

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 728800004

Enzymactiviteit als indicator voor de bodem-
kwaliteit:

Methodiekontwikkeling voor het enzym fosfatase

R.A.F.Cleef

april 1989

Opdrachtgever: Directie RIVM

Stageverslag : Universitaire Beroepsopleiding Milieukunde

Stageduur : september 1988 tot en met november 1988

Begeleider : ir.R. van den Berg

Verzendlijst

- 1 directie RIVM
- 2 ir.N.D. van Egmond
- 3 dr.ir.T.Schneider
- 4 ir.F.Langeweg
- 5 dr.ir.C. van den Akker
- 6 ir.W.Cramer
- 7 dr.H.A.M. de Kruijf
- 8 mw.dr.F.I.Kappers
- 9 drs.A.J.Schouten
- 10 ir.C.A.M. van Gestel
- 11 dr.P. van Beelen
- 12 dr.ir.J.P.G.Loch
- 13 ir.R. van den Berg
- 14 ing.J.H.A.M.Verheul
- 15 drs.W.Tamis, CML-RUL, Leiden
- 16 L.Haanstra, RIN, Arnhem
- 17 drs.G.W.J.Barendse, RU, Leiden
- 18 auteur
- 19 - 31 medewerkers RIVM
- 32 - 33 LBG/SGO
- 34 Bureau Rapporten- en projectenregistratie
- 35 - 50 Reserve

Inhoudsopgave

	blz.
Verzendlijst	ii
Inhoudsopgave	iii
Summary	v
Samenvatting	vi
1. Inleiding	1
2. Materiaal en methoden	3
2.1 Monstername	3
2.2 Voorbehandeling	3
2.3 Opslag	3
2.4 Activiteitsbepaling	3
2.4.1 Fosfatase	4
2.4.2 Urease	5
3. Resultaten	6
3.1 Vochtverlies bij opslag van grond	6
3.2 Intravariatie binnen één mengmonster	7
3.3 De invloed van preïncubatie bij 30°C op de fosfatase-activiteit	8
3.4 Invloed van verschillende buffers en de bufferconcentratie op de fosfatase-activiteit	9
3.5 Fosfatase-activiteit van RIVM-grond in een pH-reeks van een MUB-buffer	10
3.6 Fosfatase-activiteit van een basische grond in een pH-reeks van een MUB-buffer	12
3.7 Experimenten met verschillende substraatconcentratie	15
3.8 Variatie in fosfatase-activiteit in het veld	16
3.9 Beïnvloeding van de fosfatase-activiteit door toevoeging van koper (II) chloride	17
3.10 Bepaling van de urease-activiteit in grond	18

4. Conclusies en aanbevelingen	21
5. Literatuur	24
Bijlagen (1 t/m 4)	26 t/m 45

Summary

As first step for the use of soil enzyme activity in soil quality assesment measurement methods have to be developed. This report describes the methodology for determination of the enzym phosphatase in its various aspects: sampling, storage, pretreatment, subsampling and activity assay. - Spacial variation of the phosphatase activity has been investigated as well as the influence of addition of Cu(II)chloride.

Limited attention has been paid to the assessment of the urease activity according to a draft NEN standard.

Standard methodology for other soil enzymes (β -glucosidase, arylsulphatase, protease and rhodanese) is also given.

Samenvatting

In het onderhavige rapport wordt in het kader van de rol die enzymactiviteiten kunnen spelen bij de beoordeling van de kwaliteit van de bodem ingegaan op de methodiekontwikkeling voor de activiteitsbepaling van bodemenzymen. In het rapport wordt met name aandacht besteed aan de methodiek-ontwikkeling voor het enzym fosfatase. Voor dit enzym wordt beschreven de monstername, opslag, voorbehandeling, deelbemonstering en enzymassay. Daarnaast wordt voor de fosfatase-activiteit ingegaan op de variatie in de veldsituatie en de beïnvloeding door toevoeging van verontreinigingen (Cu(II)chloride) aan de bodem. Tenslotte zijn in een bijlage enzymassays beschreven voor beta-glucosidase, arylsulfatase, protease en rhodanese. Beperkte aandacht is besteed aan de bepaling van de ureaseactiviteit in bodemmonsters, namelijk in het kader van een commentaarronde op een concept NEN-norm.

1. INLEIDING

Ecotoxicologisch onderzoek is noodzakelijk voor een verdere onderbouwing van de bodemkwaliteitseisen. Of dit onderzoek op soort-, microsysteem- of ecosysteemniveau moet worden uitgevoerd en welke organismen en biologische parameters hierbij moeten worden betrokken staat nog ter discussie. De uiteindelijke keuzes zullen sterk worden bepaald door de indicatieve en voorspellende waarde van de bovengenoemde invalshoeken voor het ecologisch functioneren van de bodem. Wat betreft de biologische parameters zijn diverse structurele kenmerken, met name soortenrijkdom, levensstrategie en verdeling van saprofagen, herbivoren en carnivoren over het ecosysteem, en verschillende functionele kenmerken, met name stofkringlopen, somprocessen en soort parameters (o.a. groei en reproductie) veelbelovend (Cleef, 1988).

In deze studie is aandacht besteed aan bodemenzymen. De studie is een eerste stap in het onderzoek dat dient na te gaan of enzymactiviteiten als somprocessen een goede afspiegeling vormen van het ecologische functioneren van de bodem. Een groot voordeel van bodemenzymen is dat de methode van het bepalen van de enzymactiviteit relatief eenvoudig is.

Het doel van dit onderzoek was in eerste instantie tweeledig, namelijk:

- het verkrijgen van kennis omtrent enzymactiviteiten als indicator van beoordeling van de bodemkwaliteit
- het verkrijgen van kennis omtrent de afbraakpotentie van grond ten aanzien van natuurlijk voorkomende en xenobiotische stoffen.

Uiteindelijk is de aandacht hoofdzakelijk besteed aan de methodiekontwikkeling voor de activiteitsbepaling. Bestudeerd is de wijze van:

- * monstername
- * opslag
- * voorbehandeling
- * deelbemonstering (intravariatie)
- * enzymassay : - incubatie-omstandigheden
 - monstername
 - meting

Ook is aandacht besteed aan de ruimtelijke variatie in het veld en de invloed door toevoeging van toxische stoffen op de enzymactiviteit.

Twee bodemenzymen zijn in het onderzoek betrokken, namelijk fosfatase en urease.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstername

De grondmonsters zijn genomen met een stalen gutsboor (ϕ 3;0 cm). Per monsterplek zijn 40 steken genomen. Hiervan is één mengmonster gemaakt. De grond is tot 15 cm diep bemonsterd.

Er is gebruik gemaakt van grond van het RIVM-terrein, uit een tuin te Odijk en van de standaard monsterplaatsen Rolde, Katwijk en Maasdijk.

2.2 Voorbehandeling

Grove delen zoals takjes, stenen en bladeren, worden eerst verwijderd. Daarna wordt de grond in een plastic bak goed gemengd en vervolgens met een 2 mm stalen zeef gezeefd. Bij "vette" grond is een 4 mm stalen zeef gebruikt en is de grond tweemaal gezeefd. In beide gevallen wordt de grond die in de zeef achterblijft met de hand door de zeef gedrukt. Na zeven wordt de grond als homogeen beschouwd. In een experiment is nagegaan of tweemaal zeven over een 4 mm zeef inderdaad een goed gehomogeniserende grond oplevert.

2.3 Opslag

De gezeefde grond wordt in open plastic zakken bij 4°C bewaard. In een experiment is de invloed van opslag bij 4°C en 30°C op het vochtverlies van de grond onderzocht. Tevens is nagegaan of er een verschil optreedt in de enzymactiviteit van de grond na opslag bij 4°C of 30°C.

2.4 Activiteitsbepaling

Er zijn van twee enzymenactiviteitsbepalingen uitgevoerd, namelijk voor fosfatase en urease.

2.4.1 Fosfatase

Diverse methoden om de fosfatase-activiteit te bepalen zijn toegepast. Alle gebruikte methoden zijn afgeleid van de methode ontwikkeld door Tabatabai en Bremner (1969). Deze methode berust op de afbraak van het artificiële substraat paranitrofenolfosfaat. De enzymen zuur-fosfatase (E.C. 3.1.3.1) en alkalische fosfatase (E.C.3.1.3.2) splitsen dit substraat in fosfaat en paranitrofenol. Paranitrofenol kleurt onder basische omstandigheden (pH >8) geel. Deze gele kleur blijft minstens 24 uur stabiel. De hoeveelheid gevormd paranitrofenol wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 400 nm.

De enzymreactie wordt gestopt door toevoeging van natriumhydroxide. Voorafgaand wordt calciumchloride toegevoegd. Calciumchloride voorkomt dispersie van kleideeltjes en de extractie van organisch materiaal, dat tijdens de behandeling met natriumhydroxide kan vrijkomen en de meting kan beïnvloeden.

Afhankelijk van de methode is 5,0, 1,0 of 0,5 gram grond geïncubeerd in 80 ml glazen flesjes (met blauwe schroef dop). Deze flesjes werden twee uur in een schudincubator geplaatst. De incubatietemperatuur bedroeg eerst 35°C, later is 30°C gekozen. Deze temperatuur (30°C) wordt door de I.U.B. (1964) als de meest geschikte temperatuur beschouwd voor het verrichten van enzymbepalingen.

In principe kunnen de gebruikte assaymethoden in twee groepen worden gesplitst. Bij de eerste methode is op de tijdstippen 0, 30, 60, 90 en 120 minuten een submonster genomen. Dit monster wordt vervolgens met calciumchloride en natriumhydroxide behandeld en 10 minuten bij 3000 rpm gecentrifugeerd. Aan het supernatant wordt een glycinebuffer toegevoegd. Deze buffer voorkomt troebeling van de oplossing. Van de op deze wijze verkregen oplossing wordt vervolgens de adsorptie bepaald. Deze methode is gebaseerd op de onderzoeken van Couperus (1984) en Bonten (1985) en wordt methode I genoemd (deze methode is volledig weergegeven in bijlage 1).

De tweede assay-methode is afgeleid van de methode die op het Rijksinstituut voor Natuurbeheer te Arnhem wordt toegepast. Hierbij wordt elk grondmonster in triplo (+ één blanco) gedurende twee uur geïncubeerd. Na de incubatie wordt calciumchloride toegevoegd en de enzymreactie gestopt met natriumhydroxide. De oplossingen worden vervolgens bij 3000 rpm

gedurende 10 minuten gecentrifugeerd en van het supernatant wordt de adsorptie gemeten. De volledige methode is weergegeven in bijlage 2 en wordt methode II genoemd.

Bij het uittesten van de meest geschikte methode voor de fosfatase-activiteitsbepaling zijn de volgende factoren onderzocht:

- de invloed van het gebruik van een gebufferd of ongebufferd systeem
- de invloed van de zuurgraad van het incubatiemedium
- de invloed van de substraatconcentratie.

