

## Nährstoffe und ihre Umsätze im Pflanze-Boden System SS 2005

809325 UE+VO, 4 St

### - Der Inhalt

In diesem Praktikum werden die basalen Stoffkreisläufe und Strategien im Planze/Boden System besprochen und anhand der Analyse stark unterschiedlicher Arten mit konträren Strategien demonstriert.

Die unterschiedliche Verteilung der Hauptnährstoffe in Blatt, Wurzel und Boden werden mittels (semi-)quantitativer Analyse von Mineralstoffen, Zuckern\*, Gesamtkohlenstoff, dem C/N Verhältnis, sowie der Verteilung von Kationen nachgewiesen

Die damit in Verbindung stehenden mikrobiellen Stoffumsetzungen im Boden werden mit bodenphysikalischen Parametern und enzymatischen Substratnutzungstests untersucht.

### - Der Ablauf

Maniok und Zuckerrohr in drei Altersstufen

|    |         |  |            |
|----|---------|--|------------|
| 1. | Kurstag | MO:<br>Biometrie, Bodensieben, Wurzelwaschen, Trocknen,<br>Ansatz pH Böden (aktuell/potentiell), Extraktion für BIOLOG<br>Inkubation und erste Messung BIOLOG              | 8:30-17:00 |
| 2. | Kurstag | DI:<br>Messung BIOLOG (Morgens und Abends bis FR Morgen!)<br>Mahlen, Extraktion der Pflanzen und Böden (HW und HCl)<br>Messung pH aktuell/potentiell Böden<br>Einwaage C/N | 8:00-17:00 |
| 3. | Kurstag | MI:<br>Vorbereitung Dehydrogenaseaktivität<br>Demonstration Masse<br>Glucose/Sacharose enzymatisch (Blatt/Boden*)<br>Vorbereitung für AAS (Blatt, Boden, HW und HCL)       | 8:30-17:00 |
| 4. | Kurstag | DO:<br>Messung Dehydrogenaseaktivität<br>Demonstration GC/HPLC<br>AAS der Mineralstoffe u. Auswertung  | 8:30-17:00 |
| 5. | Kurstag | FR:<br>Urease, Nitrat<br>AUSWERTUNG und Abschluss*   | 8:30-17:00 |

\* ein zusätzlicher Termin für die Schlussbesprechung ist u.U. erforderlich

\*Anhang: sacharose/Glucose Assay

## Messparameter und Probenvorbereitung

| Messparameter  | Extrakt/Material |                                     | Methodik/Analysegerät   |
|--|------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Masse FG, TG   | BL, SP, WU, BO   |                                     |                         |
| K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , Fe <sup>++(+)</sup> | BL, SP, BO       | HWE <sup>1</sup> , SRE <sup>2</sup> | Atomabsorption          |
| Zucker enzymatisch   | BL, SP, BO       | HWE                                 | Photometer              |
| Gesamtstickstoff (C/N)   | BL, SP, BO       | TM-Pulver <sup>3</sup>              | Elementaranalysator     |
| pH-Wert  | BO               | HWE <sup>1</sup> , KCL              | pH-Messung              |
| BIOLOG   | BO               | Ringer-Extrakt                      | Microplatte, Photometer |
| Urease, Dehydrogenase, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | BO               | Frischboden 2mm                     | Photometer              |

Abkürzungen:

<sup>1</sup>, Heißwasser-Extrakt; <sup>2</sup>, Säure-Extrakt, <sup>3</sup> Gemahlene Trockenmaterial

## Probenvorbereitung der Böden

### Vorbereitung und Lagerung der Böden

Mischproben werden im naturfeuchten Zustand mit einem Bodensieb zuerst grob (5 mm) und danach fein (2 mm) gesiebt. Sollte die Feuchtigkeit der Böden zu hoch sein, so müssen die Böden vor dem Sieben bei 4 °C angetrocknet werden. Nach dem Sieben werden verbliebene Wurzelstücke entfernt, die Böden in Plastiksäcke abgefüllt und bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Sollte zwischen der Aufsammlung der Böden und den Analysen mehr als 4 Wochen vergehen, ist es notwendig die Böden tiefzufrieren. In diesem Fall sollten die Böden mindestens 48 Stunden vor der Probennahme bei 4 °C aufgetaut werden.

### Trocknung des Bodens und Bestimmung des Wassergehaltes

Ca. 5 g Boden wird in einem Aluminiumgefäß bei 95 °C im Trockenschrank für 48 h getrocknet. Aus der Differenz von Frischmasse und Trockenmasse errechnet sich der Wassergehalt des Bodens.

