Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie, 2005(3), 37-61

ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W MINERALIZACJI AZOTU ORGANICZNEGO*

Andrzej I. Wyczółkowski, Małgorzata Dąbek-Szreniawska

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27
e-mail: a.wyczolkowski@demeter.ipan.lublin.pl

Streszczenie. Etapy mineralizacji azotu organicznego w środowisku glebowym: proteoliza, amonifikacja, nitryfikacja. Enzymy biorące udział w tych procesach. Podstawy oznaczeń aktywności enzymów w glebie. Proponowane metody dla wyznaczenia aktywności wybranych enzymów w glebie.

Słowa kluczowe: gleba, minearalizacja azotu organicznego, metody oznaczania aktywności enzymów

Zasadnicza część masy azotu organicznego gleby wchodzi w skład trwałej substancji organicznej gleby – próchnicy jako frakcja białek i produktów ich hydrolizy, aminokwasów związanych z polifenolami, cukrami oraz połączeń tych produktów z minerałami gleby. Składnikami gleby zawierającymi azot są również kwasy nukleinowe, nukleoproteidy i aminocukry [6].

Związki organiczne azotu połączeń próchnicznych i dostających się do gleby w postaci resztek zwierzęcych i roślinnych substancji zawierających azot organiczny, ulegają złożonym przemianom biochemicznym. W tym procesie tworzą się dostępne dla roślin związki azotu mineralnego. We wszystkich stadiach poszczególnych etapów ich przemian (proteolizy, amonifikacji, nitryfikacji, denitryfikacji) mają udział mikroorganizmy wytwarzające specyficzne enzymy wewnątrz żywych komórek lub enzymy pozakomórkowe wydzielane do środowiska, nagromadzone w glebie, osadzone na koloidach organicznych i mineralnych [27,28,41].

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego nr 3P04G 04324 finansowanego przez KBN w latach 2003-2005.

Etapy przemian ukierunkowane są na wykorzystanie znajdujących się w glebie złożonych związków azotu organicznego, w postaci fragmentów tkanek i komórek mikro-, mezo- i makrofauny glebowej, resztek roślinnych, obumarłych strzępek i komórek mikroorganizmów, odchodów zwierzęcych, oraz dodanych celowo nawozów organicznych: obornika, kompostów, osadów ściekowych. Przemiany te polegają na enzymatycznej hydrolizie, aż do uzyskania prostych związków mineralnych pierwiastków biogennych pobieranych przez producentów – rośliny zielone [36].

Pierwszym etapem tego procesu jest proteoliza – hydroliza złożonych organicznych związków azotowych. Enzymy biorące udział w proteolizie w środowisku glebowym są wytwarzane przez mikroorganizmy heterotroficzne (reducenty) i wydzielane do tego środowiska, w wyniku czego następuje hydroliza białek i polipeptydów do wolnych aminokwasów. Dzięki hydrolitycznej działalność nukleaz kwasy nukleinowe ulegają rozkładowi początkowo na nukleotydy, a te następnie rozszczepiają się na zasady purynowe i pirymidowe oraz na pozostałe składniki – pentozy, jony fosforanowe. Złożone pochodne aminocukrów (np. chityna) pod wpływem działania heksoamidaz hydrolizują z wytworzeniem heksoamin mogących być prekursorami kwasów uronowych [38,32,29,37].

Część aminokwasów i innych niskomolekularnych związków azotu organicznego powstałych na drodze proteolizy, może być pobierana bezpośrednio przez drobnoustroje i wyższe rośliny zielone, ale większość z tych związków ulega dalszym przekształceniom podczas amonifikacji. Choć w przyrodzie proces dezaminacji może przebiegać na drodze chemicznej [33], to w glebie proces ten przebiega na drodze przemian biochemicznych przy udziale enzymów pochodzenia mikrobiologicznego. Drobnoustroje o uzdolnieniach do amonifikacji w różnorodny sposób prowadzą dezaminację aminokwasów, prostych heksoamin i innych amidów, uwalniając amoniak [31]. Mocznik i związki azotu organicznego zawarte w moczu zwierząt w glebie ulegają hydrolizie pod wpływem np. enzymu ureazy wytwarzanego przez mikroorganizmy [38,7]. Wielokrotnie poddawano badaniom takie dezaminazy glebowe jak ureaza, asparginaza, glutaminaza, amidaza. Mniej jest poznana aktywność arginazy, dezaminazy adenozynowej, liazy amoniako-histydyny lub fenyloalaniny i innych [48,42].

Część zawartych w glebie jonów amonowych może być asymilowana przez rośliny i ponownie wbudowywana w związki organiczne azotowe komórek. Części zaś ulegają sorpcji w cząsteczkach kwasów humusowych lub mineralnych. Na drodze procesów oksydo-redukcyjnych znaczna część jonów amonowych przy udziale różnych enzymów zostaje utleniona do jonów azotynowych i azotanowych. Ten proces nitryfikacji przebiegający w warunkach tlenowych powoduje zwiększenie puli azotanów, które są łatwo pobierane przez rośliny zielone [4,5,27].

Proces redukcji azotanów do amoniaku a często do wolnego azotu przebiegający przy udziale enzymów nitroreduktaz zwany jest procesem denitryfikacji. Warunkiem koniecznym do jego przebiegu jest całkowity brak lub bardzo niskie stężenie tlenu w środowisku. Proces denitryfikacji przy dużym jego natężeniu w warunkach np. długotrwałego i nadmiernego nasycenia gleby wodą może prowadzić do strat azotu w glebie agrocenoz [5,27,29].

Aktywność enzymów biorących udział w przemianach azotu w środowisku glebowym może być wskaźnikiem:

1. biologicznej aktywności środowiska glebowego a pośrednio wskaźnikiem aktywności drobnoustrojów biorących udział w tych procesach, w zależności od istniejących, lub stworzonych przez agrotechnikę warunków chemicznych i fizykochemicznych w środowisku gleby pól uprawnych i innych agrocenoz. Można też ocenić wpływ czynników antropogenicznych na środowisko glebowe naturalnych fitocenoz [9,13,20,37],
2. aktywność tych enzymów świadczy o intensywności przemian związków azotu w środowisku i może być wskaźnikiem dostępności azotu dla roślin rosnących na polach w danym systemie uprawowym [8,13],
3. charakteryzującym gleby jednej grupy systematycznej ale pod różną pokrywą roślinną agro- i fitocenoz naturalnych [11,12].

Oznaczanie aktywności proteaz (EC 3.4. groups) opiera się na oznaczeniu wolnych aminokwasów powstałych w wyniku hydrolizy białek, polipeptydów, dwupeptydów. Substratami dla proteaz mogą być – kazeina, żelatyna [30,3], zmodyfikowane białka – azokazeina, azoalbumina [34] lub chemicznie zmienione trój- i dwu-peptydy np. N-benzoil-L-arginamid (BAA), N-benzyloksykarbonyl-L-fenyloalanino-L-leucyna (z-FL,z-PL), benzyloksykarbonyl-L-fenyloalanino-L-tyrozylo-L-leucyna (z-FTL) stosowane przez Ladd, Butler [30], Watanabe, Hayano [49], Hayano [21], Burket, Dick [8] i innych.

Najczęściej oznaczano w glebie aktywność ureazy (EC 3.5.1.5) stosując jako substrat różne stężenia roztworu mocznika opierając się na metodach opisanych w badaniach Hoffmann, Teicher [22], Tabatabai, Bremner [46], Zantua, Bremner [50], Kandeler, Gerber [24].

Oznaczenie w glebie aktywności enzymów L-asparaginazy (EC 3.5.1.1), L-glutaminazy (EC 3.5.1.2) oparte jest na oznaczeniu ilości jonów amonowych uwalnianych w wyniku hydrolizy odpowiednich aminokwasów. Jony amonowe oznaczane są kolorymetrycznie, miareczkowaniem, elektrodą jonoselektywną wg metod podanych przez Omura i in. [39], Frankenberger, Tabatabai [17,18], Kanazawa, Kiyoto [23].

