

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4549—2025

微生物肥料酶活效应测定方法

Detection methods for the enzyme activity effect of microbial fertilizer

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由农业农村部肥料标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量检验测试中心、农业农村部微生物产品质量安全风险评估实验室(北京)。

本文件主要起草人：马鸣超、姜昕、李俊、曹凤明、关大伟、李力、毛聪琳、贾聪、杨小红、陈慧君、朱玲玲、刘孝颖。



微生物肥料酶活效应测定方法

1 范围

本文件规定了微生物肥料酶活效应测定的原理、试剂和溶液、仪器设备、样品采集与试样制备、测试方法、结果计算及精密度要求。

本文件适用于施用微生物肥料的土壤常见酶活力测定,施用其他肥料的土壤可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 35538—2017 工业用酶制剂测定技术导则

NY/T 1113—2006 微生物肥料术语

NY/T 1121.1 土壤检测 第1部分:土壤样品的采集、处理和贮存

3 术语和定义

NY/T 1113—2006 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物肥料 microbial fertilizer

含有特定微生物活体应用于农业生产的制品,通过其中所含微生物的生命活动,增加植物养分的供应量或促进植物生长,增强抗逆性,提高产量,改善农产品品质及农业生态环境。

[来源:NY/T 1113—2006,2.1,有修改]

注:包含农用微生物菌剂、复合微生物肥料和生物有机肥三大类产品。

3.2

微生物肥料酶活效应 enzyme activity effect of microbial fertilizer

施用微生物肥料引起土壤酶活力变化的效果。

3.3

酶活力 enzyme activity

酶在一定条件下催化某一特定反应的能力。

[来源:GB/T 35538—2017,3.2]

3.4

脲酶 urease

将尿素(脲)分解为氨和二氧化碳或碳酸铵的酶。

3.5

过氧化氢酶 catalase

将过氧化氢催化分解成氧和水的酶。

3.6

蔗糖酶 sucrase

将蔗糖水解成为果糖和葡萄糖的酶。

3.7

纤维素酶 cellulase

将纤维素分解成寡糖或单糖的酶。

3.8

硝酸盐还原酶 nitrate reductase

将硝酸盐还原成亚硝酸盐的一种含钼的酶。

3.9

蛋白酶 protease

催化蛋白质水解成肽并进一步水解成氨基酸的酶。

3.10

磷酸酶 phosphatase

水解底物实现去磷酸化的酶。

3.11

几丁质酶 chitinase

催化几丁质水解生成 *N*-乙酰葡萄糖胺反应的酶。

4 试验方法

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行,避免阳光直射,具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中,操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

4.1 土壤脲酶活力的测定(苯酚钠-次氯酸钠比色法)

4.1.1 原理

本方法以尿素为底物,根据酶促产物氨与苯酚-次氯酸钠作用生成蓝色的靛酚,通过比色测定,表征脲酶活力。在 37 ℃、pH 6.7 条件下,24 h 水解尿素产生 1 mg NH₃-N 的酶量为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.1.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.1.2.1 甲苯(C₇H₈)。

4.1.2.2 尿素溶液(10%)：称取 10.0 g 尿素(CH₄N₂O),用水溶解并定容至 100 mL。

4.1.2.3 柠檬酸盐缓冲液(pH=6.7)：称取 184.0 g 柠檬酸(C₆H₈O₇)和 147.5 g 氢氧化钾(KOH)分别溶于水中,然后将两溶液混合,用 10% 氢氧化钠溶液将 pH 调至 6.7,用水稀释并定容至 1 000 mL。

4.1.2.4 苯酚钠溶液(1.35 mol/L)：称取 62.5 g 苯酚(C₆H₅OH)溶于少量无水乙醇中,加入 2.0 mL 甲醇和 18.5 mL 丙酮,用乙醇定容至 100 mL,此为 A 液,冰箱冷藏保存；称取 27.0 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至 100 mL,此为 B 液,冰箱冷藏保存；使用时,将 A 液、B 液各取 20.0 mL 混合,用水定容至 100 mL。

4.1.2.5 次氯酸钠溶液(有效氯 0.9%)：量取有效氯浓度 10%次氯酸钠(NaClO)溶液 9 mL,用水定容至 100 mL。

4.1.2.6 氮标准溶液(100 μg/mL)：称取 0.471 7 g 经干燥保存的硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]，用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.1.2.7 氮标准工作溶液(10 μg/mL)：吸取 10.0 mL 氮标准溶液(4.1.2.6)定容至 100 mL。

4.1.3 仪器设备

4.1.3.1 电子天平：感量 0.000 1 g 和感量 0.1 g。

4.1.3.2 试验筛：孔径 1 mm。

4.1.3.3 酸度计:精确至 0.01。

4.1.3.4 紫外可见分光光度计。

4.1.3.5 恒温培养箱:(37±1)℃。

4.1.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 1 mm 孔径试验筛。

4.1.5 试验步骤

4.1.5.1 标准曲线绘制

分别取 0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 氮标准工作溶液(4.1.2.7),移至 50 mL 容量瓶中,然后加水至 20 mL,再加入 4.0 mL 苯酚钠溶液(4.1.2.4)和 3 mL 次氯酸钠溶液(4.1.2.5),边加入边摇匀,显色 20 min,用水定容至 50 mL,配成浓度为 0 μg/mL、0.4 μg/mL、0.8 μg/mL、1.2 μg/mL、1.6 μg/mL、2.0 μg/mL 的氮系列标准溶液。1 h 内,以 0 μg/mL 氮标准溶液为空白调零,于 578 nm 波长处测定氮系列标准溶液吸光度。然后以吸光度为横坐标、氮系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.1.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 5 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 具塞锥形瓶中,并加入 1.0 mL 甲苯(4.1.2.1),振荡均匀,静置 15 min 后,加入 10.0 mL 尿素溶液(4.1.2.2)和 20.0 mL 柠檬酸盐缓冲液(4.1.2.3),摇匀后置入 37℃ 恒温培养箱内反应 24 h。反应结束后用定性滤纸过滤,取 1.0 mL 滤液加入 50 mL 容量瓶中,再加 4.0 mL 苯酚钠溶液(4.1.2.4)和 3 mL 次氯酸钠溶液(4.1.2.5),边加入边摇匀。显色 20 min,用水定容至 50 mL。1 h 内,以 0 μg/mL 氮标准溶液为空白调零,于 578 nm 波长处测定其吸光度。如果样品吸光度超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.1.5.3 无尿素空白试验

