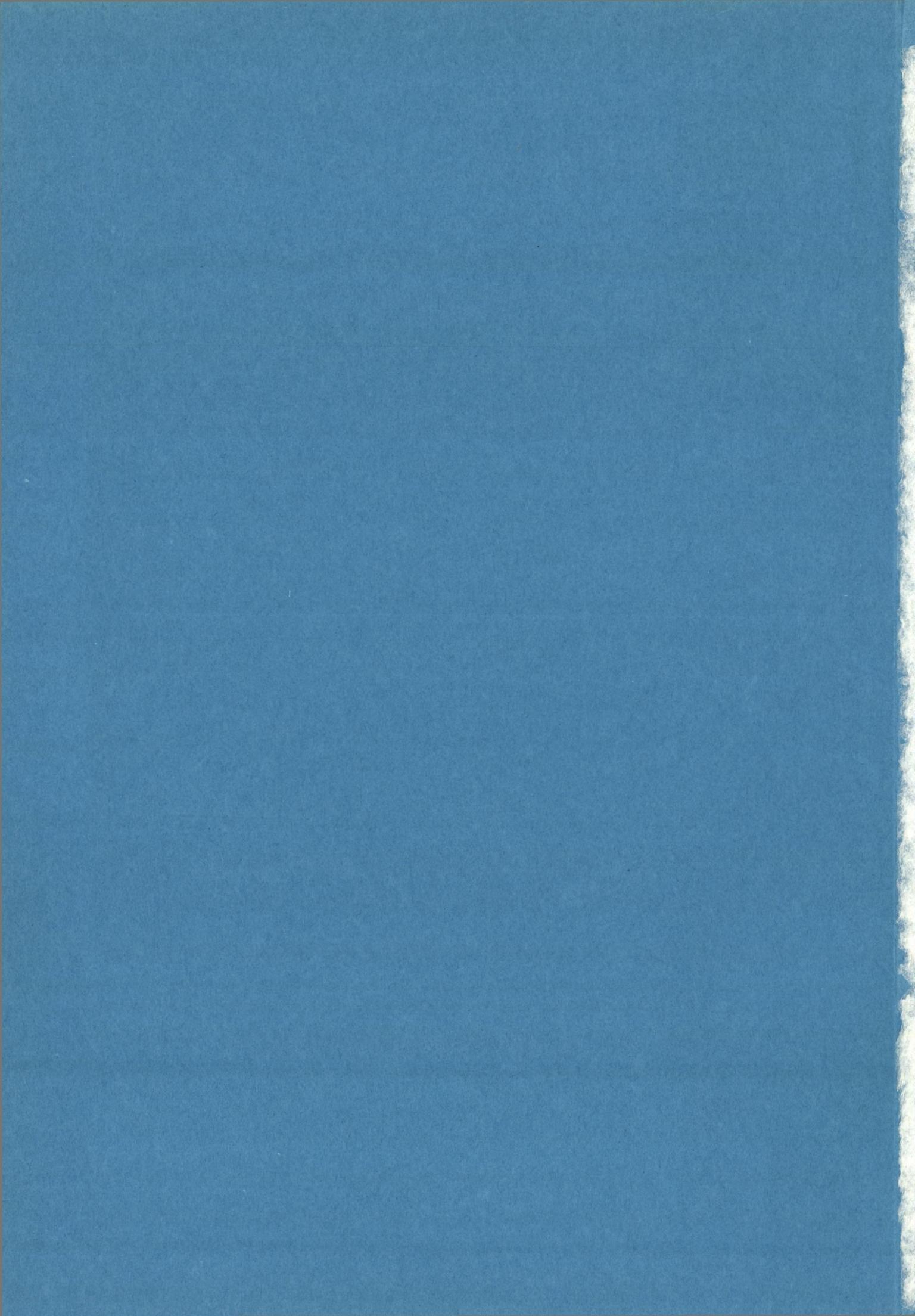


STATENS PLANTEAVLSFORSØG
BERETNING NR. S 1442

METODIK VED UNDERSØGELSER OVER JORDBUNDSSORGANISMERNES
BIOMASSE OG AKTIVITET

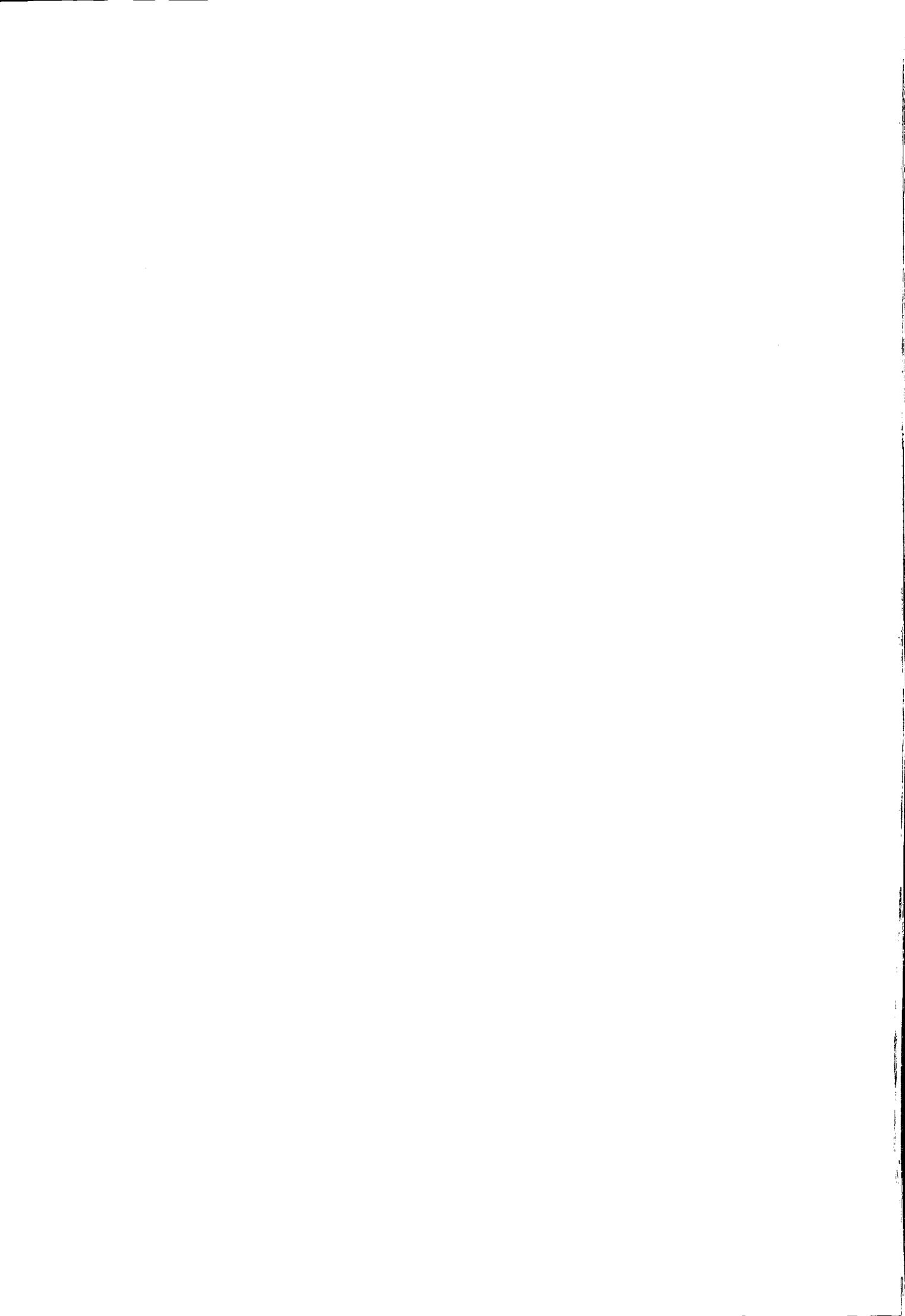
FINN EILAND, JØRGEN F. HANSEN OG T. VINCENTS NISSEN
STATENS PLANTEAVLS-LABORATORIUM, LYNGBY
1979

TIDSSKRIFT FOR PLANTEAVLS SPECIALSERIE



Indholdsfortegnelse.

Indledning.....	2
MIKROORGANISMERNES BIOMASSE OG AKTIVITET.....	3
BIOMASSE.....	5
Jenkinsons metode.....	5
Måling af ATP.....	16
Pladespredning.....	24
Fluorescensmikroskopi.....	29
RESPIRATION.....	35
Måling af kuldioxidproduktion.....	35
Måling af iltforbrug.....	41
ENZYMAKTIVITET I JORD.....	48
Dehydrogenase.....	48



Indledning

Med støtte fra Statens jordbunds- og veterinærvidenskabelige Forskningsråd udføres ved Statens Planteavls-Laboratoriums bakteriologiske afdeling, Lyngby, økologiske undersøgelser over jordbundsmikroorganismer. Forskningsprojektet omfatter anvendeligheden af nyere metoder i en undersøgelse af mikroorganismernes biomasse og aktivitet i danske landbrugsjorder. Materialet for undersøgelsen har været gødningsforsøgene ved Askov forsøgsstation.

Med baggrund i de indtil nu indvundne erfaringer gives der i det følgende en oversigt over de udvalgte metoders udførelse i praksis ved laboratoriet.



MIKROORGANISMERNES BIOMASSE OG AKTIVITET.

Det største antal mikroorganismer findes i jordbundens øverste 10-20 cm. Derefter aftager de som følge af mangel på næring og ilt. Omkring kerner med stort iltforbrug kan opstå iltfattige øer, hvor livsbetingelserne helt ændres. I rodzonen øges mikroorganismetallet stærkt, takket være udskillelse af sukkerarter, aminosyrer og vækstpåvirkende stoffer fra planterødder samt afstødning af vævsdele fra disses overflade. Her er ofte 100 gange så mange bakterier som i den rodfri jord. Mange af disse frigør her plantenæring til gavn for rødderne; nogle kan binde frit kvælstof og andre producerer stoffer mod plantepatogener.

I agerjorden anvendes dette øverste jordlag som grobund for plantevæksten. Jordbunden kan betragtes som et levende system, et levende væv, hvor planterødder, makrofauna (regnorme og insekter), mikrofauna (protozoer, nematoder og mider) og mikroflora (bakterier, svampe og alger) arbejder i indbyrdes samvirke og afhængighed, med kulisser og substrat bestående af organiske og uorganiske partikler, vandhinder og luftrum.

Størrelsen af den mikrobielle biomasse i agerjorden vil til enhver tid være afhængig af fugtighed, pH, ilt, temperatur og rette næring. Størrelsen og især kapaciteten af mikroorganismernes biomasse er en væsentlig del af det grundlag,

som betinger tilstedevarelsen af tilgængelig næring for planterne under dyrkningsforløbet.

Det optimale vandindhold for mikroorganismerne ligger nær 2/3 af jordens vandholdende evne. Via vandindhold påvirkes udvekslingen af ilt, kuldioxid og næringsoptagelse.

For bakterielivet er en almen jordreaktion over pH 6 gunstig. Men det er kendt, at mikrolokaliteter kan have forskellig reaktion og dermed betinge lokale variationer i organismernes livskår.

Temperaturen er af væsentlig betydning både for biomassens størrelse og for dens arbejde.

Mikroorganismernes biomasse og aktivitet har overmåde betydning for jordbundens egnethed som vækstsubstrat for planter. De virker både som transformatorer og depoter i et komplekst kredsløb. Jordbundsmikroorganismerne kan betragtes som kemiske kraftcentre, takket være en stor formeringshastighed, en betydelig overfladekapacitet og en anselig nedbrydningsevne som følge af enzymproduktion. Metoderne i jordbundsmikrobiologien rummer mange problemer, og man søger i disse år at forbedre metodikken, så det kan blive muligt at opnå et pålideligt billede af biomassen og den mikrobiologiske aktivitet i jorden.

MIKROORGANISMERNES BIOMASSE

BESTEMMELSE AF BIOMASSEINDEKS EFTER JENKINSONS METODE.

Ved at dampne en jordprøve med chloroform inaktivieres en del af mikroorganismerne i jorden, og disse tjener da som let tilgængelig organisk næring for de overlevende (eller ved podning tilførte) mikroorganismer. Dette medfører større kuldioxid-udskillelse i dampet end i ubehandlet jord. Forskellen betragtes da som et udtryk for let omsætteligt organisk materiale inden dampning.

Metoden kan kun anvendes under visse forudsætninger. Jorden må ikke lufttørres og genopfugtes før dampning, da let tilgængeligt humusmateriale så vil omsættes sammen med de døde bakterier. Endvidere kan metoden ikke bruges på jord, der indeholder eller lige har fået tilført store mængder organisk materiale.

Materiale:

2-liter Erlenmeyerkolber
Trådkurve med prop } fig. 1.

Apparatur for aftapning af $\text{Ba}(\text{OH})_2$, fig. 2.

HCl-beholder og burette, fig. 3.

Ekssikatorer med hane (skal kunne tåle udpumpning).

Sugepumpe

Hg-manometer

Kolonne for rensning af chloroform

Sugekolbe



Reagenser:

0,04545 N HCl (ampul)

0,04545 N Ba(OH)₂ tilsat 10 g BaCl₂/l opløsning

Indikator: 0,1 g Thymolblåt oploses i 100 ml H₂O + 2 ml 0,1 M NaOH

Chloroform

Basisk Al₂O₃

Acetone (teknisk)

0,04545 N HCl fremstilles ved at fortynde en ampul 0,1 HCl op til 2200 ml samlet volumen.

0,04545 N Ba(OH)₂ fremstilles ud fra en mættet opløsning af Ba(OH)₂ på følgende måde: Der udtages 5,0 ml mættet opl. af Ba(OH)₂ og til-sættes 7 dråber indikator og titreres med 0,04545 N HCl. Deraf kan man beregne hvor meget vand, der skal tilsettes til en be-stemt mængde mættet opløsning af Ba(OH)₂, for at få 1 ml 0,04545 N Ba(OH)₂ ~ 1 ml 0,04545 N HCl. For at stabilisere 0,04545 N Ba(OH)₂-opløsningen, skal der tilsettes 10 g BaCl₂ pr. l opløsning.

Fortyndingen af mættet Ba(OH)₂ beregnes på følgende måde:

5 mg mættet Ba(OH)₂ bruger x ml 0,04545 N HCl til neutralisering.

Mættet Ba(OH)₂ skal fortyndes $\frac{x}{5}$ gange.

Ved fremstilling af 5000 ml 0,04545 N Ba(OH)₂ skal anvendes:

$\frac{5000}{x} \cdot 5$ ml mættet Ba(OH)₂ opl.

eller: y ml mættet Ba(OH)₂ skal fortyndes op til et samlet volu-men på: y gange $\frac{x}{5}$ ml.

Metode:

Vandindholdet i jorden justeres inden måling til 60 % af vandholdende evne. Jordens vandholdende evne kan bestemmes på følgende måde:



1. Først mættes filterpladen i en G3-filtertragt med deioniseret vand ved at lade dragten ligge i vand i et døgn.
2. Filterdragten fyldes med deioniseret vand nedefra til filterpladen og anbringes i en vandfyldt Erlenmeyerkolbe (deion. vand).
3. I dragten anbringes 50 g jord, og dragten dækkes med en plastpose.
4. Når jorden fyldes i, suges der vand op i jorden, og efter henstand i 2-4 timer foretages med spatel en grundig omrøring af jorden. Herved falder jorden mere sammen, og en del af vandet dræner ud af jorden.
5. Efter henstand i et døgn bestemmes jordens vandindhold ved vejning før og efter tørring ved 105°C i 24 timer. Dette vandindhold er vandindholdet ved jordens vandholdende evne.
6. Vægt % vand ved 60 % af vandholdende evne beregnes.

