

## OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZ

*Elżbieta J. Bielińska*

Institut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska, Akademia Rolnicza  
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin  
e-mail: [tantal@agros.ar.lublin.pl](mailto:tantal@agros.ar.lublin.pl)

**Streszczenie.** Znaczenie fosfataz w przemianach fosforu w środowisku glebowym, oraz jako wskaźnik aktywności biologicznej tego środowiska. Metody oznaczania aktywności wybranych enzymów z grupy fosfataz.

**Słowa kluczowe:** fosfatazy w glebach, aktywność enzymów, metody oznaczania

Termin fosfatazy jest używany w odniesieniu do szerokiej grupy enzymów, które katalizują hydrolizę estrów i bezwodników kwasu ortofosforowego [14]. Fosfatazy odgrywają ważną rolę w glebie, ponieważ stymulują przemiany organicznych związków fosforu w nieorganiczne fosforany ( $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), bezpośrednio dostępne dla roślin i organizmów glebowych. Podział fosfataz na hydralazy monoestrów fosforanowych – potoczna nazwa fosfomonoesterazy (EC 3.1.3.), [15], hydralazy diestrów fosforanowych – fosfodiesterazy (EC 3.1.4.) i hydralazy triestrów fosforanowych – fosfotriesterazy (EC 3.1.5.) jest oparty na liczbie wiązań estrowych odpowiedniego substratu [29]. Enzymy te mają specyficzne nazwy zgodnie ze swoimi substratami, lecz są albo hydrolazami monoestrów fosforanowych (EC 3.1.3), albo hydrolazami diestrów fosforanowych (EC 3.1.4).

Do grupy pierwszej należą:

- fitazy – katalizują hydrolityczne usuwanie wszystkich sześciu grup fosforanowych z najliczniej występującego w glebie (około 50-60%) związku fosforu organicznego – inozytolu sześćfosforanowego lub jego soli,
- nukleotydyazy – uwalniające fosforany pochodzenia nukleotydowego,
- fosfatazy cukrowe,
- glicerofosfatazy.

Do grupy drugiej należą:

- nukleazy,
- fosfolipazy [41].

Enzymy te są często określane jako fosfatazy. W środowisku glebowym występują:

- fosfomonoesterazy (np.: fitazy, glicerofosfatazy, nukleotydyazy),
- fosfodiesterazy,
- fosfotriesterazy,
- polifosfatazy (np.: ATP-azy, pirofosfatazy) oraz
- P-N hydrolazy (np.: fosfoamidazy) [38].

Hoffmann [20] sugerował podział fosfomonoesteraz na trzy typy: alkaliczne, obojętne i kwaśne (odmienne optimum pH).

Kwaśny odczyn (pH 4-6) jest optymalny dla kwaśnej fosfomonoesterazy (EC 3.1.3.1.) zwanej potocznie fosfatą kwaśną, zaś alkaliczny (pH 8-10) dla alkalicznej fosfomonoesterazy, zwanej potocznie fosfatą alkaliczną (EC 3.1.3.2.). Wyróżnia się również w glebie fosfatazy obojętne [31,33] z optimum aktywności przy pH 6,5-7. Występujące w przypadku fosfatyz szerokie maksimum ich aktywności, obejmujące kilka jednostek pH, wynika z obecności mieszaniny kwaśnej i alkalicznej fosfatyz w glebach [McLaren, za: Speir, Ross 41].

Kwaśna fosfatyz, podobnie jak fitaza, jest enzymem o małej specyficzności substratowej, mającym zdolność hydrolizowania wielu połączeń fosforanowych o zróżnicowanej budowie cząsteczki [50]. Kwaśne fosfatazy roślin hydrolizują heksa-fosforan inozytolu [16,48], a te pochodzenia grzybowego również jego sole [50].

Zawartość organicznego fosforu w wierzchnich warstwach gleb waha się w szerokich granicach od 5% do ponad 60% ogólnej zawartości fosforu (w glebach polskich na ogół 20-40%), a asymilacja tego fosforu przez rośliny i mikroorganizmy odbywa się przez fosfatazy [21].