每个样品应做无尿素空白试验,即不加尿素溶液,以等体积的水代替,其他操作同 4.1.5.2。

4.1.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,不加土壤试样,其他操作同 4.1.5.2。

4.1.6 结果计算

土壤脲酶活力按公式(1)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2 - c_3) \times V \times D \times 24}{m \times t \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——土壤脲酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);
- c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_2 ——无尿素空白吸光度由标准曲线求得 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_3 ——无土空白吸光度由标准曲线求得 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- D ——分取倍数,恒温培养反应液体积/吸取滤液体积;
- 24 ——时间换算系数;
- m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);
- t ——反应时间的数值,单位为小时(h);
- 1 000 ——质量换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.1.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这

2个测定值的算术平均值的20%的情况不超过5%为前提。

4.2 土壤过氧化氢酶活力的测定(高锰酸钾滴定法)

4.2.1 原理

以高锰酸钾滴定酶促反应前后的过氧化氢,以消耗的高锰酸钾的量来表征酶的活力。在4℃条件下,1 h内消耗1 mL 0.02 mol/L KMnO_4 的酶量为一个酶活力单位,单位以U表示。

4.2.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合GB/T 6682中三级水的规定。

4.2.2.1 甲苯(C_7H_8)。

4.2.2.2 硫酸溶液(0.2 mol/L):量取5.43 mL的浓硫酸(H_2SO_4 , 98%),缓缓加入约200 mL水中混匀,待冷却后用水定容至500 mL,置于4℃冰箱储存。

4.2.2.3 高锰酸钾溶液(0.02 mol/L):称取1.58 g高锰酸钾(KMnO_4),用水溶解,缓缓煮沸15 min,冷却,用水定容至500 mL,避光保存,使用前标定。

4.2.2.4 过氧化氢溶液(3%):量取50.0 mL 30%过氧化氢(H_2O_2)溶液,用水定容至500 mL,置于4℃冰箱储存。

4.2.3 仪器设备

4.2.3.1 电子天平:感量0.001 g和感量0.01 g。

4.2.3.2 试验筛:孔径1 mm。

4.2.3.3 冰箱:(4±1)℃。

4.2.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照NY/T 1121.1的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过1 mm孔径试验筛。

4.2.5 试验步骤

4.2.5.1 高锰酸钾溶液(0.02 mol/L)的标定

使用前,按照GB/T 601的规定进行标定。

4.2.5.2 样品测定

称取风干土壤试样5 g(精确至0.001 g),放入100 mL小口锥形瓶中,加入1.0 mL甲苯(4.2.2.1),摇匀,置于4℃冰箱30 min。取出后立刻加入25.0 mL冰箱储存的过氧化氢溶液(4.2.2.4),充分混匀后,再置于冰箱中1 h。取出后立即加入25.0 mL冰箱储存的硫酸溶液(4.2.2.2),摇匀后用定性滤纸过滤。取1.0 mL滤液于锥形瓶中,加入5.0 mL水和5.0 mL硫酸溶液(4.2.2.2),用高锰酸钾溶液(4.2.2.3)滴定至淡粉红色终点。

4.2.5.3 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,即不加土壤试样,其他操作同4.2.5.2。

4.2.5.4 结果计算

土壤过氧化氢酶活力按公式(2)计算。

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \times D \times c_1}{m \times c_2 \times t} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——土壤过氧化氢酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);

V_1 ——土壤样品消耗高锰酸钾溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 ——无土空白消耗高锰酸钾溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

D ——分取倍数,容量瓶中反应液体积/吸取滤液体积;

c_1 ——高锰酸钾溶液标定浓度的数值,单位为摩尔每升(mol/L);

m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);

c_2 ——高锰酸钾溶液理论浓度,值为 0.02 mol/L;

t ——反应时间,单位为小时(h)。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.2.6 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

4.3 土壤蔗糖酶活力的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)

4.3.1 原理

蔗糖酶水解蔗糖所生成的葡萄糖与 3,5-二硝基水杨酸反应而生成橙色的 3-氨基-5-硝基水杨酸,其颜色深浅与葡萄糖含量相关,因而可用测定葡萄糖含量来表示蔗糖酶的活性。在 37℃、pH 5.5 条件下,24 h 生成 1 mg 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.3.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.3.2.1 甲苯(C_7H_8)。

4.3.2.2 蔗糖溶液(8%):称取蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)80.0 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.3.2.3 磷酸氢二钠溶液:称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)1.188 g,用水溶解并定容至 100 mL。

4.3.2.4 磷酸二氢钾溶液:称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)9.078 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.3.2.5 磷酸盐缓冲液(pH 5.5):吸取 0.5 mL 磷酸氢二钠溶液(4.3.2.3),加入 9.5 mL 磷酸二氢钾溶液(4.3.2.4),混合均匀。

4.3.2.6 葡萄糖溶液(1 000 μ g/mL):称取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)80℃干燥至恒重的葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)于烧杯中,用水溶解后,定容至 100 mL,摇匀后于 4℃冰箱中保存,保存期 7 d。若该溶液出现混浊或絮状物,应重新配制。

4.3.2.7 氢氧化钠溶液(2 mol/L):称取 8.0 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至 100 mL。

