

Statens Planteavls-Laboratorium (Aage Henriksen)
Bakteriologisk afdeling (T. Vincents Nissen)

Urease i agerjord

Urease activity in Danish soils

Kirsten Laugesen

Resumé

Der er omtalt eksperimenter med måling af ureaseaktivitet i jorder tilsat glucose eller glucose + KNO_3 .

Resultaterne viser, at glucosetilsætning i de her anvendte mængder fra 1-3 pct. af jordmængden stimulerer aktiviteten og med størst forøgelse ved 1 pct. tilsætning.

NO_3^- -tilsætning virker stimulerende på aktiviteten i nogle jorder, men hæmmende i andre.

Indledning

Vil man søge at give en omfattende karakteristik af den biologiske aktivitet, der foregår i jorden, er det ønskeligt, at denne indbefatter adskillige målestørrelser, således bør f.eks. jordens respirationshastighed, dens evne til ammonifikation og nitrifikation samt dens *enzymaktivitet* måles (Smirnov et al., 1962). Medens respirationen kun angiver et generelt mål for den biologiske aktivitet, kan enzymmålinger for det første være mere specifikke og for det andet måske gøre det muligt at anvise metoder, der fremmer omdannelsen af de forskellige organiske komponenter til planteføde, eller endog give et mål for jordens bonitet.

Man kan betragte jorden som et levende væv, og som sådant indeholder det næsten alle de enzymer, der karakteriserer den biologiske verden (McLaren, 1962). Jordbundens enzymer stammer især fra mikrofloraen, men der udskilles dog også enzymer fra planterødder og

fra jordbundens fauna. Ifølge Hofmann (1962) er det de extracellulære enzymer, der findes i jordvæsken, og de enzymer, der er adsorberet til jordkolloiderne, som er årsag til den største aktivitet på prøveudtagningstidspunktet. Hofmanns aktivitetsmålinger på jordprøver uden kulstof og kvælstof tilsætninger viser konstant enzymaktivitet uanset store sæsonmæssige svingninger i antallet af mikroorganismer, hvilket tyder på, at de enzymer, som organismene løbende producerer, spiller en mindre rolle i den totale enzymaktivitet. Af disse resultater slutter Hofmann, at en bestemmelse af enzymniveauet har større værdi ved fastlæggelsen af den biologiske aktivitet end en tælling af mikroorganismer har, men efter forfatterens mening er en kombination af begge metoder det bedste. Man kan iøvrigt sagtens kunstigt forøge den samlede enzymaktivitet i jorden ved tilsætning af en kulstof- og/eller kvælstofkilde i form af f.eks. glucose og/eller NH_4NO_3 . Herved øges mikroorganismernes antal stærkt, mængden af produceret enzym stiger væsentligt, hvilket igen giver en kraftig forøgelse af den målte enzymaktivitet.

Nærværende undersøgelse vedrører enzymet *urease* og dets afhængighed af forskellige økologiske betingelser. Urease har en vis tilknytning til gødningsproblemet, da den jo som bekendt spalter urinstof katalytisk til NH_3 og CO_2 (Chin & Kroontje, 1963; Conrad, 1944). Reaktionshastigheden ved en ren kemisk hy-

drolyse af urinstof er derimod meget langsom og ganske uvæsentlig i sammenligning med den biokemiske hydrolyse. Urease var iøvrigt det første enzym, som det lykkedes at udkrystallisere (Sumner, 1926), og den siden da fremkomne litteratur om urease er samlet i de senere år af Durand (1965) og Skujins (1967). Sumner og Somers (1947) karakteriserede urease som et makro-protein med en molekylvægt på omkring 480.000 med isoelektrisk punkt ved pH ca. 5. Den synes ikke at kræve noget specifikt coenzym. Som andre proteiner spaltes ureasen let af proteolytiske enzymer. Den er meget følsom overfor fri ilt og især overfor H_2O_2 , men kan tildels reaktiveres af H_2S . Ureasen inaktiveres af bl.a. merkuriklorid, trypsin, hydroquinon og pyrokatekin.

Enzymet produceres af de mest forskelligartede bakterietyper, dog sjældent af de obligat anaerobe bakterier. Det synes at forekomme lige almindeligt hos aerobe og fakultativt anaerobe bakterier, og de sidstnævnte må regnes for at være hovedansvarlige for urinstofspaltningen i ajle og staldgødning. Urease er også ganske udbredt indenfor svamperiget. Det er et typisk intracellulært enzym, hvilket betyder, at den extracellulære urease må stamme fra døde og disintegrerede mikroorganismer (Jensen, 1965; Weyland, 1957; McGarity, Meyer, 1967).

