

A talaj mikrobiális biomassza meghatározása kloroform fumigációs módszerrel

Régóta ismert, hogy a talajban élő mikroorganizmusok csíraszám alapján történő mennyiségi meghatározása nem ad reális kvantitatív adatot az összes biomasszára vonatkozóan. Ezért számos, a tenyésztés szelektív hatását kiküszöbölő módszert dolgoztak ki az utóbbi évtizedekben, amelyek közül egyszerűségüknél és rutinszerű alkalmazhatóságuknál fogva kiemelkednek a kloroform fumigációs eljárások. Előnyük, hogy a mérések eredményeként közvetlenül a biomassza C-, N- vagy más elem tartalmát kapjuk meg, szemben más biomassza becselő eljárásokkal, melyeknél bonyolult és nehezen kalibrálható átszámítási eljárások szükségesek. Jelen összefoglaló aktualitását az adja, hogy 30 évvel ezelőtt jelent meg a Jenkinson által vezetett rothamstedi kutatócsoport öt cikkből álló sorozata a *Soil Biology & Biochemistry* folyóiratban a mikrobiális biomassza kloroform fumigációs módszerrel történő meghatározásáról, illetve 40 éve az ezt megalapozó tanulmány. Azóta több mint ezer tudományos cikkben közöltek eredményeket a kloroform fumigációs módszer alkalmazásával.

A talaj mikrobiális biomasszája és mérési módszerei

Bár a talajok mikrobiális biomasszája viszonylag kicsi, mégis a talaj szerves anyag egyik legfontosabb frakciójának tekinthető, mivel nagyon gyorsan reagál a talaj fizikai és kémiai állapotában bekövetkező változásokra. JENKINSON (1977) úgy fogalmaz, hogy a mikrobiális biomassza olyan, mint a tű foka, amelyen valamennyi talajba került szerves anyagnak át kell hatolnia. A mikrobiális biomassza fontos szerepet játszik a fő növényi tápelemek (N, P és S) átalakulásaiban, beépítési (immobilizációs) és ásványosítási (mineralizációs) folyamatok révén befolyásolja felvehetőségüket (MARTENS, 1985; MERCKX & MARTIN, 1987; NÉMETH, 1996; KÁTAI et al., 2006).

Mezőgazdasági talajokban a mikrobiális szén $0,1\text{--}1,0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ és rendszerint az összes szerves-szén 1–3%-át teszi ki. Ez a sejtömeg 100–600 kg nitrogént és 50–300 kg foszfort köt meg egy hektár talajban a felső 30 cm-es rétegben (MARTENS, 1995). A tápanyagok felszabadulása és megkötése a mikroorganizmusok életmenet dinamikájától függ. A talajba került növényi maradványok és a gyökerek által kiválasztott anyagok elősegítik a biomassza növekedését és a tápanyagok megkötését, a mikroorganizmusok pusztulását viszont ezen anyagok felszabadulása követi. A mikrobiális biomassza tápanyagszolgáltató képessége abból adódik, hogy míg a növényekben a C:N arány 40–80:1, addig a mikroorganizmusokban ez jóval kisebb, 6–12:1. A mikroorganizmusok foszforból is jóval többet tartalmaznak, mint a növények. A mikrobiális biomasszát számos modell (MCGILL et al., 1981; MOLINA et al., 1983; VAN VEEN et al., 1985;

JENKINSON, 1990) figyelembe veszi a talaj C- és N-forgalmának tanulmányozásában. A hazai tartamkísérletek talajainak szerves-C dinamikáját és ezen belül a mikrobiális C jelentőségét, eddig kevesen kutatták (CSITÁRI & HOFFMAN, 2005; KÁTAI, 2006).

A nehézfém-szennyezés lecsökkentheti a mikrobiális biomasszát a talajban (DUMONTET & MATHUR, 1989; FLIESSBACH et al., 1994; SZILI-KOVÁCS et al., 1998; 2006), ezért, az a talajminőség egyik indikátora lehet (BROOKES, 1995).

A talaj-mikroorganizmusok biomasszájának meghatározásához egyszerű és megbízható módszerek szükségesek.

A jelenleg használatos módszerek a következők:

- direkt számolási eljárások, melynek során a mikroorganizmusokat megfestik (NICHOLAS & PARKINSON, 1967; INGHAM & KLEIN, 1984; STAMATIADIS et al., 1990) és mikroszkóppal vizsgálják. Baktériumoknál méretük, gombáknál pedig az összes hifa-hosszúság szerint kiszámítják az összes élő térfogatot és ez alapján biomasszájukat (SCHMIDT & PAUL, 1973);

- a mikrobiális biomasszában kötött szén mikrobiális felszabadításán alapuló fumigációs–inkubációs (CFI) módszerek (JENKINSON, 1966; JENKINSON & POWLSON, 1976; SPARLING et al., 1986; DUMONTET & MARTHUR, 1989);

- extrakciós eljárások, a kloroform fumigációt követően a mikrobiális eredetű C (VANCE et al., 1987; TATE et al., 1988), N (BROOKES et al., 1985), P (BROOKES et al., 1982; HEDLEY & STEWART, 1982), S (SAGGAR et al., 1981; WU et al., 1994) elemek meghatározása;

- a talajból közvetlenül kivonható ATP (adenozin-trifoszfát) (JENKINSON et al., 1979) vagy az összes adenilát, ATP+ADP+AMP (DYCKMANS et al., 2003) kvantitatív meghatározása;

- a talajból közvetlenül kivonható foszfolipidek zsírsav-metilészterre történő átalakítása és gázkromatográfiás mennyiségi elemzése (FROSTEGÅRD et al., 1991);

- fiziológiai módszerek, amelyeknél a szubsztrátadagolást követő respirációs aktivitást használják fel az aktív anyagcserét folytató biomassza meghatározására (ANDERSON & DOMSCH, 1978b);

- mikrokalorimetriás módszerrel (SPARLING, 1981; VANDENHOVE et al., 1991) a talajból képződött hőmennyiség mérése alapján becslik a biomasszát.

Egyik módszer sem tökéletes, a kutatási cél, illetve a rendelkezésre álló eszközök szabják meg, hogy melyiket alkalmazzák. Kétségtelen tény, hogy az utóbbi két évtizedben a VANCE és munkatársai (1987) által kidolgozott fumigációs extrakciós módszer terjedt el legjobban, amelyre a Scopus® keresőrendszere szerint több mint 1200 hivatkozás történt. Ezt a módszert hazánkban is alkalmazzák (SZILI-KOVÁCS et al., 1998; KÁTAI et al., 2005; CSITÁRI & HOFFMAN, 2005). A kloroform fumigációs módszerrel az összes (élő aktív, élő inaktív és holt) mikrobiális biomassza tömegét mérhetjük meg.

A fumigációs inkubációs (CFI) módszer

A talajok fertőtlenítésére régóta használnak fumigáló szereket, például metilbromidot a természetett növényeket károsító kórokozók ellen.

Ezzel kapcsolatos az a megfigyelés mely szerint (STÖRMER, 1908, cit in. JENKINSON, 1966) a talaj szén-diszulfiddal és rokon vegyületeivel történt fumigálása a következő eredményekkel járt: 1. a toxikus fumigálószert követően jelentős mennyiségű

többszörös-N tápanyag szabadult fel, ami segítette a növények növekedését; 2. ez a N-többszörös a fumigáló szer által elpusztított mikroorganizmusokból származott; 3. a fumigáló-kezelést követően a baktériumok szaporodási sebessége megnőtt, és ezek lebontották az elpusztult mikroorganizmusokat, sejtjeikből felszabadítva a nitrogént.

