

Talajlégzés mérése és jellemzése különböző rendszerekben

– Laboratóriumi gyakorlat –

1. A mérés célja

Laboratóriumi kísérletekre van szükség annak megállapítására, hogy a talajban található mikroflóra működőképes-e és aktiválható-e, amennyiben igen, akkor milyen módon (például levegőztetéssel, tápanyag-kiegészítéssel, hozzáférhetőség növelő adalékkal, szénhidrogénbontó baktériumok/gombák talajhoz keverésével).

E laboratóriumi gyakorlat során két, a fenti igények kielégítésére szolgáló mini-reaktoros gyorsesztelő módszert ismerünk meg. Mindkét módszer –egyszerű talajlégzés-mérőrendszer – alkalmas a talajok állapotának és a talajszennyező szénhidrogének bonthatóságának megítélésére, valamint a bioremediációhoz potenciálisan alkalmazható technológiai alternatívák előzetes tesztelésére.

2. Elméleti összefoglalás

2.1. A talajlégzés és a szubsztrát indukált talajlégzés fogalma; a talajlégzésmérés és jelentősége

A talaj biológiai állapota és aktivitása jól jellemezhető az ún. **talajlégzésmérés** segítségével. A **talajlégzés** az a folyamat, amikor a talajban található élőlények a talajba kerültek vagy az ott képződött szerves anyagok átalakításához oxigént vesznek fel, illetve az átalakításkor keletkező szén-dioxidot leadják. A szerves szénforrás szerves szén (CO₂-dá) való átalakítását nevezzük **mineralizációnak**. A talajba kerülő szerves vegyületek lebontása végbe mehet oxigén jelenlétében, **aerob** módon és **anaerob** viszonyok között is, amikor az oxigént például nitrát, nitrit vagy szulfát helyettesíti.

A talajlégzésmérés során legtöbb esetben a talaj **aerob légzését** vizsgáljuk. Az aerob talajlégzést általában a termelt CO₂ és/vagy az elfogyasztott O₂ mennyiségének mérésével határozhatjuk meg. A gyakorlatban inkább a kibocsátott CO₂ mennyiségi meghatározása terjedt el, hiszen szén-dioxidot mind az aerob, mind az anaerob szervezetek bocsátanak ki, továbbá a szén-dioxid-koncentráció meghatározására szolgáló módszerek érzékenyebbek. A mikroorganizmusok által termelt szén-dioxid kvantitatív meghatározása durva közelítéssel jellemzi a talaj biológiai aktivitását. A talajlégzés dinamikáját azonban sokkal jobban jellemzi

a jelen laborgyakorlat során is vizsgált, ún. **szubsztrát indukált légzésmérési** módszer. Ennek lényege, hogy az aerob talajlégzés folyamatos monitorozása közben bontható szubsztrátot (például glükózt) adagolunk a rendszerhez. Az impulzusszerű, egyszeri szubsztrátadagolás hatására bekövetkező légzésintenzitás-növekedést a szén-dioxid-termelés időgörbéjének meredekségével lehet jellemezni. Az így mért talajlégzés mind a természetes állapotú (antropogén és természetes szennyező anyagoktól mentes), mind pedig a szennyezett talajok jellemzésére alkalmas.

A talajlégzést mérő tesztrendszerek segítségével az alkalmazástól függően választ kaphatunk a következőkre:

- szennyezett-e a talaj;
- toxikusan hat-e a szennyezőanyag, vagyis gátolt-e a mikroorganizmusok működése vagy sem;
- adaptálódott-e a mikroflóra és aktívan működik-e;
- aktiválható-e a mikroflóra;
- amennyiben aktiválható a mikroflóra, milyen technológiai paraméterekre van szükség az optimális működéshez.

A termelődött CO₂ mennyisége arányos az elbontott szénhidrogének mennyiségével, a biológiai oxidáció mértékével, tehát a rendszer alkalmas mind a talaj biológiai állapotának felmérésére, mind a biodegradáció folyamatának jellemzésére és követésére. A szénhidrogén vagy más szerves szennyezőanyag típusából, a talaj fajtájából, a szennyezőanyag korából és koncentrációjából adódó különbségek kimérésére is alkalmazható a mérőrendszer. A technológiát tekintve válasz kapható például arra (levegőztetett rendszer esetében) hogy milyen mértékű levegőztetésre van szükség a mikroflóra aktiválásához. Szükség van-e tápanyag adagolásra (N- és/vagy P-forrás), szükségesek-e adalékanyagok (például hozzáférhetőséget javító anyagok). Karbonátos talajok esetén a felszabaduló CO₂ zavarhatja a mérést.

