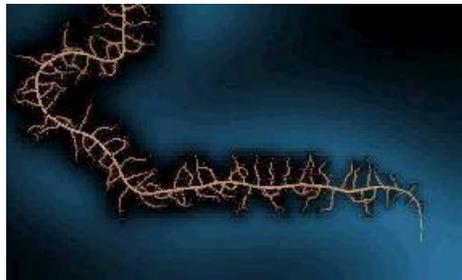


# Rhizosphäre, UE +VO 5 Stunden, 7 ECTS-Punkte

Gert Bachmann, Franz Hadacek, Karoline Uteseny



## Lehrziele

Die Übung vermittelt systemökologische Kenntnisse über Schlüsselorganismen und deren Aktivitäten im stark durchwurzelten Bodenbereich. Dabei werden chemisch-analytische Techniken der Bodenökologie (Metabolic Profiling, Bioactivity Monitoring) sowie die statistische Aufbereitung der Resultate vermittelt und praktisch erarbeitet.

## Was wird untersucht?

Die Rhizosphäre ist das Mikrohabitat im Wurzelraum. Im Fokus der Übung sind Schleime in ihrer Funktion als Matrix der Interaktion zwischen den Organismen. Sie sind an den Wurzelspitzen und im wurzelnahen Bereich lokalisiert und beinhalten niedermolekulare organische Verbindungen in verschiedenen Stadien der Polymerisation. Weiters binden sie Wasser und Ionen und bilden somit auch die Matrix für enzymatische Aktivitäten. Wir werden in den Böden unter verschiedenen Pflanzen mit diversen Extraktionsmethoden, biochemischen Messungen und eventuell elektrochemischen Analysen eine Charakterisierung der Wurzelschleime und ihrer Bewohner durchführen.

## Modellsysteme

*Solanum lycopersicum*

(Allelopathie, schwachlichtresistent)

*Saccharum officinarum*

(C4-Pflanze, mehrjährig)

*Arabidopsis thaliana*

(genomischer Modellorganismus, Frühjahrsannuelle)

### **Nematoden**

Im Rahmen des Praktikums sollen die Gemeinschaften der bakterivoren und fungivoren Bodennematoden in Abhängigkeit vom Abstand zur Pflanzenwurzel dokumentiert werden. Da sich in der unmittelbaren Nähe von Wurzeln durch die Absonderung von Inhaltsstoffen ein reiches Bakterienleben entwickelt, sollte es zu einer höheren Abundanz von Bakterienfressern in dieser Zone kommen. In größerem Abstand zur Pflanzenwurzel sollten Pilzfresser größere Bedeutung erlangen. Diese Hypothesen sollen durch gängige nematologische Methoden geprüft werden.

### **Collembolen**

Ein weiteres Ziel des Praktikums ist die Untersuchung euedaphischer Collembolen in- und außerhalb der Rhizosphäre der Untersuchungspflanzen. Neben der Erhebung der Individuendichte werden die Arten und ihre ökologische Relevanz in diesen Bereichen ermittelt. Ein Schwerpunkt wird dabei auf Wechselwirkungen zwischen den abiotischen und biotischen Bodenfaktoren gelegt.

### **Wurzelexudate**

Von allen Pflanzen sollen Wurzelexudate gewonnen werden. Die gewonnenen Exudate werden in eine wasserlösliche (hydrophile) und wasserunlösliche (lipophile) Fraktion aufgetrennt. In ersterer sollen Zucker, organische Säuren sowie Aminosäuren analysiert werden, in zweiterer Sekundärmetabolite. Die hydrophilen Wurzelschleimkomponenten liegen in erster Linie als Polymere vor und müssen daher hydrolysiert werden. Ziel der Analysen ist, die Qualität und Quantität der exudierten Kohlenstoffverbindungen in Bezug zu den anderen im Praktikum erhobenen Parametern zu stellen.

### **Bodenatmung**

Als Maß der aeroben metabolischen Bioaktivität wird die Bodenatmung aller Blumentöpfe mittels Infrarotgasanalyse (IRGA) bestimmt, und zwar ohne Zusatz (Grundatmung, Basalrespiration: BR) als auch mit Substratzusatz (SIR).

### **BIOLOG**

Die Voranpassung der mikrobiellen Populationen der Böden hinsichtlich ihrer Substratpräferenz wird mittels einer modifizierten Dehydrogenaseaktivitätsuntersuchung bei Zusatz niedermolekularer Substrate in Mikrotiterplatten untersucht.

