

红壤磷酸单酯酶活性测定方法的改进^①

龚松贵^{1,2}, 王兴祥^{1*}, 张桃林¹, 梁圆^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以甘油磷酸钠为底物, 通过添加适量无机磷减少土壤吸附作用对磷酸单酯酶活性测定的影响, 探讨红壤磷酸单酯酶活性测定方法的改进。在 4 个红壤样品的测试结果中, 与 Rogers 法相比, RSD 从 $\leq 10.2\%$ 降为 $\leq 3.2\%$; 省去了 HCl 浸提步骤; 耗时从 19 h 左右变为 2 h 左右。与对硝基苯磷酸盐法相比, 底物更具代表性; 所测磷酸单酯酶活性为 $P 4.4 \sim 6.8 \mu\text{mol}/(\text{g 土}\cdot\text{h})$, 比对硝基苯磷酸盐法的测定值 $P 0.8 \sim 2.2 \mu\text{mol}/(\text{g 土}\cdot\text{h})$ 更大, 更灵敏。

关键词: 红壤; 磷酸单酯酶; 甘油磷酸钠

中图分类号: S151.9

土壤磷酸单酯酶 (phosphomonoesterase, 简称为 PMEase) 活性能快速、灵敏反映土壤磷 (P) 环境胁迫的状况^[1]。对于评价土壤磷酸单酯酶活性的方法, 目前广泛采用的是 Tabatabai 和 Bremner^[2] 建立的对硝基苯磷酸盐法。该方法以对硝基苯磷酸盐为底物, 借助 $\text{CaCl}_2\text{-NaOH}$ 处理措施定量回收水解产物对硝基酚, 具有快速、精密估测土壤磷酸单酯酶活性的优点。而以 4-甲基伞形酮磷酸盐为底物的荧光光度法, 不受土壤有机质的干扰, 具有较高的灵敏度^[1,3]。但是, 这两种方法都以人工合成的酚酯磷酸盐为底物, 其性质与土壤主要磷酸酯 (磷酸单醇酯) 的性质相差很大^[4], 很有可能造成较大的系统误差。为了减小这种误差, Rogers^[5]、Jackman 和 Black^[6] 以及 Skujins 等^[7] 选择磷酸单醇酯为底物。他们主要通过测定培养前后无机 P 含量的变化来评价土壤磷酸单酯酶活性。但是这种方法受土壤吸附无机 P 的影响较大。当使用大量 HCl 浸提被土壤吸附的无机 P 时, 测定过程又将变得繁琐、耗时。

根据前人^[8-11] 的研究结果, 培养酸度以接近土壤酸度为宜, 甲苯可不用^[8], 培养温度以接近土壤田间的采样当日平均温度为好^[10,12-13]。不同的缓冲介质对磷酸单酯酶活性的影响很大^[14], 因此在选用缓冲溶液的时候, 要特别慎重。所以, 选择恰当的底物和适宜的分析手续对于准确测定土壤磷酸单酯酶活性有着重要意义。

本研究基于以下两个假设: ①所添加的有机 P 对土壤无机 P 的吸附影响较小, 造成土壤无机 P 吸附量的变化可以忽略; ②在培养过程中, 所添加的无机 P

短期内不影响土壤磷酸单酯酶活性的测定结果。研究目的是以磷酸单醇酯为底物, 通过向待测土壤中添加适量无机 P, 借此消除土壤吸附无机 P 所带来的影响, 从而改进红壤磷酸单酯酶活性的测定方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

4 个供试土壤均采自中国科学院红壤生态实验站 ($28^{\circ}13' \text{N}$, $116^{\circ}55' \text{E}$) 长期实验的花生地, 其成土母质为第四纪红黏土。采样深度为 0~20 cm, 采样当天平均温度约 25°C , 风干后过 10 目筛备用。供试土壤的差异主要在于种植花生时 P 肥处理措施的不同。1 号红壤: NK 处理; 2 号红壤: NPK 处理; 3 号红壤: NPK + 石灰石粉处理; 4 号红壤: NPK + 猪粪处理。实验前为稀疏马尾松林荒草地, 1997 年开垦种植花生, NPK 处理每年尿素、钙镁磷肥、KCl 施用量分别为 220、1450、300 kg/hm^2 ; 石灰石粉和猪粪施用量分别为 1500 kg/hm^2 和 15000 kg/hm^2 。供试土壤耕层的基本理化性质如表 1 所示。

