

Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel II. Cellulázaktivitás mérése talajban és trágyában

MÁRKUS LÁSZLÓNÉ

Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai Osztálya, Budapest

Előző munkánkban [15] a Dreywood-féle antron reakciót [10] alkalmaztuk modell oldatokban a különböző szénhidrátok meghatározására. Ez a módszer több szempontból előnyösnek mutatkozik, mert 1. a poliszaharidok előzetes hidrolízis nélkül közvetlenül meghatározhatók, 2. érzékenysége mikromennyiségek (10—200 γ /2,5 ml) mérésére teszi alkalmassá, 3. közvetlenül alkalmazható, ha csak aldo- vagy keto-hexózok, illetőleg pentózok vannak jelen, 4. független a szénhidrátok redukálóképességétől.

Ezek az előnyök, valamint a meghatározások aránylag egyszerű volta tették indokolttá a módszer gyakorlati alkalmazását, elsősorban poliszaharidok esetében. Egyik alkalmazási terület a cellulázaktivitás mérése, mely a mezőgazdaságban nagy gyakorlati és elméleti jelentőségű.

A cellulóz képezi legnagyobb részét azoknak a szerves anyagoknak, melyek minden évben visszatérnek a talajba (növényi hulladék, avarlevél, trágya). A cellulóz degradációja és mineralizációja a föld felületén lejátszódó egyik legfontosabb folyamat. E folyamat során főleg biológiai erők hatnak és ebből következik, hogy a cellulóz lebomlás igen eltérő életerekekben, igen eltérő körülmények között játszódik le. Pl. a talajban, trágyában, silóban, korhadó fában, iszapban, folyókban, a növényevők emésztő-rendszerében stb.

E biológiai folyamat során a talajba jutott növényi maradványok cellulóz-anyaga úgy bomlik el, hogy a növények, az állatok és a mikroorganizmusok számára nitrogénmentes tápanyagot szolgáltat. Ezzel közvetlenül befolyásolja a talaj nitrogénforgalmát. A cellulózbontó baktériumok ugyanis szervesen nitrogénvegyületeket vonnak el a talajból: fokozzák a denitrifikációt. Ez károsná válhat, ha a talaj szellőzését biztosítani nem tudjuk és feleslegesen nagy cellulóztartalmú istállótrágyát juttatunk a talajba. Ezért van a trágya előzetes erjesztésének, a cellulózbomlás megindításának olyan nagy gyakorlati jelentősége [5].

A talajokban lefolyó cellulózbomlás mértékének megállapítására az irodalom több módszert említ. A talajok laboratóriumi vizsgálatára a Holodnáj [6], illetőleg a Bengtsson[4] — és a Charpentier-féle eljárás [1] terjedt el. Az őrölt szűrőpapírral kevert talajmintákat termosztátban tartják és egy hetes időközökben Schweitzer-reagenssel kioldva, — a maradék cellulózt gravimetriчески visszamérik. A bomlás mértéke a keletkező CO₂ mérésével is jellemezhető [6,16].

A talajok cellulózbomlásának vizsgálatára Kuznjar [14] ismert súlyú szűrőpapírt ástott el a talajok különböző rétegeiben és egy év múlva ugyancsak a maradék cellulóz mennyiségét állapította meg gravimetriчески.

E vizsgálati módszerekkel csak igen durva megközelítéssel, körülményesen nyerhetünk adatokat. Az antron reakció már említett előnyei miatt ideálisnak mutatkozik a bomlás mérésére, mert mikrováltozások is nyomon követhetők, így megrövidíti a cellulózbomlás mérésének idejét. A vizsgálati anyag a talaj- és trágyaféleségek szabadföldi és laboratóriumi vizsgálatára egyaránt felhasználható.

Mint ismeretes, a természetes cellulóz az enzimhidrolízisnek sokkal jobban ellenáll, ezért duzzasztott, regenerált, vagy valamiképpen kezelt cellulóz használata sokkal ajánlatosabb cellulázaktivitás mérésére. A gyapot, a szűrőpapír [15] és a poralakú karboximetilcellulóz [3] mennyisége jól meghatározható antron reagenssel és egyaránt használhatók szubsztrátumként cellulázaktivitás mérésére, mégis a celofánt találtuk legmegfelelőbbnek az alábbi előnyei miatt:

1. Nálunk a kereskedelemben kapható, vizskóz eljárással készült celofánok azonos tulajdonságúak és minőségűek. A szűrőpapírok — bár gyorsan bomlanak és használhatók szubsztrátumként — nagyon eltérők lehetnek minőség tekintetében. Karboximetilcellulóz nem áll rendelkezésünkre.