4.3.2.8 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂):称取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸($C_7H_4N_2O_7$)于 500 mL 烧杯中,用少量水溶解后,加入 262 mL 氢氧化钠溶液(4.3.2.7),再将其倒入 500 mL 含有 185.0 g 酒石酸钾钠($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)的热水溶液中,然后加 5.0 g 结晶苯酚(C_6H_5OH)、5.0 g 无水亚硫酸钠(Na_2SO_3),搅拌至完全溶解,冷却后移入 1 000 mL 容量瓶中定容,储存于棕色瓶中,室温放置 7 d 后使用,有效期 6 个月。

4.3.3 仪器设备

4.3.3.1 电子天平:感量 0.000 1 g、感量 0.001 g 和感量 0.01 g。

4.3.3.2 试验筛:孔径 1 mm。

4.3.3.3 酸度计:精确至 0.01。

4.3.3.4 紫外可见分光光度计。

4.3.3.5 恒温培养箱:(37±1)℃。

4.3.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 1 mm 孔径试验筛。

4.3.5 试验步骤

4.3.5.1 标准曲线绘制

分别吸 1 000 μ g/mL 的葡萄糖溶液(4.3.2.6)0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 于 20 mL 具塞刻度管中,再补加蒸馏水至 1.0 mL,加 3.0 mL DNS 试剂(4.3.2.8)混匀,于沸水浴中准确反应 5 min(从水重新沸腾时算起),取出立即冷水浴冷却至室温后,用水定容至 20 mL,配成浓度为

0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、15.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖系列标准溶液。以 0 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖标准溶液为空白调零,在波长 540 nm 处测定葡萄糖系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标、以葡萄糖系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.3.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 5 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 锥形瓶中,加入 15.0 mL 蔗糖溶液(4.3.2.2)、5.0 mL 磷酸盐缓冲液(4.3.2.5)和 1.0 mL 甲苯(4.3.2.1),摇匀放入恒温培养箱中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。取出后迅速过滤,吸取滤液 1.0 mL,加入 20 mL 具塞刻度管中,加入 3.0 mL DNS 试剂(4.3.2.8),于沸水浴中准确显色反应 5 min(从水重新沸腾时算起),取出后在水浴中迅速冷却至室温,用水定容至 20 mL。以 0 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖标准溶液为空白调零,于 540 nm 处测定其吸光度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.3.5.3 无蔗糖空白试验

每个样品应做无蔗糖空白试验,即不加蔗糖溶液,以等体积的水替代,其他操作同 4.3.5.2。

4.3.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,即不加土壤试样,其他操作同 4.3.5.2。

4.3.6 结果计算

土壤蔗糖酶活力按公式(3)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2 - c_3) \times V \times D \times 24}{m \times t \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X ——土壤蔗糖酶活力的数值,单位酶活力单位每克(U/g);
- c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_2 ——无蔗糖空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_3 ——无土空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- D ——分取倍数,恒温培养反应液体积/吸取滤液体积;
- 24 ——时间换算系数;
- m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);
- t ——反应时间的数值,单位为小时(h);
- 1 000 ——质量换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.3.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

4.4 土壤纤维素酶活力的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)

4.4.1 原理

纤维素分解所生成的葡萄糖与 3,5-二硝基水杨酸反应而生成橙色的 3-氨基-5-硝基水杨酸,颜色深浅与葡萄糖量成正比,用测定葡萄糖量来表示纤维素酶的活力。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5 条件下,72 h 生成 1 mg 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.4.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.4.2.1 甲苯(C_7H_8)。

4.4.2.2 醋酸溶液(0.2 mol/L):吸取 11.55 mL 冰醋酸(CH_3COOH ,95%),用水定容至 1 000 mL。

4.4.2.3 醋酸钠溶液(0.2 mol/L):称取 16.4 g 无水醋酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$)或 27.22 g 三水合醋酸钠

($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$),用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.4.2.4 醋酸盐缓冲液(pH 5.5):吸取 11.0 mL 醋酸溶液(4.4.2.2)和 88.0 mL 醋酸钠溶液(4.4.2.3),混匀后使用。

4.4.2.5 羧甲基纤维素溶液(0.5%):称取 0.5 g 羧甲基纤维素钠($C_8H_{11}O_5Na$),加入适量的醋酸盐缓冲液(4.4.2.4),加热溶解后移入 100 mL 容量瓶中,用醋酸盐缓冲液(4.4.2.4)定容至 100 mL。

4.4.2.6 氢氧化钠溶液(2 mol/L):称取 8.0 g 氢氧化钠($NaOH$),用水溶解并定容至 100 mL。

4.4.2.7 3,5-二硝基水杨酸溶液(DNS 试剂):称取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸($C_7H_4N_2O_7$)于 500 mL 烧杯中,用少量水溶解后,加入 262 mL 氢氧化钠溶液(4.4.2.6),再将其倒入 500 mL 含有 185.0 g 酒石酸钾钠($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)的热水中,然后加 5.0 g 结晶苯酚(C_6H_5OH)、5.0 g 无水亚硫酸钠(Na_2SO_3),搅拌均匀至溶解,冷却后移入 1 000 mL 容量瓶中定容,储存于棕色瓶中,室温放置 7 d 后使用,有效期 6 个月。

4.4.2.8 葡萄糖溶液(1 000 $\mu g/mL$):称取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)80 $^{\circ}C$ 干燥至恒重的葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)于烧杯中,用水溶解后,移至 100 mL 容量瓶中,定容,摇匀后于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中保存,保存期 7 d。若该溶液出现混浊或絮状物,应重新配制。

