

STANOVENÍ POTENCIÁLNÍ NITRIFIKACE PŮDNÍCH ORGANISMŮ

1. Předmět metody

Organicky vázaný dusík v půdě je působením mikroorganismů přeměňován na amoniak (amoniakace), který je dále oxidován na dusitaný a dusičnaný (1. a 2. fáze nitrifikace). Aktivitu nitrifikačních enzymů (1. fáze nitrifikace) můžeme stanovit metodou označovanou jako krátkodobá potenciální nitrifikace (SNA – short-term nitrification assay) nebo PAO (potential ammonium oxidation). Metoda je založená na stanovení produkce dusitanových iontů v půdě obohacené přídatkem amonného substrátu během krátké doby inkubace, kdy nedochází ke změnám ve velikosti mikrobiální populace.

Vzorky půdy jsou inkubovány v půdní suspenzi za neustálého třepání při teplotě 25 °C. Suspenze obsahuje saturující množství substrátu (síran amonný) a chlorečnan sodný, který působí jako inhibitor 2. fáze nitrifikace – oxidace dusitanů na dusičnany. Předpokládá se lineární nárůst koncentrace NO_2^- iontů v čase. V hodinových časových intervalech (do doby 6 hod) se odebírají vzorky suspenze, ve kterých se stanovuje množství dusitanových iontů.

Metoda je použitelná pro všechny typy a druhy půd. Půda by měla být odebrána a manipulována ve shodě s ISO 10381-6 (1993). Analýza by měla být provedena co nejdříve po odběru půdy. Před měřením by měla půda být skladována ve 4 °C maximálně 3 měsíce.

Metoda je vhodná i jako test toxicity přičemž můžeme testovat jak čisté chemické látky tak kontaminované pevné vzorky (kaly, půdy apod.). V prvním případě se testovaná látka přidává do pracovního roztoku pro inkubaci. V druhém případě je nutno zajistit zdravou a nekontaminovanou půdu s PAO cca $0,2\text{--}0,8 \mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{N.g}_{\text{suš}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, která slouží jako referenční.

2. Zdrojové normy a relevantní SOP

Zbíral J., Honsa I., Malý, S., Čížmár, D. (2004): Analýza půd III, Jednotné pracovní postupy, ÚKZUZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno. ISBN 80-86548-60-0. str. 152-154.

Alef, K. (1995): Nitrogen mineralization in soils. Assay of nitrification (short-term estimation). In Alef, K. and Nannipieri, P. (eds): Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press London. p. 241-242.

ISO 15685 (2004): Soil quality – Determination of potential nitrification – Rapid test by ammonium oxidation. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 10381-6 (1993): Soil quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

SoilECT-SOP-01: Stanovení sušiny a maximální vodní kapacity (WHC)

3. Materiál, pomůcky, chemikálie a přístroje

- 150 ml skleněné infuzní lahve; 15 ml plastové zkumavky s víčky
- váhy s přesností 0,1 g a analytické váhy s přesností 1 mg
- automatické pipety 5, 10 ml a 30-300 μ l, špičky, multikanálová mikropipeta 30-300 μ l
- třepačka, centrifuga, spektrofotometr na mikrodestičky
- odměrný válec 100 ml, odměrné baňky 1000 ml, 200 ml a 100 ml, lžička, mikrodestičky
- deionizovaná voda (dH_2O)
- 4 M KCl (298,24 g / 1000 ml)
- 2 M KCl (149,12 g / 1000 ml)
- 0,2 M dihydrogenfosforečnan draselný – KH_2PO_4 (2,72 g / 100 ml)
- 0,2 M hydrogenfosforečnan draselný – K_2HPO_4 (3,48 g / 100 ml)
- 1M chlorečnan sodný – NaClO_4 (10,6 g / 100 ml)
- síran amonný - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (řádově gramy)
- 0,19 M chlorid amonný – NH_4Cl (10 g / 1000 ml)
- 6 % roztok hydroxidu amonného – NH_4OH pro úpravu pH; získáme naředěním z koupeného roztoku 25% roztoku, např. 12 ml a 38 ml dH_2O (Lachner, kat. č. 30023)
- sulfanilamid (CAS: 63-74-1) (od firmy ROTH Prod. No. 4716.1)
- Griess-Ilosvayovo činidlo: N-(1-naftyl)ethylen-diamin dihydrochlorid (CAS: 1465-25-4) (od firmy Fluka Prod. No. 70721)
- kyselina fosforečná (H_3PO_4) koncentrovaná
- zásobní roztok 1000 μg NO_2^- -N / ml: 2,4629 g dusitanu sodného – NaNO_2 / 500 ml 2M KCl
- všechny roztoky výše vydrží cca měsíc, pokud jsou uchovávány ve 4 °C

Pracovní postup - PAO

Příprava a inkubace půdní suspenze

V případě použití vysušené půdy či půdy skladované v lednici: do větší nádoby si navážíme množství půdy, které budeme používat do testu a 5 g navíc. Půdu ovlhčíme na 60%, promícháme a zavřeme víčkem s otvorem. Půdu necháme při 22 °C aktivovat 4 – 7 dní.