2. A celofán a szűrőpapírral ellentétben nem rostos szerkezetű, ezért a talaj és trágyamaradványok anyagvesztéség nélkül leáztathatók és lemoshatók róla. Poralakú készítményekkel, vagy örölt szűrőpapírral nem kísérleteztünk, mert szabadföldi vizsgálatokra nem alkalmasak.

3. A celofánon a mikroorganizmusok fejlődése különösen jellegzetes [14]. Alkalmasabb tehát arra, hogy segítségével a talajban a cellulózbontó mikrobák fejlődését is megvizsgáljuk. A baktériumok homályos, fehér színeződést adnak, a gombák szürke, barna, fekete, zöld, piros színeződést és berágódást mutatnak.

A celofán hátránya, hogy nehezen vehető észre, ezért cellulózmentes, ritkaszővésű üvegszövetbe varrva helyezzük el szabadföldi vizsgálatok alkalmával. Ezen az üvegszöveten a baktériumok is és az enzimek is áthatolnak.

Kísérleti rész

A régi bizonytalan és lassú gravimetricus módszerek helyett — az antron reakció segítségével — kolorimetricus módszert dolgoztunk ki talajok és istállótrágyák cellulózbomlásának vizsgálatára, melyet az alábbiakban ismertetünk.

A celofán mennyiségének meghatározása antron reagenssel

Első feladatunk az volt, hogy megállapítsuk azokat a körülményeket, amelyek között a meghatározások elvégezhetőek. Meg kellett állapítani a színkifejlődés idejét, a kifejlődött szín állandóságát, elkészíteni az etalon görbét és meghatározni a módszer érzékenységét és pontosságát.

Törzsoldat és anyag előkészítése

10–20 mg-os MGF gyártmányú torziós mérlegen egészen pontosan 10 mg-os cellofáncsíkokat (kb. 2,5 cm² felületű) mérünk le és ezeket 200 ml-es normál lombikba helyezve feloldjuk 20 ml 60%-os kénsavban. Egy órai állás után feltöltjük vízzel, majd kihülés után jelig töltjük. Öt perces időközökben végzett feltöltési kísérletek azt mutatják, hogy előbb nem tanácsos feltölteni a kénsavas celofánoldatot, mert a celofán kicsapódik és pelyhes, vagy zavaros oldatot kapunk.

A celofánlemezek vastagsága nem teljesen egyenletes, az azonos súlyú celofándarabok nem pontosan azonos felületűek, tehát sablonnal nem vághatók ki a cellofáncsíkok.

Antron reagens készítése és az antronozás keresztülvitele

5 ml vízhez 100 ml koncentrált kénsavat adunk, majd kihülés után 200 mg antront oldunk fel benne. Az így elkészített reagenst jégre téve 4 órai állás után használhatjuk. (Házi készítésű antronnal dolgoztunk.)

A törzsoldatból hígítási sort készítünk és ezekből 2,5 ml-t pipettázunk bórszilikát kémcsövekbe. Hideg vízben hűtve a csöveket 5 ml 0,2%-os antron reagenst csepegtetünk hozzá bürettából állandó rázogatózás közben. Ezután üveg-

kupakot téve rá forró vízfürdőben tartjuk 5 percig. 15 percnyi folyóvizes hűtés után a Pulfrich-féle fotométer S 61-es szűrőjével mérünk.

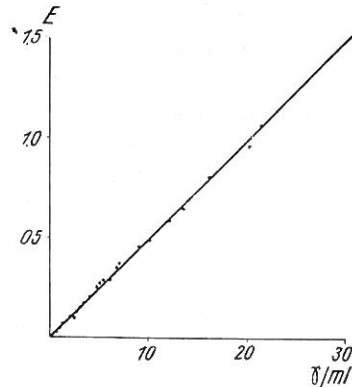
Színkifejlődés ideje és színállandósága

A celofán hidrolízise glukózt ad, ezért az aldohexóz típusú polimerek csoportjába tartozik. Antronált származéka 5 perces melegítésre éri el a színintenzitás maximumát és a kifejlődött szín több óra elteltével is csak alig változik.

A kalibrációs görbe elkészítése

A kalibrációs görbe elkészítésére 1 mg-tól 10 mg súlyú, tehát kb 0,5 cm²-től 2,5 cm² felületű celofándarabokat helyeztünk el külön-külön 50, 100, és 200 ml-es normál lombikban, és feloldottuk 5, 10 és 20 ml 60%-os kénsavban. Ezek mindegyikéből kalibrációs görbét készítettünk.

A módszer érzékenysége az 1. sz. standard görbe jellemző 0,3γ/ml — 33,3γ/ml koncentrációk között. Ezek a mennyiségek a hígítás sorozatából kivett oldatok, 2,5 ml-ében található. Ehhez adtuk az 5 ml antron reagenst, tehát a mérés mindig 7,5 ml végtérfogatban történt. A méréseket 0,33—2,00 γ/ml koncentráció között 2 cm-es küvettával, 2,00—15,00 γ/ml koncentráció között 1 cm-es küvettával az ennél koncentráltabb oldatok esetében 0,5 cm-es küvettával végeztük. A görbe adatait 1 cm-es küvettára számoltuk át.



