

郑洪元 张德生 编著

土壤动态生物 化学研究法

科学出版社

土壤动态生物化学研究法

郑洪元 张德生 编著

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书是土壤动态生物化学研究方面的主要参考书。全书共分七章，前三章分别从土壤呼吸，土壤酶学和土壤代谢等三个主要方面，系统地介绍了国内外土壤动态生物化学研究的进展；并介绍了有关的基础知识。后四章，系统地介绍了土壤有机组分分析，土壤生化作用强度测定、土壤酶活性测定以及土壤代谢等方面的研究方法。在每一分析项目中，包括测定原理及具体操作，作者都尽可能多的介绍几种测定原理及相应的测定方法，供读者选择使用。

本书可供从事土壤、土壤微生物、土壤农化、生化工作的科技人员以及有关大专院校师生参考。

土壤动态生物化学研究法

郑洪元 张德生 编著

责任编辑 陈培林

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

*

1982 年 8 月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1982 年 8 月第一次印刷 印张：9 3/4

印数：0001—4,150 字数：219,000

统一书号：13031·1974

本社书号：2680·13—12

定价：1.50 元

前 言

任何有生产力的土壤,全充满着生命,具有大量活跃的微生物,土壤原生动物,土壤动物和化学活性的无机-生物-有机复合体。在土壤中大量的各种微生物,进行着多种的反应和相互作用。这些作用大多数是化学性质的。正是由于土壤中存在这些反应,才保证了人类在地球上的继续生存。土壤微生物把土壤中的复杂有机化合物分解为简单的无机化合物是循环的。这种不断的分解和组合过程,维持地球上无止境的生物源泉。这些化学过程,包括氮、碳、磷、硫等的循环。这种提法显然是过于简单化了,因为这些过程可能永远不能彼此分割开单独进行,而是互相啮合,圆滑地工作着,起着非常完善的同步效果。因此,在研究土壤中所进行的总体过程时,就必须考虑应用动态学的方法。

目前土壤学家和土壤微生物学家,越来越倾向于把土壤作为一个有机-生物-无机复合体,从动态生物化学的观点,来研究与土壤发生和土壤肥力有关的问题。土壤酶学问题是土壤生物化学研究的重要组成部分,因而,关于土壤酶学的研究也引起人们的重视。有的学者提出,可以利用土壤酶的活性,作为土壤微生物总的活性及土壤肥力的指标;有的学者认为可以利用土壤中某种酶的活性,来判断土壤中有机质转化过程强度和方向;有的学者甚至提出,可以利用土壤酶活性来指示土壤类型以及作为土壤发生学划分的依据。

由于土壤是一个非常复杂的体系和土壤酶活性是来自积聚在土壤中的酶,以及来自土壤中繁殖着的微生物的酶活性。

此外,土壤中酶也有来源于动植物残体的。这样就给土壤酶的研究带来很大的困难。大量的研究结果证明,土壤中积累的酶在土壤化学过程中的重要性,因为它们确实参与土壤元素的生物循环。它们在有机质分解的初期和一些矿质化合物的转化,以及在不适于微生物生长的条件下,承担着重要的任务。目前,对土壤酶的研究,尚没有比较系统的完善方法,从事这方面的工作者,正在探索阻止酶的继续生物合成和细胞再繁殖产物的同化和降解;防止导致细胞表面的破坏,致使基质接触胞内酶和不影响试样中胞外酶的方法。

《土壤动态生物化学研究法》一书,是作者们在多年从事土壤生物化学研究工作中,所积累的有关土壤化学过程强度和土壤酶等研究方法的资料的基础上编写的。本书在前三章中简略地论述了土壤作为具有活性的复杂体系的生理生化特性。表明土壤中进行的这些化学过程与土壤肥力的相关性,指出了进行这方面研究的重要意义。在后四章中,除介绍了土壤中生物化学过程强度和土壤酶活性的测定方法外,还提出土壤代谢研究法。“土壤代谢”这个提法,我认为这是作者的大胆创见。这意味着著者们把土壤作为一个有生命的有机总体,来进行研究。这方面研究工作的逐步完善,将会把土壤科学的研究,推向一个新的水平。当然,著者虽然在这方面介绍了一些研究方法,有的是引用前人的方法,有的是他们修改的方法,但这只能说是初步的试探。比较完善的系统研究方法,要在今后的研究实践和工作深入中,逐步摸索出来。

