

测定土壤酶活性的标准方法

阿·斯·卡斯佳音

孫德祥 译

傅仁麟 刘绪霞校

中国科学院河南地理研究所

一九八〇年 一月



数据加载失败，请稍后重试！



数据加载失败，请稍后重试！

测定土壤酶活性统一标准方法

阿·斯·卡斯佳音

本文提要：介绍一些确定土壤生物学活性指标的某些酶——水解酶和氧化还原酶活性指标的某些方法，建议在土壤生物学诊断时重视采用这些方法。

土壤酶活性的研究对于认识土壤形成过程特征和土壤肥力的评价均具有更重要的意义。土壤中物质和能量变化相联系的所有的生物学过程都是借助于生物催化剂——酶素实现的。土壤中有机物质的合成与分解，微生物学过程、植物营养成分的供应是土壤中最复杂反应的结果，而这些反应是由土壤中所有的酶所决定的，所以，酶的作用就成为土壤肥力和土壤生物学活性指标之一（2—26）。

酶的活性不仅由各种各样的微生物、动物区系以及他们多样性决定的，而且决定于生物学过程的强度（2—13）。在土壤中酶活性的水平取决于土壤的化学性质和物理机械性质，有机物质的含量，机械组成，土壤碱的浓度，周围介质的反应，它的本性以及被土壤吸收的所有阳离子的组成，所有这一切就成为各种类型土壤诊断学指标之一的酶活性研究的基础。

近年来，土壤酶的诊断应用较为广泛（4、6、12）。同微生物学过程的强度，土壤中二氧化碳气体的产生（土壤呼吸），微生物区系和动物区系的组成和数量相比，酶的活性是土壤生物发生学的比较稳定的和灵敏的指标。在这里，是毫无疑义的，所说的是到土壤中酶活性的变化，以及在人为的各种作用的影响下酶活性的变化。应用酶活性的土壤学诊断方法实际上是促进了酶测方法，具有高度的准确性（4）。对水解酶来说达到3—5%，对氧化还原酶来说达到了5—8%。

在研究土壤酶时许多研究者应用了不同的研究方法或者由它们变^改

的方法，这些方法因所确定的条件：标准样品的准备、PH，准确称量剂量的数量，被酶^用作物的浓度、培养温度，培养液与土壤相互作用的时间以及表示酶活性的单位而不同。Галстян(4)，Хазнев(12)以及Щербакова在研究法教程中论述了现有的土壤酶测定的各种方法，以前，他们之中的某些曾在Купр^евич的专门学述论文中论述过。

应该指出，直到目前为止，现有对土壤酶活性研究的途径除了获得对比资料的可能性外，应对它们采取处理。因此，统一土壤酶活性的测定方法是必需的，这有助于测定方法的改进和提高测定结果的准确性和实践性。

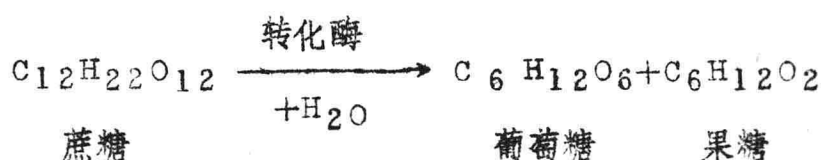
我们在连续多年期间，进行了土壤酶活性的测定统一标准的研究工作，这些方法中的某些内容在目前的不少论文中获得引用，在统一土壤酶活性测定方法时，应该查清与土壤各种类型的发生学特征相联系的问题：有机物含量，盐基的饱和度，酸和碱的性质，碱化性，潜育性，土壤盐碱化的程度，Оторфованность，物理机械组成的性质，熟化程度，以及某些自然的和人类时代的因素，对酶的测定条件要加以特别的注意，特别是在各种土壤类型中具有普遍活性的酶的测定更须如此。(1, 4)。

