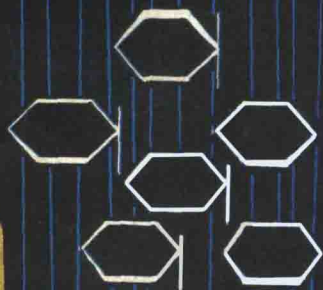


〔苏〕Ф. X. 哈兹耶夫 著

# 土壤酶活性



科学出版社

# 土 壤 酶 活 性

〔苏〕Ф. X. 哈兹耶夫 著

郑洪元 周礼恺 张德生 译  
周礼恺 校

科 学 出 版 社

## 内 容 简 介

本书是一本有关土壤酶分析方法的汇编,书中介绍了13种氧化还原酶,20种水解酶及2种转移酶的测定方法。此外,对土壤酶活性测定的基本要求,分析前样品的选择和处理,以及结果的计算也作了介绍。本书可供从事土壤、农业化学、生物化学及微生物学的科研工作者和有关大专院校师生参考。

Ф. X. Хазиев

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

Издательство «Наука» Москва 1976

## 土 壤 酶 活 性

[苏] Ф. X. 哈兹耶夫 著  
郑洪元 周礼恺 张德生 译  
周礼恺 校

\*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1980年11月第一版 开本:787×1092 1/32

1980年11月第一次印刷 印张:5 1/2

印数:0001—3,410 字数:125,000

统一书号:13031·1404

本社书号:1937·13—12

定价: 0.90 元

# 目 录

绪论	1
土壤酶活性测定方法的一般原则	3
土壤酶活性测定方法的基本要求	4
土壤样品的选择和酶分析前的处理	10
土壤中酶活性的测定方法	12
氧化还原酶	13
过氧化氢酶	13
过氧化物酶	21
多酚氧化酶	24
尿酸盐氧化酶(尿酸酶)	27
硫化物氧化酶	30
抗坏血酸氧化酶	31
脱氢酶	33
硫酸盐还原酶	41
硝酸盐还原酶	42
亚硝酸盐还原酶	43
羟胺还原酶	45
铁还原酶	46
MnO <sub>2</sub> -还原酶	47
水解酶	49
葡萄糖苷水解酶	49
β-呋喃果糖苷酶	49
α-葡萄糖苷酶	61
β-葡萄糖苷酶	63
α-与β-半乳糖苷酶	67

$\alpha$ -与 $\beta$ -淀粉酶 .....	69
纤维素酶 .....	73
木聚糖酶 .....	80
果聚糖酶 .....	82
葡聚糖酶 .....	85
肽及氨基水解酶 .....	86
蛋白酶(肽水解酶) .....	86
脲酶 .....	100
天门冬酰胺酶 .....	114
谷氨酰胺酶 .....	118
磷酸水解酶 .....	119
磷酸酶 .....	120
聚磷酸酶 .....	132
植酸酶 .....	134
核酸酶 .....	137
硫基水解酶 .....	141
芳基硫酸酯酶 .....	141
羧酸酯水解酶 .....	143
脂肪酶 .....	144
果胶酯酶,聚半乳糖醛酸酶 .....	146
转移酶,裂合酶 .....	149
果聚糖蔗糖酶 .....	150
色氨酸脱羧酶 .....	151
附录 1 .....	153
附录 2 .....	165
参考文献 .....	168

## 绪 论

酶是生物催化剂。它能成百倍、成千倍地加速有机体中的化学反应。各种酶在土壤中的积累,是由于土壤微生物、好中温动物区系和植物根系的生命活动的结果。它们参与了许多重要的生物化学过程:腐殖质的合成和分解、有机化合物、高等植物和微生物残体的水解及其转化成为可利用的形态,以及氧化还原反应等等,也就是说,它们参与了与土壤的发生和发育,及其与有效肥力的形成有关的诸过程的主要环节。

