

Ammonium/Ureaseaktivitätsbestimmung

Prinzip: Ammonium wird aus KCl-Extrakten mit einer modifizierten Berthelot-Reaktion bestimmt. Die Bestimmung basiert auf der Reaktion von Natrium-Salicylat mit 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 Cl – allgemeines Labor (2. Lade)

NaOH⁴—allg. Labor

KCl— Bodenkultur

Na Salicylat – Bodenkultur

Dichlorisocyanursäure.—Bodenkultur

Harnstoff — Bodenkultur

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 (Bodenkultur 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_4Cl / 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 Eichlsg
 900µl A. dest.
 500µl Mischlsg.
 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 Photometer:

*Microtiterplatten füllen : pro Probe 250µl Boden nicht berühren

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 : Probennamen eingeben Konzentrationen der Kalibrationspunkte eingeben
- * Read plate : Fenster um, Wellenlängenbereich auszusuchen
- * Speichern

Berechnung:

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

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)

Ultrarat-Absorptions-Spektrometer URAS (Bodenatmung)

Prinzip: Heterogene Gase (Gase, die aus unterschiedlichen Atomen bestehen) absorbieren infrarote Strahlung, wobei die absorbierte Energie im betroffenen Molekül Schwingungen in allen Raumrichtungen bewirkt. Für die Summe der betroffenen Moleküle bedeutet dies eine Temperaturerhöhung. In einem geschlossenen Gefäß wird dadurch eine Druckzunahme bewirkt (Gasgesetz von Gay-Lussac). Beim URAS (engl. IRGA, infra-red-gas-analyser) werden ein CO₂- freies Referenzgas und zu messende Gase gleichzeitig einer bestimmten Intensität Infrarotstrahlung ausgesetzt. Je nach Konzentration der Gase wird unterschiedlich viel IR absorbiert. Die nicht absorbierten Rest- IR Strahlungen gelangen in einen Detektor. Dieser besteht aus einer abgeschlossenen, CO₂- gefüllten Kammer, welche durch eine Membran zweigeteilt ist. Durch diese Konstruktion treten Druckunterschiede auf, welche elektronisch ausgewertet und in ppm CO₂ angezeigt werden. Auf diese Weise wird die CO₂ Entwicklung in Böden als sg. Bodenatmung erfaßt. Diese kann als Maß für die Belebtheit von Böden herangezogen werden, da sie im Verhältnis zur atmenden Biomasse (Anderson & Domsch, 1978) steht. Wird dem Boden ein Substrat zugesetzt (z.B. Glucose), kann die derart zusätzlich stimulierte CO₂-Freisetzung des Bodens als sg. Substrat stimulierte Bodenatmung, die mit der maximal möglichen Aktivität lebender mikrobieller Biomasse zusammenhängt (Substrat induzierte Respiration- SIR) gemessen werden.

Durchführung: 50 g naturfeuchter, auf 2 mm gesiebter Boden wird im Tiefkühlbeutel (Becherglas) eingewogen, mit 0.2 % FM (0,1 g) Glucose versetzt (separat einwiegen!) und gut gemischt (im Plastiksack durch Aufblasen des Beutels mit anschließendem Schütteln). Dieses Gemisch wird in Küvetten gefüllt, deren untere Öffnung mit einer Schicht Zellstoff bedeckt ist. Wird nur die Bodenatmung bestimmt, unterbleibt die Glucosezugabe. Die Küvetten werden nun bei einer Raumtemperatur von 25°C kontinuierlich mit CO₂-freier Luft gespült (etwa 6 L / h , "offener Kreislauf") und die CO₂-Konzentration alle 30 min mit dem URAS gemessen. Zur Auswertung gelangt der jeweils niedrigste (nach etwa 6 h) erreichte Wert.

Berechnung der Ergebnisse: Die Meßwerte werden in mg CO₂ / h / 100 g Boden FM oder TM nach folgender Formel umgerechnet:

$$\begin{array}{l}
 \text{mg/L} / 10e6 * \text{flow} * 10e3 \\
 (\text{c[ppM]} / 10e6 * \text{flow[L/h]} * 10e3 / \text{weight} * 10e3 / * 1,96
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 \text{mL CO}_2 \text{ in der Probe pro Stunde} \\
 \text{mg CO}_2 / \text{kg Boden}
 \end{array}$$

$$x = \frac{c * f * 1.000 * 1.000}{1.000.000 * w} * 1,96 \qquad x = \frac{f * c}{w} * 1,96$$

x : mL CO₂ /kg FW * h
 f : air flow rate (L / h)
 c : CO₂ - concentration (mg/L)
 w : weight of the soil sample (g)

Es ergibt sich die Möglichkeit , in einem Koordinatensystem auf der X-Achse die Zeit und auf der Y-Achse die CO₂- Konzentration aufzutragen und die so entstehenden Kurven hinsichtlich ihrer Steigung zu vergleichen.