

Chemisch Physiologische Übungen: Wurzelraumökologie

5.- 9. Mai 2003

Der Inhalt:

In diesem Praktikum sollen in erster Linie Kenntnisse über bodenbiologische Schlüsselprozesse in Abhängigkeit vom Pflanzenbewuchs vermittelt werden. Die Grundlegenden Strategien der **Speicherung** in Speicherorganen sowie die aktive Abgabe von Substanz (**Wurzelexudation**) in den Boden zur Förderung der Mikroorganismen und deren **Remineralisationstätigkeit** werden an zwei kontrastierenden Pflanzenarten (Maniok und Zuckerrohr) in Mono - und in Mischkultur gezeigt.

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 Pflanzenorgane werden auf ihren **Gehalt an Kohlenhydraten und Mineralstoffen** sowie Gesamtkohlenstoff und-stickstoff mit den Laborstandardmethoden Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert.

Anhand von zentralen **bodenphysikalischen und -biologischen Messungen** (pH-Wert, Wasserhaltekapazität, Bodenatmung/SIR) werden die im Boden auftretenden Änderungen nachvollzogen. 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, sind zunächst **Biometrie** und **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 und kationische Bestandteile zerlegt.

Inwieweit die gefundenen labilen Substrate im Boden metabolisiert werden, wird mit dem BIOLOG Substratnutzungstest gezeigt.

Den Abschluß bildet die **Gegenüberstellung der Meßergebnisse**, wobei ökologische und physiologische Besonderheiten der Pflanzen und Böden veranschaulicht werden sollen.

Organisation

1.	Kurstag	MO: Biometrie, Probenvorbereitung Trocknen, Mahlen (auch Wurzel) Ansatz der Extraktion der Böden (Zucker) AAS Standards Inkubation BIOLOG (Messung alle 12h)	9:00-17:00
2.	Kurstag	DI: Extraktion der Pflanzen und Böden (HWE, SRE) Ionentausch der Bodenextrakte für Zuckeranalyse Vorbereitung GC Zucker, Kationenanalyse (K, Mg), pH-Wert/WHK Boden	8:30--17:00
3.	Kurstag	MI: Ammoniumgehalt / Ureaseaktivität messen Einwaage C/N (auch Wurzel) GC Zucker Einwaage Phosphatase , vorbereiten d.Reagenzien Bodentrockengewichte wiegen,	8:30-17:00
4.	Kurstag	DO: Phosphatase, Berechnungen, Auswertung GC Zucker , Grundumsatz: SIR ,	8:30-17:00
5.	Kurstag	FR: Bodenatmung AUSWERTUNG BIOLOG	8:30-17:00

Meßparameter und Methodik

Meßparameter	Extrakt/Material	Methodik/Analysegerät
<i>Pflanzen</i>		
K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺	SRE ²	Atomabsorption
Zucker	HWE ¹	GC
Gesamtstickstoff (C/N)	TM-Pulver ³	Elementaranalysator
<i>Boden</i>		
pH-Wert	WE ⁵	pH-Messung
Wasserhaltekapazität (WHK)		
K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	SRE ²	Atomabsorption
Gesamtstickstoff (C/N)	TM-Pulver	Elementaranalysator
Ammonium	KClE ⁶	Photometrie
Ureaseaktivität	FMat ⁴ , KClE	Photometrie
Phosphataseaktivität	FMat	Photometrie
Bodenatmung/SIR		
BIOLOG	RLE ⁸	
<i>Abkürzungen:</i> ¹ Heißwasser-Extrakt; ² Säure-Extrakt; ³ Gemahlenes Trockenmaterial; ⁴ Frischmaterial; ⁵ Wasser-Extrakt; ⁶ Kaliumchlorid-Extrakt, ⁷ Ringerlösungs-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.

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 mit einer Kaffeemühle).

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 eingewogen (Endkonzentration ca. 4%, w/v) und mit A. dest. übergossen.

