

Biokémiai módszer a talaj biológiai aktivitásának meghatározására

KROLL LÁSZLÓ

Agrokémiai Kutató Intézet Mikrobiológiai Osztálya, Budapest

Bevezetés

Az újabbkori kutatások eredményeinek köszönhető az a felismerés, hogy a talajban uralkodó biológiai folyamat a talaj termőképességét nagymértékben befolyásolja. A talajélet intenzitása a talaj baktériumflórájától, algáitól, mikroszkópikus gombáitól és az állatvilág különböző apró képviselőinek munkájától függ. Minél erősebb ennek az együttesnek az életműködése, annál aktívabb a talaj és ez az oka annak, hogy mértékének meghatározására törekednek.

A talajélet intenzitásának megállapítására kezdetben direkt módszereket használtak, vagyis a különböző mikroorganizmusokat, különböző körülmények között (aerob, anaerob) és különböző táptalajokon kitenyésztették és megszámlálták. Ennek a módszernek azonban számos olyan hátránya volt, ami elterjedését a gyakorlati talajvizsgálatokban akadályozta. Egyetlen talajminta ilyenyszerű analiziséhez hatalmas apparátus, sok és jól felkészült személyzet és nem utolsósorban több hónap szükséges. Ugyanekkor a mennyiségi analízis a fajokon és fajtakon belül található minőségi eltérések miatt nem tükrözi vissza a néha lényegbe vágó különbségeket. Nem mindig a talaj-mikroorganizmusok száma a döntő, hanem az általuk indukált folyamatok mértéke, amely a szervesanyagok lebomlásában, tápanyagok felszabadításában stb. jut kifejezésre s amelyet együttesen a talaj biológiai aktivitásának nevezünk.

A közvetett út tehát célravezetőbb az aktivitás meghatározására. Értékes eredményeik miatt ezek közül kiemelkednek az érlelési és a talajlélekzési módszerek, melyekkel a talajvizsgáló laboratóriumok jelenleg is dolgoznak. Bizonyos célok elérésére igen alkalmasak ezek a módszerek; pl. a talaj nitrifikáló képességének és egyéb tápanyagok átalakulásának vizsgálata céljából, bomlás-szintézis megfigyelésére. Azonban a szántóföldi és erdőtalajok pillanatnyi biológiai állapotáról felvilágosítást nem adnak. Az érlelés során a talajt ugyanis olyan körülmények közé hozzák (egyenletesen magas hőmérséklet termosztátban), amelyben a szabad természetben sohasem volt, másrészt nem eredeti szerkezeti állapotban vizsgálják. Ezzel a módszerrel néha párhuzamosan a talaj lélekzését is megfigyelik, amelynek során az időegység alatt képződő CO_2 mennyiségét mérik. Ugyanazok a kifogások vonatkoznak a lélekzés mérésére is, ha csak nem helyszínen történik, mint az érlelésre. Tömegvizsgálatokra pedig különösen nem alkalmasak, mivel mindegyikhez hosszabb idő, helyszíni talajlélekzés mérésére drága felszerelés, érleléshez pedig nagy termosztát-tér szükséges.

A kutatások jelenleg arra irányulnak, hogy a talaj eredeti biológiai tulajdonságai lehető legkisebb változtatásával gyors, nagyobbmérvű felszerelést és személyzetet nem igénylő, a biológiai állapotot hűen visszatükröző módszereket dolgozzanak ki. Ugyanekkor valamilyen módon közös nevezőre kell hozni a fiziológiailag annyira eltérő makró- és mikroorganizmusokat anélkül, hogy a kitenyésztésükkel

járó technikai nehézségekkel megnehezítették az eljárást. Ezek figyelembevételével fordultak az enzimvizsgálatok felé, amelyek a talaj biológiai minőségének lehetőségeit jelentősen kiszélesítették.