Frankenberger, Tabatabai [16] przedstawili metodę oznaczenia w glebie aktywności enzymu amidazy (EC 3.5.1.4). Jako substratu do jego oznaczenia zastosowali roztwory

formamidu, acetamidu lub propioamidu, które to amidy alifatyczne pod działaniem danego enzymu ulegają hydrolizie z wydzieleniem amoniaku.

Oznaczenie w glebie aktywności enzymu dezaminazy (EC 3.5.4) wykonuje się wtedy, gdy chcemy wykazać, czy w danej glebie może przebiegać proces amonifikacji. Substratem w metodzie zaproponowanej przez Killham, Rashid [26] jest 1,2-diamino-4-nitrobenzen.

Obecnie coraz częściej wyznacznikiem biologicznej aktywności gleby jest zdolność danej gleby do amonifikacji argininy zgodnie z metodą podaną przez Alef, Kleiner [2]. Ta metoda z różnymi modyfikacjami (np. [14])stosowana jest tak do oznaczania potencjału amonifikacji danej gleby w różnych warunkach środowiska [45] jak i do porównania z biomasą drobnoustrojów [25].

Wykonywanie badań nad aktywnością licznych enzymów cyklu przemian azotu w glebie jest dużo mniejsze, bo wymagają specyficznych substratów, odczynników chemicznych, a nawet aparatury. Coraz częściej oznaczana jest w glebie aktywność ß-glukozaminidazy EC 3.2.1.30 [40], adenozyno dezaminazy EC 3.5.4.4 [43].

Rzadko oznaczanymi enzymami są: histydyny amoniako-liaza EC 4.3.1.3 [15], fenyloalaniny amoniako-liaza EC 4.3.1.5 [47], aspartaza EC 4.3.1.1 [44], reduktaza azotanowa EC 1.7.99.4 [1], oksydaza moczanowa EC 1.7.3.3 [35].

Asparaginaza EC 3.5.1.1
Glutaminaza EC 3.5.1.2

Podstawy oznaczeń

W wyniku dezaminacji L-asparaginy lub L-glutaminy, powstaje amoniak, którego ilość oznaczana może być w reakcji z odczynnikiem Nessler'a lub indofenolowym.

Metoda I: Omura, Sato, Hayano [39] zmodyfikowana

Sprzęt

1. Spektrofotometr,
2. Mieszadło rotacyjne na probówki – (rotor) 60 obrotów na minutę.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór substratu – 0,25 M roztwór L-asparaginy lub L-glutaminy w buforze fosforanowym: 8,2575 g L-asparaginy (np. L-Asparagine firmy Sigma A-0884 lub L-Asparagin wasserfrei firmy Fluka AG) lub 9,15 g L-glutaminy rozpuścić (kolba miarowa poj. 250 cm^3) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH7,6. Kolbę dopełnić do kreski buforem,

3. Bufor fosforanowy – 0,1 M bufor fosforanowy o pH = 7,6: przepis wykonania wg Chazieva [10],
4. Roztwór kwasu solnego – 5 M roztwór HCl: do kolby stożkowej o pojemności 500 cm^3 wlać 100 cm^3 wody destylowanej, a następnie bardzo powoli po ściankach 39 cm^3 stężonego HCl cz.d.a. (c.wł. 1,18). Po ostygnięciu roztwór przelać do kolby miarowej poj. 250 cm^3 i dopełnić do kreski wodą destylowaną,
5. Roztwór wymywający – 0,5 M roztwór KCl w 0,2 M roztworze NaOH: 37,28 g KCl cz.d.a. rozpuścić w 1 dm^3 0,2 M roztworu NaOH (czyli w roztworze zawierającym 8 g NaOH cz.d.a. w 1 dm^3 wody destylowanej),
6. Odczynnik Nessler'a: przepis wykonania wg Grabińska-Łaniewska [19]. **TRUCIZNA,**
7. Roztwór wzorcowy $N\text{-}NH^+_4$: 2,358 g $(NH_4)_2SO_4$ cz.d.a. rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 500 cm^3. Po rozpuszczeniu dopełnić wodą destylowaną do kreski. W 1 cm^3 roztworu znajduje się 0,001 g $N\text{-}NH^+_4$.

Uwaga: woda destylowana używana do odczynników i analiz musi być świeżo destylowana lub wygotowana i schłodzona.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Do dużej probówki z dopasowanym korkiem o pojemności 30-40 cm^3 naważyć 1 g przesianej gleby. Wprowadzić do probówki 0,5 cm^3 toluenu, zatkać szczelnie korkiem. Po 5 minutach dodać 5 cm^3 roztworu substratu, zawartość probówki wymieszać i wstawić do cieplarki o wybranej temperaturze (np. 30°C) do inkubacji przez okres 5-24 godzin. Po tym czasie dodać 0,3 cm^3 roztworu kwasu solnego i zawartość probówki energicznie wymieszać. Po dalszych 5 minutach dodać 10 cm^3 roztworu wymywającego. Zawartość probówki ponownie dokładnie wymieszać i dalej mieszać na rotorze przy 30 obrotach na minutę przez okres 10 minut. Zyskaną zawiesinę wraz z glebą przenieść na zwilżony roztworem wymywającym sączek z bibuły twardej (np. Filtrak nr 390). Klarowny przesącz zbierać do probówki z zaznaczoną objętością 15 cm^3.

Z 15 cm^3 klarownego przesączu pobrać 1 cm^3 i wprowadzić do probówki o pojemności 10 cm^3 z kalibracją co 1 cm^3. Dodać 5 cm^3 wody destylowanej i 3 cm^3 buforu fosforanowego. Zawartość probówki wymieszać, dodać 1 cm^3 odczynnika Nessler'a, dopełnić jeśli potrzeba wodą destylowaną do objętości 10 cm^3. Zawartość probówki, po jej zatkaniu korkiem, dokładnie wymieszać. Po 15 minutach zmierzyć natężenie barwy roztworu w fotokolorymetrze przy długości fali 436 nm. Zero fotokolorymetru nastawić na próbę odczynnikową tzn. mieszaninę odczynników, gdzie w miejsce 1 cm^3 przesączu wprowadzić 1 cm^3 roztworu wymywającego.

Próbki kontrolne

- Probówka z naważką gleby z 5 cm^3 wody destylowanej w miejsce roztworu substratu, inkubacja jak wyżej,
- Probówka z naważką piasku przemytego i jałowionego z 5 cm^3 roztworu substratu, inkubacja jak wyżej,
- Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Krzywa wzorcowa

Pobrać do szeregu kolbek miarowych o pojemności 100 cm^3 (w trzech równoległych powtórzeniach) po 0, 1, 2, 3, 5, 10 cm^3 roztworu wzorcowego $N\text{-}NH^+_4$. Do każdej kolbki dodać 10 cm^3 wody destylowanej i po 3 cm^3 roztworu wymywającego. Zawartość kolbek wymieszać, dopełnić do kreski wodą destylowaną i ponownie wymieszać. Dalsze postępowanie jak z przesączem próbki gleby badanej.

