

尿素酶抑制剂 NBPT 对大豆幼苗生长的影响

孙庆元,蒙 敏,张雪崧,赵 略,刘 娜

(大连工业大学 生物与食品工程学院,大连 116034)

摘要 尿素作为底肥在土壤尿素酶的作用下快速水解,对大豆幼苗生长产生不良影响。尿素酶抑制剂 NBPT 可抑制土壤尿素酶的活性,但是如何施用 NBPT 既抑制了土壤尿素酶的活性,又不影响大豆幼苗的生长还少有报道。采用盆栽方法研究了 NBPT 对尿素水解速度、大豆出苗、幼苗生长的影响。结果表明,NBPT 对土壤脲酶具有较强的抑制作用,有效浓度在 0.1% ~ 2% 之间。与尿素配合施用 NBPT 有效地减缓了只施用尿素对幼苗的毒害作用,NBPT 与尿素配比为 1: 100 时对大豆出苗有较大的促进作用,可提高 20.7%。配施 NBPT 对大豆幼苗的生长都有明显的促进作用,将 NBPT 比尿素先施 2 d 显示了更好的效果。

关键词 尿素;尿素酶抑制剂;NBPT;大豆幼苗生长

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0897-05

EFFECT OF UREASE INHIBITOR NBPT ON GROWTH OF SOYBEAN SEEDLINGS

SUN Qing-yuan, MENG Min, ZHANG Xue-song, ZHAO Lue, LIU Na

(College of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034)

Abstract The growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings could be decreased with urea applied as base fertilizer soon hydrolyzed with catalysis of soil urease. Urease inhibitor NBPT was known to inhibit urease activity. However, few reports were found how to apply NBPT for decrease the soil urease activity and increase soybean seedling growth. Using pot experiment to study the effects of NBPT on the urea hydrolysis, the seed emergence and seedling growth of soybean. The results showed that NBPT could inhibit efficiently the soil urease activity in the range of 0.1% ~ 2%. The soybean seed emergence rate and seedling growth was increased when NBPT was applied with urea at 1: 100. NBPT applied 2 days earlier than urea showed a higher inhibition activity and a promotion to soybean seed emergence rate and seedling growth.

Key words Urea; Urease inhibitor; NBPT; Growth of soybean seedling

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是粮食作物中含蛋白质较高的作物,氮素对大豆的生长发育至关重要。尿素是目前普遍施用的氮肥。尿素在土壤尿素

酶的作用下,水解为 NH_3 或 NH_4^+ 。然而,大豆对土壤中的 NH_4^+ 非常敏感,能够促进其他作物生长发育的土壤 NH_4^+ 浓度,可能阻碍大豆的生长发育以致减

收稿日期:2007-05-15

基金项目:辽宁省教育厅科研项目(2004D203);大连市重点科研项目(大连计发[2003]99号);辽宁省发酵工程重点实验开放课题(辽发2006-009号)

