

外源铜对土壤果树系统中酶活性影响的研究*

刘春生 常红岩 孙百晔 孙玉焕 叶优良

(山东农业大学资环学院, 泰安 271018)

张 福 锁

(中国农业大学资环学院, 北京 100009)

摘 要 利用褐土和红富士苹果嫁接苗为供试材料, 研究外源铜对土壤—苹果树系统中酶活性的影响。结果表明, 低量的外源铜能使果树叶片的过氧化氢酶、多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶及根系过氧化氢酶的活性加强, 而高量铜使活性大幅度降低, 加入钙铁后在一定程度上使抑制缓解。土壤过氧化氢酶的活性与外源铜量具显著的曲线相关性, ($y = x / (-11.26 + 0.75x)$, $r = 0.9955^{**}$), 蔗糖酶活性与土壤施铜量呈 Logistic 函数关系($y = 2.95 / (1 + 0.57 \exp(-5.02 \times 10^{-5}x))$, $r = -0.9820^{**}$)。脲酶对铜过量非常敏感, 大于 100mg kg^{-1} 的各处理均未测出其活性。

关键词 外源铜, 土壤, 苹果树, 酶活性

中图分类号 X503.23

铜既是植物生长发育必需的微量营养元素, 又是环境污染的重金属元素。它是多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶等多种酶类的组成成分之一, 因此, 它对作物正常的生理代谢及产量的提高有重要意义。但由于作物正常生长需要量少, 且土壤和空气中含有一定量的铜, 所以人为过程(污水灌溉、使用污泥和农药、开矿等)增加到土壤中的铜经常会给作物生长带来危害。含铜杀菌剂(蓝矾、波尔多液)是国内外果园使用历史较久的常用农药, 用量大且频度高, 已有报道表明施于土壤中的铜只有极少一部分可被水淋溶, 因此果园土壤中的铜逐年积累, 高于背景值几到几十倍, 甚至几百倍。J M Hirst 早在 1961 年就报道过英国 Wisbech 附近苹果园土壤铜严重积累的问题^[1]。Josania Santana Lima 报道巴西可可种植园使用波尔多液 0、5、16 年后表层土壤的含铜量分别为 18.6、464.7 和 993.3 mg kg^{-1} ^[2]。另有报道, 由于长期使用波尔多液, 法国部分葡萄园土壤含铜量高达 1280mg kg^{-1} , 英国部分苹果园土壤含铜量高达 1500mg kg^{-1} 土。这种高铜浓度的果园严重影响了果树的正常生长发育, 造成减产, 最终导致土地废弃, 破坏了生态环境平衡, 危害了人类的身体健康。果园土壤和果树生态系统中的各种酶类在调节土壤养分的转化与吸收、促进果树生长和代谢方面有重要作用, 我们在全面调查果园土壤铜素累积的基础上, 进行了一

* 山东省自然科学基金资助(批准号 Y98D18066)项目

收稿日期: 2000-12-31; 收到修改稿日期: 2001-08-26

系列的大田和盆栽试验, 以期为维持果园生态体系中铜元素的循环平衡、指导果树铜毒害的矫正及果园含铜农药的正确使用提供理论依据, 本文仅对外源铜对土壤果树系统中酶活性的影响部分进行探讨。

1 材料与方法

本试验供试土壤为褐土, 取自山东临朐县冶源镇老崖崮村, 其地力在当地属中等水平。供试材料为一年生红富士嫁接苗, 以 $25 \times 30 \text{ cm}$ 的钵钵, 每钵装土 17 kg 栽植。土壤施铜设六个量级(以纯铜计), 分别为 0 、 50 、 100 、 200 、 300 、 400 mg kg^{-1} 土, 文中分别用 $\text{Cu}0$ 、 $\text{Cu}50$ 、 $\text{Cu}100$ 、 $\text{Cu}200$ 、 $\text{Cu}300$ 、 $\text{Cu}400$ 表示。在高质量级 300 mg kg^{-1} 土和 400 mg kg^{-1} 土的处理上分别加钙、铁的 $\text{Ca } 200 \text{ mg kg}^{-1}$ 土、 $\text{Ca } 400 \text{ mg kg}^{-1}$ 土、 $\text{Fe } 200 \text{ mg kg}^{-1}$ 土、 $\text{Fe } 400 \text{ mg kg}^{-1}$ 土的处理, 分别用 $\text{Cu}3\text{Ca}2$ 、 $\text{Cu}3\text{Ca}4$ 、 $\text{Cu}4\text{Ca}2$ 、 $\text{Cu}4\text{Ca}4$ 、 $\text{Cu}3\text{Fe}2$ 、 $\text{Cu}3\text{Fe}4$ 、 $\text{Cu}4\text{Fe}2$ 、 $\text{Cu}4\text{Fe}4$ 表示, 共计 14 个处理, 4 次重复。以含 N、P、K 各 15% 的复合肥作肥底。其中, 铜以 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、钙以 CaCO_3 、铁用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的形式加入土壤。