Jordbundsbiokemikere kan ikke definitivt sige, hvorvidt et enzym, der omdanner dets specifikke substrat i jorden, stammer direkte fra en mikroorganisme, fra jordopslemningen eller er adsorberet på ler, humus osv. Som først nævnt er der på grund af enzymets forskellige oplagringssteder ingen grund til at forvente, at en målt enzymaktivitet svarer til antallet af mikroorganismer på prøvetidspunktet. Denne sammenhæng har heller ingen af de forskere, der har arbejdet med sagen, fundet.

Aktiviteten af enzymerne i jorden afviger betydeligt fra enzymaktiviteten i selve organismerne. Ved lav vandprocent stammer enzymaktiviteten hovedsagelig fra exoenzymerne, der er ophobet i jorden tidligere, idet mikroorganismernes aktivitet hæmmes under ca. 10 vægt-pct. vandindhold. Aktiviteten af et enkelt

enzym afhænger af mængden af mikroorganismen, der producerer det pågældende enzym, men næppe af jordens mikroflora som sådan.

Metode

Urease-bestemmelsen, der foregår efter Hoffmann & Teicher (1961), har som grundlag en NH_3 bestemmelse, da urinstoffet hydrolyseres fuldstændigt til $NH_3 + CO_2$ inden målelige mængder nitrat forekommer. Når urinstof-koncentrationen er høj nok til at udnytte hele den tilstedeværende enzymaktivitet, er hydrolyseringshastigheden konstant, så NH_3 -N mængden dannet i et givet tidspunkt kan benyttes som mål for urinstof-hydrolysen. Den ammoniak-N-mængde, som ureasen i jorden kan danne ved nedbrydning af en tilsat urinstofopløsning i løbet af 3 timer ved $37^\circ C$, anvendes i denne undersøgelse som et mål for ureaseaktiviteten og angives i mg NH_3 -N/100 g ovntør jord.

Ammoniak-bestemmelsen er foretaget kolorimetrisk, idet man udnytter, at $NH_3 +$ phenoler i alkalisk væske sammen med et oxidationsmiddel giver en intensiv blåfarvning under dannelse af indophenol-blåt. Den til undersøgelsen anvendte jord lufttørres og sigtes. Herefter fugtes den til et vandindhold på 16-18 vægt-pct. afhængig af jordens beskaffenhed. For at forbedre mikroorganismernes vilkår tilsættes tillige en kulstof- og/eller en kvælstofkilde i mængder som nedenfor anført, hvorefter jorden inkuberes i 250 ml mælkeflasker ved $25^\circ C$. Med passende mellemrum udtages prøver heraf til ureasebestemmelse, der udføres som nedenfor anført, desuden følges pH(H_2O)-svingningerne i jorden i mælkeflaskerne. Den fugtige jord, svarende til 10 g tørvægt, afvejes i en 100 ml målekolbe; der tilsættes 15 pct. toluol som bakteriestatisk middel. Efter et kvarters henstand hermed tilsættes 10 ml 10 pct. urinstof og 20 ml citratpuffer med pH 6,7. Kolben hensesættes i termostat ved $37^\circ C$ i 3 timer. Uden puffertilsetning ville pH stige til ca. 8,6, svarende til pH af en $(NH_4)_2CO_3$ -opløsning. Pufferens pH ligger på ureasens pH-optimum. Urinstoftilsetningen er så stor, at dens koncentration kan betragtes som værende konstant

under forsøget, hvorfor der også vil være konstant hydrolyseringshastighed. Efter inkubationen fyldes målekolben med destilleret vand ved 38° C, hvorefter der filtreres gennem et Munktell 20h filter, hvorved aktiviteten standser i filtratet. 1 ml filtrat udtages i en 50 ml målekolbe; der tilsættes 10 ml vand, 4 ml phenolopløsning og 3 ml NaOCl-opløsning, hvorefter der rystes. Efter 20 min. henstand fyldes kolberne op med destilleret vand og extinktionerne måles indenfor en times tid spektrofotometrisk ved 630 m μ . Jordens eget ammoniak-N indhold trækkes fra den fundne værdi. Der tegnes en reference-kurve med en kendt (NH₄)₂SO₄-opløsning.