Der so getrocknete Boden wird im Exsikkator aufbewahrt und kann zur Bestimmung des Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisses in der Schwingmühle gemahlen werden.

Für die Extrakterstellung können die Böden auch luftgetrocknet werden. Zur Berechnung des Korrekturfaktors zwischen luftgetrockneten und im Trockenschrank getrockneten Böden, muß dann eine Vergleichsprobe beiden Trocknungsmethoden unterzogen werden.

### Herstellung von Bodenextrakten

#### *Wasserextrakt*

Etwa 3 g gesiebter, luftgetrockneter (oder naturfeuchter) Boden wird mit 7.5 mL A. dest. bzw. auch mit 7,5 ml 0,1 N CaCl versetzt und 12 h bei Zimmertemperatur inkubiert und dabei auf dem Kreisschüttler geschüttelt. Diese Extrakte werden direkt für die Messung des pH-Wertes eingesetzt.

Für andere Analysen (Zucker) wird ein weniger konzentrierter Extrakt hergestellt (0,1 g auf 1 mL, i.e 10% ig), abzentrifugiert und danach filtriert. Der Wasserextrakt wird eingefroren aufbewahrt.

#### *Säure-(HCL-Extrakt)*

Siehe Säureextrakt von Pflanzenpulver, ebenfalls 10 % ig.

## Bestimmung des pH-Wertes

*Prinzip:* Der pH-Wert (negativer Logarithmus der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration) ist ein Maß für die Menge der frei in Lösung vorliegenden Protonen. Man spricht beim pH-Wert auch von der *aktuellen Acidität*. Zur Erfassung der *potentiellen Acidität* hingegen wird ein Extrakt mit Lauge bis etwa pH 9 titriert, um auch solche Protonen zu erfassen, die bei physiologischen pH-Werten nicht in dissoziierter Form vorliegen.

Für Pflanzenpresssäfte werden Blattproben (etwa 2g) eingefroren und dann mit einer Knoblauchpresse mit Filterpapereinslage gepresst. 60 µl des Extraktes werden mit einer Kolbenhubpipette aufgesogen und auf die Meßfläche einer ISFET (Ionen Sensitiver Feld Elektronen Transistor)-Elektrode pipettiert. Bodenextrakte sollten über Nacht abstehen, da aufgeschlämmtes Sediment die pH-Messung empfindlich beeinflusst.

## Probenvorbereitung der Pflanzen

### Trocknungsmethoden

#### *Mikrowelle*

Frisches Pflanzenmaterial kann schnell und schonend auch in einem Mikrowellenherd getrocknet werden. Dazu wird die Probe in eine offene Petrischale eingewogen und im Mikrowellenherd (ca. 2500 MHz, 600 - 1000 Watt) für etwa 10 min bis 20 min getrocknet. Unbedingt notwendig ist dabei, daß im Mikrowellenherd auch eine Gefäß mit Wasser, als eine Art Puffer, eingebracht wird. Das Gefäß sollte mindestens einen halben Liter Wasser (möglichst große Oberfläche) enthalten. Die Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung mit anderen Methoden ist für die meisten organischen Inhaltsstoffe (Kohlenhydrate, organische Säuren, Aminosäuren) sehr gut. Der Wassergehalt der im Mikrowellenherd getrockneten Proben ist mit dem gefriergetrockneten Proben vergleichbar.

#### *Trockenschrank*

Frisches oder in der Mikrowelle vorbehandeltes Pflanzenmaterial wird in Papiersäcke eingewogen und im (vorgeheizten) Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Diese Methode ist vor allem für Mineralstoffanalysen geeignet. Sollen darüber hinaus auch organische Säuren quantitativ erfaßt werden, so ist eine schonendere Trocknung bei 80-95 °C vorzuziehen. Die Dauer der Trocknung liegt zwischen 12 und 36 Stunden.

## Herstellung und Aufbewahrung des Pflanzenpulvers

Die getrockneten Pflanzenteile werden in einer Schwing- oder Kugel-Mühle feinst vermahlen. Bei stark verholzten Proben (Zweige, Wurzeln, ect.) ist es unbedingt erforderlich zuerst eine grobe Zerkleinerung des Materials vorzunehmen (z.B. Häckseln).