Az első ilyen szerű vizsgálat az ú. n. kataláz-próba volt. A talajt hidrogénperoxiddal hozták össze és a fejlődő oxigén mennyiségét mérték. Ezeket a vizsgálatokat legnagyobb tökélyre Velasco (7) fejlesztette, aki módszerével gyakorlatilag értékes megfigyeléseket is végzett. Az eljárás elterjedését az akadályozta meg, hogy az alapreakció nem specifikus, vagyis a H_2O_2 -t nemcsak a peroxidáz-enzim, hanem egyéb, nem biológiai eredetű anyagok is felbontják (5).

A meghatározandó enzimek közül a hidrolázokat kell figyelembevenni, ezek közül is azokat, amelyekkel a talaj baktériumai, gombái és protozoái egyaránt rendelkeznek. Talajban ezeknek meghatározásával először Hofmann (1, 2, 3) foglalkozott. Ureázt, amilázt, invertázt határozott meg, s jelenlétüket minden talajban változó mennyiségben kimutatta.

A módszer leírása

1952-ben kezdtem el az említett célokért talaj-enzim vizsgálataimat. Elterjedtségük miatt a szacharázzal és az amilázzal foglalkoztam, meghatározásukra használható módszert keresve. Az amiláz jelenlétét a talajban ki tudtam mutatni, azonban a szubsztrátumra gyakorolt hatása nagyon csekély volt, s ezért gyakorlati szempontból elejtettem. A célnak sokkal jobban megfelelt a talaj szacharáz meghatározása. A szubsztrátumra gyakorolt hatása sokkal kifejezettebb és a különböző talajok között lényeges eltéréseket lehetett észlelni. Hofmann módszerét használva végeztem a meghatározásokat (3).

A talajt mintavétel után szobahőmérsékleten azonnal megszáritjuk, majd tiszta mozsárban a rögöket és a morzsákat eldörzsöljük és szitálással az esetleges gyökér-, trágya- és kavicsmaradványoktól megtisztítjuk. Ilyen előkészítés után hetekig nem változik a talaj enzim-értéke.

20 g szitált talajt 100 ml-es gumi- vagy üvegdugóval lezárható Erlenmeyer lombikba helyezünk, hozzáadunk 2,5 ml toluolt autolizátorként és alaposan összekeverjük. 15 perc múlva hozzáadunk 10 ml 5,5 pH-jú puffert és 10 ml 20%-os nádcukor kivonatot. Erősen meszes, vagy erősen savas, — különösen lápföldek-nél, — tanácsos a pufferral teljesen feltölteni, hogy a megfelelő pH érték állandóságát biztosítsuk. A puffer és cukoroldat hozzáadása után ismét jól felkeverjük és 37 °C-on termosztátba helyezük. 23 óra elteltével 37 °C-os vízzel 100 ml-re feltöltjük és ismét jól felkeverjük. A toluol a jel felett álljon. Egy óra múlva közönséges szűrőpapíron átszűrjük és ebből 10 ml-t kipipettázunk egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikba. Hozzáadunk 10 ml Fehling-keveréket és 5 ml vizet. A lombikot 5 percre forrásban lévő vízfürdőre állítjuk, majd Lehmann—Maquenne módszere szerint titráljuk, vagyis lehűlés után 4 ml 1 : 3 arányú H_2SO_4 -el megsavanyítjuk és 5 ml 20%-os KJ-oldatot adunk hozzá, majd a kivált jódot $n/10 Na_2S_2O_3$ -al visszaitráljuk. Vakkísérletben megállapítjuk a Fehling-oldat értékét n 10 thioszulfáttal. A kettő közt lévő ml differencia megfelel a cukor által redukált Fehling-keverék mennyiségének. Ezt a számot használjuk az enzim aktivitás mértékének. Nagy aktivitású talajok esetén elegendő 5, vagy 2 ml anyag de az eredményt 10 ml-re kell átszámítani. Ajánlatos egy vakpróbát talajjal, nádcukor nélkül is beállítani és a talajban mindig található eredeti redukálóképességeket levonni.

