

## Physiologisch-chemische Übungen II: Kohlenstoffhaushalt von Pflanzen und Boden

Nov 11,12, sowie 18-22

Der Inhalt:

**Der erste Teil** des Praktikums dient der analytischen Erfassung der **Hauptnährstoffe der Pflanzen und einer Einschätzung des Recycling dieser Nährstoffe** im Boden, der sogenannten Remineralisation durch Destruenten und deren Enzyme. Die Hauptnährstoffe welche in diesem Praktikum in Pflanzensproß und Boden analytisch erfasst werden, sind die Kationen Ammonium, Calcium, Kalium, Magnesium, und Natrium. Als Beispiele für Nährstoffrecycling im Boden werden Phosphataseaktivität, also die Abspaltung von Phosphat aus organischem Material, sowie Ureaseaktivität, also die Zerlegung von Harnstoff in Ammonium, vorgestellt.

Um diese Untersuchungen vornehmen zu können, ist zunächst eine **Probenvorbereitung** notwendig. Die Pflanzen und Böden werden getrocknet und fein gemahlen. Im Praktikum wird eine definierte Menge des Pulvers mit heißem Wasser extrahiert und durch sogenannten Ionentausch mit Polystyrolharzen, welche geladene funktionelle Gruppen tragen, in neutrale, kationische und anionische Bestandteile zerlegt.

**Der zweite Teil** des Praktikums soll unterschiedliche **Strategien von Pflanzen zur Verteilung assimilierten Kohlenstoffs** in ihren Organen und in ihrem Lebensraum demonstrieren. Maniok und Zuckerrohr sind zwei Kulturpflanzen mit stark unterschiedlichen Anforderungen: Zuckerrohr kann jahrzehntelang an der selben Stelle in Monokultur gezogen werden, während Maniok einen Fruchtwechsel nach zwei bis drei Jahren erfordert. Die unterschiedliche Verteilung von Kohlenstoff in Blatt, Wurzel und Boden, welche diesem Verhalten zu Grunde liegt, wird mittels **Analyse von Zuckern und dem C/N Verhältnis in Pflanze und Boden** zu zeigen sein.

Die **Reaktion der Bodenorganismen** darauf wird am Beispiel der Bodenatmung/SIR und der Dehydrogenaseaktivität gezeigt. Inwieweit die gefundenen labilen Substrate im Boden metabolisiert werden, wird mit dem BIOLOG Test gezeigt. Den Abschluß bildet die **Gegenüberstellung der Meßergebnisse**, wobei ökologische und physiologische Besonderheiten der Pflanzen und Böden veranschaulicht werden sollen.

### Organisation

- |    |         |  |             |
|----|---------|--|-------------|
| 1. | Kurstag | MO:<br><b>Biometrie, Probenvorbereitung</b> Trocknen, Mahlen (auch Wurzel)<br>Ansatz der Extraktion der Böden<br>AAS Standards<br>Inkubation BIOLOG  | 8:30-17:00  |
| 2. | Kurstag | DI:<br><b>Extraktion</b> der Pflanzen<br>Ionentausch der Böden<br>Vorbereitung GC Zucker,<br>Kationenanalyse, pH-Wert Boden, Gesamtkationengehalt  | 8:30-17:00  |
| 3. | Kurstag | MO: Ammoniumgehalt/ <b>Ureaseaktivität</b> messen<br>Einwaage <b>Phosphatase</b> , vorbereiten d.Reagenzien<br>Bodentrockengewichte wiegen,<br>Verdünnung Anionen, Kalibrationsreihe Anionen | 8:30-17:00  |
| 4. | Kurstag | DI: Phosphatase, Demo Anionenchromatographie<br>Berechnungen, <b>GC Zucker</b> ,   | 8:30-17:00  |
| 5. | Kurstag | MI:<br>Einwaage C/N (auch Wurzel), <b>Bodenatmung</b><br><b>Glucose/Sacharose enzymatisch</b> ,<br>Ansetzen: Dehydrogenaseaktivität der Böden  | 8:30-17:00  |
| 6. | Kurstag | DO:<br>Bodenbioaktivität: Dehydrogenase<br>Grundumsatz: <b>SIR, BIOLOG</b>   | 8:30-17:00  |
| 7. | Kurstag | FR:<br><b>AUSWERTUNG</b>   | 13:00-17:00 |