Beregningseksempel:

50,000 g (våd jord før tørring)

30,000 g (jord efter tørring ved 105°C i 24 timer)

20,000 g vandindhold i jorden

$$60 \% \text{ af } 20 \text{ g } \text{H}_2\text{O} = \underline{12 \text{ g } \text{H}_2\text{O}}$$

$$\text{Tør jord} + 60 \% \text{ H}_2\text{O} = 30 \text{ g} + 12 \text{ g} = \underline{42 \text{ g}}$$

Vægtprocent H_2O ved 60 % af vandholdende evne.

$$\frac{12 \times 100}{42} = \underline{28,5 \% \text{ H}_2\text{O}}$$

I trådkurve anbringes 60 g fugtig jord (mindst 4 stk. pr. jordtype). Der udtages jord til bestemmelse af pH og vandprocent. Desuden udtages en lille jordmængde (ca. 50 g), som opbevares ved 25°C til podning af den dampede jord. Kurve med jord, anbringes i en ekssikkator for anvendelse til chloroformdampning, og et tilsvarende antal kurve med jord anbringes i en anden ekssikkator, hvor der ikke tilsættes chloroform.

Dampning foretages i stinksak. Der bruges 100 ml alkoholfrit CHCl_3 . Før dampning må chloroformen renses for alkohol: 150 g basisk Al_2O_3 fyldes i en kolonne, og 200 ml CHCl_3 sendes gennem kolonnen 3 gange. Chloroformen suges gennem kolonnen og ned i en Erlenmeyerkolbe ved hjælp af sugepumpe (fig. 4.). Der anvendes dobbelt mængde CHCl_3 , idet omkring halvdelen absorberes i Al_2O_3 .

To ekssikkatorer med jordprøverne fores med fugtig filterpapir. Den alkoholfrie chloroform anbringes i et bægerglas, hvori der findes lidt pimpsten, og anbringes i den ene ekssikkator (fig. 5.). Ekssikkatoren udpumpes, indtil chloroformen koger kraftigt (ca. 700 mm Hg i undertryk), lukkes, og står i mørke i en sort plastpose i 18-24 timer. Efter 18-24 timer fjernes bægeret med CHCl_3 , og det fugtige filterpapir fra ekssikkatoren. Denne udpumpes til et undertryk på ca. 700 mm Hg og står således i 5 min.. Dette gentages 6 gange. Efter udpumpningen må der ikke være vacuum på slangen ned til pumpen, da der så suges olie op i slangerne. Den brugte chloroform tilsættes lidt alkohol for stabilisering og hældes i en flaske for senere bortskaffelse.

Trådkurvene med jord vejes med prop og anbringes i Erlenmeyer-kolber. Eventuelt vandtab erstattes med deioniseret vand.

Den dampede jord podes på følgende måde: 5 g udampet jord opslæmmes i 50 ml deioniseret vand ved blanding i mixer i 2 min.. Der udtages til hver jordprøve 0,5 ml efter grundig omrøring med

spatel før hver udtagning. Jordopslemningen tildryppes jordprøverne ovenfra. I bunden af Erlenmeyerkolberne anbringes en passende mængde Ba(OH)_2 (100 ml) og 7 dråber indikator. Kolber med dampet og udampet jord anbringes ved 25°C . Desuden opstilles 2 kolber med trådkurve uden jord for blindbestemmelse.

10 dage efter dampning titreres Ba(OH)_2 i kolberne, både med dampet og udampet jord, med 0,04545 N HCl. Kolberne tømmes og forsynes påny med passende mængder Ba(OH)_2 , så meget at omslag kan undgås. Titreringstallet trækkes fra blindbestemmelserne.

Vægten af jord og trådkurv med prop kontrolleres. og der tilføres deioniseret vand, hvis nødvendigt. Jordprøverne står yderligere 10 dage, hvorefter der titreres igen og målingerne afslutes.

Jorden overføres fra trådkurv til forvejet bægerglas og vandprocenten og den totale mængde tør jord af hver enkelt jordprøve bestemmes ved at veje prøverne før og efter tørring ved 105°C i 24 timer. Inden tørring udtages af 2 udampede og 2 dampede jorder 10,00 g til pH-bestemmelse. Fig. 6 viser princippet i metoden.

Beregning:

Kulstof-mikroorganisme-biomassen er beregnet efter følgende formel:

$$A = \frac{(x-y)}{K} \times 0,273$$

hvor A = C i mikroorganisme-biomasse, mg/50 g tør jord.

x = CO_2 udskilt fra dampet jord 0.-10. døgn efter dampning,
mg/50 g tør jord

y = CO_2 udskilt fra ubehandlet jord 10.-20. døgn efter dampning
er foretaget, mg/50 g tør jord

K = 0,5, den del af jordens mikroorganisme-biomasse, der er
omsat efter 10 døgn (empirisk bestemt konstant).

Jenkinson har angivet 0,5; Anderson og Domsch (1978) har angivet 0,41.

0,273 = brøkdel kulstof i CO_2 .



Eksempel på C i mikroorganisme-biomassen er beregnet fra resultaterne i fig. 7.

$$B = \frac{(x-y) \times 0,273}{K} = \frac{[23,8 - (14,3-8,9)] \times 0,273}{0,5} = \underline{\underline{10 \text{ mg C}/50 \text{ g}}}$$

tør jord

Resultaterne underkastes sædvanlig statistisk behandling.

