10% 底物浓度的土样以外,其它土样的脲酶活性继续有所增加,只是幅度减缓,且底物浓度越低,增加幅度越大。原因是土壤脲酶活性的释放需要一定的时间,脲酶需要与底物尿素充分接触,且也需要时间来充分反应。培养 3 h 即取出测定虽然也能表征出脲酶活性的释放,但释放的只是少部分,难以代表土壤中所有潜在的脲酶活性。经 48 h 培养与经 24 h 培养后测定的脲酶活性差距幅度减缓,说明土样经 24 h 培养后土壤中大部分的脲酶参与了反应,观察到这时的脲酶活性受底物浓度的影响也小,所以可以考虑用土样经 24 h 培养后测定的脲酶活性来表征土壤中的脲酶活性大小。

从实验角度考虑,土壤经 48 h 培养后测得的脲酶活性过高,显色时颜色过深已超过标准曲线的显色范围,所有样品需要稀释后再测定,给操作带来不便,况且 48 h 的培养时间耗时较大。综上所述,靛蓝比色法测定脲酶活性建议采用 24 h 的培养时间,既能够充分表征出土壤脲酶活性大小,且操作简便,节省时间。

3.3 最适尿素浓度的确定

图 3、图 4 分别为不同底物浓度的无土对照释

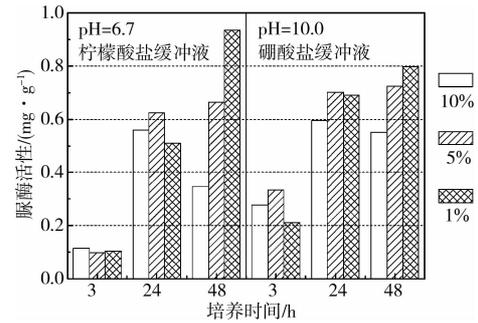


图 2 不同底物浓度的土样经浸提过滤后所测得脲酶活性

放的氨氮含量和不同底物浓度的土样释放的总氨氮量。由图 3 可以看出底物尿素会随着培养时间的延长自行水解释放氨氮,反应式如式 6。不同浓度的尿素水解速度不同,对 2 两种不同缓冲液体系而言,都是 10% 的尿素溶液水解速度最快,其次 5% 的尿素溶液,1% 的尿素溶液培养 48 h 内水解现象不明显。说明尿素溶液浓度越高,越不稳定。

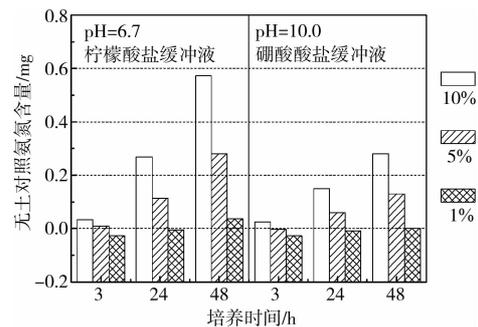


图 3 不同浓度的无土对照释放的氨氮含量

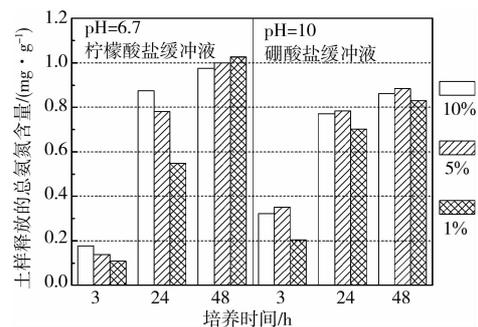


图 4 不同底物浓度的土样经浸提过滤后测得的总氨氮含量

培养 3 h 后 3 种不同浓度的尿素释放的氨氮含量可以看出 $10\% > 5\% > 1\%$,但差距不明显。此时各种底物浓度的土样释放的总氨氮含量几乎相同(图 4),因此测得到脲酶活性差距不大(图 2)。24 h 后不同浓度的尿素溶液水解释放的氨氮量已经有明显区别,溶液浓度越高,水解程度越大。因此虽然 10% 底物浓度的土样检测到了最高的总氨氮释放

量,但由于其水解程度也最大,相减之下,反而是 5%底物浓度的土壤脲酶活性最高。随着培养时间的进一步延长,高浓度尿素溶液继续水解,最终 48 h 后 1%底物浓度的土壤脲酶活性达到最高(图 2)。

