

Abiontiske fosfater i jord

En litteraturoversikt

Av Bjørn R. Langerud
NISK-Ås, november 1983

I. Innledning

Ethvert økosystem kjennetegnes av et utall biologiske transformasjoner som på et eller flere stadier katalyseres av enzymer. Fotosyntese, andre biosynteser og respirasjon i levende organismer, styres av høyt spesialiserte enzymsystemer. Jordsmønnet rommer en rekke mikroorganismer som ved hjelp av sine enzymsystemer bygger opp sin celledmasse, transformerer og mineraliserer organiske forbindelser i restene av systemets biomasse.

Den biologiske aktivitet i jord skyldes fullt ut enzymatiske reaksjoner. Det har vært vanlig å tenke seg at disse reaksjoner foregår innenfor celleveggene (intracellulært) i jordboende organismer. Rett før århundreskiftet dukket det opp rapporter som beskrev enzymaktiviteter også i mediet utenfor levende celler (catalaser: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Dette førte til en øket virksomhet for om mulig å finne flere enzymer som er stabile og beholder sin aktivitet utenfor (extracellulært) de cellene som produserte dem. Av over femti enzymer studert i jord, er en stor del stabile og akkumuleres i jord.

Etter hvert har dette fått enkelte til å betrakte jord som levende vev direkte analogt med f.eks. plantevev. I figur 1 er den totale enzymaktiviteten i jord fremstilt skjematisk (KISS et al. 1975). Som det går frem av figuren, er begrepene intra- og extracellulær lite egnet til å beskrive enzymaktiviteten i jord. Frie enzymer er heller ikke noe dekkende begrep idet mange enzymer vil være bundet til en

eller annen fraksjon i jorden. Enzymer som ikke stammer direkte fra delingsdyktige celler, har vært kalt, som i figuren, akkumulerte enzymer. (SKUJINŠ (1976) mener at disse bør kalles abiontiske enzymer («viser en form for liv for seg selv», a: (gresk): fjerne – biontisk: (gresk) har en form for liv).

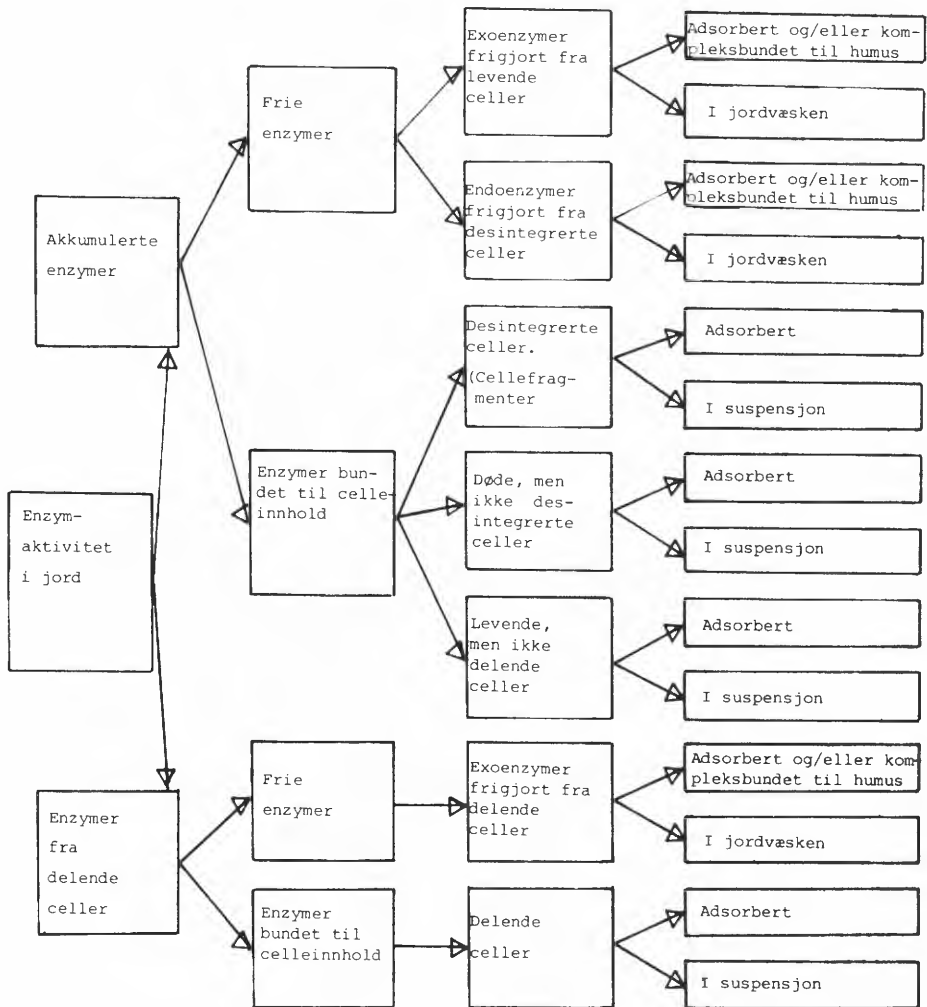
Abiontiske enzymer med organiske fosforforbindelser som substrat ble først rapportert av ROGERS (1942). Siden den gang er det gjort mange forsøk på å belyse den biologiske signifikans av abiontiske enzymer i fosforets biogeokjemiske syklus.