1. ábra.

A celofán antronált származékának standard görbéje 0,3 γ/ml — 33,3 γ/ml koncentrációk között E = extinkció középértéke.

A módszer pontossága

A módszer pontosságának megállapítására ötszörös párhuzamban készítettük el a törzsoldatok kalibrációs görbéit. A törzsoldatok azonos mennyiségét tartalmazó részeit mérve az 1. táblázat eredményeit kapjuk.

1. táblázat

A celofán mikromeghatározásának pontossága antron reagenssel 2—16 γ/ml koncentrációk között

Oldat száma	Koncentráció γ/ml	Extinkció	Középhehiba a középérték %-ában ± m%	Oldat száma	Koncentráció γ/ml	Extinkció	Középhehiba a középérték %-ában ± m%
1	2	0,09	3,3	1	13,3	0,66	1,5
2	2	0,09		2	13,3	0,69	
3	2	0,10		3	13,3	0,65	
4	2	0,08		4	13,3	0,65	
5	2	0,09		5	13,3	0,63	
1	4	0,18	3,3	1	16,0	0,80	0,5
2	4	0,21		2	16,0	0,82	
3	4	0,19		3	16,0	0,82	
4	4	0,18		4	16,0	0,84	
5	4	0,18		5	16,0	0,82	
1	8	0,40	1,5				
2	8	0,41					
3	8	0,38					
4	8	0,38					
5	8	0,38					

Az eredményekből megállapítható, hogy a módszer teljes mértékben megfelel egy kvantitatív mikromódszer követelményeinek.

A cellulázaktivitás-mérés módszerének kidolgozása

Annak megállapítására, hogy a celofánnal milyen érzékenyen követhető a cellulóz lebomlása, a csiga béltartalmát használtuk fel. Ez ugyanis gyorsabban bont, mint a talaj, vagy a trágya.

Az anyag előkészítése

A csiga boncolása Weidenhagen szerint [2]. Az éticsigákat három napig éheztetjük. Többször fürdetjük, hogy a bélsártól teljesen kitisztuljanak. Három nap elteltével a kibújt csigákat vízbe dobjuk és hálóval víz alá szorítjuk őket, hogy megfulladjanak.

A boncolás úgy történik, hogy a házat az összenövés mentén erős fogóollóval csaknem végig feltárjuk. Éles ollóval végig felnyitjuk a köpeny ürterét. Ezután levágjuk a mirigyes köpenyperemeket és az állat baloldalán a bőrt egészen a szájig végignyitjuk. Ezután megfordítjuk az állatot és a zsigerzacskót metszük fel egészen a szívig. Csak ekkor következhet a bélsatorna kiemelése. A garatnál és a végbél közelében elvágott bélsatorna tartalmát jéggel hűtött főzőpohárba csurगतjuk.

Szűrés és centrifugálás után a sötétbarna nedvet marhabélban kétszer 24 óráig áramló vízvezetéki vízzel dializáljuk. Utána 5,8 pH-jú foszfát-pufferben jégszekrényben dializáljuk 24 óráig (1/5 n NaOH és 1/5 n KH_2PO_4). A pufferből kivett anyagot G4-es üvegszűrőn szűrjük.

100 db éticsigából a nagyságtól függően kb. 30–35 ml béltartalmat kapunk. A szűretlen, valamint a dializált csigabéltartalom fehérje-nitrogén tartalma 8 mg/ml volt.

Citromsav-foszfát-puffert használtunk a cellulózbomlás vizsgálatához. I. oldat: 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sörensen) 1 liter oldatban. II. oldat: 21 g citromsav 1 liter oldatban. Ezek megfelelő arányú keverésével készítettük el a kívánt pH-jú oldatokat.

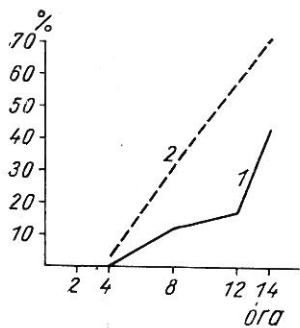
Eszközök. A cellulózbomlás vizsgálatára 20 × 80 mm-es kémcsöveket használtunk, amelyekbe gumidugón átszűrt üvegekampócskákat helyeztünk. Ezekre akasztottuk a 10 mg-os celofáncsíkokat. Az egyik sorozatában 5 ml különböző pH-jú puffert és 0,5 ml csigabélnedvet pipettáztunk, a másik sorozatba 8 ml puffert és 1,0 ml nedvet tettünk. A vizsgálatokat 28 °C és 38 °C-on végeztük. A maradék celofánokat két órás időközökben kiemeltük, vízzel alaposan leöblítettük, levegőn megszáritottuk. (Szükséges ez a szárítás, mert a nedves celofán az edény nyakára tapad és körülményes innen leoldani). A száraz celofánokat 100-as normál lombikba ejtettük, feloldottuk 10 ml 60%-os kénsavban, feltöltés után 2,5 ml-ét antronoztuk.

