



Sveriges lantbruksuniversitet

Markbiologisk uppföljning i åkermark
En undersökning av fosfolipidfettsyror (PLFA)
som möjlig mikrobiologisk indikator

*Monitoring and assessment of agricultural
soils using phospholipid fatty
acid (PLFA) analysis*

Gunnar Börjesson, Lorenzo Menichetti, Thomas Kätterer

Institutionen för mark och miljö
Department of Soil and Environment

Rapport 7
Report

Swedish University of Agricultural Sciences

Uppsala 2010
ISBN 978-91-576-9010-4

Innehållsförteckning

Abstract	4
Sammanfattning	5
Introduktion	6
Material och metoder	8
Försöksyta	8
Jordprovtagning	9
Fosfolipidfettsyra (PLFA)-analyser	9
PLFA-nomenklatur	11
Övriga analyser	11
Statistiska analyser	11
Resultat	12
Diskussion	19
Jämförelser med andra metoder och mätningar	22
Slutsatser	27
Referenser	28

Abstract

Monitoring and assessment of agricultural soils has become requested as means to detect changes in soil quality. Among possible microbial indicators for monitoring soil quality, the most common methods include microbial biomass, respiration, N mineralization and a community profiling method. Among the latter, the most used seem to be DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), PLFA (phospholipid fatty acids), and CLPP (community level physiology profile) analyses. Here we report results from an investigation of the PLFA analysis for the possible use as an indicator for monitoring soil quality.

Soil samples were taken 2009 in the Ultuna soil organic matter field experiment, which was started in 1956 for investigating the long-term effect of mineral N fertilizers and different organic amendments on crop yields, soil organic matter changes and soil physical properties. PLFAs were extracted from top- and subsoils in ten treatments. PLFA concentrations were compared to other variables, such as total carbon, total nitrogen, pH and respiration, but also to other results reported earlier from the same experiment.

Total PLFAs in topsoil samples (0-20 cm) were highest in the sewage sludge (O) treatment, which was almost reflected in subsoil samples, although the highest mean value among those samples was found for the farmyard manure (J) treatment. A good correlation was observed between total PLFAs in topsoil samples and total carbon, but total PLFAs were even better correlated with total nitrogen ($r=0.81$; $p<0.0001$). Subsoil samples (27-40 cm depth) reflected topsoil samples for total PLFAs, but the individual PLFAs revealed that the composition of the microbial communities were entirely different. The presence of cyclic fatty acids in the sewage sludge treatment indicated some kind of stress for gram-negative bacteria, probably caused by heavy metals, although a negative effect of the sewage sludge application could not be seen in other ways, e.g. crop yield.

In conclusion, the PLFA analysis can give valuable information about the microbial community in soil samples. It can be used in a monitoring programme, although the recommendation is that it would be preferable to combine the PLFA analysis with other methods, for example CLPP, in order to determine trends and changes of microbial communities and activities in soils.

Sammanfattning

Markbiologisk uppföljning i åkermark har internationellt blivit uppmärksammas för att kunna upptäcka förändringar markens kvalitetsegenskaper i ett tidigt skede. Möjliga mikrobiella indikatorer för uppföljning inkluderar bl. a. mätning av mikrobiell biomassa, respiration, kväveminalisering och en metod för att mikrobiell populationsprofil. Ofta föreslagna analysmetoder bland de senare är DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), PLFA (fosfolipidfettsyror), och CLPP (community level physiology profile). I denna sammanställning rapporterar vi resultat från en PLFA-analys av jord från det s.k. ramförsöket på Ultuna, som startades 1956 för att undersöka effekter av mineralkväve och olika organiska gödselmedel på skörd, organiskt material och markfysikaliska egenskaper.

Jordprover togs hösten 2009 och PLFA extraherades från matjords- och alvprover i tio av de femton försöksleden. Innehållet av PFLA jämfördes med andra variabler, som total C, total N, pH och respiration, men också med andra resultat som tidigare rapporterats från samma försök.

