

微池板比色法在多酚氧化酶和 β 葡萄糖苷酶研究中的应用*

王彬彬¹ 林启美² 陈源泉¹ 隋鹏¹ 高旺盛^{1†}

(1 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

(2 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193)

摘要 微池板比色法具有快速批量测定土壤酶活性的潜力, 将其应用在农田土壤纤维素和木质素分解有关的 β -葡萄糖苷酶(BG)和多酚氧化酶(PPO)活性测定及酶的温度敏感性(EQ₁₀)的研究, 尚未见报道。本文应用微池板比色法, 在获取缓冲液酸碱度、培养时间和匀浆液水土比优化参数基础上, 测定不同种植制度土壤(棉花连作和苜蓿-柳枝稷轮作)的 PPO 和 BG 活性及其温度敏感性, 评价微池板比色法在土壤酶学研究中的价值。结果表明: pH7 的缓冲液、2 h 的培养时间和匀浆液水土比(20:1)为最优的测定参数, 其既满足批量分析要求又可提高测定的准确性。棉花连作与苜蓿-柳枝稷轮作土壤的 PPO 活性没有显著性差异, 但 BG 酶活性轮作土壤显著高于连作土壤, PPO 和 BG 活性均随温度的升高而增加, 同时, 两种栽培制度土壤并没有引起两种酶的 EQ₁₀ 发生显著性的差异。本研究结果显示, 微池板比色法能够比较快速地同时测定多个土壤、多种酶活性, 可作为土壤酶学常规分析技术, 同时需要根据土壤的特性适度调整主要测定参数。

关键词 微池板比色法; 土壤; 多酚氧化酶; β 葡萄糖苷酶

中图分类号 S154 **文献标识码** A

土壤酶是土壤有机物质矿化和腐殖质化的动力, 准确测定土壤酶活性, 不仅对于了解土壤酶特性十分重要, 而且有助于深入研究了解营养元素循环转化过程与机理^[1]。传统的土壤酶活性测定方法由于操作步骤繁琐复杂, 费时费力, 无法满足批量测定土壤多种酶活性的需要, 严重限制土壤酶学及相关学科研究与发展^[2-3]。微池板酶活性测定方法(microplate, 简称微池板法)最早用于测定林地不同土层土壤酶活性^[4]。目前已构建了基于 4-羟甲基-7-香豆素(MUB)与对-硝基苯(pNP)衍生物为底物的微池板荧光法和微池板比色法^[1, 5-6], 微池板法突破了传统比色法一次土壤样品数最大为 50 的局限^[7]。

β -葡萄糖苷酶(BG)是参与碳循环的关键水解酶, 作为纤维素降解过程中限制性酶^[5], 对土壤不同管理措施有较强的敏感性^[8-10]。多酚氧化酶(PPO)主要通过微生物胞溶和土壤动物的排泄作用进入土壤, 参与木质素降解和有机质矿化等过程^[1]。已有研究结果显示, PPO 活性不仅与作用的

底物有关^[6], 而且受缓冲溶液酸碱度的影响^[11]。因此应用微池板法对土壤 BG 和 PPO 活性的探讨, 首先要确定合适的缓冲液酸碱度, 培养时间和土壤匀浆液水土比。

本研究以不同种植制度长期定位试验的土壤为供试材料, 用微池板比色法测定 BG 和 PPO 酶活性, 其目的在于: (1) 了解缓冲溶液酸碱度、培养时间和土壤匀浆液水土比对分析结果的影响, 确定合适的反应条件; (2) 比较分析不同种植制度土壤 BG 和 PPO 的特征, 一方面评价微池板比色法在测定土壤 BG 和 PPO 酶活性的价值, 另一方面探究土壤 BG 和 PPO 活性和温度敏感性(EQ₁₀)对种植制度的响应差异。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集及预处理

