

A talaj foszfatázaktivitásának vizsgálata dinátriumfenilfoszfáttal I. Módszertani kérdések

KRÁMER MIHÁLY ÉS ERDEI SÁNDORNÉ

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest

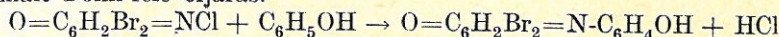
A klinikai diagnosztikában használatos King—Armstrong-féle foszfatázaktivitás meghatározó módszert Kroll és Krámer [7, 8] alkalmazták a talajok és trágyák vizsgálatára. A dinátriumfenilfoszfátnak, mint szubsztratumnak használata itt különösen két szempontból előnyös. Egyrészt, mert az enzim hatását jelző fenol mennyiségét a talaj adszorpciója nem csökkenti, másrészt, mert a fenol egyes reagensekkel igen tartós szint képez s így könnyen meghatározható.

A fenilfoszfátos talajenzim vizsgálat továbbfejlesztésének első lépéseként a meghatározást befolyásoló körülményeket tisztáztuk és ugyanekkor az eljárás egyszerűsítésére is törekedtünk.

Kísérleti rész

1. A Gibbs reagens

A tej pasztörözöttségi fokának [11] és a lucernaszéna minőségének [10] vizsgálatánál a dinátriumfenilfoszfátból felszabaduló fenol meghatározására a Gibbs [5] által ajánlott 2,6-dibrómkinonklorimidet használják, mely a fenollal igen állandó, kékszínű vegyületet ad. Ez a módszer egyszerűbb és gyorsabb, mint az általunk eddig használt Folin-féle eljárás.



A rendelkezésünkre álló Zeiss-féle „Polafot” fotométeren különböző színszűrőket és különböző fenolkoncentrációkat használva 1 cm-es küvettában a következő extinkciókat mértük:

A továbbiakban, annak ellenére, hogy az S 61 színszűrővel kaptuk a legnagyobb extinkciókat, nem ezzel, hanem az S 66-os színszűrővel dolgoztunk azért, hogy az egymástól erősen eltérő fenolmennyiségeket hígítás nélkül mérhessük.

Fenol mg 25 ml	S 72	Színszűrő S 66	S 61
extinkció			
0,025	0,1128	0,2398	0,3226
0,075	0,1710	0,5706	0,8600
0,150	0,2206	0,8600	—

A szín keletkezésének és állandóságának tartamát a hőmérsékleten kívül a közeg pH-ja is erősen befolyásolja. Gibbs mérései szerint a 9,4-es pH a legmegfelelőbb. Szobahőmérsékleten a szín 30 perc alatt kifejlődik és lezárt lombikban 48 órán át is állandó marad. Alacsonyabb pH-n a szín lassabban fejlődik ki, magasabb pH-n hamarabb bomlik el. Méréseink szerint szobahőmérsékleten 30 perc alatt 9,0 pH felett jön létre a

maximális fényelnyelés. Különböző pH-jú, 0,1 mg fenol/25 ml tartalmú közegben a következő extinkciókat mértük:

pH	4,0	8,7	9,0	9,2	9,3
Extinkció	0,0670	0,3660	0,4050	0,3947	0,3980

A szükséges kémhatást NaOH-borax (pH = 9,4) pufferrel biztosítottuk. Ennek minden ml-e 0,05 egyenértékű súlynyi erős savat képes tompítani. A fenolmeghatározást sem a toluol, sem a talajkivonat nem zavarja.

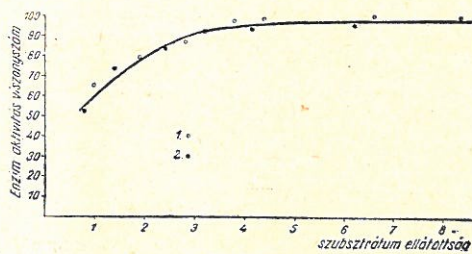
Így a Gibbs reagens alkalmas a talaj fenilfoszfátot hidrolizáló képességének mérésére.