Nadat uiteindelijk voor methode II is gekozen, is nog aandacht besteed aan de variatie in de veldsituatie en de invloed van de toevoeging van zware metalen (i.c. koper (II) chloride).

2.4.2 Urease

De urease-activiteit is bepaald volgens ontwerp NEN 5796. Deze is in bijlage 3 weergegeven.

3. RESULTATEN

3.1 Vochtverlies bij opslag van grond

Nagegaan is welke invloed opslag bij 4°C en 30°C heeft op het vochtgehalte van 4 grondsoorten. De opslag bij 4°C heeft plaatsgevonden in open plastic zakken. Bij de 30°C-opslag is gebruik gemaakt van 400 ml glazen potten, waarin ± 150 gram grond goed afgesloten is bewaard.

De resultaten zijn in onderstaande tabel weergegeven.

30°C-opslag

	<u>dag 0</u>		<u>dag 1</u>		<u>dag 2</u>		<u>dag 3</u>		<u>dag 7</u>	
	% vocht	%-vocht	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-
			verlies	verlies	verlies	verlies	verlies	verlies	verlies	verlies
RIVM	16,26	16,10	1,0	15,76	3,1	15,06	7,4	13,87	14,7	
Rolde	16,69	16,51	1,1	16,35	2,0	15,78	5,5	13,64	18,3	
Kootwijk	7,59	7,44	2,0	7,07	6,9	6,00	20,9	4,24	44,1	
Maasdijk	7,24	8,90	3,7	8,67	6,2	7,80	15,6	4,93	46,7	

4°C-opslag

	<u>dag 0</u>		<u>dag 7</u>		<u>dag 14</u>	
	%-vocht	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-	%-vocht-
			verlies	verlies	verlies	verlies
RIVM	16,20	15,86	2,1	16,02	1,1	
Rolde	16,85	16,01	5,0	16,21	3,8	
Kootwijk	7,45	7,04	5,5	7,00	6,0	
Maasdijk	9,31	8,71	6,4	8,86	4,8	

Tabel 1: Vochtverlies van vier grondsoorten als gevolg van opslag bij 30°C en 4°C.

Uit de tabel blijkt dat opslag bij 4°C nauwelijks invloed op het vochtgehalte van de bodem heeft.

Opslag bij 30°C zorgt voor een sterke verdroging, die groter wordt naarmate de grond minder vocht bevat.

3.2. Intravariatie binnen één mengmonster

Onderzocht is de intravariatie van de fosfatase-activiteit binnen één mengmonster. Hierbij zijn betrokken twee grondsoorten; grond van het RIVM en uit de tuin van Simon. De grond is eerst in een plastic bak goed gemengd en vervolgens tweemaal gezeefd over een 4 mm zeef.

Daarna is op vijf verschillende plekken in het mengmonster een deelmonster van 1,00 gram genomen, waarvan de enzymactiviteit is bepaald (volgens methode I; zie bijlage 1). In de onderstaande tabel zijn de vergelijkingen van de adsorptietoename bij 400 mm weergegeven.

RIVM grond

$$Y = 0,085 \cdot x + 1,054 \quad r = 0,998$$

$$Y = 0,088 \cdot x + 0,848 \quad r = 0,997$$

$$Y = 0,090 \cdot x + 0,908 \quad r = 0,998$$

$$Y = 0,081 \cdot x + 1,026 \quad r = 0,994$$

$$Y = 0,089 \cdot x + 0,994 \quad r = 0,999$$

Tuin Odijk

$$Y = 0,017 \cdot x + 1,151 \quad r = 0,997$$

$$Y = 0,016 \cdot x + 0,248 \quad r = 0,997$$

$$Y = 0,016 \cdot x + 0,184 \quad r = 0,994$$

$$Y = 0,016 \cdot x + 1,147 \quad r = 0,995$$

$$Y = 0,016 \cdot x + 0,163 \quad r = 0,995$$

Tabel 6: Vergelijkingen van de adsorptietoename behorende bij de fosfatasebepalingen van deelmonsters van twee grondsoorten.

De gemiddelde adsorptietoename bij RIVM-grond bedraagt $0,087 \pm 0,004$. De standaardfout bedraagt 4,2%. Bij de grond uit de tuin van Simon is de adsorptietoename gemiddeld $0,016 \pm 0,0004$. De standaardfout komt hier overeen met 2,8%.

Uit de resultaten blijkt, dat de intravariatie binnen één mengmonster - na goede menging en tweemaal zeven van de grond - gering is.

3.3 De invloed van preïncubatie bij 30°C op de fosfatase-activiteit

De fosfatase-activiteiten van vier grondsoorten (RIVM, Rolde, Kootwijk en Maasdijk) zijn na opslag bij 4°C en preïncubatie gedurende 2 dagen bij 30°C met elkaar vergeleken. De preïncubatie heeft plaatsgevonden in glazen potten van 400 ml, waarin ± 150 gram grond luchtdicht is afgesloten.

De enzymassay is verricht volgens methode II (zie bijlage 2).

In de onderstaande tabel zijn de resultaten van het experiment weergegeven.

	Act (in $\mu\text{mol}/\text{gr}.\text{OD}.\text{h}$) na preïncubatie bij 30°C	Act. (in $\mu\text{mol}/\text{gr}.\text{OD}.\text{h}$) na opslag bij 4°C
RIVM	$12,7 \pm 0,7$	$12,7 \pm 0,7$
Rolde	$7,1 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,2$
Kootwijk	$7,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,2$
Maasdijk	$2,7 \pm 0,0$	$2,7 \pm 0,01$

Tabel 2: Fosfatase activiteit van 4 grondsoorten na 2 dagen preïncubatie bij 30°C en opslag bij 4°C .

Uit de resultaten blijkt dat preïncubatie gedurende 2 dagen bij 30°C géén invloed op de fosfatase activiteit van grond heeft.

3.4. Invloed van verschillende buffers en de bufferconcentratie op de fosfatase-activiteit

Het experiment is uitgevoerd met 5,0 gr. RIVM-grond. De substraatconcentratie van het incubatiemedium (80 ml) bedroeg 1,0 mmol PNP-fosfaat, de incubatietemperatuur 35 °C. Als incubatie- en monsterbehandelingsmethode is toegepast methode I (zie bijlage 1).

Voor de activiteitsberekening geldt de volgende formule:

$$Akt = \frac{60 \cdot tg \alpha \cdot Vmt \cdot Vms2 \cdot Vink}{ME \cdot L_1 \cdot Mink \cdot VmS_1 \cdot Vms \cdot Md}$$

Akt = activiteit in nmol PNP/h.g (oven droog)

tg α = helling van de incubatieplot (dE₄₀₀/dt)

Vmt = volume van de meetoplossing (2,20 ml)

VmS₁ = volume van de monsteroplossing die behandeld wordt met NaOH en Ca Cl₂ (2,00 ml)

VmS₂ = volume van monsteroplossing na behandeling met NaOH en CaCl₂ (2,00 ml)

Vink = gemiddelde incubatievolume (72 ml)

ME = 0,0185 L/nmol

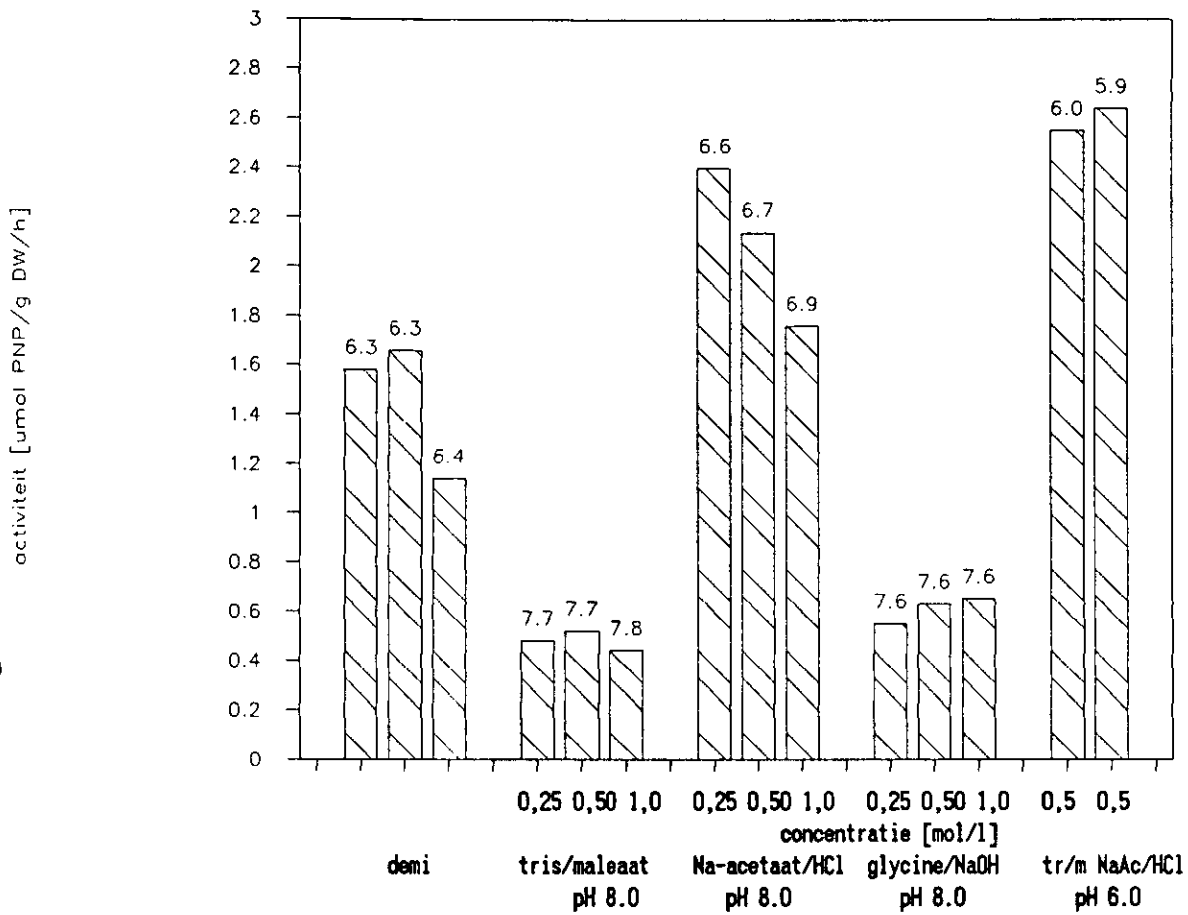
L₁ = lengte lichtweg door de cuvet (1,00 cm)

Mink = geïncubeerde hoeveelheid grond

Md = drooggewicht v.d. geïncubeerde grond.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 1. Hieruit blijkt dat het bufferend vermogen van de Tris/Maleaat (pH=8,0)-buffer en de glycine/NaOH (pH = 8.0)-buffer groot is. De zuurgraad van de Na-Acetaat (pH=8,00)-buffer verandert onder invloed van de RIVM-grond bij de drie gebruikte bufferconcentraties sterk.

