KOMPENDIUM

Kæmpegræs (Arundo), Fayal, Açores

ØKOLOGI

II FORSØG

Indhold

Forsøg 1	*Produktionsmåling*	*side 3*
Forsøg 2	*BO_5 - bestemmelse*	*side 10*
Forsøg 3	*Forureningssimulering*	*side 17*
Forsøg 4	*Bestemmelse af nettoproduktionens omsætning*	*side 25*
Forsøg 5	*Påvisning af mikroorganismer i jord*	*side 31*
Forsøg 6	*Bakterietælling og -farvning*	*side 35*
Forsøg 7	*Rhizobium-Lucerne symbiose*	*side 43*
Forsøg 8	*Azotobacter kultur*	*side 47*
Forsøg 9	*Populationstælling*	*side 51*
Forsøg 10	*Simulering af rovdyr-byttedyr forhold*	*side 59*
Stikordsregister		*side 61*

Indledning

Dette hæfte rummer vejledninger og forslag til forsøg, der kan anvendes til undersøgelse af økologiske sammenhænge.

Forsøgene illustrerer og uddyber teksten i hæfte I. Dog kan forsøgene godt udføres uafhængigt af tekstbindet.
Forsøgene kan udføres enkeltvis; men der er lagt op til forsøgene kan supplere hinanden.

□ □ □

Forsøg 1

Produktionsmåling

I forsøget foretages en biomassebestemmelse på en enårig markafgrøde (hvede, raps, majs, el. lign) eller/og en flerårig græsmark[1].
Ud fra biomassebestemmelsen foretages et skøn over netto- og bruttoproduktionen.

□ □ □

[1] *Bearbejdet efter:*
***Poul Breum & Per Geckler*:** *Menneskets økologi, etologi og genetik, Nucleus 1978*

Forsøgsudførelse

A Biomassebestemmelse på en enårig afgrøde (majs, hvede, raps, byg el. lign.)

Udtag en passende prøve af afgrøden (fx 30 X 30 cm). Noter størrelsen.
Del planterne i rødder, stængler/blade og aks. Evt. jord på rødderne børstes eller skylles af.
Bestem vådvægten af plantedelene.
Pak hver del løst i staniol og lad dem tørre i varmeskab (105 °C) et par døgn.
Bestem tørvægten af plantedelene.

B Biomassebestemmelse i vedvarende græs

Grav en repræsentativ græstørv op, således at alle roddele kommer med.
Noter størrelsen af græstørven.
Split græstørven ad. Vask omhyggeligt jorden af rødderne og del planterne i rødder, stængler/blade/blomster og frø.
Pak hver del løst i staniol og lad dem tørre i varmeskab (105 °C) et par døgn.
Bestem tørvægten af plantedelene.

Foretag et skøn over fordelingen på enårige planter, flerårige planter, græsser og urter.

□ □ □

Beregninger

Beregninger kan foretages manuelt efter punkterne A og B nedenfor eller ved hjælp af regnearksprogrammet “Produktionsmåling” (til QuatroPro), punkt C.

A Udfyld resultatskema. Beregn vandindhold i afgrøden.
Beregn biomassen i g pr m^2.
Omregn ved hjælp af tabellen tørvægtene til energi og udtryk biomassen i kj/m^2.
Denne biomasse sættes lig med NP evt. med fradrag for udsæd (se tabellen).
Beregn forholdet mellem overjordisk og underjordisk biomasse (eller overjordisk og underjordisk biomasse i procent af den totale biomasse). Foretag på basis heraf et skøn over respirationen og beregn BP.

Beregn frøbiomassen i procent af den totale biomasse.
Beregn energiudnyttelsen (effektiviteten) i systemet (se tabel for solindstråling).

B Udfyld resultatskema. Beregn biomassen i g pr m^2.
Omregn ved hjælp af tabellen tørvægtene til energi og udtryk biomassen i kj/m^2.
Foretag et skøn over overvintret biomasse (fx 33 % hvis der er næsten udelukkende flerårige planter). Træk det fra den fundne biomasse og sæt dette resultat lig med NP.
Beregn forholdet mellem overjordisk og underjordisk biomasse (eller overjordisk og underjordisk biomasse i procent af den totale biomasse). Foretag på basis heraf et skøn over respirationen og beregn BP.

Beregn frøbiomassen i procent af den totale biomasse.
Beregn energiudnyttelsen (effektiviteten) i systemet (se tabel for solindstråling).

C Start regnearksprogrammet “Produktion” (eller “Produktionsmåling”).
Regnearket starter med en tom beregningsskabelon.
Følg fremgangsmåden i hjælpeteksten. Udskriv det færdigudfyldte skema og oversigtsskemaet med tidligere resultater til sammenligning.