A korábbi megfigyelések eredményeit felhasználva JENKINSON (1966) három feltevést vizsgált meg: 1. A mikrobiális aktivitást és növekedést a talajokban ismeretlen toxikus anyagok gátolják, vagy a mikrobiális populációk közötti antagonisztikus kölcsönhatások gátló hatása érvényesül. A fumigálás következtében a részleges sterilizálás egy bizonyos ideig feloldja ezt a gátlást. 2. A talajokban a szerves anyag egy része fizikailag, vagy kémiai védett a mikrobiális támadással szemben, amelyet a kloroformkezelés megszüntet. 3. A részleges sterilizálás (hevítés, levegőn történő kiszáritás, besugárzás) megnöveli a vízzeloldható szerves anyagok mennyiségét. JENKINSON (1966) ^{14}C izotópos vizsgálataival bizonyította STÖRMER (1908) feltevését, mely szerint a megnövekedett CO_2 -termelés az elpusztult mikrobiális biomaszból származik. Így ha összevetjük a fumigált és a kontrolltalajok dekompozíciós szintjeit ugyanabban az időszakban és azonos körülmények között, az eltérésük felhasználható a mikrobiális biomasza indirekt becsléséhez (JENKINSON, 1966), a következő egyenlet szerint:

$$B = F/k$$

ahol: B = a talaj biomasza C , F = a fumigált talajból felszabaduló CO_2 - C és a nem fumigált talajból felszabaduló CO_2 - C különbsége (azonos inkubációs feltételek között, ezt az angol nyelvű irodalomban gyakran „ CO_2 -flush”-nek nevezik), k = a biomaszának az a frakciója, amely a fumigálást követő hirtelen dekompozíciós felgyorsulás során mineralizálódik (a későbbiekben gyakran k_{C} -nek jelölték, megkülönböztetésül a biomasza N -nél alkalmazott k_{N} -től).

A talajok fumigálásához JENKINSON (1966) javaslatára leggyakrabban kloroformot (CHCl_3 , CFI módszer) használnak, mivel a többi fumigáló szer, ill. biocid csak nagyon nehezen távolítható el a talajból a kezelés után, vagy pedig kevésbé kényelmes a felhasználása (JENKINSON & POWLSON, 1976). A hagyományos CFI módszer használata során mineralizálhatóvá teszik a mikroorganizmusokat kloroformgőzzel való fumigálással, amely tönkreteszi a sejtmembránt és a sejt belső részét hozzáférhetővé teszi azon mikroorganizmusok számára, amelyek túléltek a kezelést, vagy inokulum formájában a talajhoz adtak, továbbá a sejtek autolízise is végbemegy. A kloroformgőz eltávolítása után, amelyet rendszerint ekzikkátorban történő többszöri vákuumozással segítenek elő, 10 napos inkubáció során a mineralizált C - és N -mennyiséget a CO_2 -termelés, ill. az NH_4 - N felszabadulás alapján meghatározzák. Ennek elősegítésére azonos nem fumigált, kis mennyiségű mintával beoltják a fumigálást követően átszellőztetett talajokat, annak érdekében, hogy az eredeti mikrobióta kolonizálja azokat. A k faktort ismert mennyiségű ^{14}C -jelzett mikrobiális C mineralizációs sebességének a mérésével határozták meg, amelynek értéke 0,41-nak adódott 10 napos inkubációt figyelembe véve (VORONEY & PAUL, 1984).

SHIELDS és munkatársai (1974) szerint viszont a kloroformos fumigáció nemcsak a mikroszervezetek előlésén keresztül hat a dekompozíciós szint emelkedésére, hanem hatással van bizonyos extracelluláris mikrobiális anyagcseretermékekre is, amelyek lebonthatóvá válnak. A kloroformkezelés hatására a talajgombák és baktériumok mennyisége 80–99%-kal csökken (SHIELDS et al., 1974; LYNCH & PANTING, 1980; SZILI-KOVÁCS & SZEGI, 1992) vagyis 1–20%-os túlélési aránnyal lehet számolni. A fumigálás körülményei és az adott talaj fizikai és kémiai tulajdonságai egyaránt befolyásolhatják a

kloroformkezelés hatékonyságát. Ezen belül azonban az egyes mikrobacsoportok (gombák, Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok) túlélési aránya eltérő lehet (ZELLES et al., 1997). A kloroformkezelés hatására a dehidrogenáz enzimaktivitás nagymértékben lecsökken. Ez az intracelluláris enzim az aktív biomassza indikátora. Ehhez hasonlóan az arginin-deamináz aktivitását is jelentősen csökkenti a kloroform (ALEF & KLEINER, 1987). Más enzimek viszont, mint a béta-glükozidáz, szacharáz, xilanáz és alkalikus foszfatáz aktivitását a kloroformkezelés alig befolyásolja, mivel ezek az enzimek élő sejteken kívül is megőrzik aktivitásukat. A proteáz-aktivitás viszont megnövekedhet a kloroformkezelés után, mivel a lizált sejtekből enzimek szabadulnak fel (NANNIPIERI et al., 1979). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a hidrolitikus lebontó enzimek működése maradnak a kloroformfumigáció után. AMATO és LADD (1988) vizsgálatai is azt mutatják, hogy a kloroformgőzzel kezelt talajok megőrzik proteáz-aktivitásukat, de elvesztik glükózbontó és $\text{NH}_4\text{-N}$ immobilizáló képességüket. Megállapították továbbá, hogy a 10 napos kloroformkezelés hatására a jelölt sejtek dekompozíciós termékei ninhidrinnel reakcióba lépő vegyületek, főleg aminosavak, részben pedig $\text{NH}_4\text{-N}$. Egy napig tartó fumigációt követő 10-napos aerob inkubálás után viszont az összes ninhidrin-reaktív nitrogén $\text{NH}_4\text{-N}$ volt. A fumigálás után felszabaduló ninhidrin-reaktív nitrogén is megbízható eredményt ad a talaj biomassza C becslésére.

A CFI módszer alkalmazása során két alapfeltevésnek kell teljesülnie: 1. a CO_2 mennyiségének, amely a fumigálás során elpusztult mikroorganizmusok mineralizációja során képződik, sokkal nagyobbnak kell lennie annál, mint ami a nem fumigált kontrolltalajban képződik azonos időszak alatt; 2. azonos mennyiségű CO_2 -nak kell képződnie a nem élő szerves anyagból a fumigált és kontrolltalajban egyaránt. Az első feltétel teljesüléséhez a talaj nedvesítése és legalább 10 napon keresztül történő előinkubáció szükséges. A második feltétel akkor jelenthet problémát, ha nagyobb mennyiségű növényi maradvány vagy istállótrágya került a talajba röviddel a mintavétel előtt. Ebben az esetben túlságosan alacsony, esetleg negatív biomassza eredmény adódhat, mivel a nem mikrobiális eredetű szerves anyag intenzív mineralizációja elfedheti a mikrobiális eredetűt (MARTENS, 1985). Kísérletileg MARTENS (1985) azt is kimutatta, hogy 28 nappal a gyökerek talajba keverése után ez a probléma már megszűnt. Ezért a CFI módszer alapján történő biomassza becslés alkalmazásakor a növényi maradványokat a talajmintából gondosan el kell távolítani és 3 hetes előinkubációs időszak javasolt. A friss szerves anyaggal kapcsolatos probléma áthidalására CHAUSSOD és NICOLARDOT (1982) azt javasolták, hogy a fumigált minták 10–20 nap közötti inkubációja alatt képződött CO_2 -ot tekintsék kontrollnak. VORONEY és PAUL (1984), valamint FRANZLUEBBERS és munkatársai (1999) vizsgálatai szerint a nemfumigált kontrollt figyelmen kívül lehet hagyni, és elegendő a fumigált mintából mért CO_2 -képződésből számítani a biomassza C-t. SHEN és munkatársai (1987) szerint viszont csak a megfelelően hosszú előinkubáció, valamint a fumigált és a nem fumigált talajból 0–10 nap között mért CO_2 ad megfelelő eredményt.