## Meßparameter und Methodik

Meßparameter	Extrakt/Material	Methodik/Analysegerät
<i>Pflanzen</i>		
K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	HWE <sup>1</sup> , SRE <sup>2</sup>	Atomabsorption
Gesamtkationengehalt	HWE	Kationentausch, pH-Titration
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HWE	Ionenchromatographie
Organische Säuren	HWE	Ionenchromatographie
Gesamtstickstoff (C/N)	TM-Pulver <sup>3</sup>	Elementaranalysator
<i>Boden</i>		
pH-Wert	WE <sup>5</sup>	pH-Messung
K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	SRE <sup>2</sup>	Atomabsorption
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	WE	Ionenchromatographie
Gesamtstickstoff (C/N)	TM-Pulver	Elementaranalysator
Ammonium	KCIE <sup>7</sup>	Photometrie
Ureaseaktivität	FMat, KCIE	Photometrie
Phosphataseaktivität	FMat	Photometrie

*Abkürzungen:* <sup>1</sup>, Heißwasser-Extrakt; <sup>2</sup>, Säure-Extrakt; <sup>3</sup>, Gemahlene Trockenmaterial; <sup>4</sup>, Frischmaterial; <sup>5</sup>, Wasser-Extrakt; <sup>7</sup>, Kaliumchlorid-Extrakt

## Probenvorbereitung der Pflanzen

### Trocknungsmethoden

#### *Trockenschrank*

Frisches Pflanzenmaterial wird in Papiersäcke eingewogen und im (vorgeheizten) Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Diese Methode ist vor allem für Mineralstoffanalysen geeignet. Sollen darüberhinaus 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.

#### *Gefriertrocknung*

Frisches Pflanzenmaterial wird zunächst in gut verschlossenen Kunstsäcken eingefroren. Dies kann entweder in einer Tiefkühltruhe (-20 bis -30 °C) oder im Freiland mit Trockeneis (CO<sub>2</sub>, -70 °C) vorgenommen werden. Danach wird das tiefgefrorene Pflanzenmaterial in vorgewogene Papiersäcke umgefüllt und in die vorgekühlte Gefriertrocknung eingebracht, wobei darauf zu achten ist, daß das Pflanzenmaterial nicht auftauen kann. Der Wassergehalt der gefriergetrockneten Proben liegt immer einige Prozent über dem von Proben die im Trockenschrank getrocknet wurden. Achtung: Viele Enzyme werden durch Gefriertrocknung nicht denaturiert!

#### *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.

## 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 Probennahme kommen kann.

## Herstellung von Extrakten aus Pflanzenpulvern

### *Heißwasserextrakte*

Getrocknetes (Mikrowelle oder Trockenschrank) und gemahlenes Pflanzenmaterial wird genau in Meßkolben eingewogen (Endkonzentration ca. 4%, w/v) und mit A. dest. übergossen. Die Meßkolben werden etwa bis zur Hälfte gefüllt und danach 30 min im kochenden Wasserbad unter häufigem Schütteln inkubiert. Nach dem Abkühlen wird bis zur Marke aufgefüllt, gut geschüttelt, abzentrifugiert und filtriert (aschfreie Filter für feine Niederschläge). Alternativ können Heißwasserextrakte auch in einem 2 mL Eppendorf Reaktionsröhrchen hergestellt werden. Dazu werden 40 mg Pulver 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 gemahlenes Pflanzenmaterial wird genau in Meßkolben bzw. 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. Wurden Meßkolben verwendet, wird nach dem Abkühlen bis zur Marke aufgefüllt, filtriert (aschfreie Filter für feine Niederschläge) und der Extrakt in Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## 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 (Anionen) wird ein weniger konzentrierter Extrakt hergestellt (0,1 g auf 1 mL), abzentrifugiert und danach filtriert. Der Wasserextrakt wird eingefroren aufbewahrt.

