

化感物质对硝酸还原酶活性影响的研究^{*}

马瑞霞

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 3 种来自小麦秸秆腐解过程中产生的化感物质(阿魏酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸), 在不同浓度及不同 pH 条件下对硝酸还原酶活性的影响实验结果表明, 阿魏酸(t-FA) 在 0.26、2.58、5.15mmol/L 浓度下对硝酸还原酶活性均表现出一定的抑制作用, 抑制率分别为 0.52%、11.6% 和 9.02%; 苯甲酸(BA) 在 4.09、8.19mmol/L 浓度下对硝酸还原酶的活性有抑制作用, 其抑制率分别为 18.4% 和 6.98%, 在 0.41mmol/L 浓度下则表现出促进作用, 促进率为 3.07%; 对羟基苯甲酸(p-HA) 在 0.36、1.81、3.62mmol/L 浓度下对硝酸还原酶活性均表现出促进作用, 促进率分别为 6.86%、15.8% 和 8.73%, 其中以 1.81mmol/L 浓度促进作用最强. 阿魏酸、苯甲酸在不同 pH 下(pH6、pH7、pH8) 对硝酸还原酶活性均表现出一定的抑制作用, 其中 pH6 最为明显. 阿魏酸在 pH6 时抑制率为 11.6%, 苯甲酸的抑制率为 18.4%. 阿魏酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸 3 种化感物质的混合液, 在 pH6 时对硝酸还原酶活性表现出显著的促进作用, 促进率为 12.7%, 在 pH7 和 pH8 条件下则表现出抑制作用, 抑制率分别为 5.17% 和 12.4%. 实验还表明 NO_2^- 的生成与 NO_3^- 的转化之间是互相关联的.

关键词 化感物质, 硝酸还原酶, 抑制, 促进.

Study on Influence of Allelochemicals on Activity of Nitrate Reductases^{*}

Ma Ruixia

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract This paper described the research results on influence of trans-ferulic acid (t-FA), benzoic acid (BA) and p-hydroxybenzoic acid (p-HA) isolated from decomposition of wheat straw on the activity of nitrate reductases in different concentration and different pH. The results showed that the activity of nitrate reductases was inhibited by t-FA under the concentration of 0.26, 2.58 and 5.15 mmol/L, and BA under the concentration of 4.09 and 8.19 mmol/L, the inhibition rate was 0.52%, 11.6%, 9.02%, 18.4%, and 6.98%, respectively. 0.41 mmol/L of BA, however, displayed some stimulation to nitrate reductases, the stimulation rate was 3.07%. The activity of nitrate reductases was stimulated by p-HA under the concentration of 0.36, 1.81, 3.62mmol/L, the stimulation rate was 6.86%, 15.8% and 8.73%, respectively. The more strong stimulation was observed at 1.81 mmol/L of p-HA. The effect of different pH values on the activity of nitrate reductases was also studied. pH 6 for t-FA and BA showed a obvious inhibition effect, the inhibition rate was 11.6% and 18.4%, respectively. The mixture of t-FA, BA and p-HA at pH6 showed a significant stimulation to nitrate reductases and inhibition effect at pH7 and pH8. between production of $\text{NO}_2\text{-N}$ and residue of $\text{NO}_3\text{-N}$ there was relationship.

Keywords allelochemicals, nitrate reductases, inhibition, stimulation.

1937 年, 奥地利植物学家 Molish 首次提出了植物间化感作用(Allelopathy)的新概念^[1], 70 年代化学生态学作为生态学前沿的新兴科学问世以来^[2], 人们运用现代化学方法和

^{*} 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 39790100 和中国科学院资环局资助项目(KZ952-SI-230). 参加该工作的还有李 冯怡
马瑞霞: 女, 57 岁, 副研究员
收稿日期: 1998-04-06

技术对一些生态问题有了更新的理解. 近年来在对秸秆还田作为农业增产措施的研究中发现, 秸秆在被土壤微生物分解过程中, 会产生很多的化感物质(Allelochemicals)^[3]. 有些化感物质会危害下茬作物的生长. 本研究从化学生态学的角度, 由小麦秸秆腐解过程所产生的化感物质中, 选择 3 种典型的化感物质, 研究其对在农田生态系统中氮素循环与利用起重要作用的硝酸还原酶活性的影响.