A következő probléma a $\text{pH} < 5$ talajoknál jelentkezett (WILLIAMS & SPARLING, 1984; COÛTEAUX et al., 1989), ugyanis kis pH esetén az elpusztult mikroorganizmusok mineralizációja lassan ment végbe, ezért az általánosan használt K_C faktor téves eredményt adott.

ALEF (1993) kritikai megjegyzése a CFI módszerrel kapcsolatban a következő volt: a kloroform nem pusztítja el az összes mikroorganizmust a talajban; más módszerekkel kapott biomassza becslések nem felelnek meg a CFI módszerrel kapott eredményeknek;

a fumigálás hatására a talaj humuszfrakciójának egy része könnyebben lebonthatóvá válik; és végül a K_C faktor függ a mikrobiális populáció összetételétől és a pH-tól is.

A CFI módszerrel kapcsolatos problémák miatt alkalmazása az 1990-es évektől kezdett háttérbe szorulni, és helyét egyre inkább a fumigációs extrakciós módszer vette át, főleg Európában.

A fumigációs extrakciós (CFE) módszer

JENKINSON (1966) vizsgálatai szerint a kloroformkezelés után nemcsak a CO_2 -képződés sebessége, hanem a talaj 0,5 M K_2SO_4 -tal extrahálható szervesanyag-tartalma is megnőtt. Ez alapján VANCE és munkatársai (1987) kidolgozták a mikrobiális biomassza C becslését a kloroform fumigációt követő extrakciós eljárás alapján. A CFI módszerhez hasonlóan itt is szükséges egy átszámítási tényező, amelyet megkülönböztetésül k_{EC} -vel, illetve a biomassza N esetében (BROOKES et al., 1985) k_{EN} -nek jelölnék a szakirodalomban. A biomassza C számításánál a k_{EC} -érték 0,38-nak adódott, a fumigációs inkubációs módszerrel történő regresszió számítás alapján (VANCE et al., 1987). A k_{EC} faktor megbízhatóságát sokan vizsgálták a mikrobiális biomassza *in situ* ^{14}C -glükóz jelzéses technikájával (SPARLING et al., 1990; COÛTEAUX et al., 1990; BREMER & VAN KESSEL, 1990; DICTOR et al., 1998).

A kálium-szulfáttal extrahálható szerves-C-tartalmat hagyományosan tömény kén-savas foszforsavas (2:1) kálium-bikromátos oxidációval, majd Mohr-sóoldattal történő redox visszatitrálással állapítják meg. Bár a CFE módszer hamarabb ad eredményt, mint a CFI, valójában jóval munkai igényesebb, különösen a savas roncsolás miatt.

Újabban egyre jobban terjed az automata TOC (total organic carbon) analizátorok használata, melyek vagy a Dumas-féle katalizátoros égetéssel (680 °C), vagy az UV-perszulfátos oxidáción alapulnak. A fumigációs extrakciós módszer előnye a fumigációs inkubációs módszerrel szemben az, hogy nem kell kivárni a 10 napos inkubációt, hanem a fumigációt követően azonnal lehet mérni, továbbá a savas (VANCE et al., 1987), könnyen lebomló szerves anyagokat nagy mennyiségben tartalmazó (SPARLING et al., 1990; SCHOLLE et al., 1992), vízzel átitatott (INUBUSHI et al., 1991) és gyökerekkel átszőtt (MUELLER et al., 1992) talajok esetén is alkalmazható. Ugyanakkor ROSS (1988) és COÛTEAUX és munkatársai (1990) szerint a módszer nem alkalmas a biomassza meghatározáshoz nedves, nagy szerves anyag-tartalmú talajoknál, mivel a kloroform kismértékű vízzoldékonysága miatt hatását nem fejt ki megfelelően.

Míg savas talajoknál a biomassza C meghatározása CFI módszerrel problematikus, addig a biomassza N a CFI és CFE módszerrel egyaránt jól megegyező eredményt adott (AMATO & LADD, 1994).

Újabban HANEY és munkatársai (2001) a CFI módszert – a nem fumigált kontroll nélkül számítva a biomasszát – jóval megbízhatóbbnak találta, mint a CFE módszert, mert az utóbbinál a talaj pH és a kálium-szulfát oldat kölcsönhatása miatt a biomassza-eredetű C kivonhatósága eltérő lehet.

A „k” faktor meghatározása a biomassza becslésben

Fumigációs inkubációs módszer (k_C és k_N)

A Jenkinson-féle egyenlet „k” értéke függ a mikrobiális tényezőktől (pl. faj, növekedési fázis, tápanyagellátás), ill. környezeti tényezőktől (hőmérséklet, pH, talajnedveség). Mivel a CFI módszer szerint (JENKINSON, 1966; JENKINSON & POWLSON, 1976) a kloroformos fumigációt követő hirtelen mineralizációs szintemelkedés a frissen elölt mikrobiális biomassza részleges ásványosodásának tulajdonítható, ezért a „k” tényező meghatározásához olyan mikrobiális anyagot kell felhasználni, amely a növekedés lineáris kezdeti állapotában van (ANDERSON & DOMSCH, 1978a).

JENKINSON és POWLSON (1976) több mikrobafaj vizsgálatával a „k” faktor értékét 0,5-nek állapította meg (25 °C-on). ANDERSON és DOMSCH (1978a) szerint a k-értékhez a gombák 32,8%-ban, a baktériumok pedig 8,3%-ban járultak hozzá, és ez alapján a $k = 0,411$ érték használatát javasolták. Ezek a vizsgálatok ellentmondanak JENKINSON és POWLSON (1976) eredményeinek, akik a baktérium- és a gombasejtek hasonló dekompozícióját tapasztalták az inkubáció során. ANDERSON és DOMSCH (1978a) vizsgálataiban a gombák és baktériumok átlagos mineralizálódása között statisztikailag igazolt szignifikáns eltérés mutatkozott. VORONEY és PAUL (1984) a biomassza C becsléséhez ^{14}C jelzéses vizsgálataik alapján $k_C = 0,41$ érték figyelembevételét javasolták.

JENKINSON és POWLSON (1976) a mineralizált bakteriális N arányát (k_N) 0,45–0,59 közötti értéknek határozták meg. AMATO és LADD (1988) két baktériumfaj alapján $k_N = 0,46$, két gombafajnál $k_N = 0,28$ értéket állapított meg. VORONEY és PAUL (1984) a biomassza N számolásánál felhívják a figyelmet a fumigált talajok C:N arányainak eltéréseire, így pl. 6:1 C:N aránynál $k_N = 0,3$ értéket, 13:1 C:N aránynál pedig $k_N = 0,20$ értéket tartanak használhatónak. AMATO és LADD (1988) fő problémaként azt hangsúlyozták, hogy a biomassza számításához használt egyenletek alkalmazói a sejtbeli C- és N-mennyiségnek csak a CO_2 -dá és NH_4 -N-né alakult arányaira és a megfelelő kontrollértékek megválasztására vannak tekintettel.

