

Statens Planteavlslaboratorium [Aage Henriksen]

Bakteriologisk Afdeling (T. Vincents Nissen)

Dehydrogenase i jordbunden

Dehydrogenase activity in Danish soils

Kirsten Laugesen og J. P. Mikkelsen*

Resumé

Aktiviteten af enzymet *dehydrogenase* er blevet undersøgt i forskellige jorder under indvirkning af tilsat glucose og uorganiske stoffer. Som mål for enzymaktiviteten anvendtes bestemmelse af den formazanmængde, der blev dannet ved reduktion af 2,3,5-trifenylnitrazoliumklorid under de anvendte forsøgsbetingelser. Resultaterne viser, at $\text{glucose} + \text{NH}_4\text{NO}_3$ (C/N = 10/1) forøger dehydrogenase-aktiviteten og desto mere jo større jordens humusindhold er.

Indledning

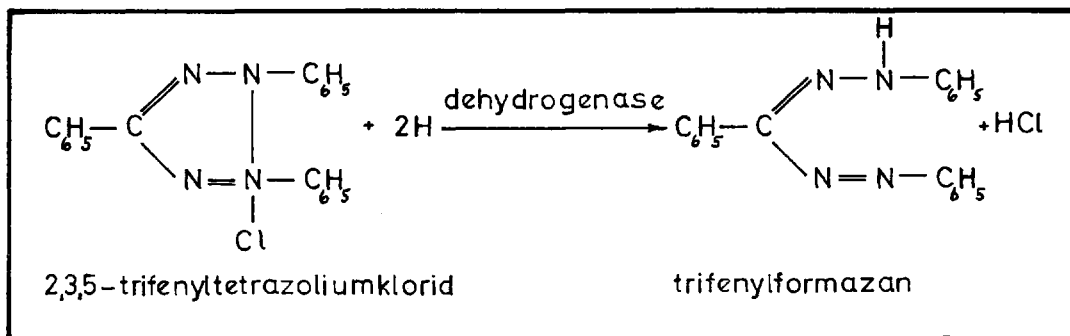
Undersøgelsen er et led i rækken af orienterende studier over *jordbundens enzymer*, der er foretaget på Bakteriologisk afdeling, Statens Planteavlslaboratorium. Tidligere er udsendt en beretning over enzymet urease i jord (Laugesen 1972) og en beretning over enzymet fosfatase i jordbunden (Laugesen og Mikkelsen 1973). Da enzymerne er vigtige katalysatorer ved forløbet af alle i jordbunden forekommende biokemiske og biologiske processer, har de været genstand for en del opmærksomhed indenfor den sidste snes år. Adskillige har forsøgt at finde en sammenhæng mellem en jords dyrkningsegnethed og dens enzymkapacitet. Opfyldelsen af dette mål har hidtil voldt visse vanskeligheder uden dog at svække interessen for enzymerne virke, idet der kan være tale om så mange andre perspektiver i denne sammenhæng. Man kunne f.eks. tænke sig at sammenkoble enzybestemmelser med undersøgelser over forureningsfaktorer såsom tunge metaller og bekæmpelsesmiddelrester i jordbunden.

Nærværende undersøgelse vedrører *dehydrogenase*-enzymerne. *Dehydrogenase* tilhører oxidoreduktase-gruppen; de er endoenzymer, og som sådanne kan de næppe forventes at forekomme som frie enzymer i jorden. Dehydrogenase-enzymene 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. Luftens ilttilgang hæmmer imidlertid reduktionen af tetrazoliumsalt i jorden betydeligt, men foretages inkubationen af en jordprøve i et reagensglas med så meget væske, at jorden er vandmættet, spiller iltindholdet en mindre rolle. Undersøgelser af Ross (1971) og Thalmann (1968) viser, at forsøgskurverne under aerobe og anaerobe forhold for-

*) akademiingeniør, p.t. Bakteriologisk afdeling, Statens Planteavlslaboratorium.

løber ens, blot ligger de aerobe kurver et stykke under de anaerobe. Omsætningen foregår efter

følgende ligning, idet dehydrogenase katalyserer processen.