Total PLFA i matjorden (0-20 cm) var högst i de rötslamsbehandlade försöksrutorna, vilket också motsvarades av höga nivåer även i alvproverna, även om det allra högsta medelvärdet bland dessa prover fanns i stallgödselledet. En stark korrelation kunde observeras mellan total PLFAs i matjordsproverna och total C, men total PLFA var ännu bättre korrelerat med total N ($r=0,81$; $p<0,0001$). Prover från alven (27-40 cm djup) reflekterade matjordsprovernas innehåll av total PLFA, men individuella PLFAs avslöjade att den mikrobiella populationen var helt annorlunda sammansatt. Förekomsten av cykliska fettsyror i rötslamsledet indikerar någon form av stress hos gram-negativa bakterier, förmodligen orsakad av tungmetaller, trots att en negativ effekt av rötslamstillförseln inte har kunnat iaktas på annat sätt, t. ex. på skördenivåer.

Sammanfattningsvis har PLFA-analysen visat sig kunna ge värdefull information om mikrobiella populationer i jordproven. Den kan mycket väl användas i ett program för markbiologisk uppföljning, men det är ändå önskvärt att kombinera PLFA-analysen med andra metoder, t. ex. CLPP, för att säkrare kunna fastställa trender och förändringar i mikrobiella populationer och aktiviteter i jordar.

Introduktion

Marken skall uppfylla ett stort antal miljömässiga, ekonomiska, sociala och kulturella funktioner. Den skall producera biomassa, lagra, filtrera och transformera vatten, näring och andra ämnen, utgöra en reservoar för den biologiska mångfalden, utgöra en fysisk och kulturell miljö för människor och mänskliga verksamheter, utgöra en källa för råvaror, fungera som kollager och utgöra ett arkiv för det geologiska och arkeologiska arvet (EGK 2006b).

Farhågorna för markförstöring har främst rört erosion och föroreningar, men också låga halter av organiskt material, vilket ledde till utarbetandet av ”En temainriktad strategi för markskydd” (EGK 2006a). EU-kommissionens förslag till direktiv om rambestämmelser för markskydd (EGK 2006b) har hittills bara lett fram till en resolution i november 2007 från EU-parlamentet, utan konklusioner, endast med rekommendationer för ett direktiv om hantering av organiskt avfall och en kommuniké angående bekämpning av ökenspridning.

Samtidigt har ett kontinuerligt arbete pågått på andra nivåer inom EU, bl. a. inom EU:s Joint Research Centre (JRC), vars Institute for Environment and Sustainability också omfattar en markavdelning, där man bl. a. arbetar för en databas, European Soil Data Centre (ESDAC), som ska kunna tillhandahålla alla data och informationer om europeiska marker. Detta arbete sker inom det sjunde ramprogrammet, vilket löper 2007-2014. Man arbetar också för att utveckla gemensamma procedurer och metoder för datainsamling, kvalitetssäkring och kontroll och hur data skall behandlas och lagras (JRC 2010).

Varför mäta biodiversitet? Brussaard m fl (2003) hävdar att förändringar som syns i populationsstrukturen hos mikrober och nematoder ger en tidig varning för långtgående förändringar i organiskt material, näringsstatus och markstruktur, som inte kan iakttas direkt med andra metoder. Ett tidigare större projekt inom EU:s sjätte ramprogram, ENVASSO (ENVironmental ASsessment of Soil mOnitoring), avslutades 2007 och var avsett att ge svar på frågan om vilka metoder som är lämpliga att använda för att skatta biodiversitet i jordprover. Summeringar av detta projekt har gjorts bl.a. av Morvan m fl (2007). Inom ENVASSO utgick man från ”The Soil Geographical Database”, som varit aktiv under 20 års tid. Baserat på diskussioner inom ENVASSO projektet, listade Bispo m fl (2009) tre nyckelindikatorer för att mäta biologisk markkvalitet: 1. Diversitet av dagmaskar eller enchytraeider; 2. Diversitet av hoppstjärtar (Collembola); och 3. Respiration. Den tredje faktorn, mätt antingen som syreförbrukning och/eller koldioxidavgång, skulle då betraktas som en indikator för mikrobiella processer kopplade till mineralisering. Denna lista upprepades av

