

Deaminase/Urease

Ammonium wird aus KCl-Extrakten mit einer modifizierten Berthelot-Reaktion bestimmt. Die Bestimmung basiert auf der Reaktion von Natriumsalicylat mit NH_3 in Anwesenheit von Natriumdichlorisocyanursäure. Im alkalischen Milieu wird dabei ein grüner Farbkomplex gebildet. Natriumnitropussid wirkt dabei als Katalysator und steigert die Empfindlichkeit der Reaktion.

Durchführung

Vollproben: 2 g naturfeuchter Boden wird in zwei 50 ml Erlenmeyer-Enghalskolben eingewogen, mit 1 ml Harnstofflösung befeuchtet und mit Korkstopfen verschlossen.

Inkubation: 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank

Blindproben: 2 g naturfeuchter Boden wird in zwei 50 ml Erlenmeyer-Enghalskolben eingewogen, mit 1 ml Aqua dest. befeuchtet und mit Korkstopfen verschlossen.

Inkubation: 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank

Während der Inkubationszeit: Herstellung der KCl-Lösung, Eichreihe

Nach 2 Stunden: 20 ml KCl wird zugegeben und 30 min geschüttelt

Filtration: 50 ml Weithalskolben mit N-freien Faltenfiltern

Assay: wird in 2 ml Eppis durchgeführt:

Kalibration: Diese erfolgt mit einer Stammlösung (3,8207 g NH_4Cl /1000 ml Aqua dest. (= 1000 mg/L N). Diese Stammlösung wird mit der KCl-Lösung verdünnt, sodass man folgende Konzentrationen erhält: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.75, 0.375 mg/L. Jeweils 100 µl der unterschiedlichen Konzentrationen werden wiederum zur Farbreaktion eingesetzt. Es wird empfohlen 2 Kalibrationsreihen herzustellen.

Farbreaktion (pro Eppi): 100 µl Probe oder Eichlösung

900 µl Aqua dest.

500 µl Mischlösung

200 µl Oxidationsmittel

Die Mischung wird am Vortex geschüttelt und 30 min stehen gelassen. Danach ist die Reaktion quantitativ verlaufen und die Lösungen werden bei 660 nm gegen den Leerwert der Eichreihe vermessen. Die Auswertung erfolgt am Tecan Infinite Mikrotiterplattenleser. 250 µl Reaktionsmischung werden pro Well pipettiert. Die ersten zwei senkrechten Spalten werden mit den beiden Eichlösungen befüllt (mit ansteigender Konzentration), daneben anschließend oben die Vollproben und darunter die Blindproben.

Auswertung:

$$\frac{(VP - BP) \cdot 22 \cdot 100}{2 \cdot \%TS \cdot 2h} = x \mu\text{g N} \cdot \text{g TS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