Verder blijkt dat niet de bufferconcentratie maar veranderingen in zuurgraad hoofdzakelijk verantwoordelijk zijn van de verschillen in enzymactiviteit.



Figuur 1: de invloed van verschillende buffers in de bufferconcentratie op de fosfatase activiteit.

N.B. Het getal op de kolom geeft de zuurgraad na incubatie weer.

3.5. Fosfatase-activiteit van RIVM-grond in een pH-reeks van een MUB-buffer

De MUB-buffer (= Modified Universal Buffer) is samengesteld volgens Skujins et al. (1962) en bevat per liter demiwater:

- 12,1 gram tris (hydroxymethyl) aminomethaan
- 11,6 gram maleïnezuur
- 14,0 gram citraat
- 6,30 gram boorzuur
- 19,52 gram natriumhydroxide

De gewenste zuurgraad van de buffer wordt verkregen door een tweemaal geconcentreerde MUB-oplossing met een 0,1 molaire HCl-of NaOH-oplossing te

verdunnen. Na het bereiken van de zuurgraad wordt de buffer met demiwater verder aangevuld, totdat de concentratie is gehalveerd.

In de onderstaande tabel is de verandering van de zuurgraad van de diverse MUB-buffers als gevolg van grondtoevoeging en incubatie weergegeven.

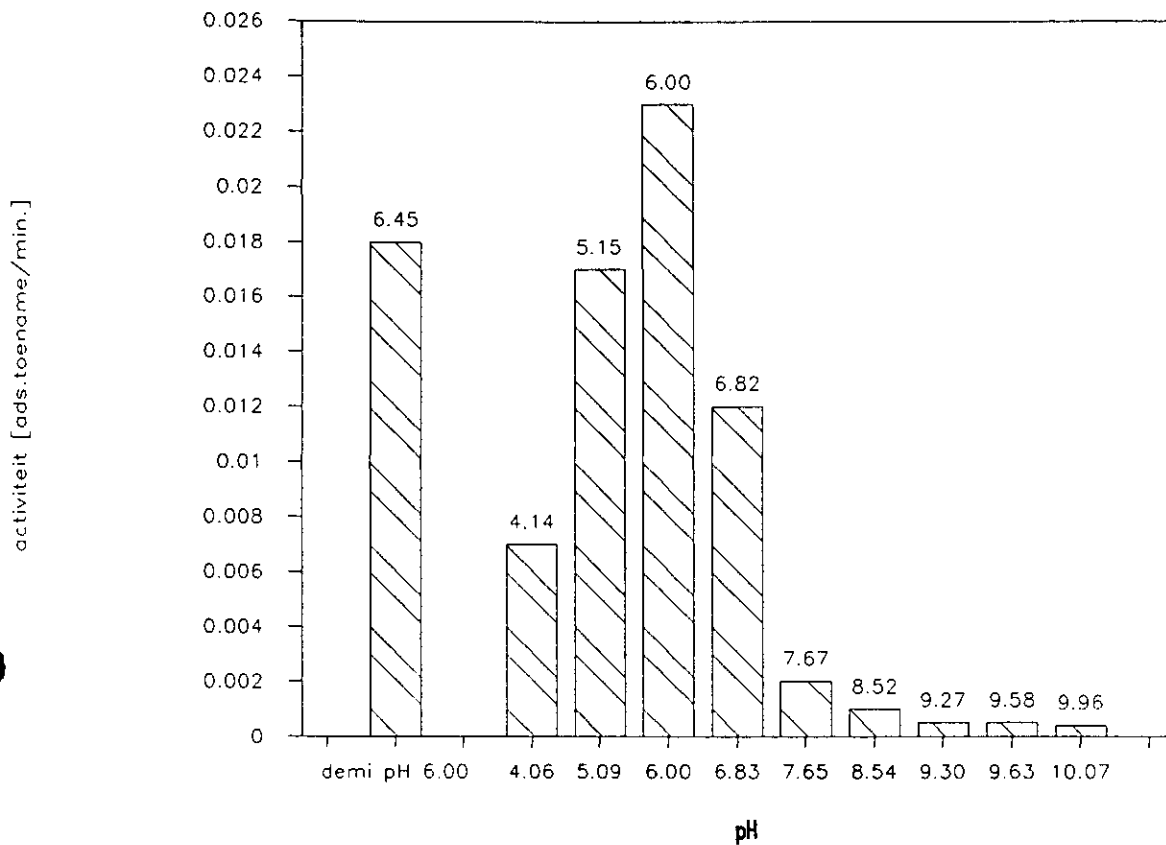
pH-incubatie- medium	pH incubatie- medium + grond (vóór experiment)	pH incubatie- medium + grond (ná experiment)
Demi- : -	6,0	6,4
MUB-buffer: 4,1	4,1	4,1
" : 5,1	5,1	5,2
" : 5,9	6,0	6,0
" : 7,0	6,8	6,8
" : 7,9	7,7	7,7
" : 8,9	8,5	8,5
" : 9,9	9,3	9,3
" : 10,8	9,6	9,6
" : 11,8	10,1	10,0

Tabel 3: pH-veranderingen van diverse MUB-buffers na zuur incubatie met 2,5 gram RIVM-grond.

Incubereren met demiwater geeft tijdens het experiment een pH-stijging van 0,3. Bij de MUB-buffers verandert de zuurgraad tijdens incubatie nauwelijks (minder dan 0,1 pH-eenheid).

De resultaten van de activiteitsmeting (volgens methode I) zijn weergegeven in figuur 2. Hieruit blijkt dat de activiteit een optimum bereikt rond pH=6,0. Dit komt overeen met de zuurgraad van de RIVM-grond. Uit figuur 2 blijkt verder dat in RIVM-grond voornamelijk het zure fosfatase actief is, het basische fosfatase nauwelijks.

De activiteit in demiwater is lager dan de activiteit in de MUB-buffer met vergelijkbare zuurgraad. Dit is waarschijnlijk een gevolg van activering van het fosfatase door ionen van de buffer.



Figuur 2: De fosfatase-activiteit in een pH-reeks van een MUB-buffer.

N.B. Het getal op de kolom geeft de zuurgraad na incubatie weer.

3.6. Fosfatase-activiteit van een basische grond (tuin Odijk) in een pH-reeks van een MUB-buffer

Er is 1,0 gram grond geïncubeerd, de substraatconcentratie van het incubatiemedium bedroeg 23 mmol PNP-fosfaat/l. De incubatietemperatuur was 35^o C. De enzymassay is uitgevoerd volgens methode I (zie bijlage 1). De pH-veranderingen als gevolg van grondtoevoeging en de incubatie zijn weergegeven in onderstaande tabel.

pH incubatie- medium	pH incubatie- medium + grond (vóór experiment)	pH incubatie- medium + grond (nà experiment)
Demi: -	8,2	8,1
MUB-buffer: 3,1	4,0	5,0
" : 4,5	4,9	5,5
" : 6,1	6,2	6,6
" : 7,1	7,2	7,5
" : 8,1	8,0	8,0
" : 9,0	8,9	8,8
" : 10,0	9,7	9,5
" : 10,9	10,3	9,8
" : 11,9	11,2	10,3

Tabel 4: pH-veranderingen van diverse MUB-buffers na zuur incubatie met 1,0 gram basische grond.

Uit de tabel blijkt dat het bufferend vermogen van de grond groot is. De MUB-buffer met pH=3,1 verandert naar 5,0 en de MUB-buffer met pH=11,9 naar 10,3.

De fosfatase-activiteit van basische grond in een pH-reeks van een MUB-buffer is tijdens twee experimenten bepaald. Aangezien de tendens van beide experimenten hetzelfde is, zijn de resultaten van slechts één in figuur 3 afgebeeld.

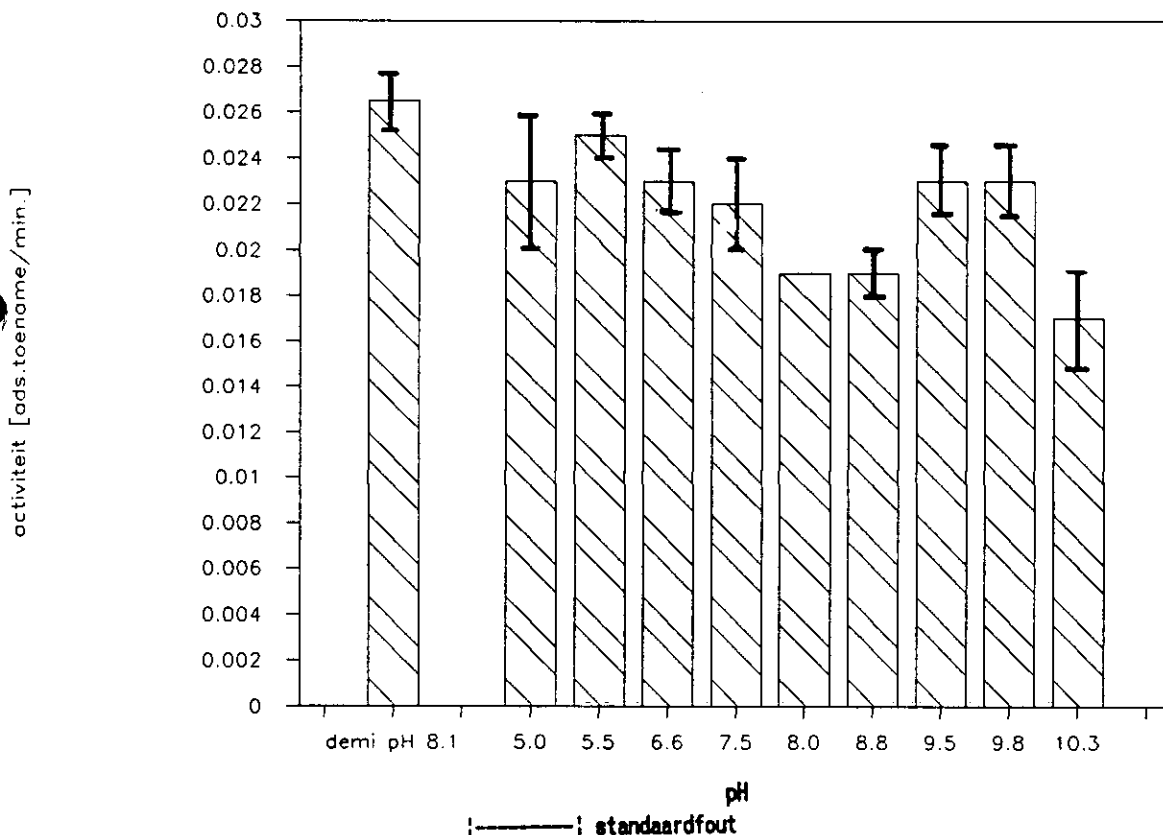
Uit de resultaten blijkt dat de basische grond geen pH-optimum vertoont.

