



# Funktionell diversitet hos mikrober i jordbruksmark

Mätning av substratinducerad respiration och enzymaktivitet

---

Agnes de Val

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap / Institutionen för mark och miljö

Växtodlingsprogrammet

Nummer i serien: 2024:12

Uppsala 2024





# Funktionell diversitet hos mikrober i jordbruksmark. Mätning av substratinducerad respiration och enzymaktivitet

Agnes de Val

**Handledare:** Karolina Jörgensen, SLU, institutionen för mark och miljö  
**Bitr. handledare:** Anke Herrmann SLU, institutionen för mark och miljö  
**Examinator:** Eveline Krab, SLU, institutionen för mark och miljö

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i biologi  
**Kurskod:** EX0894  
**Program/utbildning:** Växtodlingsprogrammet  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för vatten och miljö  
**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2024  
**Upphovsrätt:** Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

**Nyckelord:** Mikrober, respiration, enzymaktivitet, gödselbehandling, substrat, glukos, askorbinsyra, l-alanin, acid fosfatase, betaglukosidas, N-acetylglutamat

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för mark och miljö

## Sammanfattning

Detta kandidatarbete undersöker sambandet mellan enzymaktivitet och respiration hos mikrober i jordbruksmark med olika gödselbehandling vid tillsats av olika kolsubstrat med låg molekylvikt (askorbinsyra, glukos, l-alanin). Målet är att utreda mikrosamhällenas faktiska aktivitet och att avgöra om det finns korrelationer mellan enzymaktivitet, respiration, markens gödselbehandling samt substrattillsats. Studien fungerar även som ett pilotförsök för att bedöma om metoden kan mäta skillnader i enzymaktivitet över tid efter tillsats av olika substrat.

För att genomföra undersökningen genomfördes experiment med jordprover från ramförsöken på Sveriges Lantbruksuniversitet. Tre kolsubstrat och tre enzymsubstrat med olika kemiska egenskaper undersöktes och en fluorescens/absorbans-spektrofotometer användes för att mäta enzymaktivitet och respiration i jordproverna.

Resultaten visade att både respiration och enzymaktivitet varierade beroende på vilken typ av jord mikroberna befann sig i. Däremot fanns det inte ett övertygande resultat att dessa faktorer påverkades av vilket kolsubstrat som tillsattes. Detta indikerar att markens egenskaper och innehåll har en större inverkan på mikrobiell aktivitet än de specifika kolsubstrat i den koncentrationen som användes. Detta pilotförsök föreslår vidare forskning och försök för att förbättra metoden och för att undersöka effekter av olika substrattillsatser på mikrobiell aktivitet i jord.

*Nyckelord:* Mikrober, respiration, enzymaktivitet, gödselbehandling, substrat, glukos, askorbinsyra, l-alanin, acid fosfatase, betaglukosidas, N-acetylglutamat

## Abstract

This bachelor's thesis investigates the relationship between enzyme activity and respiration in microbes in agricultural soils with different fertilization treatments with the addition of various low molecular weight carbon (C) substrates (ascorbic acid, glucose, l-alanine). The aim is to examine the actual activity of microbial communities and to determine if there are correlations between enzyme activity, respiration, soil fertilization treatment, and substrate addition. The study is also a pilot experiment to assess whether the method can measure differences in enzyme activity over time after the addition of different substrates.

To conduct the investigation, experiments were carried out with soil samples from the long-term frame trials at the Swedish University of Agricultural Sciences. Three carbon substrates and three enzyme substrates with different chemical properties were examined, and a fluorescence/absorbance spectrophotometer was used to measure enzyme activity and respiration in the soil samples.

The results showed that both respiration and enzyme activity varied depending on the type of soil the microbes were in. However, there was no conclusive evidence that these factors were influenced by the added carbon substrates. This indicates that soil properties and content have a greater impact on microbial activity than the specific carbon substrates at the concentrations used. This pilot study suggests further research and experiments to improve the method and to investigate the effects of various substrate additions on microbial activity in soil.

*Keywords:* Microbes, respiration, enzyme activity, fertilization treatment, substrate, glucose, ascorbic acid, l-alanine, acid phosphatase, betaglukosidase, N-acetylglutamate

# Innehållsförteckning

<b>Tabellförteckning</b> .....	<b>7</b>
<b>Figurförteckning</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introduktion</b> .....	<b>9</b>
1.1 Bakgrund .....	10
1.1.1 Mikrobers respiration .....	10
1.1.2 Mikrobers enzymaktivitet .....	11
1.1.3 Ramförsök, Sveriges lantbruksuniversitet .....	12
1.2 Syfte och frågeställningar .....	12
1.2.1 Frågeställningar och hypoteser .....	13
1.3 Avgränsningar .....	14
<b>2. Material och metod</b> .....	<b>15</b>
2.1 Litteratursökning .....	15
2.2 Laboration .....	15
2.2.1 Förenklad beskrivning av laborationen .....	15
2.2.2 Förberedelser .....	16
2.2.3 Testomgång .....	17
2.2.4 MicroResp™ .....	18
2.2.5 Enzymanalyser .....	20
2.3 Statistisk analys .....	22
<b>3. Resultat</b> .....	<b>23</b>
3.1 MicroResp™ .....	23
3.2 Enzymanalyser .....	25
3.3 ANOVA (Analysis of Variance) .....	29
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>33</b>
4.1 MicroResp™ .....	33
4.2 Enzymanalyser .....	35
4.2.1 Acid phosphatase .....	37
4.2.2 Betaglukosidas .....	38
4.2.3 N-acetylglutamat .....	39
4.3 Felkällor .....	40
<b>5. Slutsatser</b> .....	<b>41</b>

<b>Referenser.....</b>	<b>43</b>
<b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>	<b>46</b>
<b>Tack.....</b>	<b>48</b>
<b>Bilaga 1.....</b>	<b>49</b>
<b>Bilaga 2.....</b>	<b>51</b>
<b>Bilaga 3.....</b>	<b>53</b>
<b>Bilaga 4.....</b>	<b>57</b>

# Tabellförteckning

Tabell 1. Envägs-ANOVA för MircoResp™	29
Tabell 2. Envägs-ANOVA för enzymanalysen.	30
Tabell 3. Envägs-ANOVA för enzymanalysen	31
Tabell 4 Mg C/g jord för mg substrat/brunn för glukos	48
Tabell 5. Mg C/g jord för mg substrat/brunn för askorbinsyra	49
Tabell 6. Mg C/g jord för mg substrat/brunn för l-alanin	49
Tabell 7. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat askorbinsyra, dag 1	56
Tabell 8. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat askorbinsyra, dag 7	56
Tabell 9. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat askorbinsyra, dag 14	57
Tabell 10. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat glukos, dag 1	57
Tabell 11. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat glukos, dag 7	58
Tabell 12. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat glukos, dag 14	58
Tabell 13. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat l-alanin, dag 1	59
Tabell 14. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat l-alanin, dag 7	60
Tabell 15. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat l-alanin, dag 14	60

# Figurförteckning

Figur 1. Kemisk struktur av glukos. ....	16
Figur 2. Kemisk struktur av l-alanin.....	17
Figur 3. Kemisk struktur av askorbinsyra .....	17
Figur 4. Plate set up för jordifyllning.....	19
Figur 5. Jordplattor och substrat.....	19
Figur 6. Plate set up för substratifyllning.....	19
Figur 7. Jordplattor i inkubationsskåp.....	20
Figur 8. Detektionsgelsplatta.....	20
Figur 9. Plate set up enzymanalys.....	21
Figur 10. Absorbansdiagram.....	24
Figur 11. Enzymaktivitet aP.....	26
Figur 12. Enzymaktivitet BG.....	27
Figur 13. Enzymaktivitet NAG.....	28
Figur 14. Kalorimetermätning.....	34
Figur 15. 96-brunnsplattor.....	53
Figur 16. 96-brunnsplattor.....	54
Figur 17. Falconrör.....	54
Figur 18. Ependorfrör.....	55



# 1. Introduktion

Jorden står inför stora utmaningar när det kommer till klimatförändringar. Minskade utsläpp av växthusgaser, ökad biodiversitet och stabilisering av ekosystem är essentiellt för att tackla utmaningarna. Samtidigt ökar jordens befolkning och alla behöver mat, vilket betyder att marken troligtvis kommer brukas mer intensivt (Kousar et al. 2021). Markhälsan blir därför viktig att studera för att förstå sambandet mellan klimatutmaningarna och optimerad matproduktion till befolkningen. Marken har många förmågor, bland annat kan den binda atmosfärisk koldioxid till marken, bidra till tillgängliga näringsämnen för grödor, ha en vattenhållande förmåga samt vara habitat för många organismer som bidrar till biologisk mångfald (Powlson 2020). Ett sätt att studera markhälsan är att undersöka markmikrobernas aktivitet (Ramesh et al. 2019). Mikrober är en mikroskopiskt liten organism, mindre än några tiondels millimeter. Inom markbiologi klassas oftast bakterier, protozoer, alger, nematoder, svampar och aktinomyceter som mikrober (Ramesh et al. 2019).

Markmikrober spelar en central roll i ekosystemets processer och stabilitet genom att de omsätter organiskt material, påverkar näringstillgängligheten i marken och bidrar till markens kolinlagring. I marken finns det mängder av mikrober som kan bryta ned dött organiskt material som frigör näringsämnen som är essentiella för växter och andra markorganismer (Ramesh et al. 2019). Inom jordbruket blir dessa processer avgörande då det bidrar till jordens näringsinnehåll och bördighet som i sin tur stöder en mer hållbar matproduktion. Dessutom kan markmikrober bilda organiska föreningar och på så sätt binda kol till marken och bidra till kolcykeln vilket är relevant i sammanhanget av klimatförändringar och växthusgaser i atmosfären. För att ha en frisk och produktiv jord behövs ett aktivt och diversifierat mikrosamhälle (Gayan et al. 2023).

Det är därför intressant att undersöka mikrobernas, de mikroskopiskt små organismernas, aktivitet och funktionella diversitet för att förstå deras påverkan av de gigantiska utmaningar som världen står inför. Funktionell diversitet avser de delar av den biologiska mångfalden som påverkar hur ett specifikt ekosystem fungerar. Det är den funktionella diversiteten som till exempel påverkar ekosystemets stabilitet, näringstillgänglighet och dynamik. Ett exempel på

funktionell diversitet hos mikrober är den kvävefixerande förmågan och vilka enzym som de kan producera (Mouchet et al. 2010). Däremot är mikrober svåra att studera eftersom de är så mikroskopiskt små och lever i en mycket heterogen miljö. För att överkomma dessa utmaningar har olika metoder utvecklats för att mäta mikrobiell aktivitet och de processer de är involverade i.

Denna uppsats kommer behandla ett experiment där mikrobers respiration och enzymaktivitet undersöktes med hjälp av två olika metoder. Tanken är att undersöka huruvida information från enzymaktiviteten kan komplettera data från respirationsundersökningen. Respirationen kan reflektera den totala aktiviteten medan enzymanalysen kan ge insikt i vilken typ av organiskt material som bryts ner och hur effektivt det sker. Genom att kombinera dessa metoder ges en bredare och djupare förståelse av den funktionella diversiteten hos olika mikrosamhällen i olika fältbehandlade jordar.

## 1.1 Bakgrund

### 1.1.1 Mikrobers respiration

Respiration hos mikrober är omvandlingen av en organisk förening, till exempel glukos, till energi där koldioxid blir en biprodukt av reaktionen. En hög respiration antas betyda hög mikrobiell aktivitet eller biomassa (Gayan et al. 2023). Respiration är därför ett användbart och vanligt mått på mikrobiell aktivitet. Ett sätt att mäta mikrobernas respiration är MicroResp<sup>TM</sup>. Denna metod är substratinducerad vilket betyder att olika kolsubstrat tillsätts till jordprover och den resulterande koldioxidproduktionen mäts. För att mäta koldioxidproduktionen mäter MicroResp-metoden absorbansen på en detektionsgel som sätts på jordproverna i en fluorescens/absorbans-spektrofotometer (Campbell et al. 2003).

Genom att tillsätta olika slags substrat, till exempel glukos eller askorbinsyra, kan man bedöma den metaboliska förmåga som mikrosamhället har. Eftersom olika mikrosamhällen förväntas reagera olika på olika kolsubstrat kan man få insikt om vilken sammansättning av mikrober och funktionalitet som finns i specifika jordar. Detta beror på att vissa mikrober är specialiserade på att bryta ner specifika typer av organiska föreningar och andra har en bredare metabolisk förmåga. Vilken typ av metabolisk förmåga som mikroberna har kan bero på vilken typ av jord de lever i, samt vilken typ av jordbearbetning och skötselmetod som används på jordarna (Campbell et al. 2003).

### 1.1.2 Mikrobers enzymaktivitet

Utöver respiration är enzymer ett viktigt verktyg för att kartlägga mikrobiell aktivitet. I marken finns det bakterier, svampar och rötter som behöver näring. För att komma åt näring kan de exudera enzymer i marken för att bryta ner föreningar som innehåller näringsämnen. Enzymer är proteiner, polymerer av aminosyror som katalyserar biokemiska reaktioner och behövs för nedbrytning av organiska föreningar, till exempel cellulosa och lignin, samt för omvandling av näringsämnen som kväve och fosfor (Britannica 2024). Med hjälp av enzymerna bidrar dessa markorganismer till markens näringscykel av bland annat kol och kväve. Mikrobernas enzymatiska aktivitet kan därmed bli ett mått på ekosystemets resiliens och stabilitet (Gayan et al. 2023).

I det experiment som genomfördes och beskrivs i denna uppsats är enzymerna hydrolytiska enzymer; acid phosphatase (aP),  $\beta$ -glukosidas (BG) och N-acetylglutamat (NAG). Hydrolytiska enzymer katalyserar hydrolysen av en kemisk bindning. En hydrolys är processen av att bryta ner en kemisk förening med hjälp av vatten. Den bryter ner polymerer till enklare kemiska föreningar, till exempel nedbrytning av stärkelse till glukos (Britannica 2024).

Acid phosphatase (aP) katalyserar hydrolysen av organiska fosfater i sura miljöer för att frigöra organiskt fosfor. Reaktionen är essentiell i många biokemiska processer i naturen och därför finns enzymet i växter, svamp, djur och bakterier (Alshami & Varon 2024). Fosfor är ett essentiellt näringsämne för växter och därför är det viktigt att detta ämne tillgängliggörs. Fosfor kan finnas både i organisk och oorganisk form i marken, aP aktivt tillgängliggör den organiska fosfor (New South Wales Government 2017; Alshami & Varon 2024).