□ □ □

Diskussion

Diskuter rimeligheden af de antagelser, der er foretaget under beregningerne.
Vil det være en undervurdering eller en overvurdering af den faktiske NP, at beregne den på den anvendte måde?
Er der forskel på forholdene mellem overjordisk og underjordisk biomasse for A og B?
Hvordan kan det i givet fald forklares?
Hvilke faktorer er ansvarlige for at effektiviteten er så ringe?

□ □ □

OMTRENTLIGT ENERGIINDHOLD I PLANTEMATERIALE [2]	**kJ/g**
Blade og stængler	17,8
Rødder	19,8
Frø	21,2
Solindstråling [3] [MJ/m^2/år]	3600
Udsæd (skøn) [g/m$^{2]}$	18

Tabel 6.
Tabelværdier for energiindhold, solindstråling og udsæd. Tallene for energiindhold er gennemsnitsværdier af målinger på 57 forskellige plantearter.

□ □ □

[2] ***Frank B. Golley***: *Energy values of ecological materials. Ecology, 42: 581-584. 1961.*

[3] ***B. Overgaard Nielsen***: *Stof og energi i naturen. Haase 1975.*

Resultatskema

Måleresultater

	vådvægt	tørvægt	vandindhold	AFGRØDE
	g	**g**	**%**	
Frø				
Stængler, blade, m.m.				
Rødder				
Total				
PRØVEFLADE:			**m²**	

Beregnede resultater

	BIOMASSE		NP	R	BP	EFFEKTIVITET	
	g/m²	**kJ/m²**	**kJ/m²/år**	**(skøn)**	**kJ/m²/år**	**BP/I %**	**NP/I %**
Frø							
Stængler, blade, m.m.							
Rødder							
Total							
Frøbiomasse i % af vægttotal:							
Frøbiomasse i % af energitotal:							
Overjordisk biomasse i % af total:			Underjordisk biomasse i % af total:				

Forsøg 2

MÅLING AF BIOLOGISK OXYGEN-FORBRUG (BO_5) I VANDPRØVER

Til rutinebedømmelse af et vandøkosystems forureningstilstand eller af den belastning, som en spildevandsudledning i et vandøkosystem ville have, anvender man en BO_5-analyse.
BO_5-analysen er en biologisk-kemisk standardmetode, som indirekte viser hvormeget letomsætteligt organisk stof, der er i økosystemet eller i spildevandet.
Man måler det biologiske iltforbrug (dvs. især mikroorganismernes iltforbrug) i en passende fortyndet prøve af systemet eller af spildevandet i løbet af 5 døgn (± 1 time) i mørke ved 20 °C (± 0,5 °C) (**BO_5** = Biologisk Oxygenforbrug pr liter pr 5 døgn)[4].

□ □ □

[4] *Metode efter:*

1 ***Tom Fenchel og Barbara Hemmingsen***: *Manual of microbial ecology. Akademisk forlag 1974*

2 ***Anon.***: *Limnologisk metodik. Københavns Universitet, Ferskvandsbiologisk Laboratorium. Akademisk Forlag 1977.*

Metode

En vandprøve fortyndes med iltrigt ledningsvand.
Fortyndingen bør ideelt vælges så 40-70 % af den oprindelige iltmængde i den fortyndede prøve forbruges i løbet af prøvetiden (5 døgn). Fortyndingen afhænger altså af vandprøvens forventede iltforbrug, som ikke er kendt på forhånd.

For at ramme intervallet kan det være nødvendigt at anvende to eller tre fortyndinger. En fortynding mellem 1:19 og 1:49 vil være passende til BO_5-måling i moderat til kraftigt forurenede vandøkosystemer.

Fortyndingen hældes på to 100 ml glasflasker med slebet prop.
Iltindholdet i den ene flaske bestemmes straks ved Winklertitrering.

Det giver **startværdien**: mg O_2 l^{-1} til rådighed i flasken**.**

Efter fem døgns henstand ved 20 °C i mørke bestemmes iltindholdet i den anden flaske.

Winklertitreringsmetode til iltbestemmelse i vandprøver:

Ved sammenblanding af W.1 og W.2 dannes manganohydroxid:

$$2\ NaOH + MnSO_4 \quad Mn(OH)_2 + Na_2SO_4 \qquad (1)$$

Manganohydroxiden oxideres af den ilt, der er opløst i vandet, og der dannes et bundfald af manganihydroxid:

$$4\ Mn(OH)_2 + 2\ H_2O + O_2 \quad 4\ Mn(OH)_3 \qquad (2)$$

Bundfaldet opløses ved tilsætning af koncentreret saltsyre.
De frigjorte manganiioner (Mn^{+++}) oxiderer iodidionerne (I^-) til frit iod (I_2), som farver væsken gul.
(Iodidionerne er tilsat med W.1 opløsningen i starten):

$$2\ Mn(OH)_3 + 6\ H^+ \quad 2\ Mn^{+++} + 6\ H_2O$$
$$2\ Mn^{+++} + 6\ I^- \quad I_2 + 2\ MnI_2 \qquad (3)$$

Endeligt bestemmes mængden af af frigjort iod ved titrering med thiosulfat (stivelse anvendes som indikator; omslag fra blåsort til farveløs):

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \quad Na_2S_4O_6 + 2\ NaI \qquad (4)$$

Resume: 4 mol S_2O_3-- svarer til 2 mol I_2 (reaktion 4), der svarer til 4 mol $Mn(OH)_3$ (reaktion 3), som atter svarer til 1 mol O_2 (reaktion 2).

