

土壤羟胺还原酶活性测定方法的改进*

史云峰^{1,2} 武志杰^{1,*} 史奕¹ 陈利军¹ 王旻屹^{1,2}

(¹ 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; ² 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 对传统土壤羟胺还原酶活性的测定方法进行了部分改进。用煮沸并密封冷却的蒸馏水形成 3~5 cm 的液封, 同时用 N₂ 气流排除液面以上的空气, 能够创造测定土壤中羟胺还原酶活性所需要的厌氧环境。与传统方法相比, 该方法减少了厌氧程度的不确定性和试验步骤的复杂性, 增加了培养试验的可操作性。以碘量法为对照, 对 4 种不同的测量浸提液中羟胺浓度的分光光度法进行了对比筛选, 结果表明, 硫酸铁铵-邻菲罗啉法具有较高的准确度和精密性, 是测定土壤中羟胺还原酶活性的理想方法。

关键词 羟胺还原酶; 厌氧环境; 分光光度法

中图分类号 S154.2 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2007)07-1133-05

A modified method for measuring soil hydroxylamine reductase activity. SHI Yun-feng^{1,2}, WU Zhi-jie¹, SHI Yi¹, CHEN Li-jun¹, WANG Shu-yi^{1,2} (¹Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Graduate University of Chinese Academy Sciences, Beijing 100039, China). *Chinese Journal of Ecology* 2007 26(7):1133-1137.

Abstract: In this paper, the traditional measuring method of soil hydroxylamine reductase activity was partially modified. The anaerobic condition needed for the measurement was created by a 3-5 cm fluid seal, which was made from the boiled water having been cooled down under airproof condition. The air above the fluid seal was exhausted with N₂ current to prevent O₂ dissolving into water. Compared with traditional methods, this method could reduce the uncertainty and the complexity in operation, and increase the maneuverability. Taking iodometric analysis as the reference, four spectrophotometric methods were adopted to determine the hydroxylamine concentration in extract, and the results showed that ammonium ferric sulfate-phenanthroline method was of high accuracy and precision, being feasible in measuring soil hydroxylamine reductase activity.

Key words: hydroxylamine reductase; anaerobic condition; spectrophotometry.

1 引言

含氮化合物至硝态氮(NO₃⁻-N)转化以及其相反过程, 不仅能在微生物的细胞内进行, 也能在土壤酶的作用下发生(史奕和黄国宏, 1999)。在好气条件下, NO₃⁻可以通过异化反硝化作用转化为羟胺(伊利亚列特季诺夫, 1985)。土壤中的羟胺还原酶能将在土壤中氮代谢(NO₃⁻的异化反硝化或者氨的氧化)过程中形成的中间产物羟胺还原成氨, 土壤中的还原态化合物可作为氢的供体(哈兹耶夫,

1980)。因此, 土壤中羟胺还原酶活性的强弱影响到土壤氮代谢过程中氮素的氨挥发损失, 间接影响氮肥的利用效率, 在水稻田烤田期间还影响到温室气体的排放(黄树辉等, 2004)。因此, 对土壤中羟胺还原酶活性的测定具有重要意义。到目前为止, 有关羟胺还原酶活性的测定基本都是参照哈兹耶夫(1980)的方法。该方法步骤比较繁琐, 需用专用的试剂瓶和抽滤装置进行抽真空培养, 且试验的厌氧培养程度随装置的不同、培养批次的不同具有差异性和不确定性(武志杰等, 2005), 使其难以适应土壤中羟胺还原酶活性的定量研究。

本试验的目的在于提供一种测定土壤中羟胺还原酶活性的分析方法。该方法是在借鉴前人测定方

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-445)和国家科技支撑计划资助项目(2006BAD10B00)。

** 通讯作者 E-mail: wuzj@iae.ac.cn

收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2007-04-06

法原理基础上,对土壤中羟胺还原酶活性的测定步骤进行了改进,从而减少培养时厌氧程度的不确定性和试验步骤的复杂性。同时,本试验还应用基于不同机理的4种分光光度法对土壤中羟胺还原酶活性进行测定,并与碘量法所测定的结果进行了详细对比。

2 材料与方法

2.1 供试材料

供试土壤 红壤,采自中国科学院江西鹰潭试验站;草甸棕壤,采自中国科学院沈阳生态站;水稻土,采自江苏扬州良种场。其基本理化性质见表1。试验过程中所用试剂均为分析纯。