Abdelmagid H. M. 研究了不同土壤类型中硝酸还原酶的活性^[4]. Jaap Van Rijn 等研究了乙酸、丙酸、丁酸、戊酸等对 *Pseudomonas stutzeri* 的反硝化作用的影响^[5]. 本文着重研究阿魏酸(trans-ferulic acid, t-FA)、苯甲酸(benzoic acid, BA)、对羟基苯甲酸(P-hydroxyben-

zoic acid, p-HA) 3 种化感物质对硝酸还原酶活性的影响, 它不仅在理论上可以深化和充实反硝化作用中的化学生态学的研究内容, 也对减少氮肥的经济损失和氮肥的环境污染具有重要的实践意义.

1 材料与方法

(1) 供试土壤 取自北京平谷地区农场, 含水量 5%, pH= 7. 15, 过 40 目筛处理.

(2) 试验的化感物质 由小麦秸秆腐解产生的化感物质中, 选择出 t-FA、BA 和 p-HA.

(3) 测定硝酸还原酶活性的方法 采用文献 6、7 的方法.

(4) 抑制或促进硝酸还原酶活性的计算方法

抑制或促进率(%) =
$$\frac{(\text{各处理的 NO}_3^- \text{ 剩余量} - \text{对照的 NO}_3^- \text{ 剩余量})}{\text{对照的 NO}_3^- \text{ 剩余量}} \times 100\%$$

(5) 化感物质在不同 pH 条件下对硝酸还原酶活性的影响 培养前将土壤分别调成 pH6, pH7, pH8.

以上各处理在培养前均在土壤中加入 NO₃⁻ 98. 9μmol/g.

2 结果和讨论

2. 1 浓度对硝酸还原酶活性的影响

实验结果详见表 1.

(1) t-FA 与对照相比, t-FA 在 3 种浓度

表 1 不同浓度的化感物质对硝酸还原酶活性的影响

t-FA				BA				p-HA			
处理 /mmol	NO ₃ ⁻ 的剩余量	NO ₂ ⁻ 的生成量	促进或抑制 /%	处理 /mmol	NO ₃ ⁻ 的剩余量	NO ₂ ⁻ 的生成量	促进或抑制 /%	处理 /mmol	NO ₃ ⁻ 的剩余量	NO ₂ ⁻ 的生成量	促进或抑制 /%
· L ⁻¹ / μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹		· L ⁻¹ / μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹		· L ⁻¹ / μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹	· μmol · g ⁻¹	
CK	38. 8	10. 5		CK	35. 8	25. 0		CK	48. 1	5. 67	
0. 26	39. 0	10. 4	- 0. 52	0. 41	34. 7	20. 1	+ 3. 07	0. 36	44. 8	6. 18	+ 6. 86
2. 58	43. 3	10. 1	- 11. 6	4. 09	42. 4	20. 1	- 18. 4	1. 81	40. 5	6. 42	+ 15. 80
5. 15	42. 3	10. 6	- 9. 02	8. 19	38. 3	19. 8	- 6. 98	3. 62	43. 9	6. 02	+ 8. 73

下均对硝酸还原酶活性起抑制作用, 浓度不同, 抑制程度不同. 其中 2. 58mmol/L 的 t-FA 抑制作用最为显著, 抑制率达 11. 6%. 5. 15mmol/L 的 t-FA 抑制率为 9. 02%. 0. 26mmol/L t-FA 的抑制作用十分微弱, 其抑制率只有 0. 52%.

2. 58mmol/L 的 NO₂⁻ 的生成量最少, 比对照低 0. 4μmol/g. 0. 26mmol/L、5. 15mmol/L

的 NO₂⁻ 的生成量同对照相比相差不大, 分别比对照低 0. 1μmol/g 和高 0. 1μmol/g.

(2) BA 同对照相比, BA 在 4. 09mmol/L 时对硝酸还原酶活性的抑制作用最显著, 抑制率为 18. 4%. 8. 19mmol/L 时对硝酸还原酶也表现抑制作用, 而 0. 41mmol/L 时则表现促进作用, 促进率为 3. 07%.

从 NO₂⁻ 的生成量看, 各处理均低于对照.

其中 8.19mmol/L NO_2^- 的生成量最少,为 19.8 $\mu\text{mol/g}$. 比对照少 5.2 $\mu\text{mol/g}$. 0.41 和 4.09mmol/L 处理中 NO_2^- 的生成量均为 20.1 $\mu\text{mol/g}$.