1 mol thiosulfat svarer til 1/4 mol ilt.

Det giver **slutværdien**: mg O_2 l^{-1} tilbage i flasken.

Differencen mellem startværdi og slutværdi ganget med fortyndingsfaktoren (20-50) giver BO_5-værdien.

□ □ □

Materialer:

2 stk 100 ml glasflasker med slebet prop, 1 stk 250 ml eller 500 ml målekolbe, 3 stk 1 ml målepipetter og 1 stk fuldpipette passende til den valgte fortynding, pipettebolde, koncentreret HCl, staniol.

Winkleropløsning 1: *500 g **NaOH** og 150 g **KI** i 1000 ml demineraliseret vand.*
Winkleropløsning 2: *400 g **$MnSO_4$** i 1000 ml demineraliseret vand.*

Til titrering:
0,01 M $Na_2S_2O_3$: *2,482 g **$Na_2S_2O_3$*5 H_2O** opløses i demineraliseret vand til 1,00 l, derefter tilsættes 1 g Na_2CO_3; eller standardampul fortyndet med demineraliseret vand.*
stivelsesopløsning: *1 g stivelse opløses i 100 ml varm, mættet NaCl opløsning (357 g NaCl/l).*
10 ml titrerburette, pipettebold, magnetomrører og små bægerglas eller koniske kolber (150 ml).

Fremgangsmåde

A: Find rumfanget af glasflaskerne ved at trække den tomme flaskes vægt fra vægten af flasken fyldt med vand (begge gange med prop isat).

B: Afpipetter med fuldpipette en passende prøve over i en målekolbe (ved fortynding 1:49 afpipetteres 5 ml over i en 250 ml kolbe).
Fyld op til stregen med frisk ledningsvand og omryst kolben.
Lad den stå mørkt 15 min (der må ikke være luftbobler i vandet).
Fyld fortyndingen i flaskerne (helst med hævert så yderligere iltning undgås).
Sæt propperne i uden at der fanges luftblærer.

Lad den ene flaske stå mørkt i varmeskab til der er gået 5 døgn (flasken kan evt. pakkes ind i staniol). Varmeskabet stilles til 20 °C.
Tilsæt derefter Winkleropløsningerne til flasken (punkt C).
Den anden flaske behandles straks efter punkt C.

C: Tilsæt 1 ml Winkleropløsning 1 til flasken og umiddelbart derefter 1 ml Winkleropløsning 2 (dyp ikke pipetterne ned i flasken). Brug pipettebolde! Sæt proppen i (undgå luftblærer) og omryst.

Sæt flasken mørkt mindst 30 minutter. Tilsæt derefter 1 - 2 ml koncentreret saltsyre. Sæt proppen i igen og ryst flasken til bundfaldet er opløst.
Hæld indholdet i et bægerglas og titrér med thiosulfat til farveomslag. Et

par dråber stivelse kommes i som indikator.
Forbruget af thiosulfat aflæses med 2 decimalers nøjagtighed og anvendes i beregningerne.

Beregninger

Forbruget af thiosulfat (x ml) ganget med thiosulfatens molaritet (M = 0,01 mmol ml^{-1}) giver det antal mmol thiosulfat, der er forbrugt ved titreringen (reaktion 4 i metodeoversigten side 10).
Dette tal ganget med 1/4 giver antal mmol ilt i flasken.
Derefter omregnes til mg O_2 ved at gange med ilts molmasse (32 mg $mmol^{-1}$).
Endelig udtrykkes iltindholdet i mg O_2 l^{-1} flaskevand ved division med flaskens rumfang (minus 2 ml Winkleropløsninger):

$$\textit{iltindhold} = \frac{\left(\frac{x \text{ ml} \quad 0{,}01 \frac{\text{mmol}}{\text{ml}}}{4} \right) 32 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}}{(\textit{FR} \text{ ml} - 2 \text{ ml})\, 10^{-3} \frac{\text{l}}{\text{ml}}} ; \quad [\text{mg } O_2 \text{ l}^{-1}]$$

som kan forkortes til:

$$\textit{iltindhold} = \frac{x \text{ [i ml]} \quad 80}{\textit{FR} \text{ [i ml]} - 2} ; \quad [\text{mg } O_2 \text{ l}^{-1}]$$