4.4.3 仪器设备

4.4.3.1 电子天平:感量 0.000 1 g、感量 0.01 g 和感量 0.1 g。

4.4.3.2 试验筛:孔径 1 mm。

4.4.3.3 酸度计:精确至 0.01。

4.4.3.4 紫外可见分光光度计。

4.4.3.5 恒温培养箱:(37 ± 1) $^{\circ}C$ 。

4.4.3.6 离心机。

4.4.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 1 mm 孔径试验筛。

4.4.5 试验步骤

4.4.5.1 标准曲线绘制

分别吸 1 000 $\mu g/mL$ 的葡萄糖溶液(4.4.2.8)0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 于 20 mL 具塞刻度管中,再补加蒸馏水至 1.0 mL,加 3.0 mL DNS 试剂(4.4.2.7)混匀,于沸水浴中准确反应 5 min(从水重新沸腾时算起),取出立即冷水浴冷却至室温后,用水定容至 20 mL,配成浓度为 0 $\mu g/mL$ 、5.0 $\mu g/mL$ 、10.0 $\mu g/mL$ 、15.0 $\mu g/mL$ 、20.0 $\mu g/mL$ 、25.0 $\mu g/mL$ 葡萄糖系列标准溶液。以 0 $\mu g/mL$ 葡萄糖标准溶液为空白调零,于波长 540 nm 处测定葡萄糖系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标,以葡萄糖系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.4.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 5 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 具棉塞锥形瓶中,加入 1.0 mL 甲苯(4.4.2.1),摇匀后放置 15 min,再加 5.0 mL 羧甲基纤维素溶液(4.4.2.5)和 5.0 mL 醋酸盐缓冲液(4.4.2.4),将锥形瓶放在 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱中培养 72 h。培养结束后,8 000 r/min 离心 5 min,取 1.0 mL 上清液,加入 20 mL 具塞刻度管中,加 3.0 mL DNS 溶液(4.4.2.7)混匀,于沸水浴中加热显色 5 min(从水重新沸腾时算起),取出立即冷水浴冷却至室温,用水定容至 20 mL。以 0 $\mu g/mL$ 葡萄糖标准溶液为空白调零,于波长 540 nm 处测定其吸光度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.4.5.3 无羧甲基纤维素空白试验

每个样品应做无羧甲基纤维素空白试验,即不加羧甲基纤维素溶液,以等体积的水替代,其他操作同 4.4.5.2。

4.4.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,即不加土壤试样,其他操作同 4.4.5.2。

4.4.6 结果计算

土壤纤维素酶活力按公式(4)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2 - c_3) \times V \times D \times 72}{m \times t \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

X ——土壤纤维素酶活力的数值,单位酶活力单位每克(U/g);

c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_2 ——无羧甲基纤维素空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_3 ——无土空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);

D ——分取倍数,恒温培养反应液体积/吸取滤液体积;

72——时间换算系数;

m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);

t ——反应时间的数值,单位为小时(h);

1 000 ——质量换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.4.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

4.5 土壤硝酸盐还原酶活力的测定(酚二磺酸比色法)

4.5.1 原理

硝酸盐在硝酸还原酶、亚硝酸还原酶和羟氨还原酶的催化作用下转化成氨,反应前后硝态氮含量的变化反应土壤硝酸盐还原酶的活性,硝态氮的变化可用酚二磺酸比色法测定。在 37 °C 条件下,反应 24 h 后硝态氮浓度差值为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.5.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.5.2.1 硝酸钾溶液(10 mg/mL):称取 1.0 g 硝酸钾(KNO_3),用水溶解并定容至 100 mL。

4.5.2.2 葡萄糖溶液(10 mg/mL):称取 1.0 g(精确至 0.000 1 g)80 °C 干燥至恒重的葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)于烧杯中,用水溶解并定容至 100 mL,摇匀后于 4 °C 冰箱中保存,保存期 7 d。若该溶液出现混浊或絮状物,应重新配制。

4.5.2.3 碳酸钙(CaCO_3)。

4.5.2.4 铝钾矾 [$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$]饱和溶液:称取过量铝钾矾试剂,加入 100 mL 水中,剧烈振荡,静置 15 min,容器中可明显观察到铝钾矾析出物,取上清液即为饱和铝钾矾溶液。

4.5.2.5 酚二磺酸溶液:称取 3.0 g 重蒸酚($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)与 20.1 mL 浓硫酸(H_2SO_4 , 98%)混合,在沸水浴中加热回流 6 h。使用前如析出结晶,须重新加热溶解。试剂必须储于密闭的玻璃棕色瓶中,严防吸湿。

4.5.2.6 氢氧化钠溶液(200 mg/mL):称取 20.0 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至 100 mL。

4.5.2.7 硝酸钾标准溶液 [$c(\text{NO}_3^-) = 100 \mu\text{g/mL}$]:称取 0.163 1 g 硝酸钾(KNO_3),用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.5.3 仪器设备

4.5.3.1 电子天平:感量 0.000 1 g 和感量 0.1 g。

4.5.3.2 试验筛:孔径 1 mm。

4.5.3.3 紫外可见分光光度计。

4.5.3.4 恒温培养箱:(37±1)℃。

4.5.3.5 真空泵。

4.5.3.6 厌氧培养瓶或具塞三角瓶:100 mL。

4.5.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 1 mm 孔径试验筛。

4.5.5 试验步骤

4.5.5.1 标准曲线绘制

吸取 50.0 mL 硝酸钾标准溶液(4.5.2.7)于 100 mL 烧杯中,在沸水浴上蒸干,残渣加入 2.0 mL 酚二磺酸溶液(4.5.2.5)反应 10 min,转移至容量瓶中,加水定容至 500 mL。从中分别吸取 0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,用 200 mg/mL 氢氧化钠溶液(4.5.2.6)调至微黄色(pH 呈碱性),用水定容至 50 mL,配成浓度为 0 μg/mL、0.4 μg/mL、0.8 μg/mL、1.2 μg/mL、1.6 μg/mL、2.0 μg/mL 硝酸钾系列标准溶液。以 0 μg/mL 硝酸钾标准溶液为空白调零,于波长 410 nm 处测定硝酸钾系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标,以硝酸钾系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.5.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 1 g(精确至 0.001 g),置于 100 mL 厌氧培养瓶或可抽真空具塞三角瓶中,加入 20 mg 碳酸钙(4.5.2.3)和 1.0 mL 硝酸钾溶液(4.5.2.1),混匀后加入 1.0 mL 葡萄糖溶液(4.5.2.2),盖紧瓶塞,轻摇,与真空泵连接,抽气 3 min,置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。培养结束后,加入 50 mL 水和 1.0 mL 铝钾矾饱和溶液(4.5.2.4)混匀,静置 20 min,过滤。取 20.0 mL 滤液于 50 mL 烧杯中,在沸水浴上蒸干,残渣加入 1.0 mL 酚二磺酸溶液(4.5.2.5)反应 10 min,再加入 15 mL 水,转置容量瓶中,用 200 mg/mL 氢氧化钠溶液(4.5.2.6)调至微黄色(pH 呈碱性),用水定容至 50 mL。以 0 μg/mL 硝酸钾标准溶液为空白调零,于波长 410 nm 处测定其吸光度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.5.5.3 无硝酸钾空白试验