表 1 供试土样的理化性质

Table 1 Chemical and physical properties of tested soils

土样	pH (H ₂ O)	无机 P (mg/kg)	有机 P (mg/kg)
No.1	4.50	146.8	13.6
No.2	5.83	656.1	46.7
No.3	7.57	644.4	38.7
No.4	6.20	1414.3	94.0

①基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX1-YW-09 和 KZCX2-YW-438) 资助。

* 通讯作者 (xxwang@issas.ac.cn)

作者简介: 龚松贵(1978—), 男, 广东英德人, 博士研究生, 主要从事土壤化学研究。E-mail: gsggd@tom.com

β -甘油磷酸二钠和对硝基苯磷酸钠均购于 Sigma 化学试剂公司, 皆为生化试剂。其他试剂均购于国药集团, 皆为分析纯。

Unico 2100 分光光度计购于中国上海 Unico 分公司; PHS-3C 酸度计购于上海康仪设备有限公司; 恒温培养箱购于杭州雪中炭恒温技术有限公司。

1.2 溶液配制

称取 15.306 g 的 β -甘油磷酸钠 (五水化合物, 分子量 306.11), 直接用高纯水溶解, 定容于 250 ml 容量瓶中, 配制成 0.2 mol/L 的甘油磷酸钠母液。

底物甘油磷酸钠溶液 (0.1 mol/L) 的配制: 移取 125 ml 的甘油磷酸钠母液, 加入 1000 μg 的无机 P (KH_2PO_4), 用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节到所需 pH (pH 的大小根据土壤 pH 而定), 加入相同 pH 的 1 mol/L HAc-NaAc 缓冲溶液 25 ml, 定容到 250 ml。该溶液中无机 P 的最终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。除了不加甘油磷酸钠外, 对照的配制方法同上。由于本研究通过反应前后无机 P 的变化量来表示土壤磷酸单酯酶活性, 而土壤对无机 P 有强吸附作用, 故底物中加入适量无机 P, 其作用是尽量减少土壤吸附作用对土壤磷酸单酯酶活性测定的影响。有研究表明, 所加无机 P 短期内不影响土壤磷酸单酯酶活性^[15]。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤对无机 P 的等温吸附特征 准确称取 1.00 g 过 100 目筛的土样, 置于 50 ml 离心管中, 分别加入系列浓度 (0、2.5、5、10、12.5、15、20、25、30、35、40、50、62.5、75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的无机 P 20 ml, 外加两滴饱和 NaCl, 密封, 摇匀。于恒温培养箱中 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 离心 (3000 r/min, 3 min), 过滤, 钼锑抗显色测定滤液中无机 P 含量^[16]。

1.3.2 无机 P 对磷酸单酯酶活性的影响 准确移取以 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲溶液为介质、0.1 mol/L 甘油磷酸钠为底物的 pH 5.0 含 0、50、100、250、500、1000 和 1500 μg 无机 P 溶液 5 ml, 置于 50 ml 三角瓶中, 加入 pH 5.0 的 0.1 mg/ml 磷酸单酯酶 5 ml, 密封, 摇匀。于恒温培养箱中 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 1 h。以不加磷酸单酯酶的处理为对照, 钼锑抗显色测定滤液中无机 P 含量变化。

1.3.3 土壤磷酸单酯酶活性测定方法的改进 准确称取 1.00 g 过 100 目筛的土样, 置于 50 ml 离心管中, 加入与土壤 pH 相一致的含有一定浓度无机 P 的甘油磷酸钠 5 ml, 外加两滴饱和 NaCl, 密封, 摇匀。在恒温培养箱中 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养一段时间, 取出离心 (3000 r/min, 3 min), 过滤, 钼锑抗显色测定滤液中