供试土壤采自河北石家庄中国科学院栾城农业生态野外试验站(东经 114°40', 北纬 37°50'), 试

* 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD16B15, 2012BAD14B03)和中国农业大学研究生科研创新专项(KYCX2010029)资助

† 通讯作者: 高旺盛, 男, 教授。E-mail: wshgao@cau.edu.cn

作者简介: 王彬彬(1983—), 男, 江苏南通人, 博士研究生, 主要从事循环农业研究。E-mail: otwar@163.com

收稿日期: 2011-08-01; 收到修改稿日期: 2011-12-18

验于 2003 年开始,土壤类型为褐土类灰黄土种。

试验设 2 个处理,分别为棉花连作和苜蓿—柳枝稷轮作,棉花为典型木质化类残渣为主的经济作物,苜蓿和柳枝稷是典型的纤维素类残渣为主的能源作物,棉花在 4 月下旬播种,10 月下旬收获;苜蓿—柳枝稷轮作处理 2003 年至 2006 年为苜蓿单作,2007 年至 2010 年为柳枝稷单作。每个处理 3 个重

复,小区面积 30 m^2 ($4 \text{ m} \times 7.5 \text{ m}$),随机区组排列,隔离带宽 1 m。于 2010 年 10 月用土钻($\phi 5 \text{ cm}$)采取 0 ~ 20 cm 土层土壤样品三份,混合后迅速过 2 mm 筛,部分鲜样风干后测定 pH、有机碳、机械组成(表 1),余下样品 4°C 下保存,用于测定酶活性。土壤有机碳用重铬酸钾外加热法测定,pH 用 1:2.5 水土比浸提法测定,机械组成用微吸管法测定^[12]。

表 1 土壤基本性质

Table 1 Basic properties of the soil tested

种植制度 Cropping system	pH	有机碳 Organic Carbon (g kg^{-1})	机械组成 Soil mechanical composition (%)		
			砂粒 Sand >0.05 mm	粉粒 Silt 0.05 ~ 0.002 mm	黏粒 Clay <0.002 mm
棉花连作 Continuous cropping of cotton	7.1 ± 0.1	8.1 ± 1.0	15	66	19
苜蓿-柳枝稷轮作 Alfalfa-switchgrass rotation	7.2 ± 0.1	7.3 ± 0.6	21	61	18

1.2 酶活性测定流程

微池板比色法测定酶活性,参考 Sinsabaugh^[13] 测定流程和 Allison^[6,14] 的方法。首先对 96 孔微池板进行编号,缓冲液加入区标识为 B,土壤悬浮液加入区标识为 H,底物加入区标识为 S,土壤悬浮液和底物共同加入区标识为 AS,同一微板左部 48 池孔测定 β 葡萄糖苷酶(BG),右部 48 孔测定多酚氧化酶(PPO)。多酚氧化酶的底物为 50 mmol L^{-1} 1,2,3-邻苯三酚(含 50 mmol L^{-1} 的 EDTA-Na), β 葡萄糖苷酶底物为 5 mmol L^{-1} 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)。

称取 1.00 g 土壤于 50 ml 塑料离心管中,加入一定体积的醋酸缓冲液,加盖后用涡旋仪混拌 2 min,倒入 10 cm 培养皿中,用 8 通道移液器吸取 50 μl 土壤匀浆液到微池板 AS 和 H 孔区,上样操作需在 2 min 内完成,以减小悬浮液分层而产生的取样误差,再吸取 200 μl 和 150 μl 醋酸缓冲液,分别加到 B 和 H 孔区。接着在 S 区和 AS 区加入 150 μl 底物,最后在 S 区补入 50 μl 醋酸缓冲液,盖上微池板盖,放入微板振荡机上振荡,PPO 高度振荡(2800 r min^{-1})2 min,BG 中度振荡(2000 r min^{-1})2 min,将微池板转入恒温培养箱中 20°C 下培养一定时间,此板即为反应板。另取新微池板作为上机板,提前用 BioTek 酶标仪测定上机板背景读数,以

