

Fenilfoszfátos enzimanalízis alkalmazása talajok és trágyák vizsgálatára

KROLL LÁSZLÓ, KRÁMER MIHÁLY és LÓRINCZ ERZSÉBET
Agrokémiai Kutató Intézet Szervestrágyázási Osztálya, Budapest

Utóbbi időben a talajbiológusok és biokémikusok nagy érdeklődéssel fordulnak a talajenzimek vizsgálata felé. A talajokban mindezülig katalázt [15, 22], invertázt [4, 12], ureázt [6], proteinázt [7], alfa-glukozidázt [9], beta-glukozidázt [8], alfa- és betagalaktozidázt [9], fitázt [10, 17], lecitinázt [17] és glicero-foszfátázt [17] sikerült kimutatni. Ezeket az enzimeket elsősorban a talajban élő mikroszervezetek [4, 12], valamint a magasabbrendű növények gyökerei [14] hozzák létre és választják ki.

A talajok ilyen irányú vizsgálata sok olyan alapvető kérdés megoldásához segíthet, mint az egyes talajok biológiai aktivitásának megítélése [5, 12, 15, 16, 21], valamint a talajban lejátszódó biokémiai és fizikokémiai folyamatok felderítése, amely a növény szerves- és műtrágyázásának kérdését nagymértékben elősegítheti [3, 17].

Mezőgazdasági szempontból különösen érdekes a talajban lévő foszfatáz enzim vizsgálata. A termőréteg összes foszformennyiségének jelentős része szerves formában van, amiből a foszfatáz az eszterkötés felhasításával a növények számára könnyebben felvehető ortofoszforsavat felszabadítja. A talajban előforduló foszforsav-eszter a fitin (mezo-inozithexafoszfát) és különböző nukleinsavak, valamint ezeknek kalcium, kálium, nátrium alumínium, vas és magnézium sója [2].

A foszfatázok szubsztrátum specifitásukban is különböznek egymástól. Az enzimek szubsztrátum specifitása ellenére vannak olyan szubsztrátumok, melyekre majdnem valamennyi foszfatáz egyaránt hat. Ezek közé tartozik a nátrium-beta-glicerofoszfát [1] valamint a fenilfoszfát [11]. A talaj foszfatáz aktivitásának mérésére különösen alkalmas a fenilfoszfátos módszer, mivel a felszabadult fenol a foszforsavval ellentétben a talajok nem kötik meg [18].

Sajátságai a foszfatázoknak az izodinámia. Különböző szervezetekből származó enzim egy ugyanazon szerves foszforvegyületet különböző optimális p_H -n bont. Így a növényi szövetekben főképp az ún. savanyú (p_H opt. 5 körül), állatokban pedig az ún. lúgos foszfatázok (p_H opt. 8 körül) vannak túlsúlyban.

Kísérleti rész

A talaj foszfor adszorpciójának kiküszöbölésére a talaj foszfatáz aktivitásának mérésére a King—Armstrong-féle fenilfoszfátos eljárást alkalmaztuk.

A módszert a következő követelményeknek megfelelően módosítottuk.

1. Az enzimhatás következtében felszabaduló fenol mennyisége a fenol mérésére legjobban bevált Folin—Ciocalteu módszerrel 0,02—0,80 mg fenol/ml jelenlétében jól mérhető legyen. E módszerrel a Zeiss-féle polafotométeren $\pm 0,3^\circ$ pontosságú leolvasás mellett $\pm 2\%$ -os mérési pontosság érhető el.

2. A felszabadított fenol mennyisége jelentősen nagyobb legyen, mint a vizsgált talajból kilúgozódó, Folinreakciót adó egyéb vegyületek mennyisége.

3. A felszabadított fenol mennyisége arányban legyen a talajban lévő enzim mennyiségével.

Vizsgálati módszerek

a) Fenolmeghatározás.

A használt oldatok: 1. Folin-oldat: 500 ml-es gömblombikba bemérünk 25,0 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t, 4,2 g molibdén-savat és 52 ml n NaOH-t. Ezután hozzáadunk 123 ml H_2O -t, 12,5 ml 85%-os foszforsavat és 25 ml cc HCl-t. A lombikot visszafolyó hűtővel látjuk el és olajfürdőn enyhén forraljuk. 10 óra elteltével 37,4 g Li_2SO_4 -t és 12,5 ml H_2O -t adunk hozzá, majd 2–3 csepp brómot. A visszafolyó hűtőt eltávolítva a forralás a brómgőzök eltávozásáig folytatódik. Li_2SO_4 helyett 18,7 ml cc H_2SO_4 és 25,6 g Li_2CO_3 is használható. Ezután az oldatot 250 ml-es mérőlombikba öntjük és deszt. vízzel jelig feltöltjük. Végül az oldatot leszűrés után deszt. vízzel négyszeresére hígítva használjuk.