2. Reakció-kinetikai vizsgálatok

A foszfatázok mennyiségét hatásuk alapján csak akkor lehet kielégítően meghatározni, ha feleslegben adjuk a szubsztrátumot. Így elérhető, hogy a hidrolíziskor keletkező foszfácionok az enzimhatást alig fékezik. Ajánlatos még Albers [1] szerint a koenzim-vándorlás okozta hibák elkerülésére az inkubálás idejét minél rövidebbre venni.

A szubsztrátum töménységének hatását a reakció sebességre alkálikus foszfatáznál Martland és Robison [9], savanyú foszfatáznál Courtois [3] vizsgálta. Mindkét esetben megállapították, hogy bizonyos szubsztrátum-feleslegben túl az enzim hidrolízis sebessége független a szubsztrátum mennyiségétől.

Mi is megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a szubsztrátum mennyisége a talajoknál a mérhető enzimaktivitást. Vizsgálatainkban cukor, oldható nitrogén és foszforvegyületek jelenlétében érlelt talajokkal dolgoztunk. Eredményeinket az 1. ábrán foglaltuk össze. A szubsztrátum mennyiségének növelésével a felszabadított fenol csak egy bizonyos határig nőtt. Ezt a maximális fenolmennyiséget tartalmazó szubsztrátum adagot



1. ábra.

A szubsztrátum-ellátottság befolyása a foszfatáz aktivitására különböző tápoldattal érlelt talajnál. 1. CNP, 2. CN tápoldat

annyit kell adni belőle, mint amennyi fenol felszabadul.

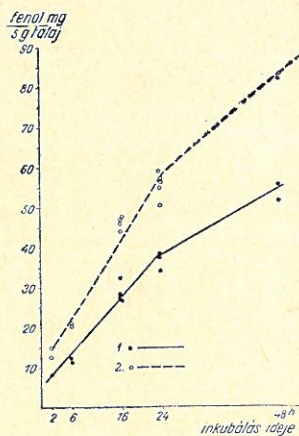
Az inkubálás idejét úgy választjuk meg, hogy egy meghatározás ne igényeljen túl sok szubsztrátumot. Ha 5,0 g talajhoz 100 mg szubsztrátumot adunk, úgy a fenti megoldások szerint legfeljebb 10,0 mg fenol szabadulhat fel az enzimhatás során. A 2. ábrából kitűnik, hogy az eltérő tápanyagellátottság miatt a talaj enzimaktivitásban létrejött különbség már 2 órai inkubálás alatt is jól mérhetően mutatkozik meg.

választottuk egységnyi, az enzimaktivitás maximumát 100-nak. Az 1. ábrából látható, hogy az egységnyi szubsztrátum adagból, adott körülmények között maximálisan felszabadítható fenol mennyiségnek csak 50—60%-a hidrolizálódik az enzim hatására és négyszeres adagnál több szubsztrátum már nem eredményez további fenoltöbbletet. Így legalább négyszeres mennyiségű szubsztrátumként adunk, mint amennyi az enzim hatására az inkubáláskor szabadddá válik. Mivel a szubsztrátum kb. 40% fenolt tartalmaz, legalább tízszer

Az inkubálás első 24 órájában az enzimaktivitás az idővel arányosan növekedik. Így — aktívabb talajok vizsgálatánál — 2 óra inkubálás is elegendő. A szubsztrátum mennyiségét úgy is lehetne csökkenteni, hogy 5,0 g-nál kevesebb talajt mérnek be egy vizsgálathoz. Ez a mód azonban nem megfelelő, mivel 5,0 g-nál kevesebb — szokásos módon előkészített talaj — nem képvisel jó átlagmintát. Vizsgálataink szerint ilyenkor a párhuzamos minták eredményei erősen (15—20%-ra) eltérnek.