### **Urease/Deaminase**

Die Remineralisierung von Stickstoff wird in Böden zu einem substanziellen Teil von Deaminasen wahrgenommen, welche Ammoniumreste von anderen organischen Molekülen wie Harnstoff oder Aminosäuren abspalten. Die Harnstoffdeaminierung gestattet Rückschlüsse auf die Bioaktivität der Mesofauna im Boden.

### **pH-Wert**

Als zentraler begrenzender abiotischer Faktor im Boden wird der pH Wert sowohl im Wasserextrakt (aktuell) als auch nach Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  (potenziell) untersucht. Die Differenz der beiden Werte ergibt die aktuelle Kationenaustauschkapazität.

### **Metallkationen**

In den Wasserextrakten werden auch die Kaliumionen bestimmt, um Rückschlüsse auf die aktive Exudation von Saccharose in den Böden zu ermöglichen.

## Programm (2.45-17.5. 2011)

|    | Datum      | Tagesziele:                                         |
|----|------------|-----------------------------------------------------|
| Mo | 2.05.2011  | Probenvorbereitung                                  |
| Di | 3.05.2011  | Exudatfraktionierung, Atomabsorbtion                |
| Mi | 4.05.2011  | Exudatfraktionierung, BIOLOG, Bodenatmung (IRGA)    |
| Do | 5.05.2011  | pH, Probenvorbereitung Chromatographie, Bodenatmung |
| Fr | 6.05.2011  | Zoologie1                                           |
|    |            |                                                     |
| Mo | 9.05.2010  | AAS, Zoologie 2, BIOLOG                             |
| Di | 10.05.2010 | Urease, C-Analyse                                   |
| Mi | 11.05.2010 | Nacharbeiten, Auswertung                            |
|    |            |                                                     |
| Mo | 16.05.2011 | Nacharbeiten Ausrechnung, Auswertung                |
| Di | 17.05.2011 | Protokollbesprechung                                |

## Messparameter und Probenvorbereitung

| Analyt/Parameter     | Probe            | Probenvorbereitung             | Analyse                      |
|----------------------|------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Primärmetabolite     | Wurzelexudat     | Wurzelwaschung                 | GC-MS                        |
| Sekundärmetabolite   | Wurzelexudat     | Wurzelwaschung                 | HPLC-UV                      |
| pH-Wert              | Rhizosphärenerde | Wasserextr., CaCl <sub>2</sub> | pH-Messung                   |
| BIOLOG               | Rhizosphärenerde | Ringer-Extrakt                 | Mikrotiterplatte, Photometer |
| Bodenatmung (BR,SIR) | Rhizosphärenerde | Frischboden 2mm                | IRGA                         |
| Deaminase/Urease     | Rhizosphärenerde | Frischboden 2mm                | Photometer                   |
| Metall               | Rhizosphärenerde | Wasser/Säureextrakt            | Atomabsorption               |
| C                    | Rhizosphärenerde | Trockenboden 2mm               | C-Analysator                 |

## **Probenvorbereitung**

*Es werden jeweils 3 Wiederholungen/Probe angefertigt.*

### **Biomasse**

Die Frischmassen werden gewogen (Sproß, Boden incl. Wurzeln). Von den Blättern wird ein Aliquot (5 -10g FM) im Trockenschrank in Papiersäckchen getrocknet und rückgewogen (Tara der Säckchen vorher und nachher erfassen). Ein Aliquot der Böden (5g) wird zur TM Bestimmung in Aluschälchen eingesetzt. Der Rest der Böden wird aufgehoben (gesiebt in Säckchen -siehe unten), in Stechzylindern für die Zoologie!

### **Wurzelexudatgewinnung**

Je nach Größe werden 3-5 Pflanzen sorgfältig von der Erde befreit und die Wurzeln gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Die Pflanzen werden dann für 6 Stunden in eine Pufferlösung (Acetatpuffer, pH=5,5) gestellt (in einem Glasgefäß). Die Exudatlösung wird dann abfiltriert und bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren.