### *Säure-(HCL-Extrakt)*

Siehe Säureextrakt von Pflanzenpulver.

## Analysenmethoden

### Elektrochemische Methoden

#### *Bestimmung von pH-Wert und Gesamtkationengehalt*

*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. Bei der Bestimmung des *Gesamtkationengehaltes* werden alle Kationen eines Extraktes mit einem Ionentauscherharz durch Protonen ersetzt und diese danach durch Titration mit Lauge bestimmt.

*Bestimmung des Gesamtkationengehaltes:* 1 mL Heißwasserextrakt wird auf einen sorgfältig regenerierten und neutral-gewaschenen Kationenaustauscher (DOWEX 50W x 8, 50 - 100 mesh,  $\text{H}^+$ -Form) aufgebracht und mit 3 x 2 mL Aqu. dest. nachgespült. Der Durchlauf wird in einem 10 mL Meßkolben aufgefangen und bis zur Marke aufgefüllt. Aliquote Mengen davon werden einer automatischen Titration (pH-Elektrode) mit 0.01 N ( $\text{CO}_2$ -freier) NaOH unterzogen. Zur Eichung werden 5 mL 0.01 N HCl (z.B. "Titrisol") eingesetzt.

### 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 genutzt werden können. Die stark unterschiedliche Meßempfindlichkeit (über mehrere 10er-Potenzen) bei den einzelnen Spektrallinien hängt von deren Strahlungsintensität 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!

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

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 (mA)	Linie (nm)	Spaltbreite (nm)	Bereich (mg L <sup>-1</sup> )	Lampe
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

## Anionenchromatographie

*Allgemeines:* Ionenchromatographie ist eine flüchtigchromatographische Methode bei der die zu analysierenden Substanzen (Analyten) an einem Ionenaustauscherharz oder -silikagel aufgetrennt werden. Die Säule wird von einer mobilen Phase durchspült, die für eine Elution der Analyten von der stationären Phase sorgt. Mit Hilfe der Anionenchromatographie lassen sich anorganische Anionen (etwa Chlorid, Sulfat, etc.) und organische Säuren (z.B. Äpfel- oder Zitronensäure) bestimmen, wobei zur Detektion ein Leitfähigkeits-Detektor verwendet wird. Leitfähigkeitsdetektoren erfassen Änderungen in der elektrischen Leitfähigkeit des Eluenten. Ein Problem ist dabei die hohe Eigenleitfähigkeit des Eluenten, der ja selbst ein Elektrolyt sein muß. Zur Unterdrückung der Eigenleitfähigkeit des Eluenten wird vor den Detektor ein „Suppressor“ geschaltet, der auf chemischem Wege die Leitfähigkeit des Eluenten (hier eine verdünnte Natronlauge) herabsetzt.

#### Durchführung:

Säule:	Anionentauscher IonPac AS11 (starker Anionenaustauscher auf Latex-Harz- Basis), 10 µm, 25 cm x 4 mm Innendurchmesser.
Vorsäule:	IonPac AS11-guard, 13 µm, 5 cm x 4 mm.
Eluent:	Ternärer Gradient: 5.0 mM NaOH, 100 mM NaOH, A. dest. 0.5 mM NaOH auf 37.5 mM NaOH in 16 min.
Flußrate:	2mL min <sup>-1</sup> bei 80 ca. bar
Temperatur:	Konstant 35 °C
Injektor:	6-Wege-Ventil mit einem Einspritzvolumen von 10 µL
Detektor:	Leitfähigkeitsdetektor nach chemischer Supression (Autosuppressionsmodus)

Der kationentauschte Heißwasserextrakt (Pflanzen) beziehungsweise der Wasserextrakt (Böden) wird nach der notwendigen Verdünnung (1:40, bei Halophyten 1:100, je 1 ml) direkt eingespritzt. Die Auswertung erfolgt über Kalibrierung mit Reinsubstanzen bekannter Konzentration (Stammlösung 400mg/L, --> 40,20,10,5,2.5 mg/L).

