

缓冲液种类对土壤酸性磷酸酶活性的影响

唐晓倩, 耿玉清*, 陈艳鑫, 郜少敏, 杨雨果

(北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要: 土壤酸性磷酸酶影响土壤有机磷矿化。选择不同的缓冲液种类和不同 pH 值测定土壤酸性磷酸酶活性, 可影响数据的可比性。为明确缓冲液及 pH 值对不同土壤磷酸酶活性的影响程度, 选取 pH 值 4~8 的土壤样本, 测定了在醋酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液和 MUB 缓冲液 3 种不同培养条件下酸性磷酸酶活性变化。结果表明, 采用 MUB 缓冲液条件可获得较稳定的土样区分序列, 且与缓冲液的 pH 值的变化无关。在醋酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液条件下, 不同 pH 值范围的不同土样之间土壤酸性磷酸酶活性变异系数变化剧烈, 而采用 MUB 缓冲液获得的变异系数较其他缓冲液大, 且趋势平稳。综合考虑, 进行土壤酸性磷酸酶活性测定, 可优先选用 MUB 缓冲溶液。

关键词: 酸性磷酸酶; 醋酸盐缓冲液; 柠檬酸盐缓冲液; MUB 缓冲液; 缓冲液 pH 值

中图分类号: S154.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6257 (2018) 05-0163-06

土壤磷酸酶可水解有机磷的磷酸酯或磷酸酐, 在土壤有机磷矿化过程中发挥重要作用。提高磷酸酶活性是提高土壤磷有效性的一种生物途径^[1]。因此, 及时准确地测定和了解土壤磷酸酶活性的高低, 对土壤磷素的管理具有重要意义。由于分离技术的限制, 目前直接从土壤中提取酶尚有一定的难度。因此, 对土壤磷酸酶活性的测定, 主要是在土壤中添加一定数量对硝基苯磷酸二钠基质, 在一定 pH 值的缓冲液和温度等环境条件下进行培养, 最终通过测定酶促反应后生成物的量来计算酶的活性^[2]。

酶促反应是在一定环境条件下进行的。其中 pH 值与酶结构的稳定性以及酶对底物的亲和力密切相关^[3], 对土壤酶活性的测定结果有显著影响^[4]。由于 pH 值对酶活性的显著作用, 为减少培养过程中因 pH 值浮动而造成的影响, 通常采用一定的缓冲液来实现较稳定的培养环境, 而不同缓冲液影响下酶活性高低也有所不同。不适宜的 pH 值可能给酶促反应生成物的测定造成困难^[5]。

由于 pH 值对磷酸酶活性的影响非常显著, 通常根据 pH 值将土壤磷酸酶分为酸性磷酸酶 (EC

3.1.3.2) 和碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1)^[5]。目前国内外学者测定酸性磷酸酶活性的方法不一。就酶促反应的环境条件而言, 国外学者主要采用 pH 值为 5 的醋酸盐缓冲液^[6-8], 也有学者认为 pH 值为 6.5 的 MUB 缓冲液是测定土壤酸性磷酸酶活性最适宜的培养条件^[2,9-10]。此外, 有学者建议依据土壤本身 pH 值的大小, 选择合适种类的缓冲液, 测定土壤酸性磷酸酶活性^[11-12]。因此, 虽然土壤酸性磷酸酶的测定是比较简单的过程, 但不同研究者所选择的培养条件是多元化的。如何针对具体的土壤选择适宜的 pH 值及缓冲液种类, 还缺乏系统的研究。这在一定程度上给土壤磷酸酶的测定方法造成了选择上的困难。因此, 本研究选用不同 pH 值的土壤, 研究不同缓冲液及 pH 值对土壤酸性磷酸酶活性的影响, 为选择适宜的测定酸性磷酸酶活性的培养条件提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究选择 6 种土壤。土壤 pH 值用梅特勒—托利多酸度计 (FE20K) 测定。土壤有机碳采用高温外热重铬酸钾氧化—容量法测定。土壤全氮测定采用凯氏消煮法, 定氮仪蒸馏。碱解扩散法测土壤碱解氮。土壤有效磷采用碳酸氢钠法测定。土壤速效钾采用乙酸铵提取, 用火焰光度计测定^[13]。土壤采样地点和常规指标分析结果见表 1。