### **Siebung und Lagerung der Böden**

Mischproben werden mit einem Bodensieb zuerst grob (5 mm) und danach bei Bedarf fein (2 mm) gesiebt. Nach dem Sieben werden verbliebene Wurzelstücke entfernt, die Böden in Plastiksäcke abgefüllt und bei 4°C im Kühlraum gelagert. Sollte zwischen der Aufsammlung der Böden und den Analysen mehr als 4 Wochen vergehen, ist es notwendig die Böden tief zu frieren. In diesem Fall sollten die Böden mindestens 48 Stunden vor der Probennahme bei 4°C aufgetaut werden.

### **Bodenextrakt für pH Messung**

Etwa 1 g gesiebter, luftgetrockneter oder naturfeuchter Boden wird in Eppendorfgefäßen mit jeweils 2 mL Aqua dest. bzw. 2 mL 0,1 N CaCl<sub>2</sub> versetzt und geschüttelt, dann 12 h bei 4°C inkubiert. Diese Extrakte werden direkt für die Messung des pH-Wertes eingesetzt.

### **RINGER-Extrakt für BIOLOG**

1 g Boden wird in 10 mL Ringerlösung (2,25 g NaCl, 0,105 g KCl, 0,12 g CaCl<sub>2</sub>, 0,05 NaHCO<sub>3</sub> pro 1 L Aqua dest) geschüttelt und 1 min bei 500 U/min zentrifugiert.

### **Metall-Kationen**

**Heißwasserextrakte:** In Eppendorfgefäßen werden 1% Extrakte (200mg TM Boden mit 2mL Ad., 30 min, 80°C) hergestellt. In Greiner-Cups werden wässrige Verdünnungen von 1:20 und 1:200 angesetzt, die 0.1% CsCl enthalten.

**Säure-Extrakte:** In Eppendorfgefäßen werden 1% Extrakte (200mg TM Boden mit 2mL 1N HCl., 30 min 25°C), hergestellt. In Greiner-Cups werden die Extrakte 1:20 und 1:200 mit 1N HCl in 0.1% CsCl verdünnt.

## **Chromatographische Analyse der Wurzelexudate**

### **Fraktionierung in eine lipophile und hydrophile Fraktion**

Die Fraktionierung der Wurzelexudate wird in Glassäulen mit in MQ Wasser aufgeschlammten **Amberlit XAD 1180** durchgeführt. Das Exudat diffundiert durch die stationäre Phase der Säule. Dabei absorbieren lipophile Analyten an der stationären Phase, die hydrophilen Analyten bleiben in Lösung. Die Säulen werden noch mit einer kleinen Menge MQ Wasser gewaschen und dann werden die lipophilen Bestandteile mit absolutem Ethanol eluiert (ca. 50 mL).

### **Probenvorbereitung der hydrophilen Analyten (GC-MS)**

Die gefriergetrocknete Wasserphase (ca. 10 mg) wird in Autosampler Vials transferiert (notfalls in Methanol gelöst und am Speedvac getrocknet). Die hydrophilen Wurzelschleimkomponenten liegen zum größten Teil als Polymere vor und müssen daher mit 100 µL 10%-iger Salzsäure hydrolysiert werden. Die Hydrolyse erfolgt 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird am Speedvac über Nacht getrocknet. Die getrockneten Proben werden 50 µL Hydroxylaminlösung überschichtet und 1 h bei 70°C temperiert. Dann wird mit 50 µL MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid) in Trimethylsilylester derivatisiert. Die 100 µL werden in spezielle Mikroinsätze transferiert. Die Analyse erfolgt mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie.

### **Probenvorbereitung der lipophilen Analyten**

Die Ethanolphase wird am Rotavapor eingeengt und in Autosampler Vials transferiert. Diese werden am SpeedVac getrocknet und adäquat (10 mg/mL) in Methanol:Wasser:Essigsäure (1:1:0,01, v/v/v) gelöst. Die Analyse erfolgt mittels Flüssigchromatographie-UV-Spektroskopie.

### **Chemikalien**

Ethanol absolut

Hydroxylamin (20 mg/mL in Pyridin)

MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid)

30% HCl

30% KOH

Methanol

Essigsäure

MQ (MilliQ) Wasser

Amberlit XAD1180

## **pH-Wert**

Der pH-Wert (negativer Logarithmus der  $H^+$ -Konzentration) ist ein Maß für die Menge der frei in Lösung vorliegenden Protonen. Man spricht beim pH-Wert (in Wasser) auch von der *aktuellen Azidität*. Zur Erfassung der *potentiellen Azidität* hingegen wird ein Extrakt mit  $CaCl_2$  versetzt, um auch solche Protonen zu erfassen, die bei physiologischen pH-Werten nicht in dissoziierter Form vorliegen, bei Böden werden die Proben anstatt mit Wasser mit 0,1 N  $CaCl_2$  extrahiert. Die Differenz dieser Werte wird als restliche KAK (Kationenaustauschkapazität) bzw. aktuelle Nährstoffhaltekapazität bezeichnet.