## Phosphataseaktivitätsbestimmung

*Prinzip:* Bodenproben werden mit einer Phenylphosphatdinatriumsalz-Lösung versetzt und 3 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Das abgespaltene Phenol wird mit 2,6 Dibromchinon-Chlorimid angefärbt und photometrisch bei 605 nm vermessen.

### Lösungen:

1 ) Substratlösung: bei 4°C einige Tage haltbar (500ml reichen für einen Probendurchgang)  
13,5g Phenylphosphat Dinatriumsalz mit A. dest in 500ml Meßkolben lösen

2 ) Boratpuffer: im Bodenlabor im Abzug  
12,4g Borsäure in 100ml 1M NaOH (= 40g NaOH in 1000ml Meßkolben mit A.d füllen)  
+ 600ml A. dest  
pH Wert mit Natronlauge auf pH 10 einstellen  
mit A. dest auf 1000ml auffüllen

pH Meter: einschalten  
zuerst mit Standard pH 7 kalibrieren  
dann mit Standard pH 4 kalibrieren; Signal muß mit Standard übereinstimmen

3 ) Farbstoffreagenz: muß jeden Tag frisch hergestellt werden!!  
100mg 2,6 Dibromchinon Chlorimid mit Ethanol (60% v/v) auf 50ml lösen  
löst sich schlecht, daher früh herstellen und nicht ganz aufgefüllt ins Ultraschallbad

4a ) Stammlösung: im Kühlschrank des Mahlraumes, hält länger = 1mg/ml  
1,00g Phenol in 1000ml Meßkolben mit A. dest lösen

4b ) Gebrauchslösung: täglich frisch herstellen = 10µg/ml  
10ml Stammlsg. in 1000ml Meßkolben mit A.dest auffüllen

\* Phenylphosphat und Dibromchinon werden im Kühlschrank aufbewahrt

### Probenansatz:

3 Vollproben zu je : 2g Boden	1 Blindprobe zu je : 2 g Boden
4 ml A.dest	6 ml A.dest
2 ml Substrat	

- \* Kolben mit Stopfen verschließen
- \* gut schütteln
- \* 3 Stunden bei 37 °C inkubieren

- \* alle Kolben: + 14 ml A. dest. ad 20ml
- \* gut schütteln
- \* durch kleiner geschnittene Filter in 50ml Weithalskolben filtrieren
- \* 5 min bei 10000 Umdrehungen zentrifugieren

**Farbreaktion:****Proben:**

In je 50ml Erlenmayerkolben : 500µl Boratpuffer (Multipette)  
 200µl **Filtrat**  
 100µl Farbstoffreagenz  
 schütteln  
 2,5 ml A. dest ( Multipette)

**Kalibrationsgerade:** 2 mal in 10ml Meßkolben herstellen

Phenol	Boratpuffer	Phenolgebrauchslsg (1g in 1L)	Farbreagenz	A. dest
0µg	0,5ml	0	0,1ml	2,5ml
50µg	0,5ml	0,5ml	0,1ml	2,5ml
100µg	0,5ml	1ml	0,1ml	2,5ml
150µg	0,5ml	1,5ml	0,1ml	2,5ml
200µg	0,5ml	2ml	0,1ml	2,5ml

**Proben und Kalibrationslösungen:**

- \* schütteln
- \* 30min Farbe entwickeln lassen
- \* mit 6,7 ml A.dest auf 10 ml auffüllen 10ml Kolben mit Eichlsg auch bis zur Marke auffüllen
- \* am Photometer bei 605 nm vermessen

**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 : Probenamen eingeben Konzentrationen der Eichpunkte eingeben
- \* Read plate : Fenster um Wellenlängenbereich auszusuchen

**Berechnung:**

$$\frac{(VP- BP)*20*100}{0,2*2* \% TS*3h} = \mu\text{g Phenol gTS}^{-1}\text{h}^{-1}$$

VP Mittelwert Extinktionen der Vollprobe  
 BP Mittelwert Extinktionen der Blindprobe

$y = kx + d$  Eichgerade

% TS Trockensubstanzfaktor (TS in % FG)