2.2. Statikus és dinamikus talajlégzésmérés definíciói, típusai

A talaj CO₂-termelésének mérésére számos eljárást dolgoztak ki. Vannak szabadföldi vagy *in situ* (***1. ábra***) és laboratóriumi mérési módszerek, előbbiekkal a talaj aktuális biológiai aktivitása, míg utóbbiakkal a talaj potenciális biológiai aktivitása határozható meg. Továbbá megkülönböztetünk statikus és dinamikus talajlégzésmérési módszereket is.



1. ábra: *In-situ* talajlégzésmérő készülék
(<https://www.adc.co.uk/products/srs-sd2000-intelligent-portable-soil-respiration-system/>)

A **statikus légzésmérés** során a zárt, inkubált, a levegő cirkuláltatásától mentes rendszerben elhelyezett talajmintából származó CO₂ vagy O₂ koncentrációját határozzák meg. A statikus módszerek tovább csoportosíthatók aszerint, hogy a mérési elv a képződő CO₂-gáz abszorpcióján vagy pedig a kísérleti kamrában lévő levegő CO₂-tartalmának dúsulásán (statikus zárt kamrás módszer) alapul.

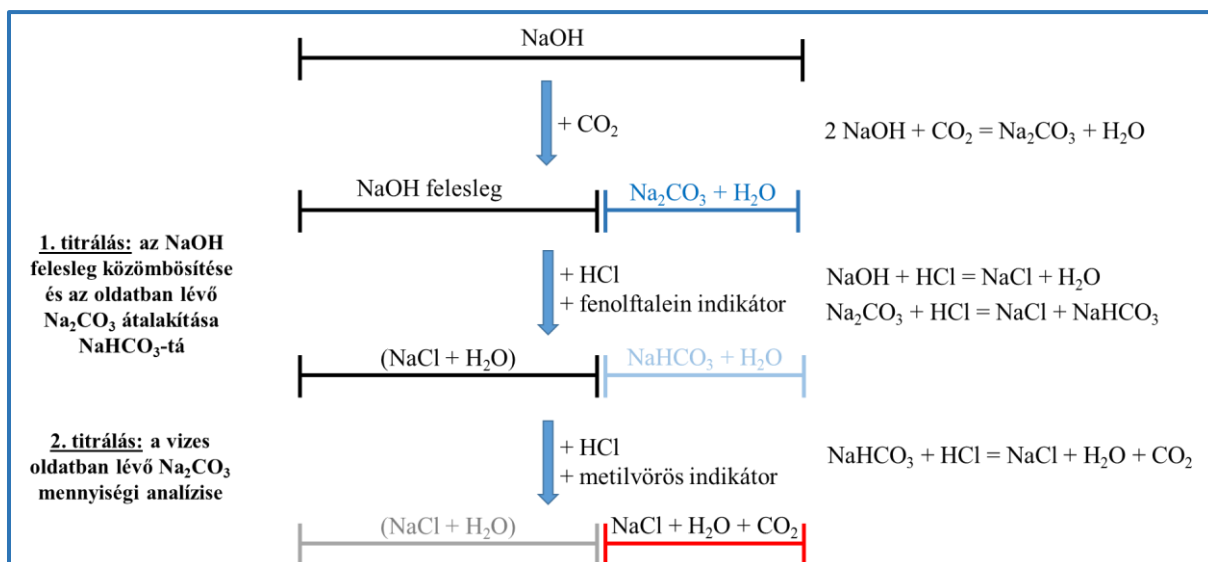
A **statikus abszorpciós módszer** azon alapul, hogy a talajlégzés során képződő CO₂-gázt valamilyen abszorbensen (például NaOH, KOH, Ca(OH)₂ oldatokban vagy ugyanezen vegyszerek szilárd hordozóin) elnyeletik, majd az elnyelt CO₂ mennyiségét meghatározzák titrimetriásan vagy gravimetriásan. A gyakorlathoz kapcsolódómérési eljárások is a statikus abszorpciós módszerek közé sorolhatók.