3. Az inkubált oldatok derítése

Az inkubált talajszuszpenziók leszűrése gyakran nehézségbe ütközik. Az elszaporodó mikroorganizmusok zavarossá teszik a szűrletet és a szerves anyagok jelenléte gátolja a jelenlevő finom részecskék tömörülését. A szűrés elhúzódnása az enzimmeghatározást zavarja. Az enzim ugyanis a talaj kolloidjaihoz van kötve és a szubsztrátum csak akkor nem hasad tovább, ha már elválasztottuk a kolloidoktól. (Jégsekreányben, tapasztalataink szerint, hetekig is eltartható a tiszta szűrlet anélkül, hogy a fenol tartalma változnék). A rövid (2 órás) inkubálás éppen a nagy enzimaktivitással rendelkező talajoknál csak akkor vezethető be, ha van mód az enzim és a szubsztrátum gyors elválasztására. Derítő anyagként csak olyan anyagot lehet adni, amely a Gibbs reagens használatát nem zavarja. Az enzimológiában általában bevált eljárásokkal (triklórecetsavas kezelés, illetve 100 °C-os melegítés) nem sikerült az enzim hatását megállítani és a kolloidot koagulálni, mert az enzim csökkentett mértékben ugyan, de továbbra is hatásos maradt ezek után a



2. ábra.

A mért enzim aktivitása és az inkubálási idő összefüggése különböző tápoldattal érlelt talajnál. 1. CNP, 2. CN tápoldat

1. táblázat

A szubsztrátumhoz adott timsó (0,25 g/100 ml vizsgált oldat) enzimgátló hatása. (Inkubálás ideje : 2 óra)

(1) Talajminta száma	(2) Kezelés	(3) Mért enzimaktivitás	
		felszabadult fenol mg	viszonyszám
I.	Timsóval szűrve (4)	5,66	100
	Timsó jelenlétében inkubálva (5)	2,20	40
II.	Timsóval inkubálás után azonnal szűrve (6)	7,67	100
	Inkubálás után 2 órát szűrés előtt timsóval szobahőmérsékleten állt (7)	9,20	120
II.	Timsóval szűrve, szűrlet első (fél óra alatt leesepegett) részében (8)	7,67	100
	Szűrlet második (féltől — másfél óráig leesepegett) részében (9)	7,97	104

kezelések után is. Ennek oka egyrészt az lehet, hogy meszes talajok pH-ját a triklórecetsav nem csökkenti kellőképpen, másrészt a talaj agyagtartalma megvédi az enzimfehérjét a hőokozta koagulációtól. A szuszpenzió derítésére a talaj nitráttartalmának meghatározásánál használatos kivonószér [2, 12] a timsó vált be. Az oldat így jól szűrhető és a timsó a Gibbs szerinti fenol meghatározást nem zavarja. A timsó bizonyos mértékig az enzimhatást is lassítja (1. táblázat), s ez szintén előnyös tulajdonsága.

A módszer leírása

A fenti vizsgálatok és megfontolások alapján a talajok és trágyák foszfatázaktivitását a következőképpen határozzuk meg:

Az alaposan homogenizált mintából 150 ml-es kúpos lombikba bemérünk 5,0 g-t, majd hozzáadunk 2,5 ml toluolt. A gumidugóval lezárt lombik tartalmát jól össze-rázzuk és 15 perces állás után hozzáadunk 20 ml 0,5%-os dinátriummonofenilfoszfát oldatot. Összerázás után 37 C°-on inkubáljuk: nagy enzimaktivitású mintáknak (pl. érlelt talajoknál) 2 óra, általában pedig 24 óra hosszat. Az inkubálási idő leteltével, 100 ml 0,3%-os timsóoldat hozzáadása és a lombik tartalmának alapos össze-rázása után a szuszpenziót redős szűrőn (MN615/6) leszűrjük. A szűrletből aliquot részt (1—5 ml) 25 ml-es mérőlombikba mérünk, hozzáadunk 5 ml pH = 9,4 boraxpuffert és 4 csepp Gibbs reagenst. A jelig töltött oldatot fél óráig szobahőmérsékleten állni hagyjuk és azután kolorimetraljuk a keletkezett kék szín erősségét S 66-os színszűrőn. Mérési határ: 0,01—0,12 mg fenol/25 ml.