Dazu werden 80 mg Pulver in 5 ML-Eppendorf-Proberöhrchen eingewogen, 2 mL A. dest. wird dazupipettiert, die Röhrchen verschlossen und mit einer Plastikspange gesichert. Danach werden die Röhrchen für 30 min im siedenden Wasserbad (90°C) 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, i.e. 20mg auf 2ml) 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 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 KCl versetzt und 12 h bei Zimmertemperatur inkubiert und dabei auf dem Kreisschüttler geschüttelt. Diese Extrakte werden direkt für die Messung des pH-Wertes eingesetzt.

Der Wasserextrakt wird eingefroren aufbewahrt.

Für die Gaschromatografie (GC) der Böden werden 10g frischer Boden in der Mikrowelle getrocknet, dann 5 g TM in 20 ml A.d. wie oben, jedoch über nacht und am Kreisschüttler, extrahiert, dieser Extrakt im Rotavapor einkonzentriert und in 0,5 mL A.d. aufgenommen und eingefroren.

Mit diesem Konzentrat wird später wie mit den Pflanzenextrakten verfahren.

Säure-(HCL-Extrakt)

Siehe Säureextrakt von Pflanzenpulver.

Analysenmethoden

Bodenphysikalisch/chemische Methoden

Bestimmung des pH-Wertes und der restlichen Kationenaustauschkapazität

Prinzip: Der pH-Wert (negativer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration) ist ein Maß für die Menge der frei in Lösung vorliegenden Protonen. Man spricht beim pH-Wert auch von der *aktuellen Acidität*.

Wird der pH Wert in einem KCL oder auch CaCL Extrakt gemessen, spricht man von der sg. potentiellen Acidität.

Die Differenz dieser Werte entspricht der sg. restlichen Kationenaustauschkapazität, also der Kapazität eines Bödens, weitere Kationen an den Ionenaustauscherstellen (Huminsäureresten) zu binden.

Ausführung: In 2ml Eppendorfgefäßen wird ein Drittel der Röhrchenhöhe mit frischem Boden aufgefüllt und mit je 1,5 mL A.d. bzw 0,1N KCl überschichtet und danach geschüttelt. Jede Probe wird doppelt angesetzt. Messung mittels pH-Einstabmesskette.

Bestimmung der Wasserhaltekapazität

Frische Bodenproben (5g) werden in Injektionsspritzen, deren Boden mit Filterpapier bedeckt wurde, eingewogen und in einem Becherglas mit Wasser überschichtet. Nach 2 Stunden wird das überschüssige Wasser auslaufen gelassen und das Gesamtgewicht gewogen. Aus der Differenz dieses Gesamtgewichtes minus Taragewicht der Spritze und minus dem Bodenfrischgewicht wird das Sättigungswasser ermittelt.

Parallel dazu werden Bodenproben gleicher Frischeinwaage über Nacht getrocknet und so das aktuelle Frischwasser gemessen. Sättigungswasser und Frischwasser werden addiert und als maximaler Wassergehalt in Prozent der Trockenmasse angegeben. diesen Wert nennt man dann (maximale) Wasserhaltekapazität (WHK) bzw. Feldkapazität.

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 Strahlungintensität 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.

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

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 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 ⁻¹)	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

Phosphataseaktivitätsbestimmung

Prinzip: Bodenproben werden mit einer Phenylphosphatdinatriumsalz-Substratlösung 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 für Kalibration: im Kühlschrank des Mahlraumes, hält länger = 1mg/ml
10 mg Phenol in 10 ml Meßkolben mit A. dest lösen

4b) Gebrauchslösung für Kalibration: täglich frisch herstellen = 10µg/ml
1ml Stammlsg. in 100 ml Meßkolben mit A.dest auffüllen

* Phenylphosphat und Dibromchinon werden im Kühlschrank aufbewahrt

Probenansatz:

2 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 30ml Greiner-Gefäße filtrieren
* 5 min bei 10000 Umdrehungen zentrifugieren

Farbreaktion:**Proben:**

In 30ml Gefässen : 0,5 ml µl Boratpuffer (Multipette)
 200 µl **Filtrat**
 2,5 ml A. dest (Multipette)
 100 µl Farbstoffreagenz
 --> schütteln

Kalibrationsgerade:

je 2 mal in 30 ml Greiner-Gefässen herstellen :