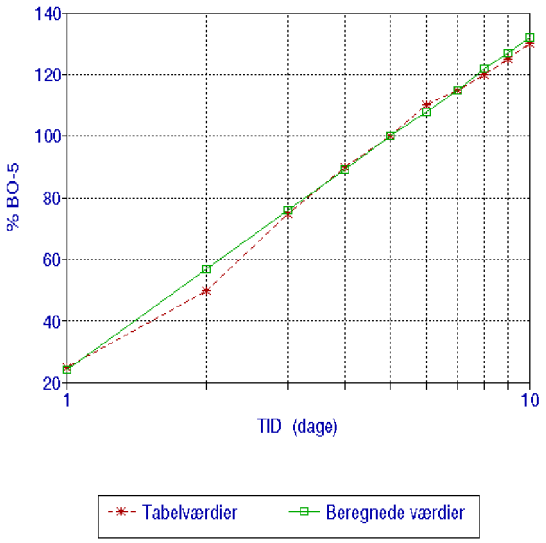
Iltforbruget (BO_5-værdien) beregnes derefter ved at trække iltindholdet i slutflasken fra iltindholdet i startflasken og gange med fortyndingsfaktoren:

$$BO_5 = \textit{fortynding} \quad (\textit{start-iltindhold} - \textit{slut-iltindhold}) ; \quad [\text{mg}O_2 \text{ l}^{-1}].$$

Har forsøgstiden ikke været 5 døgn, kan en tilnærmet BO_5-værdi beregnes:

$$BO_5 = \frac{BO_x}{0{,}24 \quad 0{,}47 \ln x} ; \quad x = \text{antal døgn}$$

BO_5-værdierne kan korrigeres (tilnærmede værdier) for kortere eller længere forsøgstid end standardforsøgstiden 5 døgn ved hjælp af formelen ovenfor eller nedenstående tabel eller graf[5].



DØGN	% BO_5 (tabelværdi)	% BO_5 (beregnet)
1	25	24
2	50	57
3	75	76
4	90	89
5	100	100
6	110	108
7	115	115
8	120	122
9	125	127
10	130	132

□ □ □

Diskussion

5 *Bearbejdet efter*
Ivar Cornelius Petersen: *Feltbiologi i undervisningen, Nucleus 1981*

Hvad måler man ved en BO_5-analyse?
Sammenlign resultatet med tabelværdierne i tabel 26 og 27 i hæfte I; hvilken forureningstilstand er der tale om?
Vurder resultatets og metodens anvendelighed og pålidelighed.

Mikroskoper en vandprøve fra økosystemet og undersøg den for karakteristiske organismetyper, fx:

infusionsdyr	*hjuldyr*	*grønalger*	*bakterier*
flagellater	*rundorme*	*kiselalger*	*cyanobakterier*
grønne flagellater	*krebsdyr*		

Udregn evt. et saprobieindeks for systemet på basis af organismetyperne[6].
Giver det samme resultat som BO_5-analysen?
Sammenlign de to typer forureningsanalyse.

□ □ □

6 *Oplysninger kan findes i fx*:

1 ***S. E. Abrahamsen***: *Biologiske Ferskvandsundersøgelser. Forum 1976.*

2 ***H. Liebmann***: *Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie. München 1962.*

3 ***V. Sladecek***: *System of Water Quality from the Biological Point of View. Ergebnisse der Limnologie, Heft 7. Archiv für Hydrobiologie, Stuttgart 1973.*

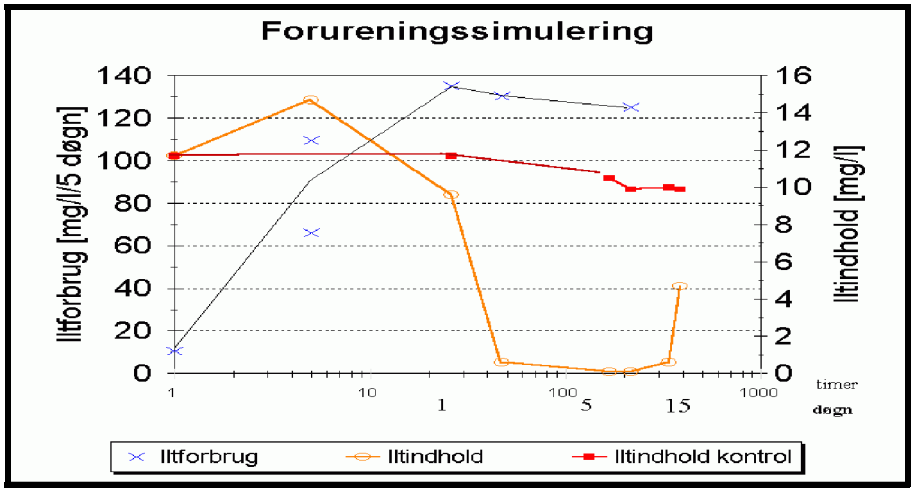
Resultat-skema

for-tynd-ing	BO_5 start					BO_5 slut					iltfor-brug
			rum-fang	thiosul-fat	iltind-hold			rum-fang	thiosul-fat	iltind-hold	BO_5
	dato	tid	ml	ml	mg/l	dato	tid	ml	ml	mg/l	mg/l

Forsøg 3

Forureningssimulering

I forsøget undersøges hvordan en “model-sø” reagerer på en forurening med organisk stof.
Ud over at måle ændringerne i iltindholdet og iltforbruget kan forsøget udvides til at undersøge bakterievæksten og ændringerne i ammoniak-, nitrat- og fosfatindholdet i vandet.



