

**K
O
M
P
E
N
D
I
U
M**



Kæmpegræs (Arundo), Fayal, Açores

ØKOLOGI II

FORSØG B

Forsøg 5

Påvisning af mikroorganismer i jord

Mikroorganismers tilstedeværelse og aktivitet i jord kan påvises med en CO₂-indikator (fx phenolrødt). Farveomslag til orange eller gult påviser mikroorganismernes tilstedeværelse i den jordprøve, der arbejdes med.

Man kan ligeledes foretage et skøn over mikroorganismernes antal eller deres aktivitetsniveau ved at notere hvor hurtigt farveskiftet sker. I forsøg6 bestemmes aktiviteten kvantitativt, ved at den udskilte CO₂ måles.

Nedbrydningen af stof i jorden og dermed mikroorganismernes aktivitet afhænger af flere faktorer - deriblandt temperatur, fugtighed, næringsstofftilgængelighed og tilstedeværelse af væksthæmmende eller væksthæmrende stoffer. Nogle af disse faktorer kan undersøges i dette forsøg¹⁰.

Q Q Q

¹⁰

Bearbejdet efter:

Poul Breum og Per Geckler:

Menneskets økologi, etologi og genetik. Nucleus 1978.

Materialer:

cylinderglas, dværgreagensglas, gummipropper,
phenolrødtopløsning- phenolrødt viser tilstedeværelse af CO₂ ved at skifte farve fra rød til orange eller gul:

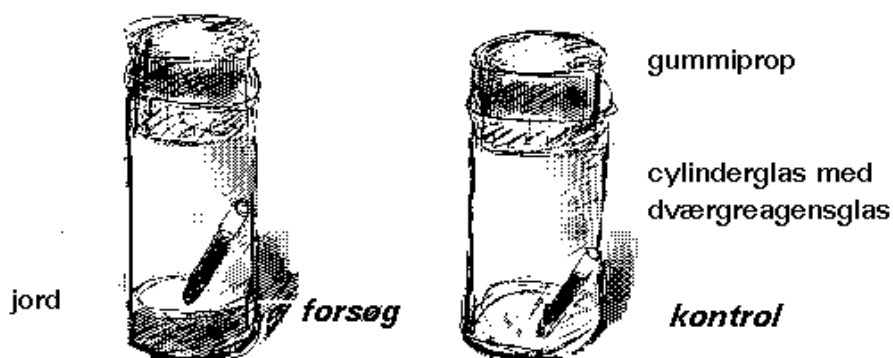


forskellige jordprøver (sand, muld),

evt. blade eller andre organiske stoffer (fx glucose),
evt. væksthæmmende stoffer.

Fremgangsmåde

Lav en grundopstilling som vist i figuren.



- 1 et kontrolglas; kun med phenolrødtopløsning
- 2 et forsøgsglas med jord + phenolrødtopløsning i dværgreagensglasset
- 3 (evt) et yderligere kontrolglas med jord, der har været opvarmet til 120 °C i et døgn + phenolrødtopløsning i dværgreagensglasset.

Glassene placeres ved 20 °C et par døgn, og indikatorfarven aflæses jævnligt.

Temperaturens indflydelse kan undersøges ved at anbringe sæt af forsøgsglas og kontrolglas (1 + 2) ved forskellige temperaturer, fx. : 7 °C - 20°C - 30°C - 45°C - og 60°C.

Lad glassene stå et par døgn og aflæs regelmæssigt indikatorfarven.

Fugtighedens indflydelse kan undersøges ved at tilsætte variende mængde vand til lufttørret jord.

Et glas med med tør jord uden vandtilsætning medtages som kontrol foruden grundopstillingens kontrolglas.

Lad glassene stå et par døgn og aflæs regelmæssigt indikatorfarven.

De øvrige faktorer kan undersøges på tilsvarende måde.

Resultatbehandling og diskussion

Indfør resultaterne i et overskueligt skema.

Indtegn i et koordinatsystem mikroorganismernes aktivitet som funktion af temperatur eller fugtighed.

Hvorfor vil en CO₂-udskillelse være tegn på aktive mikroorganismer?

Kommenter og vurder resultaterne

Hvilken funktion har har kontrolglassene (1 og 3)?

Er resultaterne entydige? kan man med forsøg af denne type opnå større grad af entydighed?