VP

Mittelwert Extinktionen der Vollprobe

LP

Mittelwert Extinktionen der Leerprobe

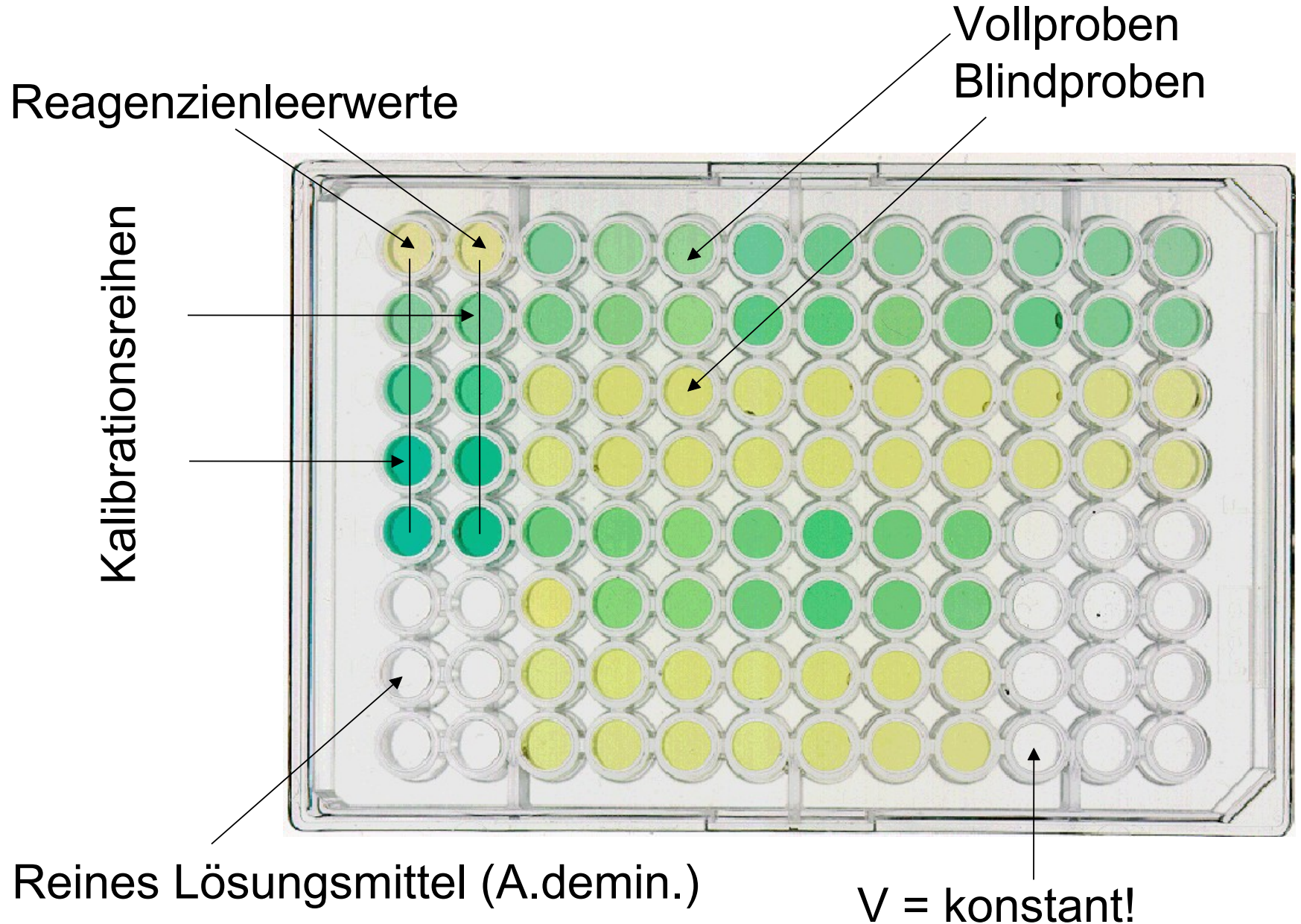
$y = kx + d$

Eichgerade

% TS

Trockensubstanzfaktor (TS in % FG)

Mikroplattenphotometer, Enzymtests (Urease)



Ringerlösung

2,25 g NaCl 0,105 g Kcl
0,12 g CaCl 0,05 NaHCO₃ ad 1 L A.d.

Urease Substrat

Harnstoff 21,6g ad 500 mL A.d.

Urease NH₄ -Extraktionslösung

KCL + HCL
75g Kcl + 10 mL 1M Hcl ad 1L A.d.

NH₄ Standard

Stammlösung: 3,8207 g NH₄Cl ad 1000 mL Aqua dest. (= 1000 mg/L NH₄-N)
bzw. 1.9351 g ad 500 mL A.d.
Gebrauchslösungen: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.75, 0.375 mgL⁻¹
2mL Stammlsg ad 50mL A.d, dann jeweils 1:1 mit A.d.)

NH₄ Mischreagens 1

1 100mL Ad

NH₄ Mischreagens 2

3 NaOH 0.3M: 1,2 g NaOH ad 100 mL A.d.

NH₄ Mischreagens 3

17g NaSalicylat + 120 mg Na No₃-Prussid ad 100 mL A.d