De generelle betraktninger i denne orienteringen er, hvis ikke annet er nevnt, tatt fra litteraturoversikter utarbeidet av SKUJINŠ (1967, 1976), RAMIREZ-MARTINEZ (1968) og KISS et al. (1975).

II. Organiske fosforforbindelser i jord

Enzymer er spesialiserte når det gjelder substrater. Det vil derfor være til nytte å ta med en kort oversikt over de organiske fosforforbindelser i jord. Opplysningene i dette kapitlet er i hovedsak hentet fra ANDERSON (1960, 1967), COSGROVE (1967) og HALSTEAD & McKERCHER (1975).

Det finnes neppe mange områder innen jordforskningen som lider under metodiske problemer i samme grad som identifisering av organiske forbindelser («humuskjemi»). Hittil har ekstraksjoner med baser, gjenutfelling med syre, behandling med alkohol og elektrolytter vært hjelpemidler ved fraksjonering av jordens organiske bestanddeler. På tross



1. Skjematisk fordeling av den totale enzymaktivitet i jord (KISS et al. 1975).

av vanskeligheter, mener man å ha identifisert en del organiske fosfater i jord. De fleste av disse hører til eller er derivater av tre klasser fosfatester.

- a) Fosfolipider
- b) Nukleinsyrer
- c) Inositolfosfater

De få estimater som er foretatt på fordelingen av disse forbindelser i jord tyder på at forholdsvis lite av organisk bundet fosfor finnes som fosfolipider (<1%), noe mer som nukleinsyrer (5–10%) og mest som inositolfosfater (≈60%).

Kromatografiteknikk er blitt brukt for å identifisere inositolfosfatene. Disse er for

en stor del pentafosfat og hexafosfat av myoinositol. Fem av de ni isomere inositoler er isolert fra jordekstrakter.

De absolutte mengder av de ulike inositoler varierer med bl.a. forvittringsintensiteten. I et tilfelle er opp til 62% av organisk bundet fosfor funnet som hexa- og pentafosfater av inositol, mens rundt 12% ble funnet som lavere inositolfosfater.

Hydrolyse av inositolene katalyseres av enzymer og mellomproduktene er ved ionebyttekromatografi identifisert som stadig lavere estere av utgangsmaterialet.