Amennyiben szűrés után lehűlve az oldat megzöldülne, úgy a brómos kezelés megismételendő.

2. 25%-os Na_2CO_3 oldat.

3. Fenol törzsoldat (standard). Analitikai mérlegen becsiszolt mérőedénybe bemérünk kb. 0,5 g fenolt, ezt 1000-szeres mennyiségű 0,1 n HCl-ban melegítés közben feloldjuk, további tízszeres hígítással 0,01 mg fenol/ml törzsoldathoz jutunk.

A meghatározáshoz kémcsőbe sorrendben a következő oldatokat mérjük be. 1,0 ml vizsgálandó oldat (ill. a vizsgálandó oldat ismert mennyisége deszt. vízzel 1,0 ml-re kiegészítve), 2,0 ml Folin-oldat, 1,0 ml deszt. víz, 1 ml Na_2CO_3 oldat. A kémcsövet 37°C -on 45 percig állni hagyjuk, majd fotométeren S66-os színszűrővel 12 cm-es küvettában megmérjük a keletkezett kék szín erősségét. A standardokat 0,1–0,01 mg fenoltartalomig készítjük. A színszűrő a talajoldatok sárga színének zavaró hatását kiküszöböli.

b) Foszformeghatározás.

A foszfort az osztályunkon módosított metolos eljárással határoztuk meg [20].

c) p_H meghatározás.

A p_H -t veronál, karbonát és acetát puffer oldatokkal állítottuk be, és ezt a di Gleria-féle készülékkel kinhidronelektrodák alkalmazásával mértük.

d) Az enzimaktivitás vizsgálatának menete.

100 ml-es Erlenmeyer-lombikba bemért 10 g légszáraz, 1 mm-es szitán átszitált talajhoz (vagy 5 g eredeti nedvességű, illetve 10 g légszáraz trágyához) 2,5 ml toluolt adtunk. Tíz perc múlva hozzáadjuk a 20 ml szubsztrátum-oldatot és — amennyiben egy adott p_H -ra kívántuk a reakcióelegyet beállítani — akkor a megfelelő pufferral jelig feltöltöttük. Ha a talaj saját p_H -ján dolgoztunk, úgy a feltöltést 37°C -os deszt. vízzel csak az inkubálás 23. órájában végeztük. 24 órás inkubálás után (37°C -os termosztátban) a lombik tartalmát leszűrtük (tisztá szűrlet szükséges) és aliquot részének fenol, ill. foszfortartalmát határoztuk meg. A meghatározást a szűrés után azonnal el kell végezni.

A fenilfoszfát oldat állandósága. — Első feladatként meg kellett vizsgálni, hogy az általunk használt fenilfoszfát oldat állás közben — enzimatisus hatás nélkül — milyen mértékben hidrolizálódik.

Az 1. táblázatból látható, a fenilfoszfát oldat állás közben csupán jelentéktelenül hidrolizálódik.

10 g talajmintából kioldódó és kimutatható foszfor és fenol mennyisége. A méréseket kétféle úton végeztük: *a)* a talajt inkubálás nélkül enzimvizsgálatokhoz előírt módon előkészítve, a lombikokat 100 ml-ig feltöltve azonnal leszűrtük (ún. 0-órás kivonat). *b)* A talajt 150 C°-on 1,2 órán át tartva az enzimeket elöltük. Ugyanazt érjük el 10 perces 1,5 atm. nyomású alkoholgőzökkel történő ún. perrozással és az ezt követő 150 C°-on történő szárítással. A zárójelbe tett számok fenol mg/10 g talajt, a többi P₂O₅ mg/10 g talajt jelentenek.

1. táblázat
Fenilfoszfát oldat hidrolizise %₀-ban kifejezve

(1) Fenilfoszfát oldat töménysége % ₀	Használt puffer		(2) Hidrolizálódott feuilfoszfát % ₀	
	fajtája	pH-ja	24 óra múlva	7 nap múlva
0,6	acetát	4,2	0,26	—
	karbonát	9,8	0,20	—
1,0	deszt. víz	7,06	0,10	0,20

A következőket állapítottuk meg a 2. táblázat adatai alapján:

10 g talajból — a megadott módszerrel nyert kivonatban — anorganikus foszfor csak a mérési határon aluli mennyiségben található, fenol pedig 1 mg körüli mennyiségben.