Lenhard (1956) var den første, der anvendte 2,3,5-trifenyltetrazoliumklorid (TTC) til dehydrogenase-aktivitetsbestemmelse 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 overensstemmelse med det af Thalmann (1968) fundne. Han fandt at Fe^{++} — og sulfidforbindelser kan reducere TTC, hvilket medfører at udeblivende reaktion efter autoklavering ikke er bevis for, at formazandannelsen er biologisk betinget, idet sulfidforbindelser destrueres ved autoklavering.

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 mikroorganismer 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 dehydrogenaseaktivitet 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 humusrige 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 $\text{pH} = 7,6$ ved anvendelse af tris puffer. Det vil sige, at aktiviteten ikke nødvendigvis er maximal under markforhold.

Forsøgsteknik

Dehydrogenasebestemmelsen, der blev foretaget efter Ross (1971), bygger på en formazan-bestemmelse, idet den tilstedeværende dehydrogenase vil reducere en del af det tilsatte enzym-substrat, TTC, til formazan. I denne undersøgelse anvendes den formazanmængde, der ved 30°C dannes på 20 timer, som mål for dehydrogenase-aktiviteten og angives som extinktion/5 g ovntør jord/20 timer. Til forsøgene er anvendt lufttørret jord, der omregnes til den vægtmængde, der fås ved tørring i ovn ved 100°C i et døgn. Bestemmelsen foretages kolorimetrisk, idet man udnytter dannelsen af det røde formazan.

De til undersøgelsen anvendte jorder blev lufttørret, sigtet og fugtet til en passende fugtighedsgrad alt efter jordernes beskaffenhed. Yderligere blev der tilsat forskellige næringsstoffer (se senere), hvorefter jorden blev inkuberet i 250 ml mælkeflasker ved 25°C i to uger. Med passende mellemrum udtoges prøver til dehydrogenasebestemmelse, der blev udført som nedenfor anført.

Analysen udførtes således: Den fugtige jord, svarende til 5 g ovntør jord, blev afvejet i et reagensglas (15 cm × 2 cm). Der tilsattes 1 ml 5% glucoseopløsning og 5 ml trispuffer (Fluka, pH = 7,6) indeholdende 0,5% TTC. Glasset blev rullet mellem hænderne 7-8 gange for at blande stofferne, hvorefter det tilproppede glas blev hensat i termostat ved 30°C i 20 timer. Efter endt inkubation tilsattes methanol, dels for at standse enzymaktiviteten, dels for at udtrække formazanen. Prøven blev overført til et 50 ml centrifugeglas, hvori den blev rystet i en time på rysteapparat inden centrifugering. Udtrækningen med methanol blev gentaget 4-5 gange, indtil den røde farve var væk. Filtreringen foregik gennem vandsugende vat ned i en 200 ml målekolbe. Farveintensiteten målt spektrofotometrisk ved 485 nm. Der blev udført dobbeltbestemmelser samt analyser til korrektion af jordernes egenfarve. Det bemærkes, at den tilsatte glucose ikke reducerer det tilsatte TTC i forsøgstiden.

Anvendte jorder

Ved undersøgelsen blev der anvendt fire forskellige jorder. De tre stammer fra det danske jordarkiv, som er beskrevet af Lamm (1971). Det drejer sig om jorderne, arkiv nr. 20, 51 og 53, som er udtaget på normalt gødede arealer ved henholdsvis Roskilde forsøgsstation (lerjord), Askov forsøgsstation (sandmark) samt ved Stubberupholm, Lammefjorden (dyndjord). Jorden, betegnet 26-56 er udtaget i det ugødede led af forsøg nr. 26-56 ved Lundgaard forsøgsstation.

En oversigt over forskellige analysedata for de nævnte jorder er vist i tabel 1.

Tabel 1. Forskellige analysedata for de anvendte jorder.