Q Q Q

Forsøg 6

Måling af respiration i jord

I forsøg 5 undersøgte mikroorganismers aktivitet i jord med en indikator (en kvalitativ analyse).

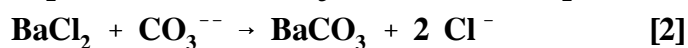
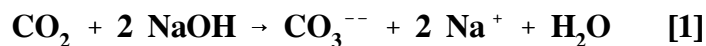
I dette forsøg gøres analysen kvantitativ ved at respirationen måles: den udskilte CO_2 absorberes i NaOH og den forbrugte mængde NaOH bestemmes ved titrering med HCl.

Nedbrydningen af stof i jorden og dermed mikroorganismernes aktivitet afhænger af flere faktorer - deriblandt temperatur, fugtighed, næringsstofftilgængelighed og tilstedeværelse af væksthæmmende eller væksthæmmende stoffer. Disse faktorer indflydelse kan måles i dette forsøg.

Q Q Q

Metode

CO₂ som produceres af organismer i jorden absorberes af NaOH (reaktion 1).



Carbonationen

bundfældes med BaCl₂ (reaktion 2), og den ikke forbrugte NaOH titreres med HCl (reaktion 3).

Differencen mellem titrerværdien (dvs mol NaOH) for en kontrolopstilling uden jord og en forsøgsopstilling med jord giver antal mol NaOH forbrugt i reaktionen med CO₂ (reaktion 1).

Da 1 mol NaOH svarer til til ½ mol CO₂, kan den producerede kuldioxid mængde beregnes ved at dividere NaOH forbruget med 2.

Angiv resultatet som mg CO₂ g_{jord}⁻¹ døgn⁻¹.

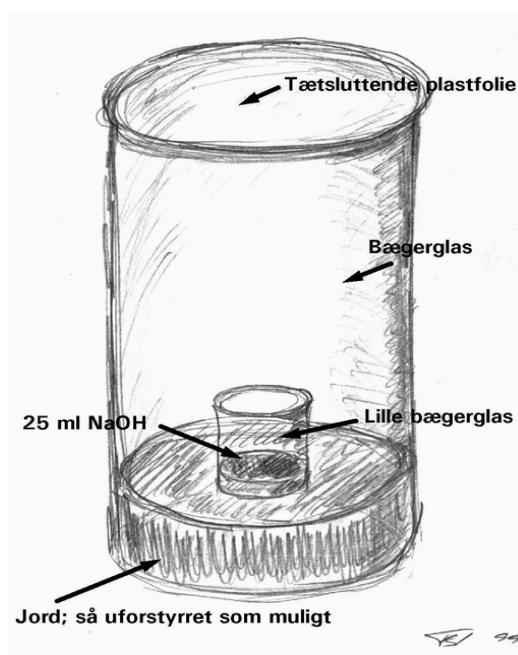
Materialer:

store bægerglas eller vidhalsede kolber (500 ml),
50 ml bægerglas,
0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, 25 % BaCl₂,
phenolphthalein (indikator: farveløs ved pH < 8,2;
rød ved pH > 10,0),
10 ml titrerburetteer,
10 ml og 25 ml pipetter,
magnetomrører, plasfolie, stanniol,
forskellige jordtyper.

Fremgangsmåde

Afpipetter 25 ml NaOH i et 50 ml bægerglas og anbring det i bunden af et stort bægerglas. Afvej 50 g jord og fordel den omkring det lille bægerglas. Hvis der anvendes tørret jord tilsættes 5-10 ml vand.

Opstillingen gøres lufttæt med plastfolie eller



lignende.

Der laves en opstilling for hver jordtype og eller behandling (se senere) samt en kontrolopstilling, hvori jorden er erstattet af stanniol.

Efter 1 - 2 døgns henstand titreres 10 ml NaOH efter tilsætning af 1 ml BaCl₂ og et par dråber indikator. Gentag med yderligere 10 ml. Gennemsnitsværdien benyttes til beregningerne - husk korrektion til det samlede volumen NaOH.

Supplement:

Jordens omsætningskapacitet for kulhydrater kan undersøges ved tilsætning af henholdsvis 0,05 g cellulose-pulver, 0,05 g glucose og 0,05 g stivelse.