作者简介:孙庆元(1957-),男,教授,博士,从事尿素酶抑制剂应用及其作用机理研究。Email: qsun@dlpu.edu.cn

产和降低大豆品质。尿素作为底肥很快水解为 NH_3 或 NH_4^+ ,不但容易造成伤苗,而且易于导致 NH_3 挥发和 NH_4^+ 淋失。N-丁基硫代磷酰三胺(NBPT)是抑制土壤尿素酶最有效的化合物之一,使用 NBPT 可以减缓尿素的水解^[1],由此降低土壤中 NH_4^+ 和 NH_3 的浓度,减少尿素对幼苗的毒害并抑制 NH_3 的挥发损失。国外曾有报道施用 NBPT 对解决尿素施用中带来的问题已显示出较好的应用前景^[2-3]。本文探讨以 NBPT 为尿素酶抑制剂对大豆生长的影响,为 NBPT 在大豆施肥中应用提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤 2005 年采自大连工业大学东侧试验地。土壤的基本理化性质:棕壤,有机质含量 12.6 g kg^{-1} ,全氮 0.94 g kg^{-1} ,全磷 0.65 g kg^{-1} ,pH6.92。采集 0~20 cm 表层土壤,经风干、弃去沙石和植物残体,再过 20 目筛,备用。NBPT(主要有效成分为正丁基硫代磷酰三胺[NBPT]),乳白色胶状物,微溶于水,由大连工业大学生物与食品工程学院脲酶抑制剂项目组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 处理 尿素(U,110 mg 尿素 kg^{-1} 土壤)、尿素和 NBPT 配施(UI)、尿素和 NBPT 单独施(U、I),NBPT 先于尿素两天施用(U+I)。其中 I 设五个施用浓度(0、0.1、0.5、1.0 和 2.0,即 10、10.1、10.5、11.0、12.0),按照配施比例的不同分别计算每盆所需的 NBPT 的用量,施用时根据配施比例,取适量的 NBPT 溶液与尿素溶液混匀后施入花盆。NBPT 设 4 个处理和一个对照,处理浓度与 UI 和 U+I 处理的 NBPT 施用浓度一致,3 次重复。

1.2.2 播种 将挑选好的种子用清水洗干净并在水中浸泡。浸泡 2 h 左右,将种子取出,放入培养皿中,上面盖上干净的湿纱布,放入培养箱,在 25~30℃ 温度条件下催芽,待芽露出时,立即播种在 3 L (3 kg 土壤)的花盆里。

1.2.3 大豆生长指标的测定 出苗期间每天记载出苗情况,播种后 14 d 计算出苗率。苗龄 22 d 时考察株高、干重等生长指标,对照各个处理中大豆幼苗的生长情况,以此分析 NBPT 对大豆幼苗生长的影响。

1.2.4 土壤脲酶活性的测定 取 6 个 25 mL 容量瓶,分别加入 5 mL 不同浓度的硫酸氨标准溶液,再加入 2 mL 苯酚钠溶液,仔细混合,加入 1.5 mL 次氯酸钠溶液,充分振荡,放置 20 min。将着色液用分光光度计于 578 nm 处进行比色测定。以铵含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。称取 7.5 g 土壤置于 150 mL 锥形瓶中,加 2 mL 甲苯(抑菌作用)处理 15 min,加入 5 mL 10% 尿素溶液和 10 mL pH7.6 柠檬酸缓冲液,混合均匀。然后置 38℃ 的恒温培养箱中培养 24 h,用 38℃ 蒸馏水稀释至 50 mL,振荡并过滤。取滤液 0.5 mL,加入 2 mL 苯酚钠溶液,并加入 1.5 mL 次氯酸钠溶液,定容至 25 mL。显色 20 min 后,在 722 型可见光分光光度计 578 nm 处测吸光度。对每一土样设置用水代替基质的对照。

土壤脲酶活性以 24 h 后每克土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 毫克数表示。

$$M = (X_{\text{样品}} - X_{\text{无基质}}) \times 100 / 7.5$$

式中:M—土壤脲酶活性值;

$X_{\text{样品}}$ —样品试验中的光密度值在标准曲线上对应的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 毫克数;

$X_{\text{无基质}}$ —无基质对照试验中的光密度值在标准曲线上对应的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 毫克数;

100—样品定容的体积与测定时吸取量的比值;

7.5—称取土壤的克数。

1.2.5 土壤尿素残留量的测定 尿素在强酸、加热的条件下,与二乙酰缩合生成红色的二嗪化合物 4,5-二甲基-2-氧咪唑(Fearon 反应),其颜色深浅与尿素含量成正比^[4]。

取 6 个 25 mL 容量瓶,分别加入 5 mL 不同浓度的硫酸氨标准溶液,再加入 2 mL 苯酚钠溶液,仔细混合,加入 1.5 mL 次氯酸钠溶液,充分振荡,放置 20 min,用水稀释至刻度。将着色液用分光光度计于 578 nm 处进行比色测定。以铵含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