Jord nr.	pH(H ₂ O)	% ler	% silt	% fin-sand	% grov-sand	% humus
20 a.	6,4	11,9	18,4	41,8	25,5	2,4
51 a.	7,0	4,1	4,7	30,9	59,2	1,1
53 a.	7,3	5,8	28,9	37,2	20,0	8,1
26-56 a. . .	5,9	4,3	5,2	30,2	57,7	2,6

Stoftilsætning

Under naturlige betingelser begrænses dehydrogenase-aktiviteten af de tilstedeværende mængder af forskellige stoffer, organiske såvel som uorganiske. Virkningen af tilsætning af en række af disse stoffer er undersøgt efter følgende plan:

1. Glucose + NH₄NO₃
2. Glucose + NH₄NO₃ + KCl
3. Glucose + NH₄NO₃ + Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O + CaCl₂
4. KCl
5. Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O + CaCl₂
6. NH₄NO₃
7. Ingen tilsætning.

De tilsatte mængder er følgende, beregnet på basis af ovntør jord: Glucose, 1 pct.; NH₄NO₃ til led 1-3, 0,11 pct., svarende til 384 ppm N; til led 6, 64 ppm N. Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O, KCl og CaCl₂ er anvendt i mængder, svarende til henholdsvis 20 ppm P, 52 ppm K og 26 ppm Ca. De tilsatte mængder af P og K, samt af N til led 6, svarer således meget nær til den i praksis anvendte gødskning med de pågældende stoffer.

Kun den meget næringsstoffattige jord fra det gamle gødningsforsøg ved Lundgaard (ugødet siden 1926) er undersøgt efter den fuldstændige forsøgsplan. Jorden fra Roskilde undersøgtes i henhold til led 1, 2, 3 og 7, medens jorderne fra Lammefjorden og Askov sandmark kun er undersøgt efter led 1.

Resultater

Det fremgår med stor tydelighed af figur 1, at de tilsatte mængder af glucose + NH₄NO₃ har øget dehydrogenase-aktiviteten i jorden fra Lundgaard gennem hele forsøgsperioden, som var på 9 døgn.

I et efterfølgende forsøg med jorden fra Lundgaard undersøgtes dehydrogenase-aktiviteten ved tilsætning af N, P og K, men uden tilsætning af glucose + NH₄NO₃. Resultaterne, der fremgår af figur 2, viser, at tilsætning af de uorganiske stoffer alene ikke har øget jordens aktuelle aktivitet.

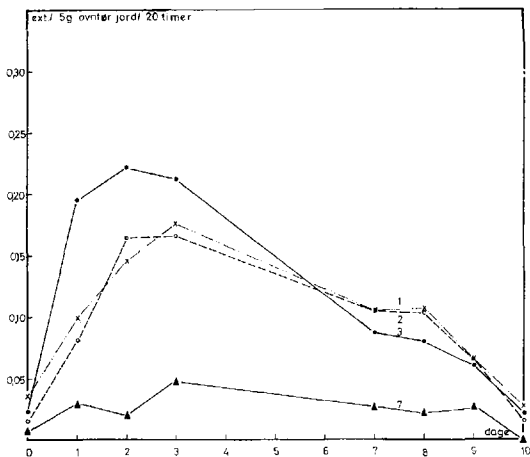


Fig. 1. Forskellige organiske og uorganiske stoffers indvirkning på dehydrogenase-aktiviteten i sandjord fra Lundgaard. 1. glucose + NH_4NO_3 , 2. gl. + NH_4NO_3 + KCl, 3. gl. + NH_4NO_3 + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + CaCl_2 , 7. ingen tilsætning.