Eksempel på resultater fra et forureningssimuleringsforsøg.

□ □ □

Materialer:

Tre eller flere 3 liters koniske kolber eller store sylteglas.
Søvand.

Materialer til måling af iltforbrug (Winkler metode, jvf side 11):
Winklerreagens 1 og 2, 100 ml glasflasker med slebet prop, konc. saltsyre,
natriumthiosulfat (0,1 M eller 0,01 M),
stivelsesopløsning (indikator ved titrering),
titrérburette og magnetomrører,
pipetter og målekolber til fortynding.

Iltelektrode.
Evt. udstyr til bakterietælling; evt. udstyr til måling af ammoniak, nitrat og fosfat.

Fremgangsmåde:

Fyld søvandet i kolberne eller glassene så der er 2,5 l i hver.
Lad vandet stå et døgn således at iltindholdet stabiliseres. Mærk kolberne eller glassene A, B, C, .. og Kontrol.

Mål iltindholdet med iltelektroden i alle kolberne eller glassene.
Tag en prøve fra til BO_5-bestemmelse (fortynding til 1/10). Se fremgangsmåden i vejledningen til BO_5 forsøget (side 10 og 11).

Tilsæt 1 ml mælk (eller 1 g opløst stivelse samt 0,1 g kødekstrakt) pr liter vand til forsøgskolberne A, B, C etc.
Udtag straks efter prøver til BO_5-bestemmelse (fortynding til 1/10) og mål iltindholdet med iltelektroden i alle kolberne.
Udtag med passende intervaller (fx. 2 timer, 4 timer, 1 døgn, 2 døgn, 5 døgn, 10 døgn, etc) prøver til BO_5-bestemmelse og mål iltindholdet med iltelektroden.

Fortyndingen ændres undervejs til 1/20 (4-5 timer) og 1/50 (1-5 døgn).

Noter omhyggeligt prøvetidspunkt og dato og tid for BO_5-prøvens start og slut (dvs når Winkler opløsningerne tilsættes).

Prøver fra kontrolkolben tages med større intervaller (fx. 1 døgn, 5 døgn, etc).

Fortynding til 1/10.
Noter lugt og udseende af kolberne.
Prøver kan evt. tages fra til bakterietælling (se vejledning side 35) og til bestemmelse af ammoniak-, nitrat- og fosfatkoncentrationen.

Resultatbehandling

Beregn start-iltindhold og slut-iltindhold for hver BO_5-prøve. Beregn iltforbruget ved at trække *slut-iltindhold* fra *start-iltindhold* og gange med fortyndingsfaktoren. Beregn forsøgstiden ved hjælp af start- og sluttidspunkterne og korriger derefter iltforbruget (**BO_x**) til **BO_5** (jvf. side 13):

$$BO_x = \textit{fortynding} \quad (\textit{start-iltindhold} - \textit{slut-iltindhold}) \; ; \quad [mgO_2\ l^{-1}]$$

$$BO_5 = \frac{BO_x}{0{,}24 \quad 0{,}47 \ \ln x} \; ; \quad x = \text{antal døgn}$$

Sæt de beregnede resultater ind i resultatskemaet.

Alternativt kan resultaterne beregnes og udskrives på skemaform ved hjælp af regnearksprogrammet “Simulering” (“Simul.wb1") til QuatroPro.
Følg vejledningen i programmet.

Indtegn iltindhold og BO_5-værdierne i et diagram som funktion af prøvetidspunktet (timer eller døgn fra start, som sættes til tiden 0).

Diskussion

Hvad viser forsøget?
Hvorfor stiger iltforbruget efter tilsætningen af mælk?
Hvorfor bliver kolberne grønne af alger?
Hvordan ville du tegne bakteriemængden i kolberne som funktion af tiden?

Er der den samme mængde kvælstof i kolberne nu, som da mælken blev tilsat?
Hvordan er kvælstoffet i mælken blevet omsat?

□ □ □

Måleskema

Prøvetidspunkt		For-tyn-ding	BO_5 start					BO_5 slut					Iltindhold (målt)
					rumfang	thiosulfat				rumfang	thiosulfat		
dato	tid		dato	tid	ml	ml		dato	tid	ml	ml		

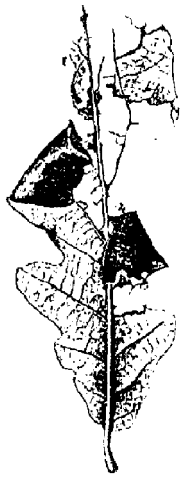
Resultatskema

Kolbe:							
prøvetids-punkt	iltindhold		fortyn-ding	forsøg-stid	iltforbrug	**BO_5**	iltind-hold
	start	slut			**(BO_x)**	(korri-geret)	
timer; døgn	**mg/l**	**mg/l**		**døgn**	**mg/l/ x døgn**	**mg/l/ 5 døgn**	**mg/l**

Forsøg 4

Undersøgelse af netoprimærproduktionens omsætning i en skov.