表1 供试土壤的基本理化性质

Tab.1 Basic physical and chemical properties of test soils

样号	土壤类型	pH	有机质 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全氮 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全磷 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全钾 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
1	红壤	4.57	0.85	0.63	0.25	10.96
2	草甸棕壤	6.76	2.22	1.05	0.62	23.25
3	水稻土	7.90	1.84	1.45	0.63	14.02

2.2 研究方法

2.2.1 培养浸提方法 哈兹耶夫(1980)的培养浸提方法:取1 g过1 mm筛的土壤样品置于100 ml带磨口塞的瓶中,加入20 mg CaCO_3 ,混匀后加入1 ml 0.5%的盐酸羟胺和1 ml 1%的葡萄糖溶液(作为氢的供体)。在10~12 mm水银柱的压力下抽出瓶中空气,将瓶仔细摇荡后置于30℃恒温箱中培养5 h。用灭菌(180℃,3 h)土壤加2 ml水作为对照,同时作试剂空白对照(不加土壤,其余同样品处理)。实验设3次重复。培养结束后,往瓶中加入50 ml蒸馏水和2 ml铝钾矾饱和试剂,并将悬液用致密滤纸过滤,得溶液A备用。

改进后的培养浸提方法:取1 g过1 mm筛的土壤样品4份于4只试管中,加入20 mg CaCO_3 ,仔细混合均匀,向其中3只试管中加入1 ml 0.5%的盐酸羟胺,另1只试管中加入等量的蒸馏水作为对照。然后向4只试管中分别加入1 ml 1%的葡萄糖溶液(作为氢的供体),再用蒸馏水(此蒸馏水需加热沸腾5 min,驱除水中的溶解 O_2 ,然后封闭冷却至室温)补充至5 ml,用 N_2 气流排除试管中的空气,塞上不透气的橡胶塞,摇匀,置于30℃恒温箱中培养5 h。同时作试剂空白对照(不加土壤,其余同样品

处理)。培养结束后,用50 ml蒸馏水将试管内的土水完全转移至100 ml三角瓶中,加入2 ml铝钾矾饱和试剂,振荡10 min后过滤得溶液B备用。

2.2.2 测定方法 标准贮备液的制备:准确称取2.1046 g盐酸羟胺溶于1 L蒸馏水得标准贮备液,其浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,贮存于阴凉处备用。

FeCl₃-醋酸酐法:取10 ml滤液A或B转移至50 ml容量瓶中,加入0.5 ml乙酸酐和0.4 ml FeCl_3 溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显色,定容。标准曲线制备:取10 ml标准贮备液稀释为100 ml($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),取0、1、2、3、4和5 ml稀释为50 ml,得0、2、4、6、8和10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羟胺溶液,显色方法同上。

硫酸铁铵-邻菲罗啉法:取1 ml滤液A或B转移至50 ml容量瓶中,分别加入1 ml缓冲溶液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钠溶液与 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸溶液混合)、1 ml硫酸铁铵溶液($0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和1 ml邻菲罗啉乙醇溶液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显色,定容。标准曲线制备:取1 ml标准贮备液稀释为100 ml($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),取0、1、2、3、4和5 ml稀释为50 ml,得0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羟胺溶液,显色方法同上。

硫酸铁铵-联吡啶法:取1 ml滤液A或B转移至50 ml容量瓶中,分别加入1 ml硫酸铁铵溶液($0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和1 ml联吡啶乙醇溶液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显色,定容。标准曲线配制方法同硫酸铁铵-邻菲罗啉法,显色方法同上。

对苯醌法:取5 ml滤液A或B于试管中,加入4 ml乙醇和1 ml对苯醌乙醇溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),振荡使液体充分混匀,显色。标准曲线配制:取10 ml标准贮备液稀释为100 ml($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),分别取0、1、2、3、4和5 ml于试管中并用蒸馏水将溶液体积补充为5 ml,显色方法同上,得到0、10、20、30、40和50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的羟胺溶液。

碘量法:取10 ml滤液A或B于三角瓶中,加入1 ml 1%淀粉溶液,用已知浓度的碘的碘化钾溶液(I_2 的最佳浓度范围 $3.0 \times 10^{-4} \sim 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行滴定。当溶液呈蓝色且在半分钟内不退色即为滴定终点。