$\beta$ -glukosidas (BG) är ett hydrolytiskt enzym som spelar en viktig roll i nedbrytningen av kolhydrater. Betaglukosidas hydrolys av glykosidbindningar resulterar i frisättningen av glukos och arkeer, bakterier och eukaryoter har den genetiska kapaciteten att producera detta enzym. Betaglukosidas bidrar till att bryta ner cellulosa till glukos och är därav delaktig i nedbrytningen av organiska ämnen i marken. Detta är viktigt för jordens kvalitet och näringstillgänglighet. BG är även det enzymet som katalyserar det sista steget i cellulosanedbrytningen, vilket är frigörandet av glukos (Sengupta et al. 2023).

N-acetylglutamat (NAG) är delaktig i hydrolysen av kitin som är en stor del av cellväggen hos svampar. Genom att bryta ner kitin frisätts kväve och kol till marken vilket är positivt för jordkvaliteten, näringstillgängligheten för växter och markens näringscykel av kol och kväve. N-acetylglutamat kan produceras av bakterier, svampar, växter och djur (Wen & Kellum 2012).

För att mäta mikrobers enzymaktivitet kan man tillsätta specifika enzymsubstrat som ger en mätbar produkt när de bryts ner av enzymer. Genom att använda denna metod får man information om vilka biokemiska processer och vilka enzymer som är aktiva i en viss miljö (Saiya-Cork et al. 2002). Det fluorescerande substrat som ofta används vid enzymanalyser är 4-metylumbelliferon (MUB). När ett enzym klyver MUB från en molekyl frigörs substratet som fluorescerar under UV-ljus. Därefter kan enzymaktiviteten mätas i en fluorescens/absorbans-spektrofotometer (Saiya-Cork et al. 2002).

### 1.1.3 Ramförsök, Sveriges lantbruksuniversitet

Ramförsöket är ett markprojekt som anlades 1956 på Sveriges Lantbruksuniversitet, Ultuna, för att undersöka om stallgödsel kunde ersättas och hur marken påverkas av olika behandlingstyper av gödsling eller tillsatts av organiskt material. Försöket är upplagt i små rutor på fyra m<sup>2</sup> och varje ruta behandlas på ett unikt sätt med upprepning. I rutorna odlas det majs förutom i behandlingen med träda. Detta försök kan ge inblick och förståelse för kolinlagring och betydelsen av mullhalt i marken för avkastning och markhälsa. Behandlingarna som undersöks på ramförsöket är bland annat: träda, halm + N, flytgödsel, gröngödsel, slam och mineralgödsel vilka är de behandlingar som undersöks i denna rapport (Sveriges Lantbruksuniversitet 2023).

Träda innebär att jorden inte har fått någon gödsel eller bevuxen mark över huvud taget tillfört sedan starten av ramförsöken 1956. Halm + N betyder att jorden har fått halmstrån alternerande med kvävegödsling tillfört som gödselbehandling. Flytgödsel betyder att jorden har fått animaliskt avfall blandat med organiskt material som gödselbehandling. Gröngödsling innebär att jorden har fått färskt organiskt material i form av hö som gödselbehandling. Jorden som har haft slam som gödselbehandling har innehållit rester från reningsverk. Mineralgödsling innebär att jorden har fått Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> tillfört som gödselbehandling.

## 1.2 Syfte och frågeställningar

Syftet med denna uppsats är att undersöka och koppla samman enzymaktiviteten och respirationen av mikrober i olika jordbruksmarkstyper från ramförsöken i Ultuna, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), vid tillförsel av substrat. Baserat på resultaten från undersökningen är syftet att utreda mikrosamhällets faktiska aktivitet samt att se om det finns samband mellan enzymaktiviteten, respirationen och vilken typ av mark som mikroberna lever i med vilket sorts kolsubstrat som

tillsätts. Undersökningen är även ett pilotförsök för att utvärdera om metoden kan över huvud taget mäta skillnader i enzymaktivitet över tid efter tillsats av olika substrat.

Mätningarna kommer att ske under tre tidstillfällen, med en veckas mellanrum, för att kunna se en förändring över tid i den mikrobiella aktiviteten. Tre tidstillfällen valdes för att hinnas med under tidsramen för kandidatarbetet.

### 1.2.1 Frågeställningar och hypoteser

Frågeställningar:

- Finns det en skillnad mellan respirationen, samt enzymaktiviteten i olika sorters jordbruksmarker från ramförsken vid Ultuna, SLU?
- Hur förändras respirationen och enzymaktiviteten i de olika jordarna under tre tidstillfällen?
- Finns det några mätbara skillnader i enzymaktivitet efter tillsats av substrat?

Hypoteser:

- Jorden som har behandlats med träda kommer ha lägre mikrobiell aktivitet än jordarna som har bevuxna behandlingar
- Störst skillnad i enzymaktivitet mellan de olika tillsatserna av substrat kommer att observeras efter två veckors inkubering.
- Respirationen kommer vara lägre under andra och tredje mättillfället än första.
- Enzymaktiviteten kommer vara högre under andra och tredje mättillfället än första.

Hypotesen att jorden som behandlats med träda kommer ha lägre mikrobiell aktivitet baseras på att det inte har tillförts något organiskt material till den jorden på mycket lång tid. Mikrober behöver organiskt material för att kunna tillgodose sig essentiella näringsämnen samt för att kunna respirera. Troligtvis kommer jorden med träda som behandling ha låg mikrobiell biomassa eftersom det är en ofördelaktig plats att leva i.

Hypotesen att det kommer bli störst skillnad i enzymaktivitet efter två veckor baseras på att det tar tid för enzymaktiviteten att komma i gång och noteras eftersom enzymaktiviteten kommer öka i takt med att den mikrobiella biomassa ökar, vilket sker succesivt efter tid.

### 1.3 Avgränsningar

Arbetet avgränsar sig till jordförsök från ramförsöket i Ultuna, SLU. Ramförsöket har många olika behandlingstyper på jordarna men i denna uppsats har endast jordarna som har behandlats med träda, halm + N, flytgödsel, gröngödsel, slam och  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  analyserats för att besvara frågeställningen.

Arbetet avgränsar sig även till endast analys av substraten glukos, askorbinsyra, l-alanin och vatten i MicroResp<sup>TM</sup> för att besvara frågeställningen. Det är vanligt att använda många fler kolsubstrat vid analys med MicroResp<sup>TM</sup> men detta experiment avgränsas till endast ett fåtal kolsubstrat så arbetet inte skulle bli för stort. De valda substraten valdes eftersom de har olika kemiska struktur (kolhydrat, organisk syra och aminosyra) som gör det olika enkelt för mikroberna att bryta ner substraten. Att ha med vatten som substrat behövs för att mäta respirationen och enzymaktiviteten utan tillsats av kolsubstrat.

Till sist avgränsar sig arbetet till analys av endast de hydrolytiska enzymerna betaglukosidas, acid phosphatase och N-acetylglutamatsyntas för att besvara frågeställningen. De valda enzymerna valdes eftersom de tillgängliggör olika essentiella näringsämnen (kol, fosfor och kväve).

## 2. Material och metod

### 2.1 Litteratursökning

För att få fram information och fakta i uppsatsen har jag använt mig av litteratursökningar från vetenskapliga artiklar i databaser som Science Direct och Google Scholar, men jag har även fått rekommenderat till mig vetenskapliga artiklar från handledare och biträdande handledare under arbetets gång. Exempel på sökord som har använts är: “soil microbiology”, “hydrolytic enzymes”, “functional diversity” och “respiration microbes”.

### 2.2 Laboration

En större del av uppsatsen baseras på laborativa undersökningar som jag genomförde systematiskt under kursens gång. Analyserna gjordes vid tre tillfällen med en veckas mellanrum. Det laborativa arbetet är uppdelat i olika metoder; MicroResp<sup>TM</sup> och enzymanalys. Innan det större laborativa arbetet satte i gång genomfördes ett test för att optimera substratkoncentrationerna för MicroResp-mätningarna. Detta test gjordes på en jord från en gräsmark nära ramförsöket. Jorden inkuberades med olika koncentrationer av glukos, L-alanin, och askorbinsyra, se tabell 4, 5 och 6 i bilaga 1 för koncentrationerna. Testet varade i tre veckor.

#### 2.2.1 Förenklad beskrivning av laborationen

Jordarna som användes under laborationen var fältprover från ramförsöken vid Ultuna. De hämtades under hösten 2023, sållades till 2 mm storlek och förvarades i – 20 °C. Jordarna som användes var från sex olika behandlingar och hade tre fältreplikater, det vill säga totalt 18 jordprover. Det fanns tre fältreplikater av jordarna,

fyra replikat av jordplattorna (kopior) och varje jordplatta hade tre tekniska replikat (tre brunnar med samma behandling + substrat). När experimentet började förinkuberades jordarna i en vecka på 25 °C.

Olika substrat (vatten, glukos, l-alanin och askorbinsyra) tillsattes en gång för att mäta respirationen under tre tillfällen. Sedan tillsattes en buffertlösning för att kunna extrahera extracellulära enzymer. Till sist mättes enzymaktiviteten efter varje mättillfälle av respirationen.

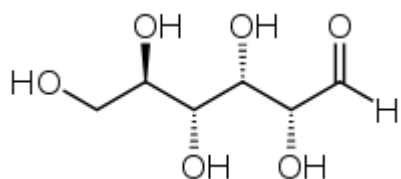
## 2.2.2 Förberedelser

12 stycken 96-hålsplattor (kallas ”jordplattor” i denna uppsats) med 1,2 ml djupa brunnar jordplattor fylldes med sex olika jordar tagna från ramförsöket. Varje brunn innehöll cirka 0,4 g jord. Se figur 5 av hur jordplattorna såg ut. Jordarna var sållade till 2 mm storlek och hade tre stycken fältreplikat - det vill säga 18 olika jordpåsar hämtades från frysen och upptinades. Jordarna fylldes i plattorna enligt plate set up, se figur 4. Därefter inkuberades plattorna i inkubationsskåp på 25 grader i en vecka.

För att få de olika koncentrationerna till substraten som skulle tillsättas i jordplattornas brunnar de koncentrerade substraten i fast form spädas. Under testgenomgången behövdes åtta olika koncentrationer av glukos och askorbinsyra, och sex olika koncentrationer av l-alanin spädas. Substraten spädades med milli-Q-vatten och förvarades i 5,5 °C under experimentets gång. Milli-Q vatten är ultrarenat vatten som används på labb (Avantor u.å.).

De substraten som användes som näringskälla för mikroberna i experimentet var glukos, l-alanin och askorbinsyra. De valdes som kolsubstrat eftersom de har olika kemisk struktur och funktion.

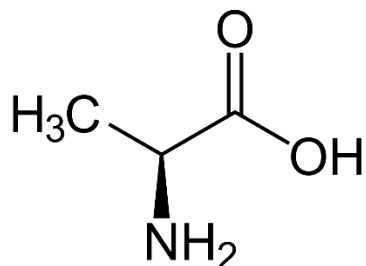
Glukos är en kolhydrat som klassas som en monosackarid. Glukos är cellens källa till energi och fungerar som en energireserv i växtceller. Cellstrukturen är enkel och därav lätt att bryta ner (Britannica 2024)



Figur 1. Kemisk struktur av glukos

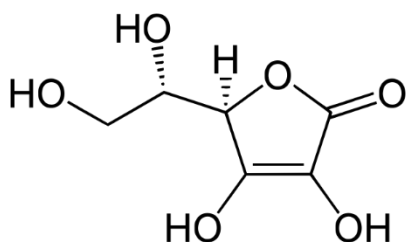


L-alanin är en aminosyra som behövs för uppbyggnaden av proteiner. Mikrober kan transaminera l-alanin till aminogrunder och pyruvat som är en viktig komponent i citronsyrcykeln (American Chemical Society 2018; Reitzer 2009).



Figur 2. Kemisk struktur av l-alanin

Askorbinsyra (vitamin C) är en organisk syra och en antioxidant. Askorbinsyra kan syntetiseras från glukos och är vattenlöslig (Britannica 2024). Det är inte lika enkelt att bryta ner askorbinsyra som andra organiska molekyler eftersom den har en stabil kemisk struktur vilket betyder att specifika enzymer behövs för nedbrytningen av molekylen (Chazot et al. 2022).



Figur 3. Kemisk struktur av askorbinsyra

För mer detaljerad beskrivning av förberedelser, se bilaga 1.

### 2.2.3 Testomgång

För att bestämma vilken koncentration av substraten som skulle tillsättas till mikroberna innan det stora experimentet startades behövdes en testgenomgång av metoderna ske. En jordplatta fick tillsatt åtta olika koncentrationer glukos och askorbinsyra samt sex olika koncentrationer l-alanin. Se tabell 4, 5 och 6 i bilaga 1 för koncentrationerna. Tre tekniska replikat gjordes. Jordplattorna fick genomgå MicroResp<sup>TM</sup> och enzymanalys precis som var tänkt för det stora experimentet. MicroResp<sup>TM</sup> och enzymanalys skedde med en veckas mellanrum under tre veckor. Resultaten från testgenomgången visade att den lägsta koncentrationen av substraten gav utslag på MicroResp<sup>TM</sup> under alla tre veckor. Detta ledde till att den

lägsta koncentrationen, 0,5 mg C/g jord, av substraten valdes att användas under experimentet. Den koncentrationen valdes även för att kunna jämföra resultaten med en tidigare genomförd kalorimetrimätning med samma koncentration.

#### 2.2.4 MicroResp™

Metoden som användes för att mäta respirationen i de olika jordarna med olika tillsatta kolsubstrat var MicroResp™. MicroResp™ är en plattläsningsmetod som avläser respirationen i olika brunnar genom att sätta på en platta med detektionsgel över jordplattan som sedan avläses i en flourescens/absorbans-spektrofotometer (Spark, Tecan Trading AG, Switzerland).