五十年代以来,由于苏联(В. Ф. Купревич, А. Ш. Галстян, К. А. Козлов, Т. А. Щербакова, А. И. Чундерова)和其他国家(E. Hofmann, G. Hoffmann, St. Kiss, A. D. McLaren, J. J. Skujins)进行的分子生物学和基础研究的成就,土壤酶学成了土壤生物学中一门独立的学科。土壤酶学研究的范围很广,包括许多复杂而重要的理论与实际问题:土壤生物催化性能的性质;土壤中酶的来源、分布、状态、组成和活性;酶在参与有机物质的分解和腐殖质的形成中的作用及其在植物营养中的功能,也就是阐明土壤-酶-植物(根)系统中各组分的相互关系;酶在土壤发生、土壤生命和土壤肥力形成中的作用。土壤酶学的方法和酶的活性指标已广泛应用于评价土壤肥力、鉴别土壤类型和土壤熟化度,以及评价各种农业措施和肥料的效果。但是,土壤酶学方法不能代替土壤生物学研究的经典的微生物学方法。如果说微生物学主要是研究存在土壤中的微生物的数量及其质的组成,那么,土壤酶学就是研

究在土壤环境条件下微生物的生物化学活性和它们借助自身的生物化学活性催化剂——酶对土壤组分的作用。将土壤酶学和土壤微生物学的研究方法与其它方法结合起来能使我们深入地了解土壤生物学中的问题。

目前，已拟定出许多测定参与各种土壤生物化学过程的大多数酶活性的方法。但是，还没有一本有关土壤酶学的综述性方法的手册，从而阻碍了一些颇有前途的土壤酶学方法在科学研究工作中的更为广泛的应用。在这本手册中，汇集了大量已有的，测定土壤中各种酶(主要是一些最重要的氧化还原酶和水解酶)活性的方法。这些酶类曾进行过最广泛的研究。在本书中，还引用了测定个别的转移酶和裂合酶活性的若干方法。在土壤中这类酶还研究得较少，同时仅其中的少数酶拟定出测定的方法。

测定其它土壤酶类(胰蛋白酶、凝化胰蛋白酶、组织蛋白酶、硫氰酸酯酶、甘氨酸脱氨酶、精氨酸脱水酶、转氨酶、葡糖酶、地衣糖酶等)活性的方法，正在研究中，本书没有包括在内。

书中引用的方法是在不同条件下提出的，其中某些方法可能不适于某些土壤。因此，在每一具体的条件下，必须通过比较分析，确定最适于某一土壤的方法。

各实验室中业已采用的方法，以及根据国际酶学生物化学协会的推荐(酶的分类和命名法，1962)和土壤酶学的当代要求(主要是适宜的土壤-基质比、基质浓度、pH缓冲液的种类、培养时间)而拟定的测定方法可广泛地应用于土壤酶学的研究。在本书最后的附录2中，列举了建议采用的、测定各个酶的方法。

在编写本方法手册时，作者采纳了 В. К. Гирфанова 教授，Л. И. Сергеева 教授，М. Н. Бурангулова 教授，白俄

罗斯苏维埃社会主义共和国科学院土壤酶学实验室主任 Т. А. Щербаковой 以及生物学副博士 Д. Г. Аглиуллиной 的宝贵意见和建议。对此,特表示由衷的感谢。

考虑到这本书是关于土壤酶学方法的第一本参考书,作者非常感激能对本书提出批评和建议。

## 土壤酶活性测定方法的 一般原则

土壤酶学方法不能定量测定土壤中酶的含量,而是测定主要以吸附态处于土壤胶体表面的和部分地处于土壤溶液中的酶的活性。因此,它涉及的是土壤样品对于加入土中的相应有机和无机化合物(基质)的转化过程的催化效应。

酶活性的测定,是根据在最适温度、pH、基质浓度和土壤称重的条件下,反应过程中转化的基质或生成的反应产物的定量测定。为了定量地测定反应的最终产物,可采用各种化学的、光度计的、比色计的、旋光计的和其它一些方法。在定性测定酶时可广泛地采用色层分离法,这个方法在酶水解时能得到很好的效果。

土壤酶活性测定方法的实质是:用防腐剂(甲苯)浸泡土壤样品,加入最适于某种酶作用的一定 pH 值的缓冲溶液和一定数量的基质。将反应混合物放在 30—37° 恒温箱中培养一定的时间,并定量或定性地测定反应产物。酶的活性,以一定时间间隔内被转化的基质量或生成的反应产物量表示,并按单位土重或腐殖质重计算。