根据对各种土壤类型进行的大量的研究，对各种土壤酶活性的测定是这样进行的：用同样的准确称量的干净的风干土壤样品(1

克)除去植物的残渣和土中的石块,通过筛孔直径为0.25 mm的筛子过筛的;在经常维持温度为30°C条件下〔除了过氧化氢酶维持在20°C以外,它的活性用贮气器(实验中收集和计量气体用的仪器)测定),在酶作用最合适的PH条件下进行测定。对土壤诊断来说,酶活性的测定在土壤介质自然反应的情况下适当地进行,酶的活性应该用相同单位的反应产物对被测定的土壤重量之比来表示。

转化酶(β-水果五环糖酶)(KФ 3, 2, 1, 26,)

转化酶就是糖酶,它对蔗糖里、棉子糖里、龙胆糖,木苏糖里的β-水果五环糖的连接键作用,这种酶的最大活性是水解县有形成还原糖——葡萄糖和果糖的蔗糖。



转化酶广泛地存在于自然界并且在各种类型的土壤中几乎都能见到,测定土壤转化酶活性的方法以查明,按照бертран法,在酶作用以后的还原糖的数量和在酶作用以后根据蔗糖溶液光学性质的改变以及酶的作用范围为基础,在研究酶活性和培养基浓度具有很宽幅度的酶时,可以应用第一种方法。偏光计方法和光电比色计方法对蔗糖的浓度有比较严格的要求,并且对有机物质含量较高的土壤来说不能接受,而会得到染色的溶液,因此,这些方法限制了

在土壤研究中的应用。

分析方法(过程)

准确称量准备好的土壤 1 克放入体积为 50 ml 的蒸馏瓶中，
加上 5 ml 3% 的^{具有}磷酸缓冲液 (PH=4.9) 的新制备的蔗糖溶液
和 0.2 ml 甲苯。在土壤的生物学诊断时，没有缓冲液——在土壤
PH 的条件下来进行测定转化酶的活性。蒸馏瓶用软木塞塞好，震
荡并放入恒温箱中在 30°C 下维持 24 小时，把有土壤的培养基和没
有土壤的培养基作对照，这土壤 用干燥蒸气在 18°C 下消毒 3
小时，在人工培养期间，蒸馏瓶定期的震荡，人工培养以后在蒸馏
瓶中加入 25 ml 蒸馏水，摇匀并过滤，按照 Бертран 方法测定
蔗糖的减少量，为此目的，将 10 ml 滤液移入容积为 100 ml
的蒸馏瓶中并再加上 20 ml 的斐林溶液，^使蒸馏瓶内容物沸腾 3 分钟，
然后，通过具有石棉的 2 号玻璃漏斗(过滤器) ^把溶液过滤到 Бунзе-
ен 的蒸馏瓶中，并应用了喷水泵抽气机或 Каиовекою 抽气机，
^{抽气过滤}蒸馏瓶中的和滤液上的一氧化铜沉淀用热水冲洗几次，冲洗以后蒸
溜瓶中和滤液里的沉淀用被硫酸酸化的硫酸 铁溶解，并通过过滤
器过滤到干净的 Бунзен 蒸馏瓶中，烧瓶和蒸馏瓶用蒸馏水^再冲洗几
遍，滤液直接^用 0.1N 高锰酸钾在 бедеи 蒸馏瓶中滴定至淡红色
(玫瑰色)，为了计算葡萄糖，被消耗的高锰酸钾的量增加到 6.36
(1 ml 0.1N $KMnO_4$ 相等 6.36 mg 的铜) 根据铜量在表中

(петербургский 1963) 查出相当的葡萄糖的量，加上校正
 值以后，计称用^时 / 1克土壤 24 小时的葡萄糖毫克数表示转化酶的
 活性，测定的误差在 5% 以内。

