**土壤纤维素酶活性测定（3,5- 二硝基水杨酸比色法）**

**一、原理**

纤维素是植物残体进入土壤的碳水化合物的重要组分之一。在纤维素酶作用下，它的最初水解产物是纤维二糖，在纤二糖酶作用下，纤维二糖分解成葡萄糖。所以，纤维素酶是碳素循环中的一个重要的酶。纤维素酶解所生成的还原糖与 3,5- 二硝基水杨酸反应而生成橙色的3-氨基-5-硝基水杨酸。颜色深度与还原糖量相关，因而可用测定还原糖量来表示蔗糖酶的活性。

**二、试剂**

1）甲苯

2）1%羧甲基纤维素溶液：1g 羧甲基纤维素钠，用50%的乙醇溶至100ml。

3）pH5.5醋酸盐缓冲液：

0.2mol/L 醋酸溶液 11.55ml 95% 冰醋酸溶至1L；

0.2mol/L 醋酸钠溶液 16.4g C2H3O2Na或27.22g C2H3O2Na.3H2O溶至1L；

取11ml 0.2mol/L 醋酸溶液和88ml 0.2mol/L 醋酸钠溶液混匀即成PH 5.5醋酸盐缓冲液。

4）3,5-二硝基水杨酸溶液：称1.25g二硝基水杨酸，溶于50ml 2mol/LNaOH和125ml水中，再加75g酒石酸钾钠，用水稀释至250ml（保存期不过7天）。

5）葡萄糖标准液（1mg/mL）

预先将分析纯葡萄糖置80℃烘箱内约12小时。准确称取50mg葡萄糖于烧杯中，用蒸馏水溶解后，移至50mL容量瓶中，定容，摇匀（冰箱中4℃保存期约一星期）。若该溶液发生混浊和出现絮状物现象，则应弃之，重新配制。

**三、操作步骤**

葡萄糖标准曲线：分别吸1mg/mL的标准葡糖糖溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mL于试管中，再补加蒸馏水至1mL，加DNS溶液3ml混匀，于沸腾水浴中加热5min，取出立即泠水浴中冷却至室温，以空白管调零在波长540nm处比色，以OD值为纵坐标，以葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线。

称10g土壤置于50ml三角瓶中，加入1.5ml甲苯，摇匀后放置15min，再加5ml 1%羧甲基纤维素溶液和5ml pH5.5醋酸盐缓冲液，将三角瓶放在37℃恒温箱中培养72h。培养结束后，过滤并取1ml滤液，然后按绘制标准曲线显色法比色测定。（为了消除土壤中原有的蔗糖、葡萄糖而引起的误差，每一土样需做无基质对照，整个试验需做无土壤对照；如果样品吸光值超过标曲的最大值，则应该增加分取倍数或减少培养的土样。）

**四、结果计算**

纤维素酶活性以72h，1g干土生成葡萄糖毫克数表示。

纤维素酶活性=（a样品－a无土－a无基质）×n／m

其中：a样品、a无土、a无机质分别表示其由标准曲线求的葡萄糖毫克数；n为分取倍数；m表示烘干土重