称取 7.5 g 土壤置于 150 mL 锥形瓶中,加 2 mL 甲苯(抑菌作用)处理 15 min,加入 5 mL 10% 尿素溶液和 10 mL pH7.6 柠檬酸缓冲液,混合均匀。然后置 38℃ 的恒温培养箱中培养 24 h,用 38℃ 蒸馏水稀释至 50 mL,振荡并过滤,滤液即为待测液。分别吸取尿素标准液于 10 mL 比色管中,加 10 滴混酸试剂,再加 1.5 mL 二乙酰-一肼溶液,充分摇匀,放人沸

水浴中,20 min 后取出,将着色液在 722 型可见光分光光度计 478 nm 处进行比色测定。以尿素含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。取 5 g 土壤样品,测其在 478 nm 处吸光度。根据标准曲线方程,计算待测液中尿素的含量,再换算为土壤中残余尿素的含量。

土壤尿素残留量以每 5 g 土壤中 $\text{CO}(\text{NH})_2\text{-N}$ 毫克数表示。

$$R = X \times 50 / 1000$$

式中:R—土壤中尿素的残留量;
X—样品试验中的光密度值在标准曲线上对应的 $(\text{CO})_2\text{NH-N}$ 毫克数;
50—样品定容的体积与测定时吸取量的比值。

2 结果与分析

2.1 不同施用浓度的 NBPT 对土壤中尿素水解的影响

尿素施到土壤表层,即可在脲酶的催化作用下水解为碳酸铵,造成氨的挥发。这种转化作用在温度为 20℃ 时需 4~5 d 即可完成^[5-6]。15 d 以后各处理脲酶活性变化基本一致。当浓度大于 1% 时,随其用量的增加,抑制作用提高幅度较小。其抑制效果随施用时间的延长而减弱,施入的前期作用大于后期(数据另文发表)。

不同 NBPT 浓度处理之间比较,随着施用浓度的增加抑制效果明显增强,且各处理均表现出同一趋势。其中 UI1、UI2 处理抑制效果最为明显,施用前 2 d 即表现出较强的抑制能力,第 4、5 天后才陆续进入水解状态,与单施尿素比较要推迟 2~3 d,4 d 后土壤尿素剩余量分别比对照提高了 93.76% 和 76.85%。其次是 UI0.5 处理,而 UI0.1 处理抑制效果最差,4 d 后土壤尿素剩余量分别比对照提高了 52.26% 和 23.46%。这表明在一定范围内,NBPT 抑制作用随着施用浓度的增加而增大,当抑制剂与尿素配比达 1% 时其抑制作用最为显著。当浓度配比大于 1% 时,随其用量的增加,抑制效果变化幅度较小(图 1)。

2.2 不同施用时间的 NBPT 对土壤中尿素水解的影响

从尿素水解的变化趋势看,添加 NBPT 明显降低了尿素的水解速率和水解强度。只施尿素(对照)第 3 天进入水解状态,7 d 后尿素剩余量趋近于

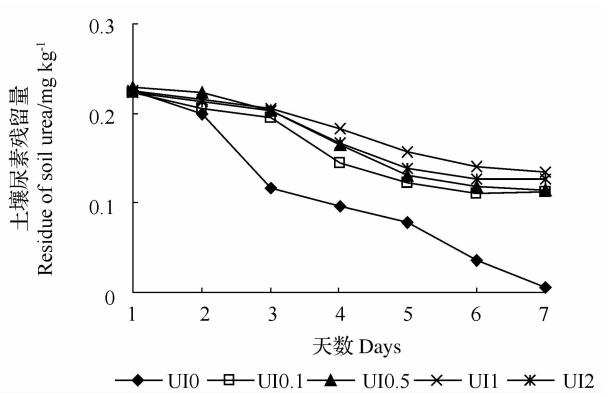


图 1 抑制剂不同施用浓度对尿素水解的影响
Fig. 1 The inhibition effect on urea hydrolysis by different concentration of NBPT