收稿日期: 2017-11-23; 最后修订日期: 2018-03-18

基金项目: 国家重点研发计划“典型脆弱生态修复与保护研究”重点专项 (2016 YFC 0503401-04)。

作者简介: 唐晓倩 (1992-), 女, 江苏南通人, 硕士, 主要研究土壤生态, E-mail: 2065710010@qq.com。

通讯作者: 耿玉清, E-mail: gengyuqing@bjfu.edu.cn。

表 1 土样的基本情况

土样	采样地点	土壤类型	pH 值 (H ₂ O)	有机碳 (g/kg)	全氮 (g/kg)	碱解氮 (mg/kg)	有效磷 (P mg/kg)	速效钾 (K mg/kg)
样 1	江西大岗山	红壤	4.22	21.29	1.70	70.00	8.43	210.00
样 2	湖北襄樊	黄棕壤	4.95	9.48	0.86	60.00	11.12	170.00
样 3	北京八达岭	棕壤	6.38	27.15	2.18	24.00	4.72	130.00
样 4	四川眉山	黄棕壤	6.18	4.34	0.42	32.00	8.53	104.00
样 5	青海小泊湖	草甸土	7.13	16.35	2.61	30.00	6.19	100.00
样 6	青海北山林场	灰褐土	8.82	30.67	2.04	40.00	14.89	80.00

1.2 测定方法

1.2.1 pH 值与缓冲液的选择

根据我国大部分土壤 pH 值为 4~9 的范围，以及有学者将最适 pH 值 5~6 的磷酸酶定义为酸性磷酸酶，本研究采用的 pH 值分别为 4、5 和 6，共 3 个梯度。缓冲液的选择主要基于目前酶测定过程中广泛应用的 3 种类型，分别为 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液（简称 ACEB）^[7-8]、50 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液（简称 CITB）^[14] 以及改进的通用缓冲液（简称 MUB）^[2,15]。根据 pH 值和缓冲液种类的选择，本研究共采用 9 种缓冲液培养条件。为尽量减少在调节 pH 值过程中引入外来离子对酶促反应的干扰，本研究选用 0.5 mol/L 醋酸和 0.5 mol/L NaOH 调节 ACEB 的 pH 值；用 50 mmol/L 柠檬酸和 50 mmol/L 柠檬酸钠调节 CITB 的 pH 值；用 0.1 mol/L HCl 和 0.5 mol/L NaOH 调节 MUB 的 pH 值。

1.2.2 终止剂的选择

在常规的土壤磷酸酶活性测定过程中，酶促反应结束后通常通过添加 0.5 mol/L CaCl₂ 和 0.5 mol/L NaOH 来终止反应，并使其显色^[16]。经预实验发现，在所选用高有机质含量土样中，添加 0.5 mol/L NaOH 后可因腐殖质的水解干扰而影响比色结果。因此，本研究改用 0.1 mol/L，pH 值为 12 的 Tris 终止反应^[2]。

1.2.3 测定过程

测定方法参照文献 [2] 中介绍的方法，以对硝基苯磷酸二钠（C₆H₄NNa₂O₆P·6H₂O，CAS 编号：4264-83-9）为底物。测定方法略作修改，具体为：称取 1.00 g 新鲜土壤，添加 8 mL 缓冲液和 1 mL 对硝基苯磷酸二钠基质溶液后，轻摇混匀，于 37℃ 下培养 1 h。培养结束后，在混合土液中添加 1 mL 0.5 mol/L 的 CaCl₂ 和 4 mL 0.1

mol/L 的 Tris 缓冲液（pH 值 12）终止反应。经过滤后，在 410 nm 波长条件下进行比色测定。在测定土壤酶活性的同时做空白参照。空白参照实验与土壤磷酸酶活性测定的区别是，在培养结束后添加对硝基苯磷酸二钠。用每小时 1 g 土酶促反应产物（对硝基酚）的 μmol 量表示土壤酸性磷酸酶活性，酶活性单位为 μmol pNP/(g·h)。