Lehetőség van **dinamikus légzésmérés** kivitelezésére is. Ennek során folyamatosan levegőt áramoltatnak át a talajmintát tartalmazó kísérleti kamrán, a levegő oxigéntartalmát pedig a mikroorganizmusok sejtlegzésük során hasznosítják. A képződő CO₂-t vagy a fentiekben ismertetett módon, abszorbensen elnyeletik, vagy közvetlenül detektálják pl. infravörös gázanalizátorral.

2.3. A talajlégzés során képződő CO₂ kvantitatív meghatározására szolgáló módszerek

Az előbbieken áttekintettük, hogy a talajlégzés mérésnek milyen módszerei terjedtek el a modern talajmikrobiológiai gyakorlatban. Most tekintsük át, hogy a talajlégzés során képződő szén-dioxid kvantitatív meghatározására milyen módszerek használatosak. A statikus és dinamikus abszorpciós talajlégzésmérési eljárásoknál, amikor a képződő CO₂-gázt pontosan ismert koncentrációjú NaOH-oldatban nyeletik el, akkor a vizes oldatban Na₂CO₃ képződik. A NaOH és a Na₂CO₃ egymás melletti kvantitatív meghatározása pontosan ismert koncentrációjú sósav mérőoldat segítségével **acidimetriás (sav-bázis) kettős titrálással** történik (2. ábra). Ennek lényege, hogy a NaOH – Na₂CO₃ vizes oldat adott térfogatát fenolftalein indikátor

jelenlétében pontosan ismert koncentrációjú sósav mérőoldattal titrálják halvány rózsaszín megjelenéséig. Ezen első titrálási lépés során a minta NaOH-tartalma vízzé és NaCl-dá, míg Na₂CO₃-tartalma NaHCO₃-tá alakul. A második titrálási lépésben a – már csak – NaHCO₃-ot tartalmazó vizes oldatot titrálják pontosan ismert koncentrációjú sósav mérőoldattal metilvörös vagy metilnarancs indikátor jelenlétében.



2. ábra: NaOH és Na₂CO₃ kvantitatív meghatározása vizes oldatban egymás mellett acidimetriás kettős titrálással

A második titrálási lépés során fogyott sósav mérőoldat anyagmennyisége ekvivalens a vizsgált talajból származó szén-dioxid anyagmennyiségével. Ez az eljárás akkor alkalmazható, ha a karbonátok mennyisége a hidroxidokéhoz viszonyítva nem nagy, ellenkező esetben a fenolftalein indikátor átcsapása nem elég éles. Az előbbieken ismertetett módszer egyszerűsíthető és gyorsítható **potenciometriás titrálással**, melynek során kiküszöbölhetők a fenolftalein és a metilnarancs indikátorok átcsapásainak bizonytalanságaiból eredő hibák.

A klasszikus és műszeres acidimetriás CO₂-meghatározáson kívül elterjedten használják a **gázkromatográfiás** és az **infravörös spektroszkópiás gázanalízist** is.

2.4. Talajlégzésmérés zárt palackban manometrikus oxigén-meghatározással

A **manometrikus oxigén-meghatározás** lényege, hogy a talajban élő szervezetek a légzési oxigén elfogyasztása mellett szén-dioxid-gázt termelnek, a termelt szén-dioxid-gázt pedig megfelelő abszorpciós szerrel megkötik. Ezzel zárt gáztérben azt érik el, hogy a gáztér nyomása lecsökken, ami kizárólag az oxigénfogyasztásra vezethető vissza, amit manometrikusan mérnek. Az oxigénfogyasztás manometrikus méréséhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

- a biológiailag aktív mintának gázt át nem eresztő edénybe zárva kell lennie;

- a minta fölött levegővel töltött, megfelelően méretezett gáztérnek kell lennie, amely elegendő oxigént biztosít a biológiai lebontáshoz;
- a zárt mérőedényben a szén-dioxid-gáz megkötésére szolgáló abszorpciós szert kell elhelyezni úgy, hogy az ne kerülhessen érintkezésbe a mintával;
- a reakció edényen megfelelő nyomásmérő berendezést kell elhelyezni;
- a reakciós edényt a mérés közben állandó hőmérsékletű helyen, fénytől elzárva kell tartani.