Die Aufbewahrung des getrockneten Pulvers erfolgt in verschließbaren Gefäßen in einer Kunststoff-Tonne über einem Trocknungsmittel mit Indikator (Blaugel, Phosphorpentoxid, ect.). Das Pulver ist vor Verwendung gut zu durchmischen, da es sonst durch unterschiedliche Korngrößen zu inhomogener Probenahme kommen kann.

## Herstellung von Extrakten aus Pflanzenpulvern

- ! Wir stellen jeden Extrakt 2 mal her, da sonst die nötigen Mengen nicht erreicht werden ! -

#### *Heißwasserextrakte*

Getrocknetes (Mikrowelle oder Trockenschrank) und gemahlene Pflanzenmaterial (40mg) wird genau in 2 mL Eppendorf-Proberöhrchen eingewogen, 1 mL A. dest. wird dazupipettiert, die Röhrchen werden verschlossen und mit einer Plastikspange gesichert. Danach werden die Röhrchen für 30 min im kochenden Wasserbad inkubiert, nach dem Abkühlen zentrifugiert und der Überstand in frische 1.7 mL Röhrchen mit Schraubverschluß transferiert. Heißwasserextrakte werden eingefroren aufbewahrt.

#### *Säureextrakte*

Getrocknetes und gemahlene Pflanzenmaterial wird ebenfalls in Eppendorf Reaktionsgefäßen eingewogen (Endkonzentration ca. 1% w/v) und mit 1 N HCl übergossen. Der Ansatz wird danach am Wasserbad etwa 30 min gekocht, danach abgekühlt, zentrifugiert und in Frische Röhrchen abdekantiert und der Extrakt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## Atomabsorptions-Spektralphotometrie (AAS)

*Prinzip:* Die Analysenlösung wird über ein entsprechendes Zerstäubersystem in eine Flamme eingebracht (Standardflamme: Luft-Acetylen, Spezialflamme für Ca-Bestimmung: Lachgas-Acetylen); das zu messende Element wird in der Hitze (ca. 2300 °C) atomisiert. Durch die Flamme wird gleichzeitig das Licht einer Hohlkathodenlampe geschickt: das sind Gasentladungslampen, deren hohlzylindrische Kathode aus dem Material des Meßelementes besteht, und die daher intensiv gebündelte, elementspezifische Strahlung abgeben (=Resonanzfrequenz des entsprechenden Metalls, vgl. die bekannten Natriumdampflampen). Die freien Atome in der Flamme absorbieren nun Licht der Hohlkathodenlampe und gehen dabei in den "angeregten Zustand" über, das heißt ihr(e) (Valenz)elektron(en) bzw. -elektronensysteme nehmen einen Zustand höherer Energie ein. Die dabei eintretende Schwächung des Hohlkathodenlampen-Lichtes kann als Messsignal registriert werden. Wenn man sich nun die Flamme als Küvette denkt und die Hohlkathodenlampe als Strahlungsquelle, so hat man den Apparate-Typus des Photometers vor sich: die gemessene Extinktion ist als analytisches Maß der Konzentration der freien Atome in der Flamme - und damit der Konzentration der Metallionen in der Analysenlösung - direkt proportional. Der Monochromator steht dabei auf der Resonanzfrequenz. Für die einzelnen Elemente, besonders für die mit komplexeren Elektronenhüllen gibt es meist mehrere Resonanzfrequenzen, die für die analytische Praxis genützt werden können. Die stark unterschiedliche Meßempfindlichkeit (über mehrere 10er-Potenzen) bei den einzelnen Spektrallinien hängt von deren Strahlungsinintensität ab: Verwendung der intensiven Hauptlinien erlaubt stets die empfindlichsten Messungen.

Das System muß wie jede spektralphotometrische Methode mit Standardlösungen bekannter Konzentration geeicht werden. Bei der Bestimmung von Elementen, die ihre Valenzelektronen leicht verlieren (wie z.B. K und Ca) muß der Meßlösung, wie auch der Standardlösung, Cäsium als sogenannter "Ionisationspuffer" hinzugefügt werden, damit die "thermische Ionisation" der Atome verhindert wird.