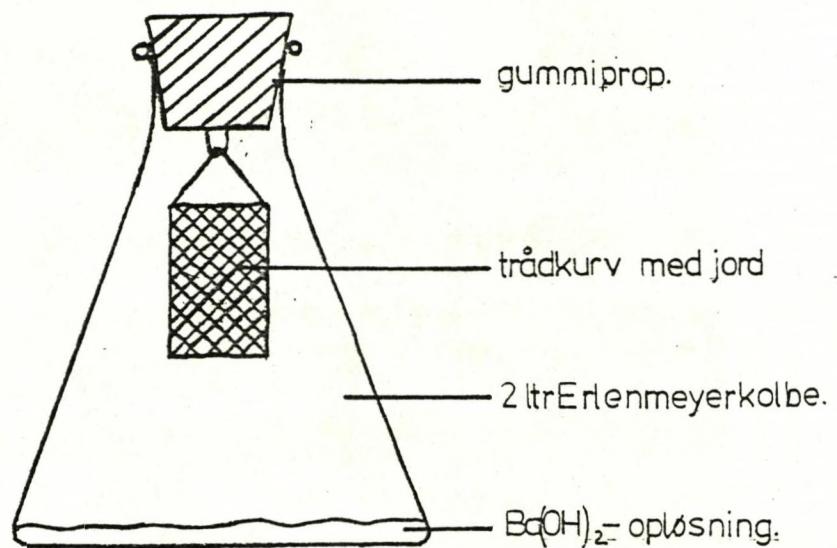


Fig. 1

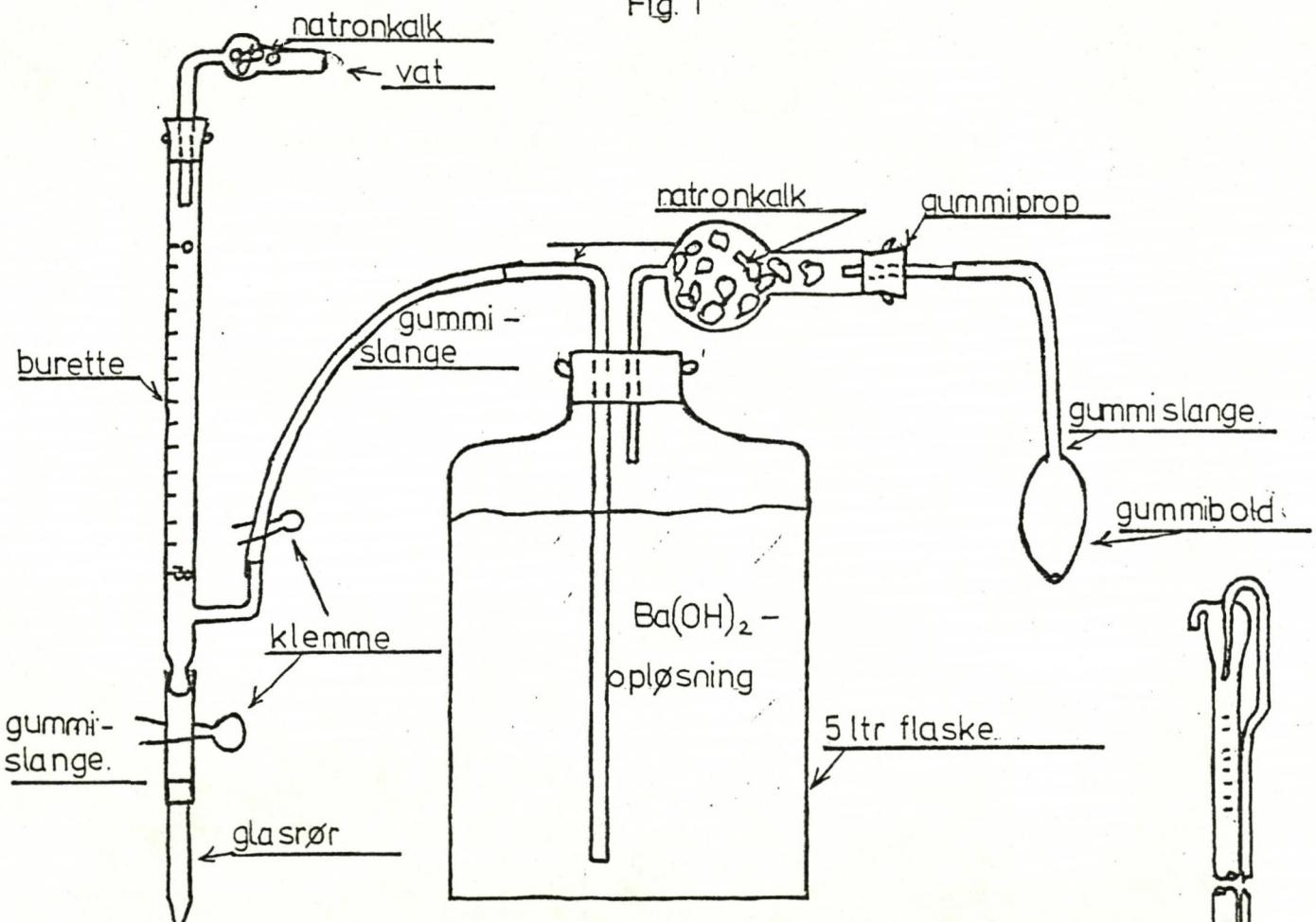


Fig. 2

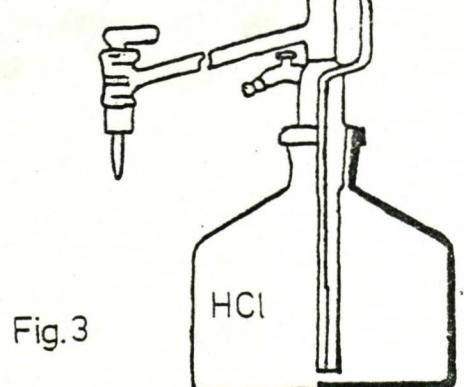


Fig. 3



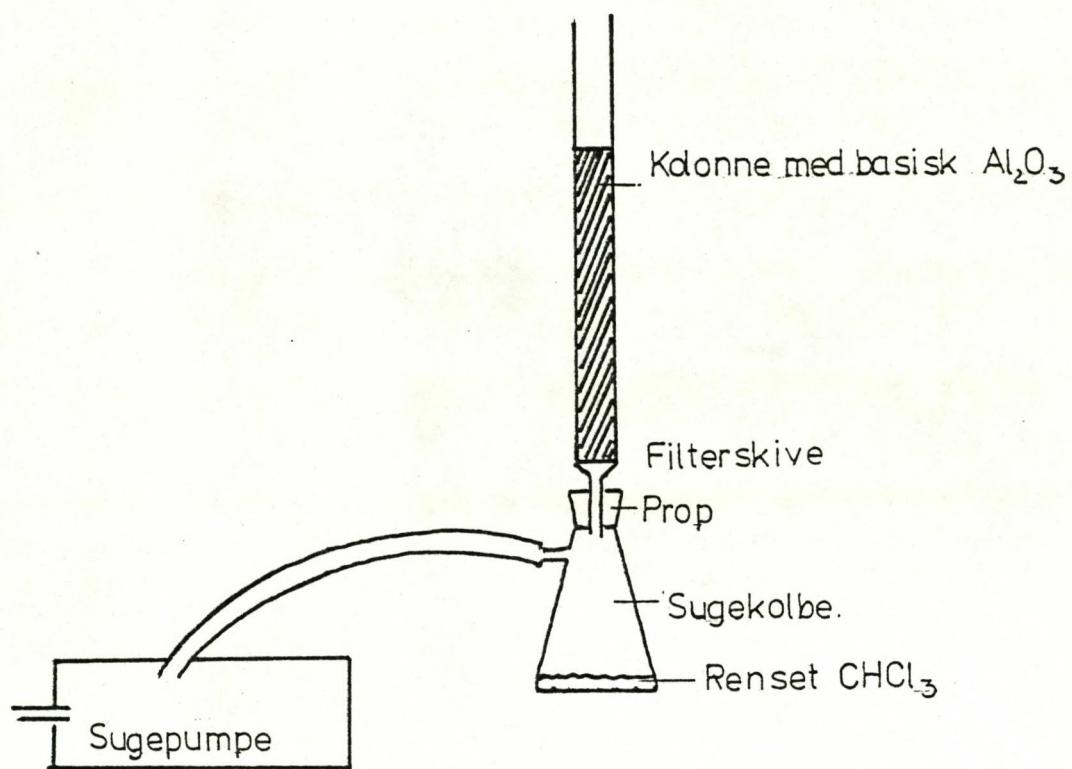


Fig. 4

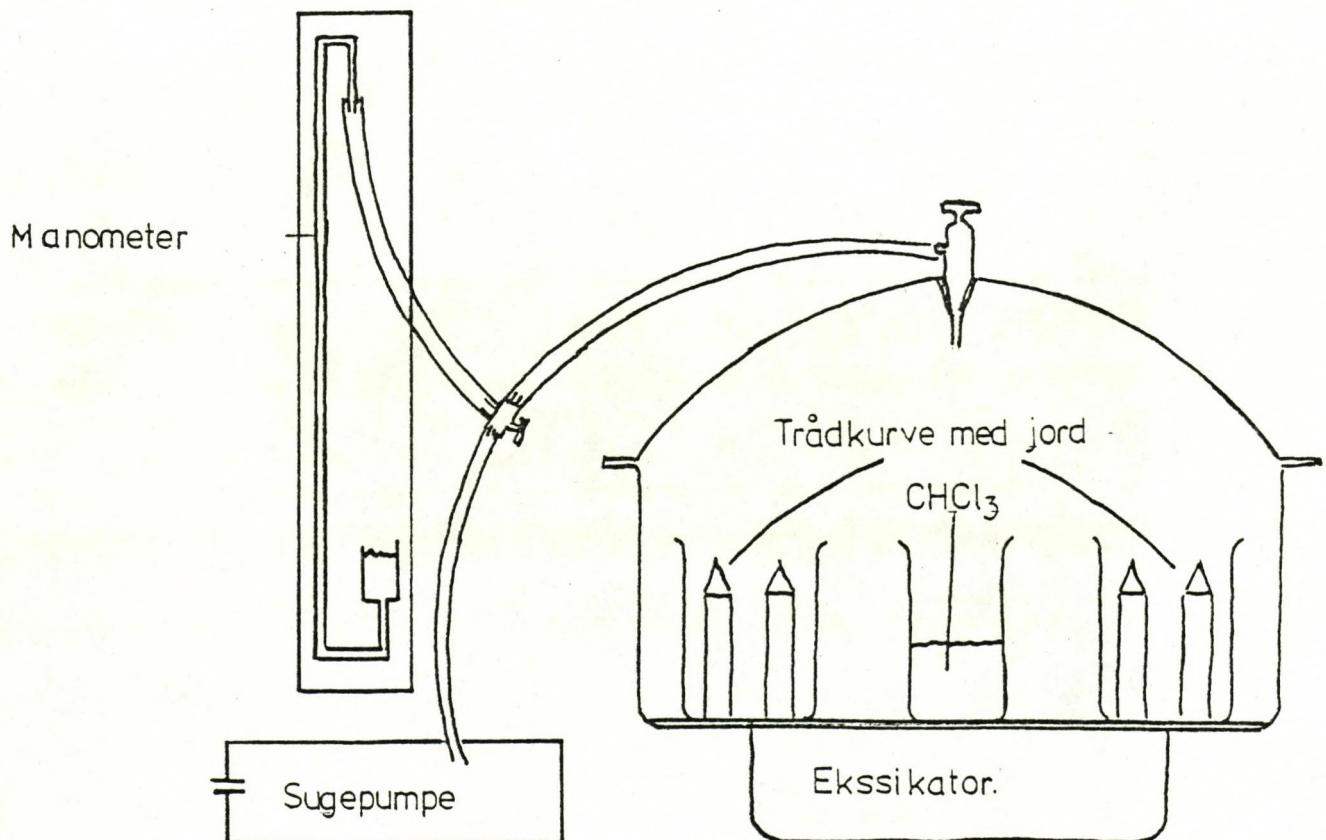


Fig. 5



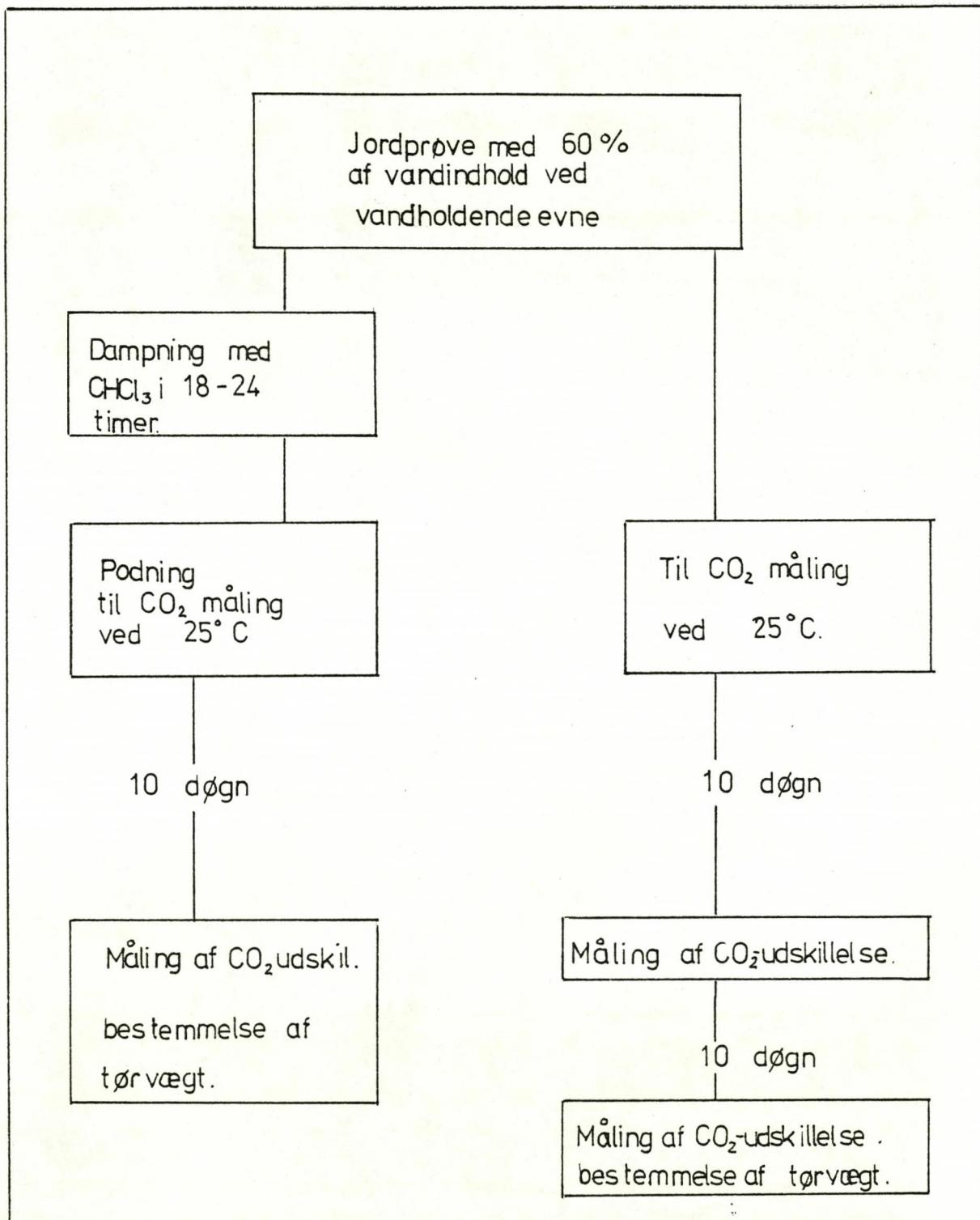


Fig. 6. Biomassebestemmelse ved chloroformdampning.



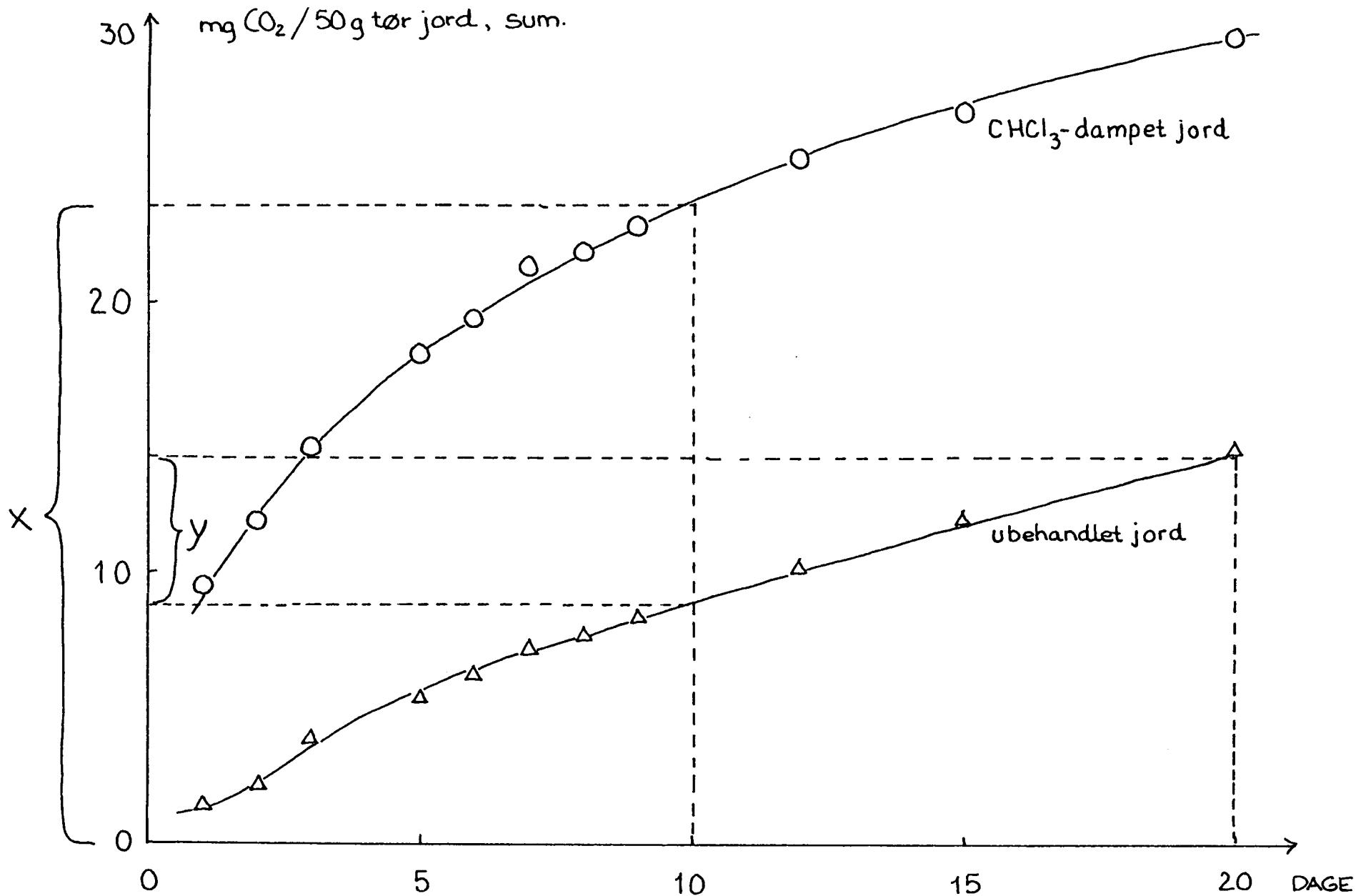


Fig. 7. CO_2 -produktion fra CHCl_3 -dampet og fra ubehandlet jord.



Litteratur:

Anderson, J.P.E. and Demsch, K.H. (1978): Mineralization of
Bacteria and fungi in Chloroform - Fumigated Soils -
Soil Biol. Biochem. 10, 207-213.

Jenkinson, D.S., and Powlson, D.S. (1976): The effects of bio-
cidal treatments on metabolism in soil- I. Fumigation with
chloroform. - Soil Biol. Biochem. 8, 167-177.

Jenkinson, D.S., Powlson, D.S. and Wedderburn, W.M. (1976):
The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-
III. The relationship between soil biovolume, measured by
optical microscopy, and the flush of decomposition caused
by fumigation. - Soil Biol. Biochem. 8, 189-202.

Jenkinson, D.S. (1976): The effects of biocidal treatments on
metabolism in soil- IV. The decomposition of fumigated or-
ganisms in soil. - Soil Biol. Biochem. 8, 203-208.

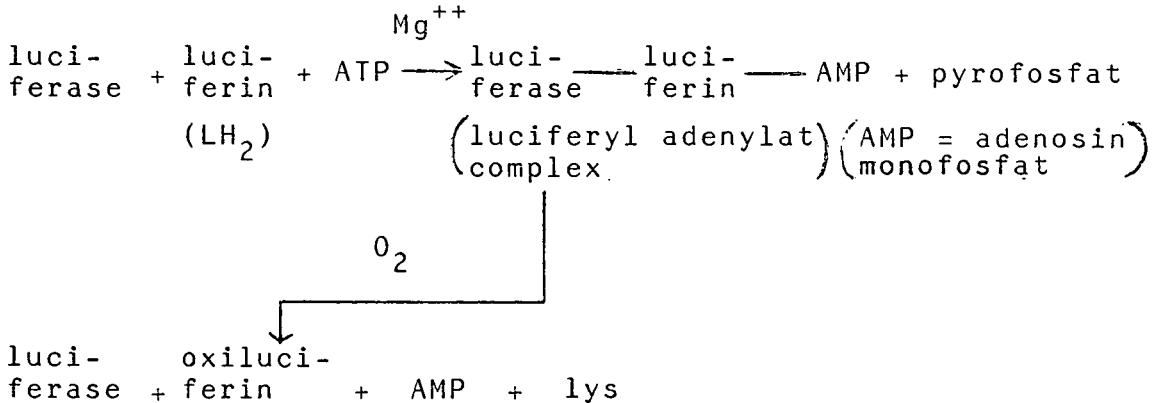
Jenkinson, D.S. and Powlson, D.S. (1976): The effects of bio-
cidal treatments on metabolism in soil - V- A method for mea-
suring soil biomass. - Soil Biol. Biochem. 8, 209-213.

Powlson, D.S. and Jenkinson, D.S. (1976): The effects of Bio-
cidal treatments on metabolism in soil- II. Gama irradia-
tion, autoclaving, air-drying and fumigation. - Soil Biol.
Biochem. 8, 179-188.

Sørensen, L.H. (1977): Factors affecting the bicstability of
metabolic materials in soil. - Soil Organic Matter Studies.
IAEA, Vienna, 3-14.

BESTEMMELSE AF ADENOSIN TRIFOSFAT (ATP) I JORD.

ATP er en energirig forbindelse, der findes i alle levende celler. Da cellernes indhold af ATP nedbrydes øjeblikkeligt ved celledød, kan ATP-mængden bruges som et udtryk for de levende celler. Cellernes ATP-indhold er både afhængig af cellernes aktivitet og mængden af levende cytoplasma. Mikroorganismernes ATP-indhold kan bestemmes kvantativt ved måling af lysudviklingen, der opstår ved reaktion mellem reduceret luciferin (LH_2), enzymet luciferase, ilt, Mg-ioner og ATP. Luciferin-luciferase systemet udvindes af ildfluehaler fra ildfluen Photinus pyralis. Reaktionen ved lysudvikling kan fremstilles således:



Når alle nødvendige stoffer er tilstede i overskud er lysudviklingen ligefrem proportional med koncentrationen af ATP i reaktionsblandingen.

Ekstraktion af ATP fra celler i jord.

Mange forskellige opløsninger er blevet brugt til ekstraktion af ATP fra forskellige omgivelser: Det er bl.a. svovlsyre, tri-



chloreddikesyre, dimethylsulfoxid, perchlorsyre og tris-buffer.

Når ATP-indholdet ekstraheres med syreopløsninger, er det vigtigt at ekstrakten har et pH < 2 for at sikre, at ATP-molekyernes fosfatgrupper ikke er ioniseret. Syren dræber cellerne, frigør intakt ATP og inaktiverer ATP-nedbrydende enzymer. I den sure ekstrakt adsorberes ATP-molekylerne ikke til kation-forbindelser i suspensionen. Desuden er ATP ret stabilt under disse forhold. Ved ekstraktionen opløses de mest P-adsorberende forbindelser (amorfe Fe- og Al-sesquioxider og CaCO₃), og det er således muligt at ekstrahere mere ATP end under neutrale betingelser. For at undgå en udfældning af ATP med Fe, Al og Ca ioner i ekstrakten ved justering af pH til 9,8, må disse ioner fjernes fra ekstrakten ved en kationbytning før indstilling af pH.

Måling af ATP.

Ved blanding af enzymopløsning og ATP-ekstrakt fås en lysudvikling, der kan registreres i et specielt fotometer. Når lysudviklingen måles, er det muligt at bestemme ATP-indholdet i forskellige jorder.

Anwendung af ATP-målinger.

ATP-indholdet i landbrugsjorder kan anvendes til at bestemme den mikrobielle biomasse og aktivitet. Til biomassebestemmelser kan der regnes med et gennemsnitligt ATP-indhold pr. bakteriecelle på $0,5 \times 10^{-6}$ ng. Det er desuden muligt at bruge ATP-målinger til at bestemme mængden af næringsstoffer, der er bundet i det mikrobielle cellemateriale. På den måde vil det være muligt at opstille modeller for Jordens tilgængelige næringsstoffer. Lee, et al. (1971) fandt forhold mellem ATP/C/N/P/S på 1 : 250 : 42 : 8,6 : 2,6 ved at bruge gennemsnitstal

citeret af andre (Spector, 1956; Strickland, et al., 1969).
(1 ng svarer til 10^{-9} g).

Materiale:

H₂SO₄ til analyse (1 N)

Ethanolamin til analyse (5 N)

Munktell 20 H filterpapir eller nr. 5 Whatman filterpapir
Dowex 50 (Na⁺ form, x 8, 20-50 mesh)

ATP-standarder

Ildflueekstrakt, (opbevares ved -20°C); et glas (50 mg) opløses i 2,5 ml destilleret vand og henstår 2 timer ved 0°C inden brug. (FLE-50, Sigma).

Lumac Celltester 2080 (fotometer) tilsluttet en programmerbar regnemaskine.

Metode:

Hele ekstraktionen udføres ved 0°C.