值得一提的是,由图 4 可见 48 h 后不同底物浓度土样释放的总氨氮量又接近相同,说明 3 种底物浓度的土样经 48 h 培养后不论是底物自行水解还是脲酶催化底物水解,底物的水解程度达到了一致。但是底物浓度越高,自行水解占的比例越大,脲酶对底物水解的贡献就越小。这个趋势随着培养时间的延长而明显。可以解释为浓度较高的尿素由于会自行水解,所以溶液中的氨氮量从开始就很高,较高的氨氮浓度会抑制脲酶对尿素的催化,但还不至于抑制尿素的自行水解,所以到了后期 10%底物浓度的土样的脲酶活性不升反降(图 2)。5%浓度的底物自行水解程度没有 10%的高,所以后期脲酶活性只是增长缓慢。而 1%浓度的尿素由于自行水解程度不明显,前期没有氨氮的积累来抑制脲酶的催化作用,所以整个反应过程中脲酶持续发挥作用直至培养后期 1%底物浓度的土样测得的脲酶活性最大。

之前提及测定脲酶活性建议采用 24 h 的培养时间,由图 2 可看出培养 24 h 后 5%底物浓度的土样显现出了最高的脲酶活性,此时 5%的底物浓度既能诱导脲酶发生催化反应,自身水解释放的氨氮量也未到达抑制脲酶活性的程度,所以 5%浓度的底物能最大程度的诱导出土壤脲酶活性。因此笔者建议若采用 24 h 的培养时间则选择 5%的尿素溶液做底物测定,能够最大程度的表征土壤脲酶活性。

3.4 最适缓冲液的确定

以 5%底物浓度的土样为例,在不同 pH 值缓冲液、不同培养时间下测得释放的总氨氮含量如图 5 所示。可见 pH6.7 的土样在培养 3 h 时检测到的氨氮含量低于 pH10.0 的土样,随培养时间的延长,pH6.7 的土样测得的氨氮含量逐渐升高,且涨幅较大,最终培养时间 48 h 时 pH6.7 的土样测得的氨氮含量高于 pH10.0 的土样。整个培养过程中 pH6.7 的无土对照样的氨氮含量都高于 pH10.0 的无土对照,最终相减之下 5%底物浓度的土样用 pH10.0 的硼酸盐缓冲液培养测得的脲酶活性高于用 pH6.7 的柠檬酸盐缓冲液(见图 2)。

分析认为,pH10.0 硼酸盐缓冲液有抑制尿素溶液自行水解的作用。因此虽然随培养时间的延长,土样释放的总氨氮含量逐渐低于 pH6.7 的土样,但由于底物自行水解的更少,所以相减之下测得的脲酶活性始终高于 pH6.7 的土样。吴金桂等^[15-17]研

究表明,在土壤中加入不同浓度的硼酸/砂后检测土壤尿素的水解率,发现硼酸/砂能够抑制尿素的水解,且硼酸/砂浓度越高抑制作用越明显,因而得出含硼化合物对土壤脲酶有抑制作用的结论。硼酸根能抑制土壤中的尿素释放氨氮这与本研究的结果一致,但硼酸根主要是抑制了尿素的自行水解才会导致检测到的土样氨氮含量降低,因此本研究认为硼酸根的存在能显著抑制尿素自行水解,而对土壤脲酶的抑制作用没有相关报道所述的那么明显,但硼酸根抑制尿素自行水解的原理还有待于进一步研究。

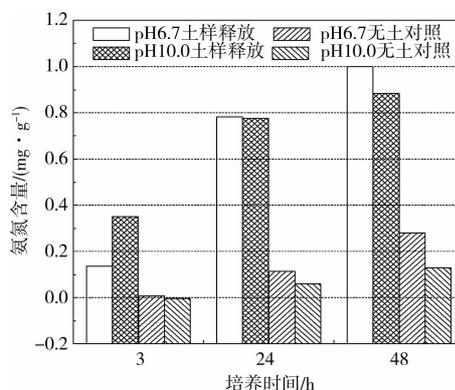


图 5 5%底物浓度的土样释放的总氨氮含量

4 结论

传统靛酚蓝比色法存在培养后土壤过滤液浑浊、带色、脲酶活性受底物浓度影响较大等缺点。

选择 5%的底物浓度、pH=10.0 的硼酸盐缓冲液、培养 24 h,再经 KCl 溶液浸提过滤后测定,既能避免反应释放的氨氮被土壤吸附,也能抑制底物自行水解,且有效解决了过滤液浑浊带色等问题。