Bij vergelijking van figuur 2 en 3 blijkt verder dat de fosfatase-activiteit in de onderzochte basische grond aanzienlijk lager is dan in de RIVM-grond (pH = 6,0). De concentratie in het incubatiemedium bedroeg immers bij de RIVM-grond slechts 1,0 mmolair PNP-fosfaat per liter, bij de basische grond 23,0 mmolair.

Op grond van de experimenten met diverse buffers en incubatiemedia met verschillende zuurgraad is besloten om de uiteindelijke enzymassaymethode in een ongebufferd systeem, dus met demiwater uit te voeren.

Hiervoor zijn twee redenen te noemen. Ten eerste blijkt uit de experimenten dat grondtoevoeging de zuurgraad van de buffer verandert, en wel sterker naarmate de zuurgraad van buffer en grond meer van elkaar afwijken. Bij gebruik van een buffer met een bepaalde zuurgraad - in de literatuur wordt vaak voor de bepaling van basische fosfatase een pH van 11,0 en voor zure fosfatase een pH van 6,5 voorgeschreven - zal de uiteindelijke zuurgraad van het incubatiemedium verschillen door toevoeging van zure of basische grond. Dit kan worden voorkomen door het bufferend vermogen van het incubatiemedium te vergroten. Nadeel is dan dat dit medium een onnatuurlijk hoge ionenconcentratie krijgt.

Ten tweede vormt incubatie met demiwater een betere afspiegeling van de natuurlijke situatie dan toevoeging van hoge ionenconcentraties in de vorm van een buffer.



Figuur 3. De fosfatase-activiteit van een basische grond in een pH-reeks.

3.7. Experimenten met verschillende substraatconcentraties

Voor het uitvoeren van een enzymassay is het algemeen aanvaard, dat de substraatconcentratie minstens 5 maal de K_m -concentratie bedraagt (Malcolm, 1983). Dan is er sprake van een 0^e -orde reactie en is de enzymactiviteit onafhankelijk van de substraatconcentratie.

Er zijn meerdere experimenten met een oplopende substraatconcentratie uitgevoerd. Het meest van belang is het laatst uitgevoerde experiment in deze rij, omdat dit experiment nauw aansluit op de uiteindelijk gekozen enzymassaymethodiek. Dit experiment wordt hieronder besproken.

De enzymassay heeft plaatsgevonden volgens methode II (zie bijlage 2); De concentraties van het incubatiemedium bedroegen 0,5, 1,0, 5,0 en 10,0 mmol PNP-fosfaat/l. De K_m en V_m van 4 gronden (RIVM, Rolde, Kootwijk en Maasdijk) zijn bepaald en in tabel 5 weergegeven.

	K_m (in mmol/l)	V_m (in $\mu\text{mol/g.l}$)	r-waarde
RIVM	2,5	14,2	0,999
Rolde	1,8	8,3	0,997
Kootwijk	3,8	8,4	0,998
Maasdijk	0,8	2,6	0,966

Tabel 5: K_m - en V -waarde van 4 grondsoorten

Om te voldoen aan het criterium van minimaal 5 maal K_m zou het incubatiemedium minstens $5 \times 3,8$ mmol/l (dit is de K_m van de grond van Kootwijk en vormt de hoogst gemeten K_m -waarde tijdens alle uitgevoerde experimenten) = 19,0 mmol PNP-fosfaat/l moeten bevatten. Tabatabai en Bremner (1969) gebruiken een concentratie van 23 mmol/PNP-fosfaat/l in een MUB-buffer.

In een ongebufferd systeem ontstaat bij deze concentratie kristalachtige neerslagen tijdens de monsterbehandeling. Deze neerslagen beïnvloeden de

adsorptiemeting duidelijk. Daarom is uiteindelijk gekozen voor het gebruik van een substraatconcentratie van 10 mmol PMP-fosfaat/l.

Het RIN (Arnhem) verricht haar fosfatase-enzymassays met concentraties van 1,0 of 5,0 mmol PNP-fosfaat/l.

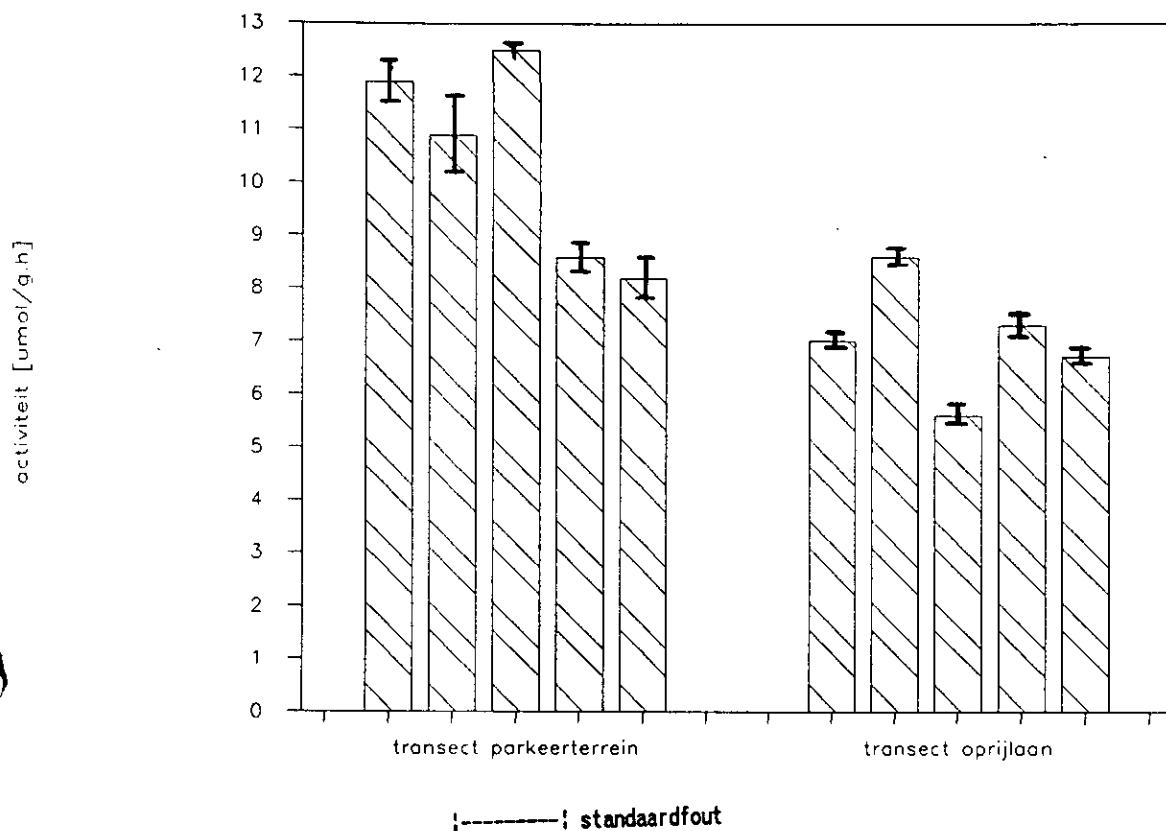
3.8 Variatie in fosfatase-activiteit in het veld

De fosfatase-activiteit in de grond wordt door vele factoren beïnvloed. De belangrijkste volgens Harrison (1983) zijn:

- organisch stofgehalte
- vochtgehalte
- klei- en siltfractie
- totaal N-gehalte
- uitwisselbare fractie Mg
- isotopisch uitwisselbare fractie P
- zuurgraad
- bodemdiepte
- bodemtype
- seizoen
- vegetatie
- onderliggend gesteente

In het hier beschreven experiment is de variatie in fosfatase-activiteit onderzocht van monsterpunten met een vergelijkbaar grondtype. Langs twee transekten op het RIVM-terrein is hiertoe om de 50 meter een grondmonster gestoken. Per transekt zijn vijf monsters verzameld. Van deze monsters is volgens methode II de fosfatase-activiteit bepaald. De resultaten van de enzymbepalingen zijn in figuur 4 weergegeven.

Hoewel de grond van de 10 monsterpunten nauw verwant is, treedt een verschil van 124% in de enzymactiviteit op. Wel moet worden opgemerkt, dat geen van bovengenoemde bodemkenmerken is bepaald. Een correlatie met deze kenmerken heeft dus niet plaatsgevonden.



Figuur 4: De variatie in fosfatase-activiteit binnen twee transecten.

3.9. Beïnvloeding van de fosfatase-activiteit door toevoeging van koper(II)chloride.

In een experiment is de invloed van een verontreiniging op de fosfatase activiteit in grond onderzocht. Hiertoe is aan RIVM-grond koper (II) chloride toegevoegd en wel in twee concentraties. De eerste concentratie is gelijk aan de C-waarde (Leidraad bodemsanering; 500 mg/kg), de tweede bedraagt vijf maal de C-waarde. Het koperchloride is als oplossing (25 ml) aan 250 gram grond toegevoegd.

Om de invloed van de veranderingen in vocht- en chloridegehalte na te gaan, is ook aan 250 gram grond respectievelijk 25 ml demiwater en een 25 ml equivalente chloride-oplossing (NaCl-oplossing) toegevoegd.

Alle toevoegingen zijn in duplo uitgevoerd. De grond is in glazen potten van 400 ml bij 30° C geïncubeerd. Na 0,1 en 7 dagen is vervolgens de fosfatase activiteit (volgens methode II) bepaald. Deze activiteiten zijn in tabel 6 weergegeven.

	<u>dag 0</u>	<u>dag 1</u>	<u>dag 7</u>
* Demiwater :	12,0 ± 0,0	11,8 ± 0,2	11,9 ± 0,5
* NaCl-oplossing :	12,2 ± 0,2	11,8 ± 0,0	13,1 ± 0,2
* CuCl ₂ -oplossing (C-waarde) :	10,0 ± 0,1	9,7 ± 0,0	9,5 ± 0,3
* CuCl ₂ -oplossing (5x C-waarde) :	5,7 ± 0,2	5,3 ± 0,1	7,2 ± 0,8

Tabel 6: Beïnvloeding van fosfatase-activiteit (weergegeven in $\mu\text{mol}/\text{gr}.\text{OD}.\text{h}$) door toevoeging van koper(II)chloride.

Uit de resultaten blijkt dat de fosfatase-activiteit door toevoeging van demiwater vrijwel constant blijft. NaCl-toevoeging heeft eveneens nauwelijks effect. Toevoeging van CuCl₂ in de concentratie van de C-waarde geeft een verlaging van de fosfatase-activiteit. Deze is na 7 dagen maximaal en bedraagt ca. 20%.

