

# Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität

Version 1.2 (2020)

Code der Referenzmethode	B-DHA		Mögliche Einsatzbereiche	
Einsatzbereich	Düngeberatung	Ackerkulturen und Grasland		
		Gemüsebau (Freiland / Gewächshaus)		
		Weinbau, Obstbau, Beerenanbau, Gewürz- und Medizinalpflanzen		
	Standortcharakterisierung		x	
	Schadstoffbeurteilung			
	Düngeruntersuchungen	Recyclingdünger	Kompost	
			Gärgut fest	
			Gärgut flüssig	
			Klärschlamm	
		Hofdünger	Mist	
	Gülle			
Mineraldünger				
Pflanzkohle				
Forschungsmethoden				
Analysenprogramm	Probennahme			
	Probenaufbereitung			
	Aufschluss			
	Messung			
Konzentrations- / Messbereich				
Angabe der Ergebnisse	Menge freigesetztes $\mu\text{g}$ TTF pro Bodentrockensubstanz pro Tag, Genauigkeit 0.1 $\mu\text{g}$ .			
Bemerkungen für äquivalente Methoden				
Sicherheit / Umwelt				



## 1. Prinzip

Bodenmaterial wird mit einer Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC) versetzt und 24 Stunden bei 30 °C bebrütet. Das farblose TTC wird durch Dehydrogenasen zum roten Triphenyltetrazoliumformazan (TTF) reduziert. Das freigesetzte TTF wird mit Aceton extrahiert und photometrisch bei 546 nm gemessen.

## 2. Durchführung

### Apparaturen und Geräte:

- (A) Reagenzgläser d=20 mm, Höhe = 200 mm, mit Schraubverschluss
- (B) Glastrichter Ø ca. 75 mm
- (C) Glasgefässe für den Extrakt, z.B. Reagenzgläser
- (D) Faltenfilter 602 1/2 Schleicher und Schuell Ø 150 mm
- (E) Messkolben 0.1/0.5/ 1l
- (F) Photometer
- (G) Küvette d=1cm, optisches Spezialglas, Hellma
- (H) Brutschrank auf 30 ± 0.5 °C einstellbar
- (I) pH-Meter
- (J) Vortex

### Reagenzien:

- (1) TRIS-Puffer: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan zur Analyse (Pufferlösung)
- (2) TTC=2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid, Qualität ≥ 99,9 % (AT)
- (3) TTF=1,3,5-Triphenyl-tetrazoliumformazan
- (4) Aceton p. A.
- (5) Salzsäure (HCl) 12 M (32 %) p.A.
- (6) Demineralisiertes Wasser (H<sub>2</sub>O, Leitfähigkeit < 5 µS/cm)

### Arbeitsvorschrift:

- Trispuffer (Lösung I): 12.11 g TRIS (1) in 1l-Messkolben mit 600 ml Demin. Wasser (6) lösen und mit Salzsäure (5) für saure Böden (pH (CaCl<sub>2</sub>)<6) auf pH 7.8 einstellen, für neutrale Böden (pH (CaCl<sub>2</sub>) 6-7) auf pH 7.6 einstellen, für alkalische Böden (pH (CaCl<sub>2</sub>) > 7) auf pH 7.4 einstellen; mit Demin. Wasser auf 1000 ml auffüllen. (Im Kühlschrank haltbar.)
- Trispuffer mit TTC (Lösung II): Lösung I mit 0.1 bis 2 % TTC (2) versetzen (im Kühlschrank 1 Woche haltbar). Die optimale TTC-Konzentration (höchste Dehydrogenaseaktivität) muss in Vorversuchen für jeden Boden bestimmt werden
- Bestimmung der optimalen TTC-Konzentration: Die Proben sollen mit folgenden Substrat-Konzentrationen versetzt werden: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 und 2 % TTC. Bei der vermuteten optimalen Konzentration können anschliessend zur Bestätigung noch 0.1-er Schritte gemacht werden. Die optimale Konzentration liegt beim Maximum an gebildetem TTF.
- Kalibrierung:  
Aceton mit Trispuffer (Lösung III): 833 ml Aceton (4) und 167 ml Trispuffer (Lösung I, pH 7.6) werden gemischt.  
Stammlösung: Zu 100 ml der Lösung III werden 10 mg TTF gegeben.