每个样品应做无硝酸钾空白试验,即不加硝酸钾溶液,以同体积的水代替,其他操作同 4.5.5.2。

4.5.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,即不加土壤试样,其他操作同 4.5.5.2。

4.5.6 结果计算

土壤硝酸盐还原酶活力按公式(5)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2 - c_3) \times V \times D \times 24}{m \times t \times 1\,000} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- X ——土壤硝酸盐还原酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);
- c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得硝态氮浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);
- c_2 ——无硝酸钾空白吸光度由标准曲线求得硝态氮浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);
- c_3 ——无土空白吸光度由标准曲线求得硝态氮浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- D ——分取倍数,过滤前反应液体积/吸取滤液体积;
- 24 ——时间换算系数;
- m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);
- t ——反应时间的数值,单位为小时(h);

1 000 ——质量换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.5.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

4.6 土壤蛋白酶活力的测定(福林法)

4.6.1 原理

蛋白酶水解酪蛋白底物产生含有酚基的氨基酸,在碱性条件下,将福林(Folin)还原,生成钼蓝与钨蓝,其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比,用酶解产生的酚基氨基酸的量来表征蛋白酶的活力。在 40 ℃和一定 pH(酸性蛋白酶 pH 3.0,中性蛋白酶 pH 7.2,碱性蛋白酶 pH 10.5)条件下,1 min 内水解酪素生成相当于 1 μg 酚基氨基酸(由酪氨酸等同物表示)所需要的酶量为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.6.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.6.2.1 碳酸钠溶液(0.4 mol/L):称取 42.4 g 无水碳酸钠(Na_2CO_3),用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.6.2.2 三氯乙酸溶液(0.4 mol/L):称取 65.4 g 三氯乙酸(CCl_3COOH),用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.6.2.3 盐酸溶液(1 mol/L):量取 85 mL 浓盐酸(HCl),用水稀释并定容至 1 000 mL。

4.6.2.4 盐酸溶液(0.1 mol/L):量取 100 mL 1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.3),用水定容至 1 000 mL。

4.6.2.5 氢氧化钠溶液(0.5 mol/L):称取 20.0 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.6.2.6 福林酚试剂。

4.6.2.7 福林(Folin)工作溶液:使用时以福林酚试剂(4.6.2.6)与水按体积比 1:2 混匀,现用现配。

4.6.2.8 乳酸盐缓冲液(pH 3.0,适用于酸性蛋白酶):称取 10.6 g 乳酸($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$,85%~90%),用水稀释并定容至 1 000 mL,此为 A 液;称取 16.0 g 乳酸钠($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$),用水溶解并定容至 1 000 mL,此为 B 液;使用前以 A 液与 B 液按体积比约 4:1 混匀,调整 pH 至 3.0 ± 0.1 即可。4 ℃冰箱储存,有效期为 3 d。

4.6.2.9 磷酸盐缓冲液(pH 7.2,适用于中性蛋白酶):分别称取 2.34 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)和 1.00 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.6.2.5),调整 pH 至 7.2 ± 0.1 ,并用水定容至 1 000 mL。

4.6.2.10 硼酸盐缓冲液(pH 10.5,适用于碱性蛋白酶):称取 19.08 g 硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$),用水溶解并定容至 1 000 mL,此为 A 液;称取 4.00 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至 1 000 mL,此为 B 液;使用前,量取 500 mL A 液和 400 mL B 液混匀,用水稀释至 1 000 mL,调整 pH 至 10.5 ± 0.1 即可。

4.6.2.11 酸性酪素溶液(10 mg/mL,pH 3.0):称取 1.000 g 酪素,加入约 0.5 mL 乳酸($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$,85%~90%)湿润后,再加入 80 mL 乳酸盐缓冲液(4.6.2.8),在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解,冷却后用 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.6.2.5),调整 pH 至 3.0 ± 0.1 ,并转入 100 mL 容量瓶中,用乳酸盐缓冲液(4.6.2.8)定容。该溶液在冰箱冷藏保存,有效期 3 d。

4.6.2.12 中性酪素溶液(10 mg/mL,pH 7.2):称取 1.000 g 酪素,加入约 0.5 mL 氢氧化钠溶液(4.6.2.5)湿润后,再加入 80 mL 磷酸盐缓冲液(4.6.2.9),在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解,冷却后用 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.6.2.5),调整 pH 至 7.2 ± 0.1 ,并转入 100 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液(4.6.2.9)定容。该溶液在冰箱冷藏保存,有效期 3 d。

4.6.2.13 碱性酪素溶液(10 mg/mL,pH 10.5):称取 1.000 g 酪素,加入约 0.5 mL 氢氧化钠溶液(4.6.2.5)湿润后,再加入 80 mL 硼酸盐缓冲液(4.6.2.10),在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解,冷却后用 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(4.6.2.5),调整 pH 至 10.5 ± 0.1 ,并转入 100 mL 容量瓶中,用硼酸盐缓冲液(4.6.2.10)定容。该溶液在冰箱冷藏保存,有效期 3 d。

4.6.2.14 L-酪氨酸标准物质:纯度 $\geq 95\%$ 。

4.6.2.15 L-酪氨酸标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$):称取 0.100 0 g 预先于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的 L-酪氨酸标准物质,用 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.3)溶解后,用水定容至 100 mL。该溶液在冰箱冷藏保存,有效期 3 d。