Obliczanie wyników

Zawartość mg N w 1 cm^3 przesączu prób odczytać z krzywej wzorcowej. Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$mg\ N \cdot g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(S - C) \cdot 15 \cdot 100}{10 \cdot 1 \cdot \%\, s.m.}$$

S – ilość mg N w 1 cm^3 przesączu próbki badanej,
C – ilość mg N w 1 cm^3 przesączu próbki kontrolnej,
15 – objętość przesączu (cm^3),
10 – czas inkubacji (godz.) np. 10 godz.,
1 – naważka gleby (g),
100 $\%^{-1}$s.m. współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki ,

Metoda II: Kanazawa, Kiyota [23]

Sprzęt

1. Spektrofotometr,
2. Mieszadło rotacyjne na probówki – (rotor) 60 obrotów na minutę.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór substratów – 0,25 M: 3,66 g L-glutaminy lub 3,31 g L-asparaginy rozpuścić odpowiednio w 100 cm^3 buforu fosforanowego o pH = 7,6,

3. Bufor fosforanowy – 0,1 M o pH = 7,6: przepis wykonania wg Chazieva [10].
4. Bufor o pH = 12:30 g Na_3PO_4 $12H_2O$, 30 g $Na_3C_6H_5O_7$ $2H_2O$ i 3 g EDTA rozpuścić kolejno w 700 cm^3 wody destylowanej pH roztworu zmierzyć i nastawić na pH =12. Roztwór przelać do kolby miarowej o pojemności 1 dm^3 i wodą destylowaną dopełnić do takiej objętości.
5. Odczynnik indofenolowy:
   A. 6 g fenolu cz.d.a., 0,2 g nitroprusydku sodu rozpuścić w 1dm^3 buforu o pH = 12. Roztwór przechowywać w chłodni. **TRUCIZNA,**
   B. 20 cm^3 podchlorynu sodu (około 10% aktywnego chloru) wprowadzić do 400 cm^3 1 M roztworu NaOH i rozcieńczyć wodą do objętości 1 dm^3,
6. Odczynnik Nesslera: 5 g KJ rozpuścić w 5 cm^3 wody destylowanej i taki roztwór wkraplać do 25% roztworu $HgCl_2$ w wodzie destylowanej do chwili utworzenia trwałej zawiesiny. Następnie dodać 45 cm^3 50% roztworu KOH w wodzie destylowanej. Całość rozcieńczyć wodą destylowana do objętości 100 cm^3,
7. Roztwór kwasu solnego – 5 M HCl wykonanie jak w metodzie I,
8. Roztwór wymywający – 0,5 M roztwór KCl w 0,2 M roztworze NaOH: wykonanie jak w metodzie I,
9. Roztwór wzorcowy wykonanie jak w metodzie I.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Do probówki o pojemności 20-30 cm^3 z dopasowanym korkiem naważyć 1 g przesianej gleby. Wprowadzić 0,2 cm^3 toluenu i natychmiast 5 cm^3 substratu. Energi-cznie wymieszać zawartość probówki. Wstawić do cieplarki o znanej temperaturze (np. 30°C) na 1-20 godzin. Po inkubacji do zawartości probówki dodać 0,3 cm^3 kwasu solnego i energicznie mieszać przez 1 minutę. Następnie dodać 9,7 cm^3 roztworu wymywającego. Zawartość probówki mieszać w mieszadle obrotowym przy 40 $obr \cdot min^{-1}$ przez 10 minut. Uzyskaną zawiesinę wraz glebą przenieść, na zwilżony roztworem wymywającym, sączek z bibuły twardej (Filtrak nr 390). Klarowny przesącz zbierać do probówki z zaznaczoną pojemnością 15 cm^3.

Przy oznaczeniu amoniaku z odczynnikiem Nesslera: z 15 cm^3 przesączu pobrać 0,1-0,3 cm^3 i w małej probówce rozcieńczyć odpowiednio 3,8-3,6 cm^3 wody destylowanej. Dodać 1 cm^3 buforu fosforanowego pH = 7,6 i 0,1 cm^3 odczynnika Nesslera, dokładnie wymieszać. Po 3 minutach zmierzyć natężenie barwy w fotokolorymetrze przy długości fali 436 nm.

Przy oznaczeniu amoniaku z odczynnikiem indofenolowym: z 15 cm^3 przesączu pobrać 0,1-0,3 cm^3 i w małej probówce rozcieńczyć odpowiednio 4,9-4,7 cm^3 wody destylowanej. Dodać 2 cm^3 składnika A i 3 cm^3 składnika B odczynnika indofeno-

lowego, zawartość probówki dokładnie wymieszać (najlepiej w mieszalniku probówkowym – Vortex mixer). W ciągu 70 minut zmierzyć natężenie barwy w fotokolorymetrze przy długości fali 630 nm.

Próbki kontrolne

1. Probówka z naważką gleby, 5 cm^3 buforu o pH = 7,6 w miejsce roztworu substratu,
2. Probówka z naważką piasku przemytego i jałowionego z 5 cm^3 roztworu substratu,
3. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Krzywa wzorcowa

Pobrać do szeregu kolbek miarowych o pojemności 100 cm^3 (w trzech równoległych powtórzeniach) po 0, 1, 2, 3, 5, 10 cm^3 roztworu wzorcowego $N\text{-}NH^+_4$. Do każdej kolbki dodać 10 cm^3 roztworu wymywającego. Zawartość kolbki wymieszać, dopełnić wodą destylowaną do objętości 100 cm^3, ponownie dokładnie wymieszać. Dalsze postępowanie jak z przesączem próbki gleby badanej.

Obliczanie wyników

Jak w metodzie I.

Amidaza EC 3.5.1.4

Podstawy oznaczeń

Enzym amidaza (acylamid amidohydrolaza) katalizuje hydrolizę amidów oraz podobnych związków kwasu węglowego z amoniakiem.

$$R-CONH_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + R-COOH \qquad (2)$$

Metoda: Frankenberger, Tabatabai [16]

Sprzęt

1. Aparat Parnasa-Wagnera na szlify do destylacji z para wodną, o kolbie destylacyjnej o pojemności 100 cm^3,
2. Mikrobiureta o pojemności 10 cm^3 z podziałką co 0,05 cm^3.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Bufor Tris – 0,1 M, pH = 8,5: rozpuścić 12,2 g Tris (hydroksymetylo) aminometan (THAM) w 800 cm^3 wody destylowanej nastawić pH na 8,5 za pomocą 0,1 M H_2SO_4 i dopełnić w kolbie miarowej, wodą destylowaną do objętości 1 dm^3,
3. Roztwór substratu – 0,5 M: 2 cm^3 formamidu ($HCONH_2$) lub 2,95 g acetamidu (CH_3CONH_2), lub 3,65 g propioamidu ($CH_3CH_2CONH_2$) wprowadzić do kolbki miarowej o pojemności 100 cm^3, dodać buforu Tris, po rozpuszczeniu dopełnić tym buforem o objętości 100 cm^3. Roztworu substratu nie wolno przechowywać,
4. Roztwór chlorku potasu – 2,5 M: rozpuścić 2,12 g octanu uranylu ($UO_2(C_2H_3O_2)_2$) w 700 cm^3 wody destylowanej, po rozpuszczeniu dodać 188 g KCl cz.d.a. Po całkowitym rozpuszczeniu chlorku potasu roztwór rozcieńczyć w kolbie miarowej do objętości 1 dm^3,
5. Tlenek magnezu: jak w metodzie II przy oznaczaniu aktywności enzymu ureazy (odczynnik 5),
6. Roztwór kwasu borowego ze wskaźnikiem: jak w metodzie II przy oznaczeniu aktywności enzymu ureazy (odczynnik 6),
7. Roztwór kwasu siarkowego – 0,005 N: naważkę analityczną (firmową) rozcieńczyć w kolbie miarowej do objętości 2 dm^3. Z tego rozcieńczenia pobrać dokładną pipetą 10 cm^3 i wprowadzić do kolbki miarowej o pojemności 100 cm^3. Dopełnić wodą destylowaną do objętości 100 cm^3.

Uwaga: woda destylowana używana do odczynników i analiz musi być świeżo destylowana lub po dłuższym staniu wygotowana i schłodzona.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. W naczyniu wyskalowanym na objętość 50 cm^3 (np. w kolbie miarowej o szerokiej szyjce) umieścić 5 g naważki przesianej gleby. Dodać 0,2 cm^3 toluenu i 9 cm^3 buforu Tris, zatkać korkiem. Zawartość energicznie wymieszać. Wprowadzić do kolbki 1 cm^3 roztworu amidu, zawartość kolbki ponownie energicznie wymieszać. Kolbkę z zawartością umieścić w cieplarce o temperaturze 37°C. Okres inkubacji: dla formamidu – 2 godziny, dla acetamidu i propioamidu 5-24 godzin. Po okresie inkubacji do kolbki wprowadzić 35 cm^3 roztworu chlorku potasu. Zawartość kolbki energicznie mieszać przez 1 minutę. Dopełnić kolbkę do objętości 50 cm^3 roztworem chlorku potasu, wymieszać i pozostawić na okres 5-10 minut do opadnięcia na dno cząstek gleby. Z zawiesiny nad osadem pobrać 20 cm^3 i wprowadzić do kolbki destylacyjnej o pojemności 100 cm^3 aparatu Parnasa-Wagnera,

dodać 0,2 g tlenku magnezu. Włączyć destylację (przepływ pary wodnej). W odbieralniku pod chłodnicą umieścić 20 cm^3 roztworu kwasu borowego ze wskaźnikiem. Destylować około 5 minut. Ilość $N\text{-}NH^+_4$ w destylacie oznaczyć przez miareczkowanie rozcieńczonym roztworem kwasu siarkowego.