Hvad sker der, hvis der tilsættes ekstra kvælstof og fosfat (fx 10 mg NaNO₃ og/eller 1 mg KH₂PO₄)?

Hvad sker der, hvis temperaturen øges eller sænkes?

Jordens pH kan måles på følgende måde:

Jord og demineraliseret vand i forholdet 1:10 rystes kraftigt og henstilles 30 minutter. Derefter måles pH med pH-meter i væsken over jorden.

Resultatbehandling

Beregn den producerede mængde CO₂ pr g jord pr døgn [mg CO₂ g_{jord}⁻¹ døgn⁻¹].
Kommentarer til resultaterne. Er kuldioxiden produceret ved respiration eller ved gæring?¹¹

Udregn mængden af omsat stof i forsøgene.

Q Q Q

¹¹

Beregn iltmængden i systemet; iltets massefylde kan findes af:

$$\rho = \frac{M_{\text{ilt}} \times 273 \text{ [K]}}{22,42 \times T \text{ [K]}}; \quad [\text{g l}^{-1}]$$

Forsøg 7

Tælling og farvning af bakterier

I forsøget vurderes bakterieantallet i en jordprøve ved hjælp af plade-spredningsteknikken (indirekte tælling). Bakterierne dyrkes i petriskåle på et passende næringssubstrat. Metoden kan også anvendes til vurdering af bakterieantal i vandprøver.

Q Q Q

Tællemetoder

I Direkte tælling.

Bakterierne tælles direkte i et tællekammer under mikroskop. Denne metode tæller samtlige bakterier i jordprøven, men det kan være vanskeligt at skelne de mindste, runde bakterietyper fra jordpartikler og andet.

1 g findelt jord hældes i 100 ml vand og omrystes kraftigt. Lad jordpartiklerne synke til bunds og overfør en dråbe til hver side af et tællekammer. Tæl bakterier systematisk i et passende antal felter. Tæl fx således at bakterier, der ligger på nedre og højre feltlinie medtælles til feltet og bakterier, der ligger på øvre og venstre feltlinie ikke medtælles til feltet.

Beregn et gennemsnitsantal pr felt og omregn til antal pr ml (hvert felt i et standardtællekammer svarer til et rumfang på $1/4000 \text{ mm}^3$). Dette tal ganget med 100 giver antal bakterier pr g jord.

II Indirekte tælling.

Bakterierne tælles ved at en jordprøve fortyndes et antal gange (typisk til $1/1000000$) og en prøve af fortyndingen derefter udsås på et passende vækstmedium i en petriskål.

Efter et par dages forløb kan bakterierne ses som kolonier, der hver repræsenterer én bakterie i den udsåede fortynding.

Koloniantallet ganget med fortyndingsfaktoren giver det antal bakterier, der har været i jordprøven.

Denne metode tæller kun levende bakterier og kun bakterier, der kan vokse på det valgte medium i petriskålen.

Q Q Q

Farvning

Negativ farvning

Bakterierne farves ikke, men fremtræder lyse på mørk baggrund. Hertil anvendes tusch eller nigrosinopløsning.

- 1 Et objektglas affedtes ved rensning i alkohol. Objektglasset tages op med en ren pincet og aftørres med et rent viskestykke.
- 2 Objektglasset flamberes (føres hurtigt gennem en bunsenbrænders flamme) og afkøles.
- 3 En dråbe bakteriekultur (fra en bouillonkultur) eller en smule af en koloni fra en petriskål anbringes på objektglasset (steriliser podenålen før og efter kontakt med bakterierne).
- 4 En dråbe tusch eller nigrosinopløsning tilsættes, og der blandes grundigt.
- 5 Blandingen stryges ud i et tyndt lag på objektglasset (brug kanten af et dækglas).
- 6 Præparatet lufttørres.
- 7 Mikroskoperes uden dækglas.

Q Q Q

Materialer:

jordprøver (evt findelte i en morter),
 6 sterile petriskåle,
 4 stk sterile 1 ml fuldpipetter, 1 stk steril 0,1 ml pipette (eller 1 stk steril 1 ml målepipette),
 1 konisk kolbe med 100 ml sterilt vand og 4 reagensglas med 9 ml sterilt vand (evt 0,5 % NaCl opløsning),
 parafilm, vandskyende vat, drigalskispapler.