Dostępność fosforu może być czynnikiem ograniczającym rozwój roślin w wielu lądowych ekosystemach [5,7]. Ponieważ rośliny wykorzystują jedynie fosfor nieorganiczny [43], mineralizacja organicznych związków fosforu ma duże znaczenie w rolnictwie i ekonomii. Większość zapotrzebowania roślin na fosfor jest zaspokajana poprzez transformację glebowej materii organicznej [4,5]. Zdaniem Appiaha i Thompsona [3] mineralizacja fosforu organicznego jest głównie zjawiskiem mikrobiologicznym, a aktywność fosfatyz zaczyna odgrywać istotną rolę po początkowym rozkładzie glebowej substancji organicznej, katalizowanej równocześnie przez wieloskładnikowe systemy enzymatyczne, produkowane przez różne grupy drobnoustrojów. Początkowe etapy rozkładu substancji organicznej mogą być czynnikiem ograniczającym szybkość mineralizacji fosforu organicznego. Niektóre wyniki badań [3,37] wskazują, że fosfatyz wewnątrz komórkowa drobnoustrojów może pełnić ważniejszą rolę niż pozakomórkowa. Jednakże w środowisku glebowym,

w warunkach niekorzystnych dla aktywności życiowej mikroorganizmów, takich jak susza lub ograniczenie dostępności substratów węglowych, fosfataza pozakomórkowa odgrywa istotną rolę w stałej mineralizacji materii organicznej [23,41].

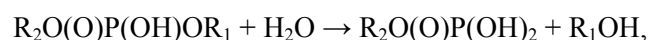
Głównym źródłem fosfataz w środowisku glebowym są przede wszystkim mikroorganizmy glebowe, a także korzenie roślin i fauna glebowa [45]. Fosfatazy kwaśne i alkaliczne są rozpowszechnione w świecie zwierzęcym i roślinnym [13]. Występują w błonach śluzowych jelita, tkance kostnej, nerce, wątrobie i śledzionie oraz łożysku. Ponadto otrzymano kwaśne i alkaliczne fosfatazy m. in. z *E. coli*, *Neurospora crassa*, fosfatazę alkaliczną z mleka, a kwaśne z marchwi i słodu.

Badania z użyciem wody znakowanej  $^{18}\text{O}$  wykazały, że kwaśne i alkaliczne fosfatazy katalizują reakcje  $\text{R-O-P} + \text{H}_2^{18}\text{O} = \text{R-O-H} + \text{H-}^{18}\text{O-P}$ , powodując zerwanie wiązania pomiędzy fosforem a tlenem i przeniesienie reszty fosforanowej na wodę (reakcja hydrolizy). Fosfatazy mogą również katalizować reakcje przeniesienia reszt fosforanowych na alkohol z utworzeniem nowego estru (reakcja transfosforylacji) [13].

Aktywność fosfataz w środowisku glebowym odzwierciedla aktywność enzymów związanych z koloidami glebowymi i substancjami humusowymi, wolnymi fosfatazami w roztworze glebowym oraz fosfatazami związanymi z żywymi i martwymi komórkami roślin i mikroorganizmów [32]. Fosfatazy mogą być dobrym wskaźnikiem potencjału mineralizacji fosforu organicznego oraz aktywności biologicznej gleby [12]. Według Frankenbergera i Dicka [17] najlepszymi wskaźnikami aktywności i wielkości populacji mikroorganizmów glebowych są fosfataza alkaliczna, amidaza i katalaza, ponieważ aktywność tych enzymów wykazywała najwyższą korelację z oddychaniem i biomasa mikroorganizmów w glebach.

W glebach najintensywniej badane są fosfomonoesterazy. Różnią się one od innych fosfataz małą specyficznością względem substratu oraz szerokim zakresem pH dla ich aktywności optymalnej.

W literaturze przedmiotu jest niewiele informacji na temat występowania i aktywności fosfodiesterazy w środowisku glebowym [6,18,24,39]. Fosfodiesteraza katalizuje reakcje typu:



gdzie  $\text{R}_1$  i  $\text{R}_2$  reprezentują grupy hydroksylowe lub fenolowe nukleozydów [35].

Zdaniem Andersona [2] aktywność fosfodiesterazy odgrywa istotną rolę w cyklu biogeochemicznego krążenia fosforu w przyrodzie.

#### METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI FOSFATAZ W GLEBIE

Procedury oznaczania aktywności fosfataz są oparte na inkubacji mieszaniny reakcyjnej zawierającej glebę i substrat, co prowadzi do uwalniania i gromadzenia

produktów hydrolizy substratu (ROH i  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), [38]. Aktywność fosfataz można oznaczyć przy użyciu naturalnych substratów (np. fityny) lub syntetycznych substratów organicznych (3-naftylofosforan, p-nitrofenylofosforan). Najczęściej jako substraty rozkładane przez fosfomonoesterazy są stosowane p-nitro-fenylofosforan [46] lub sól dwusodowa fenylfosforanu [20].

Fosfatazy glebowe mogą przyspieszać hydrolizę przy pewnym optymalnym poziomie pH. Konieczne jest zatem utrzymywane wymaganego poziomu pH w mieszaninie reakcyjnej podczas inkubacji. Literatura przedmiotu zawiera opisy stosowania różnych buforów. Na przykład Tabatabai i Bremner [46] stosowali MUB (zmodyfikowany uniwersalny bufor), Zvjagincev i in. [49] – bufor acetynowy, a Szegi [44] używał buforu boranowego.

Aktywność enzymatyczną gleby mierzy się tą aktywnością, która występuje poza interwencją żywych mikroorganizmów. Stosuje się czynnik bakteriostatyczny (np. toluen) hamujący całkowicie aktywność drobnoustrojów w glebie, żeby nie dopuścić do pobierania substratu, wytwarzania nowych enzymów i przyswajania wytworzonego produktu przez mikroorganizmy. Konsekwencją pobierania produktów dezintegracji substratów przez mikroorganizmy glebowe jest uzyskanie zaniżonych wyników pomiarów aktywności enzymatycznej [22,34].

Reakcja enzymatyczna jest najczęściej przerywana przez NaOH. Tabatabai i Bremner [46] informują o celowości stosowania NaOH i  $\text{CaCl}_2$ . Niektórzy autorzy stosowali inne wodorotlenki (np.: KOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) lub kwas chlorooctowy do zatrzymania reakcji [38].

Metody oznaczenia poszczególnych fosfataz zostały opisane przez Ohlingera, Margensina, Kandelera [38].

### ***Fosfomonoesterazy EC 3.1.3.***

#### **Metoda: Tabatabai i Bremnera [46]**

##### Odczynniki

1. Zmodyfikowany uniwersalny bufor (MUB) o pH 6,5: w kolbie miarowej na  $100 \text{ cm}^3$  umieścić 12,1 g Trisu, 0,628 g kwasu borowego, 1,4 g kwasu maleinowego i  $48,8 \text{ cm}^3$   $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaOH, dopełnić wodą destylowaną do kreski [40]. Bezpośrednio przed oznaczeniem aktywności fosfataz przygotować bufor „roboczy”: w kolbie miarowej na  $100 \text{ cm}^3$  umieścić  $20 \text{ cm}^3$  buforu uniwersalnego (MUB) i przy użyciu  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl sprowadzić do pH 6,5, uzupełnić wodą destylowaną do kreski,
2. Toluen cz.d. a.,

3. Roztwór p-nitrofenylofosforanu sodu (PNP) : 1,927 g p-nitrofenylofosforanu sodu rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> buforu (MUB o pH 6,5),
4. Wapnia chlorek: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> wodny roztwór CaCl<sub>2</sub>,
5. Sodu wodorotlenek: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> wodny roztwór NaOH,
6. Standard p-nitrofenolu – 1 g p-nitrofenolu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do 1000 cm<sup>3</sup>.

#### *Procedura*

W 50 cm<sup>3</sup> kolbie Erlenmeyera umieścić 1 g gleby (<2 mm) i 0,25 cm<sup>3</sup> toluenu. Kolbę szczelnie zamknąć, mieszać kilka sekund i pozostawić na 10 minut. Następnie dodać 4 cm<sup>3</sup> MUB (zmodyfikowany uniwersalny bufor) o pH 6,5 i 1 cm<sup>3</sup> buforowanego roztworu PNP o pH 6,5 jako substratu. Po zamknięciu kolby dokładnie mieszać kilka sekund i wstawić do inkubacji w temperaturze 37° C na 1 h. Po inkubacji zatrzymać reakcję przy użyciu 1 cm<sup>3</sup> 0,5 m chlorku wapnia i 4 cm<sup>3</sup> 0,5 m NaOH. Mieszać kilka sekund i przesączyć zawartość kolby przez sączek z bibuły filtracyjnej (Whatman nr 12) do próbówki. Natężenie barwy (żółty kolor) uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm. Aktywność fosfataz, wyrażaną w mg uwolnionego p-nitrofenolu na 1 kg gleby w ciągu 1 godziny, wyliczano w oparciu o krzywą wzorcową.