Bij een concentratie van 5 maal de C-waarde is een andere tendens waargenomen. De verlaging van de fosfatase-activiteit is na 1 dag maximaal en bedraagt dan ca. 55%. Na 7 dagen is de activiteit met nog ca. 40% verlaagd.

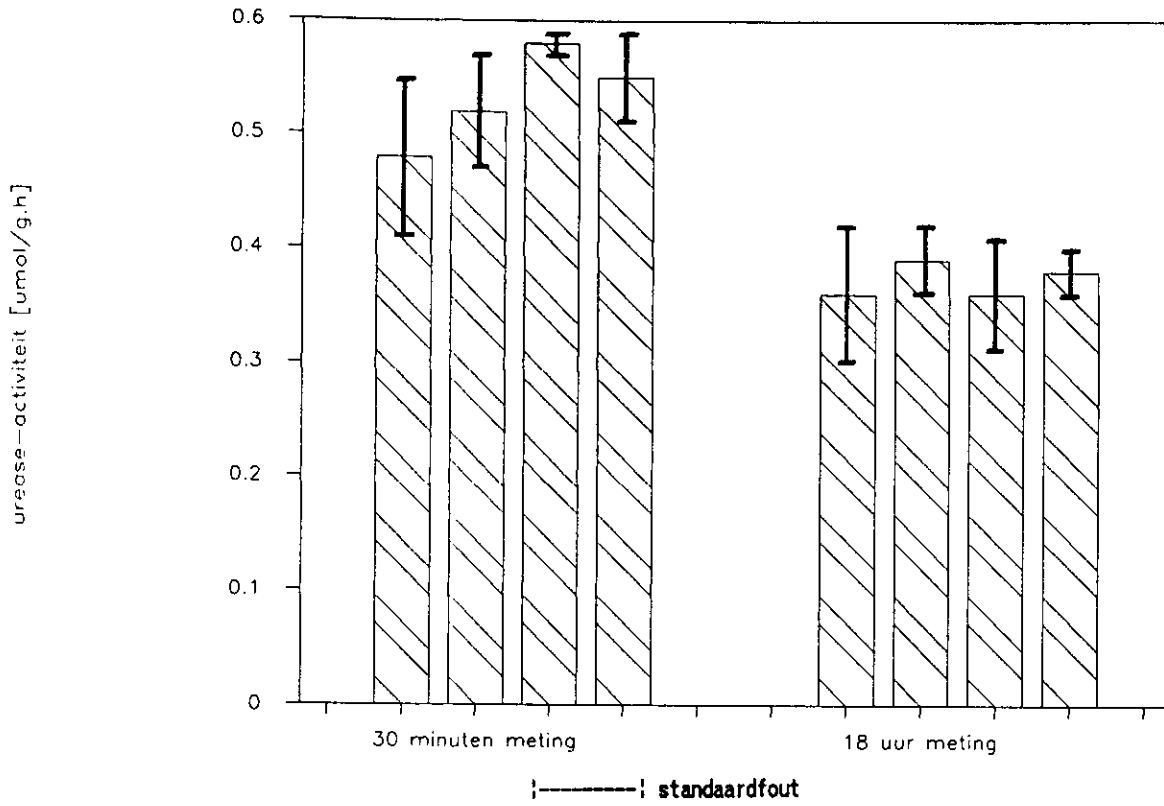
3.10. Bepaling van de urease-activiteit in grond

Onderzocht is of de beschreven concept-ontwerp NEN-5796 "Bodem-bepaling van de urease-activiteit" goed uitvoerbaar is. Twee experimenten zijn volgens deze methode uitgevoerd.

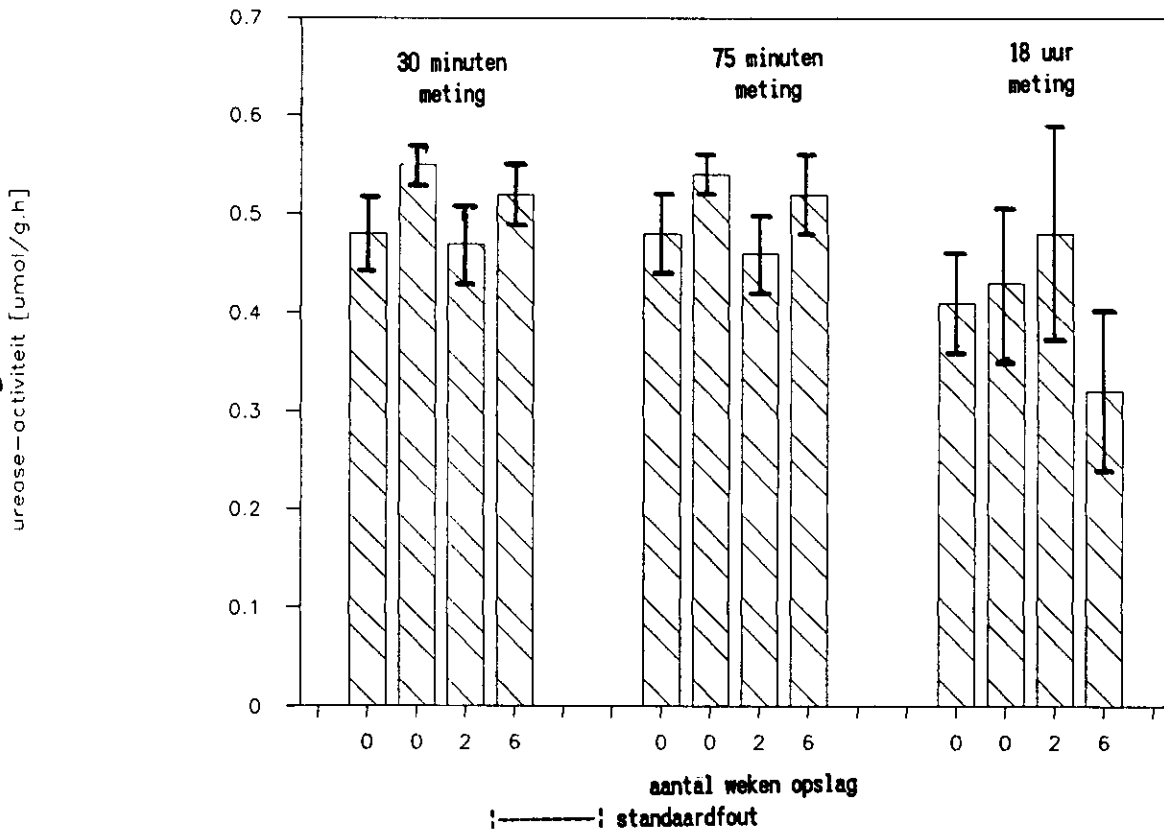
De urease-activiteit is bepaald van RIVM-grond bemonsterd op 14/9/88, 12/10/88 en 27/10/88.

Een eventuele activiteitsverandering als gevolg van de opslag bij 4^o C zou hierdoor kunnen worden aangetoond. In een ander experiment is ook nog de urease activiteit van de grond uit de tuin te Odijk bepaald. De adsorptiemetingen zijn na 30 en 75 minuten en na 18 uur uitgevoerd.

De resultaten zijn in de onderstaande figuren weergegeven.



Figuur 5. De urease-activiteit van twee grondsoorten.



Figuur 6: De urease-activiteit van RIVM-grond na een aantal weken opslag

Hieronder volgen enkele opmerkingen naar aanleiding van de bepalingen van de urease-activiteit.

- * De gevormde kleur is niet stabiel. De kleuring vermindert zowel in de standaard als monsterreeks. Het tijdstip waarop de adsorptiemeting dient plaats te vinden, staat niet in het concept-ontwerpvoorschrift vermeld.
- * Er ontstaan neerslagen in de meetoplossingen (zowel bij de standaarden als monsters). Deze neerslagen beïnvloeden de meting. Een mogelijke oorzaak is dat met relatief oude chemicaliën is gewerkt.
- * De activiteitsberekening in het voorschrift is niet toe te passen. Een correctiefactor voor de ingewogen hoeveelheid grond ontbreekt.
- * De activiteiten van de grondmonsters die 0, 2 en 6 weken zijn opgeslagen, verschillen nauwelijks. Opslag bij 4⁰ C heeft op korte termijn dus vrijwel geen invloed op de urease-activiteit.

4. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

De definitieve methode voor de bepaling van de fosfatase activiteit in grond is in bijlage 2 weergegeven. Bij deze methode vindt incubatie in een ongebufferd systeem plaats. Voor een ongebufferd systeem is om twee redenen gekozen.

Ten eerste weerspiegelt de incubatie met demiwater de natuurlijke veldsituatie beter dan toevoeging van hoge ionen concentraties in de vorm van een buffer.

Ten tweede blijkt dat ondanks de aanwezigheid van een buffer grondtoevoeging en incubatie een verandering van de zuurgraad in het incubatiemedium teweeg brengt. Deze verandering is groter naarmate de zuurgraad van buffer en grond meer van elkaar afwijken. De verandering heeft tot gevolg dat de uiteindelijke zuurgraad van het incubatiemedium sterk afhankelijk blijft van de zuurgraad van de grond. Omdat de zuurgraad van het incubatiemedium grote invloed heeft op de enzymactiviteit, blijft het daarom moeilijk de enzymactiviteiten van diverse gronden met elkaar te vergelijken. Een grote verandering in de zuurgraad van het incubatiemedium kan alleen worden voorkomen door het gebruik van geconcentreerde buffers. Dit is vanuit het oogpunt om in het incubatiemedium een natuurlijke situatie na te bootsen ongewenst.

Voor het uitvoeren van een enzymassay is het algemeen aanvaard dat de substraatconcentratie van het incubatiemedium minstens 5 maal de K_m -waarde moet bedragen om een 0^e -orde reactie te krijgen (Malcolm, 1983). In de definitieve enzymassay van fosfatase in grond is gekozen voor een substraatconcentratie van 10 mmol PNP-fosfaat/l. Voor de meeste van de onderzochte gronden in Nederland (gegevens van Couperus (1984), Bonten (1985) en onderhavige rapport) bedraagt deze concentratie minstens 5 maal de K_m -waarde. Voor enkele gronden (bijv. Kootwijk) wordt 5 maal de K_m -waarde niet bereikt. Een nadeel van het incuberen met hogere substraatconcentraties bijvoorbeeld 23 mmol/l (Tabatabai en Bremner, 1969) in een ongebufferd systeem is het ontstaan van kristalachtige neerslagen tijdens de monsterbehandeling. Deze neerslagen beïnvloeden de adsorptiemeting.

In een nader onderzoek kan worden bestudeerd in hoeverre de substraat-concentratie nog kan worden verhoogd zonder de vorming van bovengenoemde neerslagen.