# 土壤酶活性测定方法的 基本要求

**土壤样品中微生物活动的抑制** 土壤酶活性是在反应基质中存在土壤微生物的情况下测定的。现在还没有足够准确的方法，得以在不破坏酶的结构和改变其活性的情况下从土壤中定量地提取酶，或在完全排除微生物(它们的酶)的影响情况下测定自然土壤中的酶活性，并将土壤酶与微生物在试验过程中分泌出的酶区分开来。土壤酶学的现代方法只能对土壤中活的有机体的胞外酶(游离的胞外酶及与死亡的微生物细胞及植物组织的分解碎片结合的胞内酶——所谓的土壤酶)以及被活的微生物在测定土壤酶活性的过程中泌出的部分酶的活性进行总的测定。由此可见，土壤酶学中的一个重要的方法学上的问题是有效地抑制土壤样品中微生物的生长和生理过程，并在不破坏土壤的化学和物理性质的情况下，使土壤酶保持不变。

对抑制剂的基本要求是：它们不应破坏微生物细胞(质壁分离)和改变细胞壁的渗透性。有效地抑制微生物的生命活动，能防止附加数量的酶进入土壤，和微生物对于基质及反应产物的利用；而这些都能使供试土壤的酶活性值失真。酶活性的测定只有在下列情况下才能得到可靠的结果：基质的浓度不曾由于与基质的酶转化无关的因素而降低，以及在酶的作用下，由基质形成的产物的量不曾由于与供试酶反应无关的过程而遭到改变。

为了抑制微生物的活动，在实践中，一般是在加入基质前，用甲苯处理土壤样品 10—15 分钟。可是，甲苯能抑制某

些氧化还原酶。因此,在测定土壤中这些酶的活性时,通常不采用甲苯。也有人采用汞制剂: 硫柳汞 (мертиолят), 升汞等等。

为了使土壤中的微生物活动全部失活,也可以采用高能量的电离射线(5—10 百万电子伏)(McLaren 等, 1957)。当用相当大剂量的 $\gamma$ 射线( $2-3 \times 10^6$  伦/分钟, 每1克土壤; $^{60}\text{Co}$ 源), 几乎能使土样完全灭菌, 而土壤的酶活性和理化性质的改变很小。这需要特殊的设备和强大的 $\gamma$ 射线源。

许多因子影响酶反应的速度。其中,有培养温度;氢离子浓度;缓冲液成分;基质的浓度;土壤的重量;活化剂和抑制剂等等。当进行土壤酶学方法的研究时,应确定这些常数的最适值,因为它们对所有种类的酶以及个别的酶都是不相同的。

**土壤称量和基质浓度** 土壤酶活性的测定,需用一定数量的土壤样品进行。随着土壤称量的增加,酶反应速度呈直线增长(图1)。基质的浓度的选择应考虑到使酶反应速度在整个反应期间保持恒定。基质的分子数,应足以在反应終了前,饱和该称量的土壤中所含有的全部酶分子。为此,要求基质有某些过量,但是基质的大量过剩会降低反应的速度

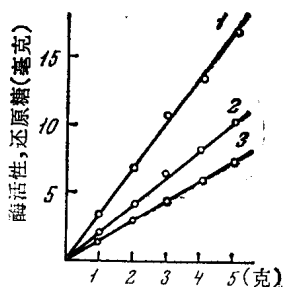


图1 土重(克)对酶促反应速度的影响 (Галстян, 1965)

1——蔗糖酶; 2—— $\beta$ -葡萄糖苷酶; 3——淀粉酶

(图2)。

一定土壤称量的最适基质浓度,需通过试验查知。有时,

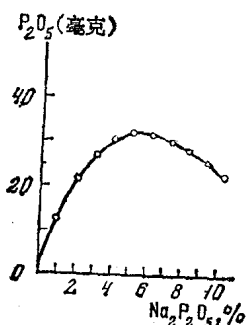


图2 焦磷酸酶活性(毫克)与焦磷酸盐浓度(%)之关系 (Хазнев, 1972)