A CFI módszernél leggyakrabban alkalmazott 22 °C-os inkubációs hőmérsékleten a k_C értéke 0,41 (ANDERSON & DOMSCH, 1978b; MARTENS, 1995), 25 °C-on pedig 0,45-nek (JENKINSON, 1988) bizonyult.

A talajnedvesség szintén befolyásolja a k_C értékét (WARDLE & PARKINSON, 1990), ezért optimális, vagyis a szabadföldi vízkapacitás körüli nedvességérték beállítása javasolt a mérések előtt.

Fumigációs extrakciós módszer (k_{EC} és k_{EN})

VANCE és munkatársai (1987) a 0,5 M K_2SO_4 -os kivonószer használata mellett a k_{EC} értékét 0,38-ban állapította meg. SPARLING és WEST (1988) eltérést tapasztalt az ásványi talajok és szerves anyagban gazdag talajok k_{EC} -értékében, ásványi talajokra 0,33-at javasolt. Később vizont nem tapasztaltak eltérést e két talajkategória között, és ^{14}C izotópos vizsgálat eredménye alapján $k_{EC} = 0,42$ -öt állapítottak meg (SPARLING et al., 1990). A TOC készülékekkel általában 20%-kal több szerves-C-tartalmat mérnek, mint a savas dikromátos oxidációval, mivel ez utóbbinak gyengébb az oxidációs határfoka (WU et al., 1990), ezért a k_{EC} javasolt értéke 0,45-re módosul. JOERGENSEN (1996a) saját és szakirodalmi adatokban szereplő összesen 153 talaj alapján TOC analizátorok használata esetén 0,45-öt, a hagyományos dikromátos oxidáció esetén 0,38-at javasol a

k_{EC} -értéknek. A k_{EC} értéke átlagosan a szántóföldi talajoknál 0,42, réti jellegű talajoknál 0,49, míg erdei talajoknál 0,51-nek adódott.

BROOKES és munkatársai (1985) a mikrobiális biomassza N meghatározásához a fumigációt követően meghatározott extrahálható N-tartalomban való növekedést javasolták a számításokhoz. A k_{EN} értéke vizsgálataik szerint 0,68-nak adódott, továbbá megállapították, hogy a vizsgált talajokban a biomassza N az összes talaj-N 2–6%-a közötti tartományban volt. JOERGENSEN és MUELLER (1996) 51 szántóföldi és 23 réti talaj vizsgálata alapján a $k_{EN} = 0,54$ értéket javasolják általános használatra. Ezzel analóg indirekt becslést ajánlanak a biomassza P (BROOKES et al., 1982; HEDLEY & STEWART, 1982) és biomassza S (SAGGAR et al., 1981; WU et al., 1994) meghatározásához.

A fumigációs és más módszerek összehasonlítása

JENKINSON és POWLSON (1976) vizsgálatokat végeztek a fumigációs módszerrel történő közvetett biomassza becslések és a talaj biomassza direkt mikroszkópos mérésének az összehasonlítására. Eredményeik azt mutatják, hogy a kétféle módszer a semleges kémhatású talajok esetében jó egyezéssel használható. Savanyú talajoknál ($pH < 4$) azonban a direkt módszerrel hétszer nagyobb biomassza C-mennyiséget mértek, mint az indirekt fumigációs módszerrel. Az eltérés fő okaként azt említik, hogy az erősen savanyú talajban az elhalt mikroszervezetek festhető sejtfalai hosszabb ideig maradnak fenn, mint a neutrális talajokban, ami meghamisítja a mikroszkópos mérési módszer eredményeit. A biotérfogat (SCHMIDT & PAUL, 1973), ill. a biomassza C (sűrűség, víztartalom, C-tartalom figyelembevételével) direkt mérési módszerrel kapcsolatban problémaként említhető, hogy a talaj-mikroorganizmusok mérete és alakja nagyon változatos, emiatt az átlag térfogatuk értéke nem használható fel kielégítően a biomassza becsléséhez (JENKINSON & POWLSON, 1976). Ezért alakjuk szerint két csoportot szokás megkülönböztetni: gömb és henger alakúakat. Ezeket méret szerint ismét tovább osztályozzák, és osztályonként számolják az élő térfogatot. A fénymikroszkópos direkt biomassza meghatározás és a CFI közötti eltérések okai a következők lehetnek: eltérő festési technikák alkalmazása, az élő és holt mikroorganizmusok megkülönböztetése és az átszámítási faktor, amelyet a mikroorganizmus sejtek méretétől, alakjától függően alkalmaznak a biomassza C becsléshez; végül a vizsgálatot végző személy rutinja is fontos tényező (MARTENS, 1995).

OADES és JENKINSON (1979) szoros korrelációt mutatott ki a mikrobiális biomassza és ATP-tartalom között. 11 talaj vizsgálata alapján a biomassza C ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj) = $120 \mu\text{g ATP}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj, illetve $8,33 \text{ mg ATP}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassza C érték adódott. Ugyanakkor JENKINSON és munkatársai (1979) hideg égővi talajok esetében az előző szerzők adataival megegyezően kimutatták, hogy a talaj ATP-tartalma és a talaj biomassza C aránya viszonylag állandó, és $1 \mu\text{g biomassza C}$ $136 \mu\text{g ATP}$ -vel egyenértékű. SPARLING (1981) ugyanakkor ennek kb. a dupláját mérte. DYCKMANS és munkatársai (2003) az előzőektől eltérő kivonási eljárással, 112 talajminta vizsgálata alapján $3,75 \text{ mg ATP}$, illetve $5,78 \text{ mg}$ összes adenilát felel meg 1 g biomassza C -nek ($r = 0,96$), továbbá a biomassza C ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj) = $68,5 \mu\text{g ATP}\cdot\text{g}^{-1}$ talajjal volt egyenértékű. Ehhez hasonlóan MARTENS (2001) $4,4 \text{ mg ATP}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassza C-t állapított meg. Az ATP mérés alapján történő

biomassza becslés azoknál a nagy szervesanyag-tartalmú talajoknál hasznos, amelyeknél a fumigációs módszer nem ad megfelelő eredményt.

A CFI módszerrel meghatározott biomassza C és a ninhidrinnel reagáló N között szoros összefüggést találtak (AMATO & LADD, 1988; CARTER, 1991; JANS-HAMMERMEISTER, 1996) és ez alapján egy új módszert dolgoztak ki a biomassza C meghatározására a ninhidrinnel történő reakció alapján (AMATO & LADD, 1994). JOERGENSEN (1996b) 110 talaj vizsgálata alapján a biomassza C és a ninhidrin reaktív N között a következő szignifikáns összefüggést találta:

$$\begin{aligned} \text{biomassza C} &= 22,0 \times E_{\text{nin}} \text{ (pH} > 5,0 \text{ talajoknál); biomassza N} = 3,1 \times E_{\text{nin}} \\ \text{biomassza C} &= 35,3 \times E_{\text{nin}} \text{ (pH} \leq 5,0 \text{ talajoknál); biomassza N} = 5,0 \times E_{\text{nin}} \end{aligned}$$

ahol: a biomassza C ($\mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj), az E_{nin} = ninhidrin reaktív N ($\mu\text{g N}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj); a biomassza N ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ talaj) értéke pedig, C/N = 7 feltételezve.