张宪武

1979年2月

目 录

前言.....	v
第一章 土壤呼吸.....	1
一、方法上的问题.....	3
(一) 土壤 CO ₂ 释放量的测定	4
(二) 土壤氧的吸收测定	7
(三) 其它一些土壤呼吸测定仪	10
(四) 土壤样品处理问题	11
二、结果整理与分析.....	13
三、土壤条件与土壤呼吸.....	19
(一) 土壤水热条件与土壤呼吸	21
(二) 土壤养分状况与土壤呼吸	22
(三) 植物与土壤呼吸	23
(四) 农药的应用与土壤呼吸	25
(五) 土壤灭菌与土壤呼吸	26
第二章 土壤酶学.....	29
一、土壤酶的基本性质.....	31
(一) 酶学的一般基本概念	32
(二) 土壤酶的基本性质	42
二、土壤中的酶类及其研究法.....	53
(一) 土壤中已被测定的酶类	53
(二) 土壤酶的研究方法	54
(三) 土壤酶的提取及其性质	58
(四) 土壤酶学研究中的某些问题	63
三、土壤状况与土壤酶活性.....	70

(一) <u>土壤物理化学性质与土壤酶活性</u>	71
(二) <u>土壤类型与土壤酶活性</u>	74
(三) <u>植物与土壤酶活性</u>	76
(四) <u>施肥、耕作以及其他农业措施与土壤酶活性</u>	77
第三章 <u>土壤代谢</u>	81
一、 <u>土壤的有机组成</u>	81
二、 <u>土壤的氧化代谢</u>	87
(一) <u>氧化与能量的产生</u>	87
(二) <u>土壤中糖类的氧化</u>	97
(三) <u>土壤中氨基酸的氧化</u>	101
(四) <u>土壤中有机的氧化降解</u>	105
(五) <u>酚类化合物的降解</u>	106
三、 <u>土壤中有机残体的分解与腐殖质化</u>	108
(一) <u>植物残体分解的图式</u>	108
(二) <u>氧的分压及其他土壤条件对土壤有机质降解的影响</u>	112
(三) <u>有机残体的转化与土壤酶活性</u>	115
第四章 <u>土壤有机成分分析法</u>	125
一、 <u>土壤全量分析</u>	125
(一) <u>土壤全氮量测定</u>	125
(二) <u>土壤全磷量测定</u>	127
(三) <u>土壤全碳的测定</u>	129
二、 <u>土壤有机质成分分析</u>	130
(一) <u>酸性水解物中有机氮的测定</u>	130
(二) <u>0.1M 焦磷酸钠 (pH7.0) 抽出物分析</u>	133
(三) <u>酸性硫酸钾抽出物测定</u>	138
(四) <u>土壤有机酸的测定(气相色谱法)</u>	143
(五) <u>土壤多糖的测定(附五碳糖的比色测定)</u>	144
第五章 <u>土壤生物化学过程强度的测定</u>	149
一、 <u>总生物活性测定</u>	150

(一) 总“生物量”的测定	150
(二) 土壤呼吸作用强度的测定	152
二、土壤生化作用强度测定	157
(一) 纤维素分解作用强度的测定(埋片法)	157
(二) 氨化作用强度的测定(土壤培养法)	158
(三) 固氮作用强度的测定	159
(四) 硝化作用强度的测定	163
(五) 磷转化强度的测定	167
(六) 酚分解作用强度的测定	169
(七) 腐殖质分解作用强度的测定	171
第六章 土壤酶活性的测定	173
一、氧化还原酶	174
(一) 脱氢酶	175
(二) 硝酸盐还原酶(包括亚硝酸盐还原酶及羟氨还原酶)	180
(三) 过氧化氢酶(接触酶)	184
(四) 过氧化物酶	188
(五) 多酚氧化酶	192
(六) 尿酸盐氧化酶(尿酸酶)	194
二、转移酶	198
(一) 果聚糖蔗糖酶	198
(二) 硫氰酸酶	200
三、水解酶	202
(一) 磷酸酶	203
(二) ATP 磷酸酶	210
(三) 植酸酶	212
(四) 核酸酶	214
(五) 脂肪酶	216
(六) β -呋喃果糖苷酶(转化酶、蔗糖酶)	218
(七) α -葡萄糖苷酶(麦芽糖酶)	224