Anvendte jorder

Ved undersøgelserne er der anvendt tre forskellige jorder taget fra pløjelaget, med følgende data på udtagningsstidspunkterne.

	pH(H ₂ O)	Nit	pct. humus
I. En lerbjord, Fyn	8,0	41	2,7
II. Virumgaardjord	6,0	5	2,6
III. Staldgødet Askov lermark	6,9	14	2,8

Resultater

Figur A viser virkningen af glucose tilsat i forskellig mængde til en og samme jord (III). Ved anlæg (O) er jorden fugtet og blevet tilsat hhv. 1, 2 og 3 pct. glucose, desuden er der opsat en kontrol uden glucose-tilsætning. Herefter er pH(H₂O) i mælkeflaskerne og ureaseaktiviteten målt over en periode på 12 dage. Det ses af den grafiske afbildning, at denne jords aktuelle aktivitet ligger på 6-9 mg NH₃-N/100 g ovntør jord, men at den ved glucose-tilsætning kan hæves til omkring 30 mg NH₃-N/100 g ovntør jord. 1 pct. glucose-tilsætning giver den største stimulering af denne jords ureaseaktivitet.

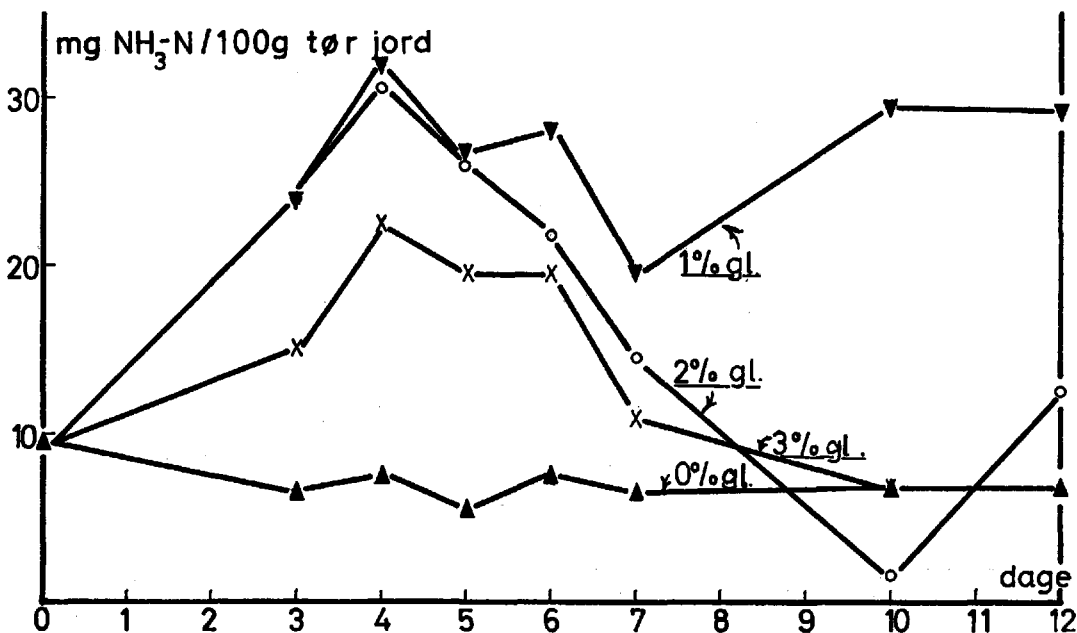


Fig. A. Indvirkning af glucose på urease i jord.
(Influence of glucose on urease in soil).