Gardi m fl (2009), som prioritetsnivå 1. På prioritetsnivå 2 tog man upp nematoder och diversitet hos svampar och bakterier.

Andra har skattat värdet av mikrobiella variabler något högre. Winding m fl (2005) har listat vad man anser vara ett minimum av mätningar som bör användas som mikrobiella indikatorer: Mikrobiell biomassa, respiration, kväve-mineralisering och en "community profiling"-metod. Bland de senare nämns DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), PLFA (phospholipid fatty acids) och CLPP (community level physiological profiles). En grundligare genomgång har presenterats av Ritz m fl (2009). Man har gått igenom 183 kandidater för användning som biologiska indikatorer. Bland dessa valdes 21 ut, som man ansåg kunde motsvara lämpliga vetenskapliga och tekniska kriterier, för användning i nationella uppföljningsprogram. Bland de 13 analysmetoder som ansågs kunna användas utan vidare utvecklingsarbete var, förutom direkträkning i fält och tre andra sätt att räkna fauna (nematoder, mikroartropoder och invertebrater), fluorimetrisk assay, multipel substratinducerad respiration och sex olika T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)-analyser, samt PLFA (fosfolipidfettsyra)-analys. T-RFLP bygger på extraktion av DNA, åtföljt av amplifiering med PCR, där man använder primers för speciella grupper av intresse (Liesack och Dunfield 2004). Ritz m fl (2009) listade T-RFLP med primers utvalda för att detektera bakterier, svampar, arkéer, aktinomycceter, ammoniumoxiderare och metanogener/metanotrofer. I den lista som Ritz m fl (2009) hade gjort rankades T-RFLP för ammoniumoxiderare högst tillsammans med PLFA-analys. Man hade då beaktat flera faktorer som informationsvärde, kostnad, tid, användbarhet, reproducerbarhet osv.

Ursprungsplanen med föreliggande arbete var att jämföra användbarheten med T-RFLP och PLFA för markbiologisk uppföljning i åkermark, men p.g.a. resursbrist har arbetet hittills begränsats till PLFA-analys. Fördelen med denna teknik är att det går att få ett mått på total mikrobiell biomassa, samtidigt som den kan ge ett kvantitativt mått på andra viktiga grupper av mikroorganismer, som svampar, gram-positiva och gram-negativa bakterier, aktinomycceter, sulfatreducerande bakterier m.fl. (Tunlid och White 1992). God korrelation mellan PLFA och andra mått på mikrobiell biomassa har också konstaterats av andra (jfr flera referenser citerade av Zelles 1999). En annan fördel med metoden anses vara att fosfolipiderna snabbt bryts ner i marken, och att PLFA därför ger ett bra mått på levande biomassa (Tunlid och White 1992).

Material och metoder

Försöksyta

Långtidsförsöket med olika typer av gödselmedel, det s.k. RAM-försöket, vid Ultuna i Uppsala, startades 1956. Detaljerade beskrivningar av jordmån m.m. har gjorts av Kirchmann m fl (1994). Jorden är en mellanlera med 36,5% ler (Eutric Cambisol enligt FAO:s klassificering), ursprungligen med 1,5% total C; 0,17 % N och pH 6,6. Försöket är avsett att användas för studier av effekter på markegenskaper samt kol- och kvävedynamik. Tillförsel av organiskt material av olika typ vid varierande växtnäringsnivåer jämförs. 15 försöksled upprepas i 4 block, vilket gör 60 rutor totalt. Försöksrutorna begränsas av träramar, 2x2 m, nedsänkta i marken, med ca 10 cm av ramen liggande ovanför markytan. All skötsel sker manuellt. Alla led grundgödsas årligen med 20 kg/ha P och 38 kg/ha K med lämpligt PK-gödselmedel. Växtföljden har varit omväxlande vårstråsäd till mogen skörd och våroljeväxter skördade som grönmassa, men från och med 2000 och framåt har enbart majs odlats till grönmassa. (Kirchmann m fl 1994; Mattsson 2010).