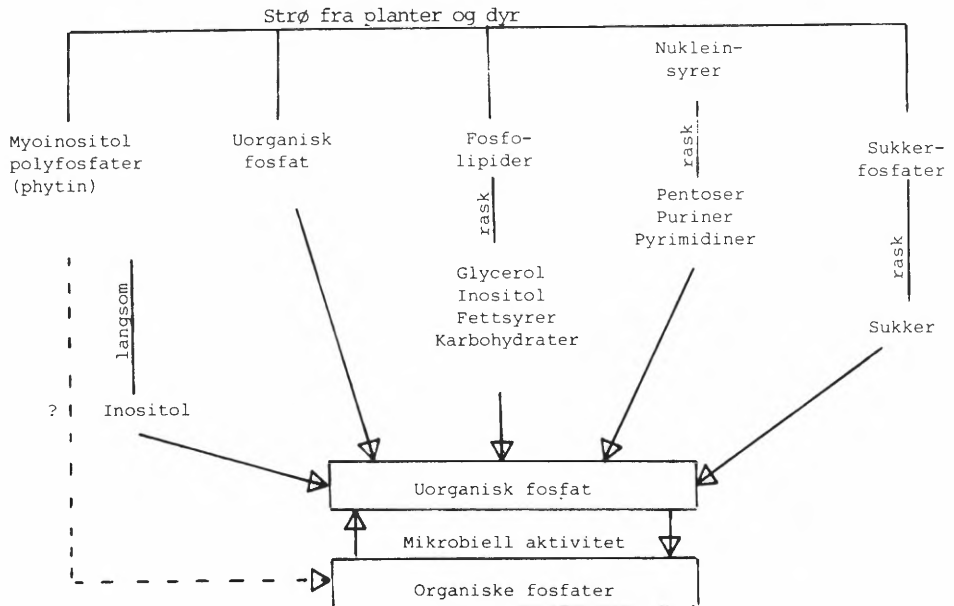
Nukleinsyrebaserne (adenin, guanin, cytosin, thymin og uracil) finnes i humussyre-fraksjonen i innbyrdes forhold som indikerer polynukleotider med mikroorganisme-DNA som startprodukt. Det er et opplagt behov for bedre teknikker for isolering før noe sikkert kan sies om nukleinsyrenes betydning i omsetningen av fosfor.

Fosfolipider tilføres jorden i forholdsvis store mengder. Lite finnes imidlertid igjen i jordens organiske fraksjon. Opp imot 40% av fosfolipidene antas å være fosfatidylcholin og rundt 30% fosfatidyletanolamin. Opprinnelsen til lipidene kan antydes ved å bestemme forholdet mellom mettede- og umettede fettsyrer. Planteprodukter har, i motsetning til bakterieprodukter, en tendens til å inneholde umettede fettsyrer.

I tillegg til de nevnte organiske fosfater er det funnet fosforproteiner og sukkerfosfater i humusfraksjonen. I figur 2 finnes en skjematisk oversikt over organiske fosfater i jord og potensielle enzymatiske transformasjoner av disse.

III. Enzymsystematikk

Strengt tatt klassifiseres enzymer etter hvilken reaksjon de katalyserer. Det vil si at «navnet» skal angi både reaksjonspro-



Figur 2. Organiske fosfater i jord. Skjematisk. (COSGROVE 1967)

dukt, substrat og reaksjonstype. Internasjonal Enzym Commission lager lister over «riktig» enzymbetegnelser og har systematisert de aller fleste identifiserte enzymer.

En del enzymer aktive i fosforsyklusen blir ofte henvist til som fosfataser. Dette er imidlertid et samlebegrep og omfatter en gruppe enzymer som katalyserer hydrolyse av anhydrider og estere av fosforsyre. Uorganisk fosfor frigjøres som orthofosfat.

Fosfataser kan klassifiseres i fem hovedgrupper.

- a) orthofosfat – fosfatmonoester hydrolaser
- b) orthofosfat – fosfatdiester hydrolaser
- c) orthofosfat – fosfatriester hydrolaser
- d) hydrolaser som angriper fosforyl holdige anhydrider
- e) hydrolaser som angriper N–P bindinger (eks. «fosfoamidaser»).

Utenfor gruppen fosfataser finnes enzymer som hydrolyserer phytin (phytinsyre) og har fått populærbetegnelsen phytaser. Phytinsyre og phytin (Ca eller Mg salter av phytinsyre) er svært resistente i jord og phytaseaktiviteten antas for det meste å være lav.

Det er også i jordekstrakter funnet enzymer i stand til å hydrolysere pyrofosfat til orthofosfat («pyrofosfataser») og metafosfat til orthofosfat («metafosfataser»). I disse reaksjoner inngår uorganiske katalysatorer (i hovedsak mangan-dioksyd), og gjør det vanskelig å vurdere den «rene» enzymatiske hydrolyse.

De studier som er foretatt av enzymerne i fosforsyklusen, går i hovedsak på orthofosfat-fosfatmonoester hydrolaser. Ut fra H^+ -ionekonsentrasjonene i mediet ved maksimal aktivitet skilles mellom sure (maks.akt. rundt pH 5.0) og alkaliske fosfataser (maks.akt. rundt pH 9.0). Noen forfattere (HOFFMAN 1967, NEUMANN 1968, TARAFDAR & CHHONKAR 1978b) skil-

ler i tillegg ut en nøytral fosfatase. (Maks.akt. omtrent ved pH 7.0.)