1998 年 3 月在山东农业大学农化网室栽植, 1999 年 10 月收获。叶片和根系过氧化氢酶的测定用过氧化氢分解量测定法^[3], 根据 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定 H_2O_2 与 KI 反应生成的 I_2 , 以每分钟每 g 鲜样分解的 H_2O_2 的 mg 数表示; 抗坏血酸氧化酶用碘量滴定法测定^[3], 以每分钟每 g 鲜叶消耗的抗坏血酸的 mg 数表示; 多酚氧化酶通过测定酚类物质氧化的抗坏血酸的量来测定^[3], 以每 g 鲜叶每分钟氧化抗坏血酸的 μg 数表示。土壤过氧化氢酶采用 J L Johnson 和 K L Temple 法测定^[4], 用滴定 H_2O_2 消耗的 $0.02 \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4$ 的 ml 数表示其活性; 脲酶用扩散法测定, 以培养 15h 后每 g 土转化生成的氨态氮的 mg 数表示; 蔗糖酶用碘量法测定, 以 37°C 下培养 24h 后每 g 土所消耗的 0.1 mol L^{-1} 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的 ml 数表示, 根系活力按白宝璋等改良的 TTC 法测定^[5]。

2 结果与分析

2.1 外源铜对苹果树体内酶活性的影响

2.1.1 外源铜对苹果树体内过氧化氢酶活性的影响 过氧化氢酶是一个植物体内广泛存在的含铁酶, 表 1 列出了不同时期不同施铜水平下苹果叶内过氧化氢酶的活性变化。由表可看出, 在 $\text{Cu}100$ 的范围内, 过氧化氢酶的活性变化不大, 三处理差异不显著, 大于 $\text{Cu}100$ 以后的处理过氧化氢酶活性锐减, 如 1998 年 10 月份, $\text{Cu}400$ 的处理过氧化氢酶的活性仅为对照的 23.9%。说明低量铜浓度不会造成机体过氧化氢酶活性的损害, 但高量铜($\geq \text{Cu}200$ 水平)时, 苹果叶片过氧化氢酶活性明显受到抑制。两年的测定结果都与外源铜水平呈极显著的负相关关系。

高量铜水平下加钙和铁处理对过氧化氢酶的活性有表现提高的作用(见表 2), 高量的钙铁又好于同等条件的低量钙铁处理。图 1 是对不同铜处理下施加钙、铁的效果比较。可以看出, 在 $\text{Cu}400$ 下, 加同量的钙、铁(200 mg kg^{-1} 土、 400 mg kg^{-1} 土)时, 铁改善铜抑制的效果均好于钙; $\text{Cu}300$ 下加高量钙、铁时(400 mg kg^{-1} 土), 铁的效果好于加同量钙, 而加低量钙、铁时(200 mg kg^{-1} 土), 铁的效果却不如钙。可能是由于苹果体内吸收机制受多种因素的影响, 而铁又是其中一个重要因素之一, 只有加入较大剂量的铁时, 过氧化氢酶的活性才能增加, 因而有报道称, 过氧化氢酶的活性与作物铁营养状况有很好的 consistency^[6]。

表 1 不同铜水平下苹果叶片过氧化氢酶活性的变化

Table 1 Changes in peroxidase activity in apple leaves at different Cu levels ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$, 20°C)