A manometrikus oxigén-meghatározáshoz használt rendszert mutatja az 3. **ábra**. A reakciós edényekre erősített sárga-fekete színű elektronikus nyomásmérők ún. **membrános nyomásmérők**. A nyomás változásának hatására egy rugalmas elem – jelen esetben egy membrán – deformálódik, és a létrejött deformáció érzékelésével kapott elektromos feszültség vagy áram szolgál kimenőjelként. Az 5. **ábrán** látható készülék nem abszolút (vákuumhoz mért) nyomást mér, hanem relatív, azaz a mindenkori légköri nyomáshoz viszonyított nyomásváltozást (pontosabban nyomáscsökkenést) mér.



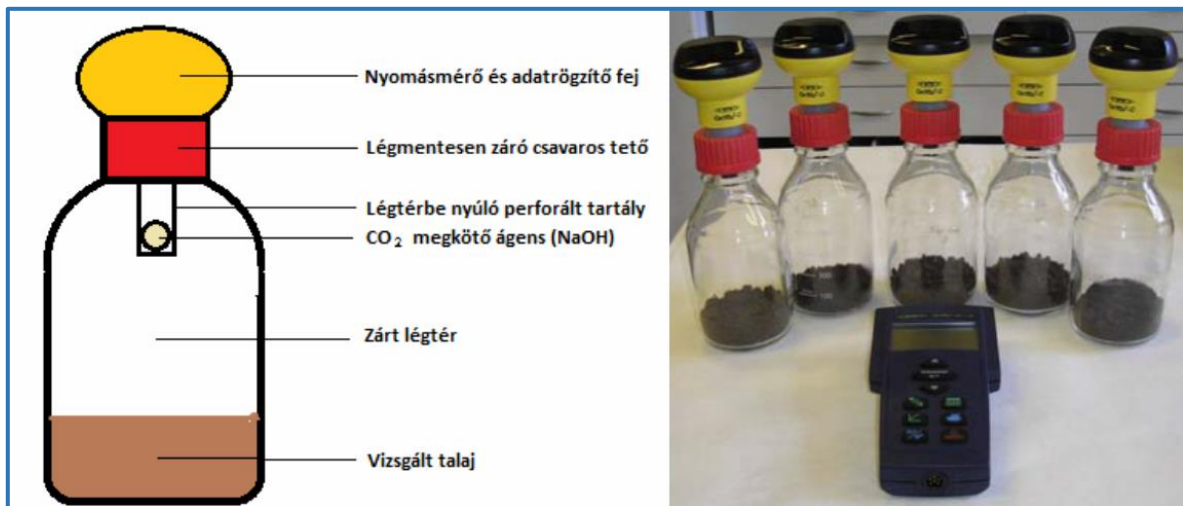
3. **ábra**: A zárt palackos manometrikus oxigén-meghatározáshoz használt apparátus

3. Laborgyakorlat – Szubsztrát indukált talajlégzés mérése zárt palackban az OxiTop légzésmérő rendszerrel

3.1. Az OxiTop Control zárt palackos légzésmérő rendszer jellemzése

Az alkalmazott **OxiTop Control** készülék légzésintenzitás változások mérésére alkalmazható manometrikus módszer. A rendszer a mintában lévő élő mikroorganizmusok aerob légzése során felhasznált oxigén fogyását, és az ezzel arányosan növekvő, kilélegzett szén-dioxid mennyiségét követi nyomon. A szén-dioxid a talajminta fölötti légtérbe kerül, ahol egy NaOH-ot tartalmazó edény található, a keletkező szén-dioxid megkötésére. Mivel az oxigén fogy, és a keletkező szén-dioxid pedig elnyelődik, ezért az edény légterében a légzés hatására nyomáscsökkenés figyelhető meg, amit a mérőfejben elhelyezett membrános nyomásmérő mér. A készülék vezérlése és az információk lekérdezése a **Control Panel**-lel történik. A Control Panel infravörös jelekkel képes kapcsolatot teremteni a mérőfejekkel.

Az összeállított mérőrendszer felépítését mutatja a **4. ábra**.



4. ábra: A zárt palackos OxiTop Control talajlégzésmérő rendszer

3.2. A mérés kivitelezése

A tesztedények összeállítását a gyakorlatvezető végzi a laborgyakorlatot megelőzően.