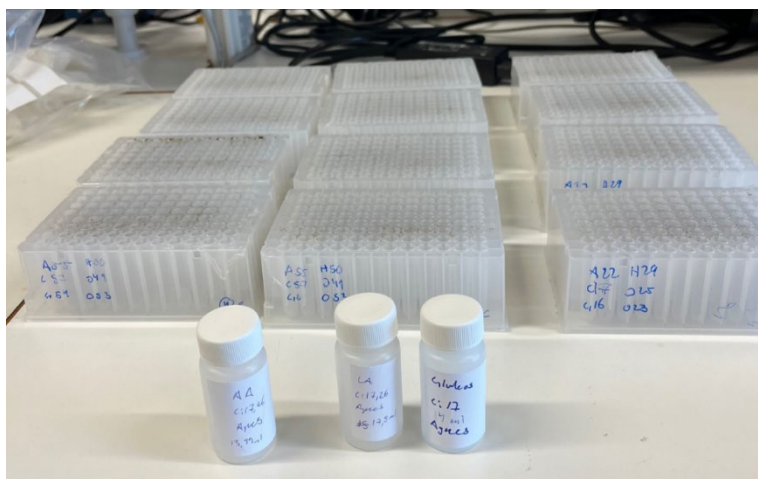
Vid första MicroResp-mätningstillfället togs alla plattor fram från inkubationsskåpet och de fyra substraten överfördes till varje jordplatta. Se figur 6 för vilka brunnar som fick vilka substrat. Varje behandling + substrat hade tre tekniska replikat, det vill säga tre identiska brunnar. Se figur 4 och 6 där till exempel brunn 1, 2 och 3 får samma innehåll, vilket blir tre tekniska replikat. Därefter lades en platta med detektionsgel som kan visa skillnad i respiration i brunnarna efter tid över jordplattan. Detektionsgelsplattan fästes med gummiplatta mellan detektionsgelsplattan och jordplattan och metallklämmor sattes runt allt för att hålla alla delar på plats. Se figur 7 för hur jordplattorna såg ut med gummiplatta, detektionsgelsplatta och metallklämmor. De 12 plattorna sattes i inkubationsskåpet igen och efter sex timmar togs de ut.

Detektionsgelsplattornas absorbans mättes i Spark, Tecan Trading AG, Switzerland, på våglängden 570 nm och jordplattorna lades inkubationsskåpet igen med parafilm över sig och i öppen påse med fuktig servett i. Se figur 8 för att se hur detektionsgelsplattorna såg ut efter olika mättillfällen. Detektionsgelen innehåller kresolrött färgämne (12,5 ppm, wt/wt), kaliumklorid (150 mM), och natriumbikarbonat (2,5 mM) sätts i 150 µl agar (1%) (Campbell et al. 2003). Koldioxiden från respirationen får ämnena i detektionsgelen att blekna från rosa till gulare färg. Samma procedur upprepades vid ytterligare vid två mättillfällen, med en veckans mellanrum.

För mer detaljerad beskrivning av MicroResp™, se bilaga 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A - träda			A - träda			A - träda			A - träda		
B	G - Halm + N			G - Halm + N			G - Halm + N			G - Halm + N		
C	J - Flytgödsel			J - Flytgödsel			J - Flytgödsel			J - Flytgödsel		
D	H - Gröngödsel			H - Gröngödsel			H - Gröngödsel			H - Gröngödsel		
E	O - Slam			O - Slam			O - Slam			O - Slam		
F	C - CaNO3			C - CaNO3			C - CaNO3			C - CaNO3		
G												
H												

Figur 4. Plate set up för ifyllning av jordarna med olika behandling till jordplattorna.



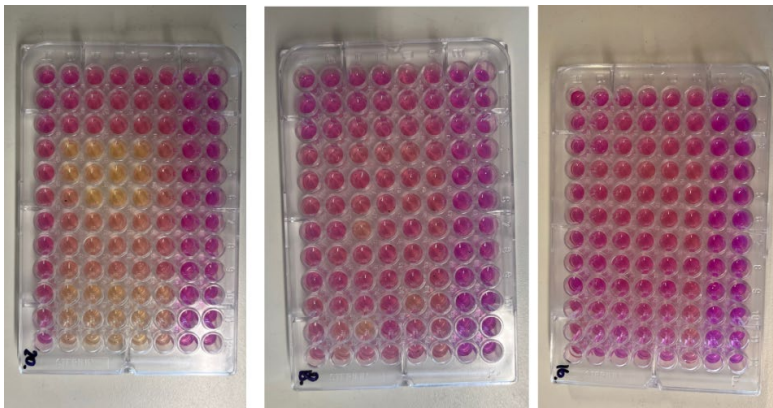
Figur 5. 12 fyllda jordplattor med framställt kolsubstrat i förgrunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A - water			A - glucose			A - alanin			A - asc.acid		
B	G - water			G - glucose			G - alanin			G - asc.acid		
C	J - water			J - glucose			J - alanin			J - asc.acid		
D	H - water			H - glucose			H - alanin			H - asc.acid		
E	O - water			O - glucose			O - alanin			O - asc.acid		
F	C - water			C - glucose			C - alanin			C - asc.acid		
G												
H												

Figur 6. Plate set up för substrat i jordplattorna.



Figur 7. Jordplattor med gummiplattor och detektionsgelsplattor över sig i inkubationsskåp i sex timmar.



Figur 8. Exempel på detektionsgelsplatta efter första, andra och tredje mättillfället. Ju gulare färgen i brunnen är, desto mer respiration har skett.

## 2.2.5 Enzymanalyser

För att mäta enzymaktiviteten genomfördes en enzymanalys efter MicroResp-mätningen. Alla jordplattor hade fyra replikat och ett av replikaten provtogs destruktivt i samband med varje enzymanalysmätning. Av alla plattor som hade genomfört MicroResp-mätningen togs tre jordplattor ut ur inkubationsskåpet för enzymanalys.

En dag efter MicroResp-mätningen fylldes brunnarna med 600  $\mu$ l buffertlösning (natriumacetat 50 mM) och överfördes till mindre rör, ett för varje jordbehandling. 50  $\mu$ l av jordproverna späddes ytterligare med 5 ml buffertlösning och förvarades i

kylskåp. Tre dagar efter det överfördes jordlösningen till 96-brunnsplatta enligt plate set up, se figur 9 för plate set up.

Enzymsubstraten acid phosphatase (aP) 0,512 mg/10 ml acetatbuffert,  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG) 0,676 mg/10 ml acetatbuffert och  $\beta$ -1,4-*N*-acetylglucosaminidase (NAG) 0,758 mg/10 ml acetatbuffert överfördes var för sig till två hela plattor (Saiya-Cork et al. 2002). I alla plattor fanns även tre brunnar som innehöll buffertlösning och enzymsubstratet MUB 4,5  $\mu$ M. På två plattor mättes även quenching. I de brunnarna fanns jordproverna som hade fått vatten som substrat samt enzymsubstratet MUB 4,5  $\mu$ M. Quenching är en typ av inhiberingsmetod av fluorescens och görs för att säkerhetsställa att mätningarna är korrekta. Detta kan man göra genom att inkubera jordlösningen med MUB, som är den fluorescerande delen av enzymsubstraten (Saiya-Cork et al. 2002).

Hälften av plattorna skulle mätas vid  $t_0$  och resten efter 30 minuter. Att ha plattor som skulle mätas vid  $t_0$  var till för att mäta bakgrundsfluorescensen i plattorna. För att räkna ut nettofluorescensen behövdes resultatet från  $t_0$  subtraheras från resultatet från plattorna med 30 minuters inkubering. Se figur 15 i bilaga 3 av alla plattor vid ett mättillfälle samt dess enzym- och tidsmarkeringar. 10  $\mu$ l 0,5 M NaOH tillsattes innan införing av enzymsubstrat i plattorna som skulle mätas vid  $t_0$ . I de andra plattorna tillsattes NaOH efter 30 minuter för att stoppa reaktionen. Därefter mättes plattornas fluorescens i fluorescens/absorbans-spektrofotometer SPARK. Inställningarna i spektrofotometern var emissionsvåglängd på 450 nm, excitationvåglängd på 365 nm och gain sattes till 74.

För mer detaljerad beskrivning av enzymanalysen, se bilaga 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A - water			A - glucose			A- alanin			A - asc.acid		
B	G - water			G - glucose			G - alanin			G - asc.acid		
C	J - water			J - glucose			J - alanin			J- asc.acid		
D	H - water			H - glucose			H - alanin			H- asc.acid		
E	O - water			O - glucose			O- alanin			O - asc.acid		
F	C - water			C - glucose			C - alanin			C- asc.acid		
G	quench: A			quench: G			quench: J			quench: H		
H	quench:O			quench:C			MUB-standard					

Figur 9. Plate set up för enzymanalys. I varje 96-brunnsplatta överfördes ett enzymsubstrat i alla brunnar förutom de två nedersta raderna.

## 2.3 Statistisk analys

För att avgöra om resultaten från MicroResp<sup>TM</sup> och enzymanalysen hade en statistisk signifikans eller om resultaten berodde på naturlig varians genomfördes en envägs-ANOVA i Excel. ANOVA står för ”Analysis of Variance” och testar om det finns signifikanta skillnader mellan grupper av data. Analysen gjordes för MicroResp<sup>TM</sup> genom att ha kolsubstraten (askorbinsyra, glukos, l-alanin), experimentdagarna (1, 7 och 14) och de sex olika gödselbehandlingstyperna som jämförande kolumner i ANOVA-dataanalysen. De tre faktorerna lades i kolumner och Excels funktion ”envägs-ANOVA” genomförde den statistiska analysen efter att värdena valdes från kolumnerna som de värden som skulle analyseras.

Samma procedur gjordes för enzymanalysen då gödselbehandling, enzymsubstrat (aP, BG, NAG) och experimentdagar (1, 7, 14) var de jämförande kolumnerna.

## 3. Resultat

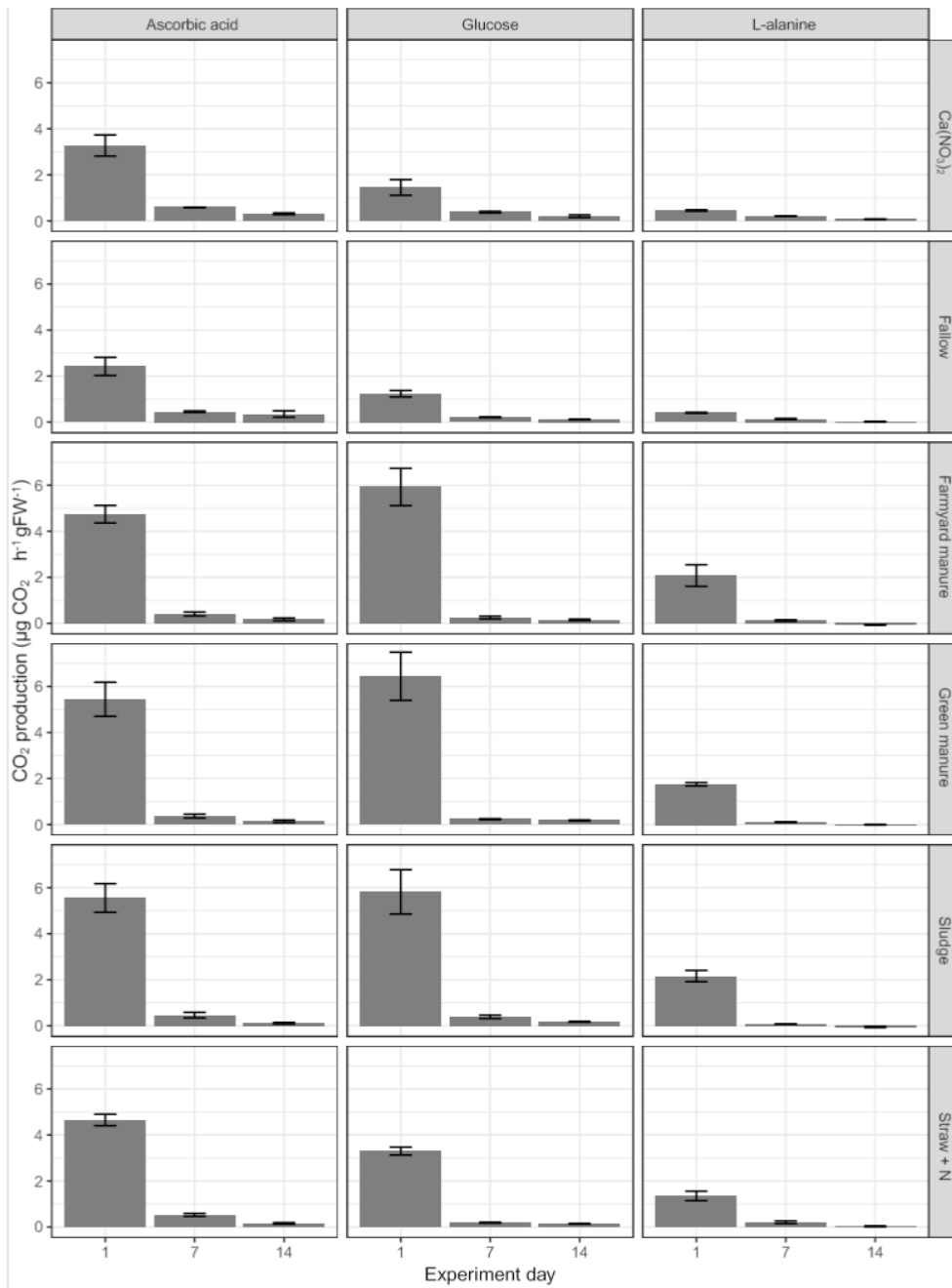
### 3.1 MicroResp™

Jordarna som har haft träda (fallow) och mineralgödsling ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) som behandling har generellt lägre respiration än de andra behandlingstyperna. På samma sätt kan man se från figur 10 att jordarna som har haft gröngödsling (green manure), slam (sludge) och flytgödsel (farmyard manure) har högre respiration än de andra behandlingarna.

Respirationen på alla kolsubstrat och behandlingar minskade efter tid, se figur 10. Figuren visar även att störst skillnad i respiration skedde mellan första och andra mättillfället.

Det går även att utläsa att jordarna som har haft l-alanin som kolsubstrat har generellt lägre respiration än askorbinsyra och glukos. Jordarna som har haft askorbinsyra som kolsubstrat har högre respiration än glukos och l-alanin för jordarna som har behandlats med mineralgödsel ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), träda (fallow) och halm + N (straw\_N). Jordarna som har haft glukos som kolsubstrat har högre respiration än askorbinsyra och l-alanin för jordarna som har behandlats med flytgödsel (farmyard manure), gröngödsling (green manure) och slam (sludge).

Figur 8 visar bilder på detektionsgelsplattor från mättillfälle 1, 2 respektive 3. Trots att bilderna visar plattor från olika jordplattor hade alla detektionsgelsplattor förhållandevis lika resultat i färgändringar som ögat kunde uppfatta. Färgändringen från rosa till gult i detektionsplattorna sjönk under de tre mättillfällena (figur 8).