Próbki kontrolne

1. Kolbka z naważką gleby z 1 cm^3 wody destylowanej w miejsce roztworu amidu,
2. Kolbka z naważką piasku przemytego, prażonego w temperaturze 180°C przez 2 godziny, z 1 cm^3 roztworu amidu,
3. Dalsze postępowanie jak z próbą badanej gleby.

Obliczanie wyników

Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ N \cdot g^{-1} s.m. \cdot 2h^{-1} = \frac{(B-C) \cdot 0{,}07 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot 100}{20 \cdot 5 \cdot \%\, s.m.} \tag{3}$$

Opis jak w metodzie II oznaczania aktywności ureazy.

Ureaza EC 3.5.1.5

Podstawa oznaczeń

Ureaza katalizuje rozkład mocznika do amoniaku i CO_2. Aktywność enzymu określa się ilością oznaczonego amoniaku lub ilością mocznika nie nierozłożonego po inkubacji gleby z określoną ilością dodanego do niej mocznika. Ilość amoniaku oznaczyć można kolorymetrycznie w reakcji z odczynnikiem Nesslera [22] lub w reakcji z wytworzeniem błękitu indofenolowego [24]. Można również oznaczyć przez destylację z ekstraktu glebowego i miareczkowaniem kwasem o znanym stężeniu [46]. Resztki mocznika nie zhydrolizowanego można oznaczyć kolorymetrycznie [50].

Metoda I Hoffmann, Teicher [22] zmodyfikowana

Sprzęt

1. Spektrofotometr,
2. Kolbki miarowe o szerokiej szyjce o pojemności 55 cm^3 z korkami i zaznaczoną objętością 50 cm^3.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór mocznika: 10 g mocznika cz.d.a. rozpuścić na ciepło w 100 cm^3 wody destylowanej. Roztwór ten można przechowywać w temperaturze 4°C nie dłużej niż 2 doby,
3. Bufor cytrynowy o pH = 6,7: 295 g KOH cz.d.a. oraz 368 g kwasu cytrynowego cz.d.a. rozpuścić kolejno w 1 dm^3 wody destylowanej. pH tego roztworu ustawić za pomocą 1 M roztworu KOH na 6,7 a następnie przelać do kolby miarowej o pojemności 2 dm^3 i dopełnić do tej objętości wodą destylowaną. Bufor używać po 2 dniach od jego zrobienia,
4. Roztwór fenolanu sodu: rozpuścić 2 g $C_6H_5ONa\ 3H_2O$ w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3, dopełnić woda do kreski,
5. Roztwór podchlorynu sodu: rozpuścić 4 g NaOH cz.d.a. w 100 cm^3 wody destylowanej, dodać 25 cm^3 podchlorynu sodu (około 15% aktywnego chloru) i całość rozcieńczyć do 1 dm^3 wodą destylowaną w kolbie miarowej,
6. Roztwór wzorcowy: 2,358 g $(NH_4)_2SO_4$ cz.d.a. rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3, roztwór trwały, przechowywać w temperaturze 4-8°C. Z takiego roztworu pobrać 10 cm^3 i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 cm^3 a następnie dopełnić ją do kreski wodą destylowaną. 1 cm^3 tego roztworu zawiera 100 μg $N\text{-}NH_4$.

Uwaga: woda destylowana używana do odczynników i analiz musi być świeżo destylowana lub po dłuższym staniu wygotowana i schłodzona.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. W naczyniu wyskalowanym na objętości 50 cm^3 (np. w kolbce miarowej o szerokiej szyjce o pojemności 55 cm^3) umieścić 50 g naważki przesianej gleby. Dodać 1 cm^3 toluenu, zatkać korkiem i wymieszać zawartość. Po 15 minutach dodać 10 cm^3 roztworu mocznika. Następnie wprowadzić 20 cm^3 buforu cytrynowego. Zawartość kolbki dokładnie wymieszać. Kolbkę umieścić w cieplarce o znanej temperaturze (np. 30°C) na okres 3-24 godzin. Po okresie inkubacji do kolbki dodać wodę destylowaną do objętości 50 cm^3, wymieszać energicznie i jej zawartość sączyć przez sączek z bibuły twardej (np. Filtrak nr 390), przesącz musi być klarowny. Przesącz zbierać do naczynia o pojemności 100 cm^3. Z zebranego przesączu pobrać 1-5 cm^3, umieścić w kolbce miarowej o pojemności 50 cm^3, dodać 9 cm^3 wody destylowanej, 4 cm^3 roztworu fenolanu.

Wymieszać zawartość kolbki i dodać 3-5 cm^3 roztworu podchlorynu (3 cm^3 przy 1 cm^3 przesączu). Ponownie wymieszać zawartość kolbki, zatkać korkiem i odstawić na 20 minut do wywołania barwy. Następnie uzupełnić kolbkę wodą destylowaną i zawartość wymieszać. W ciągu następnych 2 godzin zmierzyć natężenie barwy roztworu w fotokolorymetrze przy długości fali 580 lub 630 nm. Zero fotokolorymetru nastawić na próbę odczynnikową tzn. mieszaninę odczynników, gdzie w miejsce 1 cm^3 przesączu wprowadzić 1 cm^3 wody destylowanej.

Próbki kontrolne

1. Kolbka z naważką gleby z 10 cm^3 wody destylowanej w miejsce roztworu mocznika, bufor, inkubacja,
2. Kolbka z naważką piasku przemytego i jałowionego z 10cm^3 roztworu mocznika, bufor, inkubacja,
3. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Krzywa wzorcowa

Do szeregu kolbek miarowych poj. 50 cm^3 (w trzech równoległych powtórzeniach) wprowadzić po 0, 1, 2, 3, 5, 10 cm^3 roztworu wzorcowego rozcieńczonego. Pozostałe odczynniki dodać jak przy oznaczeniu amoniaku w przesączu.

Obliczanie wyników

Zawartość µg N w 1 cm^3 przesączu prób odczytać z krzywej wzorcowej. Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ N \cdot g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(S - C) \cdot 50 \cdot 100}{3 \cdot 5 \cdot \%\, s.m.} \tag{4}$$

S – ilość µgN w 1 cm^3 przesączu próby badanej,
C – ilość µgN w 1 cm^3 przesączu próby kontrolnej,
50 – objętość przesączu (cm^3),
np. 3 – czas inkubacji (h),
5 – naważka gleby (g),
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Metoda II Tabatabai, Bremner [46]