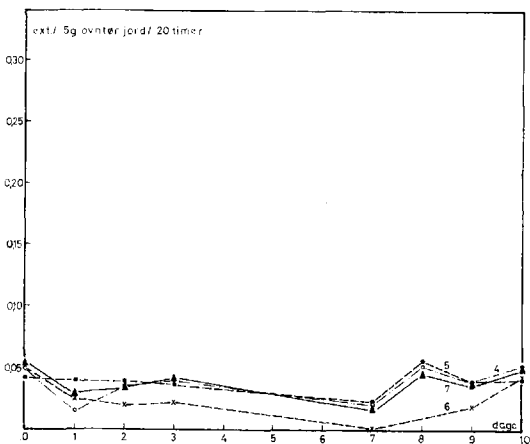


Fig. 2. Forskellige uorganiske stoffers indvirkning på dehydrogenase-aktiviteten i Lundgaardjord. 4. KCl, 5. $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + CaCl_2 , 6. NH_4NO_3 , 7. ingen tilsætning.

Den betydeligt mere næringsstofrige jord fra Roskilde blev herefter kun undersøgt efter forsøgsplanens led 1, 2, 3 og 7. Resultaterne heraf, vist i figur 3, giver samme hovedlinie som for jorden fra Lundgaard, nemlig en stærk aktivitetsforøgelse efter tilsætning af glucose + NH_4NO_3 .

Ved sammenligning af resultaterne i figur 1

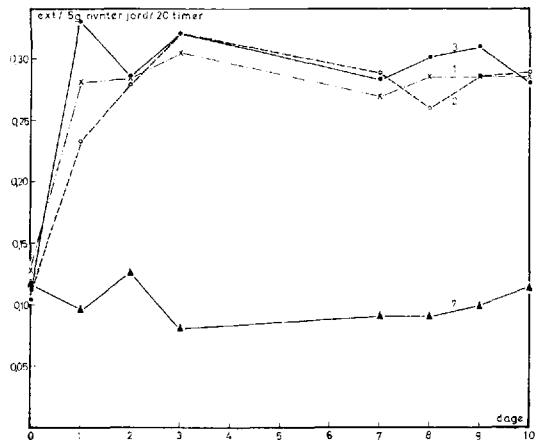


Fig. 3. Forskellige organiske og uorganiske stoffers indvirkning på dehydrogenase-aktiviteten i lerjord fra Roskilde. 1. glucose + NH_4NO_3 , 2. gl. + NH_4NO_3 + KCl, 3. gl. + NH_4NO_3 + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + CaCl_2 , 7. ingen tilsætning.

og 3 ses, at aktiviteten, såvel uden som med tilsætning af glucose + NH_4NO_3 , er tydeligt højere i jorden fra Roskilde end i jorden fra Lundgaard. Ligeledes fremgår, at aktivitetsforøgelsen holder sig i længere tid i førstnævnte jord.

Sluttelig blev dehydrogenase-aktiviteten i en meget humusfattig jord (Askov sandmark) og i en humusrig jord (Lammefjorden) sammenlignet med aktiviteten i jorderne fra Roskilde og Lundgaard, der har et ret normalt humusindhold

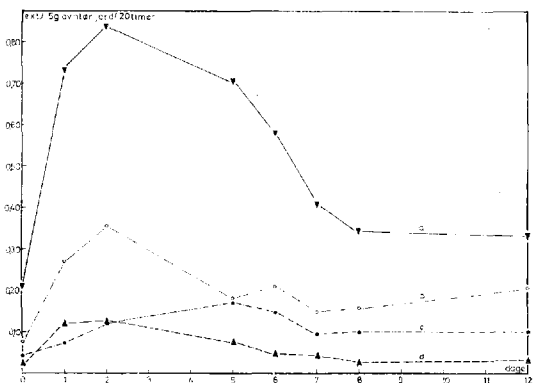


Fig. 4. Sammenligning af dehydrogenase-aktiviteten i jorder med forskelligt humusindhold. a. Lammefjord (h = 10,2 pct.), b. Roskildejord (h = 2,4 pct.), c. Lundgaardjord (h = 2,6 pct.), d. Askov Sandmark (h = 1,4 pct.).

Resultaterne, der fremgår af figur 4, viser klart, at der fås størst aktivitetsforøgelse i den mest humusrige jord og mindst i den mest humusfattige jord for tilsætning af glucose + NH_4NO_3 . Også udgangsværdierne for jordens hydrogenase-aktivitet følger denne linie.