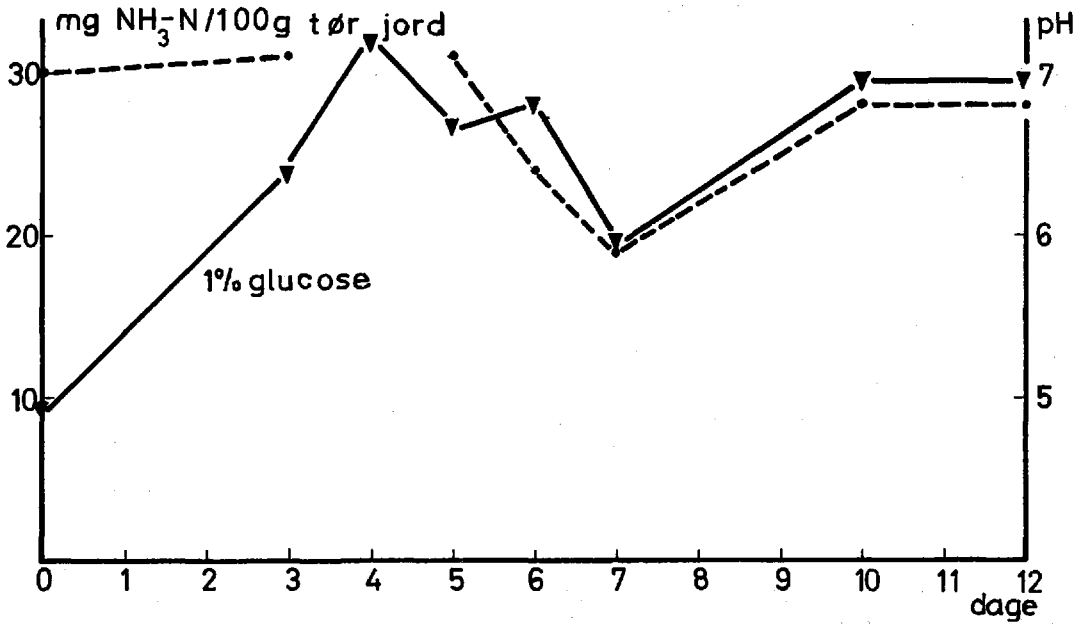


Fig. Aa. Indvirkning af 1 pct. glucosetilsætning på urease og på pH i jord.
(Influence of 1 pct. glucose addition on urease and on pH in soil).

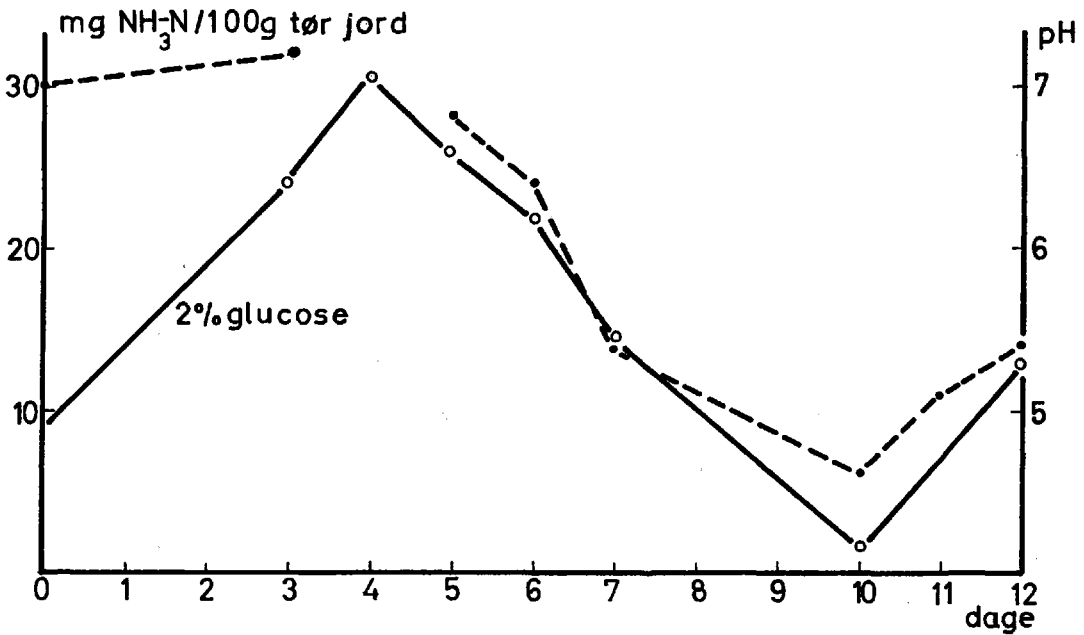


Fig. Ab. Indvirkning af 2 pct. glucosetilsætning på urease og på pH i jord.
(Influence of 2 pct. glucose addition on urease and on pH in soil).