Sprzęt

1. Aparat Parnasa-Wagnera na szlify do destylacji z para wodną, z kolbą destylacyjną o pojemności 100 cm^3,
2. Mikrobiureta o pojemności 5-10 cm^3 z podziałką co 0,01-0,05 cm^3,
3. Wytrząsarka.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór mocznika – 0,2 M: rozpuścić 1,2 g mocznika cz.d.a. w 80 cm^3 buforu Tris i po rozpuszczeniu dopełnić w kolbie miarowej do objętości 100 cm^3,
3. Bufor Tris – 0,05 M o pH = 9: w 700 cm^3 wody destylowanej rozpuścić 6,1 g Tris (hydroksymetyl)aminometan, nastawić pH na 9 przy pomocy 0,2 M roztworu H_2SO_4 i dopełnić w kolbie miarowej wodą destylowaną do objętości 1 dm^3.
4. Roztwór chlorku potasu: rozpuścić 0,01 g Ag_2SO_4 cz.d.a. w 700 cm^3 wody destylowanej po rozpuszczeniu dodać 188 g KCl cz.d.a. Po całkowitym rozpuszczeniu chlorku potasu roztwór rozcieńczyć w kolbie miarowej do objętości 1 dm^3,
5. Tlenek magnezu: MgO cz.d.a.,
6. Roztwór kwasu borowego ze wskaźnikiem: rozpuścić 5 g H_3BO_3 w 350 cm^3 podgrzanej wody destylowanej. Po ostygnięciu dodać 5 cm^3 roztworu etanolowego wskaźnika Tashiro. Całość rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 500 cm^3 w kolbie miarowej,
   Wskaźnik Tashiro: zmieszać równe objętości 0,2% alkoholowego (alkohol etylowy) roztworu czerwieni metylowej i 0,3% wodnego (woda destylowana) roztworu zieleni bromokrezolowej.
7. Roztwór kwasu siarkowego – 2,5 mM (= 0,005 N); jak w metodzie przy oznaczaniu aktywności enzymu amidazy.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Naważkę 5 g przesianej gleby, umieścić w kolbce o pojemności 50 cm^3. Dodać 0,2 cm^3 toluenu i 9 cm^3 buforu Tris, wymieszać dokładnie, zatkać korkiem. Po 2 minutach dodać 1 cm^3 roztworu mocznika, ponownie wymieszać i zatkać. Wstawić do cieplarki, o temperaturze 37°C na 2 godziny. Po inkubacji dodać 35 cm^3 roztworu chlorku potasu. Wytrząsać na wytrząsarce przez 30 minut. Zawiesinę sączyć przez

sączek z bibuły twardej (np. Filtrak nr 390). Z przesączu pobrać 20 cm^3 i wprowadzić do kolby destylacyjnej aparatu Parnasa-Wagnera, dodać 0,2 g MgO. Włączyć destylację (z para wodną). W odbieralniku pod chłodnicą umieścić w odbieralniku 10cm^3 roztworu kwasu borowego ze wskaźnikiem. Destylować do zmiany barwy roztworu kwasu z fioletowej na zieloną i jeszcze 3 minuty. Ilość $N\text{-}NH^+_4$ w destylacie oznaczyć przez miareczkowanie mianowanym rozcieńczonym roztworem kwasu siarkowego.

Próbki kontrolne

1. Kolbka z naważką gleby z 1 cm^3 wody destylowanej w miejsce roztworu mocznika,
2. Kolbka z naważką piasku przemytego, wyprażonego w 180°C z 1 cm^3 roztworu mocznika,
3. Dalsze postępowanie jak z próbą badanej gleby.

Obliczenie wyników

Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ N \cdot g^{-1} s.m. \cdot 2h^{-1} = \frac{(B-C) \cdot 0{,}07 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot 100}{20 \cdot 5 \cdot \%\, s.m.} \qquad (5)$$

B – ilość cm^3 zużytego 2,5 mM H_2SO_4 na miareczkowanie próby badanej,
C – ilość cm^3 zużytego 2,5 mM H_2SO_4 na miareczkowanie próby kontrolnej,
0,07 – współczynnik (1 cm^3 2,5 mM H_2SO_4 odpowiada 0,07 mg N),
50 – objętość ekstraktu (cm^3),
1000 – współczynnik (1 mg N = 1000 μg N),
20 – ilość przesączu do destylacji (cm^3),
5 – ilość gleby do analizy (g),
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Uwaga do metody

Budowa aparatu Parnasa-Wagnera, jego obsługa i postępowanie z nim w czasie destylacji zawarte są w np. w: Tomaszewski L. – Mikrometody biochemiczne w laboratorium klinicznym. PZWL, Warszawa, 128-130, 1970.

Proteaza EC 3.4.4

Podstawa oznaczeń

Proteolityczne enzymy hydrolizują rozerwanie wiązań peptydowych w białkach do polipeptydów a te do wolnych aminokwasów. Enzymy proteazy można podzielić na dwie grupy proteinazy i peptydazy. Pierwsze działają na białka drugie katalizują rozpad polipeptydów i dwupeptydów do pojedynczych aminokwasów. Przy oznaczeniu w glebie aktywności proteaz jako substrat stosuje się kazeinę, żelatynę i trój- lub dwupeptydy o znanym składzie i ułożeniu aminokwasów w cząsteczce. Stopień aktywności enzymów wyznacza się według ilości wytworzonych aminokwasów (np.: kolorymetrycznie z odczynnikiem Folina lub ninhydrynowym) lub też oznaczając zmiany fizyczne (np. lepkość roztworu substratu).

Metoda I: Macura, Vagnerova [34]

Sprzęt

1. Wytrząsarka w łaźni wodnej o regulowanej temperaturze
2. Spektrofotometr

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór substratu – 1%: 1 g azokazeiny (np: Azocasein firma Sigma A-2765) w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3 rozpuścić w 50 cm^3 1% roztworu $NaHCO_3$ (w łaźni wodnej o temperaturze 60°C). pH powinno wynosić 8,3. Po rozpuszczeniu dopełnić wodą destylowaną do objętości kolbki. Roztwór przechowywać w temperaturze 0-4°C,
3. Roztwór węglanu sodu – 1%: 5 g $NaHCO_3$ cz.d.a. rozpuścić w kolbie miarowej, w 500 cm^3 wody destylowanej,
4. Roztwór kwasu trójchlorooctowego – 5%: 10 g kwasu trójchlorooctowego rozpuścić w 200 cm^3 wody destylowanej,
5. Roztwór wodorotlenku sodu – 0,5 M: naważkę analityczną NaOH rozpuścić w 200 cm^3 wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 200 cm^3,
6. Roztwór wzorcowy azokazeiny: 1 g azokazeiny rozpuścić w 1% roztworze węglanu sodu (pH = 8,3) w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3. Po rozpuszczeniu dopełnić kolbę do kreski roztworem węglanu sodu. Roztwór zawiera 10 mg azokazeiny w 1 cm^3.

Uwaga: woda destylowana użyta do odczynników i analiz musi być świeżo destylowana.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Naważkę 1 g przesianej gleby (w oryginalnej metodzie glebę podsuszano do powietrznie suchej), umieścić w probówce o pojemności 10-15 cm^3 (o średnicy 10-15 mm z dopasowanym korkiem gumowym). Dodać 0,4 cm^3 toluenu, zatkać korkiem, pozostawić na 15 minut. Następnie dodać 2 cm^3 roztworu substratu. Inkubować 24 godziny w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Na 1 godzinę przed końcem inkubacji (tzn. po upływie 23 godzin), dodać do probówki 3 cm^3 roztworu węglanu sodu. Po zakończeniu inkubacji zawartość probówki energicznie wymieszać i dodać 3,5 cm^3 roztworu kwasu trójchlorooctowego. Po ponownym zmieszaniu zawartość probówki sączyć przez sączek z bibuły średniej lub miękkiej (np.: Filtrak nr 389 lub nr 388). Pobrać 5 cm^3 przesączu i przenieść do czystej i suchej probówki. Dodać 5 cm^3 roztworu wodorotlenku sodu, zawartość energicznie wymieszać i pozostawić na 10 minut. Natężenie barwy zmierzyć w fotokolorymetrze przy długości fali 430 nm. Zero fotokolorymetru ustawić stosując rozcieńczony roztwór NaOH (5 cm^3 NaOH + 5 cm^3 wody destylowanej).

Próbki kontrolne

- Probówka z naważką piasku przemytego i jałowionego z 2 cm^3 roztworu substratu bez inkubacji,
- Probówka z naważką gleby z 2 cm^3 wody z inkubacją w łaźni wodnej,
- Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Krzywa wzorcowa

Do szeregu kolbek miarowych o pojemności 50 cm^3 w trzech równoległych powtórzeniach wprowadzić po 0, 1, 2, 5, 8, 10, 15 cm^3 roztworu wzorcowego azokazeiny. Kolbki dopełnić do objętości 50 cm^3 wodą destylowaną. Z kolbek po ich wymieszaniu pobrać po 5 cm^3 roztworów i wprowadzić do probówek w miejsce przesączu. Dalsze postępowanie jak z przesączami próbki gleby badanej.