Stanovení NO₂⁻ iontů

1. Do infúzních lahví 150 ml navážíme 3 x množství odpovídající 10 g suché půdy.
2. Ke vzorkům půd přidáme 20 ml roztoku **B** (obsahuje puřry, substrát k oxidaci (NH₄)₂SO₄ a chlorečnan amonný k zastavení oxidace NO₂⁻ na NO₃⁻), uzavřeme víčkem se skleněnou trubičkou (= aerobní prostředí, přístup vzduchu, po celou dobu inkubace), promícháme a dáme třepat na horizontální třepačku při amplitudě 180.
3. V časových intervalech 0 (před začátkem třepání), 3 a 6 hodinu od založení testu odebíráme z každého vzorku 2 ml suspenze pomocí automatické pipety se špičkou s odříznutým koncem a vatou před pipetou (poté co suspenzi rychle promícháme, aby odběr byl velmi reprezentativní).
4. 3 ml suspenze pipetujeme do 15 ml zkumavek a přidáme 3 ml roztoku 4M KCl (extrakce NO₂⁻ iontů). Promícháme a hned centrifugujeme 5 min při 4000 rpm (nastavíme 24 °C).
5. Supernatant přefiltrujeme do nové 15 ml zkumavky a stanovujeme na přístroji FIALab. Dusitanové ionty stanovujeme do půl hodiny od odběru.

Výpočet

Kalibrační přímkou sestrojíme z hodnot absorbance kalibračních roztoků. Z kalibrační rovnice vypočítáme množství dusíku ve formě dusitanových iontů v µg NO₂⁻-N / ml. Množství dusitanového dusíku v půdě v jednotkách µg NO₂⁻-N / g_{suš} se vypočítá podle rovnice:

$$\text{NO}_2\text{-N } (\mu\text{g} / \text{g}_{\text{suš}}) = (\mu\text{g NO}_2\text{-N} / \text{ml} \times 2 \times V) / 10$$

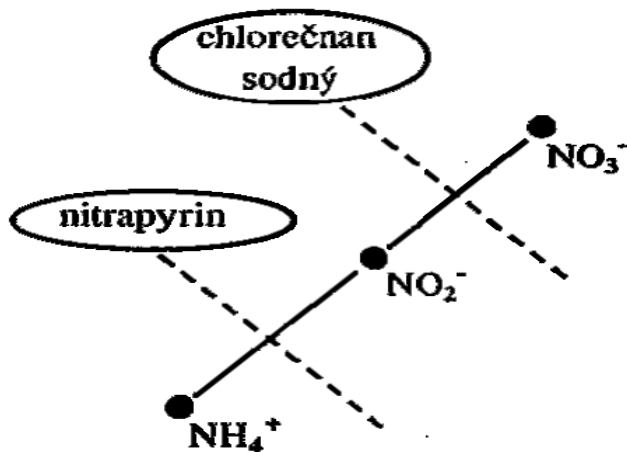
µg NO₂⁻-N / ml - koncentrace v suspenzi vypočítaná dle kalibrace

V - celkový objem (40 ml + objem vody již přítomné v půdě) – toto množství platí pro první odběr, další má již objem pouze 38, další 36 atd.

Získáme tak narůstající obsah NO₂⁻-N (µg / g_{suš}) pro 6 hodin po třech opakováních. Potenciální nitrifikace je vyjádřena jako produkce NO₂⁻-N za jednu hodinu vztažená na množství sušiny půdy. Tento výsledek získáme tak, že provedeme lineární regresi závislosti kumulativního obsahu NO₂⁻-N (µg / g_{suš}) na čase (např. v programu STATISTICA, modul Multiple regression - parametr B je "slope" regresní přímky a současně i PAO v jednotkách µg NO₂⁻-N.g_{suš}⁻¹.h⁻¹. Pokud je "intercept" statisticky nevýznamný, provedeme regresi s nastavením "intercept" roven nule. "Standard error of B" je S.D. pro PAO.

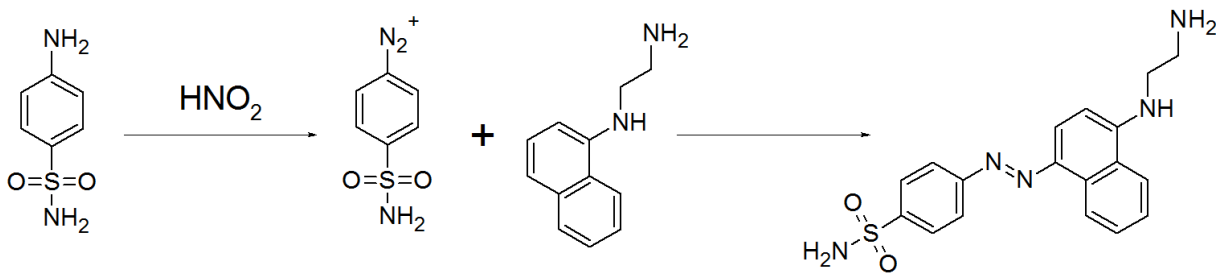
Princip metody

- PAO = ammonification, first step of nitrification
- 3 h oxidation of ammonium sulfate
- sodium chlorate added – stops nitrite oxidation to nitrate
- nitrite measured by colorimetric test



Princip měření:

Azo coupling of sulfanilamide acid and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine.png



Zdroj: Wikipedie ([https://en.wikipedia.org/wiki/N-\(1-Naphthyl\)ethylenediamine](https://en.wikipedia.org/wiki/N-(1-Naphthyl)ethylenediamine))