Halten av organiskt kol i de olika behandlingarna i RAM-försöket divergerade under de 36 första åren efter experimentets början (7 behandlingar, Persson och Kirchmann 1994). Detta betyder också att effekterna kan antas vara mer eller mindre konstanta över tiden, vilket gör att effekterna av de olika behandlingarna kan jämföras med olika metoder, även om proverna är tagna vid olika tidpunkter (jfr. exempel kolhalter i figur 1). Detta gör att jämförelser kan göras med andra metoder för mätning av mikrobiella variabler som tidigare har använts på RAM-försöket, t. ex. fumigering och färgning med fluorescein-acetat (Schnürer m fl 1985), olika analyser av kvävefixeringsförmåga (Mårtensson och Witter 1990), ATP, fumigering, ninhydrin-N (Witter m fl 1993), ergosterol och dubbelsträngad DNA (Marstorp m fl 2000), substratinducerad respiration, potentiell ammoniumoxidation, DGGE och T-RFLP (Enwall m fl 2007), samt qPCR m.fl. molekylärbiologiska analyser (Sessitsch m fl 2001; Hallin m fl 2009, Wessén m fl 2010). Före denna studie har Elfstrand m fl (2007) också rapporterat PLFA-data, men på ett mindre antal av behandlingarna (5 st, ej röt-slam).

Tabell 1. Ramförsöket Ultuna, försöksplan: Analyserade led
Table 1. The long-term fertilisation experiment at Ultuna, analysed treatments

A.	Träda (Utan organiskt material, utan kväve)			<i>Fallow, unfertilised</i>	
B.	Utan org. material, utan N, men med gröda			<i>Cropped, unfertilised</i>	
C.	80 kg/ha N i Ks (kalksalpeter)			<i>Calcium nitrate [Ca(NO₃)₂]</i>	
D.	80 kg/ha N i Ammonsulfat			<i>Ammonium sulphate [(NH₄)₂SO₄]</i>	
F.	4 ton/ha C i halm	vartannat år	utan N	<i>Straw</i>	
G.	"-"	halm	"-"	80 kg/ha N i Ks	<i>Straw + [Ca(NO₃)₂]</i>
H.	"-"	grönmassa,	"-"	utan kväve	<i>Green manure</i>
J.	"-"	stallgödsel	"-"	"-"	<i>Farmyard manure</i>
M.	"-"	torvströ	"-"	80 kg/ha N i Ks	<i>Peat + [Ca(NO₃)₂]</i>
N.	"-"	sågspån	"-"	"-"	<i>Sawdust + [Ca(NO₃)₂]</i>
O.	"-"	röt slam	"-"	utan kväve	<i>Sewage sludge</i>