Sterile dyrkningsmedier:

Kødekstrakt-pepton-agar (KPA):

kødekstrakt	5,0 g
pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
agar	15,0 g
vand	1000,0 ml

Kødekstrakt, pepton, NaCl og vand bringes i kog. Agar tilsættes under omrøring til det er opløst. pH indstilles til 7,0 - 7,2.

Autoclaveres 15 min ved 120 EC.

Jordekstrakt-pepton-agar:

Jordekstrakt:
500 g have- eller markjord + 1500 ml ledningsvand autoclaveres 1 time ved 120 EC.

Filtreres. Hvis filtratet er uklart kan der tilsættes 0,5 g CaCO₃ og filtreres igen efter 5 minutters henstand. Fortynd til 1000 ml med ledningsvand.

jordekstrakt	250,0 ml
pepton	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
gærekstrakt	1,0 g
glucose	1,0 g
agar	20,0 g
vand	750,0 ml

Jordekstrakt, vand, glucose, pepton, gærekstrakt og fosfat blandes og opvarmes til kogepunktet. Agar tilsættes under omrøring til det er opløst. pH justeres til 7,0.

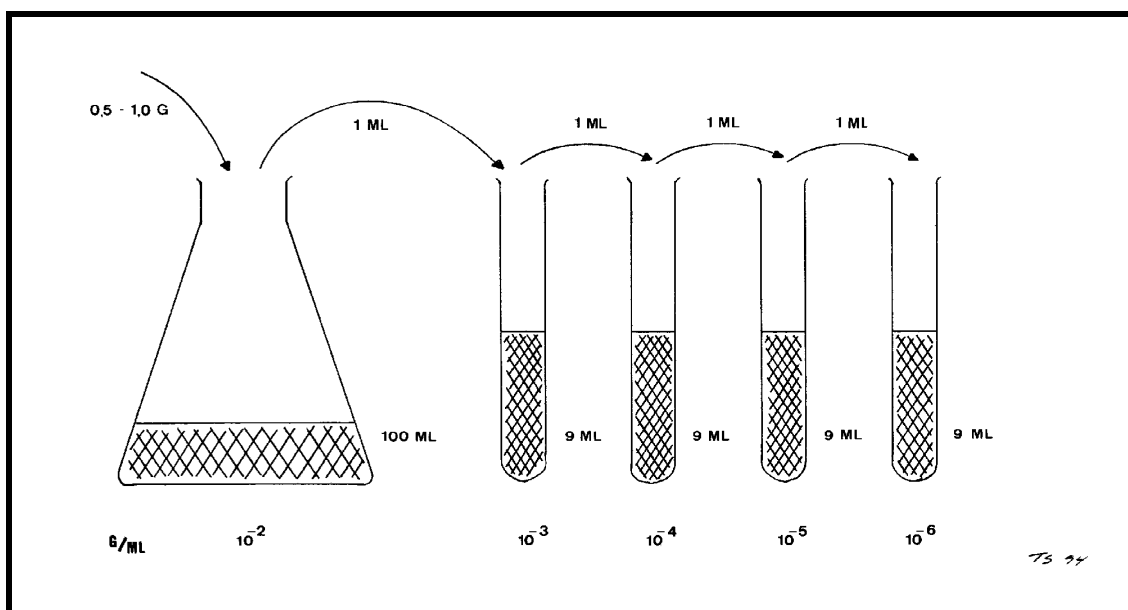
Autoclaveres 15 min ved 120 EC.

Fremgangsmåde

A Mærk reagensglassene 3 til 6.

Afvej 1,00 g (eller 0,50 g) jord og kom jorden i kolben.

Kolben omrystes derefter meget omhyggeligt med et stykke parafilm lagt over munden.



Figur 45. Fortynding af en jordprøve til bakterietælling.

Afpipetter 1 ml, der føres over i glas nr 3. Glas nr 3 omrystes.

Før 1 ml fra glas nr 3 (ny pipette!) til glas nr 4. Omryst glas nr 4.

Fortsæt på samme måde med glas 5 og 6.

Seks petriskåle indeholdende KPA eller JPA mærkes 4, 5 og 6 (mærkes i bunden).

Overfør 0,1 ml fra glas 6 til petriskålene mærket 6 og spred væsken ud på agaroverfladen med en steriliseret drigalskispatel.