4.6.2.16 L-酪氨酸标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):使用前,吸取 10.0 mL L-酪氨酸标准储备溶液(4.6.2.15),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.6.2.4)稀释后定容至 100 mL。

4.6.3 仪器设备

4.6.3.1 电子天平:感量 0.000 1 g、0.001 g、0.01 g 和感量 0.1 g。

4.6.3.2 试验筛:孔径 0.25 mm。

4.6.3.3 酸度计:精确至 0.01。

4.6.3.4 紫外可见分光光度计。

4.6.3.5 恒温水浴振荡器:(40 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 。

4.6.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 0.25 mm 孔径试验筛。

4.6.5 试验步骤

4.6.5.1 标准曲线绘制

分别吸取 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 和 6.0 mL L-酪氨酸标准溶液(4.6.2.16)于 10 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀,配成浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-酪氨酸系列标准溶液。分别吸取上述系列溶液 1.0 mL,加 5.0 mL 碳酸钠溶液(4.6.2.1)和 1.0 mL 福林(Folin)工作溶液(4.6.2.7),于具塞试管中,混匀。每个浓度做 2 个平行。将试管同时置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,反应 20 min,取出,置于冷水中,迅速冷却至室温,用 10 mm 比色皿,以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-酪氨酸标准溶液为空白调零,于波长 680 nm 处测定 L-酪氨酸系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标,以 L-酪氨酸系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

新配置的福林(Folin)工作溶液应重新绘制标准曲线。

4.6.5.2 样品测定

称取土壤风干试样 2 g(精确至 0.001 g),置于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 对应的缓冲液[酸性蛋白酶试样加入乳酸盐缓冲液(4.6.2.8),中性蛋白酶试样加入磷酸盐缓冲液(4.6.2.9),碱性蛋白酶试样加入硼酸盐缓冲液(4.6.2.10)],搅拌混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 100 r/min 振荡水浴 30 min(或普通水浴锅,每 5 min 搅拌一次),用中速定性滤纸过滤。滤液即为待测酶液。

取 3 支 10 mL 具塞试管(1 支样品空白管、2 支样品管),分别加入 1.0 mL 待测酶液,将试管置于(40 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 5 min,向 2 支样品管中分别加入 1.0 mL 经同样预热的酪素溶液[酸性蛋白酶试样加入酸性酪素溶液(4.6.2.11),中性蛋白酶试样加入中性酪素溶液(4.6.2.12),碱性蛋白酶试样加入碱性酪素溶液(4.6.2.13)],准确计时反应 10 min,向 3 支试管中分别立即加入 2.0 mL 三氯乙酸溶液(4.6.2.2),于样品空白管中加入 1.0 mL 相同 pH 的酪素溶液,摇匀。将 3 支试管继续置于(40 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 10 min,取出后置于冷水浴中,迅速冷却至室温,并用中速定性滤纸过滤。

另取 3 支 10 mL 具塞试管(1 支样品空白管、2 支样品管),分别加入 1.0 mL 上述相应的滤出液,再加入 5.0 mL 碳酸钠溶液(4.6.2.1)、1.0 mL 福林工作溶液(4.6.2.7),摇匀,置于(40 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 20 min,取出后置于冷水浴中,迅速冷却至室温。

用水替代滤出液做试剂空白,以试剂空白调零,于波长 680 nm 处分别测定样品空白管和样品管中待测溶液吸光度,将样品管与样品空白管吸光度之差取平均值,通过标准曲线求得生成的酪氨酸浓度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该适当稀释待测酶液,重新测定。

4.6.6 结果计算

土壤蛋白酶活力按公式(6)计算。

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 4.0 \times N}{1.0 \times m \times t} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

- X ——土壤蛋白酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);
 c ——样品管中酪氨酸浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
 c_0 ——样品空白管中酪氨酸浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
 V ——试样制备提取液体积的数值,即试样制备缓冲液体积的数值,单位为毫升(mL);
 4.0 ——酶反应体系总体积的数值,单位为毫升(mL);
 N ——待测酶液稀释倍数;
 1.0 ——参与反应的待测试样体积的数值,即滤出液体积,单位为毫升(mL);
 m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);
 t ——准确计时反应时间的数值,单位为分钟(min)。

测定结果用2次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留2位小数。

4.6.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的2次独立测试结果的绝对差值不大于这2个测定值的算术平均值的20%,以大于这2个测定值的算术平均值的20%的情况不超过5%为前提。

4.7 土壤磷酸酶活力的测定(磷酸苯二钠比色法)

4.7.1 原理

磷酸酶水解磷酸苯二钠生成酚,使其与2,6-二溴苯醌氯亚胺试剂反应生成蓝色,其颜色的深浅与酚含量成正比,用游离的酚含量来表示磷酸酶的活力。在37℃和一定pH(酸性磷酸酶pH 5.0,中性磷酸酶pH 7.0,碱性磷酸酶pH 9.6)条件下,反应24 h后释放出酚的质量(mg)为一个酶活力单位,单位以U表示。

4.7.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合GB/T 6682中三级水的规定。

4.7.2.1 醋酸盐缓冲液(pH 5.0,适用于酸性磷酸酶):吸取11.55 mL冰醋酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$),用水定容至1 000 mL,此为A液;称取16.40 g无水醋酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$)或27.22 g三水合醋酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),用水溶解并定容至1 000 mL,此为B液;使用前,量取14.80 mL A液和35.20 mL B液混匀,用水稀释至1 000 mL。

4.7.2.2 柠檬酸盐缓冲液(pH 7.0,适用于中性磷酸酶):称取19.20 g柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$),用水溶解并定容至1 000 mL,此为A液;称取53.63 g七水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)或71.70 g十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),用水溶解并定容至1 000 mL,此为B液;使用前,量取6.40 mL A液和43.60 mL B液混匀,用水稀释至100 mL。