(八) β -葡萄糖苷酶	226
(九) α -半乳糖苷酶与 β -半乳糖苷酶(蜜二糖酶和乳糖酶)	230
(十) α -淀粉酶与 β -淀粉酶	231
(十一) 纤维素酶	233
(十二) 木聚糖酶	237
(十三) 果聚糖酶	240
(十四) 葡聚糖酶	241
(十五) 1,3- β -葡聚糖酶	243
(十六) 蛋白酶	244
(十七) 脲酶	252
(十八) 天门冬酰胺酶	260
(十九) 谷氨酰胺酶	261
(二十) 芳基硫酸酯酶	262
四 裂合酶	264
(一) 色氨酸脱羧酶	264
第七章 土壤代谢研究法	266
(一) 土壤渗滤培养技术 (Quastel, Scholefield, 1957) ...	266
(二) 土壤酶的提取及其基本性质的测定	267
附录	272
参考文献	283

第一章 土壤呼吸

呼吸，酶和代谢，这三者是生命特征的主要基本表现形式。关于呼吸作用过程的内容在微生物以及动植物方面已经进行了很好的研究，同时在这方面的论述文章很多。在土壤学方面，自五十年代开始，提出从土壤整体出发，来阐述土壤中生物化学过程有关的问题后，对土壤呼吸作用这一过程虽然进行了一些工作，但由于对土壤呼吸这一过程的含义了解很不一致，因此不仅工作比较零散，而且在这方面较为系统的综述文章也不多。

土壤呼吸这一术语，初始时的含义为：一定时间内，一定土壤表面放出的二氧化碳量称为土壤呼吸。以后，有研究者把土壤呼吸这一含义扩展为土壤与大气间的气体交换。由于土壤空气组成中氧及二氧化碳的量，取决于土壤微生物生命活动对氧的吸收和二氧化碳的释放，以及它们的扩散速度，因此也有一些研究者，把土壤空气组成中，氧和二氧化碳的变化理解为土壤呼吸。

呼吸在生理学上的含义很广泛，根据 Stephenson (1949) 的意见，主张把一切发生能量的反应都称之为呼吸。这些反应中需要氧的，叫做需氧性呼吸或氧化，对于不需要氧的，叫做嫌氧性呼吸或发酵。在细菌生理学上，呼吸作用一般专指氧化作用，发酵一词用于表示糖类及其有关化合物的嫌气性分解(张宽厚等，1962)。今天我们把土壤作为活的生物体系来看待，在讨论土壤呼吸时，也应该把土壤呼吸的含义与植物生理学和微生物生理学上的含义统一起来。但由于对土壤呼吸系

统的研究较少,目前以其广泛的含义来代表较为恰当。

呼吸作用过程它与有机体的总的新陈代谢相关,一方面它是供给能的过程,在呼吸时,作为呼吸基质的有机质的化学能被释放出来,被用来满足生命过程的需要。另一方面,它是有机体代谢过程的表现,呼吸时进行着一系列物质的转化,在这转化过程中,形成了各种高度活性物质。这些物质进一步在有机体代谢中起着主要的作用。因此,呼吸作用过程本身反映了有机体的基本生理功能,以及有机体因外界环境条件变化所引起的反应。对土壤呼吸过程的研究,同样也有助于我们对土壤有机体的基本生理功能,以及环境因子的改变而引起土壤状况变化的了解。