时间 Time	处 理 Treatment						相关系数 <i>r</i>
	Cu0	Cu50	Cu100	Cu200	Cu300	Cu400	
1998. 10. 19	56.9aA	59.3aA	56.8aA	38.4bA	25.3cB	13.6dB	-0.9779 [*]
1999. 05. 19	37.3aA	30.8aAB	36.2aA	19.8bBC	9.8cC	9.2cC	-0.9484 [*]

注: 不同的小写字母表示 5% 和大写字母表示 1% 差异显著性水平, 下同。

表 2 钙、铁对高铜处理下苹果叶片过氧化氢酶活性的影响

Table 2 Effect of Ca and Fe on peroxidase activity in apple leaves with high copper treatment ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$, 20°C)

时间 Time	处 理 Treatment							
	Cu3Ca2	Cu3Ca4	Cu4Ca2	Cu4Ca4	Cu3Fe2	Cu3Fe4	Cu4Fe2	Cu4Fe4
1998. 10. 19	27.0	36.6	20.4	34.7	39.6	48.5	29.4	41.3
	dC	bcB	eD	cBC	bcB	aA	dC	bB
1999. 05. 19	25.2	24.5	11.0	25.4	16.2	28.0	15.5	27.4
	abAB	abAB	cB	abAB	bcAB	aA	bcAB	aA

根部的过氧化氢酶呈现出与叶片相似的规律。图 2 显示的是盆栽苹果收获时所测得的生长根的酶活性与土壤外源铜之间的关系。由图可见, 根系过氧化氢酶活性明显随施铜量的增加而呈指数关系降低。

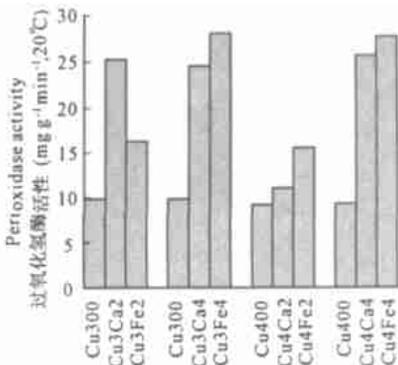


图 1 高铜处理下施加钙、铁对苹果叶片过氧化氢酶活性的影响

Fig. 1 Effect of adding Ca or Fe on peroxidase activity in apple leaves at high copper level

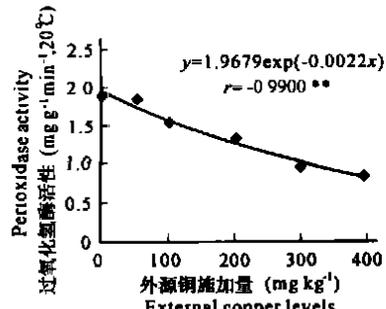


图 2 外源铜施加量与根系过氧化氢酶活性的关系

Fig. 2 The correlation of the peroxidase activity in root with the external copper level

由图 2 还可看出, 土壤施加铜量在 50mg kg^{-1} 以内, 根系过氧化氢酶活性变化不大。而大于 100mg kg^{-1} 后, 过量铜将抑制根系过氧化氢酶的活性。也就是说, 植株体内过氧化氢酶对铜过量较敏感。本试验中大于 100mg kg^{-1} 的外源铜量开始抑制根系酶活性。

施加钙、铁显著提高了根系过氧化氢酶的活性(见图 3)。与叶片有所不同, 在 Cu300 下, 施加钙和铁均比只施加同量铜时的酶活性提高一倍左右, 两者对提高酶活性的作用差异不大; 而 Cu400 下, 加铁的处理优于加同量钙的处理。

2.1.2 外源铜对苹果叶片多酚氧化酶活性的影响 多酚氧化酶能将植物体内酚类物质氧化成醌, 是一种含铜的氧化还原酶。从测得的结果来看, 叶内多酚氧化酶与外源铜施

加量之间的关系如图 4 所示。

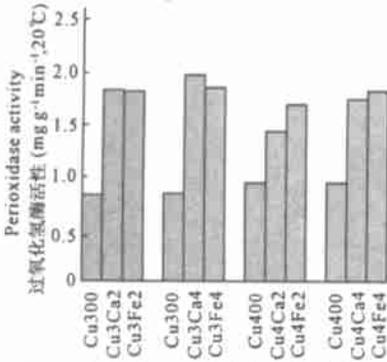


图 3 高铜处理下施加钙、铁对苹果根系过氧化氢酶活性的影响

Fig. 3 Effect of adding Ca or Fe on peroxidase activity in apple roots at high copper level