### *Durchführung:*

Herstellung der Standardlösungen aus 1000 mg/L Stammlösungen (bzw. 100 mg/L Zwischenverdünnungen). In den Standardlösungen lassen sich zur Vereinfachung alle 4 Elemente kombinieren; jeweils 100 mL ansetzen. Die Konzentration an CsCl soll 0.1% betragen. Zu beachten ist, daß die "Matrix" der verwendeten Eichlösungen der "Matrix" der Proben (Wasser, Säuren, Ammoniumacetat) angepaßt werden muß! Die fertigen Lösungen werden in je 2 15 ml Gefäße überführt und ein Satz für die Analyse bereitgestellt, der andere aufbewahrt.

| mg / L    | Standard 1 | Standard 2 | Standard 3 | Standard 4 |
|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Magnesium | 0.5        | 1.0        | 2.0        | 5.0        |
| Calcium   | 10.0       | 5.0        | 1.0        | 2.0        |
| Kalium    | 2.0        | 5.0        | 10.0       | 1.0        |
| Natrium   | 0.5        | 1.0        | 2.0        | 5.0        |
| Eisen     | 1.0        | 5.0        | 2.0        | 0.5        |
| Summe     | 14.0       | 17.0       | 17.0       | 13.5       |

Für Na, K und Mg: Acetylen-Luft-Flamme im Mischungsverhältnis 1:3 - oxidierend.

Für Ca: Acetylen-Lachgas-Flamme im Verhältnis 1:2 - leicht reduzierend.

### *Vorbereitung der Proben:*

Heißwasserextrakte: In den entsprechenden Plastikgefäßen („Greiner-cups“) werden wässrige Verdünnungen von 1:50 und 1:400 angesetzt, die 0.1% CsCl enthalten. Säure-Extrakte: In den entsprechenden Plastikgefäßen werden die Extrakte 1:100 mit 1N HCl in 0.1% CsCl verdünnt.

### *Meßparameter:*

| Element | Linie (nm) | Spaltbreite (nm) | Bereich (mg L <sup>-1</sup> ) | Lampe (mA) |
|---------|------------|------------------|-------------------------------|------------|
| Na      | 589.0      | 0.2              | <5                            | 8          |
| K       | 766.5      | 0.7              | <10                           | 12         |
| Mg      | 285.2      | 0.7              | <5                            | 6          |
| Ca      | 422.7      | 0.7              | <10                           | 15         |

## Enzymatische Substratbestimmung: Glucose und Saccharose

*Prinzip:* Saccharose wird durch das Enzym  $\beta$ -Fructosidase in Glucose und Fructose zerlegt (Hydrolyse). Zur Glucosebestimmung vor der Saccharose-Hydrolyse wird die freie Glucose mit Hilfe der Glucose-Oxidase in je ein Äquivalent Gluconsäure und  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxyd) umgewandelt. Die Äquivalente wandeln ein Reagens (p-Hydroxybenzoesäure + Aminoantipyrin) in einen Quinoneimin-farbstoff um, dessen Konzentration photometrisch bei 510 nm gemessen wird.

Saccharose durch das Enzym  $\beta$ -Fructosidase zu Glucose und Fructose hydrolysiert (enzymatische Inversion). Danach wird Glucose nach dem obigen Prinzip bestimmt. Aus der Differenz des Glucosegehaltes nach und vor der Inversion wird dann der Saccharosegehalt berechnet.

--> Methode siehe Anhang: megazyme Assay

### Demonstration:

#### HPLC der Zucker mit elektrochemischer Detektion (pulsed amperometric detection, PAD)

##### 1. Probenvorbereitung

Zur Analyse gelangen je 1 ml verdünnte 4% Heißwasserextrakte (siehe oben). Die Verdünnung der Proben erfolgt mit MilliQ-Wasser, um eine Kohlenhydratkonzentration zwischen 5-30 mg zu erreichen. Wir beginnen mit einer Verdünnung von 1+50.

Standards: 0,1 | 1 | 10 | 100  $mgL^{-1}$  Die Testlösungen werden aus 1000  $mgL^{-1}$  Stammlösungen (siehe untere Tabelle) nach folgender Methode hergestellt: 1000  $mgL^{-1}$ , 100  $\mu l$  + 900  $\mu l$  ergibt 100  $mgL^{-1}$ , davon 100  $\mu l$  für die nächste Verdünnung verwenden, der Rest (900  $\mu l$ ) kommt zur Analyse in ein Proberöhrchen und wird verschlossen.

Die Proben dürfen keine Lösungsmittel (Ethanol o.ä.) enthalten. Diese Lösungsmittel geben amperometrische Signale und interferieren darum mit der Analyse. Solche Proben müssen zuvor komplett getrocknet und so vom Lösungsmittel befreit, dann in MilliQ Wasser aufgenommen werden. Auch hohe Salzkonzentrationen (Bodenproben!) verfälschen die Signale, indem sie die Retentionszeiten verschieben.