## **Durchführung**

Siehe Vorbereitung: 1 g Boden FM in Eppendorfgefäßen 2,5 mL, A.d. Oder  $CaCl_2$  0,1 N. 100  $\mu$ L des Extrakts werden mit einer Kolbenhubpipette aufgenommen und auf die Oberfläche einer gläsernen Petrischale pipettiert. Der pH Wert wird mit einer Surface ISFET (Ionen Sensitiver Feld Elektronen Transistor)-Elektrode gemessen und die Werte nach exakt 10 Sekunden notiert. Bodenextrakte sollten über Nacht abstehen, da aufgeschlämmtes Sediment die pH-Messung empfindlich beeinflussen kann.

## **Chemikalien**

0,1 N  $CaCl_2$

## BIOLOG

Eine modifizierte Dehydrogenasereaktion mit TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) als Substrat wird benutzt, um eine Mikroorganismensuspension auf potentielle Nutzung von niedermolekularen organischen Substraten zu überprüfen. Der Test wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, die bereits Chemikalien für den DHA Test sowie Spuren- und Nährelemente enthält. Der Extrakt und die C-Quellen (niedermolekularen Substrate) werden in die Plattenvertiefungen pipettiert und die Farbentwicklung von TTC zu TPF (Triphenylformazan) im Photometer in gleichbleibenden Intervallen(6-12) Stunden nachgemessen.

### Durchführung

Der Extrakt wird mit Ringerlösung 100-fach verdünnt, 100 µl des verdünnten Extraktes werden gemeinsam mit 60 µl Substratlösung in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert. Dabei sollen die Platten so oft als möglich mit dem Deckel gegen Kontamination geschützt werden. Im Vorfeld muß ein Plattenlayout entworfen, dass als Dokumentation zum Versuch beigelegt werden muss. Die Platten werden bei 25°C inkubiert und sofort sowie alle 12 Stunden bei **542 nm** im Mikrotiterplatterleser vermessen. Leerwerte zur Kontrolle von Kontaminationen: 160µL Aqua dest., 160µl Ringerlösung, Substrat in Aqua destr.

### Chemikalien

Substrate (0,5ww% Lösung in Aqua dest.):

Asparagin, Serin, Malat, Citrat, Glukose, Saccharose, Galaktose, Zimtsäure/Malat (10:1)

### Layout der BIOLOG Platten

| Platte 1    |   | I      | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6   | 7   | 8   | 9  | 10    | 11       | 12 |
|-------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|----|-------|----------|----|
| asn         | A | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| ser         | B | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| malat       | C | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| citrat      | D | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| gluc        | E | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| sach        | F | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| galac       | G | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| zimtsre+mal | H | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |

| Platte 2    |   | II     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6   | 7   | 8   | 9  | 10    | 11       | 12 |
|-------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|----|-------|----------|----|
| asn         | A | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| ser         | B | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| malat       | C | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| citrat      | D | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| gluc        | E | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| sach        | F | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| galac       | G | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |
| zimtsre+mal | H | solan1 | solan2 | solan3 | sacch1 | sacch2 | sacch3 | at1 | at2 | at3 | ad | subst | ad+subst |    |