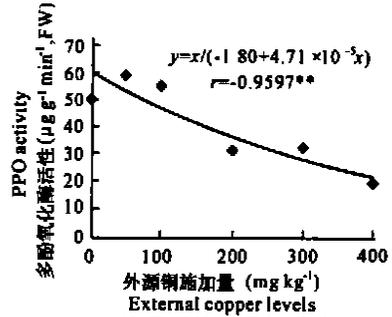


图 4 外源铜施加量与叶片多酚氧化酶活性的关系

Fig. 4 The correlation of the PPO activity in leaves with the external copper level

由图可知,在铜施加量为 50、100mg kg⁻¹时,多酚氧化酶活性似有升高现象,说明外源铜在一定施加范围内可以促进多酚氧化酶的活性。但大于 100mg kg⁻¹后,其活性则降低。这也可以说明铜毒害在代谢上对树体产生了一系列影响。

在高铜处理的基础上施加钙、铁可影响叶片中多酚氧化酶的活性(图 5)。在 Cu300 下,加低量的钙和铁对其活性的影响不大,Cu400 下,加钙和铁可以明显提高其活性。

2.1.3 外源铜对苹果叶片抗坏血酸氧化酶活性的影响 抗坏血酸氧化酶也是植物体内一个含铜酶,它参与植物体内的呼吸作用及氧化还原作用,是代谢过程中一种重要的酶类。抗坏血酸氧化酶与土壤施加铜量呈直线负相关关系(图 6)。

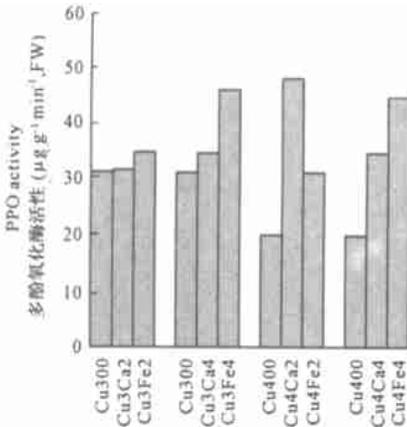


图 5 高铜处理下施加钙、铁对苹果叶片多酚氧化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of adding Ca or Fe on PPO activity in apple leaves with high copper treatments

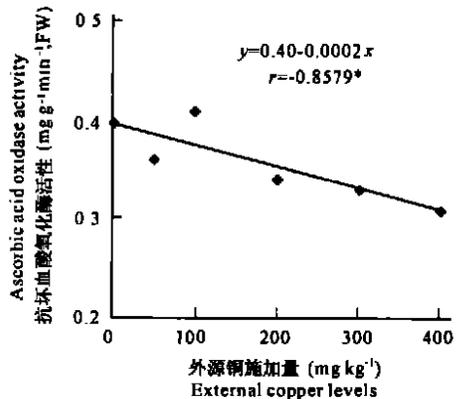


图 6 外源铜施加量与苹果叶片抗坏血酸氧化酶活性的关系

Fig. 6 The correlation of the ascorbic acid oxidase activity in apple leaves with the external copper level

随铜施加量的增加,抗坏血酸氧化酶的活性呈平稳的直线下降,但下降幅度不大,Cu400 下其活性仍为不施铜时的 77.5%,而有人在柑橘缺铜情况下测得抗坏血酸氧化酶

活性只有正常叶片的 18%，这说明铜的缺乏与过量都会抑制果树体内抗坏血酸氧化酶的活性。同样, 高铜浓度下施加钙、铁对抗坏血酸氧化酶的活性稍有提高(见图 7), 提高幅度最高的为 Cu3Fe4, 达 30.3%, 其次为 Cu4Fe4, 达到 29.0%。不论在 Cu300、还是 Cu400 下, 加铁的处理抗坏血酸氧化酶活性均比加同量钙的处理要高。