A szubsztrát indukált respiráció és a kloroform fumigációs módszerekkel meghatározott biomassza gyakran szintén szoros korrelációban van (SZILI-KOVÁCS & TÖRÖK, 2005). A szubsztrát indukált respirációs módszerek igen eltérő kivitelezése miatt azonban az átszámítási tényező változó, továbbá ez a módszer inkább az ún. aktív biomassza indikátoraként ismert, ezért az összefüggés szorossága a mikrobiális közösség anyagcsere állapotától is függ (SZILI-KOVÁCS, 2004).

A mikrokaloriméterrel mért hőkibocsátás és a mikrobiális biomassza közötti összefüggés is eléggé szorosnak mutatkozott (SPARLING, 1981; VANDENHOVE et al., 1991).

Az összes kivonható foszfolipid-tartalom és a fumigációs extrakciós módszerrel meghatározott biomassza-tartalom között rendszerint szoros korreláció van (FROSTEGÁRD et al., 1991; BAILEY et al., 2002). FROSTEGÁRD és munkatársainak (1991) vizsgálatai szerint 340 nmol PLFA 1 mg biomassza C-nek feleltethető meg. Erdőtalajoknál az ásványi és szerves horizontból származó mintáknál azonban a CFE és PLFA közötti regressziós együttható értéke szignifikánsan eltérő lehet (LECKIE et al., 2004). A talaj foszfolipid-összetételének vizsgálata elsősorban nem a biomassza, hanem az egyes mikroorganizmus csoportok mennyiségi arányának a megállapítása szempontjából jelentős, melyről HALBRITTER és UZINGER (2005) írt összefoglalót.

Az eddigi szórványos vizsgálatok szerint a talajból kivonható összes DNS-tartalom és a fumigációs extrakciós módszerrel meghatározható biomassza közötti összefüggés nem szignifikáns, ami abból adódhat, hogy a talajokban általában a gombák össz-mennyisége nagyobb (LECKIE et al., 2004), és DNS-tartalmuk nagyon változó lehet (PAWLOWSKA & TAYLOR, 2004).

A kloroform fumigációs módszerrel meghatározott mikrobiális biomassza számos talajenzim aktivitásával is szoros korrelációt mutatott, annak ellenére, hogy ezen enzimek jelentős része extracelluláris (KISS, 2003). Így az arilszulfatáz (LI & SARAH, 2003), az ureáz (KLOSE & TABATABAI, 1999) és a CFE módszerrel meghatározott mikrobiális biomassza között szoros korrelációt találtak.

A fumigációs módszer biomassza eredményeit befolyásoló tényezők

Szerves anyag. – Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a kloroform fumigációs biomassza mérési eljárás szerves anyagokkal javított, vagy eleve nagy szervesanyag-tartalmú talajok esetében sokszor nem használható megfelelő eredménnyel (JENKINSON

& POWLSON, 1976; MARTENS, 1985; JOERGENSEN, 1995). SPARLING és munkatársai (1981) fenolsavakkal kezelt talajoknál csak 28 napig tartó inkubációt követően kapott megfelelő biomassza becslési eredményt, azt megelőzően kis, sőt negatív értékek adódtak. Ezt a jelenséget azzal magyarázták, hogy a fumigált mintákban az újra inokulált populáció nem képes olyan gyorsan lebontani a maradék szubsztrátot, mint a kontroll, fumigálatlan mintákban levő mikroorganizmusok. Valószínűleg ugyanezzel magyarázható LYNCH és PANTING (1980) megfigyelése is, miszerint a talajmintáknak árpagyökerekkel való kezelését követően 18 nappal sem növekedett a biomassza C, bár a hozzáadott C 15%-a CO₂-dá mineralizálódott. MERCKX és MARTIN (1987) hangsúlyozzák, hogy az indirekt mikrobiális biomassza mérések során problémát jelenthet a növényi gyökerek, vagy a friss szerves anyagok jelenléte, mivel ezek a fumigálatlan talajban gyorsabban bomlanak, mint a fumigáltban, így csökkentik vagy meg is szüntethetik a dekompozíciós szint viszonylagos emelkedését. Bizonytalanságokat okozhat a biomassza meghatározásában, ha a gyökerekkel sűrűn átszótt talajokat a mintavétel után közvetlenül inkubálják (SPARLING et al., 1985; MARTENS, 1985). Ez a probléma a fumigálást követő azonnali extrakcióval elkerülhető (MERCKX & MARTIN, 1987; MUELLER et al., 1992).

Az inokulum mérete. – A fumigációs módszerrel kapcsolatban az inokulumméret hatásának tanulmányozása is felmerült. MARTENS (1985) vizsgálatai szerint az inokulumméret befolyása a szerves anyaggal dúsított és kontrolltalajok dekompozíciós szint emelkedésére eltérő. Gyökérmentes talajok tesztelése során megfigyelte, hogy az elhalt mikroorganizmusokból mineralizált C (k faktor) a fumigált mintákban független az inokulum méretétől. Búzagyökerekkel teli talajmintákkal kísérletezve viszont azt a következtetést vont le, hogy a szerves anyaggal dúsított, fumigált minták esetében a képződött CO₂ mennyiségét az inokulum mérete szignifikánsan befolyásolta, és csak 28 napos inkubációt követően mérhető a többi kísérlethez hasonló érték, miután a gyökerekből való CO₂-képződés megszűnt. MARTENS (1985) valamint ANDERSON és DOMSCH (1978b) vizsgálatai megerősítették, hogy a biomassza becslést az inokulum mérete nem befolyásolja, ha az elhalt mikroorganizmusokból felszabaduló CO₂ mennyiségét a javítóanyag dekompozíciója során képződő CO₂ értéke nem hamisítja meg. Szerves anyaggal javított talajok esetében a szerves anyag degradációs időszakában tehát a fumigációs inkubációs eljárással történő biomassza meghatározások nem nyújthatnak hiteles eredményeket. A mérés előtti várakozási idő függ a szerves anyag mennyiségétől és minőségétől.

A tárolás körülményei. – A minta tárolási körülményeinek mikrobiális biomasszát befolyásoló szerepéről keveset tudunk (ROSS et al., 1980). A szerzők három biomassza mérési módszer esetében vizsgálták a tárolási hőmérséklet hatását a becsült biomassza tömegére. Kimutatták, hogy a talajmintákban a biomassza C -20 °C tárolási hőmérséklet használatakor változott a legkevésbé. Ha ATP-tartalom alapján történt a biomassza meghatározás, szintén ugyanez a tárolási hőfok bizonyult a legmegfelelőbbnek. A mineralizált N emelkedési szint méréséhez viszont 4 °C találták a legjobb tárolási hőmérsékletnek. A mikrobiális biomassza három eltérő módszerrel történő meghatározásánál egyik tárolási hőfok sem volt egyértelműen jól használható, de általában a rövid periódusokra a 4 °C mindegyikhez megfelelően alkalmazható volt. ROSS (1991) az általa vizsgált talajnál a CFE és CFI biomassza-értékben nem tapasztalt csökkenést 4 °C-on 14 hónapig történő tárolás után. STENBERG és munkatársai (1998) 12 különböző

szántóföldi talajt frissen begyűjtve, valamint 2 °C-on és -20 °C-on történő 1 napos, 1, 3, 6 és 13 hónapos tárolás után vizsgálták. A CFE módszerrel vizsgált mikrobiális biomassza 2 °C-on, 3 hónapos tárolás után 27%-kal csökkent, de -20 °C-on történő tárolással nem változott.