De fosfatase-activiteit in grond wordt door vele factoren beïnvloed. De belangrijkste zijn volgens Harrison (1983)

- organische stofgehalte
- vochtgehalte
- klei/siltfractie
- totaal N-gehalte
- uitwisselbare fractie Mg
- isotopisch uitwisselbare fractie P
- zuurgraad
- bodemdiepte
- bodemtype
- seizoen
- vegetatie
- onderliggend gesteente.

De gemeten ruimtelijke variatie in fosfatase-activiteit binnen één bodemtype (RIVM-grond) blijkt groot te zijn (tot 124% verschil).

Toevoeging van toxische stoffen van dezelfde grond i.c. koperchloride geeft een verlaging van de fosfatase-activiteit. Een hoge dosis (5 maal de C-waarde Leidraad bodemsanering) levert op korte termijn een reductie in activiteit van 55%. De verandering door een zware verontreiniging blijft op korte termijn dus vele malen geringer dan de ruimtelijke variatie. Door deze ruimtelijke variatie zal het waarschijnlijk moeilijk zijn om verschillen in enzymactiviteit te koppelen aan de bodemkwaliteit.

Hierbij moet wel worden opgemerkt dat in deze studie de spreiding in ruimtelijke variatie NIET gecorreleerd is met bovengenoemde factoren als organisch stofgehalte, zuurgraad, vochtgehalte, etc.

Nader onderzoek moet zich met name richten op het verband tussen de enzymactiviteit en bovengenoemde factoren (organisch stofgehalte, vochtgehalte, vegetatie, etc.). Getracht moet worden deze verbanden per bodemsoort in empirische vergelijkingen vast te leggen. Met een dergelijke vergelijking kan dan de enzymactiviteit voor elk willekeurig monsterpunt per factor worden gecorrigeerd. Indien blijkt dat de ruimtelijke variatie

door deze correcties kan worden verklaard, kan bij een duidelijk verschil tussen gemeten en verwachte enzymactiviteit sprake zijn van een aantasting van de bodemkwaliteit. Nader onderzoek dient zich eerst te richten op een scheiding tussen belangrijke en onbelangrijke factoren, d.w.z. factoren die grote versus kleine invloed op de enzymactiviteit hebben.

5. LITERATUUR

Bonten, E. (1985)

Het modificeren van enkele activiteitsbepalingen van de volgende enzymen:

arylsulfatase, alkalische fosfatase en β -glucosidase in de bodem

Stageverslag RIVM

Leidschendam

Cleef, R.A.F. (1988)

Bodemkwaliteitseisen; stand van zaken en ontwikkelingen binnen het RIVM

Rapportnr. 728800002; RIVM

Bilthoven

Couperus, R. (1984)

De eigenschappen van arylsulfatase, alkalische fosfatase en β -glucosidase in enkele representatieve Nederlandse gronden.

Stageverslag RIVM

Leidschendam

Harrison, A.F. (1983)

Relationship between intensity of phosphatase activity and physico-chemical properties in woodland soils.

Soil Biol. Biochem. Vol 15, No 1, pp. 93-99.

I.U.B. (1964)

Recommendations of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and classification of enzymes. Elsevier.

London

In: Malcolm, R.E. (1983)

Assessment of phosphatase activity in soils Soil Biol.

Biochem. Vol. 15, No 4, pp. 403-408

Malcolm, R.E. (1983)

Assessment of phosphatase activity in soils

Soil Biol. Biochem. Vol. 15, No. 4, pp. 403-408

Skujins, J.J., Braal L. and Mcharen A.D. (1962)

Characterization of phosphatase in terrestrial soil sterilized with an electron beam.

Enzymologia 25, pp. 125-133.

Tabatabaia M.A. and Bremner J.M. (1969)

Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity.

Soil Biology & Biochemistry 1, pp. 301-307.

Bijlage 2

METHODE II: FOSFATASE-ACTIVITEIT IN GROND (naar RIN-procedure; mond. meded. Haanstra, 1988)

Principe:

De enzymen zuur-fosfatase (E.C.3.1.3.1.) en alkalisch fosfatase (E.C. 3.1.3.2) splitsen het kleurloze 4-Nitrophenylfosfaat in fosfaat en 4-Nitrophenol dat bij een pH > 8 sterk geel gekleurd is. De hoeveelheid gevormd 4-nitrophenol kan spectrofotometrisch bepaald worden. Zuur fosfatase heeft een pH-optimum bij pH 4-6 en het alkalische fosfatase heeft het optimum bij pH 8-10.

Reagentia:

4-Nitrophenylfosfaat (P.N.P.)

Los 1,856 g 4-Nitrophenylfosfaat Na₂zout (Merck no. 6850 of Serva no. 30770) op in 100 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 50 mmol l⁻¹ en dient in de koelkast bij 4^o bewaard te worden in bruine flessen.

Calcium-chloride

Los 147 g CaCl₂ · 2H₂O (Merck no. 2382) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 1 mol l⁻¹.

Natrium-hydroxide

Los 20 g NaOH (Merck no. 6498) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 0.5 mol l⁻¹.

Materiaal:

Polystyreen buizen (diameter 17 mm)/glazen potjes (80 ml) met blauwe schroefdop.

Schudwaterbad of incubator.

Centrifugebuizen.

Centrifuge.

Diverse pipetten.

Spectrofotometer.

Procedure:

Weeg de grondmonsters af in de polystyreen-buisjes of glazen fles. Gebruik ca. 1,0 g grond per monster en bepaal daarvan ook het vochtgehalte. Neem van iedere grond 3 monsters en 1 blanco. Voeg aan de drie metingen 4 ml gedemineraliseerd water en 1 ml P.N.P.-oplossing toe. Voor de blanco monsters alleen 4 ml gedemineraliseerd water. Plaats de buizen in het schudwater bad of in de incubator, gedurende 2 uur bij 30^o.

Voeg na de incubatietijd aan ieder monster 1 ml CaCl₂-oplossing toe en daarna 4 ml NaOH-oplossing. Voeg aan de blanco monsters nog 1 ml P.N.P. - oplossing toe. Schud buis krachtig en pipeteer 2,5 ml oplossing in een centrifugebuis. Centrifugeer 10 minuten bij 3000 rpm. Pipetteer 2,0 ml van het supernatant in een reageerbuis. Meet deze oplossing (eventueel na verdunnen) op de spectrofotometer bij 400 nm.

Bereken de omzettingssnelheid in micromol g⁻¹ uur⁻¹.

Bijlage 3:

Bodem -- bepaling van de urease-activiteit

Ontwerp NEN 5796

mei 1988

1. Onderwerp

Deze vorm beschrijft een methode voor het bepalen van de urease-activiteit (ureolytische activiteit van grond).

2. Toepassingsgebied

Deze norm is van toepassing op alle soorten grond. Bij de bepaling is het van belang dat het grondmonster homogeen is. De methode is niet bruikbaar bij inhomogene grondmonsters.

Deze norm is bedoeld om te worden toegepast bij de bepaling van de invloed van chemische stoffen op de urease-activiteit van grond.

3. Beginsel

Door incubatie van een grondmonster met een ureumoplossing wordt ureum door het enzym urease omgezet in koolstofdioxide en ammoniak. De resterende hoeveelheid ureum wordt fotometrisch bepaald en de urease-activiteit wordt berekend op basis van de snelheid van omzetting van ureum.

4. Reagentia

Gebruik alleen reagentia van analytisch zuivere kwaliteit en gedemineraliseerd water. De hierna vermelde ureumoplossingen dienen telkens vers te worden bereid, de overige oplossingen zijn tenminste 6 maanden houdbaar.

- 4.1. Ureumoplossing, $c(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}) = 0,06 \text{ mol/l}$.
- 4.2. Oplossing van fenylkwikacetaat in dimethylsulfoxide,
 $c(\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{Hg}) = 5 \text{ g/l}$.
- 4.3. Oplossing van fenylkwikacetaat en kaliumchloride in water,
 $c(\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{Hg}) = 5 \text{ mg/l}$.
Meng 1 ml van oplossing 4.2 met 1 l kaliumchloride-oplossing ($c(\text{KCl}) = 2 \text{ mol/l}$).
- 4.4. Oplossing van 2,3-butaanmonoxim (diacetylmonoxim) in water,
 $c(\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2) = 25 \text{ g/l}$.
- 4.5. Thiosemicarbazide-oplossing in water, $c(\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}) = 5 \text{ g/l}$.
- 4.6. Een mengsel van 1,5 g ijzer (III) chloride, 30 ml orthofosforzuur (85% m/m) en 45 ml gedemineraliseerd water.
- 4.7. Zwavelzuur, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/l}$.
Verdun geconcentreerd zwavelzuur, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$ ($\rho = 1,84 \text{ g/ml}$, 1:5 (V/V) met water.
- 4.8. Standaardureumoplossing, $c(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}) = 5,0 \text{ mmol/l}$.
- 4.9. Verdunde standaardureumoplossingen.
Pipetteer in maatkolven van 100 ml, resp. 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 en 10,00 ml van de standaardureumoplossing (4.8). Vul aan met fenylkwikacetaat/kaliumchloride-oplossing (4.3) en meng.
De zo verkregen oplossingen bevatten resp. 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; en 0,5 mmol/l aan ureum.

5. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijke laboratorium hulpmiddelen en toestellen en in het bijzonder de volgende:

5.1. Spectrofotometer geschikt voor metingen bij een golflengte van 525 nm.

5.2. Schudwaterbad, temperatuur 35⁰ C.

5.3. Zeef met maaswijdte van 2 mm.

5.4. Filtreerpapier, kwalitatief, fijn en langzaam filtrerend (aanduiding volgens NPR 6300).

5.5. Waterbad, temperatuur 100⁰ C.

5.6. Droogstoof, temperatuur 105⁰ C.

6. Analysemonster

Neem een representatief grondmonster en gebruik dit zo vers mogelijk. Ontdoe het grondmonster van grove delen, zeef zo mogelijk door de zeef (5.3) en homogeniseer het monster goed. Voorkom uitdroging gedurende deze handelingen.

Bepaal het watergehalte door wegen, drogen gedurende 16 h bij 105⁰ C, en herweging van een monster van ca. 10 g.

7. Werkwijze

7.1. Incubatie

Weeg in drievoud 6 à 7 g grond tot op 10 mg nauwkeurig in conische kolven van 100 ml en voeg 5 ml gedemineraliseerd water toe, alsmede 1 ml ureumoplossing (4.1). Weeg op dezelfde wijze voor de blancobepalingen in drievoud 6 à 7 g grond af en voeg alleen 5 ml gedemineraliseerd water toe. Sluit de kolven af en plaats deze gedurende 5 h in een schudwaterbad (5.2) bij een temperatuur van 35⁰ C.

Voeg vervolgens aan iedere kolf 50 ml van de fenylkwikacetaat/-kaliumchloride-oplossing (4.3) toe en aan de blanco's tevens 1 ml ureumoplossing (4.1).