1. En jordprøve (5 g) rystes med kold svovlsyre (6 ml) i 5 minutter. Der anvendes en svovlsyrekoncentration, således at jord og syre giver en pH-værdi på 1,5 - 2,0. Normalt anvendt syrekonzentration er 0,6 N - 1,5 N.
2. Prøven henstår i 20 minutter med lejlighedsvis rystning.
3. Filtrering af prøven under vakuum gennem en Büchnertrægt med Munktell nr. 20 H filterpapir.
4. Kationbytning af 3 ml ekstrakt to gange på en 13 cm kolonne (Dowex 50, Na-form). Søjlen placeres ved 5°C.
5. Kolonnen elueres med 4 ml kold destilleret vand.
6. Ekstrakten justeres til pH 9,8 med 5 N ethanolamin (iskappe om glasset).
7. Målingen udføres ved injektion af 100 µl luciferin-luciferasse oplosning i 50 µl prøveekstrakt.
8. Måling af hele lysudviklingen i Lumac fotometer.



ATP-standard.

Standardopløsninger (1 ml) blandes med ekstrakter (2 ml), der er filtreret fra en steril jordprøve (punkt 3). Denne blanding behandles ligesom prøveekstrakten fra punkt 4. På den måde korrigeres for følgende: 1) ATP-tab ved tilsætning af svovlsyre, 2) tab i proceduren og 3) hemningseffekter i jordekstrakten.

Beregningseksempel:

Udregning for jordprøven:

Integration af hele lysemissionen = 10,00
(Måleresultat)

Fortynding i proceduren = $\frac{3 \text{ ml} + 4 \text{ ml}}{3 \text{ ml}}$

$$\frac{10,00 (3 + 4)}{3} = 23,33$$

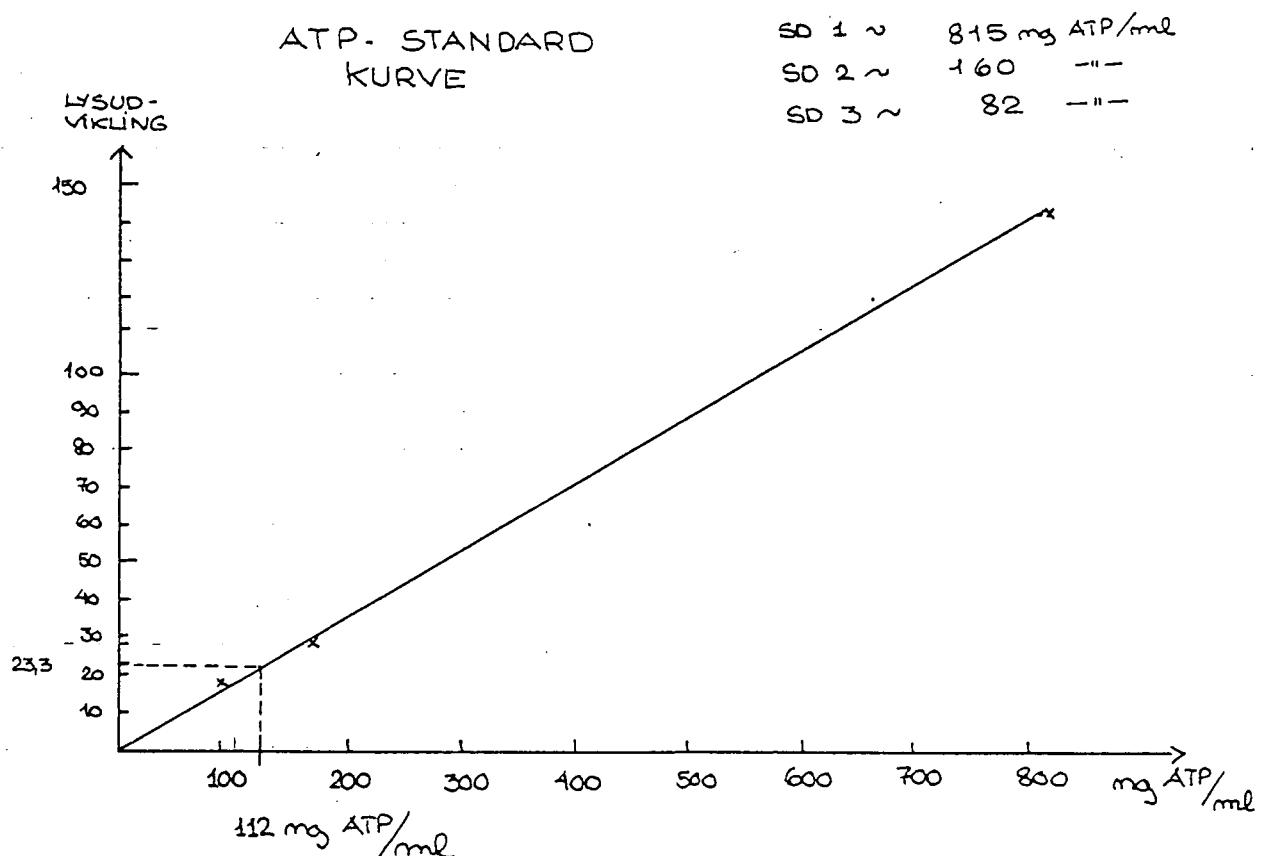
Udregning for standarder efter samme behandling som jordprøve-ekstraktionen (se under Metode).

Integration af hele lysemissionen = 4,00
(Måleresultat)

Fortyndinger i proceduren = $\frac{1 \text{ ml} + 2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$ og $\frac{3 \text{ ml} + 4 \text{ ml}}{3 \text{ ml}}$

$$\frac{4,00 \times (1 + 2) \times (3 + 4)}{1} = 28,00$$

Det er væsentligt, at prøvevolumen ved måling er det samme for prøveekstrakt og for standarder.



Efter korrektion til en standardkurve multipliceres med $\frac{6}{5}$ (5 g jord og 6 ml syre) for at få ATP-mængden pr. g jord, og der korrigeres for jordens vandindhold for at få ATP-mængden pr. g tør jord. Ved at regne med et gennemsnitligt ATP-indhold pr. bakteriecelle på $0,5 \times 10^{-6}$ ng kan biomassen pr. g tør jord beregnes. Omregning til kg biomasse pr. ha i pløjelaget bliver det samme som ng ATP pr. g tør jord.

Alle resultater underkastes statistisk behandling.



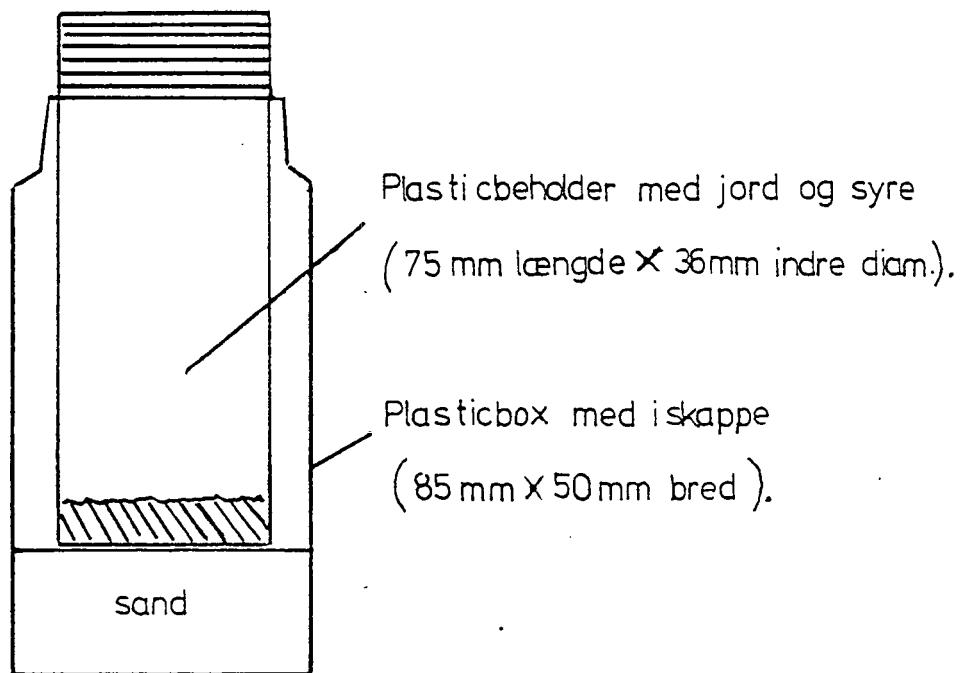


Fig. 1

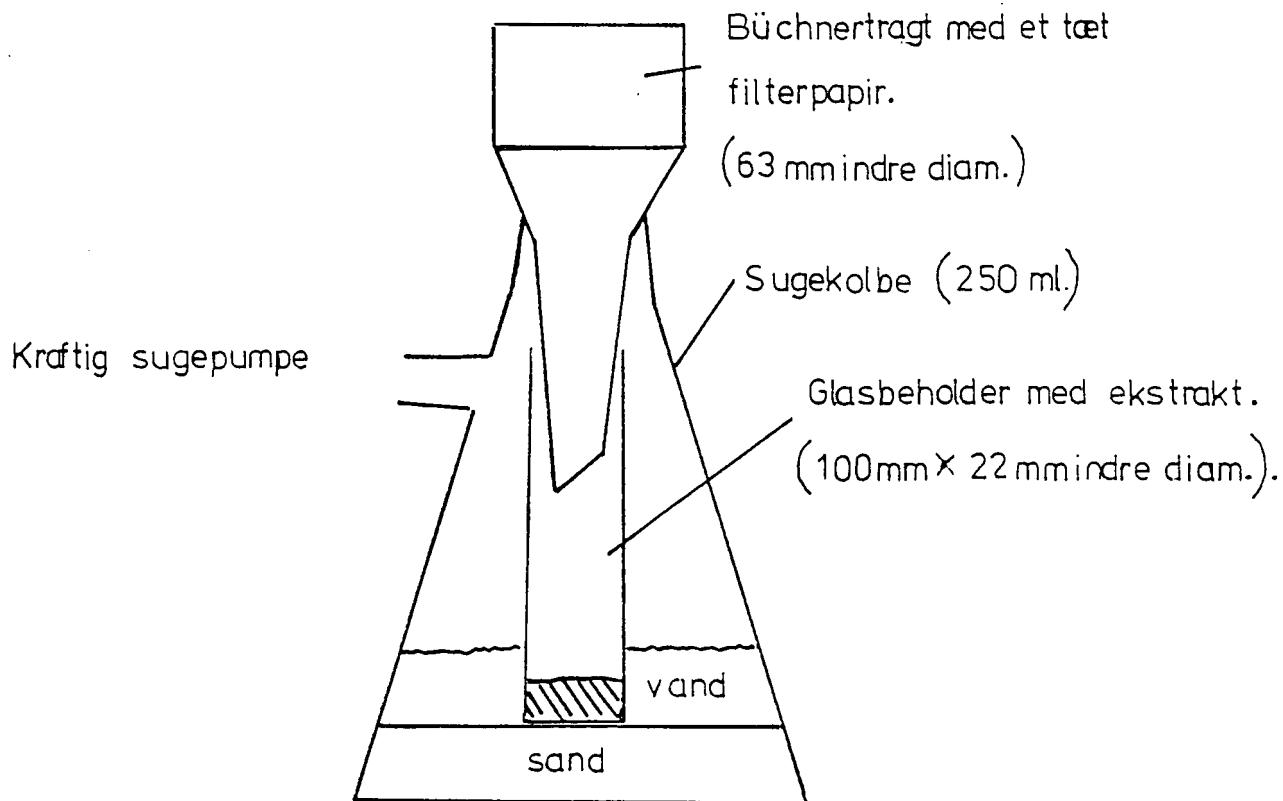


Fig. 2

Sugekolben opbevares ved -20°C med vådt sand. Inden forsøget hældes lidt vand i kolben og den placeres i et isbad.

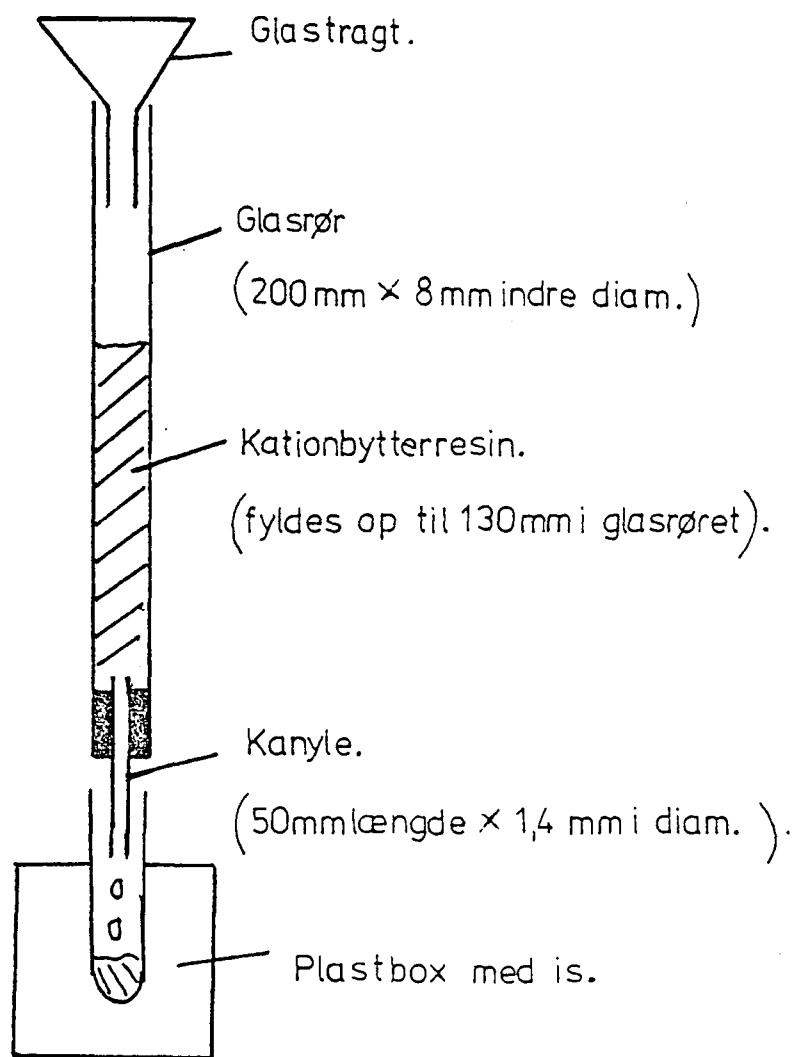


Fig. 3

Fyldning af kolonne.

Kolonnens nederste åbning lukkes med en gummidprop uden kanyle og kolonnen fyldes med destilleret vand. Ionbyttermaterialet fugtes med destilleret vand og påfyldes kolonnen. Derefter kan gummidproppen erstattes med den prop, hvor der går en kanyle igennem. Kolonnerne kan fyldes ved stuetemperatur og derpå placeres ved 5°C .



Litteratur:

Bancroft, K. Poul, E.A. and Wiebe, W.J. (1976): The extraction and measurement of adenosine triphosphate from marine sediments. - Limnol. Oceanog. 21, 273-480.

Eiland, Finn (1978): An improved method for determination of adenosine triphosphate (ATP) in soil. - Soil Biol. Biochem.

Lee, C.C. Harris, R.F. Williams, J.D.H. Armstrong, D.E. and Syers, J.K. (1971): Adenosine triphosphate in lake sediments: I. Determination. - Soil Sci. Amer. Proc. 35. 82-86.

Spector, W.S. (1956): Handbook of Biological Data. W.B. Saunders CO., Philadelphia.

Strickland, J.D.J. Holm-Hansen, O. Epplay, R.W. and Linn, R.J. (1969): The use of a deep tank in plankton ecology: In Studies of the growth and composition of phytoplankton crop at low nutrient levels. - Limnol. Oceanog. 14, 23-24.



BESTEMMELSE AF BAKTERIER I JORD VED PLADESCREDNINGER.

Pladespredningsmetoden er den først udarbejdede metode til kvantitative bestemmelser af bakterier og svampe i jord (Koch, 1881). Den bruges desuden til kvalitative studier af jordens mikroflora (isolering og rendyrkning af kolonier). Ved inkubering af agarsubstrat tilsat en jordsuspension udvikles de enkelte mikroorganismer til kolonier. Efter tælling af disse, kan antal og biomasse af levedygtige mikroorganismer i den oprindelige jordprøve beregnes. Hvis der anvendes substrater og inkubationsforhold, som er så lidt selektive som muligt, kan man i hvert fald få et udsnit af mikroorganisme-populationen.