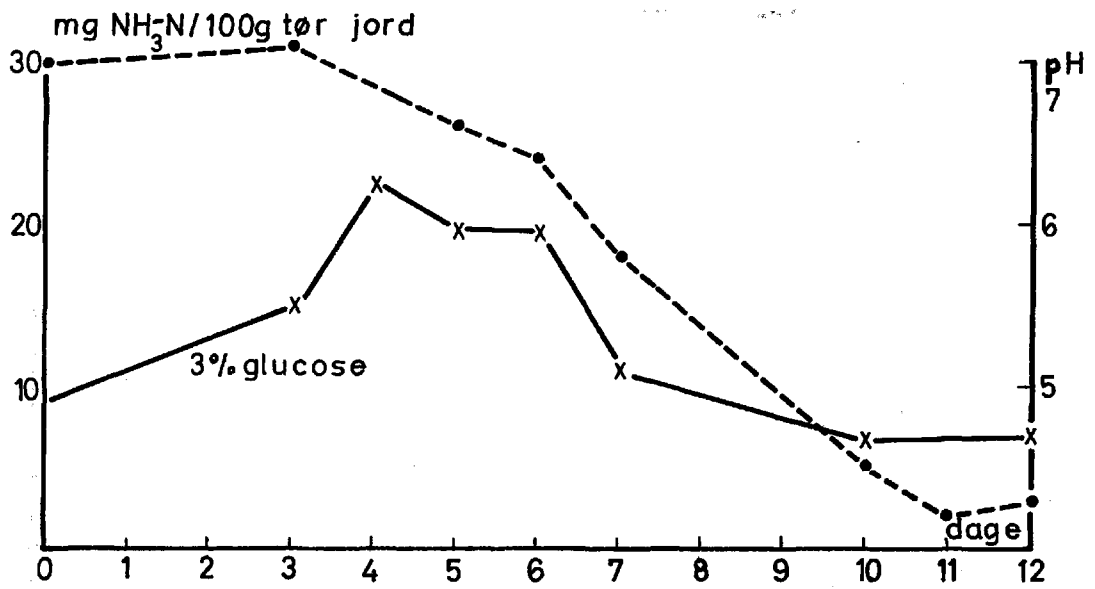


Fig. Ac. Indvirkning af 3 pct. glucosetilsætning på urease og på pH i jord.
(Influence of 3 pct. glucose addition on urease and on pH in soil).

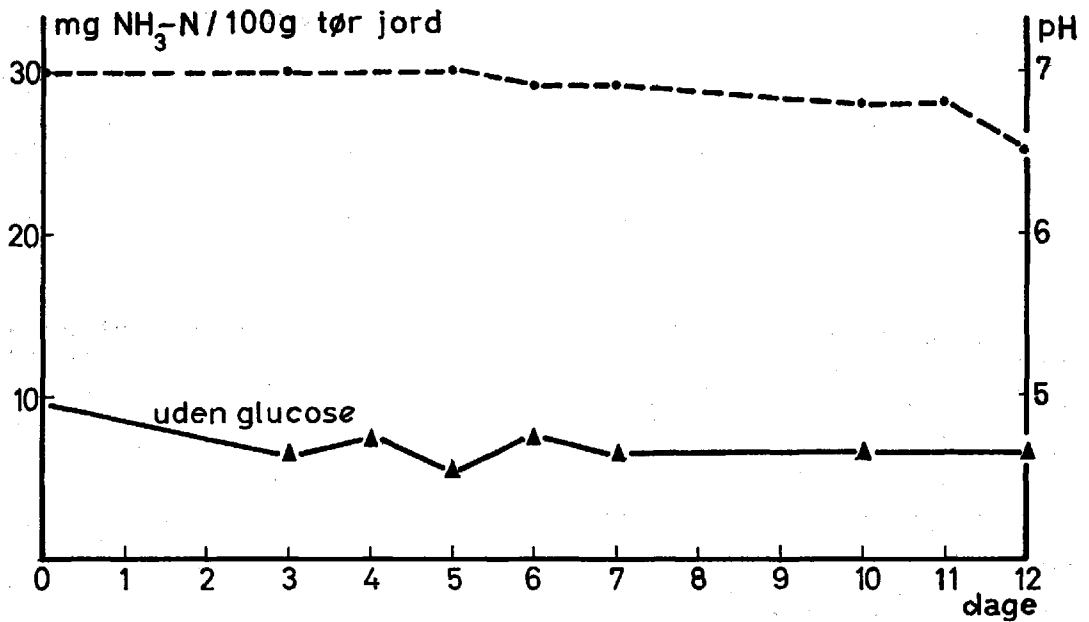


Fig. Ad. Urease-aktivitets bestemmelse og pH-måling i jord uden glucosetilsætning.
(Urease activity and pH in soil without glucose addition).