2. táblázat
Egyes talajok saját oldható foszfor- és »fenol«-tartalma

(1) A talaj neve és származási helye	(2) A mért anyag	(3) 0h kivonat	(4) Sterilizált talaj szubsztrátummal		
			0h	6h	24h
			inkubálás után		
<i>a)</i> Mezőhegyesi mezőségi vályog	fenol	1,6	—	—	2,3
	P ₂ O ₅	0,2	—	—	0,2
<i>b)</i> Bánkúti mezőségi vályog ...	fenol	0,9	1,6	1,7	1,3
<i>c)</i> Bánkúti mezőségi vályog ...	fenol	0,7	—	0,35	0,40
	P ₂ O ₅	< 0,1	—	—	0,40
<i>d)</i> Tápiószelei mezőségi vályog ..	fenol	0,7	—	—	1,7
	P ₂ O ₅	< 0,1	—	—	< 0,1
<i>e)</i> Tápiószelei mezőségi vályog ..	fenol	—	—	—	1,9
	P ₂ O ₅	—	—	—	< 0,1
<i>f)</i> Hényelpusztai erdőtalaj ...	fenol	0,8	1,8	1,7	1,3
	P ₂ O ₅	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Sterilizált talajból nyert kivonatban a fenoltartalom valamivel magasabb. Ennek valószínű oka, hogy a talaj szervesanyagának egy része a sterilizáláskor elbomlott. Az, hogy ez az érték az inkubáláskor nem növekedett, azt igazolja, hogy a talaj szerves foszfátbontó sajátosága hőérzékeny anyagtól — fehérjétől (enzimtől) — származik.

Az inkubálás optimális p_H -ja

A következőkben megvizsgáltuk a közeg p_H -jának szerepét a foszfatáz enzim aktivitására (3. és 4. táblázat).

A táblázatból kitűnik a talaj foszfatáz aktivitásának p_H -függése. Optimális a hatás a talaj eredeti p_H -jától kevéssé ($\pm 1,0 p_H$) eltérő közegben. Az adatok azt is világosan bizonyítják, hogy az enzimológiában szokásos puffer mennyiségek a talaj p_H -ját lényegesen nem változtatják meg. Mindebből az következik, hogy épp úgy, mint az eddig vizsgált talajzimeknél [21], jól definiált kísérleti körülmények mellett optimális hatást érhetünk el, ha a pufferok használata nélkül a talaj saját p_H -ján dolgozunk. Kivételt képeznek a minimális pufferolóképességű laza homoktalajok.

3. táblázat
A felszabadított fenol és a talaj p_H összefüggése

(1) Talaj neve és származási helye	(2) Vizes talajszuszpenzió p_H -ja	(3) Különböző p_H -nál 10 g talaj által felszabadított fenol mg				
a) Mezőhegyesi mezőségi vályog	8,2	p_H	7,1	8,4	9,2	
		fenol mg	22,0	19,0	16,0	
b) Gödöllői savanyú homok ...	7,5	p_H	7,0	7,3	7,6	
		fenol mg	9,6	9,6	11,2	
c) Gödöllői savanyú homok ...	6,8	p_H	4,0	4,6	6,5	8,0
		fenol mg	2,4	3,6	7,6	5,6
d) Hényelpusztai savanyú agyagos erdőtalaj	6,7	p_H	4,0	4,5	6,5	6,8
		fenol mg	5,8	6,5	8,4	8,8

4. táblázat
Puffer hatása a talaj eredeti p_H -jára

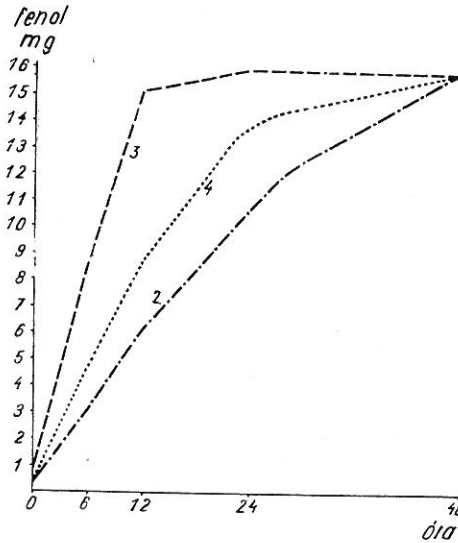
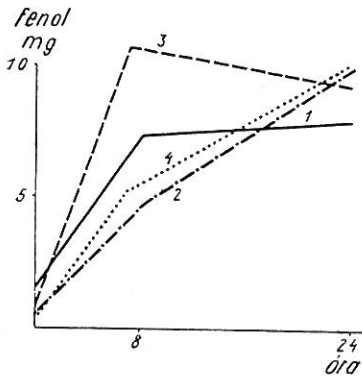
(1) Talaj neve és származási helye	(2) Hozzáadott puffer		(3) Talaj	(4) Puffer	(5) Talajkivonat p_H -ja
	fajtája	ml	eredeti p_H -ja		
a) Mezőhegyesi mezőségi vályog	acetát	10	8,2	4,2	6,8
b) Mezőhegyesi mezőségi vályog	karbonát	10	8,2	9,8	9,2
c) Gödöllői savanyú homok ...	veronál	10	7,5	5,5	6,9
				6,9	7,3
				8,0	7,6
d) Gödöllői savanyú homok ...	acetát	85	6,8	4,0	4,3
				5,0	4,6
				6,0	6,5
e) Gödöllői savanyú homok ...	veronál	85	6,8	7,0	6,8
				8,0	7,6
f) Hényelpusztai agyag	acetát	85	6,7	4,0	4,0
				5,0	5,1
g) Hényelpusztai agyag	veronál	85	6,7	6,0	6,5
				7,0	6,8
				8,0	8,0