无机 P 含量, 换算为磷酸单酯酶活性, 以 P $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 表示。

1.3.4 甘油磷酸钠的特征参数 V_{max} 和 K_m 值 改变底物甘油磷酸钠的浓度, 其余步骤同 1.3.3。将米氏方程 $V = (V_{\text{max}}S)/(K_m + S)$ 变换为 $1/V = (K_m/V_{\text{max}})/S + 1/V_{\text{max}}$ 。其中 V 为酶促反应速率, S 为底物浓度, K_m 为米氏常数, V_{max} 为酶促反应最大速率。以磷酸单酯酶活性的倒数 ($1/V$) 为纵坐标, 甘油磷酸钠浓度的倒数 ($1/S$) 为横坐标作图。通过截距值可以求取 V_{max} 和 K_m 值。

1.3.5 培养时间对磷酸单酯酶活性测定的影响 改变培养时间, 其余步骤同 1.3.3。以 P 的活化量 (P, $\mu\text{mol}/\text{g}$ 土) 为纵坐标, 时间 (min) 为横坐标作图, 从而考察培养时间的影响。

1.3.6 磷酸单酯酶活性的其他测定方法 Rogers 法^[5]: 准确称取 2.00 g 过 10 目筛的风干土样于刻度小烧杯中, 加 0.3 ml 甲苯搅匀, 密封静置 30 min 后, 以 H_2SO_4 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调节到 pH 4.0, 加入 0.5 ml 甘油磷酸钙的甲苯饱和溶液, 用蒸馏水调节土水比为 1:2。密封, 混匀, $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 下恒温培养 18 h。分别以相同 pH 的土水悬浊液和甘油磷酸钙溶液为对照。以 3 份 1 ml 体积比为 1:9 的 HCl 溶液萃取土壤无机 P, 再用一定体积的大量蒸馏水淋洗。钼锑抗比色测定滤液中无机 P 含量, 换算为磷酸单酯酶活性, 以 P $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 表示。

对硝基苯磷酸盐法^[2,16]: 准确称取 1.00 g 过 10 目筛的红壤于 50 ml 三角瓶中, 加 pH 6.5 的通用缓冲溶液 4 ml 和 0.025 mol/L 对硝基苯磷酸二钠溶液 1 ml, 轻摇混匀, 盖塞, $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 1 h。取出后, 立即加入 1 ml 0.5 mol/L 的 CaCl_2 溶液和 4 ml 0.5 mol/L NaOH 溶液, 轻摇几秒钟后, 滤纸过滤, 分取 5 ml 滤液于 10 ml 容量瓶中, 定容。用 1 cm 比色皿于 410 nm 处比色测定对硝基酚 (PN), 转化为磷酸单酯酶活性, 以 PN $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 表示。

所有实验均设 3 次重复。

2 结果与讨论

2.1 红壤对无机磷的等温吸附特征

为了寻找消除土壤吸附对红壤磷酸单酯酶活性测定干扰的方法, 本文考察了红壤对无机 P 的等温吸附特征 (图 1)。结果表明, 红壤对无机 P 的吸附量随着无机 P 添加量的增加而增大, 且不同土壤之间其吸附特征有所不同。土壤对无机 P 等温吸附特征的考察, 对于选择合适的无机 P 添加量有着重要的参考意义。有关此方

面的内容, 前人已有不少研究^[17-23], 可供参考。就 4 个供试红壤而言, 当无机P的添加量 $\geq 1000 \mu\text{g/g}$ 土时, 24 h内, 其对无机P的吸附量基本达到最大且保持相对稳定。故本研究在 5 ml底物中添加 1000 μg 无机P, 以保证有足量的无机P供土壤所吸附。