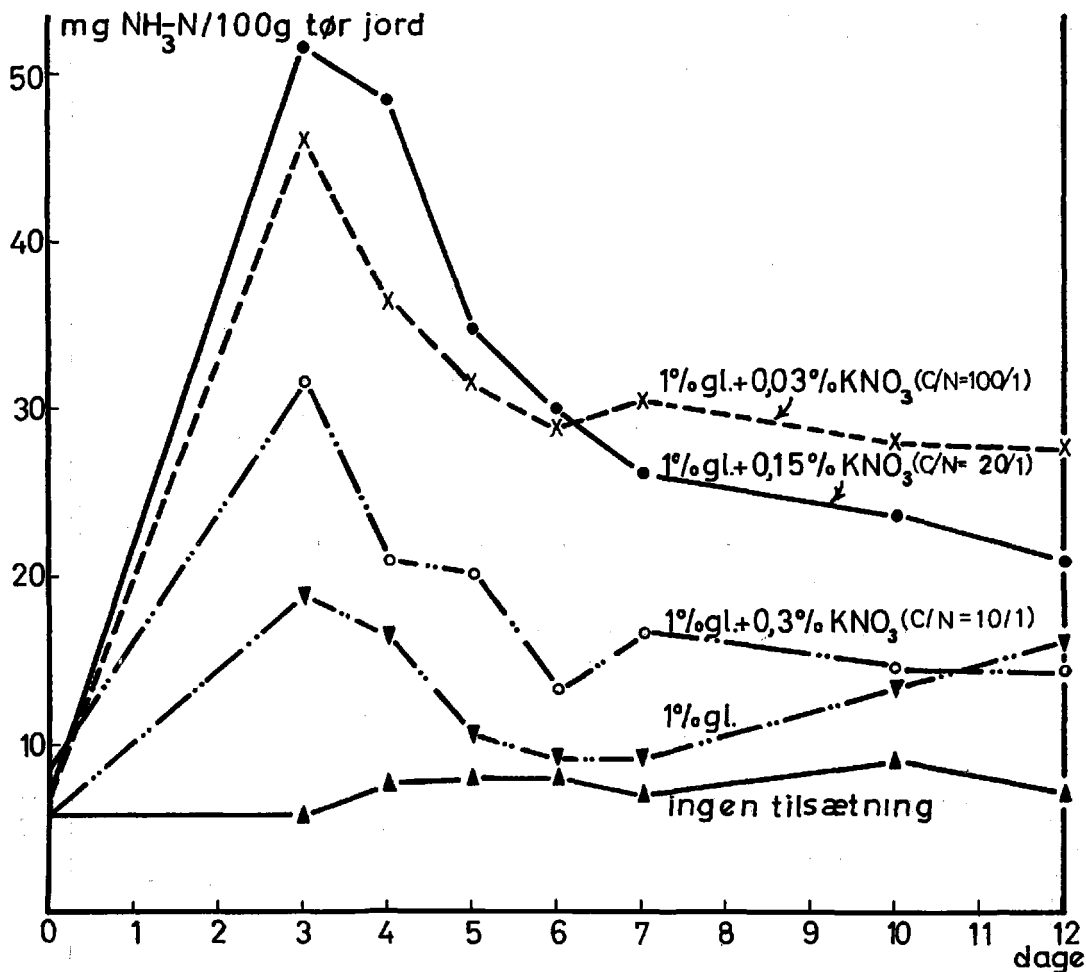


Fig. B. Indvirkning af en kvælstofkilde på urease i jord.
(Influence of a nitrogen source on urease in soil).

De første 4 dage øges ureaseaktiviteten kraftigt, idet glucose-C-kilden øger den mikrobielle aktivitet. Herefter falder aktiviteten hurtigt igen, og kraftigere jo større glucose-indholdet i jorden er.

For at afgøre om ovennævnte aktivitetsfald efter 4 dages forløb kan skyldes pH-ændringer i jorden stammende fra glucosens sure omdannelsesprodukter, er kurverne på fig. A afbildet i fig. Aa, Ab, Ac og Ad sammen med de respektive jorders pH-svingninger under forsøgsperioden, idet pH i mælkeflaskerne følges fra

dag til dag. Af figurerne ses en tydelig pH-afhængighed. Aktiviteten falder brat, når pH i jorden falder under pH-optimum ca. 6,7.

I de følgende forsøg har vi ved glucose-tilsætninger holdt os til 1 pct. tilsætning.

Herefter har vi undersøgt, hvilken virkning tilsætning af en kvælstofkilde – her specielt KNO₃ – har på jord II's ureaseaktivitet, se fig. B. Der er til jorden ved forsøgets start tilsat glucose og KNO₃ i de på kurven anførte mængder. Det anførte C/N forhold angiver forholdet mellem de tilsatte mængder; der er her ikke