Megjegyzés: A pufferokban 30,7 mg dinatriumfenilfoszfát volt feloldva.

Az inkubálás időtartama

Első méréseinknél a talaj szerves foszfor tartalmával egyenlő mennyiségű szubsztrátummal dolgoztunk. 10 g talajhoz 8–15 mg szerves foszfort adtunk fenilfoszfát formájában. Egyik esetben 30,7 mg-ot, a másik esetben 46 mg-ot. Ez megfelel 10,5, illetve 16,0 mg fenolnak. Méréseink eredményét az 1. ábrán mutatjuk be.

Látható, hogy egy adott — az enzim hatékonyságához képest csekély



1. ábra.

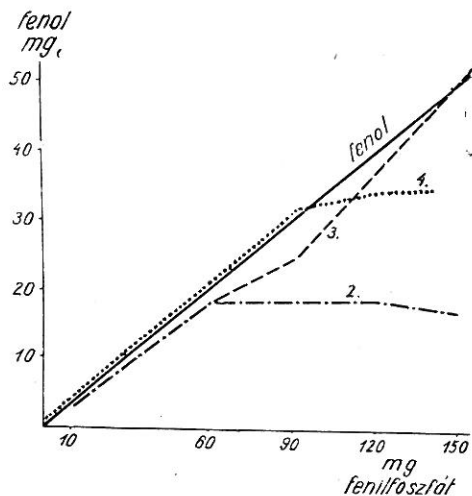
Talaj foszfatáz hatása az inkubálás idejében. 1 mezőhegyesi mezőségi vályogtalaj; 2 tápiószélei mezőségi vályogtalaj; 3 hényelpusztai savanyú agyagos erdőtalaj; 4 gödöllői savanyú homoktalaj

— szubsztrátum mennyiségét a talajenzimek teljesen elbontanak. Éppen azért, úgy kell az inkubálás időtartamát és az adott szubsztrátum mennyiségét összeegyeztetni, hogy annak legfeljebb 2/3-része hidrolizálódjék.

Hogy a talaj enzimaktivitásának széles sávját mérhessük (2–80 mg felszabadult fenol/10 g talaj a Folin-féle módszerrel jól mérhető mennyiség) és hogy az enzim hatására felszabaduló fenol mennyisége nagy legyen a talajból egyébként kioldódó fenol mennyiséghez képest, helyesebbnek találtuk hosszabb inkubálási idő alkalmazását.

Ebből a célból 48 órás inkubálást alkalmaztunk különböző mennyiségű szubsztrátummal. Eredményeinket a 2. ábrán tüntettük fel.

Az egyes talajoknál kapott eredményekből látható, hogy a szubsztrátum mennyiség bizonyos felesle-



2. ábra.

Az enzimaktivitás függése a szubsztrátum mennyiségétől. Görbék jelzését lásd 1. ábra.

gen túl nem befolyásolja a talaj enzim aktivitásának mértékét. Célszerű annyi szubsztrátumot adni, hogy ennek legfeljebb csak 3/4 része használódjék el az enzimatis lebonatás során. Továbbiakban 24 órai inkubálást és 100 mg szubsztrátum koncentrációt használtunk 10 g talaj vizsgálata esetén.

Talajkivonat foszfátáz aktivitása

1 : 5 arányban vízzel kevert előzetesen toluolozott talajból 1/2 órai rázás és szűrés útján nyert kivonathoz adva a fenilfoszfátot 24 óras inkubálás után sem kapunk mérhető fenol mennyiséget.

E szerint a talaj foszfátázai a talaj szilárd fázisához vannak kötve, onnan vízzel — legalábbis hatóképességük elvesztése nélkül — ki nem oldhatók.