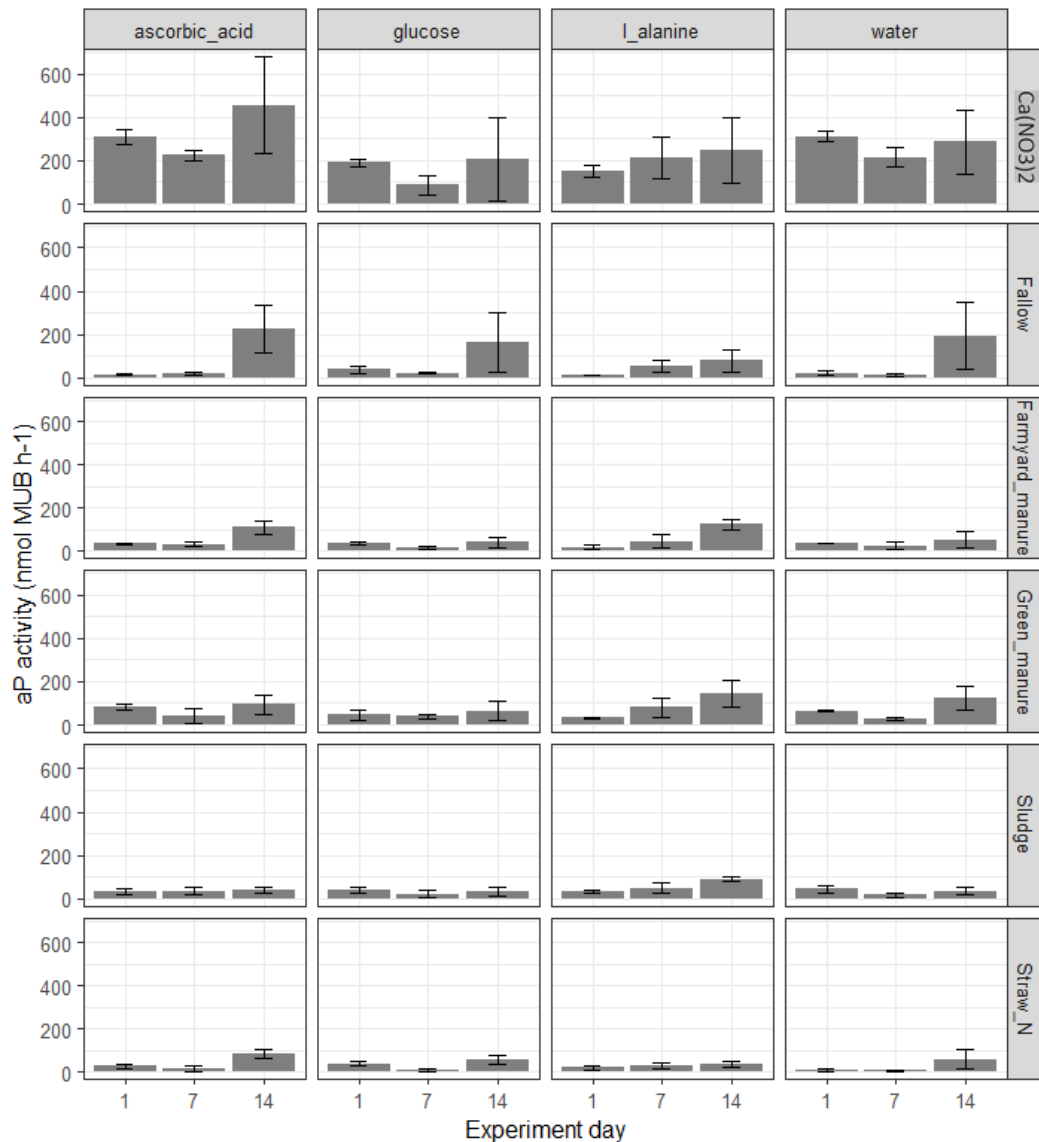
Figur 10. CO<sub>2</sub>-C respirerad (µg CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> fresh soil h<sup>-1</sup>) över 6 timmars inkubering av jordar med olika gödselbehandlingar och tillsatts av olika kolsubstrat (askorbinsyra, glukos, l-alanin) under tre mättillfällen. Standardfel presenteras i felstaplar.



## 3.2 Enzymanalyser

Generellt var skillnaden i enzymaktivitet för aP i förhållande till vatten inte särskilt stor oavsett behandlingstyp och tillsatt substrat (figur 11). Enzymaktiviteten för aP förändrades för de flesta jordarna mest för alla jordar 14 dagar efter experimentstart (figur 11). Figuren visar även att jordarna som hade behandlingarna slam (sludge) och halm + N (straw + N) hade minst skillnad i enzymaktivitet av aP oberoende på vilket substrat som var tillsatt i förhållande till jorden som haft vatten som substrat. De jordarna hade låg enzymaktivitet oberoende på behandlingstyp och tillsatt substrat.

Jordarna som hade behandlats med mineralgödsel ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) hade mycket högre enzymaktivitet av aP än jordarna som hade andra behandlingar. Jorden som hade behandlats med mineralgödsel och haft askorbinsyra som kolsubstrat hade högst enzymaktivitet i förhållande till vatten under alla mättillfällena. Jorden som hade behandlats med mineralgödsel och haft glukos som kolsubstrat hade lägre enzymaktivitet än vatten under alla mättillfällena (figur 11).

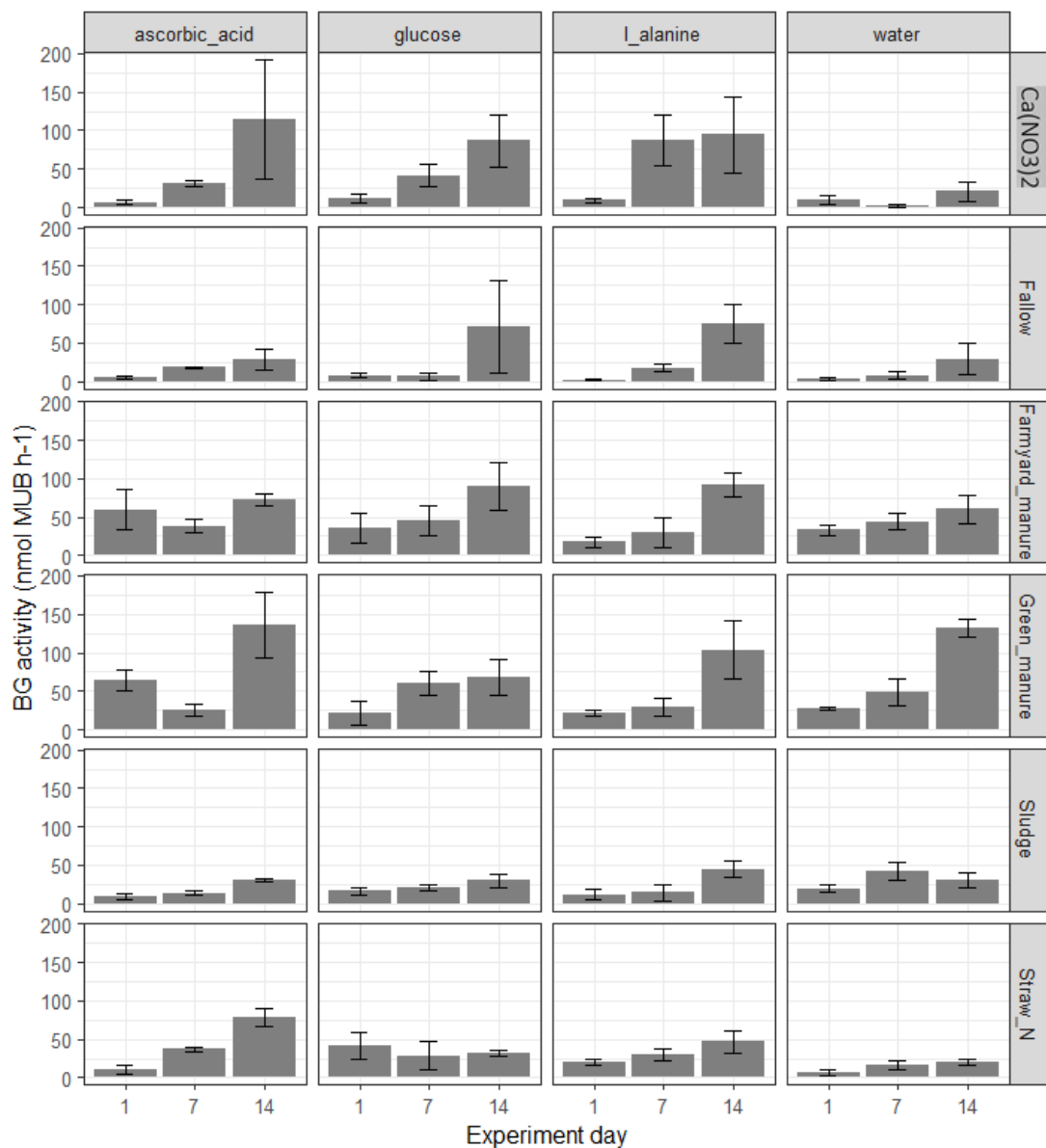


Figur 11. Enzymaktiviteten av aP efter tillsats av olika substrat (askorbinsyra, glukos, l-alanin, vatten) i jordar med olika gödslingsbehandlingar. Standardfel presenteras i felstaplar.

Enzymaktiviteten i alla jordar av BG hade generellt störst förändring i förhållande till jorden som behandlats med vatten 14 dagar efter experimentstart, speciellt jorden som hade behandlats med mineralgödsel ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) och träda (figur 12). Enzymaktiviteten ökar efter inkubationstid. Figuren visar även att jordarna som hade behandlingarna slam (sludge), träda (fallow) och halm + N (straw\_N) hade låg enzymaktivitet av BG.

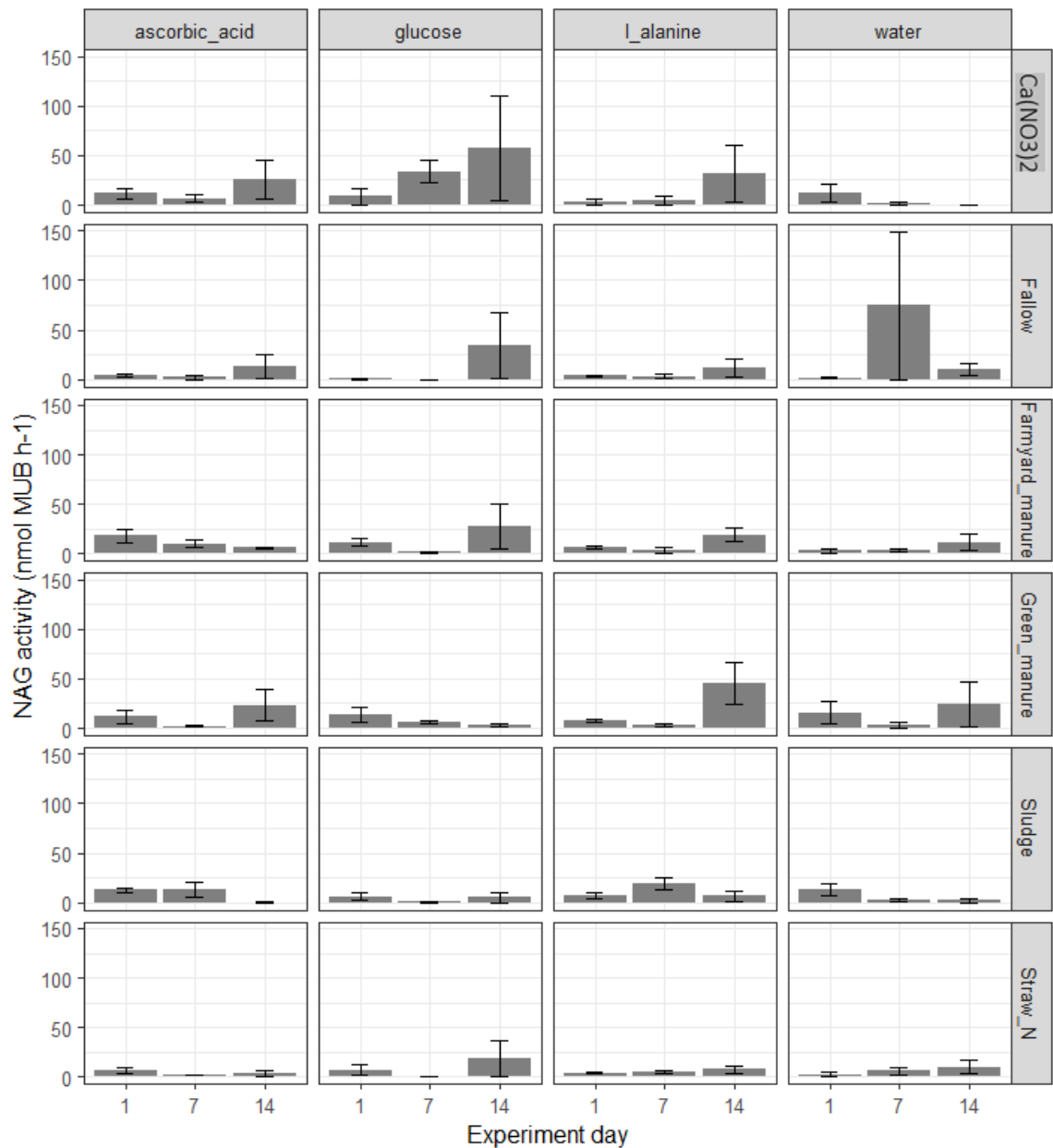
Jordarna som hade behandlats med mineralgödsel hade större skillnad av enzymaktivitet av BG i förhållande till jorden med vatten som substrat än de andra jordarna (figur 12).

Enzymaktiviteten för jordarna som behandlats med gröngödsling (green manure) och flytgödsel (framyard manure) hade förhållande vid hög enzymaktivitet av BG (figur 12).



Figur 12. Enzymaktiviteten av BG efter tillsats av olika substrat (askorbinsyra, glukos, l-alanin, vatten) i jordar med olika gödslingsbehandlingar. Standardfel presenteras i felstaplar.

Det var generellt mycket låg enzymaktivitet av NAG i alla jordar, oavsett behandling och substrat (figur 13). Jorden som hade behandlats med mineralgödsel hade generellt störst skillnad av enzymaktivitet av NAG till jorden som hade vatten som substrat än de andra jordarna (figur 13).