消除板本底值干扰,再吸取培养结束后反应板中的上清液 100 μl 到上机板中。 β -葡萄糖苷酶(BG)上机板每个孔中预先加入 1 mol L^{-1} NaOH 5 μl ,用于终止水解酶 BG 的反应和提高吸光度值,多酚氧化酶(PPO)则直接转板读数,上机前擦拭上机板底部,PPO 和 BG 均选取波长 405 nm。

BG 标准曲线用 50 mmol L^{-1} pH 5.3 醋酸缓冲液配置,浓度为 0.2,0.4,0.5,0.6 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ 的 pNP 标准液,每个微板孔中加入 100 μl 标准液和 1 mol L^{-1} NaOH 5 μl ,标准曲线每个点 6 次测定重复,换算吸光系数。PPO 的吸光系数取值 0.403^[6]。

土壤酶活性用于土 pNP 浓度计量($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$),按照下式计算:

$$\text{酶活性} \quad (\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}) = \frac{\text{OD}}{[\text{EC}/V_0 \times \text{HR} \times \text{M} \times V_{\text{H}}]}$$

式中,OD 为吸光度,OD = AS - [(S + H + B)]; AS 为样品吸光值;S 底物吸光值;H 土样吸光值;B 缓冲液吸光值;EC 为吸光系数($\mu \text{ mol ml}^{-1}$); V_0 为反应系统总体积,0.2 ml;HR 为培养时间,2 h;M 为单位体积匀浆液土样质量, g ml^{-1} ; V_{H} 为参与反应的土壤匀浆液体积,0.05 ml。

1.3 反应参数的优化

1.3.1 缓冲系统酸碱度 缓冲液酸碱度设定 4 个梯度,分别为 pH 5.3、6.5、7.5、9.5,底物溶液

pH 7, 水土比为 20, PPO 与 BG 均在 20℃ 培养 2 h, 供试土壤为春棉处理, 每个处理 3 次重复, 各点做 6 次测定重复。测定步骤均与本文 1.2 节所述保持一致。

1.3.2 培养时间 设定 4 个培养时间, 分别为 2、4、14、24 h, 缓冲液和底物 pH 7, 水土比 20, 供试土壤为春棉处理, 每个处理 3 次重复, 各点做 6 个测定重复。测定步骤均与本文 1.2 节所述保持一致。

1.3.3 土壤匀浆液水土比 设定 5 等级水土比, 分别为 40、30、20、10、5, 缓冲液和底物溶液 pH 7, PPO 与 BG 均在 20℃ 培养 2 h, 供试土壤为春棉处理, 每个处理 3 次重复, 各点做 6 个测定重复。测定步骤均与本文 1.2 节所述保持一致。

1.4 酶温度敏感性 (EQ_{10})

操作步骤同上, 培养温度分别 20、30 和 50℃ 培养 2 h, 缓冲液和底物 pH7, 水土比为 20。根据下式计算 $EQ_{10}^{[10]}$:

$$EQ_{10} = \exp^{(K \times 10)}$$

式中, K 为酶活性温度敏感系数, $K = (\ln R_{30} - \ln R_{20}) / 10$, R_{30} , R_{20} 为 30℃ 和 20℃ 的土壤酶活性。

1.5 数据统计分析

所有数据用烘干土壤质量表示, 不同酸度缓冲溶液酶活性及温度敏感性测定重复均为 6 次。数据以平均值 \pm 标准差表示, 全文数据处理采用 SPSS 11.5, 数据变异性检验采用 Frequencies 频数分析, 方差检验采用 One-way ANOVA, 多重比较采用 General linear Model 中的 Multivariate 过程, 图表制作采用 Sigmaplot 9.0。

2 结果与讨论

2.1 pNP 标准曲线及变异性检验

pNP 标准物浓度系列 405 nm 处的吸光值 OD 的标准曲线如图 1, pNP 浓度在 0 ~ 0.8 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ 时