零。施用 NBPT 尿素水解速率降低,到达水解状态时间为 4~5 d,其中 UI1 处理第 4 天土壤尿素剩余量比对照提高了 55.71%。NBPT 先于尿素 2 d 施用(U+I1)表现出比 NBPT 与尿素同时施用(UI1)更强的抑制作用,U+I1 处理第 4 天土壤尿素剩余量比对照提高了 72.62%。7 d 后尿素水解速率逐渐稳定,有效氮的供应期可延长 6~8 d(图 2)。

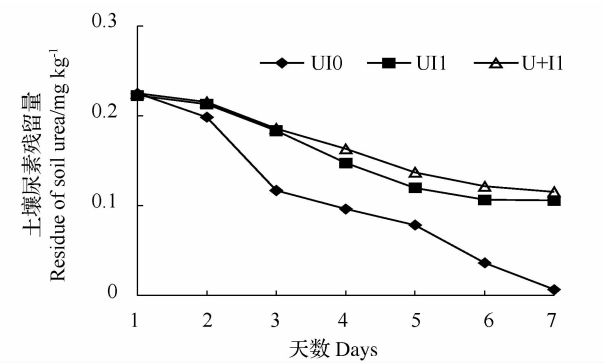


图 2 不同 NBPT 施用时间对尿素水解的影响
Fig. 2 The inhibition effect on urea hydrolysis by different application time

2.3 施用 NBPT 对大豆出苗的影响

随 NBPT 浓度的增加出苗率也随之提高。其中以配比为 0:100 的处理大豆出苗率最低,仅为 32%;而配比为 1:100 的处理最高,为 52.7%。说明 NBPT 的添加有助于大豆出苗。这可能是因为尿素水解提高了土壤溶液中的 NH_4^+ 和 NH_3 浓度,抑制了大豆种子的萌发。NBPT 的添加,减缓尿素的水解,延长施肥点处尿素向外的扩散时间,降低了土壤溶液中 NH_4^+ 的浓度,缓解了氮肥对大豆幼苗生长发育的不利影响,从而减小了尿素对大豆幼苗的毒害作用。NBPT 浓度对大豆出苗率的影响不大,在本