关于土壤呼吸,在早期的土壤研究方面,通常利用 CO_2 释放量来表征土壤的呼吸作用。在测定土壤空气中二氧化碳含量时,虽然土壤中 CO_2 的量有一些是纯化学过程所产生,但可以认为,它的来源主要是由于土壤微生物的生命活动结果,以及一部分是由于植物根的呼吸 (Rovira et al., 1967; Alexander, 1977)。计算表明,土壤二氧化碳含量中 85—90% 以上是来自于土壤微生物的生命活动 (Lundegardh, 1927),但有时植物根的呼吸可达 20% (Sauerbeck, Johnen, 1977)。

在研究土壤呼吸时,多半是结合植物残体在土壤中分解时,测定放出的 CO_2 量进行的 (Waksman, 1952),这些工作表明,土壤中 CO_2 释放量与土壤微生物总数,土壤中有机质量,以及有机残体分解过程强度存在一定的相关性,因此,不少的研究者利用土壤 CO_2 释放量作为衡量土壤肥力的指标,或者作为土壤微生物总的活性指标 (Stotzky, 1965; 田迈市郎,甲斐秀昭, 1975)。考虑到土壤呼吸过程本身的复杂性,以及吸取了生物化学其它方面 (尤其是微生物方面) 的研究成果,近二十年来,国内外学者已注意从土壤的“整体”代谢方面,来讨

论土壤呼吸问题 (Quastel, Scholefield, 1951; Rovira, 1953; Chase, Gray 1953, 1957; Katzenelson, Stevenson, 1956; Stevenson, 1958; Domsch, 1962; McLaren, 1963; Tride, Bewick, 1978)。

另一方面,土壤呼吸时所释放的二氧化碳,进一步对植物的生长及土壤的生物化学作用过程的影响相当大。 CO_2 能作用于土壤的某些组成而增加其溶解度,因而改善了土壤养分状况,对于促进植物的生长和土壤微生物生命活动均为有利。

土壤呼吸所释放出的二氧化碳可能在土壤中贮积,随着氧的利用和二氧化碳的积累,可能造成土壤的嫌气状况,而又将导致改变土壤微生物的活动方向。

土壤呼吸所释放出二氧化碳同样是植物所同化的二氧化碳的主要来源。据计算,在一个轮作期中,休闲地放出的 CO_2 量为 3.5 吨/公顷,冬黑麦地放出的为 6.5 吨/公顷,燕麦地放出 7.9 吨/公顷,如果按每公顷地所收获植物,为了合成该物质所需同化的二氧化碳量计算,可以认为植物所同化的二氧化碳,一半以上由土壤所供给 (Макаров, 1955)。

因此,可以认为对土壤呼吸过程的了解,主要是了解土壤的生理生化过程的实质。但是由于土壤并不是孤立存在的,尤其是它与植物相联系,在了解土壤呼吸作用过程时,也必须考虑它与植物生长之间的关系。

一、方法上的问题

土壤呼吸的研究,不仅在实验室条件下进行,而且也在田间进行 (Stotzky, 1965; Drobnikova, Drobnik, 1965; 田迈市郎、甲斐秀昭, 1975) 通常以 CO_2 的释放量或者 O_2 的吸收值来代表呼吸作用强度。因此,在测定土壤呼吸时,也沿用生理

学上所常用的方法进行，同时根据土壤本身条件的要求而加以必要的修改。

(一) 土壤 CO_2 释放量的测定

有许多方法可用于测定土壤所释放出的 CO_2 量。Waksman, Starkey (1924) 的早期工作利用碱吸收土壤所释放出的 CO_2 ，然后用酸滴定，根据耗碱量而计算出 CO_2 的量。也有研究者借助于不含 CO_2 的空气流，驱出土壤所释放的 CO_2 ，用氯化钙吸收，然后称重测定(Martin, 等, 1959; Allison, 1959)。

Frercks (1954) 曾利用 0.1M 的 Na_2CO_3 溶液吸收土壤所释放的二氧化碳，然后根据 p-xylanes phthalein phenolphthalein 指示剂颜色的变化而进行测定。同样，Horn (1955); Beck, Poschenrieder (1959) 利用酚酞为指示剂以 0.1M NaOH 吸收土壤所释放出的二氧化碳，然后进行比色测定。利用比色法测定土壤呼吸作用时，指示剂的浓度、温度的变化均能影响结果，在严格控制条件下，所得的结果值平均差异小于一般用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 滴定法所得的差异值 (Beck, Poschenrieder, 1959)。