A mintatartó edényekben (100 cm³) elhelyezzük a talajmintákat (20 g), majd hozzáadunk az előre elkészített 0,1 g/ml koncentrációjú glükóz oldatból 1 ml-t és alaposan homogenizáljuk. Az edényeket csavaros kupakkal ellátva 24 órán keresztül előinkubáljuk, a mérést csak ezt követően indítjuk el. A mérés indításakor a NaOH-ot tartó perforált tartályba (mely csavarosan illeszkedik a fedélhez) ~ 1 g szilárd, szemcsés NaOH-ot mérünk be, majd

csatlakoztatjuk a talajmintákat tartalmazó edényhez. A NaOH-os tartályok csatlakoztatása után rögzítjük a tömítéseket csavaros technikával.

A Control Panelen ezt követően be kell állítani a mérési módot, időt és a méréshatárt. A megfelelő beállítások ellenőrzése után elindíthatjuk a mérést, mégpedig úgy, hogy a Control Panel-t megfelelően közel (kb. 20 cm távolságba) helyezzük a mintatartó edényhez, hogy az infravörös kapcsolat létrejöhessen. A kapcsolat tényleges létrejöttét a mérőfejen piros fény felvillanása jelzi. A mérés ideje alatt állandó hőmérsékletet, és napsugárzástól mentes környezetet kell biztosítani, mert ezek mind hatással vannak a mért nyomásértékekre.

A változásokat az idő függvényében rögzíti a készülék, az időadatokat percekben jeleníti meg. A mért adatokat az adatátviteli vezeték segítségével továbbíthatjuk a számítógépre egy a készülékhez tartozó számítógépes szoftver segítségével, majd Microsoft Excel táblában elvégezhetjük a kiértékelést. A talaj-mikrokozmosz kísérleteink során **nyomásváltozást mértünk**, mely a talaj mikroflóra aerob légzése során felhasznált oxigénfogyásból adódik.

A zárt palackban OxiTop Control mérőrendszerrel végzett talajlégzésmérés főbb paramétereit az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: A zárt palackos OxiTop Control mérőrendszerrel végzett talajlégzésmérés főbb mérési paramétereit.

Kísérleti/mérési paraméter	Beállított érték
Mérőedény (reaktor) térfogata	100 cm ³
Talajmennyiség a reaktorban	20 g
Talajminták nedvességtartalma	15–18 %
Hőmérséklet	25°C
Mérési mód	nyomásváltozás hPa dimenzióban
Méréshatár	300 hPa
Mérési idő	5 nap
A CO ₂ -gáz elnyelésére használt abszorbens ágens és tömege	szilárd, szemcsés NaOH kb. 1 g