Obliczanie wyników

Zawartość mg azokazeiny w 5 cm^3 przesączu odczytać z krzywej wzorcowej. Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$mg\ azokazeiny \cdot g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(C-S) \cdot 5 \cdot 100}{24 \cdot 1 \cdot \%\, s.m.} \qquad (6)$$

C – ilość mg w przesączu próbki kontrolnej,
S – ilość mg w przesączu próbki badanej,

5 – ilość przesączu (cm^3),
24 – czas inkubacji (h),
1 – naważka gleby (g),
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Metoda II: Ladd, Butler [30]

Sprzęt

1. Wytrząsarka w łaźni wodnej o regulowanej temperaturze,
2. Spektrofotometr,
3. Wirówka 10000-12000 $obr \cdot min^{-1}$,
4. Probówki wirówkowe o pojemności 25 cm^3.

Odczynniki

1. Bufor Tris – 50 mM, pH = 8,1: 6,06 g Tris (hydroksymetyl) aminometan rozpuścić w 700 cm^3 wody destylowanej, nastawić pH na 8,1 za pomocą roztworu 1 M HCl i całość w kolbie miarowej dopełnić wodą destylowaną do objętości 1 dm^3,
2. Roztwór substratu – 2% roztwór kazeinianu sodu w buforze Tris o pH = 8,1: 10 g kazeinianu sodu (np. Casein sodium salt firma Sigma C-8654 lub Sodu caseinate firma Roth) umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 cm^3 dodać 300 cm^3 buforu Tris i umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 50°C. Mieszając kolbą w łaźni doprowadzić do rozpuszczenia kazeinianu. Po rozpuszczeniu uzupełnić buforem do objętości 500 cm^3. Roztwór zużyć w dniu robienia, nie przechowywać,
3. Roztwór kwasu trójchlorooctowego (TCA): 30,0 g CCl_3COOH cz.d.a. rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 200 cm^3 i wodą dopełnić do objętości kolby,
4. Roztwór węglanu sodu – 2,8 N: Na_2CO_3 cz.d.a. rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 1 dm^3,.
5. Odczynnik fenolowy Folin-Ciocalteu: 167 cm^3 fabrycznego odczynnika Folina rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie miarowej o pojemności 500 cm^3 do objętości kolby. Odczynnik można przechowywać 1-3 dni w temperaturze 4°C.
6. Roztwór standardowy tyrozyny – 500 μg w 1 cm^3 : 50 mg L-tyrozyny w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3 rozpuścić w buforze Tris.

Uwaga: jak w metodzie I

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Naważkę 0,2-1 g przesianej gleby umieścić w probówce o pojemności 20 cm^3 z korkiem-zakrętką. Dodać 2,5 cm^3 roztworu substratu i 3 cm^3 buforu Tris. Probówkę zakręcić i umieścić w wytrząsarce w łaźni wodnej o temperaturze 50°C na okres 1 godziny. Po tym czasie probówkę szybko schłodzić do temperatury 20°C i dodać 2 cm^3 roztworu TCA, dobrze wymieszać i zawartość przelać do probówki wirówkowej. Wirować przy obrotach 10000-12000 $obr \cdot min^{-1}$ przez 10 minut (można zawartość probówki przesączyć przez sączek z bibuły średniej (np. Filtrak nr 389). 2 cm^3 roztworu znad osadu lub przesączu zmieszać z 3 cm^3 roztworu węglanu sodu i 1 cm^3 odczynnika Folina. Zmieszać, odstawić na 10 minut. Natężenie barwy zmierzyć w fotokolorymetrze przy długości fali 700 nm.

Próby kontrolne

1. Probówka z naważką gleby z 5,5 cm^3 buforu Tris (bez substratu) inkubacja jak wyżej,
2. Probówka z naważką piasku przemytego i jałowionego z 2,5 cm^3 roztworu substratu i 3 cm^3 buforu Tris, inkubacja jak wyżej,
3. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Krzywa wzorcowa

Do szeregu kalibrowanych probówek o pojemności 10 cm^3 (w trzech równoległych powtórzeniach) wprowadzić po 0; 0,2; 0,5; 1; 2 i 3 cm^3 standardowego roztworu tyrozyny, dopełnić buforem Tris do objętości 5 cm^3. Następnie dodać 5 cm^3 roztworu TCA. Jeśli powstanie zawiesina lub osad, zawartość probówki odwirować lub przesączyć przez sączek z bibuły średniej (np. Filtrak nr 389). Dalsze postępowanie jak z przesączem próby gleby badanej.

Obliczanie wyników

Zawartość μg tyrozyny w objętości próbki odczytać z krzywej wzorcowej. Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ tyrozyny\ g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(S - C) \cdot 100}{\%\ s.m.} \tag{7}$$

S – odczytana z krzywej wzorcowej zawartość tyrozyny w próbce badanej (μg),
C – odczytana z krzywej wzorcowej zawartość tyrozyny w próbce kontrolnej (μg),
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Dezaminaza EC 3.5.4

Podstawy oznaczenia

Roztwór 1,2-diamino 4-nitrobenzenu (1,2-DANB) ma kolor czerwony, natężenie koloru zależy od ilości związku w roztworze. Intensywność koloru zmienia się gdy od pierścienia benzenowego odłączone zostaną na drodze dezaminacji grupy aminowe. Dezaminacja 1,2-DANB w glebie ma charakter biochemiczny przy udziale enzymów dezaminaz.

Metoda: Killham, Rashid [26]

Sprzęt

1. Mieszadło rotacyjne (rotor) na probówki,
2. Probówki pojemności minimum 30 cm^3 z korkami,
3. Probówki z zaznaczoną objętością 20 cm^3,
4. Spektrofotometr lub fotokolorymetr o długość fali 405 nm,

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Roztwór substratu 1,2-DANB: 0,012 g 1,2-diamino 4-nitrobenzenu (np.: 4-Nitro-1,2-phenylendiamin firmy Merck) rozpuścić w małej ilości buforu fosforanowego o pH = 6,4 w kolbie miarowej o pojemności 200 cm^3. Po rozpuszczeniu uzupełnić tym buforem do kreski na kolbce,
3. Bufor fosforanowy 0,1 M o pH = 6,4: przepis wykonania wg Chaziev [10],
4. Metanol: alkohol metylowy cz.d.a. **TRUCIZNA.**

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Naważkę 1 g gleby przesianej umieścić w dużej probówce o pojemności minimum 30 cm^3, dodać 0,3 cm^3 toluenu i zatkać korkiem. Po pięciu minutach wprowadzić 6 cm^3 roztworu substratu. Zatkać korkiem, dokładnie wymieszać jej zawartość. Probówkę z zawartością inkubować w cieplarce w temperaturze 25-37°C (w badaniach porównawczych zawsze w tej samej temperaturze) przez 20-48 godzin. Po inkubacji do probówki dodać 10 cm^3 metanolu i zawartość mieszać intensywnie przez 10 minut w rotorze o 30 obrotach na minutę. Uzyskaną barwną zawiesinę sączyć przez sączek z bibuły twardej (np.: Filtrak nr 390) zwilżony uprzednio metanolem. Pozostałość w probówce zalać ponownie 5 cm^3 metanolu i jej zawartość przenieść na sączek. Klarowny, barwny przesącz zbierać do probówki z zaznaczoną objętością 20 cm^3. Jeśli trzeba to objętość przesączu uzupełnić do tej objętości

metanolem. Natężenie barwy przesączu mierzyć w spektrofotometrze przy długości fali 405 nm. Zero fotokolorymetru nastawić na czysty metanol.

Próbki kontrolne

- Kontrola barwy – naważka piasku przemytego i wyjałowionego, roztwór substratu bez inkubacji, metanol,
- Kontrola barwy przesączu – naważka gleby badanej, bufor fosforanowy z inkubacją, metanol.