线性关系良好, 吸光系数为 4.47 ($R^2 = 0.997$, $p < 0.001$), 推算 1 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ pNP 标准物吸光系数为 4.47。0.2 ~ 0.8 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ 各浓度对应的 OD 变异系数 CV ($n = 6$) 分别为 1.54%、1.77%、1.66%、3.12%、2.14%, 表明微池板比色法测定值离散性低, 重复性高。

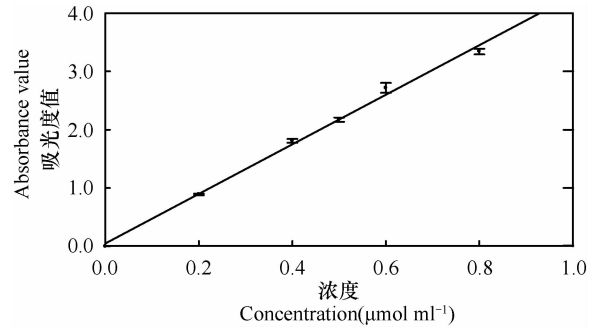


图 1 pNP 标准物浓度标线

Fig. 1 Concentration curve of pNP standard matter

2.2 缓冲液酸碱度对酶活性的影响

缓冲溶液的 pH 显著地影响 BG 和 PPO 活性 (表 2), 两种酶活性均在 pH 6.5 ~ 7.5 之间较高, pH 过高或过低, 均降低 PPO 活性; BG 受 pH 影响更大, 在 pH 5.3 时, BG 仅只有 pH 6.5 时的 41% ($p < 0.05$)。因此, 为满足微池板法大通量测定时缓冲液的一致性, 推荐选取 pH 7 的缓冲液。

已有的微池板测定方法中, 研究者推荐的缓冲液酸碱度, 有 pH 5^[15]、pH 7^[6]、pH 6.5^[16], pH 波动在 4.5 ~ 7 范围, 而本研究发现 BG 和 PPO 均在接近土壤酸碱度时获得较大的活性, 因此微池板法测定中需根据土壤特性和底物, 调整缓冲液酸碱度。在自然状态下, 反应体系酸碱性对酶活性的影响主要通过酶的构型、固体表面的吸附性、底物溶解性和辅因子活性等发挥作用。同一种酶在不同酸碱缓冲体系表现出不同的酶活性, 究其根本, 原因在于不同土壤生境影响微生物区系, 导致微生物分泌的 BG 和 PPO 同功酶数量和种类的酸碱喜好性出现差别^[11]。

表 2 不同 pH 缓冲液土壤 β -葡萄糖苷酶和多酚氧化酶活性的差异

Table 2 Difference between β -glucosidase and phenol oxidase in activity in soils different in pH buffer solution

pH	多酚氧化酶 Phenol oxidase ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase BG ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
5.3	6.09 \pm 0.49 b	0.07 \pm 0.02 b
6.5	9.35 \pm 0.68 a	0.17 \pm 0.03 a
7.5	9.58 \pm 0.45 a	0.16 \pm 0.04 a
9.5	8.93 \pm 0.88 a	0.17 \pm 0.02 a

注: 所有数据为平均值 \pm 标准差, 同一列比较, 字母表示显著性在 $p \leq 0.05$ 水平 Note: All the vaules in the table are means \pm standard deviation, each row are signifiant different at $p \leq 0.05$

