

## 尿素酶抑制剂 NBPT 对大豆根系的影响

孙庆元<sup>1</sup>, 张雪崧<sup>2</sup>, 赵 略<sup>1</sup>, 刘 娜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁大连 116034; <sup>2</sup>大连工业大学化工与材料工程学院, 辽宁大连 116034)

**摘 要:**大豆根系特别是与大豆共生的根瘤菌对土壤中的  $\text{NH}_4^+$  非常敏感, 尿素酶抑制剂 NBPT 能够抑制土壤尿素酶的活性并减缓  $\text{NH}_4^+$  的水解速率已得到广泛的认同。为探索利用 NBPT 提高大豆生长发育的途径, 对施用 NBPT 的大豆, 利用氧化还原法, 乙炔还原法和凯氏定氮法分别测定了大豆根系活性, 根瘤固氮活性和植株含氮量, 并测定了大豆根瘤的数量和重量。结果表明, NBPT 提高了大豆整个生长期的根系活力, 对根瘤固氮酶活性有促进作用, 根瘤数量和重量都有增加, 因而大豆植株的含氮量也随之增加, 根系生长得到促进。NBPT 作为氮素由于施用量小对大豆根系及根瘤的作用有限。

**关键词:**尿素; NBPT; 大豆根系; 大豆根瘤

## Effect of Urease Inhibitor NBPT on Growth of Soybean Roots

SUN Qing-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Xue-song<sup>2</sup>, ZHAO Lue<sup>1</sup>, and LIU Na<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning; <sup>2</sup>College of Chemical Engineering and Material, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

**Abstract:** Soybean roots and particular the symbiosis root nodules are vulnerable to the  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NH}_3$  in the soil. NBPT as soil urease inhibitor has been known to inhibit the urease activity in the soil and therefore deduce the hydrolysis velocity of urea. The purpose of this study was to find a way to increase soybean growth using NBPT. In this study, NBPT mixed proportionally with urea and NBPT without urea were applied to the soybean plants to analyze the effect of NBPT on the soybean root growth in root vigor, root nodule number and weight, and the activity of nitrogen fixation of root nodule. Results showed that NBPT mixed proportionally with urea increased the soybean root vigor, root nodule number and weight, the root nitrogen (N) fixation activity, and therefore the root growth was increased by a high content of N in the soybean plant. NBPT as a fertilizer applied was beneficial to soybean root growth. However, the effect of NBPT used as a fertilizer for N was limited.

**Key words:** Urease; NBPT; Soybean root growth; Soybean root nodule

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill) 是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  $\text{NH}_3$  或  $\text{NH}_4^+$ 。然而, 大豆根系特别是与大豆共生的根瘤菌对土壤中的  $\text{NH}_4^+$  非常敏感, 能够促进其他作物生长发育的土壤  $\text{NH}_4^+$  浓度, 可能阻碍大豆的根系生长发育以致减产和降低大豆品质 (刘娜等, 2007)。因此, 一方面大豆在生长发育过程中需要大量的 N 素, 另一方面土壤中 N 素过多反而影响大豆的生长发育降低大豆的产量。这是一个“氮素和根瘤菌平衡”的大豆生长机制问题。N-丁基硫代磷酰三胺 (NBPT) 是目前抑制尿素酶活性从而降

低尿素水解速率的最有效的化合物之一 (Bremner and Chai, 1986; Carter and Rennie, 1984; 宋志远等, 2006; 孙庆元等, 2007), 美国在玉米生产中施用 NBPT 减缓尿素水解速率提高尿素的利用率已取得成功 (Rozas et al., 1999)。NBPT 能够抑制土壤尿素酶的活性减缓  $\text{NH}_4^+$  的水解速率已得到广泛的认同 (刘娜等, 2006; 林新坚等, 1997; Malhi and Nybory, 1984; 赵略等, 2007)。然而, NBPT 能否打破低的“氮素和根瘤菌平衡”达到一个高的“氮素和根瘤菌平衡”, 从而促进大豆根系生长还未见报道。本研究将 NBPT 与尿素配合施用对大豆根活力和根瘤等的影响进行了分析, 试图找到一个利用 NBPT 提高

收稿日期 (Received): 2007-06-05; 接受日期 (Accepted): 2007-07-23

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)