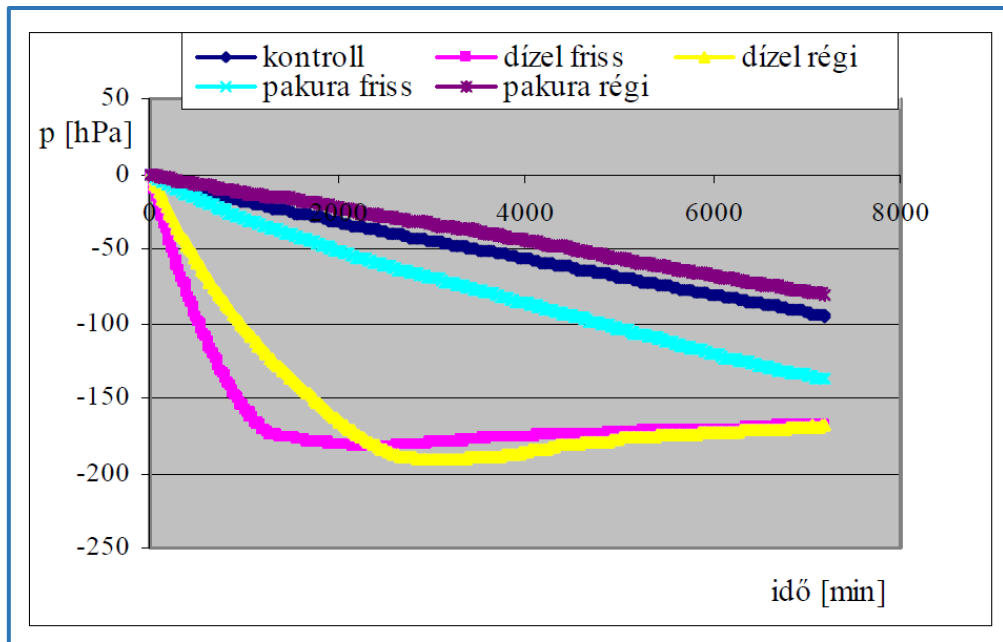
3.3. A mérési eredmények értékelése

Az OxiTop Control mérőfej öt napon keresztül, 20 percenként rögzíti a palackban a nyomásváltozás értékét. Mivel a tesztedényt állandó hőmérsékleten tartjuk, ezért a nyomásváltozás elvileg kizárólag a talaj légzése során termelődött, és a NaOH által elnyelt szén-dioxid mennyiségével arányos. A kiértékelés szemléltetésére **példaként** egy, különböző szerves szennyezőanyagokkal kezelt kísérlet talajainak teszteredményeit mutatjuk be (5. *ábra*).

A 9. *ábra* alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le.

1. A mindegyik görbén megjelenő nyomáscsökkenés azt mutatja, hogy a szennyező anyagok gyors biodegradációja elkezdődött.
2. A meredeken induló görbék azt mutatják, hogy a dízelolaj sokkal gyorsabban és könnyebben bontható a mikroorganizmusok számára, mint a hosszabb szénláncú szénhidrogéneket tartalmazó pakura.
3. A frissen szennyezett talajban gyorsabban bontják a szennyezőanyagot a mikroorganizmusok, mint a régebben szennyezett talajban. Gyorsabban aktiválódnak a szénhidrogén-bontó mikroorganizmusok a friss szennyeződések esetében, hiszen nagyobb a hozzáférhető frakció, míg a régi szennyeződés esetén feldúsultak a nehezebben bontható, kevésbé hozzáférhető komponensek.
4. Nagymértékű a nyomáscsökkenés a dízelolajjal régóta szennyezett talajban is, ami az adaptálódott mikroflóra jelentét és aktivitását mutatja.
5. A szennyezett területről származó, régi, koros szennyeződést tartalmazó pakurával szennyezett talajnak még a kontroll talajénál is kisebb az aktivitása, ami arra utal, hogy az ebben lévő szénhidrogének már biológiailag nem vagy csak nagyon nehezen hozzáférhetőek, a mikroflóra aktivitásának növelésére van szükség.

A nyomásértékek jól szemléltetik a talajokban zajló különböző folyamatok eredményét és a mikroflóra adaptációs képességét. A könnyebben bontható dízelolajhoz gyorsabban adaptálódtak a mikroorganizmusok; nagyobb a mikrobiális aktivitás ezek a talajokban. A dízelolajjal szennyezett mintáknál megfigyelhető, hogy a mérőedénybe helyezett NaOH kimerülése miatt nem nyelődött el a CO₂, ezért nem tudott tovább csökkenni a nyomás. Ilyen nagy légzésintenzitásnál több NaOH-ra van szükség.



5. ábra: Nyomáscsökkenés az 5 napos zárt palackteszt során

4. Laborgyakorlat – Talajlégzés mérése statikus rendszerben

4.1. Mérés elve

Hasonlóan a szubsztrátindukált légzésméréshez, ebben az esetben is zárt palackban, OxiTop mérőfejek segítségével végezzük el a mérést. A különbség a SIR méréshez képest az, hogy itt nem adagolunk a talajmintákhoz glükóz oldatot, illetve a manometrikus elven működő mérést kiegészítjük a talajlakó mikroorganizmusok sejtlegzése során termelődő CO₂ acidimetriás titrálással történő mennyiségi meghatározásával. A CO₂-t ebben az esetben ismert koncentrációjú NaOH oldatban nyeljük el, melyet megfelelően hígítva elvégezhető a sav-bázis titrálás. A kapott eredmények összevethetően a manometrikus detektálás során kapott nyomásgörbék eredményeivel. A laborgyakorlat során a hallgatók az acidimetriás kettős titrálást végzik el, illetve az OxiTop mérőfejek által rögzített nyomásértékeket nyerik ki a kontroller segítségével. A gyakorlat során is használt tesztedények láthatóak a 6. ábrán.



6.ábra: A statikus talajlégzés-mérés során használt mérőrendszer

4.2. A mérés kivitelezése

A tesztedények összeállítását a gyakorlatvezető végzi a laborgyakorlatot megelőzően.