Hver kurvepunkt i de viste figurer er anført som gennemsnitsværdi af dobbeltbestemmelser. Afvigelserne mellem disse bestemmelser ligger indenfor 10 pct., og da det drejer sig om målinger på små mængder af biologisk materiale, synes denne usikkerhed ikke at kunne formindskes.

Diskussion og konklusion

De undersøgte jorders dehydrogenase-aktivitet øges stærkt ved tilsætning af letomsætteligt organisk stof og kvælstof. Aktiviteten følger således omdannelsesprocesserne for tilsat organisk stof i jorden under de givne betingelser.

Forsøgene med jorden fra Lundgaard viser, at de uorganiske tilsætninger alene ikke påvirker de undersøgte jorders dehydrogenase-aktivitet. Dette er i overensstemmelse med resultater af en lignende undersøgelse for fosfatase-aktivitet (Laugesen og Mikkelsen, 1973).

Som tidligere nævnt fandt Lenhard (1956) en større dehydrogenase-aktivitet i humusrige end i humusfattige jorder. Resultaterne af de her beskrevne undersøgelser bekræfter dette forhold, som imidlertid for nærværende savner en fyldestgørende forklaring.

Betragter man de hidtil foreliggende resultater, må det i det hele taget erkendes, at mere dybtgående undersøgelser er påkrævede for at forklare niveauforskellene mellem de forskellige enzymer i forskellige jorder, og deres forskellige relation til de omgivende faktorer i jordbunden. Skujins (1967) fandt da også, at der meget sjældent kan drages konklusioner mellem enzym-aktivitet og jordfrugtbarhed eller mikrobiel aktivitet; fordi enzym-aktivitet som den måles i laboratoriet, er et udtryk for flere biologiske faktorer. Disse omfatter frie enzymer adsorberet på jordpartikler, enzymer frigjort fra mikroorganismer, frie enzymer fra planterødder og jordboende dyr. Sålænge man ikke kan adskille disse forskellige aktiviteter og undersøge dem

enkeltvis er det næppe muligt, at finde en sammenhæng mellem enzym-aktivitet, biologisk aktivitet og jordfrugtbarhed.

Summary

Dehydrogenase activity in Danish soils

A review is given of literature on dehydrogenase in soil. Experiments with addition to the soil of glucose plus NH_4NO_3 and inorganic fertilizers have been carried out.

The results indicate that the dehydrogenase-activity is correlated with the humus content in the soil and that the dehydrogenase-activity is much greater in soils, rich in humus, than in soils poor in humus.

Litteratur

- Casida, L. E., Klein, D. A. and Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98, 371-376.
- Kozlov, K. A. & Mikhaylova, E. N. (1965). Dehydrogenase activity of some soils of Eastern Siberia. *Soviet Soil Science*, 2, 161-165.
- Lamm, C. G. (1971). Det danske jordarkiv. *Tidsskr. f. Planteavl*, 75, 703-720.
- Laugesen, K. (1972). Urease i agerjord. *Tidsskr. f. Planteavl*, 76, 221-229.
- Laugesen, K. og Mikkelsen, J. P. (1973). Fosfatase i jordbunden. *Tidsskr. f. Planteavl*, 77, 352-356.
- Lenhard, G. (1956). Die Dehydrogenaseaktivität des Bodens als Mass für die Mikroorganismen-tätigkeit im Boden. *Z. Pfl. Ernähr. Düng.*, 73, 1-11.
- Raguotis, A. D. (1967). Biological activity of sod-podzolic forest soils of The Lithuanian SSR. *Soviet Science*, 6, 751-757.
- Ross, D. J. (1971). Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.* 3, 2, 97-110.
- Roth, G. (1966). Biochemical activity of soils; new method of assessment. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.*, 276-85.
- Skujins, J. J. (1967). Enzymes in soil. In soil biochemistry. Ed. by McLaren, A. D. & Peterson, G. H., 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.

Manuskript modtaget d. 27. marts 1973.