也随意地取不同的土量和基质浓度。但是,为了获得可供比较的资料,必须使实验条件规范化。首先必须确定能相当准确地测出供试酶活性的最小土重及相应于这一土重的最适基质浓度。

在土壤酶学研究中,对基质的根本要求是它有很好的溶解性。不溶性的和溶解性较弱的基质,很难与酶相互作用(例如纤维素)。

### 基质的 pH 和缓冲溶液 酶反

应的速度与基质的 pH 有关。酶的最大活性只能在很窄的 pH 范围内表现出来。这个范围称为某种酶作用的最适 pH。pH 小于或大于最适值,都会引起酶活性的降低(图3)。在测定酶活性时,保持反应基质的最适 pH 范围,是一项重要的条件。酶的最适 pH 范围可以通过试验来确定。必须注意到,具有不同 pH 的土壤,对缓冲液的 pH 的改变,影响是不同的。当确定土壤酶的最适 pH 时,在往土中加入反应混合物后,可

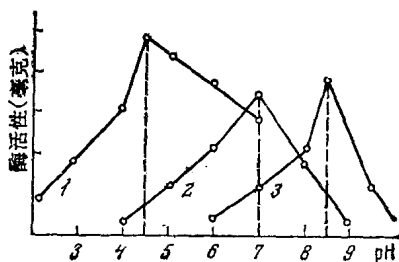


图3 pH 对酶活性的影响 (Галстян 等, 1967)

1—蔗糖酶; 2—尿酶; 3—脱氢酶

用电位滴定将悬液的 pH 值调至相应值 (Галстян, Маркосян, 1965)。

在测定土壤酶活性时,为使 pH 保持一定,应用相当于该种酶的最适作用 pH 的缓冲液。缓冲液的阳离子-阴离子的组分具有重要作用:不同的阳离子和阴离子对各种酶具有不同的影响。因此,应通过实验,选择适于每一种酶的缓冲液组分。

**培养温度** 酶的反应速度与温度有关。在一定范围内,随着温度升高,反应速度不断加快;高温时,酶会变性,并丧失本身的活性。低温时,酶活性会降低。在温度从 45° 到 60° 范围内,表现出土壤酶的活性最高(图 4)。但是,土壤酶活性并不是在其最适温度范围内进行测定,因为它与生长期间的土壤自然温度有很大差异。此外,由于培养时间相对转长(从几小时到几昼夜),在这种温度条件下,可能导致酶的某种程度的热失活。土壤酶活性的测定通常是在 30—50° 时进行。根据国际酶命名及分类协会的建议,必须保持标准温度 30°。

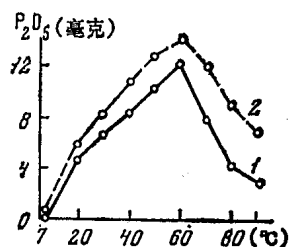


图 4 温度对土壤核酸酶的影响 (Хазиев, 1969)

1——淋溶黑钙土; 2——碳酸盐黑钙土

**培养时间** 土壤酶的活性必需在开始的反应速度下进行测定,并在整个培养期间要使之保持恒定(图 5)。这是因为,由于下列原因,酶的反应速度可能下降: 1) 基质浓度减至低于饱和浓度,因为它在反应过程中不断被消耗,并可能被土壤所吸附; 2) 在反应时间内,酶本身的部分被破坏; 3) 形成的反应产物的影响。这里可能有两种影响: 反应产物对酶活性的专性的阻滞和酶促反应的可逆性,因为,根据质量作用定

律,可逆反应的速度与反应物质的浓度积成正比。在复杂的土壤基质中,还可能有其它抑制因素起作用(图5)。

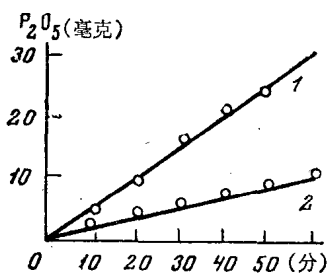


图5 土壤磷酸酶反应速度的变化 (Хазиев, 1968)

1——淋溶黑钙土; 2——生草灰化土

由于土壤酶活性相对的低,土壤与基质共同培养的时间应该较长——从几小时到几昼夜。但是,必须把培养时间缩到最短,以便排除上述诸因素的不良影响,和某些微生物菌落的可能生长。