4.7.2.3 硼酸盐缓冲液(pH 9.6,适用于碱性磷酸酶):称取19.05 g硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$),用水溶解并定容至1 000 mL,此为A液;称取8.00 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解并定容至1 000 mL,此为B液;使用前,量取50 mL A液和23 mL B液混匀,用水稀释至200 mL。

4.7.2.4 磷酸苯二钠溶液(5 mg/mL):称取5.00 g磷酸苯二钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{PO}_4$),用对应的缓冲液[酸性磷酸酶用醋酸盐缓冲液(4.7.2.1),中性磷酸酶用柠檬酸盐缓冲液(4.7.2.2),碱性磷酸酶用硼酸盐缓冲液(4.7.2.3)]溶解并定容至1 000 mL。

4.7.2.5 2,6-二溴苯醌氯亚胺试剂:称取0.125 g 2,6-二溴苯醌氯亚胺($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}$),用10 mL 95%乙醇溶解,贮于棕色瓶中,存放在冰箱里。保存的黄色溶液未变褐色之前均可使用。

4.7.2.6 甲苯(C_7H_8)。

4.7.2.7 硫酸铝溶液(3 mg/mL):称取3.00 g硫酸铝 $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]$,用水溶解并定容至1 000 mL。

4.7.2.8 苯酚(C_6H_6O)。

4.7.2.9 酚标准溶液($1\ 000\ \mu\text{g/mL}$):准确称取 $1\ \text{g}$ (精确至 $0.000\ 1\ \text{g}$)苯酚(4.7.2.8),用水溶解并定容至 $1\ 000\ \text{mL}$,存于棕色瓶中。

4.7.2.10 酚标准工作溶液($50\ \mu\text{g/mL}$):取 $50.0\ \text{mL}$ 酚标准溶液(4.7.2.9),用水稀释并定容至 $1\ 000\ \text{mL}$ 。

4.7.3 仪器设备

4.7.3.1 电子天平:感量 $0.000\ 1\ \text{g}$ 、 $0.001\ \text{g}$ 和 $0.01\ \text{g}$ 。

4.7.3.2 试验筛:孔径 $1\ \text{mm}$ 。

4.7.3.3 紫外可见分光光度计。

4.7.3.4 恒温培养箱: $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 。

4.7.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 $1\ \text{mm}$ 孔径试验筛。

4.7.5 试验步骤

4.7.5.1 标准曲线绘制

分别吸取 $0\ \text{mL}$ 、 $2.0\ \text{mL}$ 、 $4.0\ \text{mL}$ 、 $6.0\ \text{mL}$ 、 $8.0\ \text{mL}$ 、 $10.0\ \text{mL}$ 酚标准工作溶液(4.7.2.10)于 $50\ \text{mL}$ 容量瓶中,加入 $5\ \text{mL}$ 对应的缓冲液[酸性磷酸酶加入醋酸盐缓冲液(4.7.2.1),中性磷酸酶加入柠檬酸盐缓冲液(4.7.2.2),碱性磷酸酶加入硼酸盐缓冲液(4.7.2.3)]和 4 滴 $2,6$ -二溴苯醌氯亚胺试剂(4.7.2.5),显色后用水稀释并定容至刻度,配成浓度为 $0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $2.0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $4.0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $5.0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $6.0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $10.0\ \mu\text{g/mL}$ 系列标准溶液。静置 $30\ \text{min}$,以 $0\ \mu\text{g/mL}$ 标准溶液为空白调零,于波长 $660\ \text{nm}$ 处测定上述系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标,以系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.7.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 $5\ \text{g}$ (精确至 $0.001\ \text{g}$),置于 $250\ \text{mL}$ 具塞三角瓶中,加入 $1.0\ \text{mL}$ 甲苯(4.7.2.6),轻摇 $15\ \text{min}$,加入 $20\ \text{mL}$ 磷酸苯二钠溶液(4.7.2.4),混匀后置于 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $24\ \text{h}$ 。培养结束后,加入 $100\ \text{mL}$ 硫酸铝溶液(4.7.2.7),混匀,过滤。取 $3.0\ \text{mL}$ 滤液于 $50\ \text{mL}$ 容量瓶中,加入 $5\ \text{mL}$ 对应的缓冲液[酸性磷酸酶加入醋酸盐缓冲液(4.7.2.1),中性磷酸酶加入柠檬酸盐缓冲液(4.7.2.2),碱性磷酸酶加入硼酸盐缓冲液(4.7.2.3)]和 4 滴 $2,6$ -二溴苯醌氯亚胺试剂(4.7.2.5),显色后用水稀释并定容至刻度。 $30\ \text{min}$ 后,以 $0\ \mu\text{g/mL}$ 标准溶液为空白调零,于波长 $660\ \text{nm}$ 处测定吸光度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.7.5.3 无磷酸苯二钠空白试验

每个样品应做无磷酸苯二钠空白试验,即不加磷酸苯二钠溶液,以等体积水替代,其他操作同 4.7.5.2。

4.7.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,即不加土壤试样,其他操作同 4.7.5.2。

4.7.6 结果计算

土壤磷酸酶活力按公式(7)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2 - c_3) \times V \times D \times 24}{m \times t \times 1\ 000} \dots\dots\dots (7)$$

式中:

X ——土壤磷酸酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);

c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得酚浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_2 ——无磷酸苯二钠空白吸光度由标准曲线求得酚浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_3 ——无土空白吸光度由标准曲线求得酚浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);

D ——分取倍数,过滤前反应液体积/吸取滤液体积;

24 ——时间换算系数;

m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);

t ——反应时间的数值,单位为小时(h);

1 000 ——质量换算系数。

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.7.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这两个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

4.8 土壤几丁质酶活力的测定(比色法)