Metoden er tidskrævende, og den har været meget diskuteret p.g.a. en række fejlkilder. Kritikere af metoden mener, at pladespredninger kun viser et lille udsnit af den totale mikroflora. Den anvendes dog stadig i vidt omfang til mange undersøgelser.

Materialer:

Substrat til bakterier:

Trypton-soya-agar (TSA) Oxoid 10 g

Tillæg af Difco agar 9 g

ad 1000 ml vand

Autoklavering i 20 min., ved 120°C

pH 7,3

Actidion (Cycloheximide), svampehømmende stof: 0,625 g Actidion oploses i 25 ml 95 % ethanol. 0,4 ml af denne oplosning tilsættes 200 ml agar. Opbevares i køleskab.



Metode:

Jorden sigtes (2 mm sigte), blandes og vandindholdet bestemmes. $3 \times 1\text{ g}$ jord afvejes, og 1 g tilføres 100 ml af fortyndingsmediet (pc) og blandes i en mixer i 2 minutter ($\frac{1}{2}$ hastighed).

Fra hver af de $3 \times 1\text{ g}$ jord udføres 2 fortyndingsrækker. Der anvendes 3 forskellige fortyndinger i hver fortyndingsrække og fra hver af disse fortyndinger podes i 6 Petriskåle.

3 jordprøver á 2 fortyndingsrækker.

3 fortyndinger i hver fortyndingsrække.

Fra hver fortynding podes 6 Petriskåle.

Ialt 108 skåle pr. jordtype. Desuden inkuberes ikke podede skåle som kontrol.

Der podes med 1 ml i hver af Petriskålene og podematerialet overhældes derpå med det smelte agarsubstrat (afkølet til ca. 50°C) og blandes omhyggeligt ved forsiktig rotering af skålene. Skålene henstår til sikker stivning.

Skålene inkuberes ved 24°C med bunden opad og tælles 4. og 8. dag.

Beregningseksempel:

1 g frisk jord med en tørstofprocent på 85.

Jorden er fortyndet 1:800.000.

Antal kolonier gennemsnit = 80.

Frisk cellevægt = $1,1 \times 10^{-12} \text{ g}$ pr. bakterie svarende til $0,2 \times 10^{-12}$ tørvægt.

$$\frac{80 \times 800.000 \times 100}{85} = \underline{75,29 \times 10^6 \text{ bakterier/g tør jord}}$$



Sættes pløjelaget til 20 cm og regnes med en vægt af dette pr.
ha på 2500 tons fås:

$$\text{kg jord i pløjelaget/ha} = \underline{25 \times 10^5}$$

$$75,29 \times 10^6 \times 25 \times 10^5 \times 1,1 \times 10^{-12} = \underline{\underline{207,1 \text{ kg frisk vægt bakterie biomasse/ha tør jord i pløjelaget}}}$$

Alle resultater underkastes statistisk behandling.

Substrat til svampe:

Glucose-pepton-agar med Bengal Rosa:

Glucose 10 g

Pepton, mykologisk 5 g

KH_2PO_4 1 g

MgSO_4 0,5 g

Bengal Rosa 0,3 g

Agar 20 g

Ad 1000 ml vand

Autoklaving i 20 min., ved 120°C .

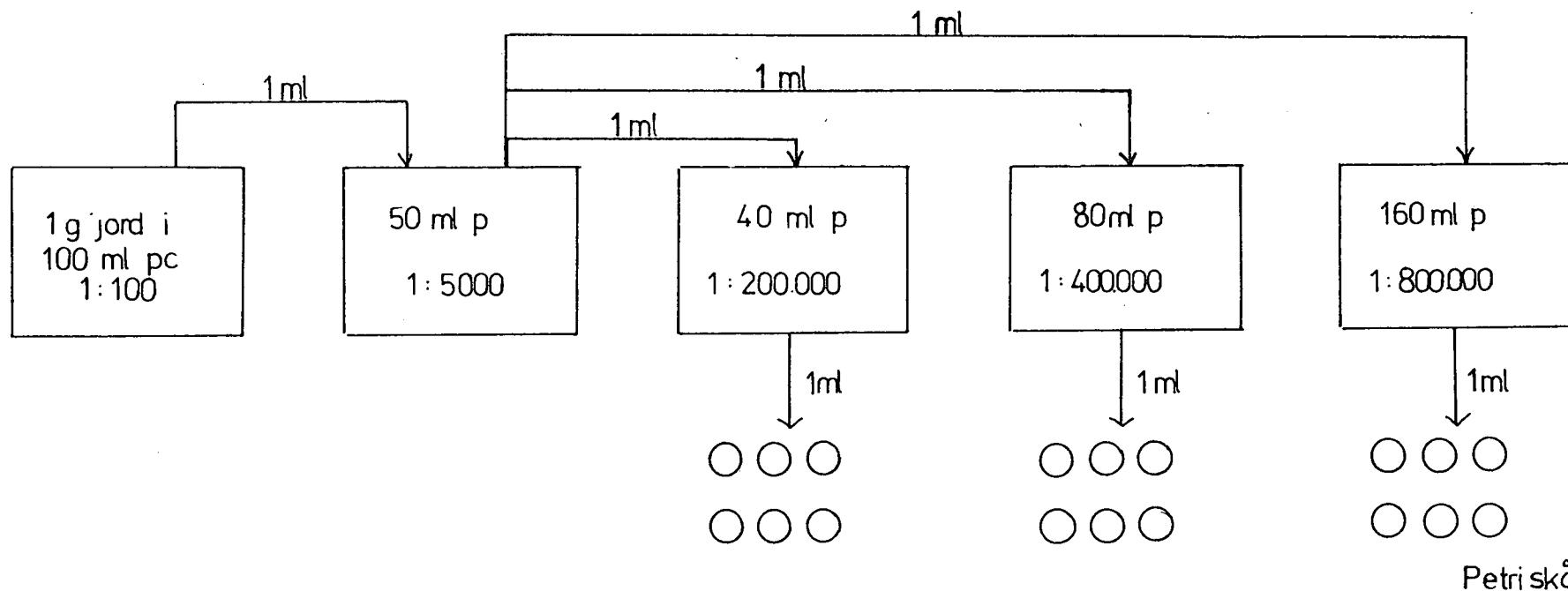
pH 5,7

Bengal Rosa begrænser svampekolonistørrelsen og hæmmer mange bakterier.

Ved svampe anvendes som regel lavere fortyndingsgrader.



EKSEMPEL PÅ EN FORTYNDINGSRÆKKE



Fortyndinger til bakterier: 1:200.000, 1:400.000, 1:800.000.

Fortyndingsmedier:

pc = 0,1 % pepton og 0,2 % calgon (natriumhexametafosfat) i sterilt vand.

p = sterilt vand med 0,1 % pepton.

Litteratur:

Jensen, V. (1967): The plate count technique. I The ecology of soil bacteria. Liverpool University Press, 158-170.

Koch, R. (1881): Untersuchung von pathogenen Organismen: Bodenuntersuchung. Mitt. K. Gesundheitsamt. 1, 34-36.

Phillipson, J. (1971): Methods of study in quantitative soil ecology: population, production and energy flow. IBP Handbook, no. 18.



FLUORESCENSMIKROSKOPI

Bestemmelse af kimal (biomasse) ved fluorescensmikroskopি

Fluorescensmikroskopet kan anvendes til direkte tælling af bakterier i en jordsuspension og dermed til skøn over jordbunds bakterie-biomasse (Strugger, 1949). Metoden er senere modificeret af Trolldenier (1973), hvis beskrivelse ligger til grund for nærværende formulering.

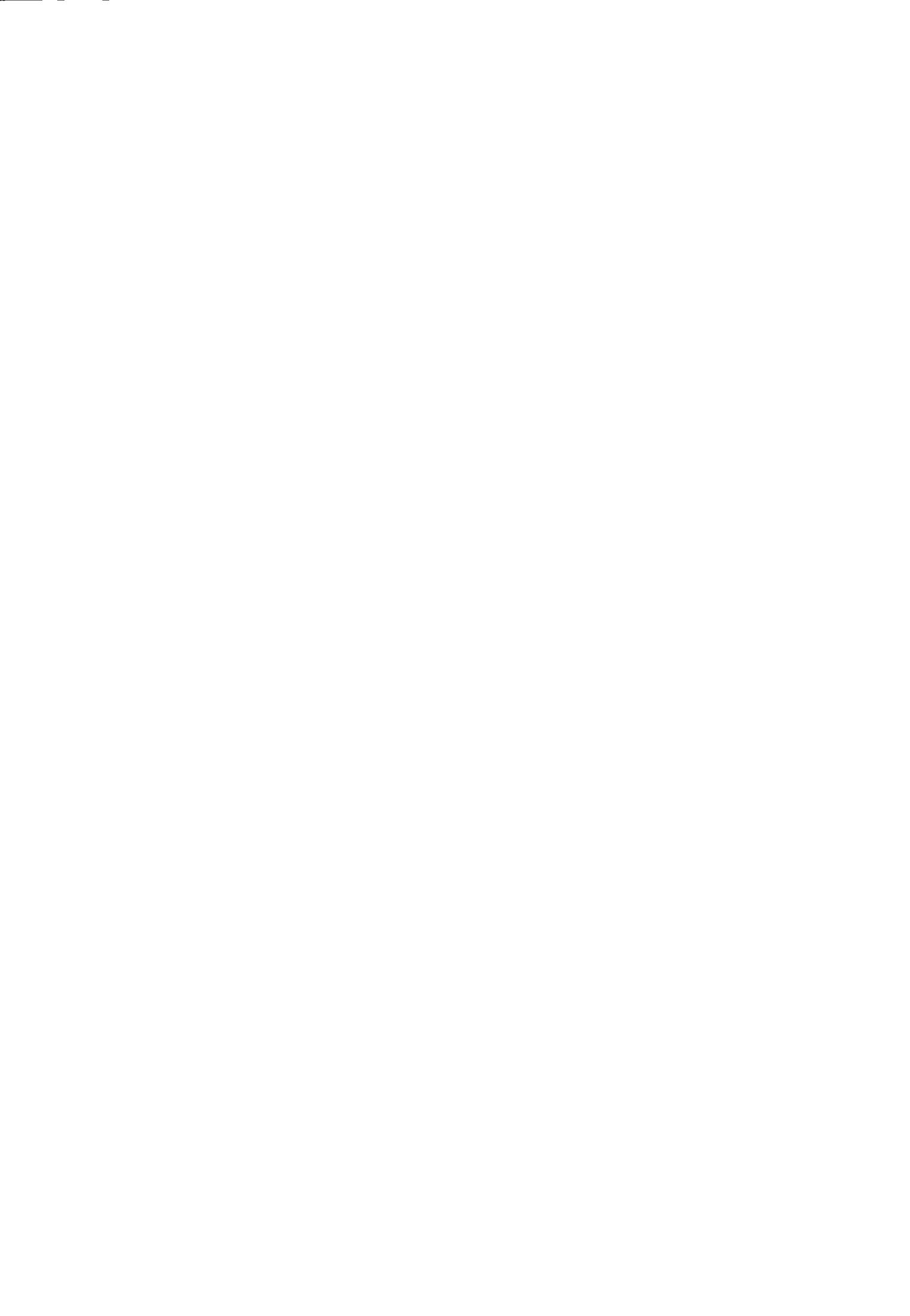
Metoden er begrundet i, at man efter farvning af en jordsuspension med visse fluorescerende farvestoffer under mikroskopet kan skelne jordbakterier fra de heterogene organiske og uorganiske partikler. Man har især arbejdet med acridin orange, og man antog i begyndelsen, at man med dette farvestof klart kunne adskille levende bakterier fra døde, idet man mente, at levende bakterier fluorescerede grønt, medens døde organismer var røde. Senere undersøgelser har afkræftet denne hypotese, der formentlig kun gælder for visse gram-negative bakterier. Når metoden dog ikke dermed er totalt forkastet, beror det på, at selve farvningen hjælper et trænet øje til en tydelig adskillelse mellem bakterier og jordpartikler.

Metode:

1. Inkubering af jordprøve efter justering af vandindhold, f.eks. til 18 %, i 3 døgn ved 25°C.



2. Afvejning af 10 g jord i 90 ml 0,2 % calgon (Na-hexametafosfat). Suspensionen rystes på rysteapparat 15 minutter. Den fortyndes til den endelige fortynding (1/100) ved, at der udtages 1,8 ml suspension i 16,2 ml dest. steril vand; slutrumfanget er da 18 ml.
3. Tilsætning af 2 ml ren 1 % agar (Difco) af en temperatur mellem 55°C og 60°C . Suspensionen, der nu er 20 ml i alt, rystes kraftigt i hånden 1 minut.
4. 10 μl af suspensionen anbringes på et specielt objektglas (se fig. 1) med en særlig pipette (Eppendorf 4700), således, at mængden holdes inden for yderste ringgrænse. For et godt resultat af præparationen er det væsentligt, at glassene er affedtede med acetone før brugen, samt at de tillades at stivne på en bordflade, som er kontrolleret vandret.
5. Farvning af præparatet foretages ved påføring med pipette af en vandig opløsning af acridin orange (konc. 1:15000) med temperatur 40°C . Farvetid 2 minutter. Farven afskyllies først forsigtigt med dest. vand fra en sprøjteflaske og præparatet skylles derpå ved dypning i 4 hold vand (bægerglas) med 2 minutter i hvert. På præparatet lægges til sidst et par dråber dest. vand, og det forsynes med dækglas.
6. Der anvendes gennemfaldende UV-lys i mikroskopet. Tælling foretages i feltet mellem de to ringe (se fig. 1), idet her angives at være den sikreste fordeling. Der tælles farvede - røde og grønne - fluorescerende partikler af distinkt kugle- eller stavform. Der tælles 10 synsfelter i hvert af 3 præparerter, og gennemsnitstallet for de i alt 30 synsfelter angives. Der er anvendt okular $6,3 \times$ og objektiv $60 \times$ ved undersøgelsen. Ved udregning af kimtal tages hensyn til de



foretagne fortyndinger (se eks.).

Følgende ændringer i metoden er foretaget: Nedsat rystetid (fra 30 til 15 minutter), den smelte agars afkøling til mellem 55°C og 60°C , opvarmning af farveopløsningen til 40°C og første skyldning med sprøjteflaske.

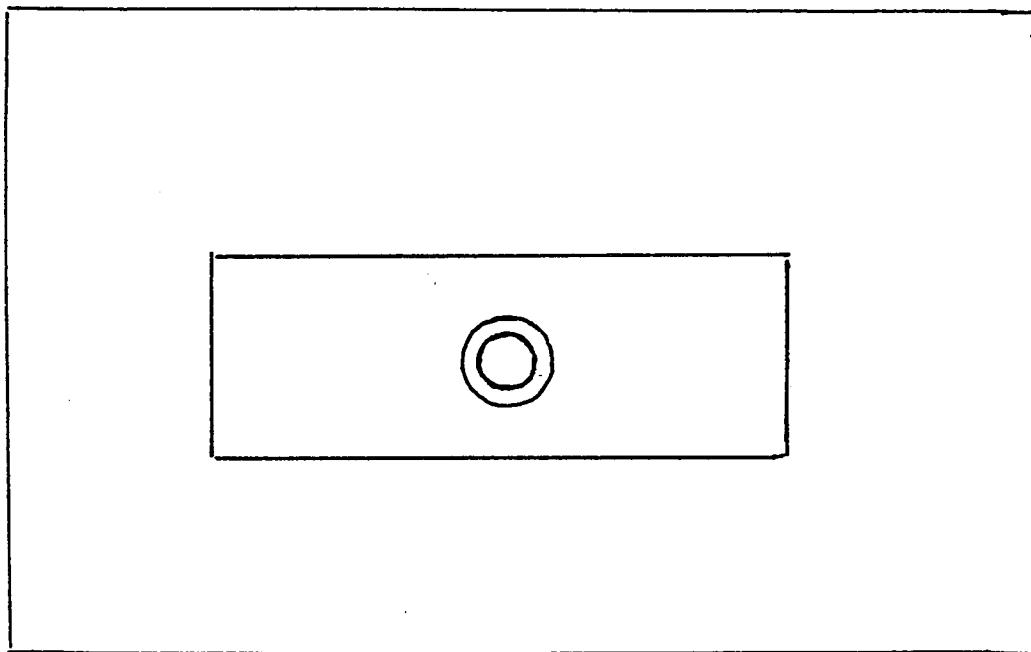


Fig. 1. Til analysen anvendes objektglas med indgraveret cirkel (diameter 11,3 mm, areal 1 cm^2). Koncentrisk med denne er indgraveret en cirkel med diameter 7,72 mm. På denne cirkels yderside vælges synsfelterne for tælling, idet agarlaget her har ensartet tykkelse.