1.3 数据统计分析

所有数据使用 Excel 2007 软件进行整理，用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析。采用平均值 ± 标准偏差表示土壤酸性磷酸酶活性。不同土壤酸性磷酸酶活性差异采用 One-way ANOVA 进行统计分析，组间两两差异显著性比较采用 Duncan 法（P<0.05）。pH 值和缓冲液种类与酶活性的交互作用采用 Two-way ANOVA 进行统计分析（P<0.05）。基于多因素方差分析进行 pH 值、缓冲液种类和不同土样对酶活性影响的研究（P<0.05）。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件下土壤酸性磷酸酶活性的区分度

在不同的缓冲液和不同 pH 值培养条件下，测得的 6 个土样之间酸性磷酸酶活性的区分度有一定的区别（表 2）。就土样磷酸酶活性的数值来看，在 pH 值 4 和 5 的培养条件下，样 1、2、3 和 4 的酸性磷酸酶活性均在 CITB 条件下最高；在 pH 值 6 时，6 个土样酸性磷酸酶活性均在 ACEB 培养条件下最高。从不同土样之间土壤酸性磷酸酶活性的区分度来看，不同的培养条件也存在一定的差异。其中，在 pH 值 4 和 5 条件下，不同土样间土壤酸性磷酸酶活性的区分度均在 CITB 条件中显著，6 个土样间酶活性的差

异区分序列为 a、b、c、cd、cd、d 和 a、b、c、d、e、f；而在 pH 值 6 条件下，土样间酸性磷酸酶活性的区分度在 ACEB 条件中最显著，区分序列为 a、b、c、d、e、f。就 MUB 而言，无论 pH 值为 4、5 还是

6，不同土样之间酸性磷酸酶活性变化的区分序列均为 a、b、c、d，较其他 2 种缓冲液的差异的变化相对平缓。

表 2 不同培养条件下土壤酸性磷酸酶活性

[$\mu\text{mol pNP}/(\text{g} \cdot \text{h})$]

土样	酶活性								
	pH 值 4			pH 值 5			pH 值 6		
	ACEB	CITB	MUB	ACEB	CITB	MUB	ACEB	CITB	MUB
样 1	0.29 ± 0.04d	5.22 ± 0.30c	4.38 ± 0.76c	10.08 ± 0.38d	14.00 ± 0.20d	6.86 ± 0.82c	19.00 ± 1.12c	2.79 ± 0.53c	7.70 ± 0.30c
样 2	0.74 ± 0.01d	4.30 ± 0.19cd	1.96 ± 0.48d	7.91 ± 0.33e	8.74 ± 0.19e	4.81 ± 0.10cd	13.91 ± 0.43d	3.15 ± 0.35e	7.33 ± 0.62c
样 3	0.28 ± 0.01d	14.22 ± 0.72b	13.27 ± 2.81b	28.36 ± 1.60a	30.51 ± 1.33a	15.60 ± 2.70b	30.64 ± 2.23b	7.59 ± 0.46b	16.40 ± 0.88b
样 4	3.09 ± 0.90c	4.74 ± 0.68cd	3.70 ± 0.09cd	13.02 ± 0.35c	15.51 ± 0.20c	3.48 ± 0.51d	7.56 ± 0.03f	0.34 ± 0.11e	4.40 ± 0.26d
样 5	9.08 ± 0.11a	25.15 ± 0.66a	25.36 ± 0.21a	20.01 ± 0.40b	21.03 ± 0.81b	31.30 ± 0.18a	40.96 ± 2.40a	8.61 ± 0.41a	28.76 ± 2.83a
样 6	4.60 ± 0.88b	3.82 ± 0.03d	5.43 ± 0.54c	8.09 ± 0.45e	6.67 ± 0.65f	4.96 ± 0.98cd	10.62 ± 1.45e	1.86 ± 0.09d	3.64 ± 0.12d