:0,2 Filtrat (Zentrifugat), : 2 (EW), :3 (Ink.dauer in h) · 20(mL im 1.Kolben)

## 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 Natrium-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— 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 Schmalhals-erlenmeyerkolben 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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  / 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 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 Analyser Paßwort Analyze
- \* X read Data : Probenamen 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)

**Bodenextraktion für Zucker und Aminosäuren- Checkliste**

ca. 20 g Boden in 100 mL Schmalhals-Erlenmeyerkolben einwiegen



+ 50 mL 60 % Aceton (v/v) → mit Korkstopfen verschließen



15 h bei 250 rpm auf Horizontalschüttler



Abnutschen: Filter MN 640W → 3 mal mit 10 mL 60 % Aceton nachwaschen



in 250 mL Rotavaporkolben überführen (3 mal mit A.m. nachwaschen)



zur Trockene einengen (bei 200 mbar beginnen)



in 2 mL A.m. aufnehmen → in 2 1,7 mL Eppis (safe-twist) einfrieren

**Zucker: Ionentausch und Vorbereitung für Kapillar- GC****Ionentauscher konditionieren**

Kationentauscherharz (KT) Dowex 50Wx8 (50-100 mesh, H<sup>+</sup> Form) in 250ml Erlenmeyerkolben geben und 30 min bei 60° mit 1N HCl im Wasserbad inkubieren, bis zur Neutralität mit A.dest waschen

Anionentauscherharz (AT) Dowex 1x8 (50-100 mesh Cl<sup>-</sup> Form) in 250ml Erlenmeyerkolben geben und 30 min bei 60° mit 1N HCl im Wasserbad inkubieren, bis zur Neutralität mit A.dest waschen, dann 30 min mit 1 N NaOH inkubieren, neutral waschen und 30 min mit 1 N Formiat inkubieren, neutral waschen.

AT und KT am Suppelcoblock in großem Ionentauschersäulchen trockensaugen (min 5 min) und im Verhältnis AT:KT = 3:2 mischen (Waage). Gemischen Ionentauscher in großem Erli in Wasser aufbewahren.

**Batch- Ionentauschen**

Ca 250 mg mit gelbem Capillettor (abgeschnittene Spitze) in 2ml Eppi pipettieren (400 µl auf Cappillettor einstellen), 400 µl Probe und 40 µl 0,4% Pentaerythrit dazugeben. 2 h bei 700 rpm im Eppi-Schüttler schütteln.

In neuer Beckmann zentrifugieren (3 min, 15.000 rpm) und ein Aliquot aus den ionengetauschten Extrakten in GC-Vials pipettieren (100 - 200 µl).

GC Vials im Speed-Vac trocknen und im Exsikkator aufbewahren. Kurz vor dem silylieren noch mal im Speed-Vac scharf trocknen.

**Derivatisieren/Silylieren**

Trockenes Pyridin mit 0,02% Phenyl-β-d-glucopyranosid versetzen.

TCMS (1 Teil) und BSTFA (10 Teile) mit Hamiltonspritzen in ein GC Vial geben, mischen und mit Kappe verschließen.

200µl Pyridin + 0,02% Phenyl-b-d-glucopyranosid mit Pipette in GC Vial geben, sofort Kappe aufsetzen.

BSTFA/TMCS mit Hamiltonspritze (250µl) aus dem verschlossenen Silylierungs-Vial aufsaugen und 50µl am Rand des Probenvials einlaufen lassen. Kappe festkrempen.

1h bei 75°C im Heizblock inkubieren.