En vanskelighed ved metoden er farvningen af humuspartikler, idet de for de anvendte jorder har domineret synsfeltet, således at oversigt og tælling af bakterierne ikke er mulig. En yderligere fortynding af suspensionen vil bevirket, at der bliver så få organismer i synsfeltet, at det medfører væsentlig statistisk usikkerhed. Hvis man inkuberer jorden før undersøgelsen i 2 døgn med en svag næringsopløsning med C/N = 10/1, f.eks. 0,1 % glucose og 0,11 % ammoniumnitrat, i stedet for med vand alene, opnås så meget højere kimal, at den statistiske sikkerhed ved tællingerne bliver større. Men værdien bliver da mere et udtryk for aktiveret bakterie-biomasse end for de helt naturlige værdier.

De valgte eksempler har materiale i en undersøgelse af ugødet og kunstgødet jord fra Askov forsøgsstation (1977). Jordprøverne blev inkuberet med ovennævnte næringsopløsning.

1. Udregningseksempel: ugødet jord

Mikroskopisk tællingsresultat (gennemsnit af 30 synsfelter):

41 bakterier.

Antal regnes først op til antal/cm²: $\frac{\text{Tællingsantal} \times 100}{\text{Synsfeltareal (mm}^2)}$

På 1 cm² anbringes 0,01 ml jordsuspension

Antal/ml fortynding = antal/cm² × 100

Antal/g jord = antal/ml × fortyndingsfaktor

Med det nævnte tællingsresultat og fortynding 1:50:

$$\frac{41 \times 100 \times 100 \times 50}{3,14 \times 0,125^2} = \underline{418 \text{ mill. bakterier/g jord.}}$$

Da vandprocenten ved tællingen var 10,65 % i jordprøven, er bakterietallet 467 mill. bakterier/g tør jord.

2. Eksempel på sammenligning af fluorescensmikroskopi (F) og pladespredning (P) under ens betingelser. Bakterietal: mill/g tør jord. Biomasse kg ha (pløjelag), tør jord. Vægt af pløjelag (20 cm) = 2500 tons/ha. Frisk vægt af en bakterie: $1,1 \times 10^{-12}$ g.

	Bakterietal F	Bakterietal P	Biomasse F	Biomasse P
ugødet jord	431 mill.	40 mill.	215 kg	20 kg
gødet jord	583 mill.	99 mill.	291 kg	49 kg

Den kunstgødede jord har højeste værdier for kimtal og biomasse. Værdierne ved direkte mikroskopi er 6-10 gange resultater af pladespredninger, hvilket stemmer med erfaring fra andre arbejder.

De lavere resultater for pladespredninger beror på disses begrænsning m.h.t. opvækstmuligheder på kunstige substrater for jordbundsbakterierne. Også mikroskopiske tællinger kan give for lave værdier, som følge af, at bakterier tabes under præparationen, at bakterier ikke optager farvestoffet og endelig af, at en del bakterier skjules på bagsiden af jordpartikler og derfor ikke er synlige. De her nævnte forhold modvirkes dog formentlig af, at døde celler også farves og medtælles.

Anvendelse af fluorescensmikroskopet ved bedømmelse af jordbundsmikrofloraen er i de sidste år optaget påny. Den ret arbejdskrævende procedure gør ikke metoden egnet til serieundersøgelser. Men med nogen erfaring kan metoden bruges til supplering af andre bestemmelser af mere videnskabelig karakter. I Sverige (Söderström 1978) er farvestoffet fluorescein diacetat (FDA) taget i brug ved bestemmelser af svampebiomasse. Fægri (1977) har an-



vendt membranfiltrering, farvestoffet acridin orange og epi-fluorescens (påfaldende UV-lys) ved bakterietællinger.

Litteratur:

Fægri, A. et al. (1977): Bacterial and fungal activities in soil. Soil Biol. Biochem. 9, s. 105-112.

Strugger, S. (1948): Fluorescence microscope examination of bacteria in soil. Can. J. Res. C, 26, 188.

Söderström, B. (1978): Fungi in Swedish coniferous soils. Fungal biomass and activity and microfungal species composition. Disputats. Lund summ. 14 s.

Trolldenier, G. (1973): The use of fluorescence microscopy for counting soil microorganisms. Bull. Ecol. Res. Comm. 17 s. 53-59.



MIKROORGANISMERNES RESPIRATION

MÅLING AF KULDIOXID PRODUKTION I JORD

Kuldioxid-produktionen kan bestemmes ved inkubation af en passende jordmængde i en lukket kolbe over en Ba(OH)_2 -opløsning efterfulgt af en titrering af overskuddet af Ba(OH)_2 . Respirationsmålingen giver et udtryk for den totale aktuelle aktivitet, men resultaterne afhænger både af mængden af levende mikroorganismer og af den tilstedevarende mængde af omsætteligt organisk stof.

Materialer:

Apparatur: se fig. 1 - 2 - 3.

Reagenser: 0,04545 N Ba(OH)_2 tilsat 10 g BaCl_2 /l opløsning
0,04545 N HCl

Indikator: 0,1 g Thymolblåt oploses i 100 ml vand
+ 2 ml 0,1 M NaOH.

Metode:

Undersøgelse af lufttørret jord.

Den friske jord lufttørres, knuses og sigtes (2 mm sigte). Før måling tilstsættes vand med de nødvendige mineraler; der tilstræbes et C/N-forhold: 10/1. Der tilstsættes yderligere kulstofkilder (evt. opløst i vandet). Derpå afvejes den fugtige jord (skal svare til 50 g ovntør jord) i metalkurven.

Undersøgelse af naturlig jord.

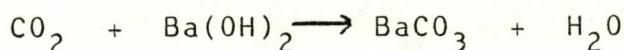
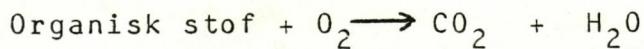
Den friske jord sigtes (2 mm sigte) og blandes grundigt. Derefter afvejes den friske jord (skal svare til 50 g ovntør jord) i metalkurven.

I bunden af Erlenmeyerkolber anbringes mellem 30 ml og 60 ml Ba(OH)_2 + 7 dråber indikator. Kurvene med jord hænges deri og kolberne tilproppes (fig. 1). Den af jordprøven producerede CO_2 passerer gennem metaltrådbeholderen og afgives til Ba(OH)_2 . Med mellemrum titreres Ba(OH)_2 med HCl. Kolben tømmes og forsynes påny med Ba(OH)_2 så meget at omslag kan undgås. Titreringstallet trækkes fra en blindbestemmelse, der udføres i en anden kolbe med samme mængde Ba(OH)_2 men uden jordprøve. Derved elimineres luftens CO_2 -indhold.

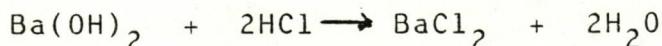
Antal fællesbestemmelser: Til hver forsøgsserie skal der være 2-3 fællesbestemmelser og tilsvarende antal kolber til blindprøver.

pH-bestemmelsen: Man bør måle jordens pH ved start og slutning af forsøget. Jordens fugtighed opretholdes ved tilslætning af 1/2 ml vand til alle kolber når det er påkrævet.

Reaktion og beregning af syrens normalitet:



Ved titrering:



Det ses, at til hvert molekyle CO_2 svarer 2 molekyler HCl.

Man ønsker at:

$$1 \text{ ml} \times N \text{ Ba(OH)}_2 \curvearrowleft 1 \text{ ml} \times N \text{ HCl} \curvearrowleft 1 \text{ mg CO}_2$$

HCl's normalitet beregnes:

$$\frac{1 \times 10^{-3}}{44} \text{ mol CO}_2 = \frac{xN \text{ HCl} \times 1 \text{ ml}}{2 \times 1000}$$

2 er antal molekyler HCl

$$xN \text{ HCl} = \frac{1 \times 10^{-3} \times 2 \times 10^{+3}}{44 \times 1} = 0,04545 \text{ N HCl}$$

Fremstilling af 0,04545 N Ba(OH)₂ gøres på følgende måde:

Der fremstilles en mættet opløsning af Ba(OH)₂. Der udtages 5,0 ml mættet opl. af Ba(OH)₂ tilsættes 7 dråber indikator og titreres med 0,04545 N HCl.

Beregning:

Mængden af udviklet CO₂, beregnes på basis af forskellen mellem titreringen af kolben med jord og kontrolkolben. 1 ml 0,04545 N HCl svarer til 1 mg udskilt CO₂. Resultaterne angives i mg CO₂/50 g tør jord.

Beregningseksempel:

Titrering af kolbe med jordprøve efter 144 timer = 30,00 ml

Titrering af kontrolkolbe efter 144 timer = 5,00 ml

Difference = 25,00 ml

Udviklet CO₂ = 25 mg CO₂/50 g våd jord/144 timer

Tørstofprocent i jorden = 85

Udviklet CO₂ = $\frac{25 \times 100}{85} = \underline{29,4 \text{ mg CO}_2/50 \text{ g tør jord/144 timer}}$

Hvis man titrerer kolberne løbende, kan mg CO₂ pr. 50 g tør jord afbildes som funktion af tiden.

Resultaterne behandles statistisk.