由以上分析可以看出, 铜过量对盆栽苹果树体内的代谢已造成了紊乱。我们知道, 酶是具有催化功能的蛋白质, 当铜加入量低时, 植株体内的铜会促进酶与底物结合, 使其活性增加, 而过量时, 铜与酶结合发生沉淀、络合等反应, 使酶类蛋白质变性、活性降低, 最终导致失活。使植株的呼吸、代谢等一系列活动均受到破坏, 这与我们测定的每克生长根每小时吸附的由 TTC 生成的 TTF 的 μg 数为代表的根系活力(图 8)较为一致。在施高铜的土壤中添加钙和铁, 在一定程度上可以减轻植株遭受的铜毒害, 使其酶活性有所提高, 但其代谢活动仍不及正常植株, 即施加钙和铁并不能够从真正意义上解除铜毒害。

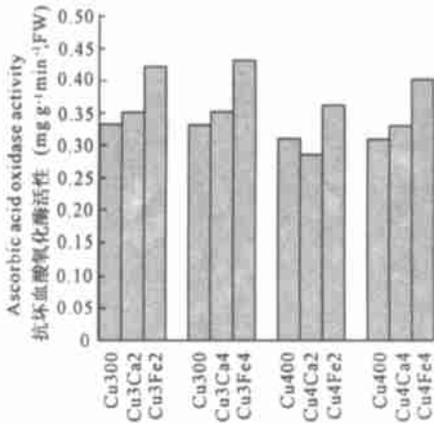


图 7 高铜处理下施加钙、铁对苹果叶片抗坏血酸氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effect of adding Ca or Fe on ascorbic acid oxidase activity in apple leaves with high copper treatments

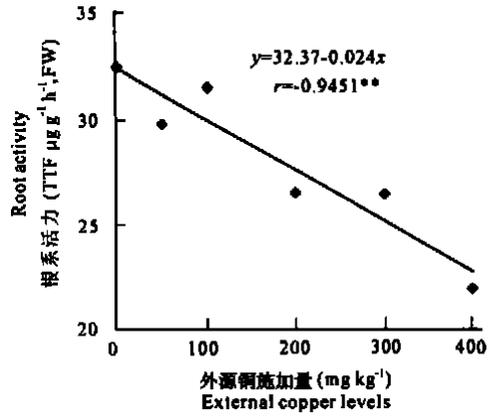


图 8 外源铜施加量与苹果根系活力的关系

Fig. 8 The correlation of the root activity with the external copper level

2.2 不同铜处理对土壤酶活性的影响

在土壤物质和能量代谢中, 氧化还原酶和水解酶类占有重要的地位, 其中又以过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶(转化酶)分布较为广泛, 它们的活性强弱决定了土壤中有有机、无机营养物质的转化速度。因此本研究于盆栽苹果树收获后测定了土壤中过氧化氢酶、蔗糖酶(转化酶)及脲酶活性(见表 3), 以确定土壤铜过量对土壤酶活性的影响程度。

表 3 不同的铜处理水平对土壤酶活性的影响

Table 3 Effect of different copper levels on soil enzyme activity

酶 Enzyme	处 理 Treatment					
	Cu0	Cu50	Cu100	Cu200	Cu300	Cu400
过氧化氢酶 (ml, 0.02mol L ⁻¹ KMnO ₄ g ⁻¹ 土)	1.75	1.80	1.67	1.62	1.44	1.32
蔗糖酶(ml, 0.1mol L ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ g ⁻¹ 土)	1.80	1.65	1.73	1.12	0.78	0.57
脲酶(NH ₃ - N, mg g ⁻¹ 土)	0.26	0.33	0.07	—	—	—

注: —表示未测出

2.2.1 不同铜处理对土壤过氧化氢酶活性的影响 过氧化氢酶是广泛存在于生物体和土壤中的一种氧化还原酶,它可以促进过氧化氢分解,有利于防止其对生物的毒害作用。分析结果(表3)经曲线拟合,发现土壤过氧化氢酶的活性与土壤外源铜量有很好的曲线相关性。回归方程模型为: $y(\text{H}_2\text{O}_2\text{酶}) = x/(-11.26 + 0.75x)$, $r = 0.9955^{**}$ 。