Vizsgálatok

A csigabélnedv cellulózbontó képessége különböző pufferekben. Annak eldöntésére, hogy milyen összetételű pufferoldatot használjunk, összehasonlító vizsgálatot végeztünk, 4,95 pH-jú acetát és 4,9 pH-jú foszfát pufferben. Azt találtuk, hogy a foszfát pufferben a bomlás gyorsabb. Ez valószínűleg összefügg azzal az általános tapasztalattal, hogy az oldható foszfát-tartalom növelése fokozza a cellulózbomlást a kedvező foszforilálási feltételek miatt. Az ecetsav esetleg gátolja ezt a folyamatot. Az eredményeket a 2. ábra mutatja. A továbbiakban a vizsgálatokat foszfát pufferrel végeztük.

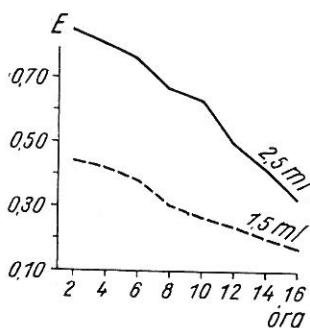
Cellulózbomlás lefolyása csigabélmedvben : Ezt a vizsgálatot 5,5 pH-n 35 C°-on végeztük ötszörös ismétlésben. A két óránként kivett celofáncsíkokat a fent leírt módon kezeltük, 200 ml-es törzsoldatból 1,5 és 2,5 ml-es mennyiségeket antro-noztunk. A celofánbomlás eredményeit a 3. ábra mutatja.

A celofán bomlása minden esetben nehezen indult, a második órában még nem volt mérhető. A celofán nem színeződött el még 16 órás bomlás után sem. Újabb



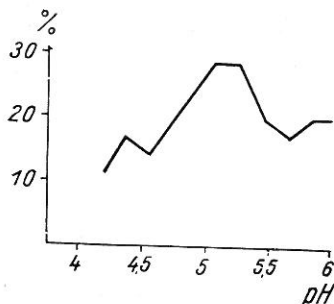
2. ábra.

A csigabélmedv cellulózbontó képessége acetát (1) és foszfátpufferben (2) a celofán, lebomlás százalékában.



3. ábra.

Cellulózbomlás lefolyása csigabélmedvben, celofánon mérve. 35°-on és 5,5 pH-on 2 órás időközökben (E = extinkció).



4. ábra.

A csigabélmedv cellulózbontó képessége különböző pH-jú foszfátpufferben 28 C°-on a celofánbomlás %-ában.

adatok ugyanis a csigabélmedv cellulázának baktériumos eredetéről is beszámolnak [7]. A celofán szakítószilárdsága fokozatosan csökken, majd szétmállik, ezért 16 óránál hosszabb ideig tartó vizsgálatok céljaira a celofáncsíkokat célszerű üvegszövetbe helyezni.

A csigabélmedv cellulózbontó képességének optimális pH-ját keresve az irodalmi adatokkal megegyező eredményeket kaptunk [9]. 8 ml különböző pH-jú foszfátpufferben 1 ml csigabélmedv volt. A 10 mg-os celofáncsíkokat 28 C°-on, kilenc óra múlva a 4. ábrán feltüntetett módon bontotta el. Az értékeket a celofánbomlás %-ában adjuk meg.

Az adatok azt mutatják, hogy a csigabélmedv cellulózbontó képességének optimális pH-ja 28 C°-on 5,05–5,25 között van.

A módszer alkalmazása

A talajok cellulózbontó képességének vizsgálata liziméterekben

Szabadföldi vizsgálatokra az Agrokémiai Kutató Intézet kertjében elhelyezett liziméterek talajait választottuk, mivel ezek talajvizsgálati adatai rendelkezésünkre álltak.

10 és 30 cm mélységben helyeztük el az üvegszövetbe varrt 10 mg súlyú celofánokat. A celofándarabok 1954 augusztus elejétől 1954 október elejéig voltak a talajban. Az adatok tehát e két hónap alatt lefolyt cellulózbomlás mértékét mutatják (2. táblázat).

Könnyebb kezelhetőség érdekében alkalmasabbnak mutatkozik nagyobb celofán darab használata (kb. 36 vagy 64 cm² felületű). Ilyenkor természetesen jóval nagyobb higítást kell alkalmazni törzsoldat készítésére, hogy az oldat 2,5 ml-ében maximálisan 200–250 γ szénhidrát legyen.