4.8.1 原理

通过 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶催化水解生成 N-乙酰葡萄糖胺,进一步与对二甲氨基苯甲醛产生红色化合物,其颜色的深浅与 N-乙酰葡萄糖胺含量成正比,用 N-乙酰葡萄糖胺含量来表征几丁质酶的活力。在 37 °C 条件下,反应 1 h 释放出 N-乙酰葡萄糖胺的质量(μ g)为一个酶活力单位,单位以 U 表示。

4.8.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

4.8.2.1 胶态几丁质悬液(1%):称取 8.0 g 几丁质溶于 100 mL 浓盐酸(HCl)中,待完全溶解后,边搅拌边倒入盛有 2 000 mL 水(预冷 ≤ 4 °C)的容器中,搅拌 30 min 后置于 4 °C 冰箱冷藏,沉淀过夜。弃上清液,剩余部分用双层中性滤纸抽滤,沉淀用水洗涤数次,至滤液 pH 达到 5.5 以上。用约 200 mL 的水将上述沉淀物冲洗至烧杯中,搅拌形成悬浮液,即为胶态几丁质悬液。取 5.0 mL 上述悬液,105 °C 烘箱干燥至恒重,称量几丁质的质量,计算胶态几丁质悬液的浓度,并根据计算结果将胶态几丁质悬液浓度稀释为 1%。配置前,根据待测土壤样品数量初步估算所需胶态几丁质悬液(1%)体积。该悬液可于 4 °C 放置 3 个月,使用前振荡摇匀。

4.8.2.2 甲苯(C_7H_8)。

4.8.2.3 硼酸盐缓冲液(pH 9.1):称取 19.78 g 硼酸(H_3BO_3),溶于 80 mL 水中,用氢氧化钾(KOH)中和,调节 pH 至 9.1,定容至 100 mL。

4.8.2.4 对二甲氨基苯甲醛(DMAB):称取 10.0 g 对二甲氨基苯甲醛($C_9H_{11}NO$),用含 12.5%(V/V) 10 mol/L 盐酸(HCl)的冰醋酸($C_2H_4O_2$)溶解并定容至 100 mL,置 4 °C 冰箱保存。使用前用冰醋酸稀释 10 倍。

4.8.2.5 N-乙酰葡萄糖胺标准溶液(20 μ g/mL):称取 1.0 g N-乙酰葡萄糖胺,用水溶解并定容至 1 000 mL,制成 N-乙酰葡萄糖胺母液,使用前吸取 2.0 mL 母液于 100 mL 容量瓶定容,即得 20 μ g/mL N-乙酰葡萄糖胺标准溶液。

4.8.3 仪器设备

4.8.3.1 电子天平:感量 0.001 g、0.01 g。

4.8.3.2 试验筛:孔径 0.5 mm。

4.8.3.3 紫外可见分光光度计。

4.8.3.4 恒温培养箱:(37 $\pm$ 1)°C。

4.8.3.5 恒温水浴振荡器。

4.8.3.6 离心机。

4.8.4 样品采集与试样制备

施用微生物肥料,按照 NY/T 1121.1 的规定采集土壤样品、制备试样,风干样品应通过 0.5 mm 孔径试验筛。

4.8.5 试验步骤

4.8.5.1 标准曲线绘制

分别吸取 0 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL *N*-乙酰葡萄糖胺标准溶液(4.8.2.5)于 10 mL 刻度试管中,用水稀释并定容至 2 mL,配成浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、15.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 系列标准溶液。分别在上述刻度试管中,加入 0.2 mL 硼酸盐缓冲液(4.8.2.3)。将试管置于沸水浴中处理 3 min,静置冷却后,加入 6.0 mL DMAB 试剂(4.8.2.4),混匀,置于 36 $^{\circ}\text{C}$ ~38 $^{\circ}\text{C}$ 水浴显色 20 min 后,静置冷却后,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 系列标准溶液为空白调零,于波长 544 nm 处测定上述系列标准溶液吸光度。以吸光度为横坐标,以系列标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

4.8.5.2 样品测定

称取风干土壤试样 10 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 锥形瓶中,加入 1.0 mL 甲苯(4.8.2.2),轻摇 15 min,加入 10.0 mL 胶态几丁质悬液(4.8.2.1),混匀后置于(37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 18 h。培养结束后,加入 20.0 mL 水稀释,4 000 r/min 离心 30 min。用中性滤纸将上清液过滤至 50 mL 容量瓶,用水冲洗 3 次并定容至 50 mL。吸取 2.0 mL 上述溶液置于 10 mL 刻度试管中,加入 0.2 mL 硼酸盐缓冲液(4.8.2.3)。将试管置于沸水浴中处理 3 min,静置冷却后,加入 6.0 mL DMAB 试剂(4.8.2.4),混匀,置于 36 $^{\circ}\text{C}$ ~38 $^{\circ}\text{C}$ 水浴显色 20 min 后静置冷却。以 0 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液为空白调零,于波长 544 nm 处测定吸光度。如果样品吸光值超过标准曲线的最大值,则应该增加分取倍数或减少土壤试样称样量,重新测定。

4.8.5.3 无胶态几丁质悬液空白试验

每个样品应做无胶态几丁质悬液空白试验,即不加胶态几丁质悬液,以等体积水替代,其他操作同 4.8.5.2。

4.8.6 结果计算

土壤几丁质酶活力按公式(8)计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_2) \times V \times D}{m \times t} \dots\dots\dots (8)$$

式中:

X ——土壤几丁质酶活力的数值,单位为酶活力单位每克(U/g);

c_1 ——样品吸光度由标准曲线求得 *N*-乙酰葡萄糖胺浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_2 ——无胶态几丁质悬液空白吸光度由标准曲线求得 *N*-乙酰葡萄糖胺浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——显色后定容体积的数值,单位为毫升(mL);

D ——分取倍数,培养结束离心后上清液定容体积/吸取的溶液体积;

m ——土壤试样质量的数值,单位为克(g);

t ——反应时间的数值,单位为小时(h);

测定结果用 2 次平行测定的算术平均值表示,所得结果应保留 2 位小数。

4.8.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。