Overfør 0,1 ml fra glas 5 til petriskålene mærket 5 og 0,1 ml fra glas 4 til petriskålene mærket 4. Spred væsken ud på agaroverfladen med drigalskispatelen (den samme pipette kan bruges alle tre gange, når man starter med den største fortynding).

Petriskålene sættes i varmeskab ved 30 °C. Vend bunden i vejret på skålene så kondensvand ikke drypper ned på agaroverfladen.

Der bør arbejdes så sterilt som muligt!

- B** Tæl evt. bakterierne i kolben ved direkte tælling.
- C** Mikroskoper og tegn bakterier fra udvalgte kolonier (evt efter opformering i bouillonkultur¹²). Anvend negativ-farvnings metoden (se side 43).

Resultatbehandling

Efter en passende tid optælles de bakteriekolonier, der er vokset frem på agar-overfladen.

Skåle med mindre end 5 og flere end 100 kolonier kasseres.

Beregn ud fra resten antal bakterier pr g jord (angiv resultatet som gns. \pm spredning).

Diskussion

Hvor mange bakterier er der pr g jord? Hvilke bakterietyper har I iagttaget? Er der forskel på jordtyperne (hvis I har brugt mere end en jordtype)? Sammenlign den direkte og den indirekte tællemetode. Hvilke fordele har den indirekte metode?

Vurder metodens nøjagtighed.

Hvad foretager bakterierne sig i jorden?

Q Q Q

¹²

Bouillonkultur: samme opskrift(er) som på side 44 men uden agar.

Resultatskema

	Antal kolonier					
Jordtype	Fortyndingsglas 4		Fortyndingsglas 5		Fortyndingsglas 6	
Gns						
Bakterier pr g						
Total gns						

Forsøg 8

Kvælstoffiksering ved Rhizobium-Lucerne symbiose

I forsøget dyrkes lucerneplanter i reagensglas med et kvælstoffrit medium: agar og sand.

En del af planterne podes med en opslemning af Rhizobiumbakterier, og efter nogen tids vækst sammenlignes de podede planter med ikke-podede kontrolplanter¹³.



Rhizobium knolde på små ærteplanter i kulturglas.

(www.safs.bangor.ac.uk)

Q Q Q

Materialer:

store reagensglas (200 mm x 22 mm), vandskyende vat,
sterilt sand, sterilt vand, 70% alkohol,

Rhizobium kultur, lucernefrø,

planteagar:	CaHPO_4	1,0 g
	K_2HPO_4	0,2 g
	MgSO_4	0,2 g
	NaCl	0,2 g
	FeSO_4	2,0 mg
	NaMoO_4	1,0 mg
	MnSO_4	1,0 mg
	CoCl_2	1,0 mg
	agar (Bacto)	8,5 g
	dest. vand til	1000 ml

Fremgangsmåde

Hæld 25 ml af planteagaren i hvert af reagensglassene. Luk glassene med vatprop og autoclavér ved 120 °C i 15 minutter.

Når agaren herefter er stivnet tilføres 10 ml sterilt sand, og glassene står et par dage, så sandet kan suge vand fra agaren.

Lucernefrø steriliseres ved skylning i 70 % alkohol og derefter i flere hold sterilt vand. Fem frø sås i hvert glas. Efter spiring udtynnes til to planter pr. glas.

Efter et par uger podes nogle af planterne ved at sætte tre dråber opslemmet bakteriekultur (et podenål - øje bakteriekoloni rystes i 1 ml sterilt vand) til glasset. Andre planter holdes som kontrolplanter og podes ikke.

Planterne stilles lyst og vandes efter behov med sterilt vand.

Iagttag planternes vækst igennem to måneder og notér tegn på kvælstofmangel.

Tag planterne op efter denne tid og se på rødderne - podede planter vil have 2-5 mm lang bakterieknolde. Knoldene er rødlige, hvis der finder en kvælstoffiksering sted og hvide, hvis bakterieaktiviteten er ophørt eller nogle af bakterierne i kulturen er muterede til en variant, som ikke passer til værtsplanten.

Diskussion

Hvorfor indeholder planteagaren så meget fosfat? Hvorfor skal der også være jern, molybdæn og cobolt i den?