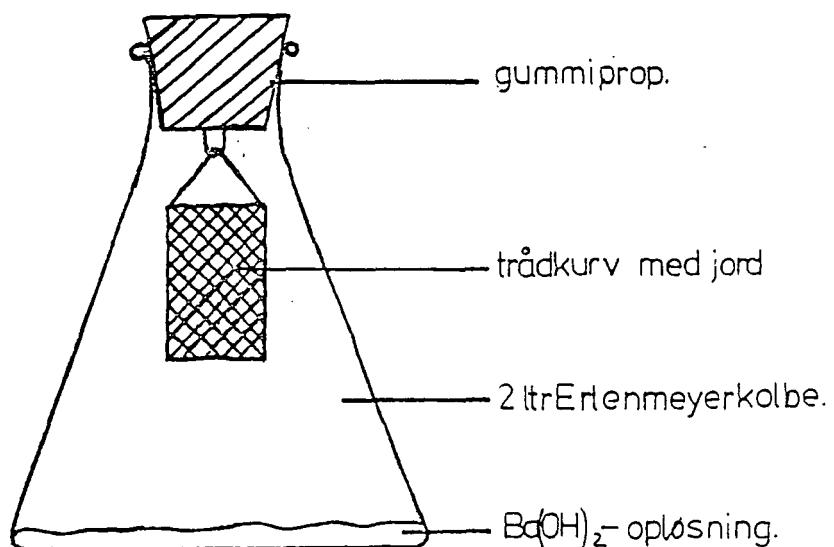


Fig. 1

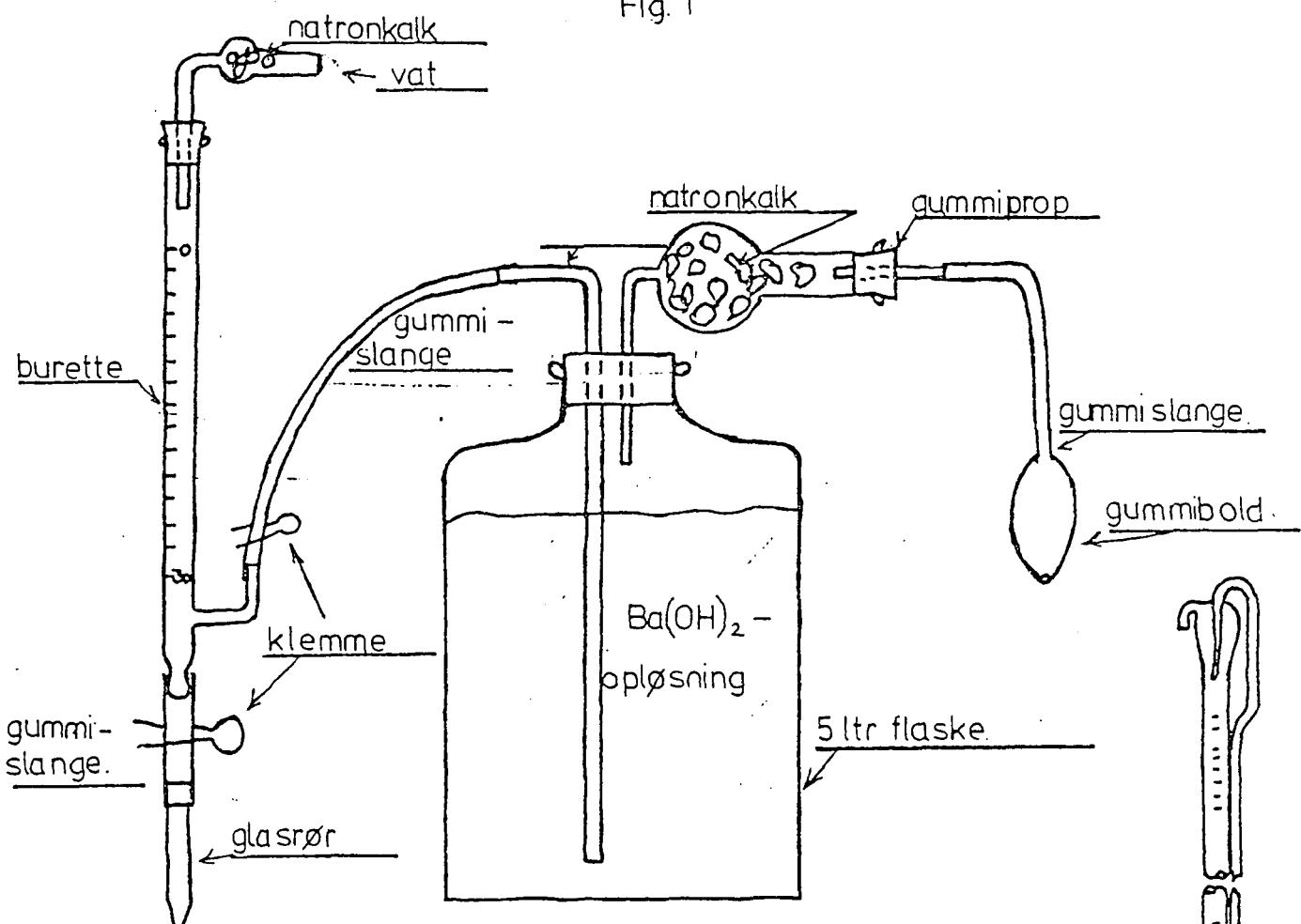


Fig. 2

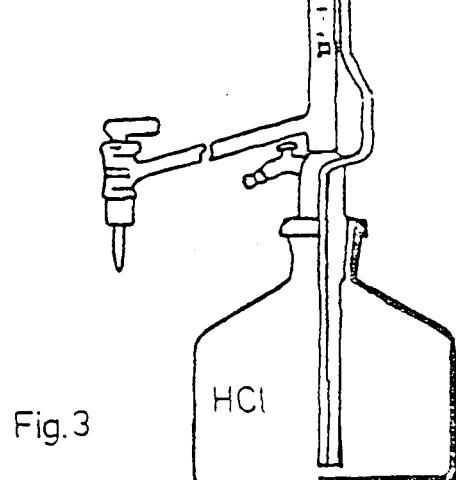


Fig. 3



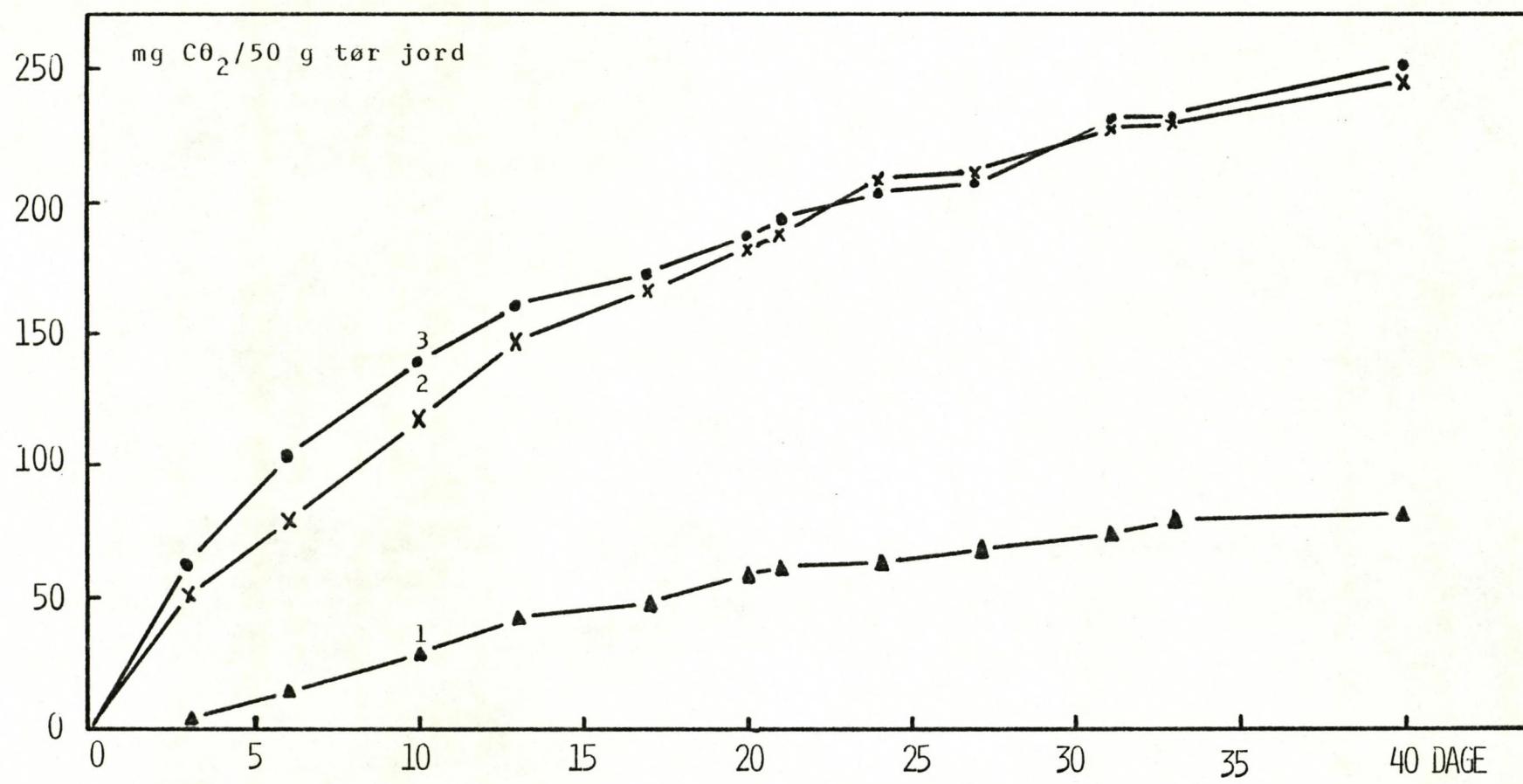


Fig. 4. Kuldioxyd produktion fra jord tilsat plantemateriale.

1. jord uden tilsetning
2. jord tilsat 0,4 % rødkløver
3. jord tilsat 0,4 % rajgræs



Litteratur:

Petersen, Erik J. (1926): Undersøgelser over forholdet mellem jordens kulsyreproduktion, kemiske tilstandsform og mikrobiologiske aktivitet. Tidsskrift for Planteavl, 32, 625-672.

MÅLING AF ILTFORBRUG I JORD I ET GILSON RESPIROMETER.

Jordens ånding bestemmes ved at måle jordprøvernes O_2 -forbrug i et Gilson respirometer. Målingerne foregår ved, at prøvernes CO_2 -produktion absorberes i KOH, hvorefter O_2 -forbruget bestemmes ved at måle rumfangsformindskelsen i luften i et lukket system.

Måleprincippet er illustreret i fig. 1. I prøvekarrene anbringes jordprøverne tillige med et glas med KOH-tabletter og et rørglas med dest. H_2O . I rørglasset med vand er anbragt en strimmel filtrerpapir for at øge væskeoverfladen. Kaliumhydroxyden absorberer CO_2 fra jorden og vandet modvirker den udtørrende virkning af KOH på jordprøverne. Prøvekar og referenceflaske er gennem diffusionstætte slanger forbundet lufttæt til hver sin side af et manometer. Under målingerne er hanen til atmosfæren lukket, afbrydningshanen er åben og operationshanen er lukket.

Da CO_2 -udskillelsen fra jorden absorberes i KOH vil trykket på prøvesiden af manometret falde i forhold til referencesiden som følge af jordprøvernes O_2 -forbrug. Herved stiger manometervæsken på prøvesiden. Ved hjælp af mikrometerskruen bringes væsken i de to manometerarme i niveau. Det rumfang som luftrumfanget derved formindskes med, kan direkte aflæses i μl på mikrometerskruen.

Da en luftarts rumfang er meget afhængig af temperaturen er det nødvendigt med en nøjagtig temperaturkontrol. Dette opnås



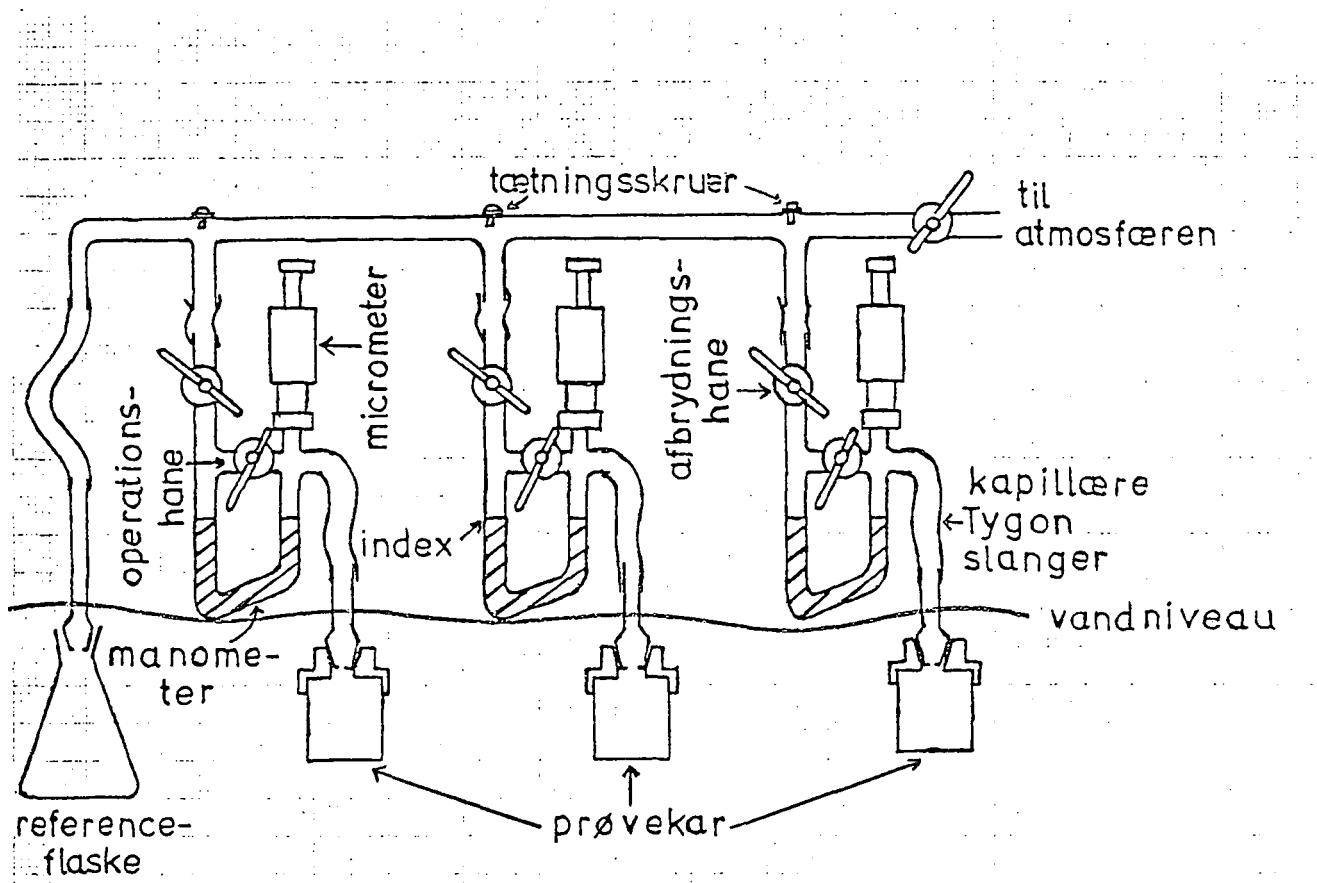


Fig. 1. Princippet i Gilson Respirometret.



ved at have prøvekar og referenceflasker anbragt i et termostat-styret vandbad, med en temperaturvariation på $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$. For at korrigere for ændringer i luftrumfanget, som ikke skyldes jordprøvernes O_2 -forbrug, medtages der ved alle målinger blind-prøver. Disse består af prøvekar uden jord, men med rørglas med KOH og dest. H_2O . Blindprøverne er anbragt på samme måde som karrerne med jord. Aflæsningerne på jordprøverne korrigeres med blindprøvernes aflæsninger.

Metode:

(Vejledning til Gilson Respirometer).

Til målinger anvendes et Gilson Respirometer model GR 14 med to referenceflasker og 13 prøvekar, hvoraf de 2 bruges til blindprøver. Prøvekarrene er fremstillet af plexiglasrør ($3,6 \times 7,0$ cm). Ved hjælp af et låg med hul i fastgøres karrene luft-tæt til forbindelsen op til manometerenheden. Ved hver måling udtages 2-4 prøver á 10 g jord fra samme jord. Jordprøverne an-bringes sammen med KOH og H_2O i prøvekarrene. Prøverne tempe-reres i mindst $3\frac{1}{2}$ time i vandbadet ved måletemperaturen og der-efter måles O_2 -forbruget. Målingerne bør strække sig over mindst 3 timer med aflæsninger ca. hver halve time. Såfremt der ikke er systematisk fald eller stigning i aflæsningerne beregnes O_2 -forbruget ud fra første og sidste aflæsning. I modsat fald be-regnes O_2 -forbruget ud fra den mest stabile periode i aflæs-ningerne. Efter at målingerne er afsluttet, vejes alle jordprø-ver i fugtig tilstand og efter tørring ved 105°C for herved at kunne beregne O_2 -forbruget pr. g tør jord.

Procedure:

1. Anbring 15 + 20 ml dest. H_2O i referenceflaskerne.
2. Fyld vandbadet op til ca. 4 cm fra kanten med deioniseret vand.



3. Indstil den ønskede temperatur med skruen over kontakttermometeret.
4. Stil alle haner, således at de er åbne.
5. Anbring foldet filterpapir (ca. 1x7 cm) i rørglas.
6. Indfædt slib og gummiring i prøvekarrenes låg med vandfrit lanolin.
7. Tænd for respirometret.
8. Afvej jord i prøvekarrene.
9. Der skal være mindst 2 blind-prøver (prøvekar uden jord, men med KOH-tabletter og H_2O).
10. Hvis ikke alle manometre er i brug lukkes slibet med en gummihætte.
11. Ca. 10 stk. KOH-tabletter fyldes i små glas (2x3 cm), som anbringes i prøvekarrene.
12. Ca. 2 ml dest. H_2O fyldes i rørgla's med filterpapir, som anbringes i prøvekarrene.
13. Prøvekarrene anbringes på respirometret, og sænkes ned i vandbadet. Slib ved manometre, som ikke er i brug, sænkes også ned i vandbadet, og afbrydningshanerne til disse manometre lukkes.
14. Kontroller temperatur.
15. Mindst 3½ times henstand før måling for opnåelse af temperaturligevægt.
16. Indstil den sorte linie ud for manometervæskens meniskebund.
17. Hanen til atmosfæren lukkes.
18. Ca. 30 min. senere lukkes operationshanen. Der bør gå ca. 30 min. for at der kan opnås "luft-ligevægt" mellem prøvekar og referenceflasker.
19. Aflæsning skal ske når varmelegemet er slukket (rød lampe er slukket), og der aflæses ved meniskens bund.



20. Ca. 45 min. senere tages 1. aflæsning (benyttes som nul-aflæsning). I dette tidsrum sænkes prøvekarrets CO_2 -indhold til et konstant niveau ved absorption i KOH.

Beregning:

Ved beregning af O_2 -forbruget pr. g tør jord korrigeres alle målinger til 0°C og 760 mm Hg efter følgende formel (Umbreit et al. 1972): $\mu\text{l gas ved } 0^{\circ}\text{C og 760 mm Hg} = \frac{273 (\text{P}-\text{P}_w) \Delta V}{760 T}$

Hvor P = barometertryk mm Hg

P_w = vanddampryk ved temperatur T

T = temperatur ved mikrometer i Kelvingrader, K

ΔV = $\mu\text{l gas målt med mikrometret}$

Beregningseksempel:

Ilt forbrugt på 120 min. = $60 \mu\text{l O}_2 / 10 \text{ g våd jord}$

tørstofprocent = 85

Korrektion for vandindhold og omregning til 1 g jord.

$\Delta V = \frac{60 \times 100}{85 \times 10} = \underline{7,06 \mu\text{l O}_2 / \text{g tør jord}}$

Temperatur = 25°C

$P_w = \underline{23,756}$ (se tabel 1 for vanddampryk).

$T = \underline{273 - 25}$

Udregning af konstanten = $\frac{273 (755 - 23,756)}{760 (273 - 25)} = \underline{1,059}$
(se formlen ovenfor)

Iltforbrug = $\frac{60 \times 100 \times 1,059 \times 60}{85 \times 10 \times 120} = \underline{3,74 \mu\text{l O}_2 / \text{g tør jord/time}}$

Resultaterne underkastes sædvanlig statistisk behandling.

Temp. °C	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8
10	9,209	9,333	9,458	9,585	9,714
11	9,844	9,976	10,109	10,244	10,380
12	10,518	10,658	10,799	10,941	11,085
13	11,232	11,379	11,528	11,680	11,833
14	11,987	12,144	12,302	12,462	12,624
15	12,788	12,953	13,121	13,290	13,561
16	13,634	13,809	13,987	14,166	14,347
17	14,530	14,715	14,903	15,092	15,284
18	15,477	15,673	15,871	16,071	16,272
19	16,477	16,685	16,894	17,105	17,319
20	17,535	17,753	17,974	18,197	18,422
21	18,650	18,880	19,113	19,349	19,587
22	19,827	20,070	20,316	20,565	20,815
23	21,068	21,324	21,583	21,845	22,110
24	22,377	22,648	22,922	23,198	23,476
25	23,756	24,039	24,326	24,617	24,912
26	25,209	25,509	25,812	26,117	26,426
27	26,739	27,055	27,374	27,696	28,021
28	28,349	28,680	29,015	29,354	29,697
29	30,043	30,392	30,745	31,102	31,461
30	31,824	32,191	32,561	32,934	33,312
31	33,695	34,082	34,471	34,864	35,261
32	35,663	36,068	36,477	36,891	37,308
33	37,729	38,155	38,584	39,018	39,457
34	39,898	40,344	40,796	41,251	41,710

Tabel 1. Vanddampryk ved forskellige temperaturer.