A talajból kiszedett celofánokat üvegszövetben hagyva alaposan megmostuk, megszárazítottuk. Az ebből kivett száraz celofáncsíkokat oldottuk fel kénsavban és 100 ml-re feltöltöttük. E törzsoldatból 1,5 ml-t antronoztunk.

Standardként 10 mg celofánt oldottunk fel hasonló körülmények között és a hígítási szorzat 2,5 ml-eit a mintákkal együtt forró vízfürdőben tartottuk 5 percig. Így az extinkció értékéből mindjárt megkaptuk a bomlatlan celofán mennyiségét és a bomlást a celofánbomlás %-ában adtuk meg.

Az adatok azt mutatják, hogy a cellulózt lebontó mikroflóra tevékenysége csökken, amint a talaj mélysége fokozódik. Azonban mint ismeretes, tekintetbe kell venni, hogy a cellulózbontás intenzitása a talaj mechanikai összetételétől,

2. táblázat
Cellulózbomlás vizsgálata az Agrokémiai Kutató Intézet lizimétereiben

Liziméter jelzése	Talaj származási helye és típusa	Trágyázás	A celofán elhelyezés mélysége cm	Extinkció d = 1	Celofánbomlás %-ában
12	Tápiószele, meszes homok	Felső 15 cm-es szintben	10	0,00	100
5	Hényelpusztá, erdőtalaj savanyú agyag	2 kg érett istállótrágya	30	0,98	2
		—	10	0,02	98
			30	0,78	22
7	Tápiószele, meszes homok	30 cm mélyen 2,5 kg érett istállótrágya	10	0,08	92
			30	0,41	59
4	Hényelpusztá, erdőtalaj savanyú agyag	15 cm-re 2 kg friss istállótrágya + 0,5 kg lucerna liszt	10	0,10	90
			30	1,00	0
10	Tápiószele, meszes homok	15cm-re 1,25 kg, 50 cm-re 2,5 kg érett istállótrágya	10	0,12	88
			30	0,60	40
3	Hényelpusztá, erdőtalaj savanyú agyag	felső 15 cm-es szintben 2 kg friss istállótrágya	10	0,15	85
			30	—	—
1	Hényelpusztá, erdőtalaj savanyú agyag	—	10	0,48	52
			30	0,92	8
6	Gödöllő, savanyú homok	—	10	0,56	44
			30	1,00	0
8	Tápiószele, meszes homok	50 cm mélyen 2,5 kg érett istállótrágya	10	0,70	30
			30	0,47	53
9	Tápiószele, meszes homok	30 és 50 cm mélyen 2,5 kg érett istállótrágya	10	0,79	21
			30	0,80	20
2	Hényelpusztá, erdőtalaj savanyú agyag	felső 15 cm-es szintben 1,5 kg érett istállótrágya	10	0,88	12
			30	—	—

víz- és levegőviszonyaitól és a talajt borító növényzettől is függ [14]. Igen megerősítette a módszer használhatóságát, hogy a liziméterek trágyázott rétegeiben erős lebomlás mutatkozott (lásd 2. táblázat 3, 5, 8, sz, talajait).

A talaj cellulózbontó képességének vizsgálata laboratóriumban.

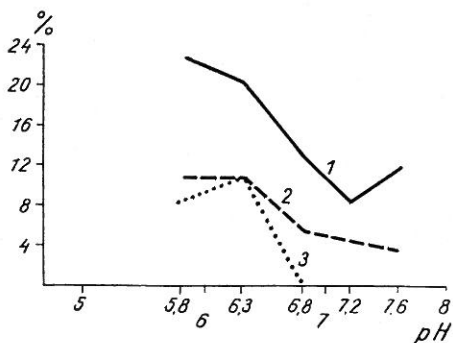
A talaj cellulózbontó képességét kétféleképpen vizsgáltuk;

1. megmértük a talaj baktériumos cellulózbontó képességét és
2. a sejtmentes cellulózbontást toluol jelenlétében.

Felhasznált anyagok és a vizsgálati módszer. Annak érdekében, hogy lehetőleg csökkentsük a természetes cellulázaktivitásban esetleg beálló változásokat, mindig friss talajmintákat vizsgáltunk előzetes szárítás nélkül. A gyökérmaradványoktól megtisztított talajokból 20 g-ot mértünk be 5 cm átmérőjű mérőedényekbe. (Szárzanyagot mindig számítottunk). A talajminták egyik részében előltük a baktériumokat azáltal, hogy a bemért talajt 2,5 ml toluollal 15 percig 37 C°-os termosztátban tartottuk és a toluol jelenlétét a vizsgálat folyamán mindvégig biztosítottuk. Ezután mind a baktériumos, mind a sejtmentes talajok belsejében elhelyeztük a celofáncsíkokat, üvegszövettel letakartuk és talajjal befedtük. 10 ml különböző pH-jú foszfátpuffert pipettáztunk rá (a baktériumos talajokra 7 ml-t) és különböző hőfokon termosztátban tartottuk.