注：表中数据为平均值 ± 标准偏差；同列数据后小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 不同 pH 值条件下土壤酸性磷酸酶活性的变化

针对同一缓冲液环境条件下，随着 pH 值的变化，土样酸性磷酸酶活性变化幅度与方向不同（表 3）。从表 3 可以看出，由 pH 值 4 到 5 时，样 1、2 和 3 在 3 种不同缓冲液条件下所测土壤的酸性磷酸酶活性变化量均为正值，变化幅度均在 ACEB 条件下最大，在 MUB 条件下最小；而样 4、5 和 6 在 3 种不同缓冲液条件下变化不尽一致。其中，样 4 和 6 的酸性磷酸酶活性变化量在 MUB 条件下表现为负值，且变化幅度在该条件下最小。

在 pH 值由 5 到 6 时，样 1、2 和 3 土壤酸性磷酸酶活性变化量均在 ACEB 和 MUB 条件下为正值，在 CITB 条件下为负值。样 4、5 和 6 在不同环境条

件下变化量不同，其中，样 4 在 MUB 条件下酸性磷酸酶活性变化量表现为正值，而样 5 和 6 在 ACEB 条件下表现为正值。就变化幅度而言，这 6 种土样在 ACEB 和 CITB 条件下的酸性磷酸酶活性变化幅度，均高于 MUB 缓冲液条件下的变化幅度。

就同一土样而言，在缓冲液由 pH 值 4 变化到 6 时，土壤酸性磷酸酶活性的极差不同（表 3）。除样 4 外，不同土样酸性磷酸酶活性的极差值均在 ACEB 条件下为最大，变化范围为 6.01 ~ 31.88；而在 MUB 条件下极差值最小，变化范围为 1.79 ~ 5.95，酶活性变化范围窄。因此，在同样 pH 值的变化区间内，不同土样酸性磷酸酶活性的变化幅度有较大的差异。

表 3 不同 pH 值条件下土壤酸性磷酸酶活性变化

[$\mu\text{mol pNP}/(\text{g} \cdot \text{h})$]

土样	酶活性								
	ACEB			CITB			MUB		
	Δ_1	Δ_2	R	Δ_1	Δ_2	R	Δ_1	Δ_2	R
样 1	9.79	8.92	18.71	8.79	-11.21	11.21	2.48	0.84	3.32
样 2	7.18	6.00	13.17	4.44	-5.59	5.59	2.85	2.52	5.37
样 3	28.09	2.27	30.36	16.29	-22.91	22.91	2.33	0.80	3.13
样 4	9.93	-5.46	9.93	10.76	-15.17	15.17	-0.22	0.92	0.92
样 5	10.93	20.95	31.88	-4.12	-12.42	16.54	5.95	-2.54	5.95
样 6	3.49	2.52	6.01	2.85	-4.81	4.81	-0.47	-1.31	1.79

注： Δ_1 ：表示 pH 值 4~5 一个单位酶活性变化； Δ_2 ：表示 pH 值 5~6 一个单位酶活性变化；R：表示 pH 值 4~6 酶活性极差。

2.3 不同缓冲条件下土壤酸性磷酸酶活性变异的统计

不同缓冲液条件下，所测土壤酸性磷酸酶活

性的统计分析结果见表 4。在 ACEB 培养条件下，土壤酸性磷酸酶活性的极差随着 pH 值的增加而增大，pH 值 6 时极差达到最大值（33.40）。就变异

系数而言，在缓冲液 pH 值为 4 时的酸性磷酸酶活性变异系数为 1.08，高于 pH 值 5 和 6 时的变异系数。

在 CITB 缓冲条件下，不同 pH 值之间土壤酸性磷酸酶活性的平均值、极差和变异系数的变化幅度明显。其中，土壤酸性磷酸酶活性的平均值和极差在 pH 值 5 的缓冲条件下达到最大值，而变异系数最小，仅为 0.51。

