

Practicum Denitrificatie, V6

denitrificatie

Denitrificatie is een belangrijk proces in de stikstofkringloop dat door zeer veel soorten bodembacteriën kan worden uitgevoerd. Bij denitrificatie zetten bacteriën nitraat (NO_3^-) om in nitriet (NO_2^-). Dit wordt vervolgens omgezet in stikstofmonoxide (NO) dat weer wordt omgezet in lachgas (NO_2). Uiteindelijk wordt het lachgas omgezet in stikstofgas (N_2). Ze gebruiken de stikstofoxiden als terminale elektronenacceptor van de elektronentransportketen als alternatief voor zuurstof. De hoeveelheid energie die bij denitrificatie verkregen wordt is wel in verhouding minder dan bij het gebruik van zuurstof. Daarom vindt denitrificatie alleen plaats als er geen zuurstof aanwezig is.

Als bron van denitrificeerders gebruiken we verse grond en/of verwarmde grond. In de verwarmde grond overleven alleen bacteriesporen. De bacteriën worden in vloeibaar medium in reageerbuizen gekweekt. Een maat voor de denitrificatie-activiteit is de hoeveelheid gas die wordt gevormd boven de vloeistof. Verder kan met nitraatsticks gemeten worden of er nog nitraat en/of nitriet aanwezig is. Op het vloeistofoppervlak breng je een laag kaarsvet (paraffine) aan. Als er stikstofgas wordt gevormd, wordt de parafineprop omhooggeduwd (zie tekening). We voegen een beetje alcohol (ethanol) toe als energiebron voor de bacteriën. Onze eigen cellen zouden liever glucose hebben, maar veel bodembacteriën kunnen ethanol makkelijker gebruiken dan glucose, als tenminste de concentratie niet te hoog is.

De onderzoeksvraag moet je zelf formuleren. Denk aan controleproeven en de betrouwbaarheid van het experiment. Als je zorgvuldig pipetteert en met een paar kunstgrepen zijn de proeven kwantitatief te doen.

wat heb je nodig?

- | | |
|---|---------------------|
| -4 reageerbuizen met aluminium dop | -vloeibaar kaarsvet |
| -leidingwater | -ethanol |
| -nitraatstrips | -verse grond |
| -nitraatoplossing (1M kaliumnitraat in water) | -pasteurse pipetten |



*pasteurse
pipet*

wat ga je doen?

Goede resultaten worden verkregen als op de volgende manier gewerkt wordt:

Vul een reageerbuis met:

10 ml leidingwater

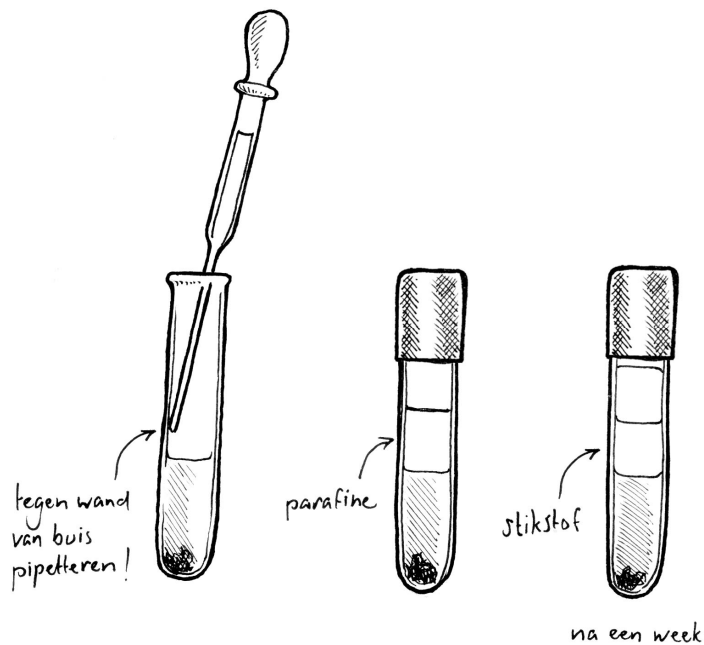
één klein spateltje van de te onderzoeken grond