Cu50时,其活性稍有增加,以后施加铜量越大,过氧化氢酶活性渐低,最高施加量 400mg kg^{-1} 土的处理过氧化氢酶抑制率为24.6%,Cu200的处理仅比Cu0降低了7.4%,说明土壤过氧化氢酶较能耐受高量铜的毒害。铜是过氧化氢酶的激活剂,在低量范围内,适量的铜可以提高其活性(如表中Cu50),但过量的铜会对其活性产生抑制作用,使其活性减小。在高量铜浓度下施加钙和铁过氧化氢酶的活性(表4)有所提高,但仍处在较低水平上,与表3的结果比较并进行T检验,差异未达到显著性水平。看来铜对土壤和植株酶活性的影响机理是不同的。

表4 钙、铁对高铜处理下土壤过氧化氢酶活性的影响

Table 4 Effect of adding Ca or Fe on peroxidase activity in soil at high copper levels (ml, $0.02\text{mol L}^{-1}\text{KMnO}_4\text{ g}^{-1}$ 土)

处理 Treatment	Ca2	Ca4	Fe2	Fe4
Cu3	1.38	1.40	1.46	1.65
Cu4	1.21	1.50	1.30	1.55

注:Ca2表示施加钙 200mg kg^{-1} 土,其他类推,以下同。

2.2.2 不同铜处理对土壤蔗糖酶活性的影响 蔗糖酶,又称转化酶,是一种可以把土壤中蔗糖分子分解成能够被植物和土壤微生物吸收利用的葡萄糖和果糖的水解酶。经研究可知,蔗糖酶活性与外源铜量呈 Logistic 函数关系,回归方程为: $y(\text{蔗糖酶}) = 2.95/(1 + 0.57\exp(-5.02 \times 10^{-5}x))$, $r = -0.9820^{**}$ 。由表3可看出,在Cu100范围以内,土壤蔗糖酶活性随土壤施铜量的增加变化不明显;Cu100以后,其活性则大大降低。Cu400的处理蔗糖酶的活性为对照值的31.7%,Cu200的处理为对照值的62.2%。有人认为土壤蔗糖酶可以作为土壤重金属污染程度的指标^[7],其活性不低于对照值的75%为轻度污染;活性为对照值的50%~75%时为中度污染;50%以下时为严重污染。根据这一观点,在Cu200处理下,蔗糖酶活性为对照值的62.2%,土壤属于中度污染,Cu300以后则属于严重污染土壤了。高铜浓度下施加钙、铁对土壤蔗糖酶活性并没有较大改观(表5与表3比较)。

表5 钙、铁对高铜处理下土壤蔗糖酶活性的影响

Table 5 Effect of adding Ca and Fe on sucrose activity in soil at high copper levels (ml, $0.1\text{mol L}^{-1}\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{ g}^{-1}$ 土)

处理 Treatment	Ca2	Ca4	Fe2	Fe4
Cu3	0.81	0.70	0.48	0.55
Cu4	0.55	0.70	0.61	0.90

2.2.3 不同铜处理对土壤脲酶活性的影响 脲酶是分类名称为胺基水解酶的一些酶的通称,它是一种作用于线型酰胺的G-N键(非肽)的水解酶。从表3中可以看出,脲酶对铜过量非常敏感,仅能对Cu100以内的几个处理测出其活性,Cu100的处理土壤脲酶活性仅为对照的26.9%,Cu50的处理脲酶活性达到最高值。土壤外源铜量大于 100mg kg^{-1} 土后,均未测出其活性,高铜处理加钙和铁对脲酶的活性也不起作用。