2.3 培养时间对反应产物浓度的影响

选择合适的培养时间对准确测定酶活性至关重要。在选取的4个时间段中(图2),硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷分解后的pNP产物的浓度产生速率在2~24 h内基本稳定,同时,培养2~24 h的产物浓度的标准差分别为0.03、0.04、0.09、和0.17 $\mu\text{mol g}^{-1}$,时间延长增大了标准差,说明培养时间延长结果精度下降。多酚氧化酶(PPO)的产物浓度与培养时间关系与 β -葡萄糖苷酶基本相同,但其24 h的取样点,产物显色浓度过高,结果受到较大影响,故没有将该点浓度标识在图中(图2)。以上结果表明,微池板法测定过程中,培养时间在14 h内即可,本研究最终选取了2 h的培养时间,保证了测定的准确度和快速性。必须强调,微池板法在测定过程中,培养时间与缓冲液的类型有直接关系,如选用碳酸氢钠缓冲液时1,2,3-邻苯三酚将自动氧化变色,反应物浓度提升速率远高于醋酸钠缓冲液,因此变换缓冲液时必须重新校正培养。

2.4 水土比对酶活性的影响

微池板法测定过程中的一个特点是土壤样品用量非常小,仅需1~2 g土样,因此在将土壤与缓冲液制备成匀浆液过程中水土比选择同样需谨慎。如表3,五个水土比对酶活性影响的测定结果对比发现,水土比对 β -葡萄糖苷酶(BG)活性的影响有限,各浓度间差异不显著;而多酚氧化酶(PPO)则相对更易受到水土比的影响,水土比20~40酶活性结果差异均不显著,但水土比5和10时反而测定结果出现明显下降,可通过微池板法测定酶活性的原理解释。微池板法测定土壤匀浆液的酶活性其实是土壤的潜在最大非胞内酶活性^[7],即游离态和吸附

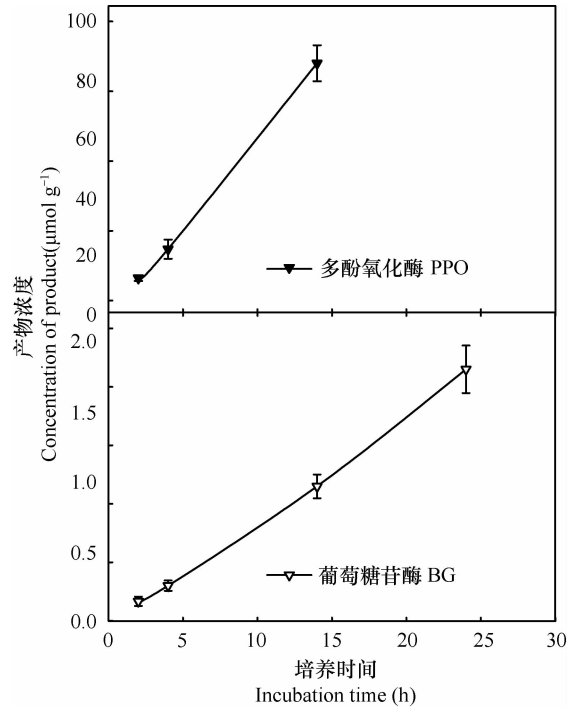


图2 培养时间对产物浓度的影响

Fig. 2 Effect of duration of incubation on concentration of product in assay

态的胞外酶活性,充分的水土比在匀浆过程中可以将吸附在黏粒或微小有机物上的吸附酶分散到匀浆液中,而多酚氧化酶相对于水解酶BG分子量更大^[1],易吸附在黏粒或有机物上,因此不充分的水土比实际上降低了土壤的最大潜在酶活性。同时值得提醒,匀浆液浓度过高时,八通道移液器很难做到均匀的吸样,此时即使将枪头剪去部分也很难保证微池板上各孔匀浆液的均匀性。因此在合适和经济的角度选择20:1的水土比。

表3 匀浆液浓度对酶活性的影响

Table 3 Effect of ratio of buffer-to-sample on activities of enzyme

水土比 Water soil ratio	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
40	6.93 ± 0.81 a	0.20 ± 0.03 a
30	6.68 ± 0.99 a	0.22 ± 0.07 a
20	6.88 ± 1.02 a	0.27 ± 0.09 a
10	4.33 ± 0.40 b	0.21 ± 0.04 a
5	3.08 ± 0.36 c	0.26 ± 0.01 a