**培养过程中反应混合物的搅和** 土壤酶是以吸附态存在

在土壤胶体的表面。反应混合物在培养过程中,定期的搅和能使基质不断地流向酶,并将反应产物从作用区除出。搅拌的频度很重要,测定每种酶的活性时,可通过实验查知。

**反应产物的定量提取** 土壤酶学方法的基本要求之一,是将酶反应产物从土壤中完全提取出来,根据提取物的量,量度酶的活性。可用相应的缓冲液和各种溶剂作为提取剂,测出未被土壤吸附或极少吸附的酶反应产物的被提取组分的量。例如,在测定磷酸酶活性时,最好是测定苯磷酸酯或酚酞磷酸酯的水解产物的有机部分——酚和酚酞的量。因为正磷酸盐被土壤大量固定,从而可能得出过低的活性值。

**对照样品** 在土壤中,经常存在着许多与土壤酶学研究中用作基质的有机化合物的分解产物类似的物质(葡萄糖、氨基酸、磷、铵等等)。因此,为了校正酶活性的测定结果,必须做下列对照试验。

(1) 基质的非酶转化的对照试验(无酶对照)。在测定氧化还原酶的活性时,这是绝对必要的,因为在土壤中经常存在

着能转移电子的变价阳离子 (Cu, Mn, Mo 等)。一般地说来, 土壤里很少或不存在基质的非酶水解作用。将反应瓶中的对照土样; 在  $180^{\circ}$  时干热灭菌 2—3 小时或在 2 个大气压下热压处理 1 小时几次。但是, 当用比色法或滴定法测定酶反应产物时, 这种对照就不适用了。高温加热土壤, 会使有机物质发生很大的变化: 有机物质溶解, 并使滤液着色。通常用专性的化学抑制剂——重金属的盐、氰化物等来代替剧烈的酶热钝化法。往干热灭菌或用抑制剂处理的土壤中加入防腐剂、缓冲液和基质, 而后则与试验土样进行同样操作。在试验样品中, 于培养结束后立即加入同样数量的抑制剂。

(2) 土壤物质(连同酶反应产物)的对照试验(无基质对照)。用甲苯处理未经灭菌的土壤, 加入缓冲液和一定体积的水(代替基质)。往后的操作与试验样品的相类似。

(3) 试剂及基质纯度和基质自生分解的对照试验(无土对照)。往反应瓶中注入规定数量的基质、缓冲液和防腐剂。对照混合物的往后处理与试验样品同。对于某一组试剂和基质, 只需设一个对照。

在测定水解酶的活性时, 可只限于设置没有基质的对照和没有土壤的对照。但是, 必须预先确证: 在土壤中不会发生基质的非酶水解。对此, 应设置若干无酶对照。在测定氧化还原酶活性时, 只须做无酶的对照, 因为它包括了无基质对照和无土对照。在计算酶活性时, 从试验处理的数值减去对照数值的和, 所得的差相当于基质酶转化时生成的产物的量; 在换算为单位土重时, 用酶反应产物的量来表示土壤的酶活性。

**土壤酶活性的量度单位** 在土壤酶学中, 还不曾拟出测定酶活性的标准。无论是酶活性的测定条件和方法, 还是测定结果的表示法, 都很不一致。对于不同的酶提出了不同的、

任意决定的单位。例如，表示酶活性的方式有：基质的物理变化(粘度，旋光度、光密度的变化)，反应产物的量，基质的转化或残余部分的量，酶单位，能量单位等。由于没有量度酶活性的标准单位，即使用统一的方法，也不能对结果进行比较。

除了拟定测定土壤酶活性的标准条件外，还必须划一量度酶反应速度的单位。看来，当前最好是保留应用得最广的量度单位——30° 时单位时间由单位土重的基质酶转化产物的量(微克，毫克，毫升，厘米<sup>3</sup>，微克分子等等)。同时，根据国际酶学生物化学协会的建议(1962)可取标准酶单位(*E*)作为量度单位。一个标准单位，相当于一定条件下，1分钟内酶促1微克分子基质转化的酶量。对于土壤酶，该量按单位土重(例如，一克土)计。