Kezdetben a talaj szilárd részének kihagyásával a talajkivonattal dolgoztam. Azonban a kirázás időpontjától, gyorsaságától s a talaj kolloidjaitól függően eltérő,

de minden esetben alig mérhető eredményeket kaptam. A talajban az enzimek úgylátszik erősen adszorbeálódnak s amint az inkubációs idő vizsgálatai mutatták, nehezebben aktiválódnak. Az 1. táblázat az inkubáció idejének vizsgálati adatait mutatja 2 szélsőséges esetet közölve.

1. táblázat
Az enzimaktivitás változása az inkubáció idején

(1) Talajtípus	óra (4)									
	1/2	2	4	8	16	20	22	24	26	28
Meszes agyag (2)	0	0	0.2	1.6	6.1	8.4	9.4	9.6	9.6	9.6
Meszes homok (3)	0	0.2	0.4	1.4	2.7	3.0	3.3	3.1	3.2	3.2

Az enzimológiai módszertanban ritka, hogy ilyen hosszú inkubációs időre van szükség ezeknél a vizsgálatoknál, azonban 24 órán belül minden talajfajleségnél a reakció kvantitatíve lejátszódik. A pH megválasztásánál figyelembe kellett venni, hogy baktériumoknak és gombáknak két különböző pH értéken van az optimális szaharáz aktivitása. Baktériumoké 5,5—6,0 pH érték között (sugárgombákat is beleértve), talajpenészeknél 4,8—5,2 pH-ig (4,5). Az 5,5 pH-értékkel mindkét csoport optimális zónáját igyekeztem elérni.

A meghatározásoknál különösen arra kell ügyelni, hogy a Fehling-oldatok elkészítése és adagolása a hasonló módszerektől eltérően a legnagyobb pontossággal történjék, mert itt a nem redukálódott Fehling-oldat mennyiségével számolunk.

A módszer kipróbálása

Legelőször a specifikusságát vizsgáltam, vagyis azt, hogy az észlelt reakció valóban a talaj biológiai tevékenységének hatására jön-e létre. Az enzim-fehérje sajátosságából kiindulva, hővel denaturáltam a talajban levő fehérjéket. Több talajjal, több hőfokon megismételve a vizsgálatot, bebizonyítható volt, hogy a nádcukor invertálásáért felelő ágens fehérjéhez kötött, mert 80 C°-on felül a redukálóképesség 0-ra csökkent (2. táblázat). Egy esetben 150 C°-on hőkezelés után is találtunk 0.5 értékű hatást, azonban ha az alacsonyabb hőmérsékleteken elért eredményeket figyelembe vesszük, nyilvánvaló, hogy a magas hő hatására a talaj eredeti redukálóképessége emelkedett.

2. táblázat
Hőkezelés hatása az enzimaktivitásra

(1) Talajtípus	(2) Talaj eredeti redukálóképessége	(3) Sterilizálás hőfoka C°	(4) Enzimaktivitás	
			(5) Eredeti	(6) Steril
Mezőségi vályog (7)	0.4	80	16.8	0.4
Mezőségi vályog (7)	0.4	100	16.8	0.4
Mezőségi vályog (7)	0.4	150	16.8	0.9
Nehéz agyag (8)	0.1	80	5.9	0.2
Könnyű vályog (9)	0.2	80	2.4	0.2

Továbbiakban összefüggést kellett keresni az általam mért enzimérték és a talaj tényleges biológiai aktivitása között. Arra nézve, hogy a kettő között szoros korreláció van, mindezeideig csak logikai feltevések voltak. Bizonyításra

ezért két talajszelvény különböző rétegeinek talajmintáit választottam, mert abban, hogy a mélység előrehaladásával a talajélet csökken, minden eddigi talajbiológiai vizsgáló megegyezik. Ugyanekkor összehasonlítottam a talajlélekezés és összes-baktériumszám általunk használatos módszerével (4) kapott eredményekkel. A talajlélekezésnél a számok 24 óra alatt fejlődött CO₂ mennyiségét jelentik mg-ban, a baktériumszámnál pedig 1 g talaj csíraszámát milliókban adjuk meg. A két talajszelvény tápiószelei szántóföldekről származott.