Jordprovtagning

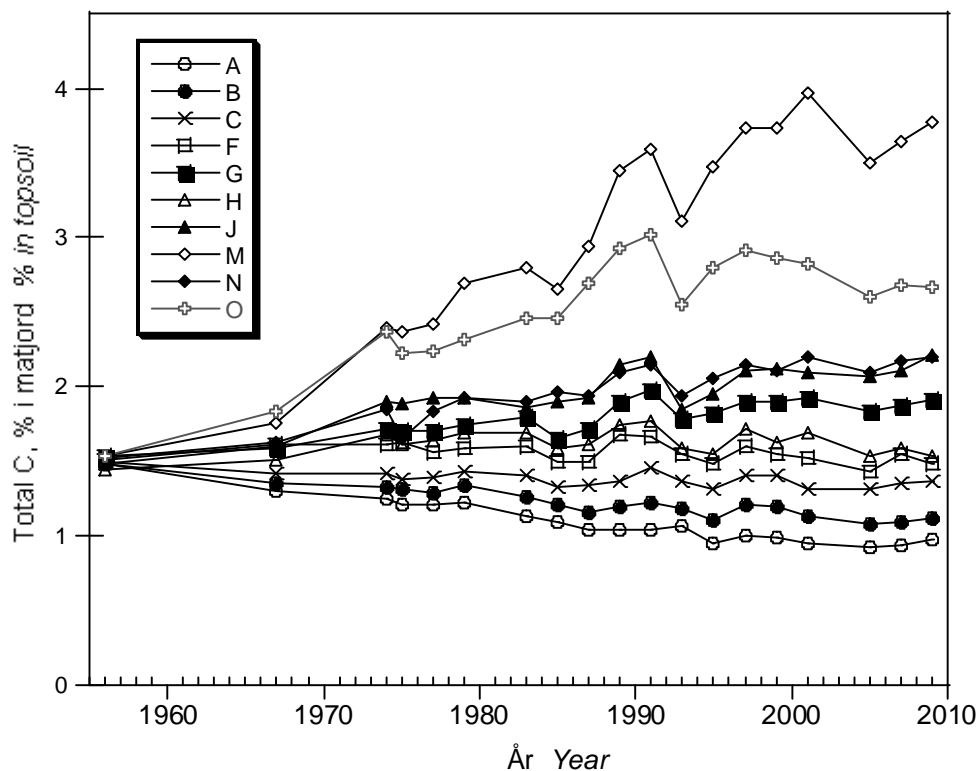
I september 2009 togs prover från alla rutor med behandlingarna A, B, C, F, G, H, J, M, N och O, med ett borrhov per ruta. Varje prov delades sedan upp i intervall för olika djup, varifrån vi här presenterar analyser gjorda i matjord 0-20 cm och i alvprover 27-40 cm. Kompletterande prov togs från behandling D, endast matjord 0-20 cm, i september 2010. Samtliga prover förvarades i kyl (+2°C) före analyser.

Fosfolipidfettsyra (PLFA)-analyser

Extraktioner utfördes på frystorkade prov enligt metoder beskrivna av Börjeson m fl (1998). I korthet innebar detta att den organiska fraktionen extraherades från varje jordprov och separerades i en kiselsyrakolonn, där fosfolipiderna samlades upp från den polära fraktionen. Fosfolipiderna konverterades sedan till metylestrar av fettsyror (FAME) med s.k. mild alkalisk methanolys. Därefter injicerades proverna på en gaskromatograf och analyserades enligt beskrivning av Steger m fl (2003).

PLFA-nomenklatur

Fettsyror namnges efter antalet kolatomer, efter ev. kolon följt av antalet dubbelbindningar, följt av position för dubbelbindningen räknat från den alifatiska änden på molekyl. Prefixen "i", "a", "10Me" anger metylgrenar i iso-, anteiso-positioner ytterst på fettsyran, resp. på den 10:e kolatomen, "br" (= branched) anger grenad fettsyra med för övrigt okänt utseende. Prefixet "cy" anger förekomsten av en cyklisk propangrupp.



Figur 1. Förändring av koncentrationer av totalt kol i matjorden (0-20 cm) 1956-2009.
 Figure 1. Time-course changes of total carbon concentrations in topsoil (0-20 cm).