作者简介: 孙庆元 (1957-), 男, 博士, 教授, 从事尿素酶抑制剂应用及其作用机理研究。Tel: 0411-86323740; E-mail: qsun@dlpu.edu.cn

通讯作者 (Corresponding author): 张雪崧。Tel: 0411-86323608; E-mail: zxs263@163.com

大豆生长发育的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

NBPT(含氮 25%,含磷 19%)乳白色胶状物,微溶于水,由大连工业大学尿素酶抑制剂项目组提供。尿素含氮 46%(辽宁华锦集团)。大豆品种采用辽豆 11 号。

### 1.2 试验设计

2005~2006 年试验小区选自大连工业大学东侧试验地,前茬为草坪。土壤为棕壤,有机质含量 1.3%、全氮 0.1%、全磷 0.07%、pH6.9。

1.2.1 处理 尿素(U)130 kg hm<sup>-2</sup>、NBPT(I)、尿素+NBPT(UI)。I 设 4 个施用水平(0、0.13、0.65、1.30 kg hm<sup>-2</sup>,施用根据配施比例,取适量的 NBPT 溶液与尿素混匀后施入土壤。UI 与 I 的 NBPT 施用水平一致,U:I 分别为 100:0、1000:1、1000:5、1000:10。小区面积为 10 m<sup>2</sup>,随机区组设计,3 次重复。

1.2.2 播种定植和取样 将挑选好的种子浸泡 2 h 左右,将种子取出,在 25~30℃ 温度条件下催芽后播种,定植密度在 20 株 m<sup>-2</sup>。随机 5 点取样,每点取 1 株,根系洗净后 86℃ 烘干 72 h 后,称干重。

### 1.3 测定项目和方法

1.3.1 大豆根系活力的测定 氯化三苯基四氮唑(TTC)是标准氧化还原电位为 80 mV 的氧化还原物质,溶于水中成为无色溶液,但还原后即生成红色而不溶于水的三苯基甲臜(TTF),植物根系脱氢酶活性可引起 TTC 还原,TTC 还原量来表示并根系的活力。

把大豆根洗净,用滤纸吸干水分,放入研钵中,加乙酸乙酯 3~4 mL 和少量的石英砂,充分研磨,以提出 TTF。把红色提取液移入刻度试管,并用少量乙酸乙酯把残渣洗涤 2~3 次,全部移入刻度试管,最后加乙酸乙酯定容至 10 mL,用 722 分光光度计在波长 485 nm 处测定吸光度(OD 值),查标准曲线,即可求出 TTC 还原量。以还原产生的三苯基甲臜(TTF)量表示其活力大小,土样中全部根量每小时所还原产生的 TTF 称为 TTC 还原量,TTC 还原量与根重之比值称为 TTC 还原强度(赵略等,2007)。

1.3.2 大豆植株总氮含量的测定 测定植株中总氮含量采用微量凯氏定氮法。准确称取干燥处理并研细后的植株样品 1g,移入干燥洁净的 250 mL

凯氏烧瓶中,然后加入研细的硫酸铜 0.2 g、硫酸钾 3 g 和浓硫酸 20 mL,进行消化和蒸馏处理用标定后的盐酸标准溶液滴定至微红色为终点。

1.3.3 大豆根瘤固氮活性的测定 用乙炔还原法测定大豆根瘤的固氮活性。准确称取 0.5 g 根瘤置于 10 mL 瓶中密封,注入 1 mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,28℃ 保温 4 h。然后用注射器吸出 1 mL 气体,用气相色谱仪测定其固氮酶活性。固氮酶活性以 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mg<sup>-1</sup>根瘤鲜重 min<sup>-1</sup>表示(刘娜等,2006)。

## 2 结果与分析

### 2.1 NBPT 对大豆根系活力的影响

根系活力是指根系新陈代谢活动的强弱,是反映根系吸收功能及植物生长的重要生理指标之一。大豆在生长期其根系活力均呈现先增加、至开花期达到高峰、而后逐渐降低的变化规律。各生长期添加抑制剂的处理与对照相比根系活力具有明显差异(图 1),在苗期各处理根系活力分别比对照提高了 66.07%、123.21%、398.21%、396.43% 和 430.36%。在成熟期各处理根系活力分别比对照提高了 16.17%、47.66%、101.70%、100.43% 和 106.81%。可见尿素对大豆根系活力具有一定的刺激作用,添加脲酶抑制剂降低了尿素的水解速率,延长了施肥点处尿素的扩散时间,降低了土壤溶液中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NH<sub>3</sub> 的浓度(数据另文发表),从而减少对根系的毒害。