##### 2. Trennung von Mono- und Oligosacchariden

Säule: PA100 (250 x 4mm) mit 50mm-Vorsäule

Elution: 100mM NaOH isokratisch, 1mL/min Flow

Dies ist die Standardmethode für Kohlehydrate. Sie ist auch geeignet für die Analyse von Glukose aus enzymatischer Stärkespaltung (Gesamtanalyse kann auf 8-10 min reduziert werden). Eine ähnlich gute Trennung kann mit PA10 (250x2mm) Säulen, eluiert mit 100mM NaOH bei 0,25mL/min erreicht werden.

## Ammonium/Ureaseaktivitätsbestimmung

*Prinzip:* Ammonium wird aus KCl-Extrakten mit einer modifizierten Berthelot-Reaktion bestimmt. Die Bestimmung basiert auf der Reaktion von Natrium-Salicylat mit  $\text{NH}_3$  in Anwesenheit von Na-Dichloroisocyanursäure. Im alkalischen Milieu wird dabei ein grüner Farbkomplex gebildet. Natrium-Nitropussid (Achtung: Giftig!) wirkt dabei als Katalysator und steigert die Empfindlichkeit der Reaktion.

### Reagenzien und deren Standort:

*Mischlösung:* Gleiche Volumsteile 0,3 N NaOH, Na-Salicylat-Lösung und Aqua dest.

*Na-Salicylat-Lösung:* 17 g Na-Salicylat und 120 mg Nitroprussid-Natrium werden in 100 mL Aqua dest. gelöst (täglich frisch zubereiten).

*Oxidationsmittel:* 0,1 g Dichlor-Isocyanursäure Natriumsalz in 100 mL Aqua dest. lösen (täglich frisch zubereiten).

\**Substratlösung:* 2,4 g Harnstoff in 500 mL

NH<sub>4</sub>Cl – allgemeines Labor (2. Lade)

NaOH – allg. Labor

KCl – Bodенlabor

Na Salicylat – Bodенlabor

Dichlorisocyanursäure. – Bodенlabor

Harnstoff – Bodенlabor

Na- Nitroprussid – Chemikaliendepot Links im Glaskasten

**Methode:** je 2 Vollproben., 2 Blindproben.

Vollproben: 2g naturfeuchter Boden in zwei 50ml Erlenmeyer-Schmalhalskolben einwiegen, mit 1ml Harnstofflösung befeuchten, und mit Korkstopfen verschließen.

2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank ( Bodенlabor rechts vom Fenster) geben.

Blindproben: 2g naturfeuchter Boden in zwei 50 ml Schmalhalserlenmeyerkolben einwiegen, mit 1ml A.dest. befeuchten, mit Korkstopfen verschließen.

2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank.

Während der Inkubationszeit: \* KCL Lsg. herstellen

\* Eichreihe herstellen

Nach 2 Stunden : Vollproben + 1ml A.dest + 20ml KCL — 30min schütteln (max.76 Pr)

Blindproben + 1ml Harnstofflsg. +20ml KCL — 30min schütteln

Während des Schüttelns : Weithalskolben mit N- freien Faltenfiltern vorbereiten

Alle Proben filtrieren (Alle Reagenzien müssen fertig sein!)

- \* 2ml Eppendorf-Reagenzgefäße (sg. Eppis) vorbereiten Probenzahl + 2mal 5 Eppis für zwei Eichgeraden
- \* Pipetten kalibrieren

*Kalibration:* Diese erfolgt mit einer N-Stammlösung (3,8207 g NH<sub>4</sub>Cl / 1000 mL Aqua dest. = 1000 mg/L N). Diese Stammlösung wird so mit der KCl-Lösung verdünnt, daß man folgende Konzentrationen erhält: 5, 10, 15, 20, 25 und 30 mg/L. Jeweils 100µl der unterschiedlichen Konzentrationen werden wiederum zur Farbreaktion eingesetzt. Es wird empfohlen 2 Kalibrationsreihen herzustellen.

**Farbreaktion:**

Pro Eppi : 100µl einer Probe oder einer Eichlg  
 900µl A. dest.  
 500µl Mischlg.  
 200µl Oxidationsmittel

- \* am Vortex schütteln, 30min stehen lassen, danach eventuell noch einmal schütteln

Nach 30 min. ist die Reaktion quantitativ verlaufen und die Lösungen werden bei 660 nm gegen den Leerwert der Eichreihe vermessen.