~750 cm³ térfogatú üvegedényekbe helyezünk 100 g-ot a vizsgálandó talajmintákból, majd a légtérben található mintatartókba 50 cm³ 1n NaOH oldatot mérünk ki, mely a termelőző CO₂ elnyelésére szolgál. Az OxiTop mérőfejek csavaros rögzítését követően a kontrollor segítségével a mérés elindítható, mely 3 napig tart. A mérőfejek a légtérben uralkodó nyomást a SIR méréshez hasonlóan 20 percenként rögzítik. Az edényeket a mérés időtartama alatt 21°C-on, fénytől védve inkubáljuk. A teszt végeztével, a kontrollor segítségével kinyerjük a mérőfejekből az adatokat.

Az acidimetriás titráláshoz a NaOH oldatos mintatartókból 2 cm³-t pipetázunk ki 100 cm³-es Erlenmeyer lombikokba. Az oldatokat ezután desztillált vízzel 5x-ös térfogatra (10 cm³) hígítjuk, és titrálást. A mintavétel és a titrálás lépései között a lombikok száját alufóliával fedjük le, hogy a légköri CO₂ beoldódását meggátoljuk.

Az acidimetriás kettős titrálás lépései:

1. A 10 cm³ mintát tartalmazó Erlenmeyer-lombikba 3-4 csepp fenolftalein indikátort csepegtetünk. Az Erlenmeyer-lombik tartalmát 1 mol/dm³ névleges anyagmennyiség-koncentrációjú sósav mérőoldattal halvány rózsaszínig titráljuk.
2. A halvány rózsaszín megjelenésekor az Erlenmeyer-lombik tartalmához 3-4 csepp metilvörös indikátort adunk, majd hagymaszínig titráljuk

0,1 mol/dm³ névleges anyagmennyiség koncentrációjú és $f = \dots\dots\dots$ faktorú sósav mérőoldattal.

3. A második titrálás végpontja előtt az oldatot kiforraljuk, hogy a NaHCO₃ és sósav reakciójakor képződő szén-dioxid-gázt kiűzzük az oldatból. A forralás után jeges vízfürdőn lehűtjük az oldatot, majd tovább titráljuk hagymaszínig. **(Fontos, hogy a titrálást viszonylag alacsony hőmérsékleten – 20 °C körül, erős rázogatóst kerülve végezzük!)**

Feljegyzendő információk:

- az acidimetriás kettős titrálás során mért sósav mérőoldat-fogyások [cm³]
- az acidimetriás kettős titráláshoz használt sósav mérőoldat faktora

4.3. A mérési eredmények értékelése

A kapott sósav- mérőoldat fogyásokból kiszámítható a talajminták által egységnyi idő alatt termelt CO₂ mennyisége. A jegyzőkönyv elkészítése során az óránként, 1 kg talaj által termelt CO₂ mennyiségének [g] kiszámítása a feladat.

A jegyzőkönyvben szerepeljen:

Statikus légzésmérés acidimetriás titrálással

- a mérés rövid elve
- a gyakorlat során végzett mérés rövid leírása, készülékrajz
- az acidimetriás kettős titrálás leírása, a három rendezett sztöchiometriai reakcióegyenlet
- az acidimetriás titrálás során kapott mérőoldat-fogyások számtani közepe a három különböző talajminta esetén
- a termelt szén-dioxid anyagmennyiségének és térfogatának kiszámítása
- a termelt szén-dioxid megadása [$\text{g CO}_2/\text{kg talaj}\times\text{óra}$] mértékegységben
- a termelt szén-dioxid térfogatok alapján meghatározni, hogy melyik reaktor milyen szennyeződést tartalmazhatott
- a vizsgálat során kapott és számított adatok alapján a szennyezett talajok szöveges értékelése és jellemzése
- Milyen remediációs technológiát választana a reaktorokban található szénhidrogénnel szennyezett talajok remediálására? (Egy technológiát javasoljon, és választását indokolja: miért azt választotta? mik annak az előnyei és hátrányai?!)

Szubsztrát indukált talajlégzés-mérés

- a mérés rövid elve
- a gyakorlat során végzett mérés rövid leírása, készülékrajz
- a nyomáscsökkenést [hPa] ábrázolni az idő [nap] függvényében mind a három minta esetén egy diagramon
- az előbbieken felvett diagram szöveges értékelése, az egyes szennyezőanyagok biodegradálhatóságának összehasonlítása

A mérési jegyzőkönyv megírása során figyeljen a megfelelő mértékegység-használatra, továbbá ügyeljen a számításai során kapott végső eredmények értékes jegyeinek megadására!