I de senere år er det også gjort forsøk på å estimere aktiviteten av «di- og triesteraser» i jord (EIVAZI & TABATABAI 1977).

IV. Estimering av abiontiske enzymaktiviteter i jord

I utgangspunktet er metoden for estimering av abiontiske enzymaktiviteter i jord forholdsvis enkel. I realiteten er det beskrevet en rekke metoder, selv om de i prinsippet er identiske.

En jordprøve inkuberes i bufret system en viss tid ved en viss temperatur med et egnet substrat. Etter inkubasjonsperioden analyseres prøven enten på restsubstrat, uorganisk orthofosfat eller den organiske delen av spaltningsproduktet. De metoder som er i bruk nå bestemmer alle hvor stor mengde av det organiske spaltningsprodukt som finnes i prøven.

Forskjellige fotometriske metoder benyttes til formålet. Et av problemene ved slike metoder er at det stoff man vil analysere på kan og vil i større eller mindre grad adsorberes til jordpartiklene. Dette har fått CERVELLI et al. (1973) til å kombinere resultater fra enzymaktivitetsanalyse med Freundlich isoterm for adsorpsjon i jord.

I de fleste tilfeller benyttes fenylfosfater som substrat og aktiviteten bestemmes ved fotometrisk analyse på fenol. Enzymaktiviteten oppgis som μg fenol frigjort pr. time og gram jord (eller cm^3 jord).

Mest brukt som substrat i de senere år er p-nitrofenylfosfat (TABATABAI & BREMNER 1969) og dinatriumfenylfosfat (HOFFMAN 1967). Videre er β -fenylfosfat (KAZIEV 1972), p-fenylfosfat (KROLL & KRAMER 1955), β -naftylfosfat (RAMIREZ-MARTINES & McLAREN 1966) vært i anvendelse. Med alle disse substrater analyseres det på fenol, selv om de direkte metoder

for fargereaksjon, ekstinksjon og så videre kan variere noe.

Glycerofosfat er også blant de substrater som har vært prøvet. I dette tilfelle analyseres det på ureagert glycerofosfat etter inkubasjonen (SKUJINSĀ et al. 1962).

Dinatriumfenylfosfat blir ansett som best egnet i de tilfelle enzymaktiviteten i organisk jord skal bestemmes (HALSTEAD 1964, TYLER 1976, HARRISON 1979, HARRISON & PEARCE 1979). Metoden er utførlig beskrevet av HOFFMAN (1967). Den enkelte forfatter har foretatt små modifikasjoner, særlig hva angår inkubasjonstemperatur og utførelse av fotometrisk analyse.

Ifølge HARRISON (1979) er det umulig å gjenfinne mer enn 45% av forventet fenolmengde ved pH <4,8 og bruk av p-nitrofenylfosfat som substrat. Med dinatriumfenylfosfat som substrat ble under de samme forhold over 94% funnet igjen.

Den totale biologiske aktivitet i jord er ikke så vanskelig å estimere. Skal bare abiontisk enzymaktivitet bestemmes, må enzymer produsert av delingsdyktige celler elimineres. Dette har vært et av de store problemer i denne del av enzymologien opp gjennom tidene. Forbedring av de analytiske metoder tillater nå svært korte inkubasjonstider, slik at en hemming av celledelingen antas å være tilstrekkelig. Fosfatasen er indusible i cellene, og det vil gå en tid før mikroorganismene har produsert de substratspesifikke enzymer. I denne lagfasen vil enzymaktiviteten så og si bare skyldes abiontiske enzymer.

En forutsetning er effektiv (om enn kortvarig) stopp av celledelingen. Denne såkalte steriliseringen blir overveiende foretatt med toluen, men bestråling fra radioaktive kilder (e^{-} , γ) synes å vinne stadig større tilslutning. Varmebehandling (autoklaving) og bruk av forskjellig

andre biologiske gifter og antibiotika har vært prøvet uten at det er funnet bedre metoder enn radioaktiv bestråling, eller for den saks skyld toluen.

V. Noen arbeider publisert etter siste litteratursammendrag

I de senere år er det utført enzymologiske arbeider som kan være til hjelp ved vurdering av den biologiske aktivitet i torv. For det meste er undersøkelsene utført med råhumus, men i hvert fall metodologisk sett skulle det være noe å hente i noen av disse arbeidene.