Zottol (1960) 曾利用碱溶液吸收二氧化碳后， Na_2CO_3 形成所引起溶液电导的改变而求出土壤 CO_2 量。Meyer, (1959) 等曾用电解滴定法测定田间土壤所释放出的 CO_2 量。

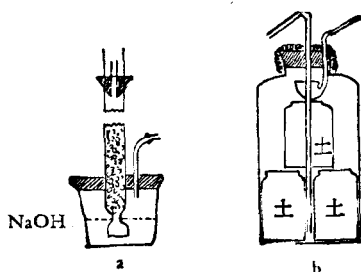
在实验室条件下研究土壤呼吸时，所放出的二氧化碳，有直接吸收法和通过抽吸或通气将土壤所发生的 CO_2 导入一定的吸收剂进行测定。

在直接吸收法中，首先将土壤调节含水量至最大持水量的 50—60%，然后将一定量的土壤置于适当体积的容器中，如大试管、三角瓶，广口瓶，瓶口配有密封性能良好的塞子。

然后在土壤上放置盛有一定体积碱液的小杯,用于吸收 CO_2 , 将瓶塞好,置于一定温度下,恒温培养,根据要求,定期取出分析。

通气法或抽吸法,培养方式基本上与直接吸收法相同,所差异者在于,土壤所发生的 CO_2 用无 CO_2 的空气流导入吸收剂,然后进行测定,这一方法目的在于维持氧分压于固定条件下进行土壤呼吸测定。

这一方法由于简易可行,一直为许多研究者所采用。同时也应用于研究有机残体在土壤分解过程中释放的 CO_2 的测定。有关实验室条件下,测定土壤呼吸时放出的 CO_2 的装置见图 1-1。



a. CO_2 吸收瓶; b. 土壤呼吸容器

图 1-1 实验室条件下测定 CO_2 的装置,引自 Stotzky 等(1958)

用无二氧化碳的空气流驱出土壤所放出的 CO_2 , 这样连续通气法能否提高土壤 CO_2 的放出量,或者直接吸收法是否吸收 CO_2 不完全,或是由于土壤表面贮积一定的 CO_2 时,能否将进一步抑制 CO_2 从土壤扩散出来,从而导致 CO_2 吸收不完全。对于这些问题存在不同看法。

Brown (1934) 认为通气(间歇通气)测定法并不提高土壤放出的二氧化碳量,反而连续通气引起土壤水分损失而影

响 CO_2 的放出量。在一个体系中,当土壤的表面空气中 CO_2 含量不超过 12% 时,不会影响土壤释放 CO_2 。也有一些研究者认为,在密闭体系内,用碱直接吸收 CO_2 ,由于氧的浓度并不恒定,因而所得结果值较低 (Norman, Newman, 1941; Галстян, 1959)。为了消除这一影响,保证土壤与大气间的气体交换,因此有人建议,用配有 CaCl_2 吸收管的塞子,借以吸收大气中的 CO_2 ,使密闭体系与大气相通,保持体系中有恒定的氧的浓度 (Галстян, 1959)。

在田间条件下,测定土壤二氧化碳释放量时,基本上采用气体收集的方法,原理与实验室直接吸收法相同。Штатиов (1952) 将 15×11.3 厘米的盒子覆于田间表土上,内放一盛碱小容器,经一定时间后取出,用酸滴定,计算出每平方米每小时放出的 CO_2 的量。Макаров (1955) 则利用瓶口直径为 5 厘米,体积为 1—1.2 升的广口瓶覆于表土上,经一定时间后,迅速翻转,用塞子塞紧,带回实验室,加入定量的碱液以吸收瓶中所收集的 CO_2 ,然后用酸回滴,计算出土壤所释放出的 CO_2 。Wallis, Wilde (1973) 在研究森林土壤呼吸时,用连续吸气法,直接在田间进行土壤 CO_2 量的测定。