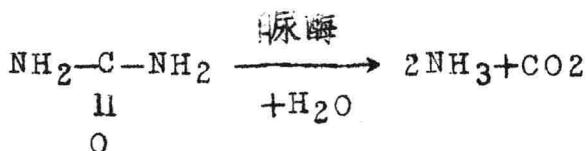
试 剂

- (1)、3% 蔗糖溶液 (2)、磷酸缓冲液 (PH=4.9)
- (3)、甲苯 (4)、斐林溶液, (a)、40g CuSO₄
 ·5H₂O 溶解在蒸馏水中并加水到 1 升。 (b)、20g 酒石钾钠盐溶解
 在蒸馏水中，加入 150g KOH 或 NaOH 并且加水至 1 升。将
 两种溶液过滤，这两种溶液 (a) 和溶液 (b) 按 1 : 1 的比例混
 合在一起。 (5)、硫酸铁溶液：50g 硫酸铁盐溶解在蒸馏水中，加
 入 108.7 ml 浓硫酸并加水使体积到 1 升。 (6)、0.1N
 KMnO₄ 高锰酸钠滴定用溶液)

尿 素 酶 (尿酶)

(异尿素, 碳酰胺, ——氨基化合物水解酶 (Kφ 3.5, 1, 5)

尿酶水解碳酰胺——(尿素) 为氨和碳酸气体。



在土壤中，尿素在氮的有机化合物——蛋白质和核酸的转

化过程中形成的，尿素 较大数量以高浓度的氮肥形式存在于厩肥中，由于尿酶作用而形成的氨是植物营养的直接来源，因此，尿酶的活性是土壤生物学活性的最重要指标之一。

测定土壤尿酶活性的方法，是计算尿素水解情况下形成的氨的数量为基础。

分析方法（过程）

准确称量准备好的土壤 1 克放入 50ml 的蒸馏瓶中，加入 5ml 3% 的具有缓冲 (PH=6.7) 的尿素和 0.2ml 的甲苯，用消毒灭菌 (180°C, 3 小时) 土壤和没有土壤的培养基作对照，蒸馏瓶用软木塞塞好，震荡并放在恒温箱中在 30°C 条件下维持 24 小时，在人工培养期间，蒸馏瓶要定期的震荡。在培养基与土壤相互作用的时间期满后，在蒸馏瓶中加入 25ml 1 N 氯化钾溶液，为了从土壤中置换被吸收的氨，震荡 5 分钟后进行过滤，从滤液中取 10ml 放入氨的半微量的 Кьельдёл 的仪器中，再加上 5ml 2% 强碱溶液，并在沸水 15 分钟时间内进行蒸馏，在接收的蒸馏瓶中事先加上 15ml 0.1 N H₂SO₄，用 0.1 N KOH 回滴来查明氨的数量。按下式进行计算。

$$P = \frac{(AT_1 - bT_2) \cdot 1.70V}{HV_1}$$

式中：A——接收瓶中 $0.1N H_2SO_4$ 的毫升数

b——用来滴定接收瓶中多余的酸而消耗的 $0.1N KOH$ 的毫升数。

T_1 —— $0.1N H_2SO_4$ 的标准滴定溶液的修正值，

T_2 —— $0.1N KOH$ 的标准滴定溶液的修正值。

1.70——相当于 1 ml $0.1N H_2SO_4$ 的氮的毫克数。

V——滤液的总体积 ml 数

V_1 ——分析用的滤液的体积 (ml)。

H——准确称量的土壤的克数。

尿酶的活性用 1 克土壤在 24 小时内产生的 NH_3 的毫克数表示，测定的误差在 5% 以内。

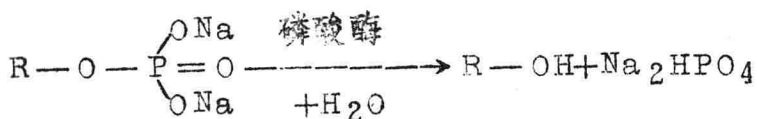
试剂：

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1、3% 的尿素溶液， | 2、磷酸缓冲液 (PH=6.7)， |
| 3、 $0.1N KOH$ | 4、 $1N KCl$ |
| 5、 $0.1N H_2SO_4$ | 6、2% 的 KOH 。 |