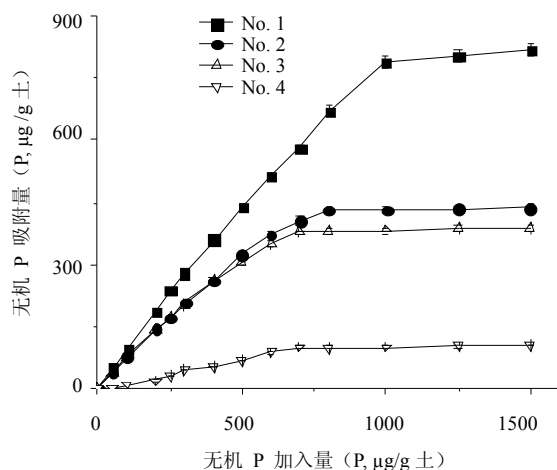


图 1 红壤对无机 P 的等温吸附曲线

Fig. 1 Adsorption isotherms of inorganic P on red soils

2.2 无机磷对磷酸单酯酶活性的影响

由于底物中添加了无机 P, 所以本实验考察了无机 P 对磷酸单酯酶活性的影响 (表 2)。结果表明, 无机 P 的存在短期内基本上不影响单位磷酸单酯酶活性。

表 2 无机 P 含量对磷酸单酯酶活性的影响

Table 2 Effect of inorganic P content on PMEase activities

无机 P 添加量 (μg)	酶活性 ($\text{P}, \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$)
0	0.803 (2.3)
50	0.801 (1.8)
100	0.804 (2.5)
250	0.807 (1.6)
500	0.800 (2.8)
1000	0.806 (2.1)
1500	0.805 (1.9)

注: 括号内的数值为相对标准偏差 (RSD%)。

2.3 V_{\max} 和 K_m 的考察

众所周知, V_{\max} 和 K_m 是土壤酶活性测定方法的两个特征函数, 可以通过酶促反应速率与底物浓度的关系图而求得。从图 2 的截距可求得供试土壤的 V_{\max} 和 K_m 值。1 号土 V_{\max} 和 K_m 值分别为 $\text{P } 5.51 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 0.0042 mol/L ; 2 号土 V_{\max} 和 K_m 值分别为 $\text{P } 3.6 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 0.0063 mol/L ; 3 号土 V_{\max} 和 K_m 值分

别为 $\text{P } 5.75 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 0.0165 mol/L ; 4 号土 V_{\max} 和 K_m 值分别为 $\text{P } 6.52 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 0.0099 mol/L 。一般认为当底物浓度 $\geq 5K_m$, 酶促反应速率与底物浓度无关。因此, 本文后续研究中, 测定红壤磷酸单酯酶时底物浓度均采用 0.10 mol/L ($\geq 5K_m$)。

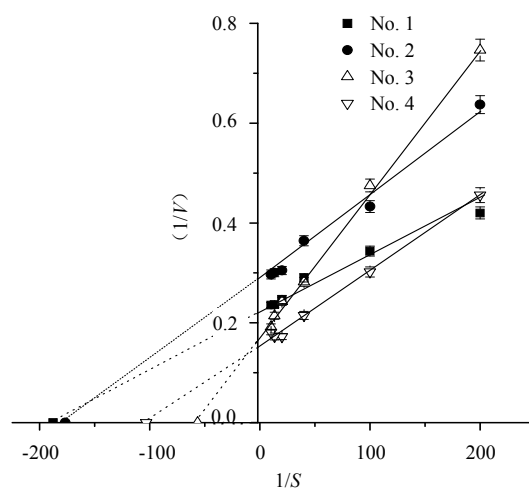


图 2 米氏常数曲线图

Fig. 2 Hanes-Woolf plots of PMEase activities in 4 soils

2.4 培养时间对磷酸单酯酶活性的影响

图 3 给出了不同培养时间下无机P释放量的变化。结果表明, 在 2 h内, 无机P的释放量和培养时间成正比。为了缩短分析时间, 参照对硝基苯磷酸盐法, 本文推荐方法的培养时间也采用 1 h。在Rogers法^[5]中, 由于用到HCl浸提被土壤吸附的无机P, 所以只有保证由底物水解而来的无机P量与对照相当或者更大, 才能有效减少测定误差。为此, Rogers法的措施