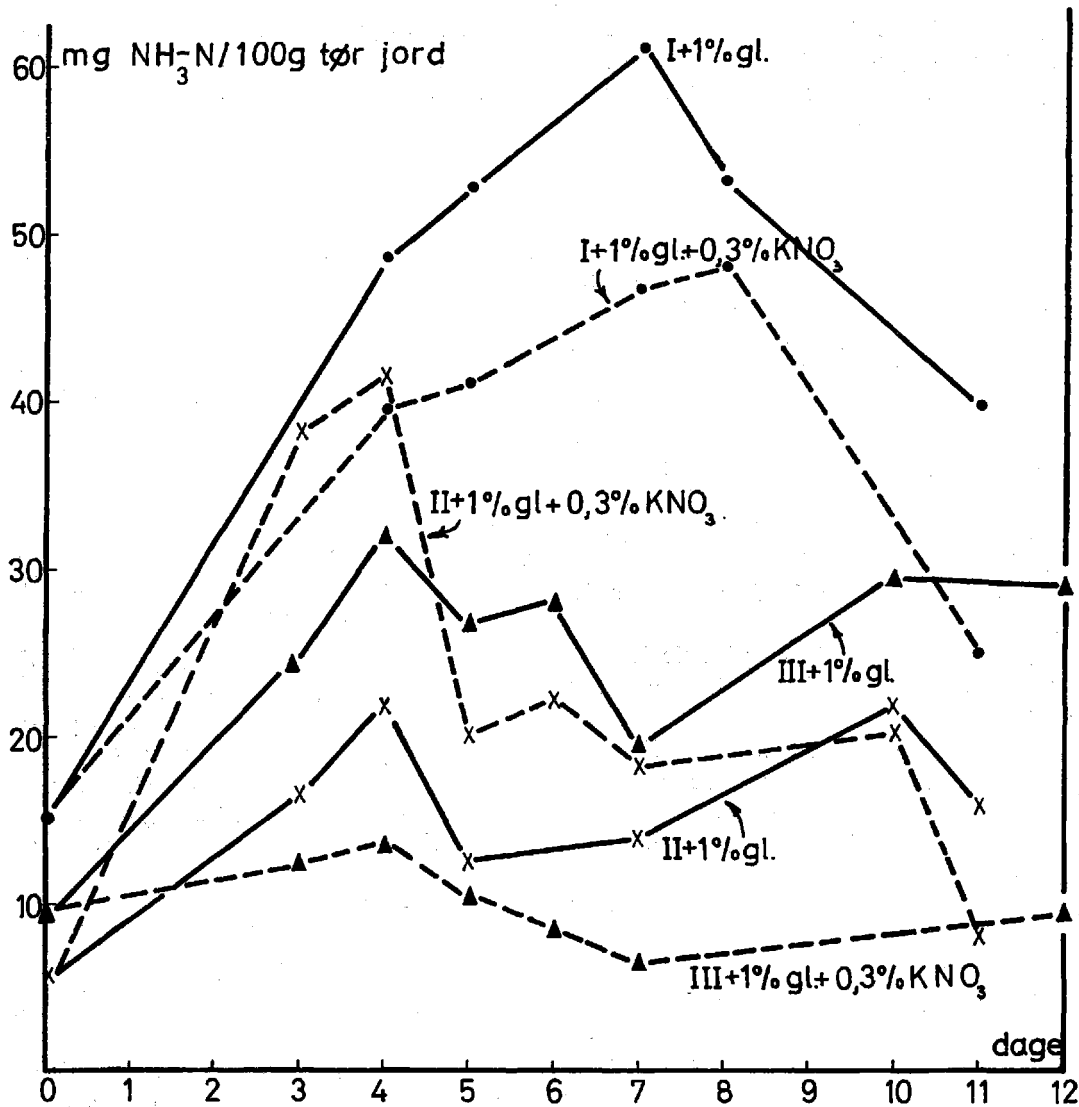


Fig. C. Sammenligning af ureaseaktiviteten i 3 forskellige jorder, der er tilsat de samme mængder af glucose og KNO₃.

(Comparison of urease activity in 3 different soils containing same amount of glucose and KNO₃.)

taget hensyn til jordens oprindelige kulstof og kvælstof indhold. Det viser sig, at et C/N-forhold på 20/1 og 100/1 giver højere udslag i ureaseaktiviteten end et C/N-forhold på 10/1. Dette gør sig dog ikke generelt gældende for alle jordtyper, hvilket også fremgår af de følgende undersøgelser.

Figur C viser en sammenligning mellem de tre anvendte jorder I, II og III efter tilsætning af dels glucose og dels glucose + KNO₃. For jorderne I og III gælder det at glucose-tilsætningen alene virker mere urease-stimulerende end glucose + KNO₃ tilsætning, medens det omvendte er tilfældet for jord II. Det skal her

bemærkes, at jord II havde det laveste nitrattal ved udtagningen, og at dette sandsynligvis er årsag til det modsatte resultat for dennes vedkommende.