Schud de monsters gedurende 10 min en filtreer vervolgens door fijn filtreerpapier (5.4). Pipetteer van de verkregen heldere filtraten 5 ml in maatkolven van 25 ml.

Opmerking

Indien de ureumconcentratie na 5 h incubatie lager is dan 4,5 à 5 mmol/l moet de bepaling worden herhaald met minder analysemonster en/of een kortere incubatietijd. In dit geval wordt aanbevolen om de lineariteit van de reactie in de tijd te bepalen met behulp van een tijdreeks, die ten minste 5 meettijdstoppen moet omvatten, en hieruit een juiste incubatietijd te bepalen.

Indien de grond een lage urease-activiteit heeft (<0,1 mmol/(kg.h), betrokken op droge grond)) dient een langere incubatietijd te worden aangehouden of een groter analysemonster in bewerking te worden genomen.

7.2. Analyse

Zie NPR 6400 voor algemene richtlijnen voor het uitvoeren van fotometrische bepalingen.

Bereid een kleurreagens door mengen van 150 ml zwavelzuur (4.7), 150 ml gedemineraliseerd water (4.6), 10 ml 2,3-butaanmonoximoplossing (4.4), 10 ml thiosemicarbazide-oplossing (4.5) en 0,15 ml van het ijzer (III) chloride/orthofosforzuur/watermengsel (4.6). Deze oplossing dient voor iedere bepaling vers te worden bereid.

Pipetteer 15 ml van het kleurreagens bij de heldere filtraten (of kalibratie-oplossing (zie 7.3)) in de maatkolven. Zet de kolven vervolgens gedurende 20 min in een waterbad bij een temperatuur van 100 °C. Na afkoelen in koud water dienen de maatkolven tot 25 ml te worden aangevuld met water. Bepaal vervolgens de extinctie tegen een blancofiltraat (7.1) als referentie in een spectrometer (5.1) bij een golflengte van 525 nm.

Opmerkingen

1. Deze bepaling kan ook in een doorstroomanalysestelsel worden uitgevoerd.
2. Indien uit de voorgeschiedenis of chemische analyse van de gebruikte grond aanwezigheid van koper wordt vermoed, dient rekening te worden gehouden met storing van de fotometrische bepaling door Cu^{2+} -ionen.

Deze storing kan worden opgeheven door toevoeging van 0,5 ml van een 5% (m/m) oplossing van 8-hydroxychinoline in 96% (V/V) ethanol aan de kolven, voor het verblijf in het schudbad en het filtreren zoals beschreven in 7.1. In dat geval moet aan de kalibratieoplossingen (7.3) 0,045 ml van deze oplossing worden toegevoegd.

7.3. Kalibratie

Bereid bij iedere meetserie een reeks kalibratieoplossingen. Pipetteer daartoe 5 ml van de verdunde standaardureumoplossingen (4.9) in maatkolven van 25 ml en pipetteer eveneens 5 ml fenylkwikacetaat/kaliumchlorideoplossing (4.3) in een maatkolf van 25 ml. Behandel deze oplossingen volgens 7.2. Bepaal de extinctie bij een golflengte van 525 nm tegen een blancofiltraat (7.1) als referentie en stel een kalibratiecurve op.

8. Berekening

Bepaald met behulp van de kalibratiecurve de ureumconcentraties in de met ureum geïncubeerde monsters en in de blanco's.

Bereken de urease-activiteit volgens:

$$A = \frac{(\bar{c}_b - \bar{c}) \times V}{t \times m}$$

waarin:

A is de urease-activiteit, in mmol/kg.h, betrokken op droge grond;

c is de gemiddelde ureaumconcentratie in het filtraat van de met ureum geïncubeerde monsters, in mmol/l;

\bar{c}_b is de gemiddelde ureumconcentratie in het filtraat van de blanco's in mmol/l;

V is het volume water plus ureumoplossing waarin de incubatie is uitgevoerd, in l (= 0,056 l);

t is de incubatietijd (zie 7.1), in h (= 5 h);

m is de droge massa van de grond, in kg.

9. Literatuur

Guidi, G, G. Poggia and G. Petruzzelli,
Determinazione automatica dell'urea nel terreno,
Proceedings Simposio Internazionale Technicon, Milano, 1973.

10. Verslag

Vermeld in het verslag:

- a. de gegevens die noodzakelijk zijn voor de karakterisering van de onderzochte grond;
- b. de gevolgde methode door de vermelding: volgens NEN 5796;
- c. de gevonden urease-activiteit, in mmol/kg.h, betrokken op droge grond;
- d. de eventuele bijzonderheden tijdens de bepaling waargenomen;
- e. alle niet in de norm voorgeschreven handelingen die het resultaat kunnen hebben beïnvloed.

Bijlage 4: Voorschriften voor de bepaling van de

- * beta-glucosidase activiteit in grond (mei '88)
- * arylsulfatase activiteit in grond (april '88)
- * Protease activiteit in grond (mei '88)
- * Rhodenase activiteit in grond (november '88)

Deze voorschriften zijn afkomstig van dhr. L. Haanstra (Rijksinstituut van Natuurbeheer te Arnhem).

beta-GLUCOSIDASE ACTIVITEIT IN GROND

Principe:

Het enzym beta-Glucosidase (E.C.3.2.1.21) splitst het kleurloze 4-Nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside in glucose en 4-Nitrophenol dat bij een pH > 8 sterk geel gekleurd. De hoeveelheid gevormd 4-Nitrophenol kan spectrofotometrisch bepaald worden.

Reagentia:

4-Nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (P.N.P.G.)

Los 0.3013 g 4-Nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (Merck no. 6793) op in 100 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 5 mmol l^{-1} en dient in de koelkast bij 4° bewaard te worden in bruine flessen.

Calcium-chloride

Los 147 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck no. 2382) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 1 mol l^{-1} .

Natrium-hydroxide

Los 20 g NaOH (Merck no. 6498) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 0.5 mol l^{-1} .

Materiaal

Polystyreen buizen (diameter 17 mm.)

Schudwaterbad of incubator

Kultuurbuizen

Trechters (9 cm)

Gevouwen filters (Schleicher en Schüll no, 602^h)

Spectrofotometer

Procedure:

Weeg de grondmonsters af in de polystyreen buisjes. Gebruik ca. 1.5 g grond per monster en bepaal daarvan ook het vochtgehalte. Neem van iedere grond 3 monsters en 1 blanco. Voeg aan de drie metingen 4 ml gedemineraliseerd water en 1 ml P.N.P.G.-oplossing toe. Voor de blanco monsters alleen 4 ml gedemineraliseerd water. Plaats de buizen in het schudwater bad, of in de incubator, gedurende 2 uur bij 30^o.

Schudfrequentie HETO-waterbad stand 3, amplitude 5 cm. Incubator ca 25 omwentelingen per minuut.

Voeg na de incubatietijd aan ieder monster 1 ml CaCl₂-oplossing toe en daarna 4 ml NaOH-oplossing. Voeg aan de blanco monsters nog 1 ml P.N.P.-oplossing toe. Schud iedere buis krachtig en filtreer de grondsuspensies tot een heldere oplossing.

Meet de verkregen oplossingen (eventueel na verdunnen) op de spectrofotometer bij 400 nm.

Bereken de omzettingssnelheid in micromol g⁻¹ uur⁻¹.

Opmerkingen:

** De aangegeven hoeveelheden en tijden zijn de normaal gebruikte. Het kan, al naar de eigenschappen van de grond en de opzet van een experiment nodig zijn deze aan te passen.

** In het sterk basische milieu na toevoeging van de NaOH vindt vrij snel chemische hydrolyse plaats. Meet zo snel mogelijk na het affiltreren en vermijd zoveel mogelijk direct zonlicht.

ARYLSULFATASE-ACTIVITEIT IN GROND

Principe

Het enzym arylsulfatase (E.C. 3.1.6.1) splitst het kleurloze 4-Nitrophenylsulfaat in sulfaat en 4-Nitrophenol dat bij een pH > 8 sterk geel gekleurd is. Arylsulfatase hydrolyseert sulfaatesters met een aromatische radikaal.

Reagentia:

4-Nitrophenylsulfaat, Kaliumzout (P.N.P.S.)

Los 0.1286 g 4-Nitrophenylsulfaat (Serva no. 30790) op in 100 ml. gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 5 mmol l^{-1} en dient in de koelkast bij 4° bewaard te worden in een bruine fles. De oplossing ontleeft vrij gemakkelijk in daglicht en in de tijd. Controleer oudere oplossingen met loog of de oplossing niet teveel vrij 4-Nitrophenol bevat (oplossing wordt dan sterk geel).

Calcium chloride

Los 147 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck no. 2382) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 1 mol l^{-1} .

Natrium hydroxide

Los 20 g NaOH (Merck no. 6498) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 0.5 mol l^{-1} .

Materiaal:

Polystyreen buizen (diameter 17 mm,)

Schudwaterbad of incubator

Kultuur buizen

Trechters (9 cm)

Gevouwen filters (Schleicher en Schüll no. 602^h)

Spectrofotometer

Procedure:

Weeg de grondmonsters af in de polystyreen buisjes. Gebruik 2 tot 3 gram grond per monster en bepaal daarvan ook het vochtgehalte. Neem van iedere grond 3 monsters en 1 blanco. Voeg aan de drie metingen 4 ml gedemineraliseerd water en 1 ml P.N.P.S.-oplossing toe. Voor de blanco monsters alleen 4 ml gedemineraliseerd water. Plaats de buizen in het schudwaterbad of in de incubator gedurende 2 uur bij 30°. Schudfrequentie HETO-waterbad stand 3, amplitude 5 cm. Incubator ca. 25 omwentelingen per minuut.

Voeg na de incubatietijd aan ieder monster 1 ml CaCl_2 -oplossing toe en daarna 4 ml NaOH-oplossing. Voeg aan de blanco monsters nog 1 ml van de P.N.P.S.-oplossing toe. Schud ieder buisje krachtig en filtreer de grondsuspensie's tot een heldere oplossing.

Meet de verkregen oplossingen (eventueel na verdunnen) op de spectrofotometer bij 400 nm.

Bereken de omzettingssnelheid in $\text{micromol g}^{-1} \text{uur}^{-1}$.

Opmerkingen:

** De aangegeven hoeveelheden en tijden zijn de normaal gebruikte. Het kan, al naar gelang de eigenschappen van de grond en de opzet van een experiment nodig zijn deze aan te passen.

** In het sterk basische milieu na toevoeging van de NaOH vindt vrij snel chemische hydrolyse plaats. Meet zo snel mogelijk na het affiltreren en vermijd zoveel mogelijk direct zonlicht.