## Infrarot-Gasanalysator IRGA - basale und substratinduzierte Bodenatmung (BR und SIR)

Heterogene Gase absorbieren Infrarotstrahlung, wobei die absorbierte Energie im betroffenen Molekül Schwingungen in allen Raumrichtungen bewirkt. Für die betroffenen Moleküle bedeutet dies eine Temperaturerhöhung. In einem geschlossenen Gefäß wird dadurch eine Druckzunahme bewirkt (Gasgesetz von Gay-Lussac). Beim URAS (deutsch: URAS, Ultra-Rot-Absorptionschreiber) werden ein CO<sub>2</sub>- freies Referenzgas und zu messende Gase gleichzeitig einer bestimmten Intensität Infrarotstrahlung ausgesetzt. Je nach Konzentration der Gase wird unterschiedlich viel Infrarotlicht absorbiert. Die nicht absorbierte Rest- Infrarotstrahlung gelangt in einen Detektor. Dieser besteht aus einer abgeschlossenen CO<sub>2</sub>-gefüllten Kammer, welche durch eine Membran zweigeteilt ist. Durch diese Konstruktion treten Druckunterschiede auf, welche elektronisch ausgewertet und in ppm CO<sub>2</sub> angezeigt werden. Auf diese Weise wird die CO<sub>2</sub> Entwicklung in Böden als sogenannte basale, aerobe Bodenrespiration (BR) erfasst. Diese kann als Maß für die lebende mikrobielle Biomasse herangezogen werden, da sie im Verhältnis der zu atmenden Biomasse steht. Wird dem Boden ein Substrat zugesetzt (z. B. Glukose), kann die derart zusätzlich stimulierte CO<sub>2</sub>-Freisetzung des Bodens als „Substrat stimulierte Bodenatmung“, die mit der maximal möglichen Aktivität der lebenden mikrobieller Biomasse zusammenhängt (Substrat induzierte Respiration- SIR) gemessen werden.

### Durchführung

SIR: 30 g auf 2 mm gesiebter Boden (pro Ansatz 2 Wiederholungen) wird im Tiefkühlbeutel eingewogen und mit 0,2 % Zuckerpulver und in einem extra Ansatz mit 0,6% Aminosäurepulver versetzt (separat einwiegen!) und gut gemischt (im Plastiksack durch Aufblasen des Beutels mit anschließendem Schütteln). Dieses Gemisch wird in Küvetten gefüllt, deren untere Öffnung mit einer Schicht Zellstoff bedeckt ist. Wird nur die Bodenatmung bestimmt, unterbleibt die Substratzugabe. Die Küvetten werden nun bei einer Raumtemperatur von 25°C kontinuierlich mit CO<sub>2</sub>-freier Luft gespült (etwa 6 L/h, "offener Kreislauf") und die CO<sub>2</sub>-Konzentration alle 30 min mit dem URAS gemessen. Zur Auswertung gelangt der jeweils niedrigste (nach etwa 3-6 h) erreichte Wert. Bei der Bodenrespirationsmessung unterbleibt die Substratzugabe.

### Berechnung der Ergebnisse

Die Messwerte werden in mg CO<sub>2</sub>/h/100 g Boden Frisch- oder Trockenmasse nach folgender Formel (unter Berücksichtigung der Avogadro-Konstante 24 L Gas per Mol unter Normalbedingungen) umgerechnet:

$$\begin{array}{l}
 \text{mg/L} / 10\text{e}6 * \text{flow} * 10\text{e}3 \\
 (\text{c}[\text{ppM}] / 10\text{e}6 * \text{flow}[\text{L/h}]) * 10\text{e}3 / \text{weight} * 10\text{e}3 / * 1,96
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 \text{mL CO}_2 \text{ in der Probe pro Stunde} \\
 \text{mg CO}_2 \text{ /kg Boden}
 \end{array}$$

$$x = \frac{c * f * 1.000 * 1.000}{1.000.000 * w} * 1,96
 \qquad
 x = \frac{f * c}{w} * 1,96$$

x : mL CO<sub>2</sub> /kg FW \* h  
 f : air flow rate ( L / h )  
 c : CO<sub>2</sub> - concentration ( mg/L )  
 w : weight of the soil sample ( g )

In einem Koordinatensystem wird auf der X-Achse die Zeit und auf der Y-Achse die CO<sub>2</sub>-Konzentration aufzutragen. Die erhaltenen Kurven informieren hinsichtlich BR, SIR und relativer Induktion (Response: SIR–BR in % BR = RESP).

## Deaminase/Urease

Ammonium wird aus KCl-Extrakten mit einer modifizierten Berthelot-Reaktion bestimmt. Die Bestimmung basiert auf der Reaktion von Natriumsalicylat mit  $\text{NH}_3$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /1000 mL Aqua dest. (= 1000 mg/L N). Diese Stammlösung wird mit der KCl-Lösung verdünnt, sodass man folgende Konzentrationen erhält: 5, 10, 15, 20, 25 und 30 mg N/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)    |

## **Chemikalien**

*Mischlösung:* 0,3 N NaOH/Natriumsalicylat-Lösung/Aqua dest (1:1:1)

*Na-Salicylat-Lösung:* 17 g Natriumsalicylat und 120 mg Natriumnitroprussid-Natrium werden in 100 mL Aqua dest. gelöst.