Q Q Q

Forsøg 9

Ophobningskultur af kvælstofbindende bakterier

Azotobacter er en fritlevende, stavformet, aerob bakterie som kan binde atmosfærisk kvælstof.

I forsøget laves en ophobningskultur af Azotobacter ved hjælp af et vækstmedium uden kvælstof og med en kulstof- og energikilde, som er svært omsættelig for andre bakterier¹⁴.



Scanning electronmikrografi af Azotobacter celler. De hænger typisk sammen to og to. (www.jic.bbsrc.ac.uk/hosting/microbes/)

Q Q Q

¹⁴

Bearbejdet efter:

Annelise Kjøller & Sten Struwe: *Kvælstofcyklus - i mikrobielt perspektiv. Duplikerede forsøgsvejledninger. Institut for Sporeplanter, Københavns Universitet. 1975.*

Fremgangsmåde

- 1 Et objektglas affedtes ved rensning i alkohol; tages derpå op med en ren pincet og aftørres med et rent viskestykke.
- 2 Objektglasset flamberes (føres hurtigt et par gange gennem en bunsenbrænderflamme) og afkøles.
- 3 En dråbe bakteriekultur udstryges på objektglasset og lufttørres.
- 4 Farvning med eddkesyre-krystalviolet opløsningen i 4-7 minutter.
- 5 Afvaskning med kobbersulfatopløsningen.
- 6 Tørring og mikroskopering.

Q Q Q

Forsøg 9

Fangst-genfangst metoden til bedømmelse af populationsstørrelse

Fangst-genfangst metodens princip er at mærke en stikprøve af populationen, sætte den ud igen og efter en passende tid atter at fange en stikprøve af populationen. Under forudsætning af at mærkede og ikke-mærkede individer blandes tilfældigt, vil forholdet mellem mærkede dyr og totalt antal dyr i 2. stikprøve svare til forholdet mellem antal udsatte og mærkede dyr og hele populationen.

Metoden er oprindeligt udviklet af C.G.Johs. Petersen (dansk marinbiolog 1860-1928), som har brugt den til tælling af rødspætter i Limfjorden 1889 og 1894¹⁵.

Forsøget udføres her som et modelforsøg med træperler eller frø, for at undersøge metodesikkerheden.

Q Q Q

15

C.G. Johs. Petersen: *Om vore Flynderfiskes Biologi og om vore Flynderfiskeriers Aftagen. Beretning fra den Danske Biologiske Station IV, 1893-94.*

Se også:

E.D. Le Cren: *A Note On The History of Mark-Recapture Population Estimates, Journal of Animal Ecology 34, 1965; pp. 453-454.*

Helmuth Strandgaard: *Calculation of the population size based on marking and observation of animals. Afsnit 2 i The Roe Deer Population at Kalø and the Factors Regulating its Size. Danish Review of Game Biology 7, 1 1972; pp. 26-45.*

Metode

- 1 En prøve af dyrene indsamles
- 2 Permanente mærker anbringes på dyrene
- 3 De mærkede dyr slippes løs i forsøgsområdet
- 4 Antallet af mærkede og umærkede dyr i den følgende prøve (2) gøres op.
Denne prøve skal tages efter så tilpas lang tid, at mærkede og umærkede dyr har kunnet blandes tilfældigt i populationen.

Hvis man sætter

$$N = \text{populationsstørrelsen} \quad M = \text{antal mærkede og udsatte dyr i populationen}$$

$$n = \text{antal dyr i prøve 2} \quad m = \text{antal mærkede dyr i prøve 2}$$

og antager at de mærkede dyrs andel i populationen er lig med de mærkede dyrs andel i prøven kan populationsstørrelsen beregnes således:

$$\frac{M}{N} = \frac{m}{n}; \quad \text{dvs.} \quad N = M \frac{n}{m}$$

Hvis man arbejder med små prøvestørrelser kan beregningssikkerheden forbedres ved at korrigere formlen således¹⁶:

$$N = M \frac{n+1}{m+1}$$

Q Q Q

¹⁶

Efter **Norman T.J. Bailey**: *On Estimating The Size Of Mobile Populations From Recapture Data*. *Biometrika* 38 1951; pp. 293-306.