Krzywą wzorcową należy sporządzić przygotowując odpowiednie rozcieńczenia roztworu standardowego zawierające odpowiednio: 0, 1, 2, 3, 4 i 5 mg p-nitrofenolu w 5 cm<sup>3</sup> roztworu, a następnie postępować jak z próbkami gleby po inkubacji.

#### *Uwagi do metody*

Porównawcze badania Tabatabai i Bremnera [46] wykazały, że zaproponowana metoda oznaczania aktywności fosfataz w glebach jest bardziej precyzyjna i mniej czasochłonna niż procedury stosowane przez innych autorów [25,36,40]. Tabatabai i Bremner [46] zwracają uwagę, że procedury zaproponowane przez niektórych autorów, między innymi przez Kramera i Edrei [25] czy Ramirez-Martinez i McLarena [36] są skomplikowane z powodu konieczności wykonywania odpowiednich prób kontrolnych, które powinny uwzględniać absorpcję substratu, absorpcję substancji fenolowych zawartych w glebie, zakłócenia spowodowane przez reakcje nieenzymatyczne, utratę substratu lub produktu w wyniku np. adsorpcji, itp.

Do oznaczania aktywności fosfataz w glebach stosunkowo często są jednakże stosowane procedury zaproponowane przez Kramera i Edrei [25] oraz Hoffmana [20]. Metoda Kramera i Edrei [25] oparta jest na inkubacji (2 godziny w temperaturze 37°C) próbki gleby (5 g) z użyciem 0,5% roztworu fenylofosforanu sodu o pH 7 jako substratu. Aktywność enzymów wyrażana jest w mg uwolnio-

nego fenolu na 5 g gleby w ciągu 2 godzin. Również w metodzie wg Hoffmana [20] jako substrat używany jest roztwór soli sodowej fenylfosforanu (z zastosowaniem 3-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C). W obydwu metodach [25,20] usunięty fenol jest barwiony 2,6-dwubromochinochloromidem i mierzony przy pomocy spektrofotometrii przy długości fali 614 nm.

Zdaniem Kucharskiego [27] w badaniach aktywności enzymatycznej różnych jednostek taksonomicznych gleb należy wybrać odpowiednie metody oznaczeń aktywności enzymów i ujedynolnić jednostki, w których podaje się aktywność enzymów.

#### **Fosfodiesterazy EC 3.1.4.1.**

##### **Metoda: Browmana i Tabatabai [6]**

##### Odczynniki

1. Bufor THAM-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05 mol·dm<sup>-3</sup>, pH 8): rozpuścić 6,1 g aminometanu trisu (THAM) w 800 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i przy użyciu 0,4 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sprowadzić do pH 8, uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm<sup>3</sup>,
2. Toluen cz.d.a.,
3. Roztwór (5 mmol) bis-p-nitrofenylfosforanu sodu (BPNP) : 0,1811 g bis-p-nitrofenylfosforanu sodu rozpuścić w 100 cm<sup>3</sup> buforu (THAM o pH 8),
4. Wapnia chlorek: 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> wodny roztwór CaCl<sub>2</sub>,
5. Roztwór THAM-NaOH (0,1 mol·dm<sup>-3</sup>, pH 12): rozpuścić 12,2 g aminometanu trisu (THAM) w 800 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i przy użyciu 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> wodnego roztworu NaOH sprowadzić do pH 12, uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm<sup>3</sup>,
6. Roztwór THAM (0,1 mol·dm<sup>-3</sup>, pH 10): rozpuścić 12,2 g aminometanu trisu (THAM) w 1000 cm<sup>3</sup> wody destylowanej,
7. Standard p-nitrofenolu (PN) – 1 g p-nitrofenolu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do 1000 cm<sup>3</sup>. Roztwór zawiera 1 mg PN w 1 cm<sup>3</sup>.