*Oxidationsmittel:* 0,1 g Dichlorisocyanursäurenatriumsalz in 100 mL Aqua dest. lösen (täglich frisch zubereiten)

*Substratlösung:* 2,4 g Harnstoff in 500 mL

KCl

## Metall-Kationen mit Atomabsorptions- Spektralphotometrie (AAS)

Die Analysenlösung wird über ein entsprechendes Zerstäubersystem in eine Flamme eingebracht (Standardflamme: Luft-Acetylen, Spezialflamme für Ca-Bestimmung: Lachgas-Acetylen). Das zu bestimmende Element wird in der Hitze (ca. 2300 °C) atomisiert. Durch die Flamme wird gleichzeitig das Licht einer Hohlkathodenlampe geschickt. Dabei handelt es sich um Gasentladungslampen, deren hohl-zylindrische Kathode aus dem Material des Messelementes besteht, und die daher intensiv gebündelte, elementspezifische Strahlung abgeben (=Resonanzfrequenz des entsprechenden Metalls, z.B. die Natriumdampflampe). Die freien Atome in der Flamme absorbieren nun Licht der Hohlkathodenlampe und gehen dabei in den "angeregten Zustand" über, d.h. ihr(e) Valenz(e)elektron(en) bzw. -elektronensysteme nehmen einen Zustand höherer Energie ein. Die dabei eintretende Schwächung des Hohlkathodenlampen-Lichts kann als Messsignal registriert werden. Wenn man sich nun die Flamme als Küvette denkt und die Hohlkathodenlampe als Strahlungsquelle, so hat man den Apparate-Typus des Photometers vor sich: die gemessene Extinktion ist als analytisches Maß der Konzentration der freien Atome in der Flamme – und damit der Konzentration der Metallionen in der Analysenlösung – direkt proportional. Der Monochromator steht dabei auf der Resonanzfrequenz. Für die einzelnen Elemente, besonders für die mit komplexeren Elektronenhüllen, gibt es meist mehrere Resonanzfrequenzen, die für die analytische Praxis genutzt werden können. Die stark unterschiedliche Messempfindlichkeit (über mehrere 10er-Potenzen) bei den einzelnen Spektrallinien hängt von deren Strahlungsintensität ab: Verwendung der intensiven Hauptlinien erlaubt stets die empfindlichsten Messungen.

Das System muss wie jede spektralphotometrische Methode mit Standardlösungen bekannter Konzentration kalibriert werden. Bei der Bestimmung von Elementen, die ihre Valenzelektronen leicht verlieren (z.B.  $K^+$  und  $Ca^{2+}$ ), muss der Messlösung, wie auch der Standardlösung, Cäsium als sogenannter "Ionisationspuffer" hinzugefügt werden, damit die "thermische Ionisation" der Atome verhindert wird.

### Durchführung

Probenvorbereitung siehe oben.

Herstellung der Standardlösungen aus 1000 mg/L Stammlösungen (bzw. 100 mg/L Zwischenverdünnungen). In den Standardlösungen lassen sich zur Vereinfachung alle 4 Elemente kombinieren; jeweils 100 mL ansetzen. Die Konzentration an CsCl soll 0.1% betragen. Zu beachten ist, dass die "Matrix" der verwendeten Eichlösungen der "Matrix" der Proben (Wasser, Säuren, Ammoniumacetat) angepasst werden muss!

| mg/L      | Standard 1 | Standard 2 | Standard 3 | Standard 4 |
|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Magnesium | 0,5        | 1,0        | 2,0        | 5,0        |
| Calcium   | 1,0        | 2,0        | 5,0        | 10,0       |
| Kalium    | 1,0        | 2,0        | 5,0        | 10,0       |
| Natrium   | 0,5        | 1,0        | 2,0        | 5,0        |

Für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Mg^{2+}$ : Acetylen-Luft-Flamme im Mischungsverhältnis 1:3 (oxidierend)

Für  $Ca^{2+}$ : Acetylen-Lachgas-Flamme im Verhältnis 1:2 (leicht reduzierend)