磷 酸 酯 酶

(正磷酸单酯的磷酸水解酶，碱的磷酸酶 Kφ 3, 1, 3, 1, 酸
的磷酸酶 Kφ 3, 1, 3, 2)。

磷酸酶水解正磷酸单酯为醇和正磷酸：



测定土壤磷酸酯酶的方法以计算在酶的作用下被分解的无机磷量，或者计算培养基的有机部分——有机磷化合物的量为基础的，磷酸酶总的活性在土壤 PH 条件下进行测定。

分析的方法（过程）

准确称量准备好的土壤 1 克放入 50 ml 的蒸馏瓶中，加上 3 ml 0.5% 硝基苯酚磷酸钠，在测定碱性磷酸酶的情况下，培养基加 PH=8.0 乙醇胺——醋酸盐缓冲液，而在测定酸性磷酸酶的情况下要加 PH=5.4 的乙醇胺——醋酸盐缓冲液，周围介质的 PH 用试纸检查并且在改变的时候调到所要求的 PH。用有土壤的培养基和没有土壤的培养基来对照检查。蒸馏瓶用软木塞塞好，震荡并放入恒温箱在 30°C 下维持 30 分钟，在这个时间内蒸馏瓶要震荡 2 次。在培养基与土壤相互作用时间以后在蒸馏瓶中加入 22 毫克的蒸馏水，摇匀并过滤（过滤器——滤纸——是呈条带状的），滤液中的硝基苯酚和酶反应的产物用 1 N 的强碱染色（1 滴 1 滴地），溶液的 PH 应该是 8.6，在此基础上，按土壤的机械组成对蒸馏瓶中的透明溶液加入 1 ml 铝钾矾的饱和溶液，染色的溶液用 φΘK—58 M 型仪器进行比色分析，比色槽 5 mm，滤光器是 4.50—

标准

480毫微米，借助于计量的列线图进行计算从培养基中分解出来的磷的数量。磷酸酶的活性用100克土壤30分钟内分解的磷的毫克数表示。

试剂：

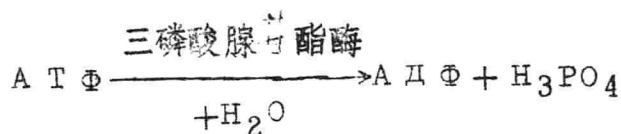
1、0.5%硝基苯酚钠溶液 2、1N KOH

3、乙醇胺——醋酸缓冲液 (PH=8.0 和 PH=5.4)

4、为了(绘制)作列线图用的标准溶液——^{标准}0.01g 化学纯的硝基苯酚溶解在蒸馏水中并使体积增加到100毫升，1ml 这种溶液含有0.1mg硝基苯酚，1mg 硝基苯酚相当于0.223mg的磷。

三磷酸腺苷酯酶 C AT Φ ——磷酸水解酶, K Φ 3, 6, 1, 3)

三磷酸腺苷酯酶水解三磷酸腺苷磷酸酯(AT Φ)为AD Φ 和正磷酸：



测定土壤中三磷酸腺苷酯酶的活性以计算在AT Φ 与土壤相互作用的条件下由于酶作用而分解的磷酸的数量为基础的。

分析步骤

准确称量准备好的土壤1克放入体积为100ml的锥形蒸馏瓶中，加入1ml 0.02克分子浓度的AT Φ -Na 溶液和2ml 乙

醇胺——醋酸缓冲剂 (PH=8.0)，周围介质的 PH 用试纸检查并且在变动时滴到测定的数值，测定土壤酶的活性要在土壤 PH_下而不是在缓冲溶液的 PH 的情况下（增加蒸馏水，在土壤不饱和的条件下同时加入 1 ml 0.2N EDTA 溶液以掩蔽 Fe 和 Al³⁺ 阳离子对测定干扰。蒸馏瓶用软木塞塞好，震荡并放入恒温箱中在 30°C 条件下维持 1 小时，用具有水的、缓冲液的、和 EDTA 的土壤以及没有土壤的培养基来检查（对照）。