##### Procedura

W 50 cm<sup>3</sup> kolbie Erlenmeyera umieścić 1 g gleby (< 2 mm) i 0,2 cm<sup>3</sup> toluenu. Kolbę szczelnie zamknąć, mieszać kilka sekund i pozostawić na 10 minut. Następnie dodać 4 cm<sup>3</sup> buforu (THAM o pH 8) i 1 cm<sup>3</sup> buforowanego roztworu BPNP jako substratu. Po zamknięciu kolby dokładnie mieszać kilka sekund i wstawić do inkubacji w temperaturze 37°C na 1 h. Po inkubacji zatrzymać reakcję przy użyciu 1 cm<sup>3</sup> 0,5 m chlorku wapnia i 4 cm<sup>3</sup> roztworu THAM-NaOH. Mieszać kilka sekund i przesączyć zawartość kolby przez sącdek z bibuły filtracyjnej (Whatman nr 2v) do próbówki. Natężenie barwy (żółty kolor) uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm.

Aktywność fosdiesterazy, wyrażaną w mg uwolnionego p-nitrofenolu na 1 kg gleby w ciągu 1 godziny, wyliczano w oparciu o krzywą wzorcową.

Krzywą wzorcową należy sporządzić przygotowując odpowiednie rozcieńczenia roztworu standardowego zawierające odpowiednio: 0, 1, 2, 3, 4 i 5 mg p-nitrofenolu w 5 cm<sup>3</sup> roztworu, a następnie postępować jak z próbkami gleby po inkubacji.

### **Pirofosfatazy EC 3.1.6.1**

#### Podstawa oznaczenia

Enzym ten katalizuje hydrolizę pirofosforanów do ortofosforanów. Aktywność tego enzymu w glebach zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ substrat pirofosfatazy (pirofosforan) jest składnikiem nawozów fosforowych [11].

#### **Metoda: Dicka i Tabatabai [11]**

#### Odczynniki

1. Zmodyfikowany uniwersalny bufor (MUB) o pH 8: w kolbie miarowej na 100 cm<sup>3</sup> umieścić 12,1 g Trisu, 0,628 g kwasu borowego, 1,4 g kwasu maleinowego i 48,8 cm<sup>3</sup> 1 mol·dm<sup>-3</sup> NaOH, dopełnić wodą destylowaną do kreski [40]. Bezpośrednio przed oznaczeniem aktywności fosfataz przygotować bufor „roboczy”: w kolbie miarowej na 100 cm<sup>3</sup> umieścić 20 cm<sup>3</sup> buforu uniwersalnego (MUB) i przy użyciu 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> HCl sprowadzić do pH 8, uzupełnić wodą destylowaną do kreski,
2. Roztwór (50 mmol) pirofosforanu (PPi) : 2,23 g Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O rozpuścić w 20 cm<sup>3</sup> buforu (MUB o pH 8) i uzupełnić wodą destylowaną do 100 cm<sup>3</sup>,
3. Roztwór 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 28 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> rozpuścić w 700 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i uzupełnić do 1 dm<sup>3</sup>.

#### Procedura

W 50 cm<sup>3</sup> plastikowej probówce do wirowania umieścić 1 g gleby (< 2 mm) i dodać 3 cm<sup>3</sup> 50 mmol PPI jako substratu. Po zamknięciu, probówki wytrząsać kilka sekund i wstawić do inkubacji w temperaturze 37°C na 5 h. Po inkubacji dodać 3 cm<sup>3</sup> buforu (MUB o pH 8) i 25 cm<sup>3</sup> 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wirować przez 5 minut na wirówce (12000 obr·min<sup>-1</sup>). Następnie pobrać 1 cm<sup>3</sup> supernatantu i oznaczyć kolorymetrycznie zawartość uwolnionego przez enzym ortofosforanu. W proponowanej metodzie oznaczania pirofosfatazy [11] ortofosforan jest ekstrahowany przy pomocy kwasu siarkowego i barwiony molibdenianem amonu, a następnie jest mierzony fotometrycznie przy 700 nm [10]. Aktywność pirofosfatazy można wyrazić w mg uwolnionego ortofosforanu na 1 kg gleby w ciągu 5 godzin.

## Fosfolipazy C

### Podstawa oznaczenia

Fosfolipaza C katalizuje hydrolizę lecytyny i może odgrywać ważną rolę w metabolizmie fosfolipidów w środowisku glebowym [28].