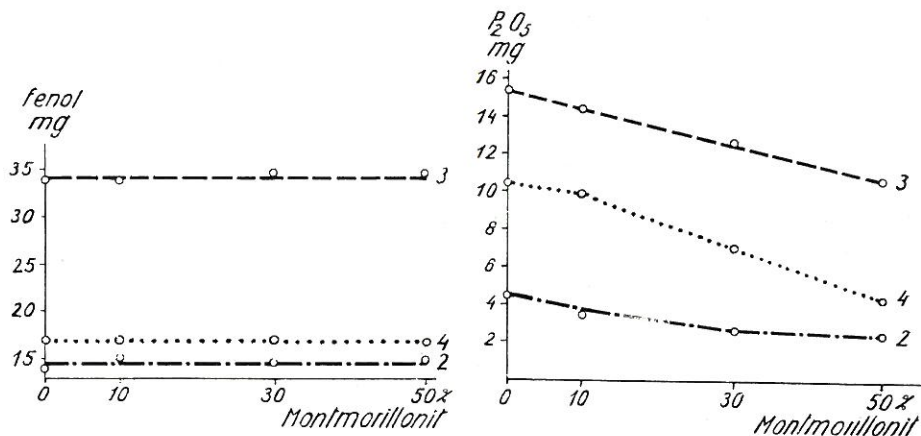
Az ismertettek alapján megállapítható, hogy 10 g talajhoz 2,5—3,0 ml toluol hozzáadása után, 10 ml deszt. vízben oldott 100 mg fenilfoszfát mennyiséggel adunk általában elegendő szubsztrátumot. 24 óras inkubálás után a lombikot 100 ml-ig feltöltjük, majd szűrjük és elvégezzük a fenol és foszfor vizsgálatot.

A módszer alkalmazása különleges esetekben

I. Foszfát-adszorpció vizsgálatok

Mivel a fenilfoszfát hidrolízisekor a mért fenollal egyenértékű foszfát is szabadná válik, meg van a lehetősége annak megállapítására, hogy a talaj kolloidjai és foszfátot megkötő egyéb komponensei mennyire vonják ki a foszfát ionokat az oldatból. A jelenség tanulmányozására háromféle típusú talajjal foszfátáz vizsgálatokat végeztünk oly módon, hogy a talajhoz 10, 30 és 50%-ig nagy adszorpciós képességű montmorillonitot (bentonitot) adtunk (5. táblázat, 3. ábra).

A montmorillonit növekvő mennyisége az enzimhatás következtében szabadná váló foszfát ionok mennyiségét egyre inkább csökkenti. Ugyanez amint ez a 3. ábrán látható, a kimutatható fenol mennyiségét a kísérleti hibák határain belül a talaj emelkedő agyag-ásvány tartalma nem csökkenti [13]. Ugyanezt tapasztalhatjuk, ha a talajhoz anorganikus foszfátot, ill. fenol oldatot adunk. A fenolt a talaj nem adszorbeálja, a foszfát ionokat azonban igen.



3. ábra

Különböző arányban montmorillonittal kevert talajok hatására fenilfoszfátból kapott fenol és foszforsav mennyisége: 2 tápiószeleli mezőségi vályog talaj; 3 hényelpusztai savanyú agyagos-erdőtálat; 4: gödöllői savanyú homoktalaj

Az agyagásványokkal kevert talajok foszfatáz vizsgálatából kitűnik, hogy helytelen Mortland és Gieseking [17] nézete: nagy adszorpcióképességű agyagok jelenlétében a foszfatáz hatás az enzim megkötődése miatt csökken.

5. táblázat

A foszfor meghatározásánál mért P_2O_5 , a mért fenol alapján számított P_2O_5 érték százalékban

(1) A talaj neve	Kapott P_2O_5 a talajhoz kevert agyagásvány % függvényében						
	0	(2) Montmorillonit %			(3) Kaolinit %		
		10	30	50	10	30	50
a) Homok	81	77	55	35	52	42	36
b) Vályog	39	33	26	24	36	34	33
c) Agyag	59	55	49	41	64	64	64

A foszfatáz aktivitásnál a felszabaduló fenol és anorganikus foszfát egyidejű mérése egy ugyanazon talaj kultúrállapotának finomabb megkülönböztetésére is alkalmas lehet. Erre példának a keszthelyi talajokon végzett vizsgálatainkat hozzuk fel. Itt, több éve parlagon lévő talajokon a foszfatáz hatás után mért fenolból számított P_2O_5 90%-át lehetett az oldatban megtalálni. Ugyanekkor a közvetlenül mellette fekvő művelés alatt álló talajon a számított foszfornak csak 70%-át tudtuk az oldatban kimutatni. A foszfatáz aktivitása mindkét talajnak a párhuzamos értékek eltérésén belül azonos volt ($20,0 \pm 3,0$ mg fenol/10 g talaj).