Figur 13. Enzymaktiviteten av NAG efter tillsats av olika substrat (askorbinsyra, glukos, l-alanin, vatten) i jordar med olika gödslingsbehandlingar. Standardavvikelse presenteras i felstaplar.

### 3.3 ANOVA (Analysis of Variance)

Tabell 1. Envägs-ANOVA resultat för MircoResp<sup>TM</sup> mätningar i olika fält behandlingstyper. Varje p-värde representerar ett individuellt ANOVA-test resultat. Tabellen visar p-värde som funktion av tre olika kolsubstrat och experimentdagar. Alfa sattes som 0,05.

Substrat	Dag	p-värde
Ascorbinsyra	1	0,004621
Ascorbinsyra	7	0,414544
Ascorbinsyra	14	0,157719
Glukos	1	0,000285
Glukos	7	0,022876
Glukos	14	0,375108
L-alanin	1	0,000375
L-alanin	7	0,038915
L-alanin	14	0,000714

En statistisk analys med envägs-ANOVA visar att det fanns en statistisk signifikant skillnad för MicroResp<sup>TM</sup> dag 1 för askorbinsyra som kolsubstrat i behandlingstyperna eftersom p-värdet är lägre än alfa vilket var 0,05 (tabell 1). Dag 7 och 14 var p-värdet högre än 0,05 vilket betyder att resultaten inte är statistiskt signifikant annorlunda, de olika resultaten beror troligtvis på naturlig variation (tabell 1).

Tabell 1 visar att kolsubstratet glukos hade en statistisk signifikant skillnad i MicroResp<sup>TM</sup> för de olika behandlingstyperna dag 1 och 7 eftersom p-värdet var lägre än 0,05. Under dag 14 var resultaten inte statistiskt signifikanta eftersom p-värdet var högre än 0,05 vilket betyder att resultaten kan bero på naturlig variation.

För kolsubstratet l-alanin var resultaten statistisk signifikanta under alla mättillfällen eftersom p-värdet var lägre än 0,05 (tabell 1).

Under dag 1 var respirationen lägst i träda och högst i jordarna som hade haft organiskt material som gödselbehandling för alla kolsubstrat (tabell 7, 10 och 13, bilaga 4).

För att se hela resultatet från ANOVA-analysen för MicroResp<sup>TM</sup>, se bilaga 4.

Tabell 2. Envägs-ANOVA resultat för enzymanalysen. Varje p-värde representerar ett individuellt ANOVA-test resultat. Tabellen visar p-värde som funktion av tre olika enzymsubstrat och experimentdagar. Alfa sattes som 0,05.

Enzymsubstrat	Dag	p-värde
aP	1	1,48E-22
aP	7	2,48E-11
aP	14	0,000725
BG	1	7,82E-05
BG	7	0,026154
BG	14	0,00383
NAG	1	0,058929
NAG	7	0,649972
NAG	14	0,336953

Tabell 2 visar en statistisk analys med envägs-ANOVA för resultaten från enzymanalysen. Det finns en statistisk signifikant skillnad i resultaten från de sex gödselbehandlingstyperna som fick aP som enzymsubstrat då p-värdet är lägre än 0,05 för alla dagar (tabell 2).

Även för gödselbehandlingstyperna som fick BG som enzymsubstrat finns det en statistisk signifikant skillnad mellan resultaten eftersom p-värdet är lägre än 0,05 för alla dagar (tabell 2).

För gödselbehandlingstyperna som fick NAG som enzymsubstrat finns det ingen statistisk signifikant skillnad mellan resultaten eftersom p-värdet är högre än 0,05 för alla dagar (tabell 2). Det kan betyda att resultaten beror på naturlig varians eller på slumpen.

Tabell 3. Envägs-ANOVA för enzymanalysen. Tabellen visar p-värde som funktion av sex olika gödselbehandlingar och enzymsubstrat. Alfa sattes som 0,05.

Gödselbehandling	Enzymsubstrat	p-värde
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	aP	0,325326
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	BG	0,011362
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NAG	0,259812
Träda	aP	0,003715
Träda	BG	0,003293
Träda	NAG	0,536378
Flytgödsel	aP	0,002264
Flytgödsel	BG	0,001336
Flytgödsel	NAG	0,11267
Gröngödsel	aP	0,037488
Gröngödsel	BG	2,14E-05
Gröngödsel	NAG	0,081017
Slam	aP	0,26703
Slam	BG	0,006002
Slam	NAG	0,137125
Halm+N	aP	0,002194
Halm+N	BG	0,028488
Halm+N	NAG	0,212366

Tabell 3 visar att det fanns en statistisk signifikant skillnad för resultaten av olika experimentdagar då aP är enzymsubstrat för gödselbehandlingarna träda, flytgödsel, gröngödsel och halm+N då p-värdet är lägre än 0,05. Tabellen visar att det inte fanns en statistisk signifikant skillnad mellan mätningar på olika experimentdagardå aP är enzymsubstrat och gödselbehandlingen är Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> och slam eftersom p-värdet är högre än 0,05. Resultaten kan då bero på naturlig varians.

När BG var enzymsubstrat fanns det en statistisk signifikant skillnad oavsett gödselbehandlingstyp då p-värdet är lägre än 0,05 (tabell 3).

Tabell 3 visar att då NAG var enzymsubstrat fanns det inga statistiska signifikanta skillnader mellan resultaten oavsett gödselbehandlingstyp eftersom p-värdet är högre än 0,05. Resultaten kan i stället bero på naturlig varians.



## 4. Diskussion

### 4.1 MicroResp™

Figur 10 visar att respirationen sjönk i alla plattor efter tid. För att mikrober ska kunna respirera behöver de syre och en energikälla i form av organiskt material (Schnecker et al. 2023). Energekällan som tillsattes i detta experiment var kolsubstraten; glukos, l-alanin och askorbinsyra. Efter tid fanns det mindre tillgängligt substrat för mikroberna att bryta ner eftersom det inte tillsattes något substrat. När substratet blev mindre tillgängligt minskade därför också respirationen (Schnecker et al. 2023). En tidigare inkubationsstudie med kaliometrimätningar av glukos, av samma koncentration som denna studie, visade att kolsubstraten inom 2–3 dagar förbrukades (figur 14, Anke Hermann, personlig kommunikation), vilket kan förklara att respirationen av såpass låg efter 7 och 14 dagar.

Kaliometrimätningar kan även förklara varför det blev störst skillnad i respiration mellan första och andra mättillfälle. Det beror på att en majoritet av substraten förbrukades under den första veckan efter tillsatts av substrat. Detta kan också förklara varför skillnaden i respiration under mättillfälle 2 och 3 inte var lika stort som mellan mättillfälle 1 och 2. Det fanns troligtvis lite mindre tillgängligt substrat under mättillfälle 3 eftersom mikroberna hade brutit ner substrat efter mättillfälle 2 och därför blev det lägst respiration efter 14 dagar.

Jorden som hade behandlats med träda hade lägst respiration enligt figur 10 och tabell 7, 10 och 13 i bilaga 4. Det kan bero på att jord som har legat i träda sedan 1956 inte har särskilt högt innehåll av näringsämnen eftersom jorden inte har varit bevuxen på mycket lång tid. När jorden är bevuxen tillförs näring till marken genom näringcykler mellan växternas rötter, markorganismerna och tillsatt näring från markytan (till exempel gödsel) (Coleman et al. 1983; Fogelfors 2020, kapitel 6). För att det ska vara möjligt för mikrober att respirera behövs en energikälla och jorden med nästan 70-årig träda är troligtvis mycket utarmad. Det kan betyda att den typen av jord blir ofördelaktig att leva i och därför kan man anta att det inte finns många aktiva mikrober som lever i den jorden. I och med att det troligtvis är

låg biomassa av mikrober i den jorden från första början blir resultatet att respirationen i just den jorden blev lägst trots tillsats av substrat (Schnecker et al. 2023).

Respirationen var högst i jordarna som behandlats med slam, flytgödsel och grüngödsling enligt figur 10 och tabell 7, 10 och 13 i bilaga 4. Något som alla dess behandlingar har gemensamt är att de alla är av organiskt material. Grüngödsling är färskt hö, flytgödsel är en blandning av animaliskt avfall och organiskt material och slam är restprodukt från reningsverk. Eftersom organiskt material är essentiellt för mikrobers respiration och de kan bryta ner det för att få näring och energi förklarar det varför respirationen var högst i de jordar som hade behandlingar med tillförsel av organiskt material (Eriksson et al. 2019, kapitel 4). Behandlingarna innehåller kväve i organiska former som måste mineraliseras av mikroberna, vilket ökar den mikrobiella aktiviteten och därmed respirationen (Eriksson et al. 2019, kapitel 4). Det finns troligtvis ett större mikrosamhälle i de jordarna än i till exempel jorden som behandlats med träda eftersom förhållandena är mer fördelaktiga i de jordarna.

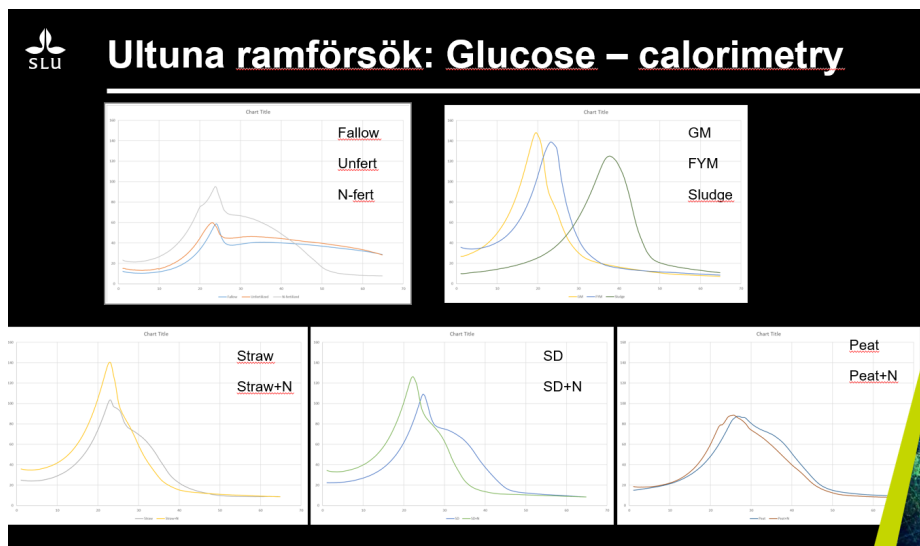
Att mikrober behöver organiska föreningar som kolkälla för att respirera kan även förklara varför jorden som hade mineralgödsel som behandling hade låg respiration (Schnecker et al. 2023). Gödsling med  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  innehåller inget organiskt material och mikroberna kan därför inte respirera i samma grad som i behandlingarna med grüngödsel, flytgödsel och slam trots att det har funnits organiskt material i marken i form av växtlighet (Schnecker et al. 2023).

När l-alanin tillsattes till jordarna blev respirationen lägre än för de andra substraten. Det kan bero på att det är enklare att metabolisera glukos och askorbinsyra än l-alanin. Speciellt glukos är en enkel och snabb energikälla som inte behöver brytas ner mycket mer för att få energi via glykolysen och sedan citronsyracykeln (Chandel 2021). L-alanin är en aminosyra och kräver därför en mer komplex nedbrytning för att kunna användas som energikälla, nämligen transaminering (Berg et al. 2019, kapitel 23). För att l-alanin ska kunna användas i citronsyracykeln behöver den först transamineras vilket är ett extra steg i jämförelse med glukos. Det kan resultera i lägre respirationstakt vilket visas i figur 10.

Den statistiska analysen som genomfördes som envägs-ANOVA visar att det finns signifikanta skillnader i resultatet mellan de olika kolsubstraten under experimentdag 1 vilket betyder att resultaten är trovärdiga och inte beror på naturlig varians (tabell 1). För kolsubstratet askorbinsyra visade den statistiska analysen (tabell 1) att under experimentdag 7 och 14 var resultaten inte signifikanta vilket

betyder att de kan bero på naturlig varians och är därav inte lika trovärdiga. För kolsubstratet l-alanin visade den statistiska analysen (tabell 1) att resultaten är signifikanta för alla experimentdagar vilket betyder att resultaten är trovärdiga. För kolsubstratet glukos visade den statistiska analysen (tabell 1) att resultaten var signifikanta även för experimentdag 7 men inte för experimentdag 14.

Att resultaten inte är av statistisk signifikans för askorbinsyra experimentdag 7 och 14 samt glukos experimentdag 14 kan bero på att respirationen var mycket låg under de mättillfällena vilket kan ha påverkat resultaten till att bli mer slumpmässiga och därav förlora sin statistiska signifikans.



Figur 14. Kalorimetrimätning av glukos i jordar från Ultuna ramforsök. X-axeln sträcker sig från 0–70 timmar.

## 4.2 Enzymanalyser

Att det blev högst enzymaktivitet för alla enzymanalyser 14 dagar (figur 11–13) efter första mättillfället kan förklaras av att den mikrobiella biomassan ökade över tiden. I samband med att den mikrobiella biomassan i jordarna ökade, eftersom det blev en ökad tillgång på kolsubstrat som de kunde omvandla till energi och på så sätt föröka sig, – ökade även mängden enzymer som mikrosamhället exuderade för att bryta ner näringsämnen i sin omgivning (Berg et al. 2019, kapitel 8). Ju större mikrosamhälle desto fler mikrober som producerar enzym vilket kan utläsas i figur 11–13. De kolsubstraten som tillsattes (glukos, askorbinsyra och l-alanin) är inte

ämnen som aP, BG och NAG bryter ned, så den ökade enzymaktiviteten beror troligtvis inte på att kolsubstraten fanns närvarande i jorden, utan att mikrosamhället blev större på grund av kolsubstraten och mikroberna exuderade ut aP, BG och NAG för att bryta ner andra ämnen i marken som kunde tillgängliggöra näringsämnen. (aP tillgängliggör fosfater, BG är med i nedbrytningen av cellulosa och NAG är med i nedbrytningen av kitin)

I alla tre enzymanalysen kan man utläsa att skillnaden i enzymaktivitet mellan jordar som fått kolsubstraten askorbinsyra, glukos och l-alanin inte skiljer sig åt så mycket från jorden som endast har haft vatten som substrat (figur 11–13). Det kan tyda på att det inte går att se någon tydlig substratinducerad enzymaktivitet med denna metod.