I forsøget undersøges hvor mange procent af nettoprimærproduktionen, der omsættes gennem græsningsfødekæden og gennem nedbryderføderkæden i en skov[7].



Egeblad med gnav af egevikler.
(Natur & Museum 13, 1-2. 1968)

[7] *Bearbejdet efter Kaskelot Pædagogiske Særnumre nr 33, 1980.*

Materialer:

en pose tilfældigt valgte, nyfaldne blade fra en skovbund, sakse, papir, spidse blyanter, analysevægt.

Fremgangsmåde:

Sorter bladene efter planteart.
Hver person eller gruppe tager tilfældigt mindst fem (gerne ti eller flere) blade af en eller flere plantearter (undgå blade helt uden huller).
Bladet lægges fladt udstrakt på et stykke papir, og bladets omrids tegnes. Hvis dele af bladet mangler, tegnes omridset som om, der ikke manglede noget.
Indtegn samtlige huller i bladet på papiret ved siden af tegningen af bladomridset.
Klip det hele blad og alle "hullerne" ud og vej begge dele på analysevægten.

Beregninger og diskussion

Udregn hvor mange % af bladet, der er blevet spist og saml alle resultater i et skema (hver art for sig).
Udregn gennemsnitsværdi og spredning for hver art.
Er der forskel på plantearternes fortæringsgrad?[8]

Hvilke arters blade ligger længst tid i genkendelig form i skovbunden?
Hvilke nedbrydere omsætter bladene?
Hvordan kan man forklare eventuelle forskelle i nedbrydningshastighed?

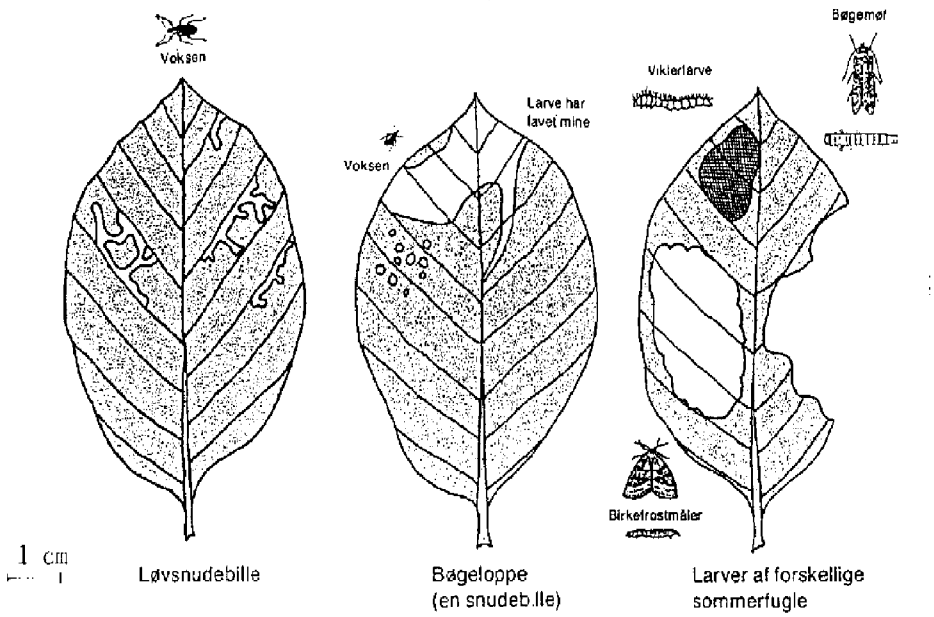
Forsøg at identificere de planteædere, der har ædt af de undersøgte blade (se figuren på næste side og figuren på titelbladet[9]).
Skitsér nogle konkrete fødekæder, som dyr og blade kunne være del af.

---

8 *Vejledning i statistisk behandling af forsøgsresultater se:*
***Thorkild Steenberg**: Om Vurdering af Talmateriale.*

9 *Se fx følgende litteratur:*
*1 **B. Overgaard Nielsen**: Bladminer på træer og buske. Natur & Museum 10. årg. nr 1-2. 1964.*
*2 **O. Zethner-Møller**: Skadelige insekter og svampe på skovtræer. 2. Løvtræer. Natur & Museum 13. årg. nr 1-2. 1968.*

Vurder metodens anvendelighed og resultaternes pålidelighed.