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

Proben und Kalibrationslösungen:

- * schütteln
- * 30 min Farbe entwickeln lassen
- * Proben mit 6,7 mL A.dest, Kalibrationen je nach Inhalt mit 6,9 bis 4,9 ml A.d. auf 10 mL 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, danach
- * Einsteigen als Analyzer Paßwort Analyze
- * X read Data : Probenamen eingeben Konzentrationen der Eichpunkte eingeben
- * Read plate : Fenster um Wellenlängenbereich auszusuchen

Berechnung:

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

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 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

NH₄Cl – allgemeines Labor (2. Lade)

NaOH—Bodenlabor

KCl— Bodenlabor

Na Salicylat – Bodenlabor

Dichlorisocyanursäurer.—Giftschrank allg Labor

Harnstoff — Bodenlabor

Na- Nitroprussid—Giftschrank allg Labor

Methode: je 2 Vollproben., 1 Blindprobe.

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 (Bodenlabor 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: * 0,1M KCL Lsg. in 0,1M HCl herstellen

* Kalibrationsreihe herstellen

Nach 2 Stunden : Vollproben + 20ml KCL + 1ml A.dest — 30min schütteln

Blindproben . +20ml KCL + 1ml Harnstofflg —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/LN). 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 : 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)

Zucker: Ionentausch und Vorbereitung für Kapillar- GC

Ionentauscher konditionieren

Kationentauscherharz (KT) Dowex 50Wx8 (50-100 mesh, H⁺ 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⁻ 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 µl).

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

Zur Kalibration werden je 30µl, 60µl, 90µl 0,1% iger Reinsubstanzgemische (glycerin, fructose, glucose, mannitol, myoinositol, saccharose, trehalose, raffinose) mit 10 µl 0,4% Pentaerythrit versetzt und ebenfalls in GC Vials zur Trochene gebracht (im "Speedvac").

Derivatisieren/Silylieren

Trockenes Pyridin mit 0,02% Phenyl-β-d-glucopyroinosit 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 (150µl) 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 inertem 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: von 85° auf 315°C mit 10° min⁻¹ aufheizen, dort 10 min isotherm halten

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

Brenngase: H₂ und Preßluft.

Injektor: Temperaturprogrammiert, 3° über Säule.

Detektor: Flammenionisationsdetektor; 330° C.

Derivatisierung: mit BSTFA in 5% TMCS 30 Minuten bei 75° C . 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.

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 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: 30 g naturfeuchter, auf 2 mm gesiebter Boden wird im Tiefkühlbeutel (Becherglas) eingewogen, mit 0.6 % FM Asparagin 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:

$\text{mg/L} / 10e6 * \text{flow} * 10e3$ $(\text{c}[\text{ppM}] / 10e6 * \text{flow}[\text{L/h}] * 10e3 / \text{weight} * 10e3 / * 1,96$	$\text{mL CO}_2 \text{ in der Probe pro Stunde}$ $\text{mg CO}_2 / \text{kg Boden}$
$x = \frac{c * f * 1.000 * 1.000}{1.000.000 * w} * 1,96$	$x = \frac{f * c}{w} * 1,96$

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.

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 1-2 mg des pflanzenpulvers bzw 2-3mg des Bodempulvers in Zinnkapseln 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 NaHCO₃ 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 (Raumtemperatur) im Dunklen incubiert und sofort sowie alle 12 Stunden bei 542 nm vermessen.

Substrate (0,5% Lsg): Glutamin, 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	asn	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
B	ile	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
C	gly	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
D	gln	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
E	gluc	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
F	succ	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
G	starch	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
H	me-cell	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
II													
A	urea	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
B	BSA	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
C	asn+NO ₃	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
D	asn+NH ₄	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
E	asn+PO ₄	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
F	gluc+NO ₃	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
G	gluc+NH ₄	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.
H	gluc+PO ₄	M	M	M	Z	Z	Z	M+Z	M+Z	M+Z	A.d. + S	Ringer	A.d.

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

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⁻¹)

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

3.4.2 TPF-Gebrauchslösung (0,1 mg TPF ml⁻¹) 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 ⁻¹ :	Trockensubstanzfaktor