A fumigáció időtartama. – Az eredeti módszerleírás 24 órás kloroform fumigálást tartalmaz. A kivonható szerves-C-tartalom a fumigálás időtartamának meghosszabbításával egyes talajoknál – főleg az erdőtalajok humuszos szintjében – növekedhet (ROSS & TATE, 1993; HAUBENSAK et al., 2002). Mások az egynapos fumigációt elegendőnek tartják.

Talajnedvesség. – A mikrobiális biomassza eredményét befolyásolja a minta nedvességtartalma a CFI és CFE módszernél egyaránt. A túl nedves talaj gátolja a kloroform diffúzióját, de a túl száraz talaj sem megfelelő. Ezért általánosságban a minta nedvességtartalmának a beállítása a szabadföldi vízkapacitás, azaz -0,03 MPa vízpotenciál körüli értékre javasolt, közvetlenül a mérés előtt nedvesítéssel, vagy kéméletes szárítással (ROSS, 1989; SPARLING & WEST, 1989).

Szűrés. – A szűréshez eredetileg Whatman 42, illetve ezzel analóg szűrőpapírok használata terjedt el. Mivel a szűrőpapírok pórusmérete nem állandó, hanem egy bizonyos tartományban változik, ezért többen a standard pórusméretű (< 0,45 µm) membrán szűrőket alkalmazzák (COÛTEAUX et al., 1990), ami a mikroorganizmusokat visszatartja, viszont ez költségesebbé teszi az eljárást. Gyakran a talajminta jellege miatt centrifugálás is indokolt (COÛTEAUX et al., 1990).

Talaj és kivonószer arány. – Az extrakciós eljárások során, különösen az automata analizátorok kapcsán merült fel, a 0,5 M K₂SO₄ oldat használatának problematikája. Ez a tömény sóoldat ugyanis kedvezőtlen, károsítja a műszerek egyes alkatrészeit, ezért hígabb oldatok alkalmazása lenne kívánatos. A hígabb oldat használatát az is indokolja, hogy minél töményebb a sóoldat annál kevesebb szerves-C vonható ki a talajokból, elsősorban a proteinek koagulációja miatt (HANEY et al., 2001).

A részleges sterilizálási módszerek összehasonlítása

A fumigációhoz hasonlóan más biocidkezelés (pl. besugárzás, hőkezelés, vagy szárítás) esetében is megfigyelték, hogy a szervesanyag-lebomlásban rövid ideig tartó gyorsulás következik be (JENKINSON, 1966). Semleges kémhatású talajokban a következő sorrendben növekedett a dekompozíció a kezeléseket után: légszárítás < CH₃Br ≤ CHCl₃ < besugárzás < autoklávozás (POWLSON & JENKINSON, 1976). A gamma-besugárzás egyes talajokban ugyanúgy befolyásolta a N mineralizációját és a respirációt, mint a kloroform, ill. a metil-bromid, azonban a mindennapi gyakorlatban ez a kezelés nehezen kivitelezhető.

A legnagyobb mértékű O₂-fogyasztást, N-mineralizációt és CO₂-termelést az autoklávozott talajminta beoltását követően mérték (POWLSON & JENKINSON, 1976), ami összhangban áll azzal a feltevéssel, hogy a hőkezeléssel a jelentős mikrobapusztulás mellett a talaj nem mikrobiális eredetű szervesanyag-frakciójának a lebonthatósága vagy mikrobiális hozzáférhetősége is megnő (JENKINSON, 1966). Az autoklávozás után oldható szerves anyag nagy része biológiai rezisztens, vagyis a talaj nem mikrobiális

eredetű frakciójából származik (SALONIUS et al., 1967; POWLSON & JENKINSON, 1976), ezért az autoklávozás nem alkalmas sem az inkubáción, sem az extrakción alapuló biomassza meghatározásra.

A levegőn való szárítás után kisebb mértékben nő az extrahálható szerves-C, mint más kezeléseknél, ugyanakkor az oldható frakció kevés bomlás rezisztens anyagot tartalmaz, továbbá nem csökken le a talajokban a C és N aránya olyan mértékben, mint a többi kezelés hatására (POWLSON & JENKINSON, 1976). Légszárítást követően a mikrobiális biomassza hozzávetőlegesen 30%-a pusztul el (VAN GESTEL et al., 1991), ami nem túl kedvező a meghatározás szempontjából. BLAGODATSKIY és munkatársai (1987) a kloroform fumigáció helyett, egyszerűen a talajok 70 °C-on, 24 órán keresztül történő szárítását és újranedvesítésük után a 0,5 M K₂SO₄ oldattal kivonható szerves-C-tartalmának mérése alapján javasolták a biomassza C meghatározását. Ez az eljárás hatékonyabb, mint a légszárítás, de kevésbé hatékony, mint a kloroformkezelés.

A magas hőfokon történő szárításnál jobb eredményt lehet elérni a talajok mikrohullámú kezelésével (ISLAM & WEIL, 1998) vagy fagyasztva-szárításával (RUMPEL et al., 2001), melyek a kloroformkezelés alternatívájaként szóba jöhetnek és ezáltal egy valóban gyors és biztonságos biomassza meghatározási módszerhez juthatunk.

Összefoglalás

A talaj mikrobiális biomassza mennyiségének ismerete a növényi tápelemek transzformációja, és a talajállapot minőségének jellemzése miatt fontos. Meghatározását leggyakrabban kloroform fumigációs módszerrel végzik. A kloroformkezelés hatására bekövetkező tömeges mikrobapusztulás arányos az összes biomassza mennyiségével, amely a többlet CO₂-képződés, vagy a talajból kivonható megnövekedett szerves anyag alapján mérhető. Tárgyaljuk az inkubációs és extrakciós módszereket, összehasonlítva más eljárásokkal. A méréseket befolyásoló tényezőket és a különböző sterilizálási eljárásokat is összehasonlítjuk.

A dolgozat az OTKA (T 42930 számú pályázat) támogatásával készült.

Irodalom

- ALEF, K., 1993. Estimation of microbial biomass in soil – a critical-view. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. **156**. 109–114.
- ALEF, K. & KLEINER D., 1987. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils. *Biology and Fertility of Soils*. **5**. 141–148.
- AMATO, M. & LADD, J. N., 1988. Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **20**. 107–114.
- AMATO, M. & LADD, J. N., 1994. Application of the ninhydrin-reactive assay for microbial biomass in acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**. 1109–1115.
- ANDERSON, J. P. E. & DOMSCH, K. H., 1978a. Mineralisation of bacteria and fungi in chloroform fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **10**. 207–213.
- ANDERSON, J. P. E. & DOMSCH, K. H., 1978b. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **10**. 215–221.