Krzywa wzorcowa

Do szeregu probówek z zaznaczoną objętością 20 cm^3 naważyć po 1 g piasku przemytego i jałowionego. Do probówek dodać w trzech równoległych powtórzeniach odpowiednio 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 cm^3 roztworu substratu i uzupełnić do kreski metanolem. Powstałe roztwory przesączyć przez sączki bibułowe i dalsze postępowanie jak z probówkami przesączy badanej gleby.

Obliczanie wyników

Aktywność enzymu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ 1{,}2-DANB \cdot g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(C-S)\cdot 100}{24 \cdot \%\, s.m.} \tag{8}$$

C – ilość µg 1,2 – DANB z krzywej wzorcowej próbki kontrolnej,
S – ilość µg 1,2 – DANB próbki badanej,
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczenia na 1 g s.m. gleby,
24 – czas inkubacji w godzinach.

Amonifikacja argininy

Podstawy oznaczenia

Dezaminacja argininy w wyniku której powstają jony amonowe. Powstały amoniak oznacza się kolorymetrycznie reakcją Berthelota (reakcja indofenolowa) w pH alkalicznym.

Metoda: Alef, Kleiner [2]

Sprzęt

1. Spektrofotometr / fotokolorymetr długość fali 630-690 nm,
2. Wytrząsarka z uchwytami na kolbki o pojemności 100 cm^3.

Odczynniki

1. Roztwór substratu – 11,5 M: 0,2 g L-argininy (np.: L-Arginina firmy Sigma A-5006) rozpuścić w niewielkiej ilości podgrzanej wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3. Po rozpuszczeniu uzupełnić objętość kolbki do kreski świeżo wygotowaną i ochłodzoną wodą destylowaną. Odczynniki trzeba zużyć w dniu robienia.
2. Roztwór chlorku potasu – 2 M: 149 g KCl cz.d.a. rozpuścić w ciepłej wodzie destylowanej. Roztwór przelać do kolby miarowej o pojemności 1 dm^3 i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.
3. Roztwór fenolanu sodu – 0,12 M: rozpuścić 2 g $C_6H_5ONa \cdot 3H_2O$ w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3.
4. Roztwór nitroprusydku sodu – 0,17 mM: 0,05 g $Na[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1 dm^3. **TRUCIZNA,**
5. Roztwór podchlorynu sodu – 0,005 M NaOCl w 0,125 M NaOH: 5,0g NaOH rozpuścić w 100 cm^3 wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1 dm^3, po rozpuszczeniu i ostygnięciu roztworu dodać 25-30 cm^3 podchlorynu sodu o zawartości minimum 15% chloru. Uzupełnić objętość kolby do kreski wodą destylowaną. Odczynnik trwały około 4 dni.
6. Roztwór wzorcowy podstawowy 1000 μg $N\text{-}NH^+_4$ w 1 cm^3: 3,8207 g NH_4Cl cz.d.a. rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie o pojemności 1 dm^3. Roztwór przechowywać w chłodni w temperaturze 4°C.
7. Roztwór wzorcowy roboczy 10 μg $N\text{-}NH^+_4$ w 1 cm^3: pobrać 10 cm^3 roztworu wzorcowego podstawowego i rozcieńczyć w kolbie miarowej wodą destylowaną do objętości 1 dm^3.

Uwaga: woda destylowana używana do odczynników i analiz musi być świeżo destylowana lub wygotowana i schłodzona.

Postępowanie w oznaczeniu

Badaną glebę przesiać przez sito o oczkach średnicy 2-3,5 mm. Oznaczyć jej wilgotność. Do kolbki stożkowej o pojemności 100 cm^3 wsypać 5 g przesianej gleby. Do kolbki dodać 2 cm^3 roztworu substratu, zatkać kolbkę korkiem z waty i inkubować w cieplarce o temperaturze np. 30°C (zawsze tej samej w badaniach porównawczych) przez 3-5 godzin. Po inkubacji do kolbki dodać 18 cm^3 roztworu wymywającego (roztwór chlorku potasu). Zawartość kolbki energicznie wymieszać, a następnie wstawić na wytrząsarkę i mieszać przez 30-40 minut. Uzyskaną zawiesinę przenieść wraz z glebą na sączek z bibuły twardej (np. Filtrak nr 390) przemyty uprzednio roztworem wymywającym. Klarowny przesącz zbierać do dużej probówki

z zaznaczoną objętością 20 cm^3. Jeśli trzeba, przesącz uzupełnić do tej objętości roztworem wymywającym. Z 20 cm^3 klarownego przesączu pobrać 1 cm^3 i umieścić w probówce o pojemności 10 cm^3 z kalibracją co 1cm^3. Dodać następnie: 5 cm^3 roztworu wymywającego, 2 cm^3 roztworu fenolanu, oraz 1 cm^3 roztworu nitroprusydku. Zawartość probówki energicznie wymieszać, a następnie dodać 1 cm^3 roztworu podchlorynu. Zawartość probówki ponownie wymieszać i pozostawić w ciemności, w temperaturze pokojowej na okres 30 minut. Po tym czasie zmierzyć natężenie barwy roztworu w fotokolorymetrze przy długości fali 630 nm. Zero fotokolorymetru nastawić na próbkę, w której w miejsce 1 cm^3 przesączu wprowadzono 1 cm^3 roztworu wymywającego.

Próbki kontrolne

1. Kolbka z naważką gleby z dodatkiem 2 cm^3 wody destylowanej w miejsce roztworu substratu, inkubacja jak wyżej,
2. Kolbka z naważką piasku przemytego i jałowionego z dodatkiem 2 cm^3 roztworu substratu, inkubacja jak wyżej,
3. Dalsze postępowanie jak z próbką badaną.

Krzywa wzorcowa

Do szeregu probówek o pojemności 10 cm^3 (w trzech powtórzeniach) wprowadzić po 0; 0,5; 1; 2; 3 i 5 cm^3 roztworu wzorcowego roboczego i uzupełnić roztworem wymywającym do objętości 10cm^3. Zawartość probówek dokładnie wymieszać. Roztwory w probówkach zawierają odpowiednio 0, 0,5; 1, 2, 3, 5 μg $N\text{-}NH^+_4$ w 1 cm^3. Dalsze postępowanie jak z przesączem próbki gleby badanej.

Obliczanie wyników

Zawartość μg N w 1 cm^3 przesączu odczytać z krzywej wzorcowej. Aktywność procesu obliczyć według wzoru:

$$\mu g\ N \cdot g^{-1} s.m. \cdot h^{-1} = \frac{(S - C) \cdot 20 \cdot 100}{3 \cdot \%\, s.m.} \tag{9}$$

S – ilość μg N w 1 cm^3 próbki badanej,
C – ilość μg N w 1 cm^3 próbki kontrolnej,
20 – objętość przesączu (cm^3),
3 – czas inkubacji (h),
5 – naważka próbki gleby,
$100 \cdot \%^{-1}$ s.m. – współczynnik przeliczenia na 1 g s.m. gleby.

Uwagi do metody

Autor tego opracowania uważa, że przed dodaniem roztworu substratu do naważki próbki gleby w kolbce, należy poddać ją wstępnej inkubacji przez 2 godzin w temperaturze, w jakiej będzie przeprowadzona inkubacja właściwa, Ta wstępna inkubacja skraca znacznie czas inkubacji właściwej.