实验范围之内,均高于不添加 NBPT 的尿素处理。说明 NBPT 的单独施用不会对大豆出苗产生不利影响(图 3、4)。

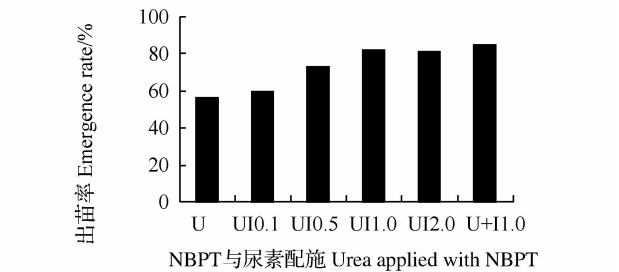


图 3 不同 NBPT 与尿素配施浓度对大豆出苗的影响

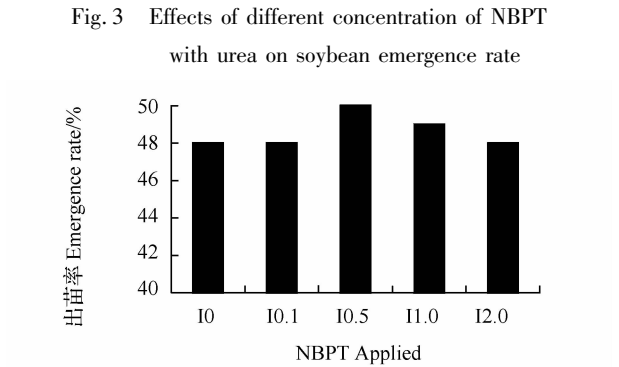


图 4 不同 NBPT 浓度对大豆出苗的影响

Fig. 4 Effects of different concentration of NBPT on soybean emergence rate

2.4 施用 NBPT 对大豆幼苗生长的影响

低剂量氮对大豆幼苗生长有明显的促进作用,而提高施氮量则表现明显抑制大豆幼苗生长,其抑制程度随着生育进程而减轻^[7]。在盆栽试验大豆出苗后第 30 天,在大豆苗期,添加不同配比的 NBPT 较只施用尿素的根冠比均有不同程度的提高。说明配加 NBPT 可以促进大豆生长前期根系的生长(表 1)。在只施用 NBPT 的处理中,各处理的根冠比、株高、株干重都没有明显差异。说明 NBPT 本身对前期大豆根系几植株的生长没有明显影响(表 2)。NBPT 与尿素配合施用,不同处理与对照相比对大豆幼苗生长均有促进作用。配加 NBPT 的处理在第 20 天时的大豆株高、干重等指标均高于对照,提高幅度高达 111.76%(表 3)。

出苗后 20 d,各处理的根冠比都有很大程度的提高。UI 各处理中,NBPT 与尿素的配施量为 1: 100 时(UI1)的处理根冠比最高,达到 0.18,比对照提高了 100%。说明 NBPT 可抑制尿素过量水解并提供大豆根系的建立有促进作用。提前施用 NBPT 的处理(U + I1)根冠比达到 0.20,比对照提高了

122%。提前施用 NBPT 更有利于 NBPT 与土壤脲素酶的结合从而抑酶效果适度。大豆根系生长得到促进后必然反映到大豆植株地上部分的生长,株高和干重得到快速积累。UI 各处理与对照相比都有明显的增加,但处理 UI1 和 UI2 差异不大,说明 NBPT 的施用浓度达到 1% 后,已达到饱和抑制,再提高浓度可导致 NBPT 的抑制过强而影响根系的生长(表 3)。随着幼苗的生长,虽然各处理的根冠比、株高和干重的增加速度比出苗后 20 天有所下降,但与对照相比仍保持较大的差异。结果表明 NBPT 可促进大豆根系及地上部分的生长。

表 1 与尿素不同配比的 NBPT 对大豆生长的影响
Table 1 Effect of urea treated by different amount of NBPT on growth of pot cultured soybean

| | NBPT 与尿素配比 NBPT:urea | | | | | |
|----------------------------|----------------------|-----------|---------|---------|----------|--|
| | 0: 1000 | 0.5: 1000 | 1: 1000 | 5: 1000 | 10: 1000 | |
| 株高 Plant height/cm | 35.83 | 33.00 | 34.65 | 33.33 | 36.33 | |
| 叶片数 Leaf number | 24 | 21 | 22 | 21 | 22 | |
| 株干重 Plant dry mass/g | 7.78 | 7.70 | 7.82 | 7.98 | 8.01 | |
| 根干重 Root dry mass/g | 1.26 | 1.41 | 1.66 | 1.94 | 1.63 | |
| 根冠比 Ratio of root/shoot | 0.16 | 0.18 | 0.21 | 0.24 | 0.20 | |

表 2 不同浓度的 NBPT 对大豆生长的影响
Table 2 Effect of different concentration of NBPT on growth of pot cultured soybean

| | NBPT 浓度 NBPT concentration/mg kg ⁻¹ | | | | |
|-------------------------|--|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0.033 | 0.067 | 0.333 | 0.667 |
| 株高 Plant height/cm | 32.33 | 32.13 | 32 | 31.67 | 32.67 |
| 叶片数 Leaf number | 20 | 19 | 19 | 20 | 22 |
| 株干重 Plant dry mass/g | 6.15 | 6.33 | 6.93 | 6.91 | 7.04 |
| 根干重 Root dry mass/g | 0.94 | 1.02 | 1.13 | 1.14 | 1.17 |
| 根冠比 Ratio of root/shoot | 0.15 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.17 |