- BAILEY, V. L. et al., 2002. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. **34**. 1385–1389.
- BLAGODATSKIY, S. A. et al., 1987. Regisztrációs módszer meghatározására a mikroorganizmusok mennyiségének meghatározására. *Pocsvivedenie*. **4**. 65–71.
- BREMER, E. & VAN KESSEL, C., 1990. Extractability of microbial ^{14}C and ^{15}N following addition of variable rates of labelled glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 707–713.
- BROOKES, P. C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*. **19**. 269–279.
- BROOKES, P. C., POWLSON, D. S. & JENKINSON, D. S., 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **14**. 319–329.
- BROOKES, P. C. et al., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **17**. 837–842.
- CARTER, M. R., 1991. Ninhydrin-reactive N released by the fumigation-extraction method as a measure of microbial biomass under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. **23**. 139–143.
- CHAUSSOD, R. & NICOLARDOT, B., 1982. Measurement of microbial biomass in cultivated soils. 1. Kinetic approach and simplified estimation of easily mineralizable carbon. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*. **19**. 501–512.
- CSITÁRI, G. & HOFFMANN, S., 2005. Comparative study on soil biological parameters at a long-term field experiment. *Archives of Agronomy and Soil Science*. **51**. 563–569.
- COÛTEAUX, M. M., HENKINET, R. & BOTTNER, P., 1990. Anomalies in microbial biomass measurements in acid organic soils using extractable carbon following chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 955–957.
- COÛTEAUX, M. M. et al., 1989. Native carbon mineralization of an acid organic soil after use of the chloroform-fumigation method to estimate microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*. **8**. 172–177.
- DICTOR, M. C., TESSIER, L. & SOULAS, G., 1998. Reassessment of the K_{ec} coefficient of the fumigation-extraction method in a soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*. **30**. 119–127.
- DUMONTET, S. & MATHUR, S. P., 1989. Evaluation of respiration-based methods for measuring microbial biomass in metal-contaminated acidic mineral and organic soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **21**. 431–436.
- DYCKMANS, J. et al., 2003. Adenylates as an estimate of microbial biomass C in different soil groups. *Soil Biology and Biochemistry*. **35**. 1485–1491.
- FLEISSBACH, A., MARTENS, R. & REBER, H. H., 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage-sludge. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**. 1201–1205.
- FRANZLUEBBERS, A. J. et al., 1999. Assessing biological soil quality with chloroform fumigation-incubation: why subtract a control? *Canadian Journal of Soil Science*. **79**. 521–528.
- FROSTEGÅRD, A., TUNLID, A. & BÅÅTH, E., 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*. **14**. 151–163.
- HALBRITTER A. & UZINGER N., 2005. A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján. I. Szükségesség és alkalmazási lehetőségek. *Agrokémia és Talajtan*. **54**. 517–534.
- HANEY, R. L. et al., 2001. Molar concentration of K_2SO_4 and soil pH affect estimation of extractable C with chloroform fumigation-extraction. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**. 1501–1507.
- HAUBENSAK, K. A., HART, S. C. & STARK, J. M., 2002. Influences of chloroform exposure time and soil water content on C and N release in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **34**. 1549–1562.

- HEDLEY, M. J. & STEWART J. W. B., 1982. Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **14**. 377–385.
- INGHAM, E. R. & KLEIN, D. A., 1984. Relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*. **16**. 273–278.
- INUBUSHI, K., BROOKES, P. C. & JENKINSON, D. S., 1991. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method. *Soil Biology and Biochemistry*. **23**. 737–741.
- ISLAM, K. R. & WEIL, R. R., 1998. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biology and Fertility of Soils*. **27**. 408–416.
- JANS-HAMMERMEISTER, D. C., 1996. Is there a correlation among factors used to estimate soil microbial biomass? *Applied Soil Ecology*. **3**. 79–83.
- JENKINSON, D. S., 1966. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. *Journal of Soil Science*. **17**. 280–302.
- JENKINSON, D. S., 1977. The soil biomass. *NZ Soil News*. **25**. 213–218.
- JENKINSON, D. S., 1988. The determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems* (Ed.: WILSON, J. R.) 368–386. CAB International. Wallingford.
- JENKINSON, D. S., 1990. The turnover of organic carbon and nitrogen in soil. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. **329**. 361–368.
- JENKINSON, D. S. & POWLSON, D. S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. 5. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. **8**. 209–213.
- JENKINSON, D. S., DAVIDSON, S. A. & POWLSON, D. S., 1979. Adenosin triphosphate and microbial biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **8**. 167–177.
- JOERGENSEN, R. G., 1995. The fumigation extraction method. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. (Eds.: ALEF, K. & NANNIPIERI P.) 376–382. Academic Press. London.
- JOERGENSEN, R. G., 1996a. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EC} value. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**. 25–31.
- JOERGENSEN, R. G., 1996b. Quantification of the microbial biomass by determining ninhydrin-reactive N. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**. 301–306.
- JOERGENSEN, R. G. & MUELLER, T., 1996. The fumigation extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EN} value. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**. 33–37.
- KÁTAI, J., 2006. Changes in soil characteristics in a mono- and triculture long-term field experiment. *Agrokémia és Talajtan.* **55**. 183–192.
- KÁTAI, J., VÁGÓ, I. & LUKÁCS, V. E., 2005. Relationships between the carbon content and some microbial characteristics in the different soil types. *Cereal Research Communications*. **33**. 389–392.
- KÁTAI, J. et al., 2006. Correlation between the nitrogen content of soil and element uptake of maize in a pot experiment. *Cereal Research Communications*. **34**. 215–218.
- KISS I., 2003. *Az erodált talajok enzimológiája*. Scientia Kiadó. Kolozsvár.
- KLOSE, S. & TABATABAI, M. A., 1999. Urease activity of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**. 205–211.
- LECKIE, S. E. et al., 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biology and Biochemistry*. **36**. 529–532.
- LI, X. & SARAH, P., 2003. Arylsulphatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect. *Soil Biology and Biochemistry*. **35**. 925–934.
- LYNCH, J. M. & PANTING, L. M., 1980. Cultivation and the soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. **12**. 29–33.
- MARTENS, R., 1985. Limitations in the application of the fumigation technique for biomass estimations in amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **17**. 57–63.