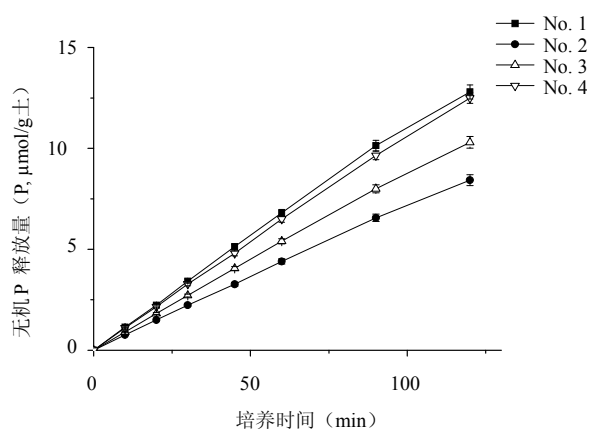


图 3 培养时间对磷酸单酯酶活性测定的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on release of inorganic P in estimation of PMEase activities in 4 soils by the proposed method

就是延长培养时间至 18 h, 从而导致Rogers法非常耗时。而对硝基苯磷酸盐法^[2]借助CaCl₂-NaOH处理措施定量回收水解产物对硝基酚, 既保证了方法的精密度, 也将培养时间缩短为 1 h。

2.5 方法的比较

将对硝基苯磷酸盐法^[2]、Rogers法^[5]和本文推荐的

方法应用于 4 个红壤样品的磷酸单酯酶活性的评估, 结果(表 3)表明, 本文推荐的方法精密度(RSD≤3.2%)比Rogers法(RSD≤10.2%)和对硝基苯磷酸盐法(RSD≤5.8%)要好; 所测的磷酸单酯酶活性(P 4.4 ~ 6.8 μmol/(g·h))与Rogers法相当, 且比对硝基苯磷酸盐法(P 0.8 ~ 2.2 μmol/(g·h))大得多。

表 3 3 种方法的磷酸单酯酶活性测定结果对比

Table 3 Comparison among phosphomonoesterase activities by three methods

土样	Rogers 法 (P, μmol/(g·h))	本文推荐方法 (P, μmol/(g·h))	对硝基苯磷酸钠法 (PN, μmol/(g·h))
No.1	7.23 (8.9)	6.81 (2.6)	1.10 (3.1)
No.2	4.22 (8.2)	4.39 (3.2)	1.68 (4.8)
No.3	5.63 (10.2)	5.36 (0.7)	0.81 (5.8)
No.4	6.45 (5.6)	6.52 (1.2)	2.24 (3.6)

注: 括号内数值为相对标准偏差(%)。

进一步比较本文推荐方法与对硝基苯磷酸盐法在不同 P 肥处理措施红壤磷酸单酯酶活性的测定结果, 可以发现, 两者的结果唯一相似之处在于所测的 NPK+猪粪处理的酶活性都大于 NPK 处理的酶活性。猪粪可以增加土壤磷酸单酯酶活性的原因可能在于, 猪粪带入的有机质可以促进磷酸单酯酶的合成, 并且猪粪自身也可能会带入部分磷酸单酯酶。

在 NK 处理、NPK 处理和 NPK+猪粪处理的结果中, 本文推荐方法是 NK 处理的红壤磷酸单酯酶活性比 NPK 处理的高 55%, 比 NPK+猪粪处理的高 10%; 而对硝基苯磷酸盐法的结果却相反, NK 处理的磷酸单酯酶活性均比 NPK 处理和 NPK+猪粪处理的低, 分别是 NPK 处理和 NPK+猪粪处理的 65% 和 49%。从理论上讲, 低 P 胁迫下, 植物根系分泌的磷酸单酯酶数量会上升, 而土壤磷酸单酯酶活性会增加。在这一点上, 本方法的结果是合理的, 而对硝基苯磷酸盐法的结果却难以解释上述现象。