- \* Photometer aufdrehen – 1. Computer einschalten  
 2. Photometer hinten rechts einschalten

**Messung mit Rainbow Microplatten- Photometer:**

\* Microplatten füllen : pro Probe 250µl Boden der Platte nicht berühren (Teil der Optik!)  
 Dazu am besten das Layout der Platte zuerst auf Paier aufschreiben und beim Pipetieren dazu legen!  
 Die ersten zwei senkrechten Spalten werden mit den beiden Eichgeraden befüllt (mit ansteigender Konzentration), daneben anschließend oben die Vollproben darunter die Blindproben.

- \* Einsteigen als Analyzer Paßwort Analyze
- \* X read Data : Probenamen eingeben Konzentrationen der Kalibrationspunkte eingeben
- \* Read plate : Fenster um, Wellenlängenbereich auszusuchen
- \* Speichern

**Berechnung:**

$$\frac{(VP - BP) \cdot 22 \cdot 100}{2 \cdot \%TS \cdot 2h} = x \mu\text{g N} \cdot \text{g TS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

VP Mittelwert Extinktionen der Vollprobe  
 LP Mittelwert Extinktionen der Leerprobe  
 y = kx + d Eichgerade  
 % TS Trockensubstanzfaktor (TS in % FG)  
 : 2(EW) : 2 (Ink.dauer) · 22 (mL im 1.Kolben)

## Gesamtkohlenstoffanalyse und $\delta^{13}\text{C}$ - Verhältnis

Je 1 g der gesiebten Böden werden in der Mikrowelle getrocknet und anschließend in der Schwingmühle fein vermahlen. Für die Messung der C-Isotopenverhältnisse werden je 10 mg des Bodempulvers in Zinnkapsel eingewogen.

### BIOLOG- Test

*Prinzip:* Eine modifizierte Dehydrogenasereaktion mit TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) als Substrat wird benutzt, um eine Microorganismensuspension auf potentielle Nutzung von niedermolekularen organischen Substraten zu prüfen. Der Test wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, die bereits die Chemikalien für den DHA Test sowie Spuren und Nährelemente enthält. Der Extrakt und die C-Quellen (niedermolekularen Substrate) werden in die Plattenvertiefungen pipettiert und die Farbentwicklung von TTC zu TPF (Triphenylformazan) im Photometer in gleichbleibenden Intervallen (6-12) Stunden nachgemessen.

*Durchführung:* 1 g Boden wird in 10 mL Ringerlösung (2, 25g NaCl, 0,105g KCl, 0,12gCaCl, 0,05 NaHCO<sub>3</sub> pro Liter A.d.) geschüttelt und 1 min bei 500 U/min zentrifugiert.

Der Extrakt wird 100-fach verdünnt, 100µl des verdünnten Extraktes werden gemeinsam mit 60µl Substratlösung in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert (schräg, Hand abstützen, gutes Licht!). Dabei sollen die Platen so oft als möglich mit dem Deckel gegen Kontamination geschützt werden. Zur besseren Kontrolle das Plattenlayout ausdrucken und dazulegen!

Leerwerte zur Kontrolle von Kontaminationen: 160µL Wasser, 160µl Ringerlösung, Substrat+ Wasser. Die Platten werden bei 25°C incubiert und sofort sowie alle 12 Stunden bei **542 nm** vermessen.

Substrate (0,5% Lsg): Asparagin, Isoleucin, Glycin, Glutamin, Glucose, Saccharose, Stärke, Methylcellulose, Harnstoff, BovinSerumAlbumin (BSA), sowie Kalium-, Calcium-, Magnesiumchlorid als Zusatz zu gluc, asn.

... der Versuch soll nach folgendem Layout (zum Pipettieren ausdrucken!) angesetzt werden!