在培养基与土壤相互作用的时间以后在蒸馏瓶中加入 50 ml 缓冲液混和物，为了提取磷酸用转动体方式震荡 30 分钟并过滤。按照 Труога—Иейер 法测定滤液中的磷；为此，将 10 ml 滤液移入 50 ml 干净的蒸馏瓶中，加入 2 ml 合成（合）催化剂——钼酸铵，加水到刻度，搅匀，然后再滴上 3 滴 2.5% 的 SnCl₂，就是在 15—20 分钟时间内立即重新摇匀，用具有红色滤光器的光电比色计在波长 $\lambda = 650 \text{ m}\mu$ 范围测定染色（显色）的溶液，借助于校准的 KH₂PO₄ 的工作曲线图进行计算在三磷酸腺苷酯酶作用下由三磷酸腺苷分解的磷酸的量。

三磷酸腺苷酯酶的活性用 100 g 土壤在 1 小时内分解的磷的毫克数表示，测定的误差在 6% 以内。

试剂：

1、0.02M ATP—Na

2、乙醇胺——醋酸缓冲液

(PH=8.0)(乙醇氨 0.2M 25ml + CH₃COOH 0.1N 50ml + 25 ml H₂O),

3、EDTA—0.1N EDTA 溶液,

4、Труора 缓冲混和物——3 g (NH₄)₂SO₄+20ml 0.1N H₂SO₄ ——溶解在 1 升的蒸馏水中。

5、合(合成)催化剂——25 g 钼酸铵——在加热情况下溶解在 200 ml 的蒸馏水中, 同时在容积为 1 升的干净的蒸馏瓶中加入 500 ml 的水并用不大的一分沿着蒸馏壁小心仔细地加入 280 ml H₂SO₄ (比重 1.84), 在两种溶液冷却后, 在不断搅拌的情况下将少量钼酸铵溶液 倒入硫酸中, 第二冷却后, 体积增加到 1 升, 摇匀并放入不透光的玻璃瓶中。

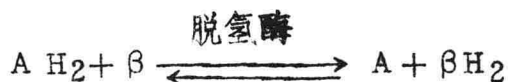
6、还原剂——0.25g SnCl₂·2H₂O 倒入体积在 10—15 ml 以内的玻璃试管内, 加上 10 ml 10% HCl, 将试管浸入装满水的体积为 100—200 ml 的化学玻璃杯中, 并在电炉上加热到还原剂完全溶解为止。

7、绘制曲线的标准溶液——一升水中有 0.4392g KH₂PO₄,
工作溶液: 5 ml 标准溶液在干的蒸馏瓶中用到 500 ml,
1 ml 这种溶液含有 0.001 mg 的磷。

脱氢酶 (培养基: НАД(Ф)——氧化还原酶

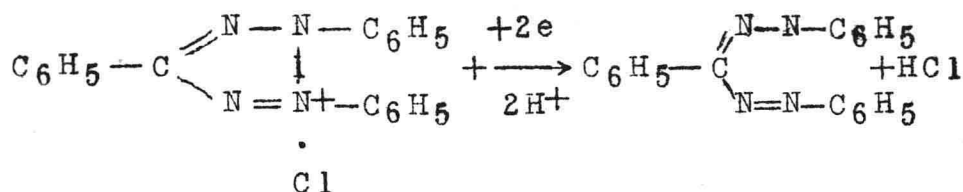
КФ 1, 1, 1)

脱氢酶以有机物质脱氢作用的途径催化氧化——还原反应。它们按下列示意图进行：



在土壤中，非特殊的有机化合物（碳水化合物、有机酸、氨基酸、乙醇、酚、脂肪等等）和特殊的有机化合物（腐殖质）都可以作为脱氢酶的作用物，在氧化还原反应中，脱氢酶怎样发挥转移氢的功能分^为两种类型：(1)、需氧的，它们将氢转交给空气中的氧。(2)嫌氧的，它们将氢转交给其他受体，酶。具有低氧化势类型的亚甲基兰指示剂的还原作用是显示脱H酶作用的主要方法。

为了测定土壤酶活性，应用无色的偶二氮化合物盐类（2、3、5、——氯化偶二氮化合物——TTX）作为氢的受体，它们能还原红色Фориазан化合物（трпФенилФориазан）—ТФФ），用脱氢酶2、3、5、——氯化偶二氮化合物的还原作用按反应式进行。



分析步骤：

准确称量准备好的土壤 1 g 通过漏斗（以免引起磨口的污染）