## Gaschromatographie

*Allgemeines:* GLC (Gas Liquid Chromatography) ist eine chromatographische Methode, bei der eine Flüssigkeit als stationäre Phase und ein inertes Gas als mobile Phase fungiert. Als stationäre Phasen kommen hauptsächlich hochsiedende aliphatische oder aromatische Carbonsäuren sowie Silikonöle in Frage. Diese Flüssigkeiten werden auf ein Trägermaterial mit großer Oberfläche aufgebracht und in Säulen mit etwa 2 mm Durchmesser gepackt (gepackte Säulen). In der Kapillar-Gaschromatographie hingegen wird die stationäre Phase ohne Trägermaterial an die Wand einer Glaskapillare (0.25 - 0.53 mm ID) chemisch gebunden oder als Film aufgebracht. Die meisten Trennflüssigkeiten sind bei höheren Temperaturen nur unter Ausschluß von Sauerstoff stabil. Daher müssen die Säulen bei Temperaturen über 50° C ständig mit einem inerten Gas durchspült werden. Die mobile Phase nimmt am Trennprozeß selbst nicht teil, sondern sorgt nur für den Transport der Probemoleküle durch die Säule. Das Probegemisch wird in einem Einspritzblock verdampft, und die einzelnen Komponenten werden nach ihrem Verteilungskoeffizient in der stationären Phase aufgetrennt. Die Auftrennung der Substanzen ist einerseits von der Polarität der stationären Phase und von der Geschwindigkeit des Trägergasdurchflusses, und andererseits von der Säulen-Temperatur abhängig. Häufig wird die Temperatur während des Trennprozesses gesteigert (Temperaturprogramm), wodurch die Auftrennung von Substanzen mit stark unterschiedlichen Elutionstemperaturen in relativ kurzer Zeit möglich wird. Der gebräuchlichste Detektor in der GC ist der sogenannte Flammen-Ionisations-Detektor (FID), der Spannungsänderungen, die durch die Ionisation verbrennender organischer Moleküle ausgelöst werden, registriert.

Zucker und organische Substanzen lassen sich nicht verdampfen, sondern zerfallen bei höheren Temperaturen. Sie müssen daher vor dem Gaschromatographieren chemisch dahingehend verändert werden, daß sie ausreichend flüchtig und bei höheren Temperaturen stabil sind. Am häufigsten werden Trimethylsilyl-Ether und -Ester (Reaktion mit -OH und -COOH - Gruppen) dieser Substanzen hergestellt. Da diese TMS-Derivate von organischen Säuren und Zuckern allerdings beim Kontakt mit Wasser leicht zerfallen, müssen alle Proben vor der Derivatisierung in einem wasserfreien Lösungsmittel aufgenommen werden.

### *GLC der niedermolekularen Kohlenhydrate und Cyclite*

*Säule:* Kapillarsäule, 45 m x 0.32 mm Innendurchmesser.

*Stationäre Phase:* HP1, 0.5 µm.

*Temperaturprogramm:* 85°, 1 min isotherm; 85-220°, mit einer Heizrate von 30°/min; 220°, 10 min isotherm; 220-250°, 3°/min; 250-315°, 5°/min; 315°, 5 min isotherm.

*Trägergas:* He, 140 kPa bei 85°; konstanter Fluß.

*Brenngase:* H<sub>2</sub> und Preßluft.

*Injektor:* Temperaturprogrammiert, 3° über Säule.

*Detektor:* Flammenionisationsdetektor; 330° C.

*Derivatisierung:* Die trockenen Proben werden in 200 µL wasserfreiem Pyridin, das 0.05% Phenyl-β-D-Glucopyranosid als interner Standard enthält, gelöst (siehe Probenvorbereitung). Danach wird mit 50 µL BSTFA in 5% TMCS 30 Minuten bei 75° C derivatisiert. Die derart silylierten Ansätze sind für rund 12 Stunden im Kühlschrank haltbar.

*Durchführung:* 0.5 µL der derivatisierten Ansätze werden in den Gaschromatographen injiziert. Die quantitative Auswertung erfolgt über Kalibrierungen mit Reinsubstanzen bekannter Konzentration, unter Bezug auf einen internem Standard.

### 2.6.1. 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 des Enzyms Hexokinase in Gegenwart von ATP (und unter Bildung von ADP) zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Das so entstandene G6P wird dann durch  $\text{NADP}^+$  durch das Enzym G6P-Dehydrogenase zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert, wobei  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Die umgesetzte Menge an  $\text{NADP}^+$  ist dabei der Menge an Glucose äquivalent. Der Anstieg der Extinktion wird daher bei 340 nm vermessen. Nach Abschluß dieser Reaktion (also wenn die gesamte Glucose umgesetzt wurde) 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.