对同一土样,分别采用传统靛酚蓝比色法和改良靛酚蓝比色法测定土壤脲酶活性,其结果分别为: 0.285 mg/g 土、0.701 mg/g 土。改良靛酚蓝比色法比传统法测定结果高约 2.46 倍,改良靛酚蓝比色法测定结果更接近土壤真实脲酶活性。

参考文献:

- [1] ZARREN AMTUL, CRISTIAN FOLLMER, SUMERA MAHBOOB, et al. Germa- γ -lactones as novel inhibitors of bacterial urease activity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007(2):457-463.
- [2] 吴金水,林启美,黄巧云,等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京:气象出版社,2006:122-124.
- [3] 刘淑英. 不同施肥对西北半干旱区土壤脲酶和土壤氮素的影响及其相关性[J]. *水土保持学报*, 2010, 24(1): 219-223.

- LIU SHU-YING. Effects of different fertilization on soil urease, nitrogen and their correlation in semiarid area of northwest China [J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2010, 24(1):219-223.
- [4] 康莉,周文生,侯翠红,等. 脲酶抑制剂的研究综述[J]. *河南化工*, 2009, 26:8-10.
KANG LI, ZHOU WEN-SHENG, HOU CUI-HONG, et al. Review on the research of urease inhibitors [J]. *Henan Chemical Industry*, 2009, 26:8-10.
- [5] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京:科学出版社, 1987:275-276.
- [6] 倪秀菊,李玉中,徐春英,等. 土壤脲酶抑制剂和硝化抑制剂的进展[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(12):145-149.
NI XIU-JU, LI YU-ZHONG, XU CHUN-YING, et al. Advance of research on urease inhibitor and nitrification inhibitor in soil [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(12):145-149.
- [7] 焦晓光,隋跃宇,张兴义. 土壤有机质含量与土壤脲酶活性关系的研究[J]. *农业系统科学与综合研究*, 2008, 24(4):494-496.
JIAO XIAO-GUANG, SUI YUE-YU, ZHANG XING-YI. Study on the relationship between soil organic matter content and soil urease activity [J]. *System Sciences and Comprehensive Studies In Agriculture*, 2008, 24(4):494-496.
- [8] CALDWELL B A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review [J]. *Pedobiologia*, 2005, 49:637-644.
- [9] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社, 1986:294-297.
- [10] TABATABAI M A, BREMNER J M. Assay of urease activity in soils [J]. *Soil Biol. Biochem*, 1972, 4:479-487.
- [11] GUETTES R, DOTT W, EISENTRAEGER A. Determination of urease activity in soils by carbon dioxide release for ecotoxicological evaluation of contaminated soils [J]. *Ecotoxicology*, 2002, 11:357-364.
- [12] SHUPING QIN, CHUNSHENG HU, WENXU DONG. Nitrification results in underestimation of soil urease activity as determined by ammonium production rate [J]. *Pedobiologia-International Journal of Soil Biology*, 2010, 53:401-404.
- [13] 朱兆良. 中国土壤氮素研究[J]. *土壤通报*, 2008, 45(5):778-783.
ZHU ZHAO-LIANG. Research on soil nitrogen in China [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5):778-783.
- [14] 中国科学院林业土壤研究所微生物室. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:科学出版社, 1960:67.
- [15] 吴金桂,唐玉邦,徐跃定,等. 硼砂抑制脲酶活性的效应及尿素硼肥的增产效果[J]. *江苏农业科学*, 1999, 1:38-40.
- [16] 王天元,宋雅君,滕鹏起,等. 土壤脲酶及脲酶抑制剂[J]. *化学工程师*, 2004, 107(8):22-24.
WANG TIAN-YUAN, SONG YA-JUN, TENG PENG-QI, et al. The urease of the soil and the inhibitor of urease [J]. *Chemical Engineer*, 2004, 107(8):22-24.
- [17] 李昌满,许明惠. 硼酸对土壤脲酶动力学参数的影响[J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2010, 35(2):124-126.
LI CHANG-MAN, XU MING-HUI. Effect of boric acid treatment on kinetic parameters of soil urease [J]. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition*, 2010, 35(2):124-126.

(编辑 王秀玲)