### **Metoda: Kuroshima i Hayano [28]**

#### Odczynniki

1. Bufor Tris-maleinowy ( $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , pH 9,2): rozpuścić 11,6 g kwasu maleinowego w  $50 \text{ cm}^3$   $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Trisu, a następnie zmieszać z  $81 \text{ cm}^3$   $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaOH i  $69 \text{ cm}^3$  wody destylowanej,
2. Toluen cz.d.a.,
3. Roztwór ( $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) p-nitrofenylofosforylocholin (PNPC): 156,7 mg PNPC rozpuścić w  $10 \text{ cm}^3$  wody destylowanej,
4. Etanol cz.d.a.
5. Roztwór Trisu ( $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ): rozpuścić 24,2 g Trisu (hydroksymetyloamino-metan) w  $100 \text{ cm}^3$  wody destylowanej.

Standard p-nitrofenolu (PN),  $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  – 139,1 mg p-nitrofenolu rozpuścić w  $100 \text{ cm}^3$  wody destylowanej, następnie pobrać  $10 \text{ cm}^3$  tego roztworu i uzupełnić do  $100 \text{ cm}^3$  wodą destylowaną.

#### Procedura

W probówce (16 mm x 175 mm) umieścić 0,5 g gleby (< 2 mm) i  $0,1 \text{ cm}^3$  toluenu. Probówkę szczelnie zamknąć, mieszać kilka sekund i pozostawić na 5 minut. Następnie dodać  $1,8 \text{ cm}^3$  wody destylowanej,  $0,6 \text{ cm}^3$  buforu Tris-maleinowego (pH 9,2) i  $0,6 \text{ cm}^3$  PNPC jako substratu. Po zamknięciu probówki dokładnie mieszać kilka sekund i wstawić do inkubacji w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  na 2 h. Po inkubacji zatrzymać reakcję przy użyciu  $8 \text{ cm}^3$  etanolu. Mieszać kilka sekund i przesączyć zawartość probówki przez sączek z bibuły filtracyjnej (Whatman nr 2). Natężenie barwy (żółty kolor) uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm. Aktywność fosfolipazy C, wyrażaną w mmol uwolnionego p-nitrofenolu na 1 kg gleby w ciągu 1 godziny, wyliczano w oparciu o krzywą wzorcową.

Krzywą wzorcową należy sporządzić przygotowując odpowiednie rozcieńczenia roztworu standardowego zawierające odpowiednio: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1 mmol p-nitrofenolu w  $5 \text{ cm}^3$  roztworu, a następnie postępować jak z próbkami gleby po inkubacji.



*Uwagi do proponowanych metod*

W ostatnich latach podjęto badania nad poszukiwaniem nowych metod oceny aktywności fosfataz w glebie. W glebie enzymy zewnątrzkomórkowe często występują w formie nieruchomej, stanie, który może zmienić ich interakcje z substratami w porównaniu do enzymów w fazie płynnej. De Cesare i in. [9] ocenili sonifikację pod względem jej użyteczności w badaniu nieruchomej kwaśnej fosfatazy przez rozpraszanie agregatów gleby. Wzrost aktywności po sonifikacji, który jest równoczesny z uwalnianiem chromoforów z gleby może być związany z wystawieniem lub uwolnieniem z agregatów nieruchomej frakcji zewnątrzkomórkowej enzymu w koloidzie.

Marx i in. [30] opisali oznaczenie aktywności fosfataz fluorometryczne na mikroplątce. Cytowani autorzy przeprowadzili również badania porównawcze pomiędzy nowowprowadzonym oznaczeniem fluorometrycznym na mikroplątce i standardowym oznaczeniem kolorymetrycznym z zastosowaniem p-nitrofenylu jako substratu. Kremer [26] wykazał, że metoda mikroplatkowa charakteryzuje się podobną do metody standardowej dokładnością oznaczeń, a jednocześnie wymaga mniej reagentów chemicznych i znacząco redukuje czas analizy.

W systemie korzeniowym i w zewnętrznych strzępkach grzybni możliwe jest zbadanie aktywności pochodzącej z grzyba fosfatazy przy użyciu fluorogenicznego substratu, który tworzy fluoryzujący krystaliczny osad w miejscu aktywności fosfatazy [48]. Van Aarle i in. porównali tę metodę z innymi, na przykład z zastosowaniem fosforanu p-nitrofenylenu i wykazali, że mikroskopowa detekcja z użyciem substratu fluorogenicznego może być użyta do uwidocznienia aktywności fosfatazy pochodzącej ze strzępków grzybni zarówno w korzeniach, jak i w grzybni zewnętrznej.