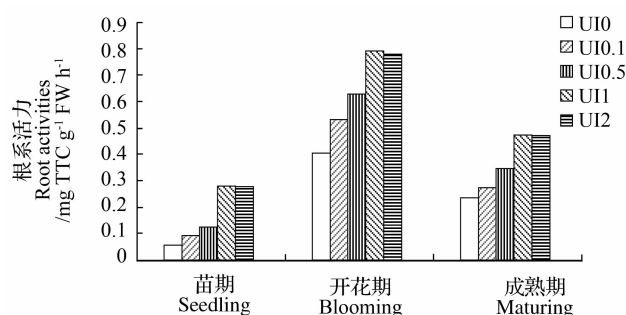


图 1 NBPT 对大豆根系活力的影响

Fig. 1 Effects of urease inhibitor on root activities of soybean

添加 NBPT 明显地提高了大豆整个生长期的根系活力,延缓了大豆根系的衰老,对保持大豆根系对养分的吸收能力具有重要意义,同时可以延缓地上部分特别是叶片的衰老,保持后期叶片的光合作用,对大豆产量的提高产生积极的影响。

### 2.2 NBPT 对大豆根瘤的影响

从苗期开始根瘤数目逐渐增加,至结荚期达到

顶峰后根瘤数又逐渐减少,在盛花期的根瘤数相对于前期增长的幅度最大。

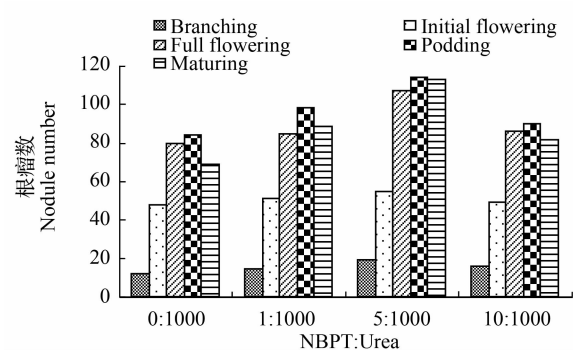


图2 尿素酶抑制剂与尿素比对大豆根瘤数的影响  
Fig.2 Effect of NBPT and Urea on soybean nodule number

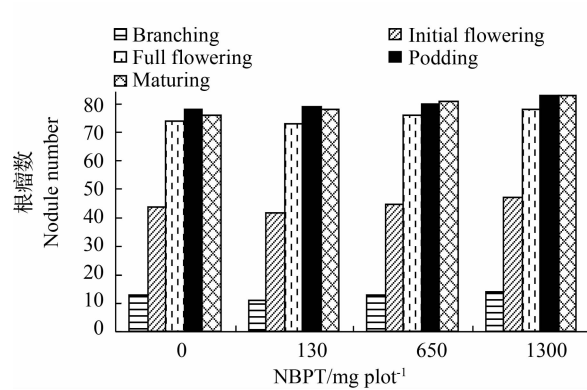


图3 尿素酶抑制剂施用量对大豆根瘤数的影响  
Fig.3 Effect of NBPT on soybean nodule number

与尿素配施各个处理比对照,在结荚期平均每株根瘤数分别增加 16.7%、35.7%和 7.1%,其中以 5:1000 的配比处理表现最好。只施 NBPT 各处理,随施用浓度的增加根瘤数量越多,但影响幅度没有与尿素配加的处理明显。在结荚期浓度为 13、65、130 mg m<sup>-2</sup> 的处理平均每株根瘤数比对照分别增加了 1.3%、2.3%和 6.4%。

各个处理中根瘤干重均随着植株生长期的延长而逐渐增加,在结荚期达到最大值后根瘤干重又逐渐减少,与各个处理根瘤数在生长期的变化趋势相似,根瘤干重也是在盛花期相对于前期的增长幅度最大,如表 1 所示。