注:所有数据为平均数 ± 标准差,同一列比较,字母表示显著性在 $p \leq 0.05$ 水平 Note: All the vauls in the table are means ± standard deviation, each row are signifiant different at $p \leq 0.05$

2.5 酶的温度敏感性特征

棉花连作与苜蓿-柳枝稷轮作土壤多酚氧化酶(PPO)活性均随温度上升而提高,50℃时的酶活性是20℃时的2.7倍和2.5倍(图3a);轮作制度与连作制度PPO活性的差异20℃时为8.5%,30℃为10.3%,50℃下降到1.5%。两种种植制度PPO的EQ₁₀没有显著性差异,分别为1.23 ± 0.04和1.05 ± 0.19。多重方差分析显示,PPO对种植制度不敏感($p = 0.88$),仅对温度敏感($p < 0.001$)。以往研究表明,棉花连作抑制了土壤氧化酶活性^[17],而蔬菜连作促进了设施农田土壤氧化酶活性^[18],但均指出PPO活性差异与连作年限和连作作物类型密切相关。设施蔬菜连作7a的

PPO活性大于连作2a的^[18],而棉田连作10a后土壤PPO活性升高^[17]。本研究中苜蓿-柳枝稷轮作制度土壤PPO活性与棉花连作差异不显著,再次表明PPO活性在连作中因种植品种和年限存在差异。

两个土壤的 β -葡萄糖苷酶活性(BG)有明显的差异(图3b),苜蓿-柳枝稷轮作土壤的BG酶活性显著高于棉花连作土壤($p < 0.05$),且随着温度的升高,这种差异扩大,20℃时差异为28%,50℃达到35%。两个土壤的酶活性均随温度的升高而增强,温度从20℃升高至50℃,酶活性分别提高2.9倍和2.7倍。两个土壤的EQ₁₀没有显著性差异,分别为2.98 ± 0.200和3.04 ± 0.539。

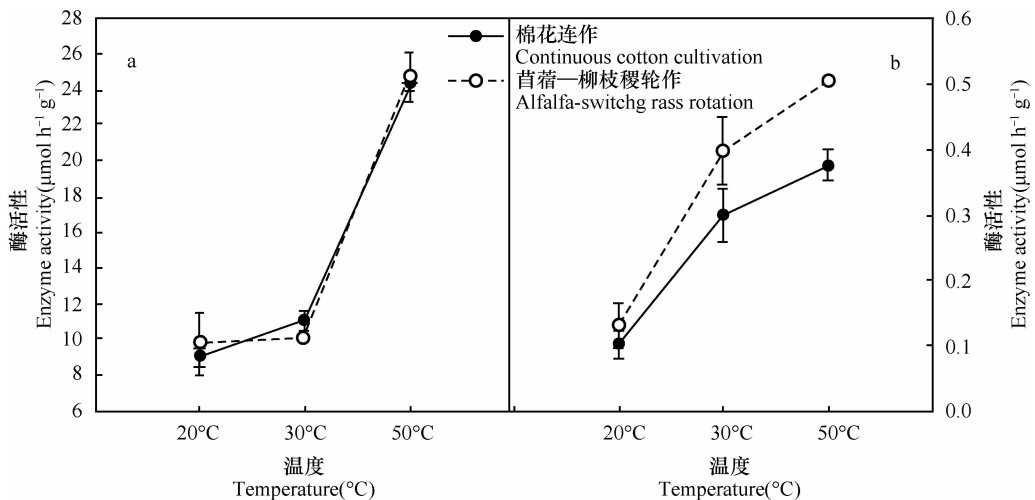


图3 棉花连作和苜蓿-柳枝稷轮作土壤多酚氧化酶(PPO)(a)和 β -葡萄糖苷酶(BG)(b)温度敏感性

Fig. 3 Temperature sensitivity of PPO (a) and BG (b) enzyme in soils under continuous cropping of cotton and alfalfa-switchgrass rotation, separately