Szükséges oldatok: 1. Szubsztrátum-oldat. Dinátriummonofenilfoszfát 0,5%-os vizes oldata, melynek pH-ját — ha szükséges — 7,0-re állítjuk be. Toloul jelenlétében jégszekrényben hetekig eltartható. A készítmény Freeman és Colver [4] szerint állítható elő. Összes fenol tartalma 45,2%, összes P_2O_5 tartalma 31,5%. 0,5%-nál több szervesetlen P_2O_5 -t nem tartalmazhat. Először Iwatsuru [6] alkalmazta az enzimológiában. 2. Borax-puffer. 500 l desztillált vizes oldat 14,2 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ -t (puriss) és 41 ml n NaOH-t tartalmaz. 3. Gibbs reagens. 0,125 g 2,6 dibromkinonklorimidet (száraz $CaCl_2$ felett, jól záró barna üvegben, jégszekrényben kell tartani) 10 ml 96-os alkoholban hosszas (kb. fél óra) rázás útján kell feloldani. Sötét üvegben, jégszekrényben hetekig el lehet tartani. Mindaddig használható, míg a sárga oldat barnulni nem kezd. 4. Fenol törzsoldat. A frissen desztillált fenol 1000 g-ját feloldjuk 1 liter n/10 HCl-ban, majd meghatározzuk a fenol tartalmát Br_2 fogyasztása alapján Koppe-schaar szerint.

Összefoglalás

A talajok és trágyák foszfatáz aktivitásának mérésére a tej- és lucernavizsgálatoknál használt enzimvizsgáló módszerekből kiindulva gyors, olcsó és egyszerűen elvégezhető módszert dolgoztunk ki. Az enzimhatást befolyásoló körülmények (szubsztrátum mennyisége, inkubációs idő, szűrés helyes módja) vizsgálatával a módszert megbízhatóbbá tettük.

Érkezett: 1958. szeptember 20.

Irodalom

- [1] Albers, H.: Phosphatasen. In *Nord, F. F. & Weidenleggen, R.: Handbuch der Enzymologie*. I. 408—479. Akad. Verl. Leipzig. 1940.
- [2] Balks, R. & Reehers, I.: Bestimmung des Nitrat- und Ammoniumstickstoffes im Boden. *Landw. Forsch.* 8. 7—13. 1955.

- [3] *Courtois, J.*: Hydrolyse comparée des acides α et β glycerophosphoriques par diverses phosphatases végétales. II. Étude de la taka diastase. Bull. de la Soc. Chim. Biol. 17. 1318—1339. 1935.
- [4] *Freeman, H. F. & Colver, C. W.*: Synthesis of disodium phenylphosphate. J. Amer. Chem. Soc. 60. 750—751. 1938.
- [5] *Gibbs, H. D.*: Phenol tests. III. The indophenol test. J. Biol. Chem. 72. 649—664. 1927.
- [6] *Iwatsuru, R.*: Über die Spaltung der mono phenylphosphorsäuren und mono etilphosphorsäuren Salze durch pflanzliche und tierische Phosphatase. Biochem. Z. 173. 348—357. 1926.
- [7] *Kroll, L. & Kramer, M.*: Der Einfluss der Tonminerale auf die Enzymaktivität der Bodenphosphatase. Naturwiss. 42. 157—158. 1955.
- [8] *Kroll, L., Kramer, M. & Lörinicz, E.*: Fenilfoszfátos enzimanalízis alkalmazása talajok és trágyák vizsgálatára. Agrokémia és Talajtan. 4. 173—182. 1955.
- [9] *Mariland, M. & Robison, R.*: The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. VII. The bone phosphatase. Biochem. J. 21. 665—674. 1927.
- [10] *Sanders, G. P., Hupfer, J. A. & Wiseman, H. G.*: A phosphatase test for determining heat treatment of alfalfa meal. J. Dairy Sci. 39. 561—567. 1956.
- [11] *Sanders, G. P. & Sager, O. S.*: Phosphatase test for various dairy products. J. Dairy Sci. 30. 909—920. 1947.
- [12] *Zöttl, H.*: Bestimmung der Stickstoffmineralisation im Waldhumus durch Brutversuch. Z. Pfl. Ernähr. Düng. 81. 35—50. 1958.