6. táblázat

Keszthelyi talaj fenol és anorganikus foszfát megkötőképessége

Talaj származása	Fenol				P_2O_5			
	hozzá- adott	vissza- kapott	adszorbeált		hozzá- adott	vissza- kapott	adszorbeált	
	mg		%		mg		%	
Kaszálatlan parlag	40,0	40,6	-0,6	- 1,5	40,0	38,0	2,0	5,0
Kaszált parlag	40,0	40,3	-0,3	- 0,8	40,0	34,7	5,3	13,2
Istállótrágyázott- forgó	40,0	43,0	-3,0	- 7,5	40,0	29,8	10,2	25,5
Zöldtrágyás forgó	40,0	45,5	-5,5	-13,7	40,0	33,5	6,5	16,3

Fenolnál a negatív adszorpció a talajból fenolként reagáló vegyületek kioldásából adódik.

II. Istállótrágya adszorpciós vizsgálatok.

Érdekes képet mutat a foszfor-adszorpció különböző érettségű istállótrágyák fenilfoszfátos enzimaktivitás vizsgálatakor (7. táblázat). A friss trágyák az enzim hatására keletkezett anorganikus foszfátot csaknem teljes mértékben megkötik, ugyanakkor a felszabadult fenol mennyisége jól mutatja a biológiai aktivitást.

Eddigi méréseink eredményeiből remélhető, hogy az enzimológiai vizsgálati módszerek alkalmasak a trágyák közti finomabb különbségtételre. A vizsgálatokban 5 g nedves trágyához 200 mg fenilfoszfátot adtunk. (Ebben 52,0 mg P_2O_5 és 68,6 mg

fenol volt). A pH -t acetát, ill. veronál pufferrel állítottuk be. Egyidejűleg szubsztrátum nélkül, de pufferolt inkubálást is végeztünk, hogy az egyes trágyák saját kioldódó foszfát, ill. »fenol« tartalmát is megállapíthassuk. Az így kapott vak értékeket a foszfátáz vizsgálatoknál kapott értékekből levontuk, és a táblázatban a már korrigált értékeket tüntettük fel.

7. táblázat

Különböző érettségű istállótrágyák foszfátáz aktivitása, ill. anorganikus foszfor megkötő képessége

Trágya neve	Inkubálás pH -ja	Száraz anyag %	5 g nedves trágya hatására kapott		P_2O_5 adszorbeió
			fenol (a)	P_2O_5 (b)	
			mg		
Szilárd tehénürülék	5,2	16,1	41,8	5,3	83,3
	8,0		38,0	5,6	80,5
Friss tehéntrágya	5,5	25,2	50,5	1,3	97,3
	8,0		36,5	10,5	62,0
Szilárd lóürülék.....	5,3	23,0	49,5	—	—
	7,9		21,6	2,6	84,1
Friss lótrágya	5,7	38,6	64,4	4,6	90,6
	8,1		34,9	4,0	84,9
Szilárd sertésürülék	5,4	20,6	55,4	—	—
	7,7		53,0	—	—
Friss sertéstrágya	5,2	27,0	51,0	—	—
	8,0		63,8	1,3	97,2
3 hetes vegyes trágya ..	5,3	29,2	5,4	3,2	22,6
	7,6		3,3	2,1	17,0
8 hónapos vegyes trágya	5,3	32,2	3,9	—	—
	8,3		9,1	—	—
20 hónapos vegyes trágya	5,3	37,6	16,0	—	—
	8,3		28,8	16,7	23,4

P_2O_5 adszorbeió = $100 - \frac{100b}{0,757a}$, ahol a = az enzim hatásban mért fenol mg; b = a mért P_2O_5 mg; 0,757 = a fenolnak a P_2O_5 -ra vonatkozó egyenértéke.

A 7. táblázat adataiból kitűnik, hogy míg az istállóban összegyűlő híg ürüléknek és trágyának igen nagy a foszfátáz aktivitása, addig ez a kazalbarakást követő hőfok emelkedésével megszűnik. A 3 hetes kazalban lévő trágya foszfátáz aktivitása lényegesen alacsonyabb, mint az istállóban vett mintában. Ez várható is, mert a tejparban is a fenilfoszfátos enzimaktivitás vizsgálatot alkalmaznak a pasztórozottság kimutatására. A 70 °C hőfokon sterilizált tej már ugyanis nem mutat fenilfoszfátot bontó hatást [19].