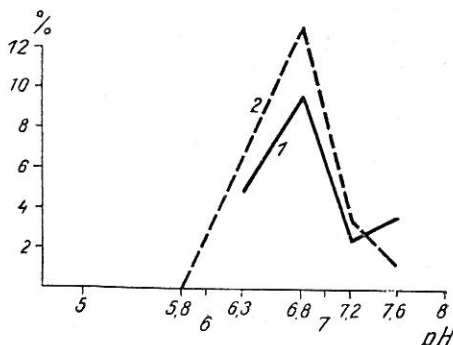
Mivel a mérőedények fedele könnyen beragad, alkalmasabbnak mutatkozik 5 cm átmérőjű Petri-csészék használata.

Három, öt és kilenc nap múlva kivettük a bomlatlan celofáncsíkokat és a fent leírt módon törzsoldatot készítve 200 ml-es normál lombikban, a törzsoldat 2,5 ml-ét antronoztuk. Az eredményeket az 5. és 6. ábra mutatja.



5. ábra.

10 cm mélyről vett tápiószelei talaj baktériumos cellulózbontása különböző pH-jú foszfát pufferben 35 és 45 C°-on. 1 : 3 napi bomlás 35 C°-on ; 2 : 5 napi bomlás 45 C°-on ; 3 : 9 napi bomlás 45 C°-on.



6. ábra.

A tápiószelei talaj sejtmentes cellulózbontása különböző pH-jú foszfát pufferben 35 és 45 C°-on. 1 : 3 napi bomlás 35 C°-on ; 2 : 9 napi bomlás 45 C°-on.

A fenti adatokból az látszik, hogy a baktériumos cellulózbomlás optimális pH-ja a vizsgált két hőmérsékleten 5,8; 35 C°-on nagyobb bomlást kaptunk, mint 45 C°-on. A mezofil baktériumok ugyanis maximálisan 40 C°-ig fejtik ki hatásukat, 45 C°-on már csak a kis számban jelenlevő termofil baktériumok működnek. Baktériumok jelenléte aktiválhatja a celluláz enzimet. [12].

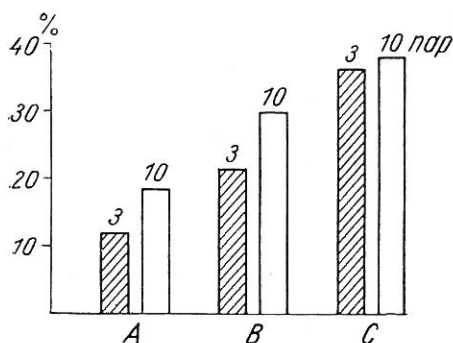
A sejtmentes cellulózbomlás optimális pH-ja magasabbnak mutatkozik : 6,8, olyan mint a β -glukozidázé [8]. 35 C°-on és 45 C°-on a bomlás kb. egyforma, valószínű a celluláz enzim hőállósága miatt [11].

Így a cellulázaktivitás vizsgálatát a többi talajenzim vizsgálatához hasonlóan [13] 37 C°-on végezhetjük 6,8-as pH-n, vagy puffer nélkül a talaj természetes pH-ján.

A trágya cellulózbontó képességének vizsgálata laboratóriumban

Az istállótrágya előkészítése cellulózbontó képesség vizsgálatára a talajétől csak abban tér el, hogy darált trágyát mérünk be azonnal a mintavétel után. Friss, félig érett, és érett vegyes istállótrágyát vizsgáltunk. Az eredményeket a 7. ábra mutatja.

A fenti vizsgálatokat csupán a módszer kipróbálására végeztük. A ta-



7. ábra.

Friss, félig érett és érett vegyes istállótrágya baktériumos cellulózbontása 5,5 pH-ás 40 C°-on a celofánbomlás %-ában. A: Friss trágya; B: Félig érett trágya; C: Érett trágya. Vonalkázott oszlop 3 és üres oszlop 10 napi bomlást mutatja.

lajra és a trágyára vonatkozó értelmezésére egyelőre nem kívánunk kitérni. Amint az adatok bizonyítják, jól mérhető különbségek mutatkoznak és így a módszer alkalmasnak látszik a talajok és a trágyaféleségek cellulózbontó tevékenységének jellemzésére.

A dolgozat a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült. A témát férjem jelölte ki, mint a Biokémiai Osztály vezetője; a feldolgozásban Vas Károly és Ferencz Vilmos tanácsait követtem.