Aktywność enzymów w środowisku glebowym zależy od bezwzględnej ich ilości, wielkości puli reagujących związków innych niż enzymy, katalitycznej sprawności, właściwości fizycznych i chemicznych gleby, liczebności i stanu gatunkowego mikroorganizmów [1]. Aktywność fosfataz jest związana z glebą i warunkami wegetacji [19], reaguje na zmiany użytkowania gleb [8] i może zależeć od okresowych zmian temperatury i wilgotności gleby [42].

## PIŚMIENNICTWO

1. **Abraham S.A.:** Variation of enzyme activity of soil under the influence of natural and anthropogenic factors. *Euras. Soil Sci.*, 25, 57-74, 1993.
2. **Anderson G.:** Nucleic acids, derivatives, and organic phosphates. *Soil Biochem.*, 1, 67-90, 1967.
3. **Appiah M.R., Thompson E.J.:** The effect of successive cropping on soil organic phosphorus. *Ghana J. Agric. Sci.*, 7, 25-30, 1974.
4. **Attwill P.M.:** Nutrient uptake and nutrient return. *Australian J. Botany*, 28, 199-222, 1980.

5. **Attwill P.M., Adams M.A.:** Nutrient cycling in forests. *New Phytologist*, 124, 561-582, 1993.
6. **Browman M.G., Tabatabai M.A.:** Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42, 284-290, 1978.
7. **Chapin F.S., Walker L.R., Fastie C.L., Sharman L.C.:** Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecological Monographs*, 64, 149-175, 1994.
8. **Clarholm M.:** Microbial biomass P, labile P and acid phosphatase activity in the humus layer of a spruce forest, after repeated additions of fertilizers. *Biol. Fertility Soils*, 16, 287-292, 1993.
9. **De Cesare F., Garzillo A.M.V., Buonocore V. Badalocco L.:** Use of sonification for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 6, 825-832, 2000.
10. **Dick W.A., Tabatabai M.A.:** Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. *J. Environ. Qual.*, 6, 82-85, 1977.
11. **Dick W.A., Tabatabai M.A.:** Inorganic pyrophosphatase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 59-65, 1978.
12. **Dick W.A., Tabatabai M.A.:** Significance and potential uses of soil enzymes. In: Metting, F.B. (Ed.), *Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural and Environmental Management*. 95-125, Marcel Dekker, New York, 1993.
13. **Dziembor E.:** Fosforylaza monoestrów ortofosforanowych. *Post. Biochem.*, 16, 89-99, 1970.
14. **Eivazi F., Tabatabai M.A.:** Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 9, 167-172, 1977.
15. **Enzyme Nomenclature.** NC-IUBMB. Red. E.C. Webb. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1992.
16. **Ferens M., Morawiecka B.:** Kwaśne fosfatazy roślin wyższych. *Post. Biochem.*, 30, 3-4, 461-475, 1984.
17. **Frankenberger W.T., Dick W.A.:** Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 945-951, 1983.
18. **Hayano K.:** Extraction and properties of phosphodiesterase from a forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9, 221-223, 1977.
19. **Herbien S.A., Neal J.L.:** Phosphatase activity in arctic tundra soils disturbed by vehicles. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 853-858, 1990.
20. **Hoffmann G.:** Phosphatases in the enzyme system of cultivated soils (in Germany) and possibilities of determining their activity. *Z. Pflanzenernähr. Dung. Bodenk.*, 118, 153-160, 1968.
21. **Jennings D.H.:** The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press, Cambridge, 141-152, 1995.
22. **Juma N.G., Tabatabai M.A.:** Distribution of phosphomonoesterases in soils. *Soil Sci.*, 126, 101-108, 1978.
23. **Kieliszewska-Rokicka B.:** Enzymy glebowe i ich znaczenie w badaniach aktywności mikrobiologicznej gleby. [W:] H. Dahm, A. Pokojska-Burdziej [Red] *Drobnoustroje środowiska glebowego*. 37-47, Wyd. Adam Marszałek, Toruń, 2001.
24. **Kiss S., Drăgan-Bularda M., Radulescu D.:** Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agron.*, 27, 25-87, 1975.
25. **Kramer R., Erdei G.:** Primenenie metoda opredelena aktivnosti fosfatazy v agro-himičeskih issledovaniäh. *Počvoved.*, 9, 99-102, 1959.
26. **Kremer R.J.:** Determination of soil phosphatase activity using a microplate method. *Communications in soil science and plant analysis*, 25 (3-4), 319-325, 1994.
27. **Kucharski J.:** Relacje między aktywnością enzymów a żyznością gleby. [W:] W. Barabasz [Red] *Drobnoustroje w środowisku, występowanie, aktywność i znaczenie*. 327-348, AR Kraków, 1997.
28. **Kuroshima T., Hayano K.:** Phospholipase C activity in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 28, 4, 535-542, 1982.