表 3 抑制剂对大豆生长的影响
Table 3 Effect of urease inhibitor on growth of soybean

| 出苗后天数 Days after emergence | 处理 Treatment | 株高 Plant height/cm | | 干重 Dry mass/g | | 根冠比 Ratio of root/shoot | |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|-------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | 平均值 | 增高 | 平均值 | 增重 | 平均值 | 提高 |
| | | average | Increased/% | average | Increased/% | average | Increased/% |
| 20 | UI0 | 5.0 | — | 3.4 | — | 0.09 | — |
| | UI0.1 | 5.4 | 8.00 | 4.1 | 20.59 | 0.12 | 33.33 |
| | UI0.5 | 6.7 | 34.00 | 4.9 | 44.11 | 0.14 | 55.56 |
| | UI1 | 8.8 | 76.00 | 7.0 | 105.88 | 0.18 | 100.00 |
| | UI2 | 8.9 | 78.00 | 6.9 | 102.94 | 0.15 | 66.67 |
| | U + UI | 9.2 | 84.00 | 7.2 | 111.76 | 0.20 | 122.22 |
| 30 | U | 10.1 | — | 5.3 | — | 0.18 | — |
| | UI0.1 | 11.7 | 15.84 | 6.0 | 13.21 | 0.20 | 11.11 |
| | UI0.5 | 12.9 | 17.82 | 6.9 | 30.19 | 0.23 | 27.78 |
| | UI1 | 15.6 | 54.46 | 10.8 | 103.77 | 0.31 | 72.22 |
| | UI2 | 15.3 | 51.49 | 10.5 | 98.11 | 0.30 | 66.67 |
| | U + UI | 16.2 | 60.40 | 11.2 | 111.32 | 0.35 | 94.44 |
| 40 | U | 14.8 | — | 8.6 | — | 0.25 | — |
| | UI0.1 | 15.7 | 6.08 | 9.4 | 9.30 | 0.27 | 8.00 |
| | UI0.5 | 16.4 | 10.81 | 11.7 | 36.04 | 0.33 | 32.00 |
| | UI1 | 20.8 | 40.54 | 15.8 | 83.72 | 0.48 | 92.00 |
| | UI2 | 20.6 | 39.19 | 15.3 | 77.91 | 0.43 | 72.00 |
| | U + UI | 22.4 | 51.35 | 16.1 | 87.21 | 0.49 | 96.00 |

3 结论

NBPT 对土壤脲酶具有较强的抑制作用,有效浓度在 0.1% ~ 2% 之间,并且随着施用浓度增大,抑制作用增强。将 NBPT 比尿素先施 2 d,结果显示可改善抑制效果。与尿素配合施用 NBPT 有效地抑制了只施用尿素对幼苗的毒害作用并提高了施用尿素氮对大豆作物的有效性,NBPT 与尿素配比为 1:100 时对大豆出苗有较大的促进作用。大豆出苗可提高 20.7%。配施 NBPT 对大豆幼苗的生长都有明显的促进作用,将 NBPT 比尿素先施 2 d 显示了更好的效果。

参 考 文 献

[1] Vlekp L G,Stumpe J M,Byrnes B H. Urease activity and inhibi-

tion in flooded soil systems[J]. Fertilizer Research,1980,1(3): 191 – 202.

[2] Bremner J M,Chai H S. Evaluation of N-butyl phosphorothioic triamide for retardation of urea hydrolysis in soil [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis,1986,17:337 – 351.

[3] Grant C A,J I S,Brown K R,et al. Volatile losses of urea from surface applied urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitor NBPT[J]. Canada Journal of Soil Science,1996,76: 417 – 419.

[4] 林新坚,陈济琛,郑时利,等. NBPT 产生菌筛选和抑制剂的提取[J]. 微生物学通报,1997,24(6):323 – 326.

[5] 程东娟,刘树庆,王殿武,等. 长期定位培肥对土壤酶活性及土壤养分动态变化影响[J]. 河北农业大学学报,2003,26(3): 33 – 36.

[6] 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.

[7] 汤树德,徐凤花,隋文志. 保护性施氮对大豆生育和产量的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,1995,8(2):15 – 24.