在与尿素配施的各个不同比例之间进行比较,与尿素配比 1:1000、5:1000、10:1000 的处理比对照不添加的尿素处理(即配比为 0:1000 的处理),在结荚期根瘤干重分别增加 12.8%、23%和 14.9%,以配比为 5:1000 的处理根瘤生长最好。单独施用不同浓度的处理在植株生长各阶段根瘤生长情况,随施用浓度的增加表现越好,但影响是微弱的。在结荚期浓度为 13、65、130 mg m<sup>-2</sup> 的处理平均每株根瘤干重分别增加 7.5%、10.2%和 13.9%。

不同处理对大豆根瘤固氮酶活性的影响不同,如表 2 所示。单独施用尿素处理在始花期和盛花期根瘤固氮酶活性比空白处理分别低 1.5%和 8.4%,在结荚期和成熟期比对照分别高 1.6%和 0.8%。尿素配施 NBPT 的处理与对照相比,大豆根瘤固氮酶活性均高于对照,其中以配施比例为 5:1000 的处

表 1 NBPT 对大豆根瘤重量的影响

生育时期 Growth stage	Table1 Effect of NBPT on nodule weight of soybean				g plant <sup>-1</sup>			
	NBPT:尿素 (Urea)				NBPT / mg plot <sup>-1</sup>			
	0:1000	1:1000	5:1000	10:1000	0	130	650	1300
苗期 Seedling	0.22	0.23	0.25	0.25	0.23	0.22	0.23	0.23
始花期 Initial flowering	0.63	0.81	0.92	0.75	0.53	0.55	0.55	0.58
盛花期 Full flowering	0.96	1.52	1.65	1.34	0.90	0.90	0.95	0.97
结荚期 Podding	2.35	2.65	2.89	2.70	1.87	2.01	2.06	2.13
成熟期 Maturing	2.07	2.13	2.58	2.19	1.73	1.78	1.79	1.85

表 2 NBPT 配施尿素对大豆根瘤固氮酶活性的影响

Table 2 Effect of NBPT and urea on nitrogenase activity of nodule  
nmolC<sub>2</sub>H<sub>4</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>

NBPT 和 尿素 (Urea)	始花期 Initial flowering	盛花期 Full flowering	结荚期 Podding	成熟期 Maturing
0:0	4.10	8.66	10.25	8.11
0:1000	4.04	7.99	10.09	8.05
1:1000	4.09	9.42	10.29	8.23
5:1000	4.26	9.64	11.24	8.42
10:1000	4.44	9.44	10.79	8.02

理在结荚期时比对照根瘤固氮酶活性增加最多,为 13.2%。高浓度氮的处理会使大豆根瘤固氮酶活性受到抑制,固氮能力减弱,所以在单施尿素处理中始花期和盛花期根瘤固氮酶活性会比对照降低,随着大豆作物的生长,尿素的这种对根瘤固氮酶活性的抑制作用逐渐变弱,与对照几乎没有区别,甚至比对照有所提高。

在尿素中配施 NBPT 后,NBPT 减缓了尿素的水

解,降低了高浓度氮处理对大豆根瘤固氮活性的抑制程度,使得配施 NBPT 的各个处理在整个生育期的根瘤固氮酶活性比照都是有所提高的。

在单独施用 NBPT 的处理中,从低浓度到高浓度 NBPT 对大豆根瘤固氮酶活性的影响逐渐增大,浓度较高的单施 NBPT 处理对大豆根瘤固氮酶活性有促进作用。

表 3 NBPT 对大豆根瘤固氮活性的影响

Table 3 Effect of NBPT on nitrogenase activity of nodule

nmolC<sub>2</sub>H<sub>4</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>

NBPT /mg plot <sup>-1</sup>	始花期 Initial flowering	盛花期 Full flowering	结荚期 Podding	成熟期 Maturing
0	4.10	8.72	9.93	7.99
130	4.09	8.82	9.44	8.06
650	4.18	8.40	10.05	8.13
1300	4.37	8.97	10.13	8.44

2.3 NBPT 对植株总氮含量的影响

随着植株的生长,植株中总氮含量在结荚初期达到最高值,在成熟期又有所下降。NBPT 与尿素配施为 1:1000、5:1000、10:1000 的各处理比对照在结荚期植株总氮含量分别增加 11.6%、21.3% 和 10.2%。只施 NBPT,随 NBPT 施用浓度的增加而增加,但是增加的幅度不大。在成熟期植株含氮量增加最多,比对照分别增加了 1.7%、4.6% 和 6.9% (图 4、5)。