Figur 27. *Eksempler på gnavespor på bøge og egeblade.*
(Kaskelot Pædagogiske Særnumre nr 33)

□ □ □

Måleresultater

hele bladet	huller	% ædt	hele bladet	huller	% ædt

Forsøg 5

Påvisning af mikroorganismer i jord

Mikroorganismers tilstedeværelse og aktivitet i jord kan påvises med en CO_2-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.
Nedbrydningen af stof i jorden og dermed mikroorganismernes aktivitet afhænger af flere faktorer - deriblandt temperatur, fugtighed, næringsstoftilgængelighed og tilstedeværelse af væksthæmmende eller vækstfremmende stoffer.
Nogle af disse faktorer kan undersøges i dette forsøg[10].

□ □ □

10 *Bearbejdet efter:*
***Poul Breum og Per Geckler**: Menneskets økologi, etologi og genetik. Nucleus 1978.*

Materialer:

cylinderglas, dværgreagensglas, gummipropper,
phenolrødtopløsning- phenolrødt viser tilstedeværelse af CO_2 ved at skifte farve fra rød til orange eller gul:

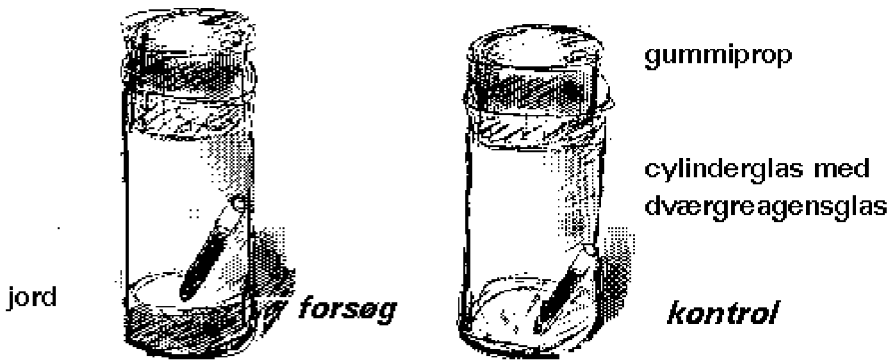
	rød	orange	gul	indikatorfarve
	-	+	+ +	kuldioxid

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 CO_2-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?

□ □ □

Forsøg 6

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.

□ □ □

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 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.

□ □ □

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.

□ □ □

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, drigalskispatler.

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 °C.

Jordekstrakt-pepton-agar:

Jordekstrakt:
500 g have- eller markjord + 1500 ml ledningsvand autoclaveres 1 time ved 120 °C.
Filtreres. Hvis filtratet er uklart kan der tilsættes 0,5 g $CaCO_3$ og filtreres igen efter 5 minutters henstand.
Fortynd til 1000 ml med ledningsvand.

jordekstrakt	250,0 ml
pepton	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
gærekstrakt	1,0 g
glucose	1,0 g
agar	20,0 g
vand	750,0 ml

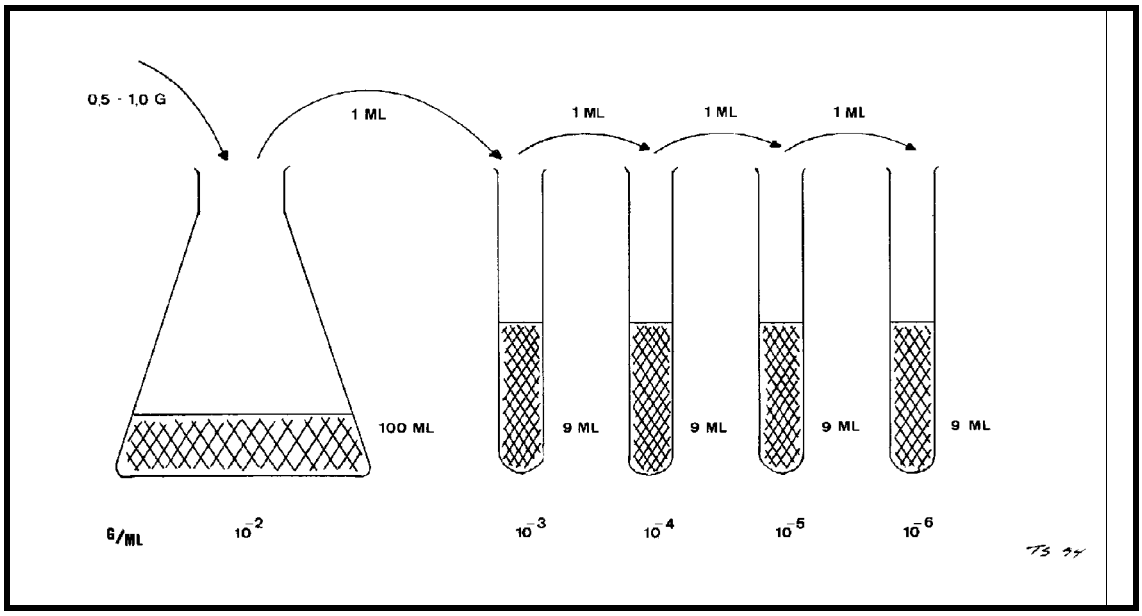
Jordekstrakt, vand, glucose, pepton, gærekstrakt og fosfat blandes og opvarmes til kogepunktet. Agar tilsættes under omrøring til det er opløst. pH justeres til 7,0.
Autoclaveres 15 min ved 120 °C.