相对于 ACEB 和 CITB 缓冲液，用 MUB 缓冲液条件测定的 6 个不同土样的酸性磷酸酶活性的平均值、极差数值和变异系数比较接近。其中，当缓冲液 pH 值从 4 变化到 6 时，土壤酸性磷酸酶活性极差数值变化范围是 23.39 ~ 27.82；变异系数数值变化范围是 0.80 ~ 0.92。由此看来，用 MUB 缓冲液测定的不同土样之间的变异系数较其他缓冲液大，且与缓冲液 pH 值的变化无关。

表 4 土壤酸性磷酸酶活性统计分析

缓冲液	平均数 [μmol pNP/(g·h)]			极差 [μmol pNP/(g·h)]			变异系数 (CV)		
	pH 值 4	pH 值 5	pH 值 6	pH 值 4	pH 值 5	pH 值 6	pH 值 4	pH 值 5	pH 值 6
ACEB	3.01	14.58	20.45	8.80	20.45	33.40	1.08	0.52	0.60
CITB	9.57	16.08	4.06	21.33	23.84	8.27	0.84	0.51	0.91
MUB	9.02	11.17	11.37	23.39	27.82	25.12	0.92	0.91	0.80

2.4 pH 值和缓冲液对土样磷酸酶活性的共同影响
pH 值和缓冲液种类是同时作用于土壤磷酸酶的培养条件，二者共同影响着土壤磷酸酶活性测定。通过双因素方差分析表明，缓冲液的 pH 值高低、种类以及二者的交互作用均显著影响土壤酸性磷酸酶活性的变化（表 5），但对不同土样影响的

程度有所不同。样 1、2、3 和 4 中，pH 值对土壤酸性磷酸酶活性变化的影响程度大于缓冲液种类以及二者交互的影响程度；而在样 5 和 6 中，pH 值的影响程度相对较小。这说明 pH 值和缓冲液种类对土壤酸性磷酸酶活性的影响程度，与选定的土样有关。

表 5 pH 值与缓冲液对土壤酶活性影响的双因素方差分析

土样		样 1	样 2	样 3	样 4	样 5	样 6
pH 值	F	393.93	704.16	190.27	682.12	65.77	16.50
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
缓冲液	F	81.92	157.15	17.00	199.65	168.31	65.54
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH 值 × 缓冲液	F	338.62	371.73	126.99	310.93	338.79	36.43
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

3 讨论

3.1 土壤特征对土壤酸性磷酸酶活性的影响

土壤酶来源于生物的分泌，其活性受多种土壤性质的影响。本研究选取了 6 种不同土壤类型的土样，利用 3 种广泛使用的缓冲液，比较不同 pH 值条件下土壤酸性磷酸酶活性，力求找出具有普遍性

的适宜缓冲液和 pH 值。但利用三因素方差分析发现，不同土样（F = 1 675.28，p = 0.00）对土壤酸性磷酸酶活性的影响最显著（表 6），其次是 pH 值（F = 708.94，p = 0.00）对酶活性的影响，而缓冲液种类对酶活性的影响程度最小（F = 125.58，p = 0.00）（表 6）。因此，在不同缓冲液测定的土壤酸性磷酸酶差异中，土样起关键作用。

表 6 缓冲液 pH 值和种类与土壤类型对土壤酶活性影响的三因素分析

	pH 值	缓冲液	土样	pH 值 × 缓冲液	pH 值 × 土样	缓冲液 × 土样	pH 值 × 缓冲液 × 土样
F	708.94	125.58	1 675.28	793.41	79.11	63.74	78.59
p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