A következőkben: 1. Meg kell vizsgálni, hogy a trágyáknál a reakció pH -ja milyen szerepet játszik a kapott aktivitási értékekre. Hoffmann és munkatársai [5] már rámutattak arra, hogy a gombákból származó enzimek más pH -n hatnak optimálisan, mint a baktériumokból származó enzimek. Lehetőség nyílik így a pH változtatásával az erjedés irányára adatokat szerezni.

2. Vizsgálni kell, hogy a trágya, illetve a talaj előkészítése, a minta raktározása hogyan változtatja a mérhető foszfátáz értéket.

3. Meg kell vizsgálni, hogy a talajokban és trágyákban fellépő időszakos változásokat mennyire képes az enzimaktivitás követni.

4. A módszerrel nyerhető adatokat össze kell vetni egyrészt már a talajenzimológiában gyakran használt vizsgálatok adataival, másrészt az egyéb biológiai

vizsgálatok adataival (kvalitatív és kvantitatív baktérium analízis. CO₂ termelő-képesség, nitrátfeltárolóképesség stb.).

Összefoglalás

Talajok és trágyák foszfatáz aktivitásának meghatározására a King-Armstrong fenilfoszfátos módszert módosítottuk. A lebomlás mértékét fenol és foszforsav egyidejű meghatározásával mértük. E módszer a gyakorlati talajvizsgálatoknál alkalmazható, mivel: a) képet ad a talajok és trágyák foszfort adszorbeáló képességéről, b) képet ad a talajok és trágyák biológiai állapotáról.

Érkezett: 1955 január 15.

Irodalom

- [1] Bodansky, A.: J. biol. Chem. **101**, 93. 1933.
- [2] Bower, C. A.: Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bul. 362. 1949.
- [3] Eusminger, L. E. & Gieseking, I. E.: Soil Sci. **53**, 205. 1942.
- [4] Hofmann, E. & Seegerer, A.: Biochem. Z. **322**, 174. 1951.
- [5] Hofmann, E.: Z. PflErnähr. Düng. **56**, 68. 1952.
- [6] Hofmann, E. & Schmidt, W.: Biochem. Z. **324**, 125. 1953.
- [7] Hofmann, E. & Niggemann, J.: Biochem. Z. **324**, 308. 1953.
- [8] Hofmann, E. & Hoffmann, G.: Biochem. Z. **324**, 397. 1954.
- [9] Hofmann, E. & Hoffmann, G.: Biochem. Z. **325**, 329. 1954.
- [10] Jackman, R. H. & Blaack, C. A.: Soil Sci. **73**, 167. 1952.
- [11] King, E. J. & Armstrong, A. R.: Canad. Medic. Assoc. J. **31**, 376. 1934.
- [12] Kroll, L.: Agrokémia és Talajtan, **2**, 301. 1953.
- [13] Kroll, L. & Kramer, M.: Naturwissenschaften, **42**, 157. 1955.
- [14] Kuprevics, W. F.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **68**, 953. 1949.
- [15] Kuprevics, W. F.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **79**, 863. 1951.
- [16] Mastakov, Sz. N. & Kulakovszkaja, T. N.: Dokl. Akad. Nauk SSSR. **98**, 141. 1954.
- [17] Mortland, M. & Gieseking, J. E.: Proc. Soil Sci. Soc. Amer. **16**, 10. 1952.
- [18] Rauterberg, E.: Z. PflErnähr. Düng. **17**, 302. 1931.
- [19] Ritter, W.: Milchwirtschaft. **9**, 301. 1952.
- [20] Sarkadi, J. & al.: Agrokémia és Talajtan. **4**, 71. 1955.
- [21] Scheffer, F. & Twachtman, R.: Z. PflErnähr. Düng. **62**, 158. 1953.
- [22] Welasco, J. R.: Anales Real. Soc. Espa. Fis. y. Quim. **45**, B. 821. 1949.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕНИЛФОСФАТНОГО ЭНЗИМОВОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВ И УДОБРЕНИЙ

Л. Кролл, М. Крамер, Е. Лёринц

Научно-Исследовательский Институт Агрохимии, отдел органических удобрений Будапешт (Венгрия)

Резюме

Для определения активности фосфатаза почв и удобрений, авторы разработали новый метод, где как субстрат применяется фенолфосфат. Степень активности фосфатаза измеряется определением фенола и фосфорной кислоты.

1. С образованным фенолом почвы и удобрения не дают соединений, но адсорбция фосфора почвой наблюдается.

2. Вычитая из количества фенола количество P₂O₅, можно измерить адсорбцию фосфорной кислоты различными почвами и удобрениями.