在 NPK+石灰石粉处理和 NPK 处理的结果中, 本文推荐方法是 NPK+石灰石粉处理的红壤磷酸单酯酶活性比 NPK 处理的高 22%; 而对硝基苯磷酸盐法的结果却是 NPK+石灰石粉处理的磷酸单酯酶活性只有 NPK 处理的 48%。在对硝基苯磷酸盐法中, 普遍认为 Ca 离子的存在会对磷酸单酯酶活性有抑制作用。但 Rogers 法所用底物甘油磷酸钠自身就含有 Ca 离子, 但所测红壤磷酸单酯酶活性的结果却是 NPK+石灰石粉处理大于 NPK 处理, 并没有出现 Ca 离子抑制磷酸单酯酶活性的现象。因此, 在对硝基苯磷酸盐法中, Ca 离子对磷酸单酯酶活的抑制性作用, 可能是由于 Ca 离子与对硝基苯磷酸盐反应生成一种难以进入酶活性中心的物质造成的。这只是一现象, 实质上对酶活性并没有影响。综上所述, 在测定红壤磷酸单酯酶活性时, 本文推荐方法比对硝基苯磷酸盐法更加合理。3 种方法优缺点的详细比较见表 4。

表 4 3 种方法的差异

Table 4 Differences among three methods

项目	Rogers 法	本文推荐方法	对硝基苯磷酸盐法
底物	甘油磷酸钙	甘油磷酸钠	对硝基苯磷酸钠
底物与土壤主要有机 P 的性质区别	小	小	大
精密度	较差	好	好
准确度	较好	好	较差
分析手续	HCl 浸提, 繁琐	添加无机 P, 简化	简单
分析耗时(h)	19	2	1

3 结论

本文以甘油磷酸钠为底物,通过添加适量无机 P 的方法,减少土壤吸附无机 P 对磷酸单酯酶活性测定的影响,对红壤磷酸单酯酶活性的测定方法进行改进。具体操着过程如下:准确称取 1.00 g 过 100 目筛的土样,置于 50 ml 离心管中,加入与土壤 pH 相一致的 0.1 mol/L 的底物甘油磷酸钠 5 ml,外加两滴饱和 NaCl 溶液,密封,摇匀。在恒温培养箱中 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h。取出后离心 (3000 r/min, 3 min),过滤,钼锑抗显色测定滤液中无机 P 含量,换算为磷酸单酯酶活性,以 $\text{P } \mu\text{mol}/(\text{g } \text{土} \cdot \text{h})$ 表示。

与 Rogers 法相比,本文推荐方法具有更高的精密度,省去了 HCl 浸提步骤,节省了分析时间 17 h 以上。与对硝基苯磷酸盐法相比,本文推荐方法以性质与土壤主要有机 P (磷酸单醇酯) 比较接近的甘油磷酸钠为底物,首先保证了较高的准确度。其次,采用添加适量无机 P 的措施,也解决了精密度的难题。简而言之,本文推荐的方法的精确度要比对硝基苯磷酸盐法高。

其次,本文推荐方法所测的结果均比对硝基苯磷酸盐法高。这说明了本文推荐方法的灵敏度较好;同时也从侧面证明了所选底物不同,所测的结果就会有较大的差异。故底物选择对测定结果有很大影响,选择时要慎重。

再次,本方法避免了毒性物质的使用。而在对硝基苯磷酸盐法中,其底物本身就是一类有挥发性的毒性化学物质,既可通过皮肤接触渗入人体,也可经过呼吸作用进入肺部,从而损害与之长期接触的分析人员的身体健康。