(3)p-HA 不同浓度的 p-HA 对硝酸还原酶活性均有不同程度的促进作用. 1.81mmol/L p-HA 的促进作用最为显著,促进率为 15.8%; 0.36mmol/L 的促进率为 6.86%; 3.62mmol/L 的促进率为 8.73%. NO_2^- 的生成量均高于对照. 其中, 1.81mmol/L 处理中的 NO_2^- 的生成量最多,比对照多 0.75 $\mu\text{mol/g}$, 0.36mmol/L 处理中比对照多 0.51 $\mu\text{mol/g}$,

3.62mmol/L 处理中比对照多 0.35 $\mu\text{mol/g}$.

鉴于硝酸还原酶活性强即反硝化作用强,而反硝化作用是造成氮素气态损失的基本原因^[8], 因此, 从上述实验结果可以得出, p-HA 在农田中不利于氮素的保持, 而 t-FA 和 BA 对氮素的保持起积极的作用. 这为在农业生产中选择硝化抑制剂提供了理论依据. p-HA 能促进氮的转化, 将对处理水体中氮的富营养化有参考价值.

2.2 t-FA 在不同 pH 下对硝酸还原酶活性的影响

实验结果见表 2.

表 2 阿魏酸(2.58mmol/L)和苯甲酸(4.09mmol/L)在不同 pH 条件下对硝酸还原酶活性的影响

t-FA					BA				
pH 值	化感物质	NO ₃ ⁻ 的 剩余量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	NO ₂ ⁻ 的 生成量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	抑制/ 促进 / %	pH 值	化感物质	NO ₃ ⁻ 的 剩余量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	NO ₂ ⁻ 的 生成量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	抑制/ 促进 / %
6	CK	38.8	10.5		6	CK	35.8	25.0	
	t-FA	43.3	10.1	- 11.60		BA	42.4	20.1	- 18.40
7	CK	51.2	20.5		7	CK	40.2	20.8	
	t-FA	51.6	21.7	- 0.78		BA	44.5	19.1	- 10.70
8	CK	75.4	16.1		8	CK	43.0	19.4	
	t-FA	78.6	18.9	- 4.24		BA	43.7	19.7	- 1.63

(1)t-FA (2.58mmol/L) 在不同 pH 下 (pH6、pH7、pH8)对硝酸还原酶活性均有不同程度的抑制作用. 在 pH6 的条件下,对硝酸还原酶活性抑制最为显著,抑制率为 11.6%. 在 pH8 的条件下,抑制率为 4.24%. 在 pH7 的条件下,抑制作用最弱, NO_3^- 的剩余量与对照相差不大,差值为 0.4 $\mu\text{mol/g}$,抑制率仅为 0.78%.

NO_2^- 的生成量在 pH6 的条件下比对照低 0.4 $\mu\text{mol/g}$, 在 pH7 和 pH8 的条件下,分别比对照高 1.2 $\mu\text{mol/g}$ 和 2.8 $\mu\text{mol/g}$.

(2)BA(4.09mmol/L) BA 在不同 pH 下对硝酸还原酶活性也均表现为抑制作用. 在 pH6 条件下,抑制作用最为显著,抑制率为 18.4%. 在 pH7 下的抑制作用弱于 pH6,抑制率为 10.7%. pH8 时的抑制作用最弱,抑制率为 1.63%.

NO_2^- 的生成量在 pH6 和 pH7 的条件下,分别低于对照 4.9 $\mu\text{mol/g}$ 和 1.7 $\mu\text{mol/g}$. 在 pH8 条件下, NO_2^- 的生成量略高于对照 0.3 $\mu\text{mol/g}$.

从上述实验结果可以得出,t-FA 和 BA 作为反硝化的抑制剂在酸性土壤中效果好,而在碱性土壤中作用不大.

2.3 t-FA、BA、p-HA 3 种化感物质的混合液在不同 pH 值下,对硝酸还原酶活性的影响

数据详见表 3. 混合液随着 pH 值不同对硝酸还原酶活性的影响表现出明显的差别. 其中在 pH7 和 pH8 条件下,混合液对硝酸还原酶活性表现为抑制作用, pH8 时的抑制作用最为显著,抑制率为 12.4%. 在 pH7 时的抑制率为 5.17%. 在 pH6 条件下,混合液对硝酸还原酶活性表现出促进作用,促进率为 12.7%. NO_2^- 的生成量除在 pH6 条件下比对照低 5.8 $\mu\text{mol/g}$

g 外, 在 pH 7 和 pH8 条件下均与对照相同, 其数值分别为 15. 2 $\mu\text{mol/g}$ 和 15. 6 $\mu\text{mol/g}$.