3. С помощью этого метода авторы установили, что коллоиды не инактивируют фосфатаз, как это утверждали раньше (17).

4. Самая большая активность энзимов наблюдалась у почв при естественном pH, а удобрений при pH около 5-8.

Рис. 1. Действие фосфатазы почвы во время инкубации. 1. Черноземная почва. 2. Черноземная почва. 3. Кислая глинистая лесная почва. 4. Кислый песок.

Рис. 2. Зависимость активности ферментов от количества субстрата. Номер почвы см. рис. 1.

Рис. 3. Количество фенола и фосфорной кислоты образованных из фенолфосфата под влиянием почв смешанных с монтмориллонитом в различных отношениях. 2. Суглинок. 3. Глина. (4) Песок.

Таблица 1. Гидролиз растворов фенолфосфата в %. (1) Концентрация раствора фенолфосфата. (2) Гидролизуемый фенолфосфат в %, через 24 часа или через 7 дней.

Таблица 2. Содержание растворимого фосфора и "фенола", в образцах почв.

Таблица 3. Связь между pH почвы и количеством образованного фенола.

Таблица 4. Влияние буферности на исходный pH почвы.

Таблица 5. Количество определяемого фосфора в % вычисленное на основе измеренного количества фенола. (1) Тип почвы (а) - песок, б) суглинок, с) глина. (2) При прибавлении 10-50% монтмориллонита. (3) При прибавлении 10-50% каолинита.

Таблица 6. Поглощение фенола и анорганического фосфора почвами Кестхей.

Таблица 7. Активность фосфатазы или поглощение анорганического фосфора навозами разной спелости.

Enzym Analysis with Phenylphosphate as a Substrate Applied in Soil and Fertilizer Examinations

L. KROLL, M. KRÁMER and E. LÓRINCZ

Department of Organic Fertilization, Agrochemical Research Institute, Budapest (Hungary)

Summary

A method has been worked out to be employed in determining the phosphatase activity of soils and fertilizers, using phenylphosphate as a substrate. The degree of phosphatase activity has been measured by assays of phenol and phosphoric acid. The experiments carried out permit of the following conclusions:

1. The soils and fertilizers do not bind the phenol formed, whereas phosphor adsorption is demonstrable.

2. The amount of P_2O_5 formed being calculable from the amount of phenol, the method is suitable for measuring the phosphoric-acid adsorption of the different soils and fertilizers.

3. In contradiction to earlier views [17], colloids do not inactivate phosphatases.

4. With soils, enzymic activity is found to be the highest at the original pH, with manures, at pH values around 5.0 and 8.0.

Fig. 1. Phosphatase effect of soil at time of incubation. (1-2) Steppe loam. (3) Acid clayey forest soil. (4) Acid sand.

Fig. 2. Dependence of enzymic activity on the amount of substrate (For numbering of soils see fig. 1.).

Fig. 3. Amount of phenol and phosphoric acid obtained from phenylphosphate upon the effect of soils mixed with montmorillonite in different ratios. (2) Loam. (3) Clay. (4) Sand.

Table 1. Hydrolysis of phenylphosphate solutions, in %. (1) Concentration of phenylphosphate solution. (2) Hydrolysed phenylphosphate in %, in 24 hours and 7 days, respectively.

Table 2. Soluble phosphor and "phenol", content of some individual soils. (1) Soil types (a-e: steppe loam, f: forest soil). (2) Measured quantity of phenol and P_2O_5 respectively, in mg/10 g of soil. (3) 0-hour extract. (4) Phenol and phosphor content of sterilized soils brought together with substrate, in mg, after 0, 6, and 24 hour incubation.

Table 3. Correlation of the obtained phenol to the pH of the soil. (1) Soil types (a: steppe loam, b-c: sour sand, and d: sour clayey forest soil). (2) pH of aqueous soil suspension.

Table 4. Effect of buffer on original pH of soil. (1) Soil types (a-b: steppe loam, c-e: acid sand, f-g: acid clayey forest soil). (2) Buffer added, in ml. (3) Original pH of soil. (4) Original pH of buffer. (5) pH of soil extract.

Table 5. Phosphor measured at determining phosphatase in percentage of the phosphor value calculated on the basis of measured phenol. (1) Soil types. (a: sand, b: loam, c: clay). (2) On addition of 10 to 50% of montmorillonite. (3) After admixture of 10 to 50% of kaolinite.

Table 6. Phenol and inorganic phosphate binding capacity of soil from Keszthely.

Table 7. Phosphatase activity and inorganic phosphor binding capacity of farm-yard manures of different degree of maturity.