- Kalibrierlösungen: Die Stammlösung wird mit Lösung III verdünnt, sodass Lösungen von 1 bis 60 µg TTF/ml für die Kalibrierung zur Verfügung stehen. z.B. je 10 ml:

	-ml Stammlösung D	-ml Lösung C
-	-	-
-1	-0.1	-9.9
-2	-0.2	-9.8
-5	-0.5	-9.5
-10	-1	-9
-20	-2	-8
-30	-3	-7
-40	-4	-6
-50	-5	-5
-60	-6	-4

- Arbeitsschritte, bei denen TTC oder TTF verwendet werden, müssen bei gedämpftem Licht erfolgen, da diese lichtempfindlich sind!
- 5 g Boden (Frischgewicht) werden in Reagenzgläser (A) eingewogen und 5 ml TTC-haltiger Puffer (Lösung II) zugegeben. Die Reagenzgläser werden verschlossen (Schraubverschluss); der Boden und der Puffer werden gut vermischt (2 mal 10 Sekunden auf höchster Stufe Vortex). Von einer Bodenprobe werden jeweils drei parallele Ansätze gemacht. Blindproben mit 5g Boden und Puffer ohne TTC (Lösung I) werden genauso angesetzt.
- Die so vorbereiteten Proben werden bei 30 °C für 24 Stunden im Brutschrank (H) inkubiert.
- Danach wird das gebildete TTF extrahiert, indem 25 ml Aceton (4) in die Reagenzröhrchen mit dem inkubierten Boden gegeben wird (Dispenser). Auf einer Schüttelmaschine werden die Proben 2 Stunden lang horizontal bei 200 U/min geschüttelt. Danach wird die Bödenlösung durch einen Faltenfilter (D) in ein weiteres Reagenzglas filtriert.
- Mit dem Photometer wird die Extinktion der Extrakte bei 546 nm gemessen. Proben, deren Extinktion > 1 ist, müssen 1:1 verdünnt werden.

### 3. Berechnung

Berechnung der Menge an gebildetem TTF bezogen auf Feinerde (TS):

Der Wert der Blindprobe (BP) wird vom Wert der Vollprobe (VP) abgezogen. Anhand der Kalibriergeraden wird aus der Extinktion die TTF-Konzentration bestimmt:

$y = VP - BP$  (Extinktion Vollprobe minus Blindprobe)

µg TTF/ml aus der Kalibriergeraden:  $x = (y - b) / a$

µg TTF/gTS/24 h =  $x \cdot \text{ml Probenlösung} / \text{g TS Bodeneinwaage}$

ml Probenlösung setzt sich zusammen aus 25 ml Aceton, 5 ml TTC-Puffer und ml Wasser in 5 g Boden

### 4. Resultatangabe

Resultat: Menge freigesetztes µg TTF pro Bodentrockensubstanz pro Tag, Genauigkeit 0.1 µg.

### 5. Bemerkungen

- Anwendungsbereich: Bei sauren Böden (pH CaCl<sub>2</sub> < 5.0) sollte der pH-Wert der Bodenlösung (Boden in Lösung II) überprüft werden. Bei einer starken Veränderung des pH-Wertes sind die erzielten Aktivitätswerte auffallend niedrig und sollten mit grosser Vorsicht interpretiert werden. Für Böden mit einem pH-Wert < 4 ist die Methode nicht geeignet.
- Zwischen verschiedenen Chargen TTC (auch vom selben Lieferanten) können beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen der Bestimmung auftreten, auch wenn beide Chargen die Qualitätskriterien der Chemikalienhersteller erfüllen. In der durchgeführten Ringanalyse

betragen die Unterschiede bis 15%. Die Ursache dafür könnte nicht eruiert werden. Da sich das Problem nicht lösen lässt, sollten neue Chargen stets mit den bisherigen verglichen werden. Für absolute Vergleiche von Ergebnissen zwischen Labors sollte auch TTC ausgetauscht und verglichen werden.

- Nach Korrektur der durch unterschiedliches TTC bedingten Unterschiede betrug die Streuung zwischen den Labors im Mittel 11%. Innerhalb der Labors betrug die Streuung zwischen den Laborwiederholungen bei 4 der 6 Böden unter 10%, bei den anderen beiden Böden mit Dehydrogenaseaktivitäten  $> 800 \mu\text{g TTF} / \text{g Boden} * 24 \text{ h}$  betrug sie zwischen 8 und 33%. Ein Labor, das die Methode zum ersten Mal durchführte ist dabei nicht berücksichtigt.
- Die Methode basiert auf der Methode von Thalmann (1968).
- An 2 Proben aus einem Laubwald und einer Naturwiese konnte nach Sterilisation des Bodens keine Reduktion von TTC festgestellt werden.

## 6. Historie

Version	Art der Änderung	neu	bisher
Version 1 (1999)	Erstellung Methode		
Version 1.1 (2000)	Überarbeitung Methode		
Version 1.2 (2020)	Editorisch	Elektronische Veröffentlichung mit geändertem Layout	

### Impressum

Herausgeber	Agroscope Reckenholzstrasse 191 8046 Zürich <a href="http://www.agroscope.ch/referenzmethoden">www.agroscope.ch/referenzmethoden</a>
Auskünfte	Diane Bürge
Copyright	© Agroscope 2020