*Assay:* In Glasküvetten, bei 40°C thermostatiert.

	Glucose-Proben		Saccharose-Proben	
	<i>Probe</i>	<i>Leerwert</i>	<i>Probe</i>	<i>Leerwert</i>
Citrat-Puffer, pH 4.6 / $\beta$ -Fructosidase	_____	_____	0.20 mL	0.20 mL
Probe	0.10 mL	_____	0.10 mL	_____
Aqu. glasdest.	_____	0.10 mL	_____	0.10 mL
Mischen und Probe 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.				
Triethanolamin-Puffer, pH 7.6	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL
(inkl. ATP, NADP, $\text{MgSO}_4$ )				
Aqu. glasdest.	2.00 mL	2.00 mL	1.50 mL	1.50 mL
Mischen und nach 5 min die Extinktion bei 340 nm festhalten.				
Hexokinase / G6P-Dehydrogenase	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL

Mischen und Extinktionsanstieg bis zur Konstanz verfolgen und Extinktion festhalten.

Die Berechnung erfolgt über den molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH: eine Extinktionsdifferenz von 1.000 entspricht  $0.1608 \times 10^{-6}$  mol pro mL. Die Messung einer Saccharose-Standardlösung dient nur zur Überprüfung der Arbeitstechnik.

#### Reagenzien:

Citrat-Puffer	50 mM, pH 4.6 (inkl. $\beta$ -Fructosidase 72 U/mL)
Triethanolamin-Puffer	200 mM, pH 7.6, 10 mM $\text{MgSO}_4$ (inkl. 2.4 mg/mL NADP, 5.8 mg/mL ATP)
Enzymsuspension	290 U/mL Hexokinase und 145 U/mL G6P-DH
Saccharose-Standardlösung	500 mg/L A.dest. (unverdünnt einsetzen)

### Ultrarot-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 CO<sub>2</sub>- 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, CO<sub>2</sub>- gefüllten Kammer, welche durch eine Membran zweigeteilt ist. Durch diese Konstruktion treten Druckunterschiede auf, welche elektronisch ausgewertet und in ppm CO<sub>2</sub> angezeigt werden. Auf diese Weise wird die CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>-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 CO<sub>2</sub>-freier Luft gespült (etwa 6 L / h , "offener Kreislauf") und die CO<sub>2</sub>-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 CO<sub>2</sub> / h / 100 g Boden FM oder TM nach folgender Formel umgerechnet:

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

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

x : mL CO<sub>2</sub> /kg FW \* h  
 f : air flow rate ( L / h )  
 c : CO<sub>2</sub> - 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 CO<sub>2</sub>- Konzentration aufzutragen und die so entstehenden Kurven hinsichtlich ihrer Steigung zu vergleichen.

## 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 Reagenzgläsern 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

## 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 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 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 Mikrotiterplatte pipettiert.

Leerwerte!

Die Platten werden bei 25°C incubiert und sofort sowie alle 12 Stunden bei 542 nm vermessen.

Substrate (0,5% Lsg): Asparagin, Isoleucin, Glycin, Glucose, Saccharose, Stärke, Methylcellulose, Harnstoff, BovinSerumAlbumin

Layout der BIOLOG Platten													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I													
A	asp	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
B	ile	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
C	gly	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
D	glu	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
E	gluc	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
F	succ	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
G	starch	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
H	me-cell	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
II		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	urea	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
B	BSA	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
C	asp+NO <sub>3</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
D	asp+NH <sub>4</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
E	asp+PO <sub>4</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
F	gluc+NO <sub>3</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
G	gluc+NH <sub>4</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.
H	gluc+PO <sub>4</sub>	M	M	Z	Z	M+N	M+N	Z+N	Z+N	A.d. + S	A.d. + S	Ringer	A.d.

Die Auswertung erfolgt anhand des Ansprechpunktes (initial point of response, threshold), der Steigung im linearen Bereich und des erreichten Maxima.