□ □ □

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 mundingen.



Figur 39. *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 bouillonkultur[11]). Anvend negativ-farvnings metoden (se side 37).

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 udfra resten antal bakterier pr g jord (angiv resultatet som gns. ± 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?

□ □ □

11 *Bouillonkultur: samme opskrift(er) som på side 38 men uden agar.*

Resultatskema

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

Forsøg 7

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 kontrolplanter[12].

Rhizobium knolde på små ærteplanter i kulturglas.
(www.safs.bangor.ac.uk)

□ □ □

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

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 udtyndes 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?

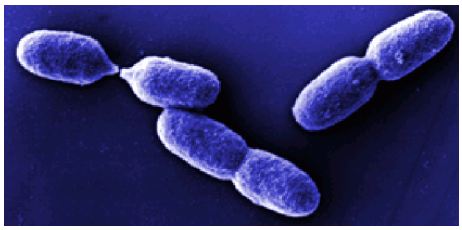
□ □ □

Forsøg 8

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 bakterier[13].



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

□ □ □

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

Materialer:

500 ml koniske kolber, jord,

***næringsopløsning**:*	*mannitol*	*20,0 g*
	K_2HPO_4	*0,5 g*
	$CaSO_4$	*0,1 g*
	$MgSO_4$, 7 H_2O	*0,3 g*
	NaCl	*0,2 g*
	FeCl	*0,1 g*
	$CaCO_3$	*5,0 g*
	vand til	*1000 ml*

pH justeres til 8,3
autoclavering ikke nødvendig.

Fremgangsmåde

100 ml næringsopløsning hældes i 500 ml koniske kolber.
Tilsæt en spatelfuld jord og lad kolberne stå mørkt en uge ved 25-28 °C.

Der dannes en bakteriehinde på overfladen af næringsopløsningen.
Bakterierne fra denne hinde farves og mikroskoperes: negativ farvning side 37 eller special farvning se nedenfor.

Farvning af Azotobacter celler og slimkapper

Azotobacter cellerne forekommer ofte i par. Bakterien kan desuden danne hvileceller, som er omgivet af en tyk slimkappe.
Bakterierne farves mørkeblå og slimkapperne violette.

Opløsninger: *eddikesyre-krystalviolet opløsning:*
1 g krystalviolet opløses i 100 ml 45 % eddikesyre

kobbersulfatopløsning:
20 g $CuSO_4$ opløses i 80 g demineraliseret vand

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 bunsen-brænserflamme) 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.

□ □ □

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 til atter at fange en stikprøve af populationen. Under forudsætning af at mærkede og ikke-mærkede individer blandes tilfældigt vil forholdet mellem mærkede og total antal dyr i 2. stikprøve svare til forholdet mellem antal udsatte, 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 1894[14].

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

□ □ □

14 ***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 Polulation 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 = populationsstørrelsen *M = antal mærkede og udsatte dyr i populationen*
n = antal dyr i prøve 2 *m = 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 populationsstørelsen 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 således[15]:

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

□ □ □

15 *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 ($\mu \pm 2\sigma$):

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

dvs

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

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

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

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.

□ □ □

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 mærke-de i prøve	Population **(beregnet)**
N	**M %**	**M**	**n**	**m**	**N**
	10				
	20				
	30				
	40				
	50				
	60				
	70				

Forsøg 10

Simulering af rovdyr-byttedyr sammenhæng

□ □ □

Stikordsregister

Biologisk oxygen forbrug (BO5) 9
  beregningsformel 12
  korrektion for afv. forsøgstid 12
  metode 10
Biomassebestemmelse 3
  tørvægt 4
CO2-indikator 31
Farvning
  Azotobacter 48
  negativ farvning af bakterier 37
Fortynding
  jordprøve, metode 39
Fortyndingsfaktor
  BO5 analyse 12, 19
Fortyndingsrække 39
Forureningstilstand 9
Jordekstrakt-pepton-agar 38
Kødekstrakt-pepton-agar 38
Mikroorganismer
  iltforbrug 9, 17
  påvisning med indikator 31
  tælling af bakterier 35
Nettoproduktion 3
  omsætning 25
Pladespredning 35
Planteagar 44
Regnearksprogram
  forureningssimulering 19
  population 60
  produktionsmåling 5
Simulering
  fangst-genfangst 51
  forurening 17
  rovdyr-byttedyr 59
Thiosulfat 11
Tællekammer 36
Tælling
  pladespredning 36
  tællekammer 36
Tørvægt 4
Winkleropløsning 11

□ □ □