- MARTENS, R., 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils*. **19**. 87–99.
- MARTENS, R., 2001. Estimation of ATP in soil: extraction methods and calculation of extraction efficiency. *Soil Biology and Biochemistry* **33**. 973–982.
- MCGILL, W. B. et al., 1981. PHOENIX, a model of the dynamics of carbon and nitrogen in grassland soils. In: *Terrestrial Nitrogen Cycles: Processes, Ecosystems, Strategies and Management Impacts*. Ecological Bulletin 33. (Eds.: CLARK, F. E. & ROSSWALL, T.) 49–115. Royal Swedish Academy of Sciences. Stockholm.
- MERCKX, R. & MARTIN, J. K., 1987. Extraction of microbial biomass components from rhizosphere soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**. 371–376.
- MOLINA, J. A. et al., 1983. NCSOIL, a model of nitrogen and carbon transformation in soil: description, calibration and behavior. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**. 85–91.
- MUELLER, T., JOERGENSEN, R. G. & MEYER, B., 1992. Estimation of soil microbial biomass-C in the presence of living roots by fumigation extraction. *Soil Biology and Biochemistry*. **24**. 179–181.
- NANNIPIERI, F. et al., 1979. Changes in aminoacids, enzyme activities and biomass during soil microbial growth. *Soil Science*. **127**. 26–34.
- NÉMETH T., 1996. Talajaink szervesanyag-tartalma és nitrogénforgalma. MTA Talajtani és Agro-kémiai Kutatóintézet. Budapest.
- NICHOLAS, D. P. & PARKINSON, D., 1967. A comparison of methods for assessing the amount of fungal mycelium in soil samples. *Pedobiologia*. **7**. 23–41.
- OADES, J. M. & JENKINSON, D. S., 1979. Adenosine triphosphate content of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. **11**. 201–204.
- PAWLOWSKA, T. E. & TAYLOR, J. W. 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **427**. 733–737.
- POWELSON, D. S. & JENKINSON, D. S., 1976. Effects of biocidal treatments on metabolism in soil. 2. Gamma-irradiation, autoclaving, air-drying and fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*. **8**. 179–188.
- ROSS, D. J., 1988. Modifications to the fumigation procedure to measure microbial biomass C in wet soils under pasture: influence on estimates of seasonal fluctuations in the soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. **20**. 377–383.
- ROSS, D. J., 1989. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction procedure: influence of soil moisture content. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 295–300.
- ROSS, D. J., 1991. Microbial biomass in a stored soil: a comparison of different estimation procedures. *Soil Biol. Biochem.* **23**. 1005–1007.
- ROSS, D. J. & TATE, K. R., 1993. Microbial C and N in litter and soil of a southern beech (*Nothofagus*) forest: comparison of measurement procedures. *Soil Biology and Biochemistry*. **25**. 467–475.
- ROSS, D. J. et al., 1980. Influence of storage on soil microbial biomass estimated by 3 biochemical procedures. *Soil Biology and Biochemistry*. **12**. 369–374.
- RUMPEL, C., GROOTES, P. M. & KÖGEL-KNABNER, I., 2001. Characterization of the microbial biomass in lignite-containing mine soils by radiocarbon measurements. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**. 2019–2021.
- SAGGAR, S., BETTANY, J. R. & STEWART, J. W. B., 1981. Measurement of microbial sulfur in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **13**. 493–498.
- SALONIUS, P. O., ROBINSON, J. B. & CHASE, F. E., 1967. A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbial colonization experiments. *Plant and Soil*. **27**. 239–248.
- SCHMIDT, E. L. & PAUL, E. A., 1982. Microscopic methods for soil microorganisms. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph 9. (Ed.: PAGE, A. L.) 803–814. American Society for Agronomy. Madison, WI.
- SCHOLLE, G., WOLTERS, V. & JOERGENSEN, R. G., 1992. Effects of mesofauna exclusion on the microbial biomass in 2 moder profiles. *Biology and Fertility of Soils*. **12**. 253–260.

- SHEN, S. M., BROOKES, P. C. & JENKINSON, D. S., 1987. Soil respiration and the measurement of microbial biomass C by the fumigation technique in fresh and air-dried soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**. 153–158.
- SHIELDS, J. A., PAUL, E. A. & LOWE, W. E., 1974. Factors influencing the stability of labelled microbial materials in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **6**. 31–37.
- SPARLING, G. P., 1981. Microcalorimetry and other methods to assess biomass and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **13**. 93–98.
- SPARLING, G. P. & WEST, A. W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C-calibration in situ using microbial respiration and C-14-labeled cells. *Soil Biology and Biochemistry*. **20**. 337–343.
- SPARLING, G. P. & WEST, A. W., 1989. Importance of water content when estimating soil microbial C, N and P by fumigation-extraction methods. *Soil Biology and Biochemistry*. **21**. 245–253.
- SPARLING, G. P., ORD, B. G. & VAUGHAM, D., 1981. Changes in microbial biomass and activity in soils amended with phenolic acids. *Soil Biology and Biochemistry*. **13**. 455–460.
- SPARLING, G. P., SPEIR, T. W. & WHALE, K. N., 1986. Changes in microbial biomass C, ATP content, soil mono-esterase and phospho-diesterase activity following air drying of soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **18**. 363–370.
- SPARLING, G. P. & WEST, A. W. & WHALE, K. N., 1985. Interference from plant roots in the estimation of soil microbial ATP, C, N and P. *Soil Biology and Biochemistry*. **17**. 275–278.
- SPARLING, G. P. et al., 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the k_{ec} -factor. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 301–307.
- STAMATIADIS, S., DORAN, J. W. & INGHAM, E. R., 1990. Use of staining and inhibitors to separate fungal and bacterial activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 81–80.
- STENBERG, B. et al., 1998. Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biol. Biochem.* **30**. 393–402.
- STÖRMER, K., 1908. Über die Wirkung des Schwefelkohlenstoffs und ähnlicher Stoffe auf den Boden. *Zentbl. Bakt. II*. **20**. 282–286.
- SZILI-KOVÁCS T., 2004. Szubsztrát indukált respiráció a talajban. *Agrokémia és Talajtan*. **53**. 195–214.
- SZILI-KOVÁCS T. & SZEGI J., 1992. Néhány magyarországi talaj mikrobiális biomassza-C tartalmának meghatározása kloroform fumigációs és szubsztrát indukált respirációs módszerrel. *Agrokémia és Talajtan*. **41**. 227–240.
- SZILI-KOVÁCS T. & TÖRÖK K., 2005. Szénforráskezelés hatása a talaj mikrobiális aktivitására és biomasszájára felhagyott homoki szántókon. *Agrokémia és Talajtan*. **54**. 149–162.
- SZILI-KOVÁCS, T. et al., 1998. Soil microbial biomass-C as a possible indicator of soil pollution. *Agrokémia és Talajtan*. **47**. 253–264.
- SZILI-KOVÁCS, T. et al., 2006. Microbial biomass and phosphomonoesterase activity of the willow (*Salix sp.*) rhizosphere in a heavy metal polluted soil. *Agrokémia és Talajtan*. **55**. 241–250.
- TATE, K. R., ROSS, D. J. & FELTHAM, C. W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C: Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology and Biochemistry*. **20**. 329–335.
- VANCE, E. D., BROOKES, P. C. & JENKINSON, D. S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**. 703–707.
- VANDENHOVE, H. et al., 1991. Microcalorimetry as a tool to detect changes in soil microbial biomass. *Toxicological and Environmental Chemistry*. **30**. 201–206.
- VAN GESTEL, M., LADD, J. N. & AMATO, M., 1991. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: Influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biology and Biochemistry*. **23**. 313–322.
- VAN VEEN, H. A., LADD, J. N. & AMATO, M., 1985. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with [^{14}C (U)] glucose and

- [¹⁵N](NH₄)₂SO₄ under different moisture regimes. *Soil Biology and Biochemistry*. **17**. 747–756.
- VORONEY, R. P. & PAUL, E. A., 1984. Determination of KC and kN in situ for calibration of the chloroform fumigation incubation method. *Soil Biology and Biochemistry*. **16**. 9–14.
- WARDLE, D. A. & PARKINSON, D., 1990. Determination of bacterial and fungal fumigation k_C factors across a soil moisture gradient. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 811–816.
- WILLIAMS, B. L. & SPARLING, G. P., 1984. Extractable N and P in relation to microbial biomass in UK acid organic soils. *Plant and Soil*. **76**. 139–148.
- WU, J. et al., 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction – an automated procedure. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**. 1167–1169.
- WU, J. et al., 1994. Fumigation-extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**. 117–125.
- ZELLES, L. et al., 1997. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**. 1325–1336.

Érkezett: 2006. július 18.

SZILI-KOVÁCS TIBOR és
TÓTH JÁNOS ATTILA
MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, Budapest
és Debreceni Egyetem Természettudományi Kar
Ökológia Tanszék, Debrecen