Diskussion

Figurerne A, B og C viser, at de undersøgte jorders ureaseaktivitet er påvirkelig af kulstof- og kvælstof-tilsætninger. Aktiviteten følger altså omdannelsesprocesserne for tilsat organisk stof i jorden under de givne betingelser. Når disse betingelser ændres, skifter aktiviteten også værdi. Den forøgelse i aktiviteten, der kan opnås ved forskellige tilsætninger, er forskellig fra den ene jord til den anden, alt efter hvilken tilstand jorden befinder sig i med hensyn til kulstof- og kvælstofindhold.

I de nævnte forsøg er der foretaget dobbeltbestemmelser. Disse afviger 8-10 pct. fra hinanden, og da det er målinger på biologisk materiale, synes denne usikkerhed ikke at kunne formindskes.

Til sammenligning skal der her tilføjes et par andre forfatteres resultater. Undersøgelser udført af *Skujins* og *McLaren* (1969) viser øget ureaseaktivitet ved tilsætning af organisk kulstof; deres forsøg viser endvidere bedre korrelation mellem ureaseaktivitet og indholdet af organisk kulstof end mellem ureaseaktivitet og antallet af mikroorganismer.

McGarity og *Meyers* (1967) fandt også en stigning i ureaseaktivitet ved tilsætning af organisk kulstof. De fandt desuden en svag sammenhæng mellem pH og ureaseaktivitet i området 4,8-6,7, således at ureaseaktiviteten var størst ved højest pH.

Hofmann og *Kesseba* (1962) konstaterede en tilnærmelsesvis proportionalitet af ureaseaktiviteten med indholdet af organisk stof, og endvidere at den følger indholdet af totalt kvælstof.

Man må iøvrigt erindre sig, at de erfaringer man gør, og de konklusioner man måtte drage med hensyn til et enkelt enzym, hverken kan overføres til et andet enzym eller generaliseres, hvad angår den enzymatiske aktivitet i jorden i almindelighed.

Analysearbejdet er udført af laboratorieassistent Minna Schrøder, Bakteriologisk afdeling, Statens Planteavls-Laboratorium.

Summary

Urease activity in Danish soils

A review is given of literature on urease in soil. Experiments with addition to the soil of glucose and glucose plus KNO_3 have been carried out.

The results indicate that the urease-activity is correlated with the organic carbon content and that addition of NO_3^- stimulates the urease-activity in some cases.

Litteratur

- Chin, Wei-Tsung & Kroontje, Wybe*, 1963. Urea Hydrolysis and Subsequent Loss of Ammonia. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 27, 316.
- Conrad, J. P.*, 1944. Some effects of developing alkanities upon urease like activities in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 8, 171-174.
- Durand, Gilbert*, 1965. Les enzymes dans le sol. *Rev. Ecol. Biol. Sol, T. II* 2, 141-205.
- Hoffmann G. & Teicher, K.*, 1961. Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. *Z. Pfl. Ernähr. Düng.*, 95, 55-63.
- Hofmann, E.*, 1962. The origin and importance of Enzymes in soil. VIII International congress for Microbiology, Montreal, 216-220.
- Hofman, E. & Kesseba, A.*, 1962. Untersuchungen über Enzyme in Ägyptischen Böden. *Z. Pfl. Ernähr. Düng.*, 99, 9-20.
- Jensen, H. L.*, 1965. Urease hos mikroorganismer og i jord. *Ugeskrift for landmænd*, nr. 45, 739-744
- McGarity, J. W. & Meyers, M. G.*, 1967. A survey of urease activity in soils of Northern New South Wales. *Pl. Soil*, 27, 217-238.
- McLaren, A. D.* 1962. Enzyme activity in soils sterilized by ionizing radiation and some comments on micro-environments in nature, in: *Recent Progress in Microbiology*, Montreal, 221-229.
- Skujins, J. J. & McLaren*, 1969. Assay of urease activity using ^{14}C -urea in stored, geologically preserved, and in irradiated soils. *Soil Biol. Biochem. I*, 1, 89-99.

- Smirnov, V. N., Grishkun & Usynina, V. A.*, 1962. Enzymic activity and intensity of soil respiration in the forest and in the field. *Soviet Soil Science*, 1, 49.
- Sumner, J. B.*, 1926. Isolation and crystallization of enzyme urease. *J. Biol. Chem.*, 69, 435.
- Sumner, J. B. & Somers*, 1947. *Enzymes. Chemistry and Methods of Enzymes*. Acad. Press. Inc. Publ., New York.
- Weyland, H.*, 1957. Untersuchungen über die Ammonifizierung des Stickstoffs im Jauche. *Cent. Bakt. (II)* 110, 471-489.
- Manuskript modtaget i redaktionen den 22. november 1971.