Összefoglalás

Az antron reakció alkalmazásával kolorimetrikus módszert dolgoztunk ki a talajok és az istállótrágyák cellulázaktivitásának mérésére, amely mind szabadföldi, mind laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas. A módszer alapja az,

hogy a talajban és a trágyában elhelyezett, ismert súlyú celofáncsíkokat, a vizsgálat körülményeitől függően három nap, két hét vagy egy hónap múlva kiemeljük, kénsavban feloldjuk és antron reagenssel mérjük a maradék celofán mennyiségét. A módszer rendkívül egyszerűnek, gyorsnak, és érzékenynek bizonyult.

Érkezett: 1955. április 15.

Irodalom

- [1] Ballenegger, R.: Talajvizsgálati módszerkönyv. Mezőgazdasági kiadó. Budapest. 1953.
- [2] Bamann, E. & Myrbäck, K.: Die Methoden der Fermentforschung. II. Thieme. Leipzig. 1941.
- [3] Black, H. C. J.: Anal. Chem. **23**. 1792. 1951.
- [4] Fähræus, G.: Studies in the cellulose decomposition by Cytophaga. Almquist & Wiksells. Uppsala. 1947.
- [5] Fehér, D.: Talajmikrobiológia. Akadémiai kiadó. Budapest. 1954.
- [6] Fjodorov, M. V.: Mikrobiológiai gyakorlatok. Mezőgazdasági kiadó. Budapest. 1952.
- [7] Florkein, M. & Lozet, F.: Arch. Internat. Physiologie. **57**. 201. 1949.
- [8] Hoffmann, E. & Hoffmann, G.: Biochem. Z. **325**. 329. 1954.
- [9] Holden, M., Pirie, N. W. & Tracey, M. V. Biochem J. **47**. 399. 1950.
- [10] Koehler, L. H.: Anal. Chem. **24**. 1576. 1952.
- [11] Kooiman, P., Roelofsen, P. A., & Sweeris, S.: Enzymologia. **16**. 237. 1953.
- [12] Kiits, W. D. & Underhoffer, L. A.: J. Agr. Food. Chem. **2**. 639. 1954.
- [13] Kroll, L., Krámer, M. & Lövincz, E.: Agrokémia és Talajtan. **4**. 173. 1955.
- [14] Kuzniar, K.: Acta Microbiologica Polonica. **1**. 257. 1952.
- [15] Márkus, L.: Agrokémia és Talajtan. **3**. 227. 1954.
- [16] White, I. W., Holben, F. J. & Jeffries, C. D.: Soil. Science, **68**. 229. 1949.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ РЕАГЕНТОМ II. ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ПОЧВЕ И НАВОЗЕ

Г. Маркуш

Научно-Исследовательский Институт Агрехимии, Отдел Биохимии Будапешт (Венгрия)

Резюме

Нами, для измерения активности целлюлозы в почве и навозе, разработан колориметрический метод с применением реакции антрона. Этот метод даёт возможность вести определения в лабораторных и полевых условиях. Метод основан на следующем: в зависимости от условия исследования через 3 дня, 2 недели или 1 месяц извлекают из навоза или почвы, предварительно вложенную туда ленту целлофана с известным весом (10 мг) затем растворяют её в серной кислоте и измеряют с помощью реагента антрона количественный остаток целлофана. Метод является очень простым, быстрым и чувствительным. Этим методом изготовили калибрационную кривую раствора целлофана в серной кислоте от 0,3 γ /мл — 33,3 γ /мл и установили точность метода в модельных растворах.

Исследовали способность разрушения целлюлозы в кишечном соке малюска, через каждые 2 часа. Оптимальное значение pH для разрушения целлюлозы 5,5—5,25.

При исследовании разрушения целлюлозы в почве при полевых условиях через две месяца получили хорошие результаты. Были исследованы бактериальные и стерильные (в присутствии толуола) почвы. Оптимальный pH разрушения целлюлозы почв в бактериальном состоянии 5,8 а у стерильных 6,8.

При разной степени спелости навоза в присутствии бактерий самое активное разрушение целлюлозы наблюдалось в спелом навозе.

Исследования проводились нами с целью проверки метода. Выводы пока не даются. Как показывают полученные нами результаты, метод является пригодным для определения активности и длительности разрушения целлюлозы в почве и навозе.

Табл. 1. Точность микроопределения целлофана реагентом антрона между концентрациями 2 γ /мл — 16 γ /мл.

Табл. 2. Исследование разрушения целлюлозы в лизиметрах агрохимического института.

Рис. 1. Стандартная кривая. Средние цифры E = экстинкция между концентрациями 0,3 γ /мл и 33,3 γ /мл.

Рис. 2. Способность разрушения целлюлозы кишечным соком малюска с помощью буферного раствора ацетата, (1) и фосфата (2) в процентах распада целлофана.