以上各种方法所需要的显色环境、显色时间和分光光度法所需要的比色波长见表2。

表 2 5 种分析方法的应用条件

Tab. 2 Applied conditions of five analytic methods

显色剂	介质	pH	显色温度 ($^{\circ}\text{C}$)	显色时间 (min)	颜色	比色波长 (nm)	最佳浓度
FeCl_3 -醋酸酐	水	中性	20	5-10	褐色	600	
硫酸铁铵-邻菲罗啉	水	2~9	20	1-10	橘红色	510	0.4~15 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
硫酸铁铵-联吡啶	水	4.6~6.6	20	1-10	橙色	520	0.4~10 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
对苯醌	乙醇-水	中性	30	65	棕色	495	6~80 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
淀粉- I_2	水	中性	20		蓝色		

2.2.3 计算方法 土壤中羟胺还原酶活性的计算公式为：

$$A = [(S_1 - (S_2 - S_3))V_1V_2/1000V_3] / M$$

式中 A 为土壤羟胺还原酶活性 ($\text{mg NH}_2\text{OH} \cdot \text{g}^{-1} \text{土} \cdot 5 \text{h}^{-1}$)， S_1 为试剂空白中的 NH_2OH 含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)， S_2 为样品中的 NH_2OH 含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)， S_3 为样品对照中的 NH_2OH 含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)， V_1 为浸提

液总体积 (ml)， V_2 为显色时定容后的溶液体积 (ml)，1 000 为单位转换系数， V_3 为测定时所取滤液体积， M 为称土样恒量。

3 结果与分析

应用 5 种分析测试方法测定的不同处理土壤的羟胺还原酶活性见表 3。

表 3 5 种分析方法测定不同处理土壤羟胺还原酶活性

Tab. 3 Hydroxylamine reductase activities of different treatments measured by five analytic methods

方法	土壤编号	培养浸提方法	羟胺还原酶活性 ($\text{mg NH}_2\text{OH} \cdot \text{g}^{-1} \text{土} \cdot 5 \text{h}^{-1}$)	标准差	同种方法测定不同土壤的差异显著性 ($P < 0.01$ $P < 0.05$)	不同方法测定同种土壤的差异显著性 ($P < 0.01$ $P < 0.05$)
FeCl_3 -醋酸酐法 $r^* = 0.9882$	1	1**	0.747	0.027	B b	A a
		2***	0.724	0.057	B b	A a
	2	1	0.633	0.028	A a	A a
		2	0.625	0.046	A a	A a
	3	1	0.974	0.069	C c	A a
		2	0.955	0.032	C c	A a
硫酸铁铵-邻菲罗啉法 $r = 0.995$	1	1	0.718	0.010	B b	A a
		2	0.724	0.034	B b	A a
	2	1	0.610	0.013	A a	A a
		2	0.617	0.027	A a	A a
	3	1	0.922	0.006	C c	A a
		2	0.914	0.022	C c	A a
硫酸铁铵-联吡啶法 $r = 0.994$	1	1	0.709	0.004	B b	A a
		2	0.702	0.043	B b	A a
	2	1	0.618	0.017	A a	A a
		2	0.624	0.032	A a	A a
	3	1	0.912	0.010	C c	A a
		2	0.931	0.025	C c	A a
对苯醌法 $r = 0.914$	1	1	0.734	0.035	B b	A a
		2	0.716	0.020	B b	A a
	2	1	0.721	0.053	B b	B b
		2	0.631	0.043	A a	A a
	3	1	0.928	0.044	C c	A a
		2	0.930	0.024	C c	A a
碘量法	1	1	0.725	0.010	B b	A a
		2	0.708	0.016	B b	A a
	2	1	0.616	0.014	A a	A a
		2	0.625	0.041	A a	A a
	3	1	0.931	0.023	C c	A a
		2	0.940	0.028	C c	A a

* r 为羟胺浓度与吸光度的相关系数 $r_{0.05} = 0.707$ $r_{0.01} = 0.834$ ，下同；** 1 为采用改进后的培养浸提方法所得到的数据；*** 2 为采用哈兹耶夫(1980)的培养浸提方法所得到的数据。