显然,与PPO比较,BG酶活性易受到种植制度和温度的影响,且EQ₁₀更高,同功酶的变化一定程度上决定了相关酶的温度敏感性^[19],说明土壤中BG同功酶种类更多,且容易变化。已有研究表明,水解酶BG温度敏感性EQ₁₀可从1.7变化到3.2^[10],PPO温度敏感性部分接近于1.5,本研究EQ₁₀在此范围中。PPO和BG是土壤中有机碳转化极其重要的酶类,其同功酶数量种类与活性,形成了不同的温度敏感性^[19-21],直接关系到有机物质分解转化,以及养分释放,造成了土壤碳库不同组分降解速率的差异^[21]。研究者对土壤氧化酶与土壤有机碳总量间相关性的结论并不一致,存在正相关^[22-23]和负相关的两种观点^[24],说明土壤碳循环酶系的活性或温度敏感性对土壤有机碳的稳定性的影响存在变异性。

综上所述,微池板比色法能够比较快速地同时测定多个土壤、多种酶活性,每个土样可维持在6次及以上的测定重复,结果准确性强于传统方法;pH7的缓冲液、2h的培养时间和匀浆液水土比(20:1)为最优的测定参数,既满足批量分析要求又可提高测定的准确性;种植制度对不同酶的影响存在差异,且对不同酶的温度敏感性有区别,这可能反映出土壤酶的多样性和易变性,其对于有机碳转化的作用与意义,有待进一步深入研究。

致谢 感谢 Steven D. Allison 教授在微池板比色法研究中提供的帮助。

参考文献

- [1] Sinsabaugh R L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42:

- 391—404
- [2] Steven C. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50:165—173
- [3] 张丽莉, 武志杰, 陈利军, 等. 微孔板荧光法对土壤糖酶活性的测定研究. *光谱学与光谱分析*. 2009, 29(5):1 341—1 344. Zhang L L, Wu Z J, Chen L J, et al. A microplate fluorimetric assay for sacchariase activity measurement (In Chinese). *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29(5):1 341—1 344
- [4] Wirth S J, Wolf G A. Microplate colourimetric assay for endoacting cellulase, xylanase, chitinase, 1, 3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24:511—519
- [5] Allison S D, McGuire K L, Treseder K K. Resistance of microbial and soil properties to warming treatment seven years after boreal fire. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42:1 872—1 878
- [6] Allison S D, Jastrow J D. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 3 245—3 256
- [7] Marx M C, Wood M, Jarvis S C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33:1 633—1 640
- [8] Saiya-Corka K R., Sinsabaugh R L, Zak D R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 2002, 34: 1 309—1 315
- [9] Acosta-Martinez V, Maysoon M M, Merle F V. Microbial communities and enzyme activities in soils under alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37:41—52
- [10] Wallenstein M D, McMahon S K, Schimel J P. Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology*, 2009, 15:1 631—1 639
- [11] Turner B L. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(19):6 485—6 493
- [12] 鲍士旦, 土壤农化分析. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000. Bao S D. Analysis of soil agricultural chemistry (In Chinese). 3 rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [13] Sinsabaugh R L, Reynolds H, Long T M. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32:2 095—2 097
- [14] Allison S D, Czimczik C I, Treseder K K. Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest. *Global Change Biology*, 2008, 14:1 156—1 168
- [15] Allison S D, Vitousek P M. Extracellular enzyme activities and carbon chemistry as drivers of tropical plant litter decomposition. *Biotropica*, 2004, 36(3):285—296
- [16] Benitez E, Nogales R, Campos M, et al. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology*, 2006, 32:221—231
- [17] 刘建国, 张伟, 李彦斌, 等. 新疆绿洲棉花长期连作对土壤理化性状与土壤酶活性的影响. *中国农业科学*, 2009, 42(2):725—733. Liu J G, Zhang W, Li Y B, et al. Effects of long-term continuous cropping system of cotton on soil physical-chemical properties and activities of soil enzyme in oasis in Xinjiang (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(2):725—733
- [18] 吴凤芝, 孟立君, 王学征. 设施蔬菜轮作和连作土壤酶活性的研究. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(4):554—558. Wu F Z, Meng L J, Wang X Z. Soil enzyme activities in vegetable rotation and continuous cropping system of under Shed Protection (In Chinese). *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12(4):554—558
- [19] Koch O, Tschirko D, Kandeler E. Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemical Cycle*, 2007, 21(4):1—11
- [20] Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F, Leiros M C. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39:311—319
- [21] Wallenstein M D, Allison S D, Ernakovich J, et al. Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes// Shukla G, Varma A. *Soil Enzymology*. New York: Springer Publish, 2011:245—259
- [22] 刘合明, 刘树庆. 冀西北栗钙土有机碳、酶活性及土壤呼吸强度特征研究. *土壤学报*, 2009, 46(4):741—745. Liu H M, Liu S Q. Characteristics of soil organic carbon, enzyme activities and soil respiration in chestnut soil of Hebei Province (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(4):741—745.
- [23] 张继光, 秦江涛, 要文倩, 等. 长期施肥对红壤旱地土壤活性有机碳和酶活性的影响. *土壤*, 2010, 42(3):364—371. Zhang J G, Qin J T, Yao W Q, et al. Effects of long-term fertilization on soil active organic carbon and soil enzyme activities in upland red soils (In Chinese). *Soils*, 2010, 42(3):364—371
- [24] Zhang Y M, Zhou G Y, Wu N, et al. Soil enzyme activity changes in different-aged spruce forests of the eastern Qinghai-Tibetan Plateau. *Pedosphere*, 2004, 14(3):305—312