虽然影响土壤酸性磷酸酶活性高低的性质指标很多,但对土壤就 pH 值和有机质指标的研究非常普遍。就所选定的土样而言,土壤 pH 值低,土壤有机质含量高的土样如样 1 和 2,土壤酸性磷酸酶活性相对较高,而样 6 的 pH 值高,土壤有机质低,土壤酸性磷酸酶活性相对较低。对土壤 pH 值、有机碳和土壤酸性磷酸酶活性进行相关性分析,结果表明,土壤 pH 值、有机碳和酸性磷酸酶活性相关程度弱。由于土壤酸性磷酸酶活性受多因素的影响,而选定的不同土壤类型因存在多变量的差异,使得缓冲液及 pH 值对土壤酸性磷酸酶的影响甚为复杂。针对土壤自身 pH 值可显著影响土壤酸性磷酸酶活性的状况,在土壤酸性磷酸酶的测定中,对适宜缓冲液和 pH 值的选择,尽量选用性质相近的土壤如酸性土、石灰性土壤等开展研究。

3.2 pH 值和缓冲液对土壤酸性磷酸酶活性的影响

pH 值的变化可显著地改变土壤磷酸酶活性的变化。在酶活性的测定中, pH 值的大小通过缓冲液实现。醋酸盐缓冲液 pH 值范围为 3.6 ~ 5.8,其中广泛采用 pH 值为 5 测定土壤酸性磷酸酶活性^[6,8,17]。但本研究发现,随缓冲液 pH 值的增加,土壤酸性磷酸酶活性呈较剧烈的上升,并没有支持采用 pH 值为 5 的醋酸盐缓冲液为最适环境条件的结论。此外,在醋酸盐缓冲液条件下,用不同 pH 值范围测定的不同土样之间土壤酸性磷酸酶活性变异系数剧烈变化:即在缓冲条件为 pH 值 5 或 6 时变异系数分别为 0.52 和 0.60,而在 pH 值为 4 时的变异系数为 1.08。这在一定程度上影响着数据的可比性。

柠檬酸盐缓冲液作为主要的酸性缓冲液,其 pH 值范围在 3.0 ~ 6.6 之间。如果把 pH 值为 5 看作是一个最适的 pH 值,只有柠檬酸盐缓冲液有这种现象,即土壤酸性磷酸酶活性在缓冲液 pH 值由 4 到 5 环境条件下呈上升趋势,而在 pH 值由 5 到 6 时呈下降趋势。就不同土样酸性磷酸酶活性变异系数而言,在不同 pH 值范围内的变化幅度较醋酸盐缓冲液条件低但高于 MUB 缓冲液。

MUB 是一种广谱缓冲液,缓冲液 pH 值范围是 2.6 ~ 12.0^[14]。在酸性磷酸酶活性的测定中,通常认为 pH 值 6.5 时,土壤酸性磷酸酶活性最高^[18]。从表 3 数据来看,也有个别土壤的酸性磷酸酶活性并没有随着 pH 值增加呈上升趋势,这在一定程度

上说明 pH 值 6.5 并不是所有土壤的最适 pH 值,在选定的 3 种缓冲液中, MUB 缓冲液条件下土壤酸性磷酸酶活性变异系数在 0.80 ~ 0.92 之间,不同 pH 值之间的变异系数的变化趋势平稳,也较其他缓冲液的变异系数高。因此, MUB 缓冲液有利于不同土样之间数据的比较。针对目前不少学者提出了使用接近待测土壤 pH 值的缓冲环境测定土壤磷酸酶的现状,选用 MUB 缓冲液应是合理的选择。

4 结论

为选择适宜的测定土壤酸性磷酸酶活性的培养条件,采用 3 种常用的缓冲液,分别测定了 6 种不同特征的土壤酸性磷酸酶活性。研究结果表明,采用 MUB 缓冲液条件可获得较稳定的土样区分序列,且与缓冲液的 pH 值的变化无关,而在醋酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液条件下,不同土样的酸性磷酸酶区分度序列受缓冲液 pH 值影响明显。就不同土样之间土壤酸性磷酸酶活性变异系数而言,醋酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液条件下,不同 pH 值范围获得的变异系数变化剧烈;而采用 MUB 缓冲液获得的变异系数较其他缓冲液大,且趋势平稳,有利于不同土样间数据的比较。因此,选用 MUB 缓冲液测定土壤酸性磷酸酶活性应是合理的选择。针对土壤自身的 pH 值能显著影响土壤酸性磷酸酶活性的状况,在土壤酸性磷酸酶的测定中,应进一步开展适宜缓冲液和 pH 值的选择的研究。