3 结 语

本试验测定了果树叶片过氧化氢酶、多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶及生长根的过氧化氢酶活性。结果发现,各酶在外源铜量大于 100mg kg^{-1} (不包括 100mg kg^{-1}) 时活性均明显降低,而在 100mg kg^{-1} 以内的土壤铜施加量下,各酶活性稍有升高现象。说明低量的铜浓度不会对植株体内酶活性产生抑制。加入钙和铁后的处理各酶的活性均有所恢复,总的来说,加铁处理的酶活性高于加同量钙的处理。低量铜下使植物体内的酶类活动加强,这也是植株的一种适应性反应;而高浓度的铜施加于土壤中时,使植株的呼吸、代谢等一系列活动均受到破坏,从而影响了整株植株的生长。高铜的土壤中加入钙或铁,在一定程度上可以使其酶活性有所提高,但其代谢活动仍不及正常植株,即从植株代谢的角度来看,也可以得出施加钙和铁并不能够从真正意义上解除铜毒害。这与我们所测定的果树生长发育指标如叶绿素含量、新梢生长量、胸径增长量及生物总量有其较好的一致性。

土壤过氧化氢酶的活性与土壤铜处理水平有显著的曲线相关性, [$y(\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 酶}) = x / (-11.26 + 0.75x)$, $r = 0.995^{**}$], 过氧化氢酶较能耐受高量铜的抑制。因铜是过氧化氢酶的激活剂,在低量范围内,适量的铜可以提高其活性,但过量的铜会对其活性产生抑制作用,使其活性减小。蔗糖酶活性与土壤施加铜量呈 Logistic 函数关系 ($y = 2.95 / (1 + 0.57\exp(-5.02 \times 10^{-5}x))$, $r = -0.9820^{**}$)。高铜浓度下施加钙、铁对土壤蔗糖酶和过氧化氢酶活性并没有明显改观,这与植株体内的酶有所不同,钙铁通过离子间的拮抗等作用可抑制铜的吸收,间接缓解了过量铜对植株体内酶的毒害。而土壤是外源铜的直接接受者,则土壤酶受钙铁的作用影响显著小于植株酶。脲酶对铜过量非常敏感,仅能对 $\text{Cu}100$ 以内的几个处理测出其活性, $\text{Cu}100$ 的处理土壤脲酶活性仅为对照的 26.9%。土壤施加铜量大于 100mg kg^{-1} 后,均未测出其活性,高铜处理加钙和铁后对脲酶的活性影响也未发生明显变化。

参 考 文 献

1. Hirst J M, Riche H H, Bascomb C L. Copper accumulation in the soils of apple orchards near Wisbech. *Plant Pathology*, 1961, 10: 105~ 108
2. Josanidia Santana Lina. Copper balances in cocoa agrarian ecosystems: effects of different ial use of cupric fungicides. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1994, 48: 19~ 25
3. 西北农业大学植物生理生化教研组编. 植物生理实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992
4. 关松荫等编. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986
5. 白宝璋, 金锦子, 白崧等. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良. *玉米科学*, 1994, 2(4): 44~ 47
6. 邹春琴, 陈新平, 张福锁等. 活性铁作为植物铁营养状况诊断指标的相关研究. *植物营养与肥料学报*, 1998, 4(4): 399~ 406
7. 周礼恺编. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987

EFFECTS OF EXTERNAL COPPER ON ENZYME ACTIVITY IN SOIL AND APPLE TREE SYSTEM

Liu Chun-sheng Chang Hong-yan Sun Bai-ye Sun Yi-tuan Ye You-liang

(Resources and Environment College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Zhang Fu-suo

(Resources and Environment College, China Agricultural University, Beijing 100009)

Summary

Effect of external copper on enzyme activity in a soil and apple tree system was studied by using cinnamon soil and 'Fuji' apple young tree. The results showed that peroxidase, PPO and ascorbic acid oxidase activity in the leaves and peroxidase activity in the roots were reinforced at low external copper levels and reduced at high. Adding Ca or Fe at high copper levels could mitigate copper toxicity in some degree. A significant curvilinear correlation was observed between soil peroxidase activity and the external copper concentration ($y = x / (-11.26 + 0.75x)$, $r = 0.9955^{**}$). Soil sucrase activity was logistically correlated with the external copper level ($y = 2.95 / (1 + 0.57 \exp(-5.02 \times 10^{-5} x))$, $r = -0.9820^{**}$). Urease was very sensitive to copper and it lost activity at levels $> \text{Cu}100$.

Key words Excessive copper, Soil, Apple trees, Enzyme activity