29. **Margesin R., Schinner F.** Phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phospho-triesterase, and inorganic pyrophosphatase activities in forest soils in an alpine area: effect of pH on enzyme activity and extractability. *Biol. Fertil. Soils*, 18, 320-326, 1994.
30. **Marx M.C., Wood M., Jarvis S.C.:** A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1633-1640, 2001.
31. **Nakaz J.P., Gould W.D., Klein D.A.:** Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 13-18, 1987
32. **Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B.:** Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag J.M. Stotzky G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, 6, 293-355. Marcek Dekker, New York, 1990.
33. **Nannipieri P., Sastre L., Landi L., Lobo M.C., Pietramellara G.:** Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 1, 107-112, 1996.
34. **Pang P.C.K., Kolenko H.:** Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 35-39, 1986.
35. **Privat de Garilha M.:** Enzymes in nucleic acid research, 259-278. Holden-Day, Inc. San Francisco, 1967.
36. **Ramirez-Martinez J.R., McLaren A.D.:** Determination of soil phosphatase activity by a fluorimetric technique. *Enzymologia*, 30, 243-253, 1966.
37. **Ridge E.H., Rovira A.D.:** Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non sterile conditions. *New Phytol.*, 70, 1017-1026, 1971.
38. **Schinner F., Klinger R., Kadeler E., Margesin R.** (Eds.) *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer Labor, 1993.
39. **Skujiņš J.J.:** Extracellular enzymes in soil. *Crit. Rev. Microbiol.*, 4, 383-421, 1976.
40. **Skujiņš J.J., Braal L., McLaren A.D.:** Characterization of phosphatase in a terrestrial soil sterilized with an electron beam. *Enzymologia*, 25, 125-133, 1962.
41. **Speir T.W., Ross D.J.:** Soil phosphatase and sulphatase. [W:] *Soil enzymes*. Red. R.G. Burns. Academic Press, London, 197-251, 1978.
42. **Speir T.W., Cowling J.C.:** Phosphatase activities of pasture plants and soils: Relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biol. Fertility Soils* 12, 189-194, 1991.
43. **Stevenson J.J.:** Cycles of soil: C, N, P, S, micronutrients. John Wiley and Sons, New York, 231-284, 1986.
44. **Szegi J.:** *Metody počvennoj mikrobiologii*. Kolos Moskva, 1983.
45. **Tabatabai M.A.:** Enzymes. W: R.W. Weaver, S. Augle, P.J. Bottomly, D. Bezdicek, S. Smith, M.A. Tabatabai, A. Wollum (red.). *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*, *Soil Sci. Soc. Am.*, 775-833, 1994.
46. **Tabatabai M.A., Bremner J.M.:** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1, 301-307, 1969.
47. **Tarafdar J.C., Claassen N.:** Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*, 5, 308-312, 1988.
48. **Van Aarle I.M., Olsson P.A., Soderstrom B.:** Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia*, 93 (1), 17-24, 2001.
49. **Zvjagincev D.G., Asseva I.V., Babjeva I.P., Mirčink T.G.:** *Metody počvennoj mikrobiologii i biochemiji*. Izd. Mosk. Univ., Moskva, 1980.
50. **Żyła K., Kujawski M.:** Enzymatyczna defitynicacja żywności i pasz przez fosfatazy grzybni odpadowej *Aspergillus Niger* „Z”. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 10, 9-11. 1989.

## METHODS OF DETERMINATION OF PHOTOSPHTASE ACTIVITY

*Elżbieta J. Bielińska*

Institute of Soil Science and Environmental Management, University of Agriculture  
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin  
e-mail: [tantal@agros.ar.lublin.pl](mailto:tantal@agros.ar.lublin.pl)

**Abstract.** The role of phosphatases in the phosphorus transformation in soil environment as an indicator of biological activity of that environment. Methods of determination of the activity of selected phosphatase enzymes.

**Key words:** Phosphatases in soils, their activity, methods of determination