Рис. 3. Процесс разрушения целлюлозы в кишечном соке малюска, измеряемый на целлофане при температуре 35°C, pH — 5,5. Измерение велось через каждые два часа (E = экстинкция).

Рис. 4. Разрушение целлюлозы в кишечном соке малюска в буферном фосфатном растворе, при различных pH, температуре 28°C, в процентах разрушения целлофана.

Рис. 5. Разрушение целлюлозы в бактериальной почве, взятой с глубины 10 см в Тапшосели, в фосфатном буферном растворе, при различном pH температуре 35 и 45°C. Распад при температуре 35°C длится 1 : 3 дня, распад при 45°C — 2 : 5 при 45°C 3 : 9.

Рис. 6. Разрушение целлюлозы в стерильной почве в фосфатно-буферном растворе, при различных pH и температуре 35—45°C. Распад при t = 35°C длится 1 : 3 дня, а при 45°C — 2 : 9.

Рис. 7. Бактериальное разрушение целлюлозы свежего смешанного навоза при pH — 5,5, t° — 40°C в процентах распада целлофана. А — свежий навоз, В — полуспелый навоз, С — спелый навоз. Заштрихованный столб показывает результат разрушения за 3 дня, а не заштрихованный за 10 дней.

Determination of Carbohydrates in Vegetable Matter with Anthrone Reagent II.

Measurement of Cellulase Activity in Soil and Manure

Mrs. L. MÁRKUS

Biochemical Department of the Agrochemical Research Institute, Budapest
(Hungary)

Summary

By applying the anthrone reaction, a colorimetric method suitable for investigations both in the field and in the laboratory has been evolved for the measurement of cellulase activity in soils and farm-yard manures.

Essentially, the method is to place cellophane stripes of known weight (10 mg.) in the soil or manure, take them out 3 days, 2 weeks, or 1 month later according to test conditions, dissolve them in sulphuric acid, and determine the remaining amount of cellophane by means of the anthrone reagent. The method proved to be very simple, quick and sensitive.

Using this method, the calibration curve of the sulphuric acid solution of cellophane was established between the concentrations 0,3 $\mu\text{g./ml}$ and 33,3 $\mu\text{g./ml}$, and the accuracy of the method was checked in model solutions.

Examining at 2 hour intervals the capacity of the intestinal secretion of snails to decompose cellulose, it was found to be highest at pH values of from 5,05 to 5,25.

On examining soils in the field for their capacity to decompose cellulose, well measurable changes could be recorded after the lapse of 2 months. Soils placed in the thermostat were tested both in the presence and in the absence of living bacteria (the latter was secured with toluene). The optimal pH of the cellulose-decomposing capacity proved to be 5,8 for bacteria-containing and 6,8 for toluene treated soils.

Of bacterium-infected farm-yard manures at different stages of maturity, it was the mature one that showed the greatest capacity for decomposition.

The sole object of the experiments was to test the new method, and for the present it is not intended to draw conclusions either in respect of soil or manure. The method seems to be well suited to determine the cellulase activity of soils and manures.

Table 1. Accuracy of the micro-determination of cellophane with anthrone at concentrations of from 2 $\mu\text{g./ml}$. to 16 $\mu\text{g./ml}$.

Table 2. Cellulase activity as observed in the lysimeters of the Agrochemical Research Institute.

Fig. 1. Standard curve of the anthronized derivative of cellophane between concentrations 0,3 $\mu\text{g./ml}$. and 33,3 $\mu\text{g./ml}$. E = mean value of extinction.

Fig. 2. Capacity of the intestinal secretion of snails to decompose cellulose in acetate (1) and in phosphate buffer (2), expressed as percentage of cellophane decomposition.

Fig. 3. Decomposition of cellulose in the intestinal secretion of snails, measured on cellophane. At 35° C and 5,5 pH in 2 hour intervals (E = extinction).

Fig. 4. Capacity of the intestinal secretion of snails to decompose cellulose in phosphate buffers of different pH values, at 28° C, expressed as percentage of cellophane decomposition.

Fig. 5. Decomposition of cellulose in soil containing living bacteria taken from a depth of 10 cm at Tápiószéle, in phosphate buffers of different pH values, at 45° C. Decomposition after 1/3 days at 35° C, 2/5 days at 45° C, 3/9 days at 45° C.

Fig. 6. Decomposition of cellulose in toluene treated soil from Tápiószéle in phosphate buffers of different pH values. Decomposition after 1/3 days at 35° C, 2/9 days at 45° C.

Fig. 7. Decomposition of cellulose in fresh, half-mature, and mature mixed, bacteria containing farm-yard manures at 40° C and pH 5,5, in percentage of cellophane decomposition. A = fresh manure, B = half-ripe manure, C = ripe manure. Three-day values indicated by shaded, 10-day values by white column.