Varför resultatet blev så kan bero på flera olika faktorer. Det kan bero på att den valda koncentrationen av kol var för låg i kolsubstraten, endast 0,5 mg C/g jord. Om det hade varit högre koncentration av kol i substraten hade kanske påverkan av substraten varit högre vilket kan ha resulterat i en högre enzymaktivitet som skiljde sig från jorden som inte haft något kolsubstrat tillsatt (vatten). En annan anledning kan vara att förutsättningarna för mikroberna inte var optimala. Jorden provtogs i oktober 2023 då det hade varit kallt och blött (SMHI, 2024). Det var även precis innan gödslingsbehandlingarna skulle tillsättas i försöket igen efter två år. Därför var den mikrobiella biomassan kanske inte särskilt stor under just det tillfället eftersom det var länge sedan de till tillgång till energisubstrat. Det kan ha resulterat i att den mikrobiella aktiviteten var låg och kunde därför inte producera större mätbara skillnader i enzymaktivitet.

Felstaplarna är även mycket stora för alla enzymsubstrat (figur 11–13) vilket betyder att det fanns en stor variation i resultat mellan fältreplikaten. Det kan betyda att resultaten inte är svårtolkade eftersom det skilde sig såpass mycket mellan jordarna. Det skulle behövas fler mätningar för att få mer trovärdiga statistiska resultat som speglar den verkliga enzymaktiviteten. Därför kan man argumentera för att detta experiments resultat inte är övertygande.

Resultaten kan däremot visa att det finns en skillnad i enzymaktivitet över tid mellan olika jordars behandlingstyper vilket tyder på att det finns olika sorters mikrosamhällen i de olika jordarna som är specialiserade på olika biokemiska processer utefter de omständigheter de lever i. En förbättringsmöjlighet för detta experiment skulle kunna vara att ha tätare provtagning för att tydligare kunna se när variationen i enzymaktivitet sker.

### 4.2.1 Acid phosphatase

Jordarna som hade behandling med slam och halm + N hade lägst enzymaktivitet av aP. Även jordarna som hade behandlats med flytgödsel och gröngödsling hade låg enzymaktivitet. Det kan förklaras med att dessa jordar inte behövde producera aP eftersom de hade tillräckligt med fosfor i jorden. AP är en fosfatas som tillgängliggör fosfater från organiskt material (Alshami & Varon 2024). De gödslingsbehandlingarna tillför alla organiskt material till jorden vilket kan betyda att det redan finns tillgång till organiskt fosfor från till exempel skörderester och animaliskt avfall i den jorden (Fogelfors 2020, sid. 182). Det betyder att de mikroberna inte behöver producera aP eftersom det redan finns tillgängligt fosfor och det är energikrävande att syntetisera ett enzym som inte är nödvändigt - vilket leder till att enzymaktiviteten av aP var lägre i jordarna med organiskt material som behandling.

Eftersom jorden som behandlats med mineralgödsel inte har någon tillförsel av organiskt fosfor kan det förklara varför enzymaktiviteten var högre i denna jord. I  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  finns ingen fosfor eftersom det inte är en del av den kemiska sammansättningen. Fosfor är ett essentiellt näringsämne för mikrober, då det behövs i till exempel adenintrifosfat (ATP), nykleinsyror och i fosforlipider som är en viktig del i cellmembranet (Campbell et al. 2021, kapitel 37). Jorden som har haft  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  som behandling har inte fått fosfor tillfört vilket kan leda till att mikroberna i den jorden producerar aP för att tillgängliggöra organiskt fosfor från material i jorden till sig själva (Widdig et al. 2019). N/P kvoten blir hög eftersom  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  tillför mycket kväve till marken.

Likande kan gälla jorden som behandlats med träda. I och med att det inte har tillförts organiskt fosfor till den jorden kan mikroberna som lever där behöva producera aP för att tillgängliggöra organiskt fosfor (Widdig et al. 2019).

Varför jorden som behandlats med mineralgödsel och hade glukos som kolsubstrat hade lägre enzymaktivitet än jorden som hade vatten som substrat kan bero på att mikroberna kunde enklare metabolisera glukos och få energi på det sättet än att producera enzym som tar mycket energi (Campbell et al. 2021, kapitel 6 och 10). Eftersom glukos är enkelt att få energi ifrån var det kanske mer fördelaktigt att inte producera aP trots mikroberna behöver organiskt fosfor eftersom det är för energikrävande i förhållande till hur mycket energi de får från glukos.

Enligt den statistiska analys som genomfördes av resultaten (envägs-ANOVA) kan man se att resultaten är av statistisk signifikans för aP som enzymsubstrat under alla experimentdagar vilket gör resultaten mer trovärdiga (tabell 2). Resultaten är även av statistisk signifikans då aP är enzymsubstrat i jordarna som hade gödselbehandlingarna träda, flytgödsel, gröngödsel och halm + N vilket kan ses i tabell 3. Däremot är resultaten inte av signifikans då aP är enzymsubstrat i jordarna som hade gödselbehandlingarna mineralgödsel och slam (tabell 3). Det kan betyda att resultaten från de två jordarna beror mer på naturlig varians vilket betyder att resultatet är mindre trovärdigt, vilket kan förklara de stora felstaplarna.

#### 4.2.2 Betaglukosidas

Att jordarna som hade behandlingarna slam, träda och halm + N hade låg enzymaktivitet av BG kan bero på att de hade tillräcklig med kol i sina jordar vilket betyder att de inte behövde producera BG som tillgängliggör organiskt kol med hydrolys av cellulosa till glukos samma som i inledning (Sengupta et al. 2023).

Däremot kan det sannolikt bero på andra orsaker också. Eftersom det troligtvis inte finns mycket cellulosa i jorden som behandlats med träda samt halm + N kan den låga enzymaktiviteten bero på att mikrosamhällena i de jordarna inte har den genetiska kapaciteten att producera BG eftersom det finns låg tillgänglighet på cellulosa där i vanliga fall. Mikrosamhällena har därför inte utvecklats genetiskt att ha kapaciteten att producera BG vilket betyder att enzymaktiviteten av BG blev låg i de jordarna (Piton et al. 2020). Att jorden som har haft halm + N har låg aktivitet av BG kan bero på att halm består till största del av lignin från det torkade strået (del Rio et al. 2013). Det är mycket svårt för hydrolytiska enzym (till exempel BG) att bryta ner lignin eftersom molekylerna är så komplex (Eriksson et al. 2019, kapitel 4). Det kanske är därför mer fördelaktigt för mikroberna som lever i den jorden att producera oxidativa enzymer eftersom de kan lättare bryta ner lignin och därav producerar de mikroberna inte lika mycket BG (Wang et al. 2018).

Jordarna som hade behandlats med mineralgödsel hade större skillnad i enzymaktivitet av BG i förhållande till jorden med vatten som substrat än de andra substraten. Det kan förklaras med att mikroberna i den jorden behövde organiskt kol och producerade därför BG för att kunna tillgodogöra sig det från marken. I  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  finns det inte kol vilket betyder att den jorden inte får tillräckligt med organiskt kol till mikroberna. C/N kvoten blir mycket låg eftersom  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  förser jorden med mycket kväve men inte kol vilket kan betyda att mikroberna producerade enzymet för att tillgängliggöra organiskt kol från material i marken till sig själva (USDA, 2014; Widdig et al. 2019).

Enzymaktiviteten för jordarna som behandlats med grüngödsling och flytgödsel hade också hög enzymaktivitet av BG. Eftersom dessa jordar behandlas med organiskt material kan man anta att de får gott om organiskt kol i form av cellulosa vid gödslingstillfället. Då skulle man kunna anta att enzymaktiviteten av BG skulle vara låg eftersom de har redan tillgång på organiskt kol. Men eftersom jorden var hämtad precis innan nästa gödslingstillfälle var det länge sedan de fick tillförsel av organiskt material. Det kan betyda att de var hungriga på kol för energiproduktion vilket resulterar i hög enzymaktivitet av BG. Dessutom kan man anta att mikroberna i dessa jordar har god genetisk kapacitet att producera BG eftersom de behöver bryta ner organiskt kol från cellulosan som tillförs (Piton et al. 2020).

Det är möjligt att mikrober producerar enzym både när det finns god tillgång på material som kan brytas ner till näring och när de är begränsade på näring, men på grund av olika anledningar. Att de producerar enzym när det finns gott om material kan bero på att de vill tillgodose sig all näring som finns tillgänglig och att de producerar enzym när det finns dåligt om näring för mikrosamhället kan bero på att de vill försöka få tag på all energi de kan hitta i omgivningen för att tillgodose sina näringsbehov.

Enligt den statistiska analysen som genomfördes kan man utläsa i tabell 2 och 3 att det finns en statistisk signifikans för resultaten där BG har varit enzymsubstratet, både beroende på experimentdag och behandlingstyp vilket gör resultaten trovärdiga.

### 4.2.3 N-acetylglutamat

Resultatet i enzymaktiviteten av NAG var att det var låg enzymaktivitet för alla jordar och substrat. Det kan se ut som att det var högre enzymaktivitet i jorden som behandlats med mineralgödsel och träda men felstaplarna är väldigt höga så resultatet är svårt att tyda. Att det var mycket låg aktivitet av NAG kan bero på att NAG är ett enzym som används för att tillgängliggöra organiskt kväve främst från kitin som finns i svampars cellväggar (Wen & Kellum 2012). Att enzymaktiviteten var låg kan därför tyda på att det inte fanns mycket svamp i jordarna som provtogs. I jordbruksmark brukar det vanligtvis inte finns särskilt mycket svamp eftersom jorden bearbetas vilket betyder att man förstör svamparnas hyfer (Hydbom 2017). I ramförsöket använder de sig också av jordbearbetning vilket kan betyda på att det blir en otrevlig miljö för svampar att leva i. Om det finns lite svampar i jorden behöver inte mikroberna producera NAG eftersom det är energikrävande och de får

inte tillbaka någon energi i form av nedbrutet organiskt kväve. Det kan förklara den låga enzymaktiviteten av NAG i alla jordar.

Trots det fanns det dock några/något fältreplikater av mineralgödselbehandlingen som fick lite högre enzymaktivitet av NAG. Det kanske beror på att mikroberna som lever i den jorden har den genetiska kapaciteten att bryta ner kväve eftersom de får ofta tillförsel av kväve från nitraten i  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Piton et al. 2020).

Enligt den statistiska analysen som gjordes kan man utläsa att resultaten från NAG är inte statistiskt signifikanta både beroende på experimentdag och gödselbehandling (tabell 2 och 3). Resultaten beror därför troligtvis på naturlig varians och blir därför inte särskilt trovärdiga. Det kan förklara de stora felstaplarna i figur 13.

### 4.3 Felkällor

Under experimentets gång kan en del felkällor ha uppstått som påverkade resultatet. I och med att alla delar av experimentet genomfördes för första gången av en student, jag, som inte har arbetat självständigt i labb tidigare kan små misstag ha begåtts i metod som kan resultera i felaktiga resultat. Det kan handla om misstag vid pipettering på grund av ovana eller okunskap kring vad som är relevant att mäta inom experimentet, till exempel vattenhalt.

En annan felkälla i detta experiment kan vara att plattläsningsmaskinen inte mätte precis i brunnarna i fluoresensmätningen. Eftersom 96-hålsplattorna inte passade perfekt i inmatningsdelen av SPARK kan vissa 96-hålsplattorna ha hamnat mer till vänster ibland och mer till höger under andra mätningar. Detta kan ha påverkat resultatet från SPARK i och med att fluorescensstrålen kanske hamnade på precis samma ställe under varje mätning.

Om man tittar på figur 11, 12 och 13 kan man utläsa att standardfelet är ganska stort. Det betyder att det fanns mätvärden som skilde sig åt en del vilket kan betyda att resultaten är svårtolkade. Efter den statistiska analysen kan man utläsa att många delar av resultaten är av signifikans vilket ökar resultatets trovärdighet, men vissa resultat har inte statistisk signifikans och blir därför mer svårtolkade och mindre trovärdiga.



## 5. Slutsatser

Detta experiment undersökte effekten på jordens mikrobiella respiration och enzymaktivitet vid olika gödselbehandlingar och tillsats av substrat. Experimentet undersökte även om det finns en koppling mellan respirationen och enzymaktiviteten beroende på tillförsel av olika substrat. Till sist skulle experimentet och uppsatsen utvärdera om experimentet är en bra metod för att mäta substratinducerad enzymaktivitet.

Resultaten visade att det fanns en skillnad mellan olika gödselbehandlingars respiration och enzymaktivitet men att det inte fanns en tydlig skillnad av respiration och enzymaktivitet mellan substraten. Det kan bero på att det var för låg koncentration kol i substraten för att de skulle ha en påverkan på mikrobernas aktivitet som skulle resultera i att se en skillnad i respiration och enzymaktivitet mellan jordarna. I och med att det inte fanns några tydliga mätbara skillnader i enzymaktivitet mellan substraten kan man dra slutsatsen att denna metod och under de rådande omständigheterna inte var optimal för att utläsa substratinducerad enzymaktivitet.

Resultaten visade att det fanns skillnader i respiration och enzymaktivitet främst mellan jordarna som haft gödselbehandling med organiskt material och de utan organiskt material. Det kan tyda på att tillgängligheten av organiskt material är av betydelse för mikrobiell aktivitet. Skillnaderna i mikrobiell aktivitet mellan de olika behandlingstyperna kan också innebära att det finns olika mikrobiella samhällen med olika kapacitet till biokemiska reaktioner beroende på vilken miljö de lever i. De olika förmågorna att producera de undersökta enzymerna tyder på en funktionell diversitet mellan mikrosamhällena i de jordar med olika gödselbehandlingar som undersöktes i detta experiment. Till exempel verkar det som att jordarna som har haft låg tillgång på fosfor producerar mer aP för att tillgängliggöra sig detta näringsämne och att jordar som inte har haft organiskt material som gödselbehandling har lägre mikrobiell aktivitet när det kommer till respiration.

Ett annat sätt att beskriva denna slutsats är att resultaten visade att mikroberna i jorden var mer aktiva beroende på vilken typ av gödsel som hade använts, snarare än vilka näringsämnen som tillsattes. Det visade sig att jordens naturliga egenskaper

och innehåll spelar en större roll för mikrobernas aktivitet än de specifika näringsämnen, iallafall i den koncentrationen av näringsämnen som användes.

Genom att besvara frågeställningarna kan vi komma närmare till att förstå de olika mikrobiella processerna i jorden och hur de påverkas av sin omgivning samt vilken effekt de har på sin omgivning. Att forska om mikrober och markhälsa är av betydelse för att tackla frågor om framtida matförsörjning och klimatförändringar på grund av markens påverkan på miljön och matproduktionen.