## 土壤样品的选择和 酶分析前的处理

土壤样品必须仔细选择，因为所有以后的结果均取决于土样选择的准确程度。

事先，在记录本上，详细地记载研究的地区、剖面配置处、地块或试验田的情况(地形、植被、前茬、农业技术、施肥情况)和详细的土壤特性。必需记录采集的时间。

土壤样品的选择方法，取决于摆在研究工作者面前的任务。当研究不同植被下的酶活性时，应按植物生长期从根际和根外采取土壤样品。必须考虑到，生荒地和多年生牧草地的土壤，0—5—7厘米土层具有最大的活性，而在土壤较深的土层中，酶的活性显著降低。因此，最好是分层取样。

当研究耕作土壤时,应从整个耕作层深度取样,事先除去可能混入的最表层的土壤。耕作层可以分为2—3层。在夏季,0—5厘米土层很干,酶的活性降低。在正常的水热条件下,这一土层的酶活性最大。当研究施肥和农业技术措施对生物化学过程的影响时,要在作物生长期内取样若干次。时间最好安排在供试农作物的各个生长发育阶段。在所有这些情况下,都是取混合样品。为了研究试验地块的微生物特性和测定每百米小区的酶活性建议取5个样品(土壤微生物及其代谢产物的研究方法,1966)。每个土样由三个混合样品组成。如果试验区小于100平方米,则按对角线取三个样品,每个样品由三个混合样品组成。每个样品分别进行分析。

在计算活性时(准确度达10—15%,显著性水准不小于0.95),样品必需的重覆次数,视供试面积上酶活性的变差系数而定。

在每一小区上取样后,将工具(小铲、钻、小刀)多次插入从中取样的土壤,使之清洁。

在研究酶在土壤剖面上的分布时,应从新挖成的土壤剖面上按发生层次,并从各层中为该层所固有的形态特征最明显的部分采集样品。有时,从剖面的三个壁上取混合样品。样品的采集应从下层(母质)至上层顺序进行,事先将取样处弄净。

为了比较研究不同土类的酶活性,可仅进行一次测定,但样品需在同一时间采集,生长初期(春天)或末期(秋季),以除去活的植物根系对酶活性的影响。为研究生态-地理特性而采集的土壤样品,实际上不可能以新鲜状态进行分析,因此,需要立即使干(必须在阴凉处,并尽可能快地使干)。土壤应经常翻动,土壤样品晾干和保存的条件应该一致。分析前,晾干的或新鲜的土壤均在冷处保存。它们的活性降低不大。



用什么样的样品进行土壤酶活性的分析问题，取决于我们面临的任務。在田间或盆栽试验中研究酶活性的动态时，以采用自然湿润状态的新鲜土样较好。在分析时，将自然湿润的土样放到磨口瓶中，用甲苯处理以抑制微生物的活动，并将瓶置于冷处。在其它的情况下，将土壤样品放在阴凉处，最好是冷处使干，并在分析前把样品一直放在密闭的容器里和置于阴凉的地方。

分析的土样要仔细地剔除根和其它植物残体、石头和其它夹杂物。将风干的土粉碎，并通过1—2毫米筛。

在所有情况下，酶活性的指标均换算为风干或绝干土重，并需指出是用什么样的土样(干土或自然湿润土)进行分析的。

## 土壤中酶活性的测定方法

根据酶促反应的类型，可将所有已知的酶分为六大类。

1. **氧化还原酶** 酶促氧化还原反应。
2. **水解酶** 酶促各种化合物中内分子键的水解和裂解反应。
3. **转移酶** 酶促化学基团的分子间或分子内的转移同时产生化学键中的能量传递的反应。
4. **合成酶** 酶促伴随有 ATP 或其他类似三磷酸盐中的焦磷酸键断裂的两分子的化合反应。
5. **裂合酶** 酶促有机化合物的各种化学基在双键处的非水解裂解或加成反应。
6. **异构酶** 酶促有机化合物转化成它的异构体的反应。

研究得相当详细的，是广泛分布于土壤中的氧化还原酶和水解酶，它们在土壤生物动力学中具有极其重要的意义。对