I litteraturen har olika PLFA använts som biomarkörer: Några enkelomättade PLFA, t. ex. 16:1 ω 7 och 18:1 ω 7, verkar vara mera vanligt förekommande bland gram-negativa bakterier än i andra organismer (Zelles 1997). Icke desto mindre bör man vara försiktig vid användandet av PLFA som biomarkörer, både när det gäller att gruppera PLFA och även individuella PLFA. Så kan till exempel PLFA 18:2, som flitigt används som markör för svamp, endast användas när provet innehåller begränsat växtmaterial (Sundh m fl 1997; Zelles 1999). Vi har därför valt att i första hand analysera individuella PLFA var för sig.

Tabell 2. Innehåll av total PLFA i jordprover tagna från RAM-försöket 2009, medeltal för n=4 rutor av varje behandling, samt skördeavkastning med standardavvikelser
Table 2. Content of total PLFAs in soil samples from the long-term field experiment at Ultuna, given as mean values for n=4 in each treatment; together with yields with standard deviations

Behandling	Matjord (0-20 cm) <i>Topsoil (0-20 cm)</i>	Alv (27.5-40 cm) <i>Subsoil (27.5-40 cm)</i>	Skörd av majs, medeltal 2000-2009 <i>Maize yield, means 2000-2009 (tons ha⁻¹)</i>	pH 2009
<i>Treatment</i>	Total PLFAs (nmol g ts ⁻¹) Prob. diff. $\alpha=0,05^*$	Total PLFAs (nmol g ts ⁻¹) Prob. diff. $\alpha=0,05^*$		
A	25,8 ± 2,0 f	12,0 ± 2,2 e	-	6,1
B	46,3 ± 11,1 d, e	17,1 ± 3,6 c, d, e	3,57 ± 1,97	6,2
C	41,5 ± 4,2 e	14,2 ± 1,4 d, e	5,18 ± 1,69	6,7
D **	40,0 ± 3,1 e, f	not measured	3,73 ± 1,79	4,2
F	59,7 ± 21,3 c, d	16,8 ± 3,2 c, d, e	4,32 ± 1,52	6,4
G	64,3 ± 4,9 b, c	21,6 ± 5,4 a, b, c	6,00 ± 1,63	6,6
H	58,5 ± 2,7 c, d	20,2 ± 3,3 a, b, c, d	4,84 ± 1,69	6,1
J	82,6 ± 5,2 a	23,3 ± 5,5 a, b	5,42 ± 1,61	6,5
M	76,8 ± 1,7 a, b	24,2 ± 5,5 a	6,33 ± 2,95	6,0
N	77,1 ± 7,7 a	17,5 ± 5,0 b, c, d, e	4,90 ± 1,96	6,7
O	89,2 ± 22,4 a	21,6 ± 4,0 a, b, c	6,22 ± 2,12	4,9

* Behandlingar inom nivåer (djup) som inte har samma bokstav är signifikant skilda

* *Treatments within depth levels that do not share the same letter are significantly different*

** Provtagning 2010 *Sampled 2010*

Övriga analyser

I prover tagna 2009 bestämdes koncentrationer av total C och total N med hjälp av torr förbränning (LECO CNS Analyzer, USA). pH mättes med aq. dest. Respiration mättes som CO₂-fällning i NaOH-lösning, kvantifierad genom titrering med HCl efter tillsats av BaCl₂ i excess (Zibilske, 1994).

Statistiska analyser

JMP version 6.0.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA) användes för analyser av varians, korrelationer och multivariata analyser av principalkomponenter. För skattning av effekter på mikrobiell populationsstruktur normaliserades individuella PLFA till procent av den totala molhalten för varje prov.

Resultat

Totalmängden PLFA i matjordsproverna låg i genomsnitt 3,3 gånger högre i matjordsproverna jämfört med alven (jfr. data i tabell 2). De behandlingar som hade höga värden i matjorden hade också motsvarande höga halter i alvproverna: Korrelationen mellan total PLFA i matjord och alv var $r=0,84$ med $p=0,0023$ för de 10 jämförbara behandlingarna.