Forbehandling av prøver har i noen grad vært gjenstand for diskusjon. De originale metodebeskrivelser foreskriver tørking og maling (2 mm) av prøvene. De abiontiske enzymeres aktivitet blir generelt sett mindre påvirket av endringer i fuktighet og temperatur enn andre biologiske aktiviteter. På den annen side er det påvist at også forsiktig tørking kan endre systemene. Størst effekt synes å forårsakes av tørking og gjenfukting. I et arbeid av VOROB'ĒVA & GORCHARUK (1978) er temperatur og fuktighet som variabler i enzymologien undersøkt. Blant annet fant de inaktivering av fosfatasen i «lufttørre» prøver etter 1,5–2 måneder. Videre mener de å ha funnet lavere termostabilitet for fosfataser enn for mange andre enzymer.

Konsekvensen av denne type arbeider er en overgang til bruk av friske prøver ved enzymaktivitetsanalyser. I mange tilfelle vil det være nødvendig å lagre prøvene i noen tid. For eksempel kan prøvene fryses (ned til -20°) uten særlige effekter på estimert enzymaktivitet. Derimot kan frysing og tining ha andre effekter på de fysiske og kjemiske kvaliteter (SÆBØ 1968, 1969). Lagring ved $+4^{\circ}\text{C}$ (TYLER 1974, 1976) eller ved $+10^{\circ}\text{C}$ (TARAFDAR & CHHONKAR 1978a) med etterfølgende sikting (2 mm) synes å gi tilfredsstillende resultater.

I torvprøver vil det være fornuftig å benytte dinatriumphenylfosfat som substrat, lagre prøvene ved +4°C og inkubere ved rundt + 10°C.

Som tidligere nevnt presenteres ofte resultatene fra enzymaktivitetsestimering som μ g fenol g^{-1} (cm^{-3}) tørr jord. Som i enzymologien ellers, er det fullt mulig å beskrive reaksjonene ved å estimere K_m (Michaelis konstant, MICHAELIS & MENTEN 1913) og V_m -verdier. K_m er definert som den substratkonsentrasjon som gir 50% av maksimal reaksjonsrate med et bestemt substrat og enzym. V_m er maksimal reaksjonsrate (μ g fenol g^{-1} (cm^{-3})). Resultater fra slike beregninger finnes blant annet hos TABATABAI & BREMNER (1971), CERVELLI et al. (1973), EIVAZI & TABATABAI (1977), IRVING & COSGROVE (1976) og TARAFDAR & CHHONKAR (1978b). Det finnes også arbeider hvor enzymaktiviteter er forsøkt korrelert med diverse jordparametre som organisk karbon og pH (JUMA & TABATABAI 1978), biomasse av mikroorganismer (HANKIN & HILL 1978, VOROB'EVA & GORCHARUK 1978), jord pH, organisk karbon og leirinnhold (TARAFDAR & CHHONKAR 1978b), forurensning av sporstoffer (TYLER 1976, JUMA & TABATABAI 1977), fosfatkonsentrasjon (TYLER 1976, SPIERS & MCGILL 1979) og innhold av organisk karbon og nitrogen (NIGRO & SCANELLA 1977). Langt flere tar for seg slike sammenhenger, og hva eldre arbeider angår, henvises til de litteratursammendrag som er nevnt i innledningen.

VI. Referanser

Anderson, G. 1960. Factors affecting the estimation of phosphate esters in soil. *J. Sci. Food Agric.* 11: 497-503.
 Anderson, G. 1967. Nucleic acids, derivatives, and organic phosphates. Pp. 67-90 in: McLaren, A. D. & Peterson, G.