3.1 培养方法改进的依据

土壤中羟胺还原酶同土壤中其它还原酶类一样,测定过程中均需要厌氧培养条件。哈兹耶夫(1980)测定土壤中羟胺还原酶活性的方法,培养是在带磨口塞的瓶中进行,培养时需在10~12 mm汞柱压力下抽出瓶中空气以创造厌氧环境。这种方法步骤比较繁琐,需要专用的试剂瓶和抽滤装置进行抽真空培养,且试验的厌氧培养程度随装置的不同、培养批次的不同具有差异性和不确定性(武志杰等2005)。本试验则是通过液封保持厌氧环境。将蒸馏水煮沸, O_2 在水中的溶解度急剧减小,将其密封冷却后加入到盛有土壤样品的试管中形成3~5 cm水封,其效果与在土水混合物中通入 N_2 气流3 min效果是一致的(武志杰等2005)。同时在试管中通入 N_2 排出水面以上的空气,阻止 O_2 进一步溶入水中。由表3可以看出,应用2种培养方法所测得的羟胺还原酶活性均未达到显著差异($P > 0.05$),可见改进后的培养浸提方法在准确度方面是有保证的。从碘量法(黄尚勋2000)的测定结果(表3)可以看出,应用这种培养方法所得数据的标准差较小,处理1、处理2和处理3的变异系数(CV)分别只有1.34、2.27和2.50,这说明改进后的培养方法与原来的方法相比较,排除了由于试验条件引起的差异和不确定性,增强了重复性,提高了测量的精密度,简化了试验的操作步骤。

3.2 $FeCl_3$ -醋酸酐法的准确度和精密度

$FeCl_3$ -醋酸酐法是哈兹耶夫(1980)所推荐使用的方法。表2给出了应用 $FeCl_3$ -醋酸酐法的显色介质、pH、显色温度、显色时间、颜色和比色波长等参数(哈兹耶夫,1980)。该方法的显色机理为被羟胺还原所得的 Fe^{2+} 离子与醋酸酐的羰基作用而显褐色,测定 Fe^{2+} 离子的浓度,即可间接测定原溶液中羟胺的浓度。在2~10 $mg \cdot L^{-1}$ 羟胺浓度与吸光度的相关系数为0.988。与碘量法相比虽然2种方法得到的差异显著性相同(表3),但所测得的羟胺还原酶活性偏大,应用改进后的培养方法所测得的处理1、处理2和处理3分别达到3.0%、2.8%和4.6%。这种差异可能是由于醋酸酐和 Fe^{2+} 形成配合物时的稳定常数较低(大连理工大学无机化学教研室2000),导致所测定的溶液中的羟胺浓度偏低有关。应用此法所测定的羟胺还原酶活性的标准差也较碘量法高2~3倍,说明该方法在测量精密度方面也有所欠缺。

3.3 硫酸铁铵-邻菲罗啉法的准确度和精密度

硫酸铁铵-邻菲罗啉法的显色机理为硫酸铁铵溶液中的 Fe^{3+} 将溶液中的羟胺氧化为氮气,而自身被还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与加入的邻菲罗啉(Phen)发生配合反应生成的三邻菲罗啉合亚铁离子($Fe(Phen)_3^{2+}$)显橘红色(杨明,1999;姜林华等,2005),而过量的邻菲罗啉与剩余 Fe^{3+} 配合生成无色的三邻菲罗啉合铁离子($Fe(Phen)_3^{3+}$),因而可以通过比色测定 $Fe(Phen)_3^{2+}$ 的生成量来衡量溶液中羟胺的量。有研究表明,在pH为2~9内 $Fe(Phen)_3^{2+}$ 的吸光度不随pH值而变化(武汉大学等,1978),故本试验采用醋酸钠和醋酸的混合液作为缓冲溶液,使显色反应体系pH保持在2~9。

此种方法的最佳测量浓度为羟胺含量在0.4~15 $mg \cdot L^{-1}$,而试验时的羟胺浓度恰好在此范围内。表3给出了应用此法所测定的羟胺还原酶活性的相关数据。与碘量法相比较,各处理的差距均不高于1.0%,测量标准差也有所减小,说明硫酸铁铵-邻菲罗啉法是测定羟胺还原酶活性的适宜方法之一。

3.4 硫酸铁铵-联吡啶法的准确度和精密度

硫酸铁铵-联吡啶法的显色机理与硫酸铁铵-邻菲罗啉法大致相同,即被羟胺还原得到的 Fe^{2+} 与加入的联吡啶发生配合反应生成的三联吡啶合亚铁离子($Fe(Dipd)_3^{2+}$)在微酸性条件下显橙色,而过量的联吡啶与剩余 Fe^{3+} 配合的生成物为无色,因而可以通过比色间接测定溶液中羟胺的浓度(马卫兴和刘文明,1993)。表3表明,应用此法所测定的羟胺还原酶活性的标准差较小,即此种方法的精密度较高。但与碘量法相比较,所测定的羟胺还原酶活性均偏低。这可能是 Fe^{3+} -联吡啶配合物经缓慢的光还原作用而转化为 Fe^{2+} -联吡啶配合物导致羟胺测定浓度偏高所造成(马卫兴和刘文明,1993)。因此,可以通过减少显色时间或通过待测溶液中加入少量NaF溶液,掩蔽未被还原的 Fe^{3+} 离子,阻止光还原反应的发生来减小应用此法所造成的系统误差。