3. táblázat

Enzimaktivitás összefüggése a talaj mélységével, CO₂ termelésével és összes baktérium-tartalmával

(1) Talajréteg mélysége cm-ben	(2) Mezőségi talaj				(3) Meszes homoktalaj			
	(4) Összes bakt.	(5) Enzimaktivitás	CO ₂ mg		(4) Összes bakt.	(4) Enzimaktivitás	CO ₂ mg	
0—10....	46,0	18,6	2,6	humusz szint (6)	8,2	3,8	1,0	humusz szint (6)
10—20....	112,0	18,3	2,6		6,4	3,9	1,1	
20—40....	17,0	17,2	3,2		11,3	3,0	0,8	
40—60....	38,0	17,2	1,8		2,2	0,7	0,2	
60—80....	4,5	3,2	0,1		3,1	0,6	0,2	
80—100....	2,3	0,9	0,2		7,0	0,2	0,2	
100—120....	7,6	0,4	0,0		0,3	0,0	0,2	
120—150....	3,0	0,0	0,0	5,7	0,2	0,6	vízréteg (7)	

A 3. táblázat adataiból kitűnik, hogy az összes baktérium szám és a CO₂ képződés a felső, aktívabb szintekben magasabb, a mélyebb rétegekben alacsonyabb, azonban a humusz-szintből való átmenet kivételével fokozatokat nem találunk. Az enzimaktivitás a mélység növekedésével arányosan csökken és bár nagy általánosságban a csíraszámmal és a CO₂ képződéssel összefügg, az érzékenysége az átmenetek értékelésére sokkal kifejezőbb, mint a másik kettőé.

Itt felmerülhet az a gondolat, hogy az enzimérték a baktériumszámot miért nem követi szorosabban. Különösen mezőeségi talajban és meszes homokban, ahol elsősorban a baktériumok termelik a talaj enzimjeinek túlnyomórészét. Ennek valószínű magyarázatát a következőkben látom: A talajbaktériumok és gombák enzimjeinek legnagyobb százaléka, így a szaharáz is, exo-enzim, amelyek a talajban kiválasztódva — valószínűleg kolloidokhoz tapadva — az őket létrehozó organizmus pusztulása után is hosszabb ideig kifejtik enzimikus tevékenységüket. A baktériumok mennyisége viszont a legkisebb külső behatásra is rövid időn belül nagymértékben változik. Ez az ingadozás így nem vonatkozik az általuk produkált enzimekre is. Ezáltal az enzim-mennyiség mintegy átlagolja a talaj mikroorganizmusainak hullámzását és így meghatározásukkal az illető talaj biológiai képességéről a legreálisabb képet nyerjük. Hogy ezek az enzimek a talaj fiziko-kémiai tulajdonságaitól könnyen nem változnak meg, erre nézve Hofmannék-nak vannak kísérletei (6), akik enzim-kivonattal mesterségesen felemelték a talajok enzim-tartalmát és megvizsgálva azt találták, hogy a talaj enzim-tartalma 6 hónap mulva sem csökkent s azt többszörös mosás és centrifugálás segítségével sem lehetett eltávolítani. Az állandó enzim-kiválasztódás révén, különösen a kolloidokban gazdag talajoknál időleges felhalmozódás áll elő, amely miatt az 1. táblázatban is láthatóan, a sok kolloidot tartalmazó agyag és a kevés kolloidot tartalmazó homoktalajok között már eleve lényeges enzim mennyiségi differencia van. Ezért ilyen irányú vizsgálatoknál csak azonos fiziko-kémiai tulajdonságú talajok enzim-