参考文献:

- [1] Dick W A, Tabatabai M A. Hydrolysis of organic and inorganic phosphorus compounds added to soils [J]. Geoderma, 1978, 21 (3): 175 - 182.
- [2] Dick R P. Methods of soil enzymology [M]. Madison: Soil Science Society of America, 2011.
- [3] 周礼恺. 土壤酶学 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] Dick W A, Cheng L, Wang P. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32 (13): 1915 - 1919.
- [5] Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, et al. Methods in soil biology [M]. Berlin: Springer - Verlag, 1995.
- [6] Verchot L V, Borelli T. Application of *para* - nitrophenol (*p*NP) enzyme assays in degraded tropical soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37 (4): 625 - 633.
- [7] Saiya - Cork 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 [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34 (9): 1309 - 1315.

- [8] García - Pérez J A, Alarcón E, Hernández Y, et al. Impact of litter contaminated with glyphosate - based herbicide on the performance of *Pontoscolex corethrurus*, soil phosphatase activities and soil pH [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 104: 31 - 41.
- [9] Criquet S, Braud A, Nèble S. Short - term effects of sewage sludge application on phosphatase activities and available P fractions in Mediterranean soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39 (4): 921 - 929.
- [10] Ye D H, Li T X, Yu H Y, et al. P accumulation of *Polygonum hydropiper*, soil P fractions and phosphatase activity as affected by swine manure [J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86 (86): 10 - 18.
- [11] Harrison A F, Pearce T. Seasonal variation of phosphatase activity in woodland soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1979, 11 (4): 405 - 410.
- [12] Yavitt J B, Wright S J, Wieder R K. Seasonal drought and dry - season irrigation influence leaf - litter nutrients and soil enzymes in a moist, lowland forest in Panama. [J] *Austral Ecology*, 2004, 29: 177 - 188.
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [14] 关松荫. 土壤酶及其研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [15] Sanchez - Hernandez J C, Sandoval M, Pierart A. Short - term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos - treated mesocosm: Use of enzyme - based indexes [J]. *Ecological Indicators*, 2017, 73: 525 - 535.
- [16] Lucas - Borja M E, Hedo J, Cerdá A, et al. Unravelling the importance of forest age stand and forest structure driving microbiological soil properties, enzymatic activities and soil nutrients content in Mediterranean Spanish black pine (*Pinus nigra* Ar. ssp. *salzmannii*) Forest [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 562: 145 - 154.
- [17] Wu Q S, Zou Y N, He X H. Differences of hyphal and soil phosphatase activities in drought - stressed mycorrhizal trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) seedlings [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129 (2): 294 - 298.
- [18] Turner B L. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76 (19): 6485 - 6493.

Effects of buffer on soil acid phosphatase activity

TANG Xiao-qian, GENG Yu-qing*, CHEN Yan-xin, GAO Shao-min, YANG Yu-guo (College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: The soil acid phosphatase is closely related to soil organic phosphorus mineralization. The choice of buffers and pH may result in different results of enzyme activity determination. In order to figure out the change of regulation, the acid phosphatase activity of different soil under acetate buffer, citrate buffer and MUB buffer were measured. The results showed that a stable soil sample sequence can be obtained by using the MUB buffer solution, and it is not related to the change of pH in the buffer solution. Under the conditions of acetate buffer and the citrate buffer, the variation coefficient of soil acid phosphatase activity was drastic changes in range of different pH among different soils. But the variation coefficient of soil acid phosphatase activity under the condition of MUB buffer was large and trended stationary. In a short, MUB buffer solution was proposed for determining the soil acid phosphatase activity.

Key words: acid phosphatase; acetate buffer; citrate buffer; MUB buffer; buffer pH