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗЫ ПОЧВ ПРИ ПОМОЩИ ДИНАТРИУМФЕНИЛФОСФАТА

М. Крамер и Г. Эрден

Научно-Исследовательский Институт Почвоведения и Агрохимии А. Н. Венгрии, Будапешт

Резюме

Авторы определяют активность фосфатазы почв и навозов при помощи динатриумфенилфосфата, этот метод используемый в медицинских лабораториях и при контроле продуктов питания.

Из тщательно гомогенизированного вещества отмеряли 5 гр. в коническую колбочку на 150 мл. и прибавляли 2,5 мл. толуола. Колбочка была закрыта резиновой пробкой и содержание колбочки хорошо перемешивалось. После 15 минутного стояния прибавили 20 мл. раствора 0,5%-ого динатриумфенилфосфата. Инкубация проводится после встряхивания при 37° С; продолжительность её 24 часа, но у образцов с высокой энзиматической активностью (напр. у компостируемых почв) 2 часа. По истечении времени инкубации прибавим 100 мл. 0,3%-ного раствора квасцов, после чего содержание колбочки тщательно взбалтывается и суспензия фильтруется через фильтровальную бумагу. Из чистого филтраты 1—5 мл. переносим в измерительную колбочку по 25 мл, прибавим 5 мл. бораксного буфера, имеющего рН — 9,4 и 4 капли реагента Гиббса. Раствор доводится до метки и оставляется на 1/2 часа при комнатной температуре и потом колориметрически определяется интенсивность синей окраски у фильтра С—66.

Граница измерения: 0,01—0,12 мг. фенол/25 мл.

Необходимые растворы: 1, Раствор субстрата. Он является 0,5%-ным водным раствором динатриуммонофенилфосфата, рН которого, если потребуется, устанавливается на 7,0. В присутствии толуола можно сохранить в леднике в течение нескольких недель. 2, Боракс — буфер. Приготавливается путем растворения 14,2 гр. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (чистого) в 500 мл. дистиллированной воды и прибавляется 41 мл. 1 н. NaOH . 3, Реагент Гиббса. 0,125 гр. 2,6 дибромхинонхлоримид (он хранится над сухим CaCl_2 в хорошо закрытой коричневой склянке в леднике) растворяется в 10 мл. 96%-ном спирте после продолжительного (около половина часа) встряхивания. В темной склянке в леднике можно держать в течение нескольких недель. При побурении раствор к работе не пригоден. 4, Основной раствор фенола. 1 гр. свежее-отдистиллированного фенола растворяется в 1 л. н/10 HCl , потом содержание фенола определяется на основе израсходования Br_2 по методу Коппешар.

Таблица 1. Тормозящее влияние квасцов на энзимы, прибавленных к субстрату (0,25 гр/100 мл. изученного раствора). Время инкубации 2 часа. (1). Номер почвенного образца — (2). Варианты (3) Измеренная активность энзимов; освобожденный фенол в мг. и относительное число (4). Фильтрация в присутствии квасцов (5). Инкубация

в присутствии квасцов (6). После инкубации сразу же фильтруется в присутствии квасцов (7). Взаимодействие с квасцами в течение 2 часов после инкубации перед фильтрацией. (8) Фильтрация в присутствии квасцов, первая часть фильтрата (за 30 минут) (9) Другая часть фильтрата (от 30 до 90 минут).

Рис. 1. Влияние количества субстрата на активность фосфатазы у почв, обработанных различными питательными растворами.