APPLICATION OF MICROPLATE COLORIMETRIC METHOD IN DETERMINING ACTIVITIES OF POLYPHENOL OXIDASE AND β -GLUCOSIDASE IN SOIL

Wang Binbin¹ Lin Qimei² Chen Yuanquan¹ Sui Peng¹ Gao Wangsheng^{1*}

(1 College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

(2 College of Resources and Environment Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The microplate colorimetric method has the potential of fast batch-determining activity of soil enzymes. However, so far in China, nothing has been reported on use of this method in measuring activities of lignin-and-cellulose-decomposing enzymes, i. e. polyphenol oxidase (PPO) and β -glucosidase (BG), in the soil and in studying their sensitivity to temperature (EQ_{10}). In this study, based on optimized acidity of the buffer solution, duration of the incubation and buffer/sample ratio of the slurry, the microplate colorimetric method was used to measure activities of the two enzymes in soils under two different farming systems, i. e. consecutive cropping of cotton and alfalfa-switchgrass rotation, and their sensitivity to temperature, and furthermore, its value to the study of soil enzymes was assessed. Results demonstrate that pH 7 of the buffer solution, 2 hours of the incubation and 20:1 of the ratio were the optimal parameters for the test, satisfying both the requirements for batch-analysis and accuracy of the analysis. No significant different was observed between the two cropping systems in soil PPO activity. However, BG activity was much higher in the soil under rotation than under consecutive cropping of cotton. Nevertheless, the two enzymes became more active with rising temperature. The EQ_{10} values of BG and PPO did not vary much with cultivation systems. It is, thus, concluded that the microplate technique can be used as a routine analytic technique to measure quite rapidly a number of soils and enzymes at the same time in the study of enzymes. Meanwhile, it is necessary to adjust some major parameters properly for use of the microplate method in light of properties of the soil samples.

Key words Microplate colorimetric method; Soil; Polyphenol oxidase; β -glucosidase