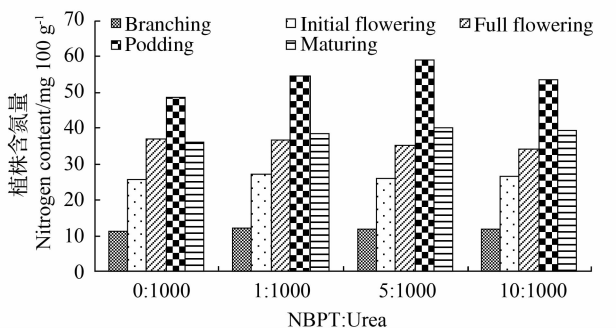


图 4 尿素酶抑制剂对大豆植株含氮量的影响

Fig. 4 Effect of NBPT and urea on nitrogen content of soybean

2.4 NBPT 对根系生长的影响

NBPT 配施尿素对大豆根系的干重均有促进作用,这种促进作用在盛花期表现最为明显。1:1000、5:1000、10:1000 的处理比对照在盛花期的植株根系干重分别增加 22.5%、29.4% 和 11.3%,以配比为 5:1000 的处理对根系生长影响最为突出。只施 NBPT 对植株根系生长的影响,随施用浓度的增加而增加。但影响幅度不大,如表 4 所示。大豆植株根系

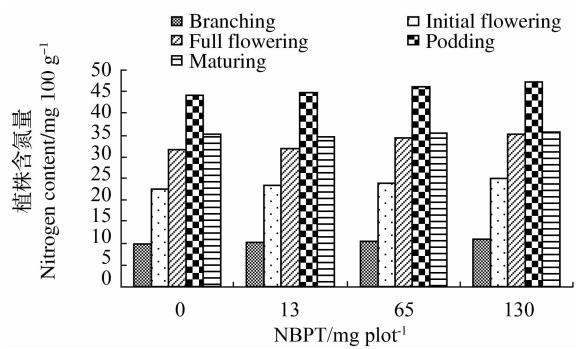


图 5 尿素酶抑制剂对大豆植株含氮量的影响

Fig. 5 Effect of NBPT on nitrogen content of soybean

与地上部的茎叶的长势是密切相关的,植株根系发达,其从土壤中吸收养分的能力就越强,越有利于植株地上部分的生长。但是在结荚期后,根系重量会随着供给地上籽粒成熟所需养分的不断增加而有所下降。

表 4 NBPT 对大豆主要生育期根系重量的影响

Table 4 Effect of different NBPT treatments on the fresh and dry weight of soybean root g plant<sup>-1</sup>

	NBPT:尿素 (Urea)				NBPT / mg plot <sup>-1</sup>			
	0: 100	0.1: 100	0.5: 100	1: 100	0	130	650	1300
苗期 Seedling	0.91	1.03	1.08	1.06	0.89	0.89	0.89	0.90
始花期 Initial flowering	1.73	1.91	2.08	1.91	1.40	1.44	1.42	1.44
盛花期 Full flowering	3.20	3.92	4.14	3.56	2.73	2.85	2.95	3.03
结荚期 Podding	6.09	6.34	6.88	6.78	4.68	4.55	4.83	5.23
成熟期 Maturing	5.41	5.76	6.14	5.60	4.40	4.41	4.61	4.65

3 讨论

在大豆苗期 NBPT 减缓了尿素的水解速率,降低了对大豆幼苗根际土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NH<sub>3</sub> 的浓度,从而提高了大豆土壤根际 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NH<sub>3</sub> 的水势并减少了氨气对根尖的毒害作用 (赵略等,2007),促进了大豆根系的生长。然而,增加 NBPT 的施用量,由于对尿素酶的抑制作用,降低了对大豆根系的供氮量,从而降低了大豆根系的生长 (表 4)。尿素酶在 NBPT 的抑制下,尿素的水解得到缓冲,大豆根系不但对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NH<sub>3</sub> 的伤害得以减轻,而且还得到持续稳定的氮素供给,在整个生长期大豆根系活力都较强并