表 3 t-FA(2. 58mmol/L)、BA(4. 09mmol/L)、p-HA(3. 62mmol/L) 3 种化感物质的混合液对硝酸还原酶活性的影响

pH	化感物质	NO ₃ ⁻ 的 剩余量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	NO ₂ ⁻ 的 生成量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	抑制/ 促进 / %
6	CK	45. 6	22. 9	
	混合液	39. 8	17. 1	+ 12. 70
7	CK	34. 8	15. 2	
	混合液	36. 6	15. 2	- 5. 17
8	CK	35. 4	15. 6	
	混合液	39. 8	15. 6	- 12. 40

3 种化感物质的混合液在碱性条件(pH8)下, 对硝酸还原酶活性表现出显著的抑制作用, 而在 pH6 条件下则表现出明显的促进作用. 这可能是由于 p-HA 所产生的促进作用大于 t-FA 和 BA 所起的抑制作用所致. 从以上分析可以看出, 混合液在碱性环境中可以有效抑制硝酸还原酶的活性, 减少氮肥的损失.

Bremner 等人发现反硝化速率随 pH 值上升而增加, 最佳 pH 值在 7—8 之间^[9]. Jens 等人在研究了不同 pH 对反硝化作用影响时, 发现反硝化作用的动力学模型在酸性和碱性条件下也是不同的^[10]. 许多研究者认为, 在酸性条件下, 微生物的还原酶被抑制, 因此酸性条件下反硝化活性降低. 但是 Garcia 却发现在碱性条件下抑制作用强. 土壤 pH 值对反硝化作用的影响较为复杂, 报道不一. 本研究结果表明, 对硝酸还原酶活性的影响, 不仅是 pH 起作用, 而且不同的化感物质也起重要作用.

2. 4 NO₃⁻ 的转化与 NO₂⁻ 的生成之间互相关联的分析

在 p-HA 不同浓度的处理中, NO₃⁻ 的剩余量比对照少, NO₂⁻ 的生成量相应地比对照多, 在 t-FA、BA 的处理中, NO₃⁻ 的剩余量比对照多, 转化成 NO₂⁻ 的量也比对照少. 可以看出, NO₃⁻ 的转化与 NO₂⁻ 的生成之间是相互关联

的. 在 t-FA、BA 各自的不同浓度之间, NO₃⁻ 的剩余量差别较明显, 但生成量之间差别并不明显. 这可能是在不同浓度的化感物质作用下, NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 对电子竞争不同而引起的, NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 对电子的竞争决定於电子传递途径^[5]. 上述 3 种化感物质及不同浓度的化感物质在培养过程中都会有电子流变化, 进而影响到亚硝酸根的不同积累. 不同浓度的 t-FA、BA 也可能对亚硝酸还原酶有一定的抑制作用, 阻碍其进一步将 NO₂⁻ 还原成 NO、N₂O、N₂, 因而造成 NO₂⁻ 的一定积累.

参 考 文 献

- 1 Kimber R WL. Phytotoxicity from plant residues(11): The relative effect of toxins and nitrogen immobilization on the germination and growth of wheat. Plant and Soil, 1973, **38**: 347—361
- 2 王世荣. 微生态学研究进展. 生态学进展, 1989, (4): 252—256
- 3 马瑞霞, 刘秀芬, 袁光林, 孙思恩. 小麦根区微生物分解小麦残体产生的化感物质及其生物活动的研究. 生态学报, 1996, **16**(6): 632—639
- 4 Abdelmagid H M. Activity of nitrate reductases in soil. Soil Biol. Biochem. , 1987, **19**(4): 421—427
- 5 Jaap Van Rijn, yossi Tal and Yoram Barak. Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 2615—2620
- 6 严昶升. 土壤肥力研究方法. 北京: 农业出版社, 1988. 253—258
- 7 郑洪元, 张德升. 土壤动态生物化学研究法. 北京: 科学出版社, 1982. 180—182
- 8 Купакова Н Т. 反硝化作用在土壤氮素平衡中的作用. Агромиия 1984, **5**: 118—127
- 9 Bremner J M, Blackmer A M. Nitrous oxide: Emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. Science, 1978, **199**: 295—296
- 10 Jens K Thomsen, Torken Geest and Raymond P. Cox. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of mitermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(2): 536—541