H. (eds.) Soil biochemistry. Vol. I. Marcel Dekker, New York. 509 pp.
 Cervelli, S., Nannipieri, P., Ceccanti, B. & Segui, P. 1973. Michaelis constant of soil acid phosphatase. *Soil Biol. Biochem.* 5: 841-845.
 Cosgrove, D. J. 1967. Metabolism of organic phosphates in soil. Pp. 216-228 in: McLaren, A. D. & Peterson, G. H. (eds.) Soil biochemistry, Vol. I. Marcel Dekker, New York. 509 pp.
 Eivazi, F. & Tabatabai, M. A. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9: 167-172.
 Halstead, R. L. 1964. Phosphatase activity of soils as influenced by lime and other treatments. *Can. J. Soil Sci.* 44: 137-144.
 Halstead, R. L. & McKercher, R. B. 1975. Biochemistry and cycling of phosphorus. Pp. 31-63 in: Paul, E. A. & McLaren, A. D. (eds.) Soil biochemistry, Vol. IV. Marcel Dekker, New York. 277 pp.
 Hankin, L. & Hill, D. E. 1978. Proportion of bacteria in agricultural soils able to produce degradative enzymes. *Soil Sci.* 126: 40-43.
 Harrison, A. F. 1979. Variation of four phosphorus properties in woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 11: 393-403.
 Harrison, A. F. & Pearce, T. 1979. Seasonal variation of phosphatase activity in woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 11: 405-410.
 Hoffman, G. 1967. Eine photometrische Methode zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität im Böden. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkd.* 118: 161-172.
 Irving, G. C. J. & Cosgrove, D. J. 1976. The kinetics of soil acid phosphatase. *Soil Biol. Biochem.* 8: 335-340.
 Juma, N. G. & Tabatabai, M. A. 1977. Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 343-346.
 Juma, N. G. & Tabatabai, M. A. 1978. Distribution of phosphomonoesterases in soils. *Soil Sci.* 126: 101-108.
 Kaziev, F. 1972. Determination of phosphatase activity in soils. *Biol. Sol.* 16: 22-30.

- Kiss, S., Drăgan-Bularda, M. & Rădulescu, D. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agronomy* 27: 25–87.
- Kroll, L. & Kramer, M. 1955. The influence of clay minerals on the activity of soil phosphatase.
- Naturwissenschaften* 42: 157–163.
- Michaelis, L. & Menten, M. L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49: 333–369.
- Neuman, H. 1968. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. *J. Biol. Chem.* 243: 4671–4676.
- Nigro, C. & Scandella, P. 1978. L'attività fosfatase del terreno. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante* 8: 1–13.
- Ramirez-Martinez, J. R. 1968. Organic phosphorus mineralization and phosphatase activity in soils. *Folia Microbiol.* 13: 161–174.
- Ramirez-Marinez, J. R. & McLaren, A. D. 1966. Determination of soil phosphatase activity by a fluorimetric technique. *Enzymology* 30: 243–253.
- Rogers, H. T. 1942. Dephosphorylation of organic phosphorus compounds by soil catalysis. *Soil Sci.* 54: 439–445.
- Skujinš, J. J. 1967. Enzymes in soil. Pp. 371–414 in: McLaren, A. D. & Peterson, G. H. (eds.) *Soil biochemistry*. Vol. I. Marcel Dekker, New York. 509 pp.
- Skujinš, J. J. 1976. Extracellular enzymes in soil. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 4: 383–421.
- Skujinš, J. J., Braal, L. & McLaren, A. D. 1962. Characterization of phosphatase in a terrestrial soil sterilized with an electron beam. *Enzymologia* 25: 125–133.
- Spiers, G. A. & McGill, W. B. 1979. Effects on phosphorus addition and energy supply on acid phosphatase production and activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 11: 3–8.
- Sæbø, S. 1968. The autecology of *Rubus chamaemorus* L. I. Phosphorus economy of *Rubus chamaemorus* in an ombrotropic mire. *Meddr. Norges landbrukshøyskole* 47: 1–67.
- Sæbø, S. 1969. On the mechanism behind the effect of freezing and thawing on dissolved phosphorus in *Sphagnum fuscum* peat. *Meddr. Norges landbrukshøyskole* 48: 1–10.
- Tabatabai, M. A. & Bremner, J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301–307.
- Tabatabai, M. A. & Bremner, J. M. 1971. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biol. Biochem.* 3: 317–323.
- Tarafdar, J. C. & Chhonkar, P. K. 1978 a. Status of phosphatases in the root – soil interface of leguminous and non-leguminous crops. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 141: 347–351.
- Tarafdar, J. C. & Chhonkar, P. K. 1978b. Thermal sensitivity and Michaelis constants for acid, neutral and alkaline phosphatases in different soils and root exudates. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 141: 753–759.
- Tyler, G. 1974. Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. *Plant and Soil* 41: 303–311.
- Tyler, G. 1976. Heavy metal pollution, phosphatase activity and mineralization of organic phosphorus in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 8: 327–332.
- Vorob'eva, E. A. & Gorcharuk, L. M. 1978. A comparative study of the potential biological activity of certain Caucasian soil types. *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* 33: 41–47.