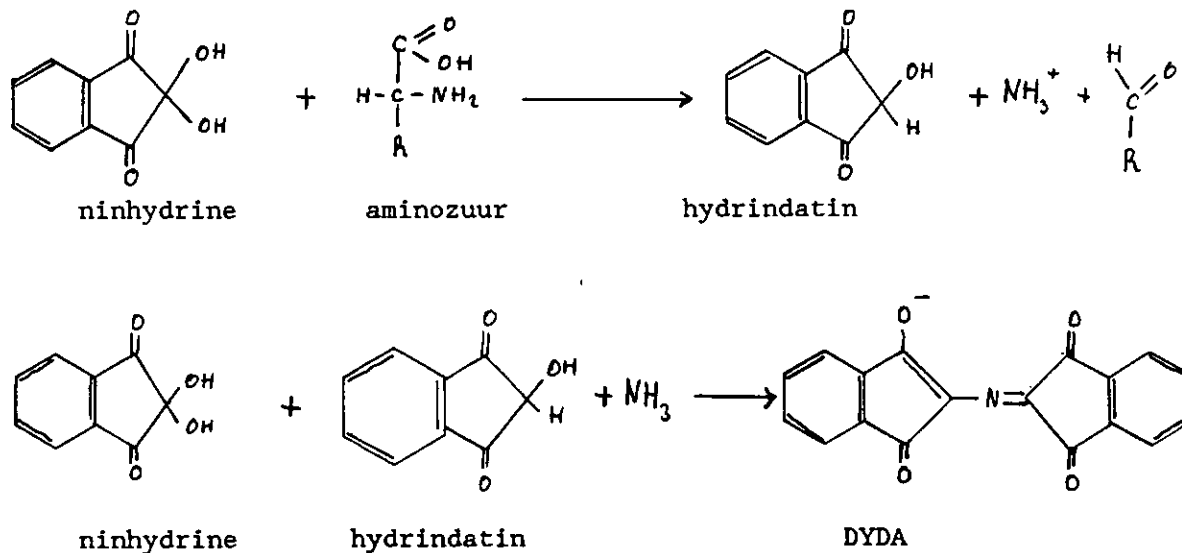
** De pH van de monsters dient, ook na verdunnen nog minimaal 10,0 te zijn.

PROTEASE ACTIVITEIT IN GROND

(moet nog getest worden!)

Principe

Het dipeptide derivaat N-Benzoyl-L-arginine amide (B.A.A.) wordt in de grond door proteolytische enzymen afgebroken waarbij arginine ontstaat. Dit kan met ninhydrine bepaald worden. Aminozuren reduceren ninhydrine en hydrindatin, de hierbij afgesplitste NH_3 reageert met ninhydrine en hydrindatin tot het intensief paarse diketohydrindylin denediketohydrindamine (DYDA).



In de grond komen echter meerdere ninhydrine-positieve verbindingen voor, dit maakt het noozakelijk dat er representatieve blanco monsters mee bepaald moeten worden.

Reagentia:

Benzoylarginineamide (B.A.A.)

Los 0.3318 g N-Benzoyl-L-arginineamid-hydrochloride Monohydraat (Fluka nr. 12890) op in 100 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 10 mmol l^{-1} en moet bij 4° bewaard worden.

5 mol. HCL

Vul 492 ml HCL 37% (Merck nr.317) aan tot 1000 ml met gedemineraliseerd water. Deze oplossing is 5 mol l^{-1} .

4 mol. Acetaat-buffer

Los 544 g Natrium-acetaat (Merck nr. 6267) op in 900 ml gedemineraliseerd water. Voeg hieraan 100 ml azijnzuur (Merck nr.62E) toe. De pH moet tussen de 5.45 en 5.55 liggen. Deze buffer is 4 mol l^{-1} .

Kleur reagens

Los 5 g Ninhydrine (Merck nr. 6762) en 0.75 Hydrindatin (Merck nr. 4510) op in 750 ml Methyl-Cellosolve (Äthylenglycolmonoethylether, Merck nr.859). Wanneer dit opgelost is voeg 250 ml 4 mol. Na-acetaat buffer pH 5.5 toe. Voer alle handelingen uit in bruin glaswerk en vermijd het oplossen van lucht. Het reagens is niet erg stabiel.

Ethanol-water

Verdun ethyl alcohol (technische kwaliteit) met een gelijk volume gedemineraliseerd water.

Arginine standaards

Los 210.67 mg L-Arginine monohydrochloride (BDH nr.37016) op in 100 ml gedemineraliseerd water. Verdun hiervan 2.000, 1.500, 1.000 en 0.500 ml tot 100 ml. Deze standaards zijn resp. 0.200, 0.150, 0.100 en 0.500 mmol l^{-1} arginine.

Materiaal:

Polystyreen buizen (diameter 17 mm)

Schudwaterbad of incubator

Trechters

Gevouwen filters (Schleicher en Schüll no. 602^h)

Reageer- of cultuurbuizen.

Waterbad (van 100°C)

Spectrofotometer

Mixer (Spinmix of Vortex)

Procedure:

Weeg in de polystyreen buizen 1 à 2 g grond af en bepaal het vochtgehalte. Neem van iedere grond 3 monsters en 1 blanco; de gewichten mogen niet meer dan 25 mg van elkaar verschillen. Voeg aan de monsters 6 ml B.A.A. toe en aan de blanco's 6 ml gedemineraliseerd water. Incubeer in het waterbad of de incubator gedurende 1 uur bij 40°C. Schudfrequentie HETO-waterbad stand 3, amplitude 5 cm. Incubator ca. 25 omwentelingen per minuut.

Voeg na de incubatietijd 1 ml 5 mol. HCl toe en filtreer de grond-suspensies af tot heldere oplossingen.

Pipetteer van de oplossingen 1 ml in een reageerbuis. Voeg hieraan, als de pH > 6 azijnzuur toe of als de pH < 5 NaOH toe ter neutralisatie (dit is zelden nodig). Voeg aan de monsters en de standaards 1 ml kleurreagens toe en verhit de buizen gedurende 15 minuten in het waterbad bij 100°C. Laat ze enigzins afkoelen en meng ze op de mixer gedurende 10 seconden. Voeg na afkoeling 5 ml. ethanol-water toe en meet de kleur direct bij 570 nm.

Bereken de omzettingssnelheid met de verkregen ijklijn in micromol omgezet substraat per gram droge grond per uur.

Referentie:

Aminozuur bepaling:

Moore S. and W.H. Stein (19??) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of aminoacids and related compounds. Journal of Biological Chemistry 211, 907-913

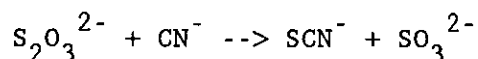
Protease bepaling:

Ladd J.N. and J.H.A. Butler (1972) Short term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biology and Biochemistry 4: 19-30

RHODANASE ACTIVITEIT IN GROND

Principe:

Het enzym Rhodanese (Thiosulfaat-cyanide sulfurtransferase; E.C. 2.8.1.1) kataliseert de reactie van thiosulfaat met cyanide. De activiteit wordt bepaald door het onstane thiocynaat om te zetten in IJzer(II)thiocynaat, dat fel oranje van kleur is.



Reagentia:

M.P.S. Buffer

Los 10.463 g 3-Morpholinopropaansulfonzuur (Merck Nr.6129) op in 950 ml gedemineraliseerd water. Breng de oplossing op pH 6.0 (ca. 4.4 ml NaOH van 1 mol l^{-1}) en vul aan tot 1 liter. Deze buffer oplossing is 50 mmol l^{-1} .

Kaliumcyanide

Los 3.256 g KCN (Merck Nr. 4967) op in 500 ml MPS buffer (50 mmol l^{-1} , pH 6.0). Deze oplossing is 0.1 mol l^{-1} .

Natriumthiosulfaat

Los 12.009 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr.6516) op in 500 ml MPS-buffer (50 mmol l^{-1} , pH 6.0). Deze oplossing is 0.1 mol l^{-1} .

Calciumchloride-Formaline

Los 14.70 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr.2382) op in 900 ml gedemineraliseerd water en voeg er 100 ml Formaldehyde-oplossing 37% (Merck Nr.4003) aan toe. Deze oplossing bevat 0.1 mol l^{-1} CaCl_2 en 3.6 mol l^{-1} formaldehyde.

IJzernitraat

Los 101.0 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr.3883) op in 785 ml gedemineraliseerd water en voeg er 215 ml HNO_3 (Merck Nr.452) aan toe. Deze oplossing is 0.25 mol l^{-1} Fe^{3-} en 3.1 mol l^{-1} H^+ .

Kaliumthiocyanaat

Los 0.9718 g KSCN (Merck Nr. 4967) op in 1000 ml gedemineraliseerd water. Deze oplossing is mmol l^{-1} .

Materiaal:

Polytyreen buizen (diameter 17 mm.)

Kultuurbuizen

Brede polystyreen buizen (diameter 26 mm.)

Schudwaterbad of incubator

Trechters (9 cm.)

Transferpettor 5 ml. (rode knop)

Gevouwen filters (Schleicher en Schüll no. 602^h)

Spectrofotometer

Zuurkast

Procedure:

Weeg de grondmonsters af in de polystyreen-buizen. Gebruik ongeveer 4 g grond per monster en bepaal daarvan ook het vochtgehalte. Neem van iedere grond 3 monsters en 1 blanco. Voeg aan de buizen voor de metingen 8 ml MPS-buffer, 1 ml 0.1 mol Natriumthiosulfaat en 1 ml 0.1 mol Kaliumcyanide. Laat in de buis van de blanco de Kaliumcyanide weg. Plaats de buizen in de incubator of in het schudwaterbad gedurende 2 uur bij 30° C. Schudfrequentie HETO-waterbad stand 3, amplitude 5 cm. Incubator ca. 25 omwentelingen per minuut.

Voeg na de incubatietijd aan ieder monster 8 ml CaCl_2 -formaline toe en aan de blanco nog 1 ml 0.1 mol Kaliumcyanide. Schud iedere buis krachtig en filtreer af in een brede buis. Oplossingen moeten helder zijn.

Pipetteer af in een brede buis. Oplossingen moeten helder zijn.

Pipetteer met een 5 ml. Transferpettor 5 ml van het filtraat en van de standaards in een kultuurbuis. Voeg aan iedere buis 1 ml IJzernitraatoplossing toe en meet de ontstaande kleur bij 460 nm op de spectrofotometer. Bereken de omzettingssnelheid in $\text{micromol g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Opmerkingen

*** Voer alle handelingen met geopende buizen met Kaliumcyanide uit in de zuurkast.

*** De aangegeven waarden zijn richtwaarde; al naar gelang de eigenschappen van de grond en de eisen van de proef kan het nodig zijn deze aan te passen.

*** Deze methode is de methode van Tabatabai en Singh (1976) gewijzigd m.b.t. de gebruikte buffer. de originele methode gebruikt Tris-buffer van dezelfde pH en sterkte.

Referentie:

Tabatabai M.A. and Singh B.B. (1976) Rhodanese activity of soils. Soil Science Society of America Journal **40**, 381-385.

november '88