为了测定不同层次的土壤空气组成中 CO_2 的变化量,Макаров (1955, 1959); Frinkel Nir (1958) 等采用特制的土钻收集各土层的空气,然后用一般的气体分析仪分析空气中氧及二氧化碳的百分组成。也可以用减压法将各土层空气吸集至一定容器中,然后用容量法分别进行测定。

Epstein, Kohnke (1957) 曾设计,能在基本保存土壤本身状况的条件下,测定添加有机质的各土层在不同时期,二氧化碳及氧的变化量的方法,借以研究有机质的施用对土壤通气的影响。Fountame, Brown (1959) 等所设计的土壤呼吸器,体积为 2000 升,能观察在植物正常生长下,各个生长季节中,土

壤所释放的 CO_2 。

为了研究水稻土的代谢过程,山根一郎(1975)设计了一套用于水稻土田间或实验室条件下气体取样管,并能连接于 Van Slyks 气体分析仪,用于分析由于水稻土代谢过程中所释放出的各种气体。也可连接于气相色谱仪,进行气体成分分析。

(二) 土壤氧的吸收测定

以往土壤呼吸作用强度的研究,大多是根据 CO_2 释放量测定。在一般生理生化研究中,在实验室条件下测定有机体的呼吸作用时,采用氧的吸收法,主要是依据在恒温条件下气体的压力与体积改变关系来测定。目前,Warburg 测压呼吸仪也在土壤呼吸研究中得到了广泛的应用(Webley, 1947; Chase, Gray, 1957; Drobnikova, Drobnik, 1965; Nawmen, 1963)。

利用 Warburg 测压技术,测定氧的吸收量时,是按下式计算的:

$$Q_{\text{O}_2} = k \cdot \Delta h$$

k ——反应瓶常数

Δh ——测压管读数,即测定前后测压管开口端的液面差(毫米)

为了使 Warburg 测压技术适用于土壤呼吸的研究,Webley (1947) 提出用下列修正式计算反应瓶常数(k)

$$k_{\text{O}_2} = \frac{V - (V_s + V_f) \frac{273}{T} + V_f \alpha_{\text{O}_2}}{P_0}$$

V ——测压管至连接反应瓶的总体积

V_s ——土壤所占的体积 = $\frac{\text{土重(克)}}{\text{土壤比重}}$

V_f ——液体体积

α_{O_2} ——液体吸收氧的系数

T ——273 + 测定时的温度

P_0 ——10000 毫米 (假设测压管内用的溶液比重为 1.033)

Webley (1947) 认为,在研究相类似的土壤时,采用土壤的平均比重不会导致统计学上的误差,但是,对于差异性较大的土壤,必须按各种土壤的比重逐一计算反应瓶常数 (Chase, Gray, 1957)。

在这种水土体系中,由于土壤含有粘粒矿物,有机质,代换性阳离子及其它不溶解物质,因此,在存在土壤的液体中气体溶解度(即 α_{O_2}) 也不同于纯水所得的值。另一方面土壤固相也能吸附氧,土壤吸附的氧量也取决于土壤本身的含水量及粘粒矿物质和数量 (Rukcles, Scott, Nakagama, 1958)。例如,水分含量为 10—25% Edina Subsoil 所吸附氧的量低于理论上土壤水所能溶解氧的量,而对于蛭石 (Vermiculite),当水分含量超过 5% 时,所吸附氧的量相当于理论上纯水所能溶解氧的量。因此,在计算反应瓶常数时,不能仅只考虑土壤溶液对氧吸附的影响,而且还要考虑到土壤固相对气体的吸附,以及它对气体扩散的速度的影响。

应用 Warburg 测压技术于土壤呼吸的研究,通常称取 2 克至 4 克风干土壤于反应瓶中,基质可以事先和土壤混合,然后用水调节至土壤最大持水量的 60%,在测定的温度下平衡一定时间以后,开始进行测定,在测定过程中一般不须振荡 (Stevenson, 1958; Drobnik, 1960)。如果土壤呼吸的测定过程仅只进行数小时,那么反应瓶的中心小室碱液的浓度不会