## Referenser

- Alshami, A. & Varon, J. (2024). Acid Phosphatase. I: *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556039/> [2024-04-10]
- Avantor *Vattenrenare, ultrarent vatten, Milli-Q® Reference* (u.å.). VWR. <https://se.vwr.com/store/product/2983107/vattenrenare-ultrarent-vatten-milli-q-reference> [2024-05-17]
- Berg, J., Gatto Jr, G., Stryer, J., Tymoczko, J. (2019). *Biochemistry ninth edition*. New York: W.H Freeman and Company.
- Britannica (2024) *Enzyme | Definition, Mechanisms, & Nomenclature* | <https://www.britannica.com/science/enzyme> [2024-05-17]
- Britannica (2024) *Glucose | Definition, Structure, & Function* | <https://www.britannica.com/science/glucose> [2024-05-17]
- Britannica (2024) *Hydrolase | Protein-cleaving, Hydrolysis & Catalysis* | <https://www.britannica.com/science/hydrolase> [2024-05-17]
- Britannica (2024) *Vitamin C | Definition, Structure, Benefits, & Facts* | <https://www.britannica.com/science/vitamin-C> [2024-05-17]
- Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S. & Potts, J.M. (2003). A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), 3593–3599. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003>
- Campbell, N., Cain, M., Minorsky, P., Orr, R., Urry, L., Wasserman, S. (2021). *Biology – a global approach*. Essex: Pearson Education Limited.
- Chandel, N.S. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13 (5), a040535. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>
- Chazot, C., Steiber, A.L. & Kopple, J.D. (2022). Chapter 26 - Vitamin metabolism and requirements in chronic kidney disease and kidney failure. I: Kopple, J.D., Massry, S.G., Kalantar-Zadeh, K., & Fouque, D. (red.) *Nutritional Management of Renal Disease (Fourth Edition)*. Academic Press. 413–465. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818540-7.00043-4>
- Coleman, D.C., Reid, C.P.P. & Cole, C.V. (1983). Biological Strategies of Nutrient Cycling in Soil Systems. I: MacFadyen, A. & Ford, E.D. (red.) *Advances in Ecological Research*. Academic Press. 1–55. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60107-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60107-5)
- del Rio, J., Gutiérrez, A., Matrínez, Á., Prinsen, P., Ralph, J., Rencoret, J. (2013). Structural Characterization of Wheat Straw Lignin. Evidence for a Novel Monomer in Grasses. *IRNAS-CSIC, CIB-CSIC, University of Wisconsin*. [JCdelRio-17ISWFPC-proceeding.pdf \(csic.es\)](https://www.csic.es/medias/contenidos/17ISWFPC-proceeding.pdf)

- Eriksson, J, Dahlin, S, Nilsson, I, Simonsson, M. (2019). *Marklära*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Fogelfors, H. (2020). *Våt mat – odling av åker- och trädgårdsgrödor*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Gayán, A., Borah, P., Nath, D. & Katakí, R. (2023). Soil microbial diversity, soil health and agricultural sustainability. I: *Sustainable Agriculture and the Environment*. Elsevier. 107–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90500-8.00006-3>
- Hydbom, S. (2017). *Tillage practices and their impact on soil organic carbon and the microbial community*. (Doctoral Thesis (compilation)). Lund University, Faculty of Science, Centre for Environmental and Climate research (CEC) & Department of Biology.
- Kousar, S., Ahmed, F., Pervaiz, A. & Bojnec, Š. (2021). Food Insecurity, Population Growth, Urbanization and Water Availability: The Role of Government Stability. *Sustainability*, 13 (22), 12336. <https://doi.org/10.3390/su132212336>
- Mouchet, M.A., Villéger, S., Mason, N.W.H. & Mouillot, D. (2010). Functional diversity measures: an overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. *Functional Ecology*, 24 (4), 867–876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01695.x>
- New South Wales Government (2017). *Plant nutrients in the soil*. <https://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/soils/soil-testing-and-analysis/plant-nutrients> [2024-05-18]
- Piton, G., Foulquier, A., Martínez-García, L.B., Legay, N., Hedlund, K., Martins da Silva, P., Nascimento, E., Reis, F., Sousa, J.P., De Deyn, G.B. & Clement, J.C. (2020). Disentangling drivers of soil microbial potential enzyme activity across rain regimes: An approach based on the functional trait framework. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107881. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107881>
- Powelson, D.S. (2020). Soil health&#8212;useful terminology for communication or meaningless concept? Or both? *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 7 (3), 246. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2020326>
- Ramesh, T., Bolan, N.S., Kirkham, M.B., Wijesekara, H., Kanchikerimath, M., Srinivasa Rao, C., Sandeep, S., Rinklebe, J., Ok, Y.S., Choudhury, B.U., Wang, H., Tang, C., Wang, X., Song, Z. & Freeman Ii, O.W. (2019). Soil organic carbon dynamics: Impact of land use changes and management practices: A review. I: *Advances in Agronomy*. Elsevier. 1–107. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.02.001>
- Reitzer, L. (2009). Amino Acid Synthesis. I: Schaechter, M. (red.) *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Academic Press. 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00063-8>
- Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L. & Zak, D.R. (2002). The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34 (9), 1309–1315. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00074-3)
- Schnecker, J., Baldaszti, L., Gündler, P., Pleitner, M., Sandén, T., Simon, E., Spiegel, F., Spiegel, H., Urbina Malo, C., Zechmeister-Boltenstern, S. & Richter, A. (2023). Seasonal dynamics of soil microbial growth, respiration, biomass, and carbon use efficiency in temperate soils. *Geoderma*, 440, 116693. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116693>
- Sengupta, S., Datta, M. & Datta, S. (2023).  $\beta$ -Glucosidase: Structure, function and industrial applications. I: *Glycoside Hydrolases*. Elsevier. 97–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91805-3.00004-6>
- SMHI (2024). Oktober 2023 - Lokalt i norr kallaste oktober sedan 1992 <https://www.smhi.se/klimat/klimatet-da-och-nu/manadens-vader-och-vatten-sverige/manadens-vader-i-sverige/oktober-2023-lokalt-i-norr-kallaste-oktober-sedan-1992-1.200393> [2024-05-18]

- Sveriges Lantbruksuniversitet (2024). *Sveriges mest kända jordbruksförsök?. SLU.SE.*  
<https://www.slu.se/forskning/kunskapsbank/ekologi/sveriges-mest-kanda-jordbruksforsok2/> [2024-05-17]
- USDA- United States Department of Agriculture (2014). *Soil Respiration*. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.  
<https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-10/Soil%20Respiration.pdf>
- Wang, X., Yao, B. & Su, X. (2018). Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (11), 3373. <https://doi.org/10.3390/ijms19113373>
- Wen, X. & Kellum, J.A. (2012). N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase (NAG). I: Vincent, J.-L. & Hall, J.B. (red.) *Encyclopedia of Intensive Care Medicine*. Springer. 1509–1510. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00418-6\\_305](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00418-6_305)
- Widdig, M., Schleuss, P.-M., Weig, A.R., Guhr, A., Biederman, L.A., Borer, E.T., Crawley, M.J., Kirkman, K.P., Seabloom, E.W., Wragg, P.D. & Spohn, M. (2019). Nitrogen and Phosphorus Additions Alter the Abundance of Phosphorus-Solubilizing Bacteria and Phosphatase Activity in Grassland Soils. *Frontiers in Environmental Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00185>

# Populärvetenskaplig sammanfattning

Mikrober är mikroskopiskt små organismer som lever i jorden och deras egenskaper påverkas av vilken typ av jord de lever i samt vilken typ av näring de får i sig. Dessa mikrober spelar en avgörande roll för växters och markens hälsa genom att bryta ner organiskt material och frigöra näringsämnen. Detta gör de med hjälp av enzymer och när de bryter ner näring respirerar de. I mitt kandidatarbete undersökte jag hur mikrobers respiration och enzymaktivitet påverkas av olika gödselbehandlingar och tillsatta näringsämnen i jordbruksmark.

För att ta reda på detta använde jag jordprover från långsiktiga odlingsförsök från Sveriges lantbruksuniversitet, där olika typer av gödsel, som konstgödsel och organiskt gödsel, har använts i många år. Jag tillsatte olika näringsämnen till jordproverna och mätte sedan mikrobernas aktivitet genom att studera deras enzymaktivitet och respiration.

Resultaten visade att mikroberna i jorden var mer aktiva beroende på vilken typ av gödsel som hade använts, snarare än vilka näringsämnen jag tillsatte. Det visade sig att jordens naturliga egenskaper och innehåll spelar en större roll för mikrobernas aktivitet än de specifika näringsämnena, iallafall i den koncentrationen av näringsämnen som jag använde. Detta innebär att valet av gödsel kan ha stor betydelse för jordens hälsa och bör beaktas noggrant vid jordbruksplanering.

Min studie fungerar också som ett pilotförsök för att utveckla metoder att mäta mikrobiell aktivitet i jord. Detta är viktigt för framtida forskning, som kan leda till bättre förståelse och nya metoder för att förbättra markhälsa och växtodling. En förbättringsmöjlighet med denna metod skulle kunna vara att tillsätta näringsämnen i högre koncentration och ha mer frekventa provtagningar för att tydligare se hur näringsämnena påverkar mikrobernas aktivitet.

Sammanfattningsvis visar mitt arbete att mikroberna i jorden påverkas av den gödsel som används, och att detta kan ha långsiktiga effekter på markens bördighet och hållbarhet. Det är en påminnelse om att även de minsta organismerna kan ha stor betydelse för jordbruket och vår miljö.



# Tack

Jag vill rikta ett tack till min handledare, Karolina Jörgensen, för all hjälp, stöttning och vägledning under mitt kandidatarbete. Jag vill även tacka min biträdande handledare, Anke Hermann, för all hjälp och tips om MicroResp<sup>TM</sup> och ramförsöket. Till sist vill jag även tacka Tilda Wassén, labbassistent i labbet där jag genomförde experimenten, för gott sällskap och stöttning under min tid i labbet.



# Bilaga 1

## Förberedelser

De jordar som användes i detta experiment hämtades under hösten 2023 från ramförsöken på Ultuna, sållades till 2 mm storlek och förvarades i  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jordarna som användes var från sex olika behandlingar och hade tre fältreplikater, det vill säga totalt 18 jordprover. Behandlingarna var: träda (A),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (C), halm + N (G), gröngödsling (H), flytgödsel (J) och slam (O).

I detta experiment användes glukos, l-alanin och askorbinsyra som substrat. Vilka koncentrationer som behövdes för experimentet utgick ifrån hur många milligram kol per gram jord som behövdes i varje koncentration. Skillnaden i milligram kol per gram jord behövdes för att se vid vilken minsta lägsta koncentration som MicroResp<sup>TM</sup> och enzymanalysen fortfarande gav ett resultat.

Under testgenomgången av experimentet bestämdes det att det skulle finnas; 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 och 0,5 mg C/ g jord för glukos och askorbinsyra. För l-alanin: 1,75, 1,5, 1,25, 1, 0,75 och 0,5 mg C/g jord.

Efter uträkning kom jag fram till att det behövdes 3,75 g glukos, 0,906 g l-alanin, 3,667 g askorbinsyra för spädningen. Nedanstående tabell visar hur koncentrationerna som behövdes för att få respektive mängd mg C/g jord.

*Tabell 4. Mg C/g jord för mg substrat/brunn för glukos*

Mg C/g jord	Mg substrat/brunn (35 ul)
7	250,0
6	214,2857143
5	178,5714286
4	142,8571429
3	107,1428571
2	71,42857143
1	35,71428571
0,5	17,85714286

*Tabell 5. Mg C/g jord för mg substrat/brunn för askorbinsyra*

Mg C/g jord	Mg substrat/brunn (35 ul)
7	244,44
6	209,5238095
5	174,6031746
4	139,6825397
3	104,7619048
2	69,84126984
1	34,92063492
0,5	17,46031746

*Tabell 6. Mg C/g jord för mg substrat/brunn för l-alanin*

Mg C/g jord	Mg substrat/brunn (35 ul)
1,75	62,42
1,5	51,78571429
1,25	43,1547619
1	34,52380952
0,75	25,89285714
0,5	17,26190476

Substraten uppvägdes på våg och överfördes till glasbägare. Därefter pippeterades 10 ml milli-Q-vatten till glasbägarna och blandades med magnetorrörare och värme. Sedan överfördes den 10 ml upplösta lösningen till 15 ml volymetrisk flaska. Den resterande volymen till 15 ml pippeterades med milli-Q-vatten till röret med pasteurpipett. 15 ml lösningen i flaskan var av den högsta koncentrationen av substratet. Med hjälp av ekvationen  $c_1v_1=c_2v_2$  räknade jag ut hur mycket milli-Q-vatten som behövdes spädas med av de resterande koncentrationerna och använde mig av den högsta koncentrationen som bas.

När alla koncentrationer var färdigspädda överfördes de till 25 ml plastflaskor, märktes med innehåll och datum och förvarades i kylan tills de behövdes för experimentet.

## Bilaga 2

### **MicroResp™**

Första steget under denna metod var att ta fram de jordar som skulle mätas från frysen för upptining. Sex jordar från ramförsöken med olika behandling upptinades. Jordarna som användes i experimentet var: träda (A),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (C), halm + N (G), grön gödsling (H), flytgödsel (J) och slam (O). Varje jord hade tre fältreplikater, det vill säga 18 jordar totalt.

Varje jordplatta skulle ha sex olika jordar i sig enligt plate set up, se figur 4. Innan jordplattorna blev fyllda med jord vägdes plattorna och resultatet noterades. Därefter fylldes plattorna enligt plate set up, vägdes igen och resultatet noterades. Totalt fylldes 12 jordplattor. Alla jordplattor märktes med vilka jordar den innehöll samt en bokstav och nummer för att hålla bättre koll på dem, se figur 5 för markeringen på jordplattorna.

Efter ifyllningen av jord överfördes parafilm över plattorna, de blev inlagda i öppna plastpåsar med fuktig trasa och inkuberades på 25 grader i inkubationsskåpet i en vecka.

En vecka senare skedde första mättillfället. Vid mätning av MicroResp™ behövs: jordplatta med jord i, platta med detektionsgel, gummiplatta och metallklämmor. Se figur 7 för alla delar ihopsatta.