1, У почвы, обработанной питательным раствором CNP.

2, У почвы, обработанной питательным раствором CN. На абсциссе: Количество субстрата. На ординате: Относительные числа активности энзимов.

Рис. 2. Взаимосвязь между измеренными активностями энзимов и временем инкубации.

1, У почв, обработанных питательным раствором CNP.

2, У почв, обработанных питательным раствором CN. На абсциссе: время инкубации. На ординате: фенол в мг/5 гр. почвы.

Investigation of the Phosphatase Activity of Soils with the Use of Disodium Phenylphosphate

M. KRÁMER and Mrs. G. ERDEI

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

The method of determining phosphatase activity with disodium phenylphosphate, in general use in medical and food research laboratories, has been applied by the authors to the investigation of soils and manures. The suggested procedure is as follows.

5,0 g of the completely homogenized sample is transferred into a 150 ml conical flask, then 2,5 ml of toluene added, the flask closed by a rubber stopper, shaken up, allowed to stand for 15 minutes and treated with 20 ml of a 0,5% solution of disodium monophenyl phosphate. On shaking the mixture, it was incubated at 37° C for 24 hours (except in the case of samples of high enzymatic activity, as fermented soils, when incubation for 2 hours proved to be satisfactory. After incubation, 100 ml of a 0,3% solution of alum was added, the mixture shaken, and the suspension filtered through a Faltenfilter MN 615/5. An aliquot portion (1—5 ml) of the filtrate was transferred into a 25 ml measuring flask, 5 ml of borax buffer of pH 9,4 and 4 drops of Gibbs reagent added, made up to volume with water, allowed to stand at room temperature for 30 minutes and the intensity of the developed blue colour determined by colorimetry, applying colour filter S 66. Limit of measurability: 0,01—0,12 mg phenol/25 ml.

Solutions required: 1. Solution of substrate. A 0,5% aqueous solution of disodium monophenyl phosphate, the pH value of which, when necessary, is adjusted to 7,0. 2. Borax buffer, prepared by dissolving 14,2 g of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (puriss. grade) in 500 ml distilled water containing 41 ml of 1,0 N NaOH. 3. Gibbs reagent. 0,125 g of 2,6-dibromoquinone chlorimide (kept in an ice box in a well closed brown flask over dry CaCl_2) is dissolved in 10 ml 96% ethanol under long shaking (for about half an hour). The solution can be stored for weeks in a dark flask in ice box. It can be used as long as the yellow colour does not turn brown. 4. Phenol stock solution, prepared by dissolving exactly 1,0 g of freshly distilled phenol in 1 liter of 0,1 N HCl. The phenol content of the stock solution is determined according to Koppeschaar, on the basis of its bromine consumption.

Table 1. Inhibiting action of alum added to the substrate (0,25 g alum in 100 ml of test solution) on enzymatic effect. Period of incubation: 2 hours. (1) Number of soil sample, (2) Treatment, (3) Measured enzymatic activity: mg of liberated phenol and ratio, (4) filtered with alum, (5) incubated in the presence of alum, (6) filtered immediately after incubation with alum, (7) allowed to stand for two hours with alum at room temperature, subsequent to incubation but prior to filtration, (8) filtered with alum, in first portion of filtrate (obtained in 30 minutes) (9) in second portion of filtrate (dropping from the 30th to the 180th minute).

Fig. 1. Effect of nutrient supply of substrate on the phosphatase activity of soils fermented with various nutrients: 1: measured with soil fermented with CNP nutrient, 2: measured with soil fermented with CN nutrient. Vertical axis: ratio of enzymatic activity, horizontal axis: supply of substrate.

Fig. 2. Correlation of measured enzymatic activity and periods of incubation of soils fermented with various nutrients. 1: measured with soil fermented with CNP nutrient, 2: measured with soil fermented with CN nutrient. Vertical axis: mg of phenol in 5 g soil, horizontal axis: period of incubation.