| Layout der BIOLOG Platten |    |   |   |     |     |     |     |     |     |          |          |         |      |
|---------------------------|----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|----------|---------|------|
|                           |    |   |   |     |     |     |     |     |     |          |          |         |      |
| <b>Platte 1</b>           |    | 1 | 2 | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9        | 10       | 11      | 12   |
| asn                       | A  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | asn      | asn      | M+A.d.  | A.d. |
| ile                       | B  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | ile      | ile      | M+A.d.  | A.d. |
| gly                       | C  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gly      | gly      | M+A.d.  | A.d. |
| gln                       | D  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gln      | gln      | M+A.d.  | A.d. |
| gluc                      | E  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gluc     | gluc     | M+A.d.  | A.d. |
| succ                      | F  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | succ     | succ     | M+A.d.  | A.d. |
| starch                    | G  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | starch   | starch   | M+A.d.  | A.d. |
| me-cell                   | H  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | me-cell  | me-cell  | M+A.d.  | A.d. |
|                           |    |   |   |     |     |     |     |     |     |          |          |         |      |
| <b>Platte 2</b>           | II | 1 | 2 | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9        | 10       | 11      | 12   |
| urea                      | A  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | urea     | urea     | Z1+A.d. | A.d. |
| BSA                       | B  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | BSA      | BSA      | Z1+A.d. | A.d. |
| asn+CaCl                  | C  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | asn+CaC  | asn+CaC  | Z1+A.d. | A.d. |
| asn+KCl                   | D  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | asn+KCl  | asn+KCl  | Z1+A.d. | A.d. |
| asn+MgCl                  | E  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | asn+MgC  | asn+MgC  | Z1+A.d. | A.d. |
| gluc+CaCl                 | F  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gluc+CaC | gluc+CaC | Z1+A.d. | A.d. |
| gluc+KCl                  | G  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gluc+KCl | gluc+KCl | Z1+A.d. | A.d. |
| gluc+MgCl                 | H  | M | M | Z_1 | Z_1 | Z_2 | Z_2 | Z_3 | Z_3 | gluc+MgC | gluc+MgC | Z1+A.d. | A.d. |



## Dehydrogenaseaktivität (DHA) von Böden

*Prinzip:* Dehydrogenasen werden zu den Oxidoreduktasen gezählt und bewirken die Oxidation organischer Verbindungen durch Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen. Viele spezifische Dehydrogenasen übertragen den abgespaltenen Wasserstoff auf eines der beiden Co-Enzyme NAD oder NADP. Durch diese Co-Enzyme wird der Wasserstoff in die Atmungskette eingeschleust oder ist an reduktiven Vorgängen von Biosyntheseprozessen beteiligt. Die Dehydrogenaseaktivität eines Bodens resultiert daher aus der Aktivität verschiedener Dehydrogenasen, welche ein wesentlicher Bestandteil des Enzymsystems sämtlicher Mikroorganismen sind (Enzyme des Atmungsstoffwechsels, des Citratzyklus und des Stickstoffstoffwechsels). Somit dient die Dehydrogenaseaktivität als Indikator für biologische Redoxsysteme und kann als Maß für die Intensität mikrobieller Stoffumsetzungen im Boden angesehen werden (Tabatabai 1982).

Das Bodenmaterial wird mit einer Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC) versetzt und 16 Stunden bei 25°C bebrütet. Das freigesetzte Triphenylformazan (TPF) wird mit Aceton extrahiert (Rotfärbung) und photometrisch bei 546 nm gemessen.

*Durchführung:* 5,0 g naturfeuchter Boden werden in 4 Reagenzglasern eingewogen. Zu 3 Proben werden 5 ml Substratlösung 3.2 zugesetzt (Vollproben). Zur Leerprobe werden anstelle der Substratlösung 5 ml Puffer 3.1 pipettiert. Nach dem Mischen werden die Reagenzgläser mit Gummistopfen verschlossen und 16 Stunden bei 25°C inkubiert. Zur Extraktion des gebildeten Triphenylformazan werden die Proben mit 25 ml Aceton 3.3 versetzt und 2 Stunden im Dunkeln geschüttelt. Anschließend werden die Kolbeninhalte in einem halbdunklen Raum filtriert. Die Extinktion der Filtrate wird innerhalb 1 Stunde bei 546 nm photometrisch gegen den Blindwert gemessen.

Reagentien:

### 3.1 Trispuffer (0,1 M)

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan werden in 600 ml dest. Wasser gelöst und mit Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

3.2 Substratlösung 1 % TTC (w/v) in Puffer 3.1 gelöst (ist im Dunkeln ca. 1 Woche bei 4°C haltbar).

3.3 Aceton p.A.

3.4 Kalibrationslösung

#### 3.4.1 TPF-Stammlösung (10 mg TPF ml<sup>-1</sup>)

1,000 g Triphenylformazan (TPF) werden in 100 ml mit Aceton 3.3 gelöst.

3.4.2 TPF-Gebrauchslösung (0,1 mg TPF ml<sup>-1</sup>) 1 ml Stammlösung 3.4.1 wird mit Aceton 3.3 auf 100 ml verdünnt. Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden 0, 1, 2, 5 und 10 ml Lösung 3.4.2 in 5 Reagenzgläser pipettiert und mit Lösung 3.3 auf 30 ml ergänzt. Die Lösungen entsprechen 0, 100, 200, 500 und 1000 µg TPF im Ansatz.