6 druppels nitraatoplossing

3 druppels ethanol

- Schud de buizen goed door te zwenken
- Druppel met een pasteurse pipet voorzichtig vloeibaar kaarsvet op het vloeistofoppervlak. Zorg dat hierbij geen kaarsvet op de zijwanden van de reageerbuizen komt. De laag moet ongeveer 2 cm dik zijn
- Sluit de buizen af met een aluminium dop.
- Zet de reageerbuis in de stoof bij 30°C of, als die er niet is, op een donkere, veilige plek.
- Kijk na enkele dagen tot een week of er gasvorming is opgetreden.
- Vervolgens kun je met een roerstafje de kaarsvetprop omlaag duwen en met een nitraatstrip onderzoeken of er in de vloeistof nog nitraat en nitriet aanwezig is.





verslag

Schrijf individueel een verslag van het experiment. Bij de beoordeling wordt vooral gelet op de betrouwbaarheid van de experimenten, controle-experimenten en de hoeveelheid informatie die je uit de experimenten kunt halen.

Hieronder is schematisch de ademhalingsketen weergegeven van de bacterie uit het geslacht *Paracoccus* als deze denitrificeert. *Paracoccus* is een genus van bacteriën met een zeer flexibele ademhalingsketen en waar heel veel onderzoek naar verricht is (ondermeer door Hz).

Nar: nitraatreductase

SDH: succinaatdehydrogenase (succinaat is barnsteenzuur)

bb: protonenpomp

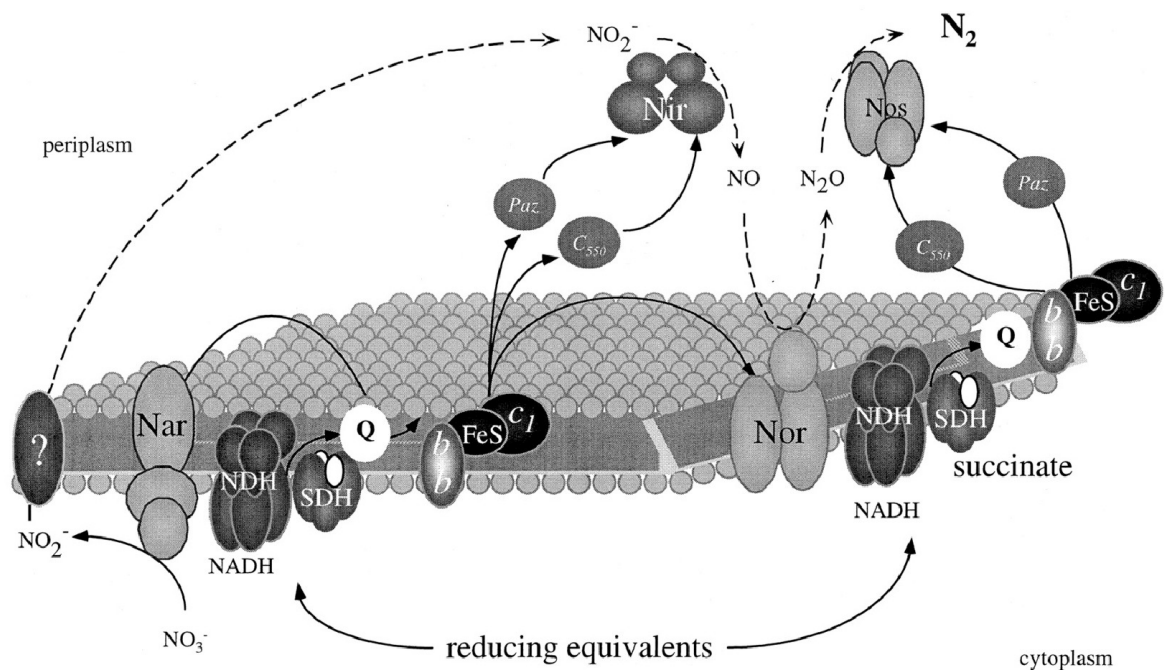
Nir: nitrietreductase (in het periplasma)

NDH: NADH-dehydrogenase

Q: ubiquinon

Nor: NO-reductase

Nos: NO₂-reductase



Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.-M.H., van Spanning, R.J.M.: Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: Metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, 62, 1046-1078.