Litteratur:

Umbreit, W.W., Gurris, R.H. and Stauffer, J.F. (1972): Manometric and Biochemical Techniques. Burgess Publishing Company, U.S.A.



MIKROORGANISMERNES ENZYMAKTIVITET I JORD

DEHYDROGENASE-AKTIVITET I JORD.

Da enzymerne er vigtige katalysatorer ved forløbet af alle i jordbunden forekommende biokemiske og biologiske processer, har de været genstand for en del opmærksomhed indefor den sidste snes år. Adskillige har forsøgt at finde en sammenhæng mellem en jords dyrkningsegnetethed og dens enzymkapacitet. Opfyldelsen af dette mål har hidtil voldt visse vanskeligheder uden dog at svække interessen for enzymernes virke, idet der kan være tale om så mange andre perspektiver i denne sammenhæng. Man kunne f.eks. tænke sig at sammenkoble enzymbestemmelser med undersøgelser over forureningsfaktorer såsom tunge metaller og bekämpelsesmiddelrester i jordbunden.

Dehydrogenaserne i jord findes i de levende celler, da de er endoenzymer, men kan også lokaliseres i døde celler, rodekssudater og som "frie" enzymer (Skujins, 1967). De "frie" enzymer kan adsorberes til ler- og humuskolloider, hvor de er beskyttet mod nedbrydning.

Enzymerne spiller en væsentlig rolle i de første trin ved omsætningen af de organiske stoffer i jordbunden, idet de er i stand til at fraspalte hydrogen fra hydrogenindeholdende forbindelser og overføre det til andre stoffer. Berører levende aktive celler således opløst tetrazoliumsalt, reduceres det til det røde farvestof formazan. Denne reduktion foregår særdeles let, og den opnåede farveintensitet udnytter man i laboratoriet

til at få et relativt mål for den stofomsætningsintensitet, som finder sted i de levende celler, samt for den dehydrogenase-aktivitet, der er knyttet til disse cellers virksomhed.

Lenhard (1956) var den første, der anvendte 2,3,5-trifenyl-tetrazoliumklorid (TTC) til dehydrogenase-aktivitetbestemmelse i jord. TTC er farveløs i oxyderet form, men rød i reduceret form og formazandannelsen er irreversibel. Lenhards forsøg viste, at formazandannelsen udelukkende skyldes mikrobiel virksomhed, men dette er ikke i fuld overensstemmelse med Thalmann (1968). Han stillede spørgsmålet om Fe^{++} - og sulfidforbindelser kan reducere TTC, hvilket vil medføre at udeblivende reaktion efter autoklaving ikke er bevis for, at formazandannelsen er biologisk betinget, idet sulfidforbindelsen destrueres ved autoklaving.

Da dehydrogenase-aktiviteten hovedsageligt afhænger af mikroorganismernes stofskifteaktivitet, er det ikke overraskende, at dens størrelse i forskellige jorder ikke altid svarer til det samlede antal levedygtige organismer, der isoleres på et specielt substrat. Intensiteten af den mikrobielle omsætning i jorden afhænger af mængden af mikroorganismér og dermed af deres livsbetingelser i den pågældende jord. Livsbetingelserne afhænger af tilgængeligt kulstof, kvælstof, kalium, calcium og mange andre stoffer. Dog er der i nogle jorder fundet en positiv sammenhæng mellem dehydrogenase-aktivitet og hastigheden af ilt-optagelse eller CO_2 -udskillelse (Stevenson (1959), Casida et al. (1964)). Positiv sammenhæng mellem dehydrogenase-aktivitet og antallet af levende bakterier er blandt andre fundet af Roth (1966) og Raguotis (1967).

Lenhard (1956) fandt større dehydrogenase-aktivitet i humusrike jorder end i humusfattige jorder. Kozlov og Mikhaylova (1965) fandt aftagende aktivitet med tiltagende jorddybde.



De fleste publicerede arbejder anfører, at dehydrogenase giver maximal aktivitet omkring pH = 7,6 ved anvendelse af tris puffer. Det vil sige, at aktiviteten ikke nødvendigvis er maximal under markforhold.

Curl og Sandberg (1961) brugte 2-p-jod-fenyl-3-p-nitro-fenyl-5-fenyl-tetrazolium-violet (INT) som H akceptor for at finde den biologiske aktivitet i vandområder. De valgte INT, fordi dette stof hurtigt blev reduceret, således at det ikke er nødvendigt at frembringe iltfri forhold under proceduren. Desuden giver denne tetrazolium-forbindelse den største følsomhed og det er muligt at færdiggøre analysen på kortere tid.

I det følgende er en metode beskrevet, hvor dehydrogenaseaktivitet kan bestemmes ved reduktion af INT.

Materialer:

Tetrachlorethylen (til spektrofotometri)

Acetone (til spektrofotometri)

Tetrachlorethylen-acetone blandes i forholdet 1:1,5. Blandingen er ikke vandopløselig.

INT.; 100 mg INT opløses i 50 mg H₂O (0,2 %). Nogle få µl 3 N Na₂CO₃ tilføres, så pH er på 7,5. Den gulbrune opløsning kan opbevares i køleskab ved 5°C i flere måneder.

Na₂CO₃; 3 N opløsning ≈ 159 g/l

Fosfat puffer;

0,2 M opløsning } 27,22 g/l af KH₂PO₄ (pH indstilles på 7,9)
 } 8,00 g/l af NaOH

Na-succinat; 0,4 M ≈ 64,832 g/l

Ascorbinsyre; 0,001 M 0,7613 g/l

Metode:

Kan forberedes dagen før eksperimentet påbegyndes.

Reaktionsblandingen fyldes i 50 ml centrifugeglas. Den består af 2 ml fosfat puffer, 1 ml 0,2 % INT og 1 ml 0,4 M Na-succinat. Husk reaktionsblanding til standarderne, som skal udføres sammen med prøverne. Desuden skal der bruges reaktionsblandinger uden 1 ml INT, men erstattet med 1 ml destilleret vand til kontrol. Alle centrifugeglassene opbevares i køleskab til næste dag.

1. Hver jordprøve afvejes i 1 g portioner og fyldes i centrifugeglassene, der indeholder reaktionsblanding. Standarder med 1 ml tilsættes også glas med reaktionsblanding (se atandardkurve). Desuden fyldes 1 g portioner af steril jord i glas med reaktionsblanding uden INT.
2. Bland prøverne med en whirly mixer i 10 s. Prøverne og standarderne inkuberes i 45 min. ved 30^oC.
3. Glassene placeres på isbad, og reaktionen afbrydes ved at tilføre 8 ml tetrachlorethylen-acetone.
4. Blandingerne rystes i 60 min. ved 25^oC.
5. Glassene centrifugeres ved 3000 r.p.m. i 4 min.
6. Den farvede fase (rød) suges omhyggeligt op med en pipette.
7. Det ekstraherede formazan kan opbevares nogle dage uden ændringer i aflæsningen. Opbevar formazanopløsningen i mørke ved 5^oC indtil analysering.
8. Farvestyrken fra jordprøverne aflæses ved 490 nm imod blindværdien, hvor steril jord er behandlet uden INT. Standarderne aflæses imod blindværdi af tetrachlorethylen-acetone.
Mængden af overført H⁺ kan således bestemmes ved korrektion

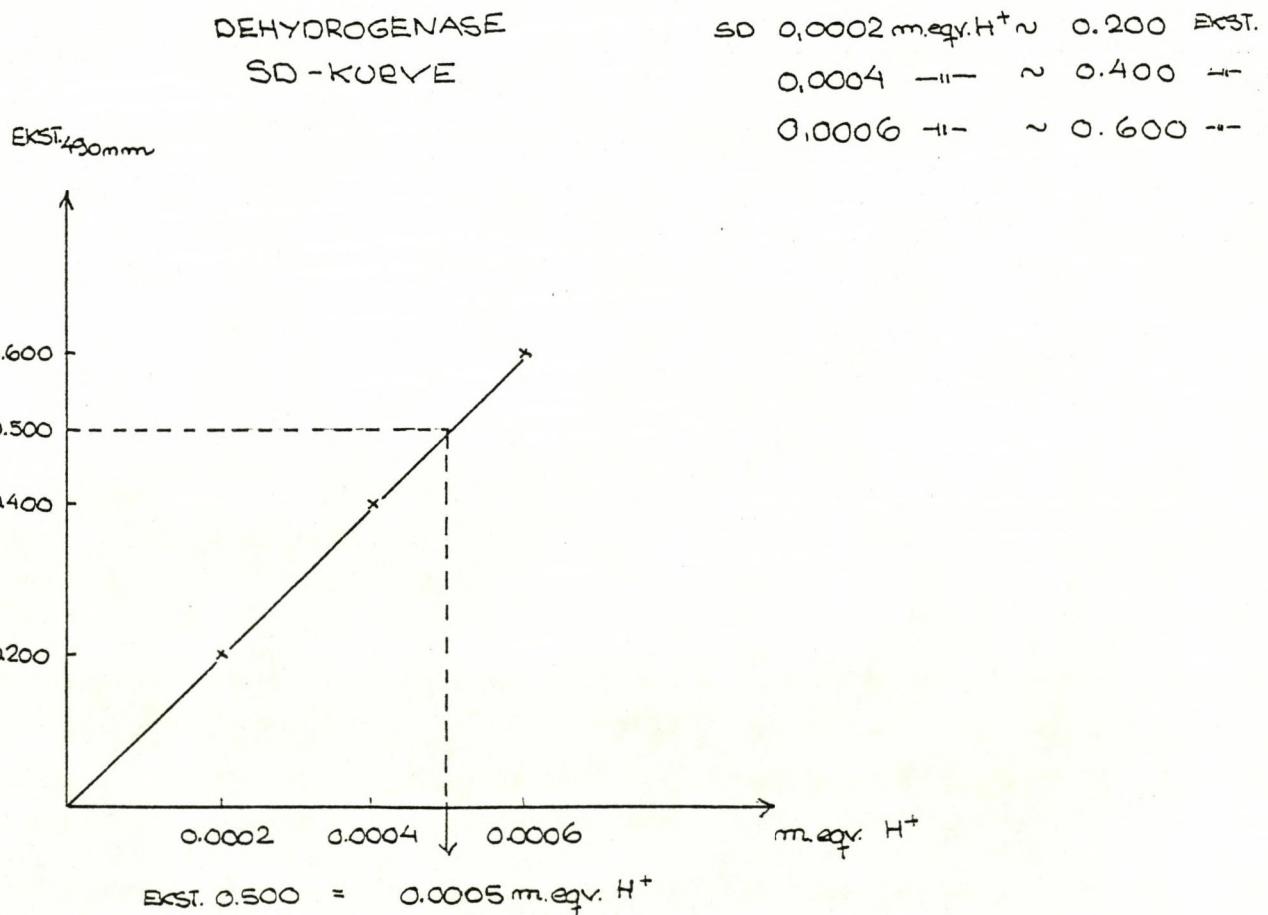
til en standardkurve og udtrykkes som millieqvivalenter (meqv.) H^+ /g tør jord.

Reaktionen er hurtig og følsom, og desuden uafhængig af oxygen-tilstande (aerobe/anarobe forhold).

Beregningseksempel:

Måling i spektrofotometer (absorption)

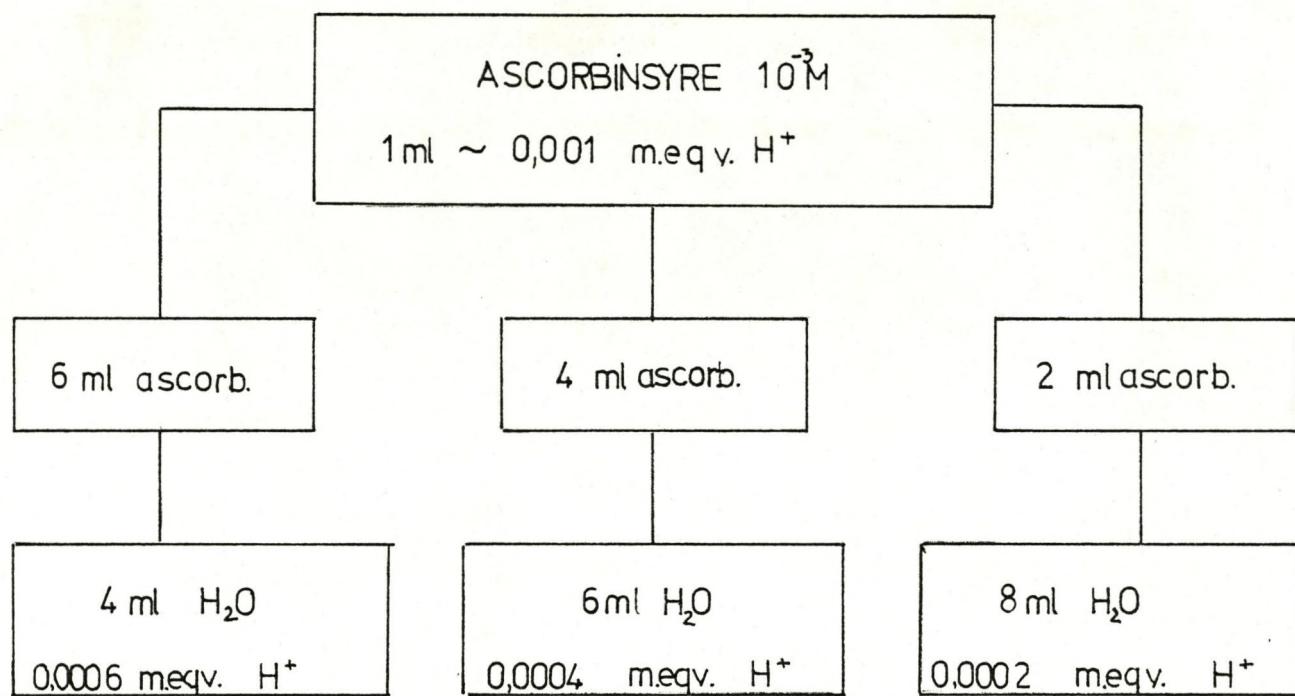
Prøvens farveintensitet = 0,500



Resultaterne behandles statistisk.



STANDARDKURVE TIL DEHYDROGENASE-AKTIVITET



1 ml af de fortyndede portioner af ascorbinsyreopløsning tilføres reaktionsblanding'en.

Litteratur:

Benefield, C.B. Howard, P.J.A. and Howard, D.M. (1977): The estimation of dehydrogenase activity in soil. - Soil Biol. Biochem. 9, 67-70.

Casida, L.E. Klein, D.A. and Santoro, T. (1964): Soil dehydrogenase activity. - Soil Sci., 98, 371-376.

Curl, H. JR. and Sandberg, J. (1961): The measurement of dehydrogenase activity in marine organisms. - J. mar. Res. 19, 123-138.

Kozlov, K.A. and Mikhaylova, E.N. (1965): Dehydrogenase activity of some soils of Eastern Siberia. - Soviet Soil Science, 2, 161-165.

Laugesen, K. (1973): Dehydrogenase i jordbunden. - Tidsskrift for Planteavl. 77, 516-520.

Lenhard, G. (1956): Die Dehydrogenaseaktivität des Bodens als Mass für die Mikroorganismentätigkeit im Boden. - Z. Pfl. Ernähr. Düng., 73, 1-11.

Raguotis, A.D. (1967): Biological activity of sodpodzolic forest soils of The Lithuanian SSR. - Soviet Soil Science, 6, 751-757.

Roth, G. (1966): Biochemical activity of soils; new methods of assessment. - Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 276-285.

Skujins, J.J. (1967): Enzymes in soil. - Soil Biochemistry. Ed. A.D. McLaren and G.H. Peterson. 371-414. Marcel Dekker, inc. New York.

Stevenson, I.L. (1959): Dehydrogenase activity in soils.

- Can J. Microbiol., 5, 229-235.

Thalmann, A. (1968): Determination of dehydrogenase activity
in soil by means of triphenyltetrazolium chloride (TTC).

- Landw. Forsch. 21, 249-258.