Vurdering af populationsbestemmelsens spredning

Hvis man antager at antallet af mærkede individer (m) i en prøvetagning (n) er tilnærmelsesvis normalfordelt vil det betyde at der er mindst 95 % sandsynlighed for at m ligger i intervallet $(\mu \pm 2F)$:

$$\left[\frac{M n}{N} - 2\sqrt{\frac{M n}{N}}; \frac{M n}{N} + 2\sqrt{\frac{M n}{N}} \right]$$

dvs

$$\frac{M n}{N} - 2\sqrt{\frac{M n}{N}} \leq m \leq \frac{M n}{N} + 2\sqrt{\frac{M n}{N}}$$

Divideres igennem med m og ganges med $(\sqrt{N})^2$ fås

$$\frac{M n}{m} - \frac{2}{m} \sqrt{M n} \sqrt{N} \leq (\sqrt{N})^2 \leq \frac{M n}{m} + \frac{2}{m} \sqrt{M n} \sqrt{N}$$

Ved at løse ulighederne kan man finde de intervalgrænser, som antallet af individer i populationen - med en sandsynlighed på 95 % - må antages at ligge imellem.

Q Q Q

Materialer:

farvede træperler, hvedefrø, majs eller lignende,
store bægerglas,
speedmarker.

Fremgangsmåde

Hæld en portion perler eller frø i et stort bægerglas. Tæl dem.

- 1 Udtag en stikprøve på 10 % af populationen .
Erstat dem med perler af en anden farve eller mal frøene med speedmarkeren. Sæt dem ud igen, bland grundigt og udtag en ny prøve (fx 50 stk). Beregn populationen.
- 2 Erstat perler eller frø i populationen med yderligere af den anden farve så antallet af mærkede er 20 %.
Bland grundigt og udtag en ny prøve (samme størrelse som før). Beregn populationen.
- 3 Fortsæt på samme måde med 30% mærkede, 40 % mærkede, 50 % mærkede, 60 % mærkede og 70 % mærkede. Beregn populationen for hvert trin.
- 4 Lav tilsvarende med andre prøvestørrelser, fx 10 stk og 100 stk.

Beregninger kan foretages manuelt, eller regnearksprogrammet Fangst-genfangst (fangst.wb1" eller fangst.wb3" til QuatroPro) kan anvendes til at udføre beregningerne og udskrive tabel over forsøgsresultater. Følg vejledningen i programmet.

Resultatbehandling og diskussion

Indtegn populationsstørrelsen som funktion af antal mærkede og/eller prøvestørrelse i et koordinatsystem (dette kan også gøres i regnearksprogrammet).

Hvor stor en del af populationen skal mærkes før den beregnede størrelse er realistisk?
Spiller prøvestørrelsen nogen rolle?

Resultatskema

Population (talt)	Antal mærkede udsat		Prøve-størrelse	Antal mærkede i prøve	Population (beregnet)	
N	M %	M	n	m	N	
	10					
	20					
	30					
	40					
	50					
	60					
70						

Forsøg 11

Simulering af rovdyr-byttedyr sammenhæng

Q Q Q

Stikordsregister

Biologisk oxygen forbrug (BO5)	9	Nettoproduktion	3
beregningsformel	12	omsætning	25
korrektion for afv. forsøgstid	12	Pladespredning	41
metode	10	Planteagar	50
Biomassebestemmelse	3	Regnearksprogram	
tørvægt	4	forureningssimulering	19
CO2-indikator	33	population	64
Farvning		produktionsmåling	5
Azotobacter	54	Respiration	
negativ farvning af bakterier	43	Bruttoproduktion	5
Fortynding		iltforbrug, BO5	9, 17
jordprøve, metode	45	måling af respiration i jord	37
Fortyndingsfaktor		Simulering	
BO5 analyse	12, 19	fangst-genfangst	57
Fortyndingsrække	45	forurening	17
Forureningstilstand	9	rovdyr-byttedyr	63
Jordekstrakt-pepton-agar	44	Thiosulfat	11
Kvalitativ analyse	37	Tællekammer	42
Kvantitativ analyse	37	Tælling	
Kødekstrakt-pepton-agar	44	pladespredning	42
Mikroorganismer		tællekammer	42
iltforbrug	9, 17	Tørvægt	4
påvisning med indikator	33	Winkleropløsning	11
respiration i jord	37		
tælling af bakterier	41		