PIŚMIENNICTWO

1. **Abdelmagid H.M., Tabatabai M.A.:** Nitrate reductase activity of soils. Soil Biol. Biochem., 19, 421-427, 1987.
2. **Alef K., Kleiner D.:** Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. Soil Biol. Biochem., 18, 233-235, 1986.
3. **Badalucco L., Kuikman P.J., Nannipieri P.:** Protease and deaminase activities in wheat rhizosphere and their relation to bacterial and protozoan populations. Biol. Fertil. Soils, 23, 99-104, 1996.
4. **Barabasz W.:** Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. I. Biogeochemia azotu glebowego. Post. Mikrobiol., 30(4), 395-410, 1991.
5. **Barabasz W.:** Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. II. Biotransformacja azotu glebo-wego. Post. Mikrobiol., 31 (1), 3-33, 1992.
6. **Bremner J.M.:** Nitrogenous compounds. [w] A.D. McLaren, G.H. Peterson (eds.) Soil biochemistry, vol.1, 19-66, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1967.
7. **Bremner J.M., Mulvaney R. L.:** Urease activity in soils, p. 149-196. [w] R. G. Burns (ed.). Soil enzymes. Academic Press, London, 1978.
8. **Burket J.Z., Dick R.P.:** Microbial and soil parameters in relation to N mineralization in soils of diverse genesis under differing management systems. Biol. Fertil. Soils, 27, 430-438, 1998.
9. **Burns R.G.:** Enzyme activity in soil; theoretical and practical considerations. [w] Burgs R.G. (ed) Soil enzymes, 295-340, Academic Press, London, New York, 1978.
10. **Chaziev F.Ch.:** Fermentativnaja aktivnost poczv. Izd. Nauka, Moskva 1976.
11. **Chaziev F.Ch.:** Sistemno-ekologičeskij analiz fermentativnoi aktivnosti poczv. Izd. Nauka, Moskva, 1982.
12. **Chaziev F.Ch., Gul'ko A.E.:** Fermentativnaja aktvnost' poczv agrocenozov i perspektivy ee izuczenija. Poczvoved., (8), 88-103, 1991.
13. **Deng S.P., Tabatabai M.A.:** Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. I. Amidohydrolases. Biol. Fertil. Soils, 22, 202-207.
14. **Dilly O., Munch J.C.:** Microbial biomass and activities in partly hydromorphic agricultural and forest soils in the Bornhöved Lake region of Northern Germany. Biol. Fertil. Soils, 19, 343-347, 1996.
15. **Frankenberger W.T., Johanson J. B.:** L-histidine ammonia-lyase activity in soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 46, 943-948, 1981.
16. **Frankenberger W.T., Tabatabai M.A.:** Amidase activity in soils. I. Method of assay. Soil Sci. Soc. Am. J., 44, 282-287, 1980.
17. **Frankenberger W.T., Tabataba M.A.:** L-Asparaginase activity of soils. Biol. Fertil. Soils, 11, 6-12, 1991.
18. **Frankenberger W.T., Tabatabai M.A.:** L-Glutaminase activity of soils. Soil Biol. Biochem., 23, 869-875, 1991.

19. **Grabińska-Łoniewska A.** (red.) Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologi ogólnej. Oficyna Wydawnicza Politchniki Warszawskiej, Warszawa, 1996.
20. **Gianfreda L., Bollag J.M.:** Influence of natural and antrophogenic factors on enzyme activity in soil. [w] G.Stotzky, J.M. Bollag (eds.) Soil biochemistry, vol. 9, 123-193, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1996.
21. **Hayano K.:** Protease activity in a paddy field soil: origin and some properties. Soil Sci. Plant Nutr., 39, 539-546, 1993.
22. **Hoffman G., Teicher K.:** Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. Zeit. Pflanzenernaehr. Dung. Bodenkunde, 95, 55-63, 1961.
23. **Kanazawa S., Kiyota H.:** Estimation of L-glutaminase and L-asparginase activities in soils by the indophenol method. Soil Sci. Plant Nutr., 41, 305-311, 1995.
24. **Kandeler E., Gerber H.:** Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biol. Fertil. Soils, 6, 68-72,1988.
25. **Kaszubiak H., Durska G.:** Arginine ammonification rate compared with bacteria biomass concentration. Pol. J. Soil Sci., 25, 165-170, 1992.
26. **Killham K., Rashid M.A.:** Assay of activity of a soil deaminase. Plant Soil, 92, 15-21, 1986.
27. **Kobus J.:** Rola mikroorganizmów w przemianach azotu w glebie. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., 440, 151-173, 1996.
28. **Kucharski J.:** Relacje między aktywnością enzymów a żyznością gleby. [w] W. Barabasz (red.) Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie. 327-347., Akademia Rolnicza Kraków, 1997.
29. **Kudejarov V.N.:** Cikl azota v poczve i effektivnost' udobrenij. Izd. Nauka, Moskwa, 1989.
30. **Ladd J.N., Butler J.H.A.:** Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrate. Soil Biol. Biochem., 4, 19-30, 1972.
31. **Ladd J.N., Jackson R.B.:** Biochemistry of ammonification [w] F.J. Stevenson (ed.) Nitrogen in agricultural soils. 173-228, Am. Soc. Agron., Madison, 1982.
32. **Loll M.J., Bollag J.M.:** Protein transformation in soil. Adv. Agron., 36, 351-383, 1983.
33. **Łoginow W., Spychaj-Fabisiak E.:** Chemiczne przemiany związków azotu w glebie. Post. Nauk Roln., 32, 3-15, 1985.
34. **Macura J., Vagnerova K.:** Kolorimetrická metoda stanoveni aktivity proteolityckych enzymu v pude. Rosl. Vyroba, 15, 173-180, 1969.
35. **Martin-Smith M.:** Uricolytic enzymes in soil. Nature, 197, 361-362, 1963.
36. **Mazur T. (red.):** Azot w glebach uprawnych. PWN, Warszawa 1991.
37. **Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P.:** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. [w] R.J. Burns, R.P. Dick (eds.) Enzymes in the environment. Activity, ecology and applications. 1-33., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2002.
38. **Nowotny F., Samotus B.:** Biochemia ogólna. PWRiL, Warszawa, 1965.
39. **Omura H., Sato F., Hayano K.:** A method for estimation of L-glutaminase activity in soils. Soil Sci. Plant Nutr., 29, 295-303, 1983.
40. **Parham J.A., Deng S.P.:** Detection, quantification and characterization of β-glucosaminidase activity in soil. Soil Biol. Biochem., 32, 1183-1190, 2000.
41. **Paul E.A., Clark F.E.:** Mikrobiologia i biochemia gleb. Tłumaczenie, Wyd. Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2000.
42. **Roberge M. R.:** Methodology of soil enzyme measurement and extraction,. In R. G. Burns (ed.), Soil enzymes. 341-370, Academic Press, London, 1978.

43. **Sato F., Omura H., Hayano K..:** Adenosine deaminase activity in soils. Soil Sci. Plant Nutr., 32,107-112, 1986.
44. **Senwo Z. N., Tabatabai M.A**. Aspartase activity of soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 60, 1416-1422, 1996.
45. **Suttner T., Alef K.:** Correlation between the arginine ammonification, enzyme activities, microbial biomass, physical and chemical properties of different soils. Zentralbl. Mikrobial., 143, 569-573, 1988.
46. **Tabatabai M.A., Bremner J.M.:** Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem., 4, 479-487, 1972.
47. **Tena M., Pinilla J.A., Magallones M.:** L-phenylalanine deaminating activity in soil. Soil Biol. Biochem., 18, 321-325, 1986.
48. **Trojanowski J.:** Przemiany substancji organicznych w glebie. PWRiL, Warszawa, 1973.
49. **Watanabe K., Hayano K.:** Source of soil protease in paddy fields. Can. J. Microbiol., 39, 1035-1040, 1993.
50. **Zantua M.I., Bremner J. M.:** Comparison of methods of assaying urease activity in soils. Soil Biol. Biochem., 7, 291-295, 1975.

ENZYMES TAKING PART IN ORGANIC NITROGEN MINERALIZATION

Andrzej I. Wyczółkowski, Małgorzata Dąbek-Szreniawska

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Science, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27
e-mail: a.wyczolkowski@demeter.ipan.lublin.pl

Abstract. Stages of organic nitrogen mineralization in the soil environment: proteolysis, ammonification, nitrification. Enzymes taking part in these processes. Basis of determining the activity of enzymes in soil. Proposed methods for determination of the activity of selected enzymes in soil.

Keywords: soil, organic nitrogen mineralization, methods of determination of the activity of enzymes