## Berechnung der Ergebnisse

Aus der Kalibrationskurve werden die µg TPF im Ansatz ermittelt.

$$\frac{(VP - LP) \cdot 100}{5 \cdot \%TS} = \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ TS } 16 \text{ h}^{-1}$$

|                          |                                    |
|--------------------------|------------------------------------|
| VP :                     | Mittelwert der Vollproben (µg TPF) |
| LP :                     | Mittelwert der Leerproben (µg TPF) |
| 5 :                      | Bodeneinwaage (g)                  |
| 100 % TS <sup>-1</sup> : | Trockensubstanzfaktor              |

## Enzymatische Nitrat- und Nitritbestimmung

Das Meßprinzip ist völlig analog zur Nitratreduktasebestimmung. Der Boehringer Nitrat/Nitrit- Kit Nr. 1746081 beinhaltet die meßfertigen Reagenzien einschließlich lyophilisierter Nitratreduktase.

Gemessen wird (im Praktikum nur) die Summe aus Nitrit und Nitrat.

Als Kalibrationsreihe werden 6 Lösungen zwischen 0,05mg bis 5mg Natriumnitrat pro Liter verwendet (also 0,05\_0,10\_0,20\_0,30\_0,40\_0,50 mgL<sup>-1</sup>, je 20 ml). Zur Messung gelangen die 4% igen Heißwasser-extrakte nach folgender Arbeitsvorschrift des Beipackblattes. Allerdings werden

1. die Mischungen in Eppendorf- Probenröhrchen anstatt in Küvetten durchgeführt und
  2. nach der 15 minütigen Inkubation im Dunklen je 200µl in je 2 Mikrotiterplatten-Vertiefungen pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird mit allen Proben und den 2 Kalibrationsreihen beschickt, dann wird alles gleichzeitig im Mikroplattenphotometer vermessen.

### 5. Determination

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Wavelength <sup>1</sup> :    | 540 nm (Hg 546 nm)                     |
| Glass cuvette <sup>2</sup> : | 1.00 cm, semimicro                     |
| Temperature:                 | 20 – 25°C                              |
| Volume:                      | 1.27 ml                                |
| Measurement against blank    |  |
| Sample solution:             | 0.05 mg – 5.00 mg nitrite or nitrate/l |

<sup>1</sup> Carry out the measurement at 540 nm if using a spectrophotometer, at 546 nm if using a spectral line photometer with a mercury vapor lamp.

<sup>2</sup> Disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

### 6. Measurement

| Pipette into cuvettes:  | Blank nitrite | Sample nitrite | Blank nitrite + nitrate | Sample nitrite + nitrate |
|---|---------------|----------------|-------------------------|--------------------------|
| Sample  | –             | 0.500 ml       | –                       | 0.500 ml                 |
| Redist. water   | 0.770 ml      | 0.270 ml       | 0.500 ml                | –                        |
| Reaction mixture 2  | –             | –              | 0.250 ml                | 0.250 ml                 |
| Solution 3*   | –             | –              | 0.020 ml                | 0.020 ml                 |
| Mix**, incubate for 30 min at room temperature, read off A <sub>1</sub> and add                 |               |                |                         |                          |
| Color reagent I   | 0.250 ml      | 0.250 ml       | 0.250 ml                | 0.250 ml                 |
| Color reagent II  | 0.250 ml      | 0.250 ml       | 0.250 ml                | 0.250 ml                 |
| Mix, allow to stand in the dark at room temperature for 10 to 15 min, read off A <sub>2</sub> . |               |                |                         |                          |

NADPH in Phosphatpuffer

Nitratreduktase

Sulfanilsäure

α-Naphtylethylendiamid

\* Before adding the sample solution rinse the pipette supplied with the test or the tip of the piston pipette with the sample.

\*\*e.g. using a spatula or by swirling after sealing, e.g. with Parafilm\*

### 7. Calculation

#### Graphical evaluation

The result is calculated from the calibration curves constructed using the standard solutions. Plot the change in absorbance obtained for the sodium nitrite and potassium nitrate standard solutions on the y-axis against the corresponding nitrite or nitrate concentrations in mg/l on the x-axis.

$$\Delta A_{\text{nitrite}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrite}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blank nitrite}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrite + nitrate}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrite + nitrate}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blank nitrite + nitrate}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrate}} = \Delta A_{\text{nitrite + nitrate}} - \Delta A_{\text{nitrite}}$$