35 µl av de olika substraten tillsattes i alla jordplattor enligt plate set up, se figur 6. Alla kolsubstrat hade den lägsta koncentrationen från testgenomgången; 0,5 mg C/g jord. Gummiplattorna, metallklämmorna och detektionsgelsplattorna sattes på jordplattorna och inkuberades i inkubationsskåpet i 25 grader under sex timmar. Därefter mättes absorbansen av detektionsgelen i fluorescens/absorbans spektrofotometern SPARK och resultaten infogades i en MicroResp-excel-fil tillsammans med vad jordplattorna vägde med och utan jord samt jordarnas vattenhalt. Foton togs på detektionsgelen för att dokumentera färgskiftningen på plattorna. Ju gulare en brunn var desto mer hade jorden respirerat i den brunnen.

Jordplattorna lades i plastpåsar med fuktigt papper i och inkuberades i 25 grader. Inget mer kolsubstrat tillsattes under experimentets gång. Samma procedur upprepades två gånger ytterligare, med en veckas mellanrum.

## Bilaga 3

### Enzymanalys

Enzymsubstraten togs ut ur frysen och inkapslades i aluminiumfolie för att tina, i cirka en timme. Två 96-brunnsplattor behövde runt 8 ml enzymsubstrat, det vill säga ett förberett fryst rör enzymsubstrat. Totalt togs tre rör betaglukosidas (BG), tre rör acid phosphatase (aP), tre rör N-acetylglutamatsyntas (NAG) och ett rör 4-methylumbelliferone (MUB) fram för varje mättillfälle.

Tre plattor av jordplattorna togs fram från inkubationsskåpet för enzymanalys. 600 µl natriumacetat, buffertlösning, tillsattes i varje brunn. Plattorna omskakades med vortex och 300 µl pippeterades ut systematiskt med tre pippettblandningar från varje brunn till ependorfrör. Brunnarna med samma behandling och substrat pippeterades till samma ependorfrör, det vill säga tre brunnar = 900 µl jordlösning totalt i varje ependorfrör. Totalt blev det 72 ependorfrör (24 prover \* 3 fältreplikat). Alla ependorfrör märktes med jord och substrat, se figur 18. Därefter späddes jordlösningarna i 5 ml natriumacetat i 15 ml falconrör. 50 µl från ependorfrören överfördes efter vortexomrörning till falconrören som märktes med jord och substrat, se figur 17.

18 96-brunnsplattor togs fram, 3 st/enzymsubstrat \* 2 mättillfällen \* 3 fältreplikat, se figur 15. 200 µl från falconrören överfördes till 96-brunnsplattorna enligt plate set up, se figur 9. I quencingbrunnarna överfördes 200 µl av jordlösningarna med vatten som substrat. I MUB-brunnarna överfördes 200 µl natriumacetat.

I de plattor som skulle mätas vid  $t_0$  tillsattes 10 µl 0,5 M NaOH direkt. Sedan överfördes 50 µl av respektive enzymsubstrat till de plattorna som skulle mäta just det enzymsubstratet. Totalt 6 plattor hade samma enzymsubstrat. I alla quenching- och MUB-brunnar tillsattes 50 µl MUB 4,5 i stället för annat enzymsubstrat.

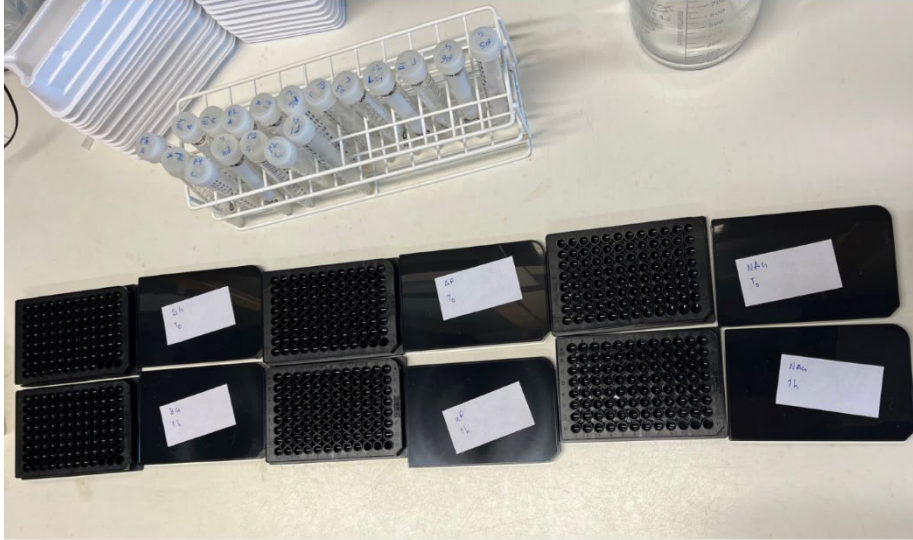
Alla 96-brunnsplattor märktes med vilket enzymsubstrat som tillsattes samt  $t_0$ /tidpunkt då enzymsubstratet tillsattes.  $t_0$ -plattornas flourecens mättes direkt i SPARK. Inställningarna sattes under varje mättillfälle på set gain:74 efter att första

plattan under första mättillfället fick optimal gain:74. Excitationsvåglängden var inställd på 365 nm och emissionsvåglängden på 450 nm.

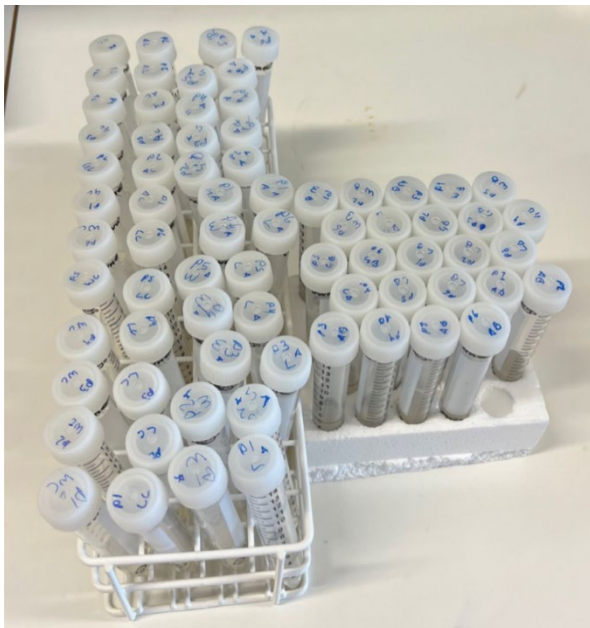
30 minuter efter överföring av enzymsubstrat tillsattes 10  $\mu$ l NaOH i de resterande plattorna och fluorescence mättes därefter. De plattorna hade inkuberats i 30 minuter i mörker med locket till 96-brunnsplattorna. Samma procedur upprepades vid ytterligare två mättillfällen, med en veckans mellanrum.



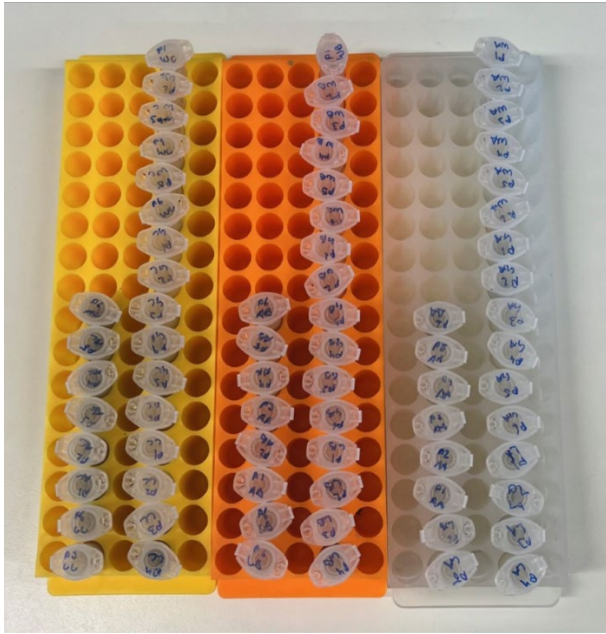
Figur 15. 18 stycken 96-brunnsplattor med markering för vilket enzymsubstrat som plattan innehåller samt tid för mätning.



*Figur 16. 6 stycken 96-brunnsplattor med BG, aP, NAG för både t0 och inkubering 30 minuter.*



*Figur 17. Falconrör med utspädda jordprover från jordplattorna.*



*Figur 18. 72 stycken ependorfrör med jordlösning.*



## Bilaga 4

Tabell 7. ANOVA för MicroResp<sup>TM</sup> med kolsubstrat askorbinsyra, dag 1

Dag 1

Askorbinsyra

### SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	9,822801	3,274267	0,63052
Träda	3	7,256465	2,418822	0,461168
Flytgödsel	3	14,22442	4,741473	0,437679
Gröngödsel	3	16,33095	5,443649	1,638042
Slam	3	16,65686	5,552286	1,163983
Halm+N	3	13,95555	4,651849	0,186876

### ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	23,31757	5	4,663514	6,192877	0,004621	3,105875
Inom grupper	9,036537	12	0,753045			
Totalt	32,35411	17				

Tabell 8. ANOVA för MicroResp<sup>TM</sup> med kolsubstrat askorbinsyra, dag 7

Dag 7

Anova: En faktor

Askorbinsyra

### SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	1,757107	0,585702	0,000196
Träda	3	1,358437	0,452812	0,003244
Flytgödsel	3	1,219029	0,406343	0,02136
Gröngödsel	3	1,106458	0,368819	0,021145
Slam	3	1,385455	0,461818	0,044666
Halm+N	3	1,580674	0,526891	0,012565

ANOVA						
<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,093672	5	0,018734	1,089458	0,414544	3,105875
Inom grupper	0,206353	12	0,017196			
<b>Totalt</b>	<b>0,300026</b>	<b>17</b>				

Tabell 9. ANOVA för MicroResp<sup>TM</sup> med kolsubstrat askorbinsyra, dag 14

DAG 14 Anova: En faktor

Askorbinsyra

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	0,925655	0,308552	0,004213
Träda	3	1,049939	0,34998	0,058671
Flytgödsel	3	0,506795	0,168932	0,010828
Gröngödsel	3	0,41838	0,13946	0,008538
Slam	3	0,333506	0,111169	0,003565
Halm+N	3	0,474247	0,158082	0,003018

ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,145013	5	0,029003	1,958921	0,157719	3,105875
Inom grupper	0,177665	12	0,014805			
<b>Totalt</b>	<b>0,322678</b>	<b>17</b>				

Tabell 10. ANOVA för MicroResp<sup>TM</sup> med kolsubstrat glukos, dag 1

Dag 1 Anova: En faktor

Glukos

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	4,353018	1,451006	0,349822
Träda	3	3,692955	1,230985	0,058101
Flytgödsel	3	17,77168	5,923892	1,961166
Gröngödsel	3	19,32951	6,44317	3,287757
Slam	3	17,45315	5,817718	2,779423
Halm+N	3	9,897533	3,299178	0,086788

ANOVA						
<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	82,87774	5	16,57555	11,66874	0,000285	3,105875
Inom grupper	17,04611	12	1,420509			
<b>Totalt</b>	<b>99,92386</b>	<b>17</b>				

Tabell 11. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat glukos, dag 7

Dag 7 Anova: En faktor

Glukos

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	1,142792	0,380931	0,003996
Träda	3	0,627128	0,209043	0,000991
Flytgödsel	3	0,751787	0,250596	0,010842
Gröngödsel	3	0,699494	0,233165	0,00111
Slam	3	1,169722	0,389907	0,01671
Halm+N	3	0,56616	0,18872	0,001078

ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,115693	5	0,023139	3,997732	0,022876	3,105875
Inom grupper	0,069455	12	0,005788			
<b>Totalt</b>	<b>0,185149</b>	<b>17</b>				

Tabell 12. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat glukos, dag 14

Dag 14 Anova: En faktor

Glukos

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	0,605037	0,201679	0,009854
Träda	3	0,336568	0,112189	0,000481
Flytgödsel	3	0,446996	0,148999	0,00335
Gröngödsel	3	0,538611	0,179537	0,001077
Slam	3	0,523698	0,174566	0,000754
Halm+N	3	0,417458	0,139153	0,00028

ANOVA						
<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,01551	5	0,003102	1,178263	0,375108	3,105875
Inom grupper	0,031592	12	0,002633			
<b>Totalt</b>	<b>0,047102</b>	<b>17</b>				

Tabell 13. ANOVA för MicroResp<sup>TM</sup> med kolsubstrat l-alanin, dag 1

Dag 1 Anova: En faktor

L-alanin

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	1,352547	0,450849	0,002825
Träda	3	1,216776	0,405592	0,001351
Flytgödsel	3	6,225339	2,075113	0,665967
Gröngödsel	3	5,257031	1,752344	0,0165
Slam	3	6,482958	2,160986	0,18048
Halm+N	3	4,048184	1,349395	0,127812

ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	9,132796	5	1,826559	11,01514	0,000375	3,105875
Inom grupper	1,989872	12	0,165823			
<b>Totalt</b>	<b>11,12267</b>	<b>17</b>				

Tabell 14. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat l-alanin, dag 7

Dag 7 Anova: En faktor  
L-alanin

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	0,616378	0,205459	0,000344
Träda	3	0,4074	0,1358	0,001638
Flytgödsel	3	0,359766	0,119922	0,003689
Gröngödsel	3	0,314096	0,104699	0,000745
Slam	3	0,217319	0,07244	0,000136
Halm+N	3	0,628526	0,209509	0,00978

ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,046013	5	0,009203	3,380634	0,038915	3,105875
Inom grupper	0,032665	12	0,002722			
Totalt	0,078678	17				

Tabell 15. ANOVA för MicroResp™ med kolsubstrat l-alanin, dag 14

Dag 14 Anova: En faktor  
L-alanin

SAMMANFATTNING

<i>Grupper</i>	<i>Antal</i>	<i>Summa</i>	<i>Medelvärde</i>	<i>Varians</i>
Ca(NO3)2	3	0,219097	0,073032	1,25E-05
Träda	3	0,053116	0,017705	0,000669
Flytgödsel	3	0	0	0
Gröngödsel	3	0	0	0
Slam	3	0	0	0
Halm+N	3	0,103605	0,034535	0,000906

ANOVA

<i>Variationsursprung</i>	<i>KvS</i>	<i>fg</i>	<i>MKv</i>	<i>F</i>	<i>p-värde</i>	<i>F-krit</i>
Mellan grupper	0,012673	5	0,002535	9,581755	0,000714	3,105875
Inom grupper	0,003174	12	0,000265			
Totalt	0,015847	17				

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.