3.5 对苯醌法的准确度和精密度

对苯醌法的显色机理与上述几种分析方法有所不同。羟胺分子中的胺氮原子有孤对电子,可以作为电子的给予体,与对苯醌发生荷移反应生成荷移配合物(张辉等,1996)而显棕色。在本试验中应用对苯醌法作标准曲线时,羟胺浓度与吸光度的相关系数为0.914,低于上述3种分光光度法的相关系

数。而以吸光度为羟胺浓度的二次函数进行拟合时,相关系数却高达 0.998,可见本试验所测定的羟胺浓度并未落在应用对苯醌法的最佳羟胺浓度范围内。从表 2 可见,应用本分析方法的羟胺最佳浓度为 $6 \sim 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (黄薇, 2004),这一浓度高于本试验浸提液的浓度。从这一方面分析,应用对苯醌法测定土壤中羟胺还原酶活性存在较大系统误差是正常的。另外,由于对苯醌与羟胺的反应是一个缓慢的荷移反应,需要在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 显色 65 min (表 2) 才能达到稳定,降低了测定的精确性和实效性,使其测定精密度也较上述几种方法有所降低,测量结果标准差较大。

4 结 论

用煮沸并密封冷却的蒸馏水形成 3~5 cm 的液封,同时用惰性气流(本试验用 N_2 气流)排除液面以上的空气,能够创造测定土壤中羟胺还原酶活性需要的厌氧环境。与以前应用的抽真空法相比较,减少培养时厌氧程度的不确定性和试验步骤的复杂性,增加培养试验的可操作性。

应用硫酸铁铵-邻菲罗啉法测定浸提液的羟胺浓度,与应用碘量法所测定的结果非常接近,与其它分光光度法测量结果相比较,具有较高的准确度和精密度,是测定土壤中羟胺还原酶活性的理想方法。

FeCl_3 -醋酸酐法、硫酸铁铵-联吡啶法和对苯醌法都被用于羟胺溶液浓度的测定。但其应用于土壤中羟胺还原酶活性的测定时结果的准确性不及硫酸铁铵-邻菲罗啉法。如何提高其在测定过程中的准确度,还有待进一步研究。

参考文献

- 大连理工大学无机化学教研室. 2000. 无机化学. 北京:高等教育出版社:458.
- 哈兹耶夫 ФХ. (周礼恺,张德生,译). 1980. 土壤酶活性. 北京:科学出版社:45-46.
- 黄尚勋. 2000. 无机及分析化学. 北京:中国农业出版社:344-347.
- 黄树辉,吕军,曾光辉. 2004. 水稻烤田期间 N_2O 排放及其影响因素. 环境科学学报, 24(6):1084-1090.
- 黄薇. 2004. 光谱法测定盐酸羟胺含量的研究. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 33(2):184-185.
- 姜林华,黄晔,龙光锦,等. 2005. 分光光度法测定百色特色蔬菜铁含量的研究. 微量元素与健康研究, 22(4):45.
- 马卫兴,刘文明. 1993. 盐酸羟胺的分光光度测定法. 中国医药工业杂志, 24(7):315-316.
- 史奕,黄国宏. 1999. 土壤中反硝化酶活性变化与 N_2O 排放的关系. 应用生态学报, 10(3):329-331.
- 武汉大学等五校. 1978. 分析化学. 北京:人民教育出版社:399.
- 武志杰,孙志梅,张丽莉. 2005. 一种检测土壤亚硝酸还原酶活性的分析方法. 中国:200510047888.5[P].
- 杨明. 1999. 间接分光光度法测定盐酸羟胺. 化学工业与工程, 16(4):233-235.
- 伊利亚列特季诺夫 AH. (张耀栋等,译). 1985. 含氮化合物在土壤中的转化. 北京:农业出版社:188-193.
- 张辉,冯建章,童沈阳. 1996. 头孢氨苄与苯醌类试剂的荷移反应. 分析化学, 24(4):426-429.

作者简介 史云峰,男,1981年生,博士生。主要从事土壤与植物营养学研究。E-mail: shiyunfeng8189@sina.com
责任编辑 王伟