当然,本文推荐方法的普遍性和适用性有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Drouillon M, Merckx R. Performance of para-nitrophenyl phosphate and 4-methyl-umbelliferyl phosphate as substrate analogues for phosphomonoesterase in soils with different organic matter content. *Soil Biol. Biochem.*, 2005, 37: 1527-1534
- [2] Tabatabai MA, Bremner JM. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1969, 1: 301-307
- [3] Marx MC, Wood M, Jarvis SC. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33:1633-1640
- [4] Cosgrove DJ. Microbial transformation in the phosphorus cycle. *Adv. Micro. Ecology*, 1977, 1: 95-134
- [5] Rogers HT. Dephosphorylation of organic phosphorus compounds by soil catalysts. *Soil Sci.*, 1942, 54: 439-446
- [6] Jackman RH, Black CA. Hydrolysis of phytate phosphorus in soils. *Soil Sci.*, 1952, 73:167-171
- [7] Skujins JJ, Braal L, McLaren AD. Characterization of phosphatase in a terrestrial soil sterilized with an electron beam. *Enzymol.*, 1962, 25: 125-133
- [8] Eivazi F, Tabatabai MA. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1977, 9(3): 167-172
- [9] Frankenberger Jr WT, Johanson JB. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, 14(5): 433-437
- [10] Malcolm RE. Assessment of phosphatase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1983, 15(4): 403-408
- [11] Trasar-Cepeda MC, Gil-Sotres F. Kinetics of acid phosphatase activity in various soils of galicia (NW Spain), *Soil Biol. Biochem.*, 1988, 20(3): 275-280
- [12] Harrison AF, Tracey Pearce. Seasonal variation of phosphatase activity in woodland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1979, 11(4): 405-410
- [13] Susanne Krämer, Douglas MG. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32(2): 179-188
- [14] Tsou KC, Helen CFSu. A new colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase with indoxyl phosphate. *Anal. Biochem.*, 1965, 11: 54-64
- [15] Spiers GA, McGill WB. Effects of phosphorus addition and energy supply on acid phosphatase production and activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1979, 11: 3-8
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [17] 傅明华, 戴朱恒, 承友松, 顾仲兰. 上海土壤磷的吸附特性及缓冲性能的研究. *土壤学报*, 1986, 23(2): 113-123
- [18] 潘洁, 陆文龙, 王德芳. 天津几种潮土吸磷和解磷特性研究. *天津农业科学*, 1995, 1(3):1-2
- [19] 徐明岗, 孙本华. 陕西土壤磷等温吸附特性及其测定条件的研究. *土壤*, 1997, 29(2): 109-112
- [20] 章和珍, 罗奇祥, 刘光荣, 王少先. 不同熟化度红壤稻田磷的吸附和解吸特征初探. *江西农业学报*, 1997, 9(4): 39-45
- [21] Li HX, Zhang XM, Liu YJ. Soil components affecting phosphate sorption parameters of acid paddy soils in Guangdong Province. *Pedosphere*, 2000, 10(4): 317-321
- [22] Dolui AK, Roy SS. Phosphate sorption-desorption characteristics

in two Inceptisols and an Alfisol of Chattisgarh, India. [23] 杜立宇, 梁成华, 潘大伟. 长期定位施肥条件下设施土壤磷的 Pedosphere, 2005, 15(5): 611-619 吸附特性. 安徽农业科学, 2007, 35(3): 774-775

Improvement of Phosphomonoesterase Activity Determination in Red soils

GONG Song-gui^{1,2}, WANG Xing-xiang¹, ZHANG Tao-lin¹, LIANG Yuan^{1,2}

(1 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;*

2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: A method was improved for the determination of phosphomonoesterase activity in red soils by determining inorganic phosphate released from soil incubated with Na- β -glycerophosphate as substrate. The influence of inorganic P adsorption on soil can be greatly minimized by the pretreatment that the substrate was mixed with appropriate inorganic P before being added into the soil for incubation. The proposed method successfully determined phosphomonoesterase activities in 4 red soils. The results showed that the precision of the proposed method ($RSD \leq 3.7\%$) was greater than that of Rogers method ($RSD \leq 10.2\%$). Compared with Rogers method, the proposed method avoided HCl extraction procedure and shorted analytical time from 19 hours to 2 hours. In addition, phosphomonoesterase activity obtained with the proposed method (P 4.4 - 6.8 $\mu\text{mol}/(\text{g soil}\cdot\text{h})$) was significantly higher than that obtained from the *p*-nitrophenyl phosphate method (P 0.8 - 2.2 $\mu\text{mol}/(\text{g soil}\cdot\text{h})$).

Key words: Red soil, Phosphomonoesterase, Na- β -glycerophosphate