延缓了大豆根系的衰老(图1)。大豆根瘤对土壤中的  $\text{NH}_4^+$  非常敏感,能够促进其他作物生长发育的土壤  $\text{NH}_4^+$  浓度,可能阻碍大豆的根系生长发育以致减产(刘娜等,2007)。由于 NBPT 对尿素酶的抑制作用,特别是在大豆苗期,尿素保持一个较低的水解速率,不但有利于大豆生长后期的氮素供给,而且对大豆根瘤的发育影响较小,因此,适当施用 NBPT 无论对大豆根瘤数量还是对大豆根瘤重量特别是对大豆根瘤的固氮活性都有所增加。大豆根系的生长和发育是形成大豆高产和良好品质的基础,适量施用 NBPT 对大豆产量的影响将进一步的探讨(另文发表)。

#### 4 结论

由于 NBPT 对土壤尿素酶的抑制作用,NBPT 减缓了尿素的水解速率,从而控制了  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NH}_3$  对大豆根系的不利影响。NBPT 配施尿素对大豆根系活力,根瘤数量及根瘤固氮酶活性都有明显的促进作用,因而大豆植株的含氮量也随之增加,根系生长得到促进。NBPT 本身是一个含氮磷的化合物,但其降解缓慢,作为氮素和磷素对大豆根系及根瘤的作用有限。

#### References

- Bremner J M, and Chai H S. 1986. Evaluation of N-butyl phosphorothioic triamide for retardation of urea hydrolysis in soil. *Soil Science and Plant Analysis*, 17:337-351
- Carter M R, and Rennie D S. 1984. Dynamics of soil microbial biomass N under zero and shallow tillage for spring wheat, using  $^{15}\text{N}$  urea. *Plant and Soil*, 76:157-164
- Lin X J, Chen J C, Zheng S L, Liu Z Z, and Freney J R. 1997. Purifications and kinetics of urease inhibitor from *aspergillus ochraceus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 37(4):276-280 (林新坚, 陈济琛, 郑时利, 刘中柱, Freney J R. 1997. 赭曲霉产生的脲酶抑制剂的提纯与动力学. *微生物学报*, 37(4):276-280)
- Liu N, Yang H, and Sun Q Y. 2006. Effect of urease inhibitor on growth of soybean. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 25(1):26-29 (刘娜, 杨红, 孙庆元. 2007. 尿素酶抑制剂对大豆生长的影响. *大连轻工业学院学报*, 25(1):26-29)
- Ludden P A, Harmon D L, Larson B T, and Axe D E. 2000. Influence of the novel urease inhibitor N-n-butyl) thiophosphoric triamide on ruminant nitrogen metabolism; I. in vitro urea kinetics and substrate digestion. *Journal of Animal Science*, 78:181-187
- Malhi S S, and Nybory M. 1984. Inhibiting nitrification and increasing yield of barley band placement of thiourea with fall-applied urea. *Plant and Soil*, 77(2/3):193-206
- Rozas H S, Echeverria H E, and Studdert G A. 1999. No-till maize nitrogen uptake and yield effect of urease inhibitor and application time. *Agronomy Journal*, 91:950-955
- Song Z Y, and Sun Q Y. 2006. Effect of urease inhibitor nBPT on soil microorganisms. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 25(2):100-102 (宋志远, 孙庆元. 2006. 脲酶抑制剂 nBPT 对土壤微生物的影响. *大连轻工业学院学报*, 25(2):100-102)
- Sun Q Y, Zhang X S, and Wang Y H. 2007. Functional groups of soil urease inhibitor nBPT. *Soil*, 39(3):492-495 (孙庆元, 张雪崧, 王艳红. 2007. 土壤脲酶抑制剂正丁基硫代磷酰三胺的作用基团研究. *土壤*, 39(3):492-495)
- Zhao L, Sun Q Y, Yu Y M, and Ma G B. 2007. Effect of urease inhibitor nBPT on soil urease activity and urease producing microorganisms. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 26(1):24-27 (赵略, 孙庆元, 于英梅, 马国宝. 2007. 脲酶抑制剂 nBPT 对土壤脲酶活性和脲酶产生菌的影响. *大连轻工业学院学报*, 26(1):(24-27)