aktivitása hasonlítható össze. Egy elméletileg elképzelt kolloidmentes homoktalaj enzimértéke a közelmúlt és jelenlegi biológiai aktivitás függvénye, míg a kolloidokban gazdag talajokban számolni kell egy régebbi idő óta felgyülemlett enzim-mennyiséggel. Hogy ez így van, azt a 4. táblázat adatai bizonyítják, ahol egy bőven trágyázott könnyű, kolloidokat alig tartalmazó homoktalajt, egy ugyancsak trágyázott, kolloidokban gazdag agyagtalajjal hasonlítottam össze. (Mindkettőn közel azonos mennyiségű kender termett).

4. táblázat

Azonos kendermennyiséget termelt, trágyázott homok- és agyagtalaj enzimértékének összehasonlítása

(1) Talajtípus	(2) Enzimaktivitás		
	IV. 15.	V. 20.	VI. 24
Trágyázott homok (3)	2,4	3,1	3,3
Trágyázott agyag (4)	8,8	11,9	13,3

Hogy az akkumulálódó enzim mennyiségét milyen tényezők csökkentik, ill. az akkumulációt a kolloidokon kívül még milyen tényezők korlátozzák, ezt még nem vizsgáltam, bár ilyen csökkenéseket éppen a trágyázott agyagtalajoknál már megfigyeltem. Ennek Seegerer vizsgálataiból (6) következtetve nemcsak fizikai, hanem biokémiai okai lehetnek.

Meggyőződésem, hogy a gyakran emlegetett globális talajéletet, amelyről eddig sok esetben technikai okok miatt ferde képet kaptunk, ezzel a módszerrel jobban meg lehet fogni anélkül, hogy biológiai vizsgálatokhoz felszerelt laboratórium szükségessé válnék. Ugyanekkor a talajbiológiai és mikrobiológiai kutatásoknak a további enzim-vizsgálatokra az eddiginél sokkal nagyobb mértékben ki kellene terjednie.

Ö s s z e f o g l a l á s

A H o f m a n n eljárásával (3) végzett szaharáz meghatározást kipróbáltam és megállapítottam, hogy ennek segítségével jól követhetőek a talajéletben bekövetkező változások.

Igazoltam, hogy az így mért enzimaktivitás biológiai eredetű. A csíraszám és a talajlélekzés változásaival összehasonlítva, a szaharáz-módszer gyorsabbnak és pontosabbnak bizonyult.

Vizsgálataim alapján az enzim-meghatározásokat használhatónak tartom a szabadföldi kísérleteknél a talajéletre gyakorolt hatás megítélésére.

Már a dolgozat a szerkesztőségben volt, mikor kézhez kaptam a Zeitschrift f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, 61. Band. 1953. 3. számát, melynek 251-ik oldalán Seegerer: »Der Saccharosegehalt des Bodens als Mnsstab seiner biologischen Aktivität«, című cikkében azonos módszert használva, hasonló megállapításokra jutott.

Érkezett: 1953. július 15.

I r o d a l o m

1. Hofmann, E.: Biochem. Zeitschr. 272. 133. 1934.
2. Hofmann, E.: Naturwissenschaften, 22. 406. 1934.
3. Hofmann, E.: Z. PflErnähr. Düng. 56. 68. 1952.
4. Hofmann, E. & Seegerer, A.: Biochem Zeitschr. 322. 174. 1951.
5. Kroll, L.: Agrokémiai Intézet Évkönyve III. 1951.
6. Scharrer K.: Landw. Vers. Stat. 107. 143. 1928.
7. Velasco, J. R.: Anales Real. Soc. Espa. Fis. y. Quim. 45. B, 821. 1949.

БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Л. Кролл

Отдел Микробиологии Агрохимического Научно-Исследовательского Института Будапешт

В ы в о д ы

Автором было проведено определение сахарозы методом Гофмана и установлено, что при помощи этого метода можно хорошо следить за изменениями в жизнедеятельности почвенных микроорганизмов. Доказано, что измеренная таким путем активность ферментов, имеет биологическое происхождение. Метод сахаразы оказался более быстрым и точным по сравнению с измерением изменений количества микробы дыхания почвы.

На основе своих исследований, автор считает определение ферментов пригодным для обсуждения влияния полевых опытов на жизнедеятельность почвенных микроорганизмов. Уже после отдачи рукописи в редакцию автор узнал что Сегерер сделал подобные выводы.

Т а б л. 1. Изменение активности ферментов в период инкубации. (1) Тип почвы. (2) Известковая глинистая почва. (3) Известковая песчаная почва. (4) Час.

Т а б л. 2. Влияние термической обработки на активность ферментов. (1) Тип почвы. (2) Исходная редуцирующая способность почвы. (3) Температура стерилизации (в С°). (4) Активность ферментов. (5) Исходный. (6) Стерильный. (7) Суглинистый чернозем. (8) Тяжелая глинистая почва. (9) Легкая суглинистая почва.

Т а б л. 3. Связь активности ферментов с глубиной, продукцией CO₂ почвы и общего содержания бактерий в почве. (1) Глубина почвенного слоя (в см). (2) Черноземная почва. (3) Известковая песчаная почва. (4) Всего бактерий. (5) Активность ферментов. (6) Перегнойный горизонт. (7) Слой воды.

Т а б л. 4. Сравнение величин ферментов удобренной песчаной и глинистой почвы из-под сходных урожаев конопли. (1) Тип почвы. (2) Активность ферментов. (3) Удобренная песчаная почва. (4) Удобренная глинистая почва.

Méthode biochimique pour déterminer l'activité biologique du sol

L. KROLL

Section de Microbiologie de l'Institut des Recherches Agrochimique, Budapest

Résumé

Nous avons fait l'essai de la méthode de Hofmann pour le dosage de la saccharase et nous avons trouvé qu'à l'aide de cette méthode l'on peut bien suivre les changements survenus dans la vie du sol. Nous avons prouvé que l'activité enzymique ainsi déterminée est d'origine biologique. En comparaison avec les variations du nombre des germes et de la respiration du sol le dosage de la saccharase est plus rapide et plus précise.

D'après nos recherches nous sommes d'avis que le dosage de l'enzyme constitue un procédé applicable pour juger de l'effet exercé par les expériences en pleine terre sur la vie du sol.

Notre manuscrit a été déjà à la rédaction lorsque nous avons pris connaissance du travail de Seegerer paru dans la Zeitschrift f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde. 61; 251. 1953 dans lequel l'auteur est arrivé à des résultats pareils en employant une méthode identique à la notre.

Tableau 1. Variations de l'activité de l'enzyme avec le temps d'incubation. (1) Type du sol. (2) Argile calcaire. (3) Sable calcaire. (4) Heures.

Tableau 2. L'effet de la chaleur sur l'activité de l'enzyme. (1) Type du sol. (2) Pouvoir réducteur initial du sol. (3) Température de la stérilisation, en C°. (4) Activité de l'enzyme. (5) Original. (6) Stérilité. (7) Terre franche légère.

Tableau 3. Relation entre l'activité de l'enzyme avec la profondeur du sol, sa production d'acide carbonique et sa teneur en bactéries. (1) Profondeur du sol, cm. (2) Sol des steppes. (3) Sol sableux calcaire. (4) Nombre total des bactéries. (5) Activité de l'enzyme. (6) Couche humifère. (7) Couche d'eau.

Tableau 4. Comparaison de la valeur enzymatique d'un sol sableux et d'un sol argileux fumés ayant produit la même quantité de chanvre. (1) Type du sol. (2) Activité de l'enzyme. (3) Sable fumé. (4) Argile fumée.