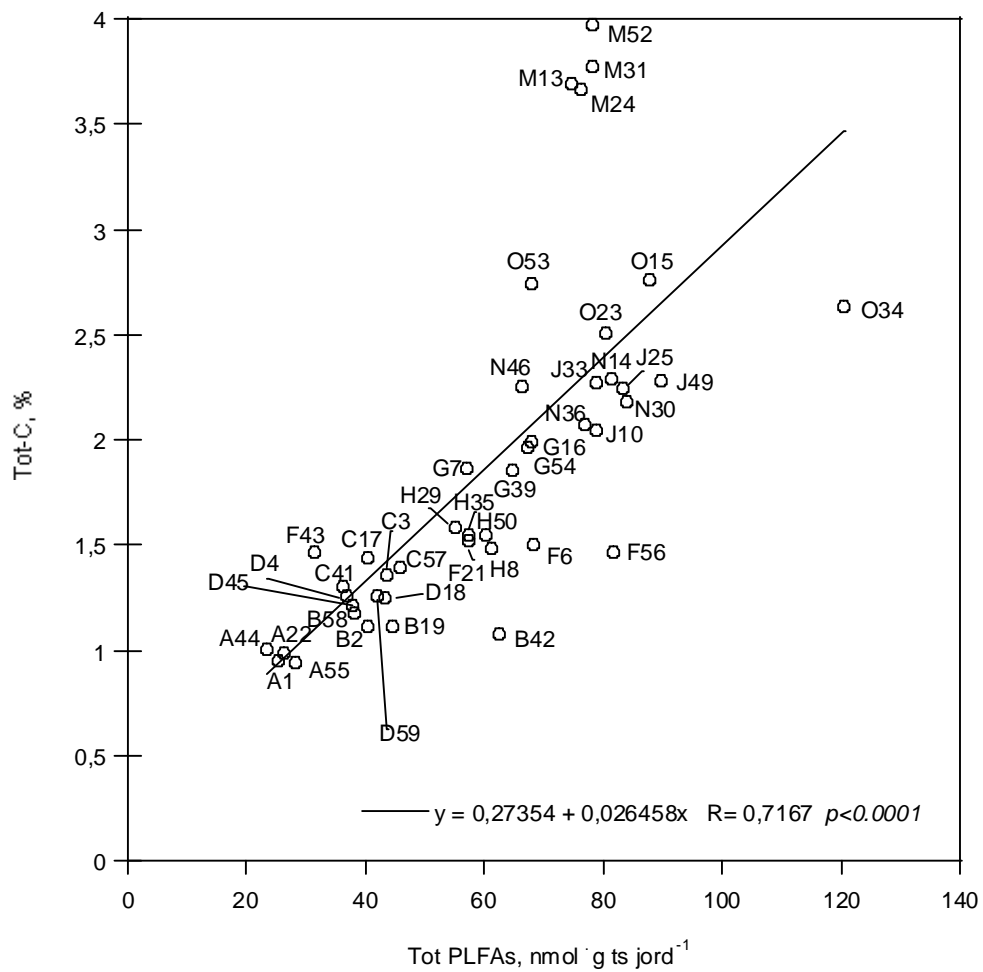
Bland de olika behandlingarna var totalmängden PLFA i matjordsproverna högst i rötslam (O), vilket i stort sett bekräftades i alvproverna, även om det högsta medelvärdet i alven noterades för stallgödselbehandlingen (J) (tabell 2). Ruta O34 hade den högsta totalmängden PLFA, 120,6 nmol per gram ts, medan A44 hade den lägsta, 23,3.

Vi har valt att inkludera behandling D i de flesta jämförelser, trots att proverna inte tagits samtidigt som de övriga, men värdena från denna behandling stämmer väl överens med vad som kunde förväntas, t.ex. när det gäller samband mellan totalinnehåll av PLFA och totalhalter av C och N (figur 2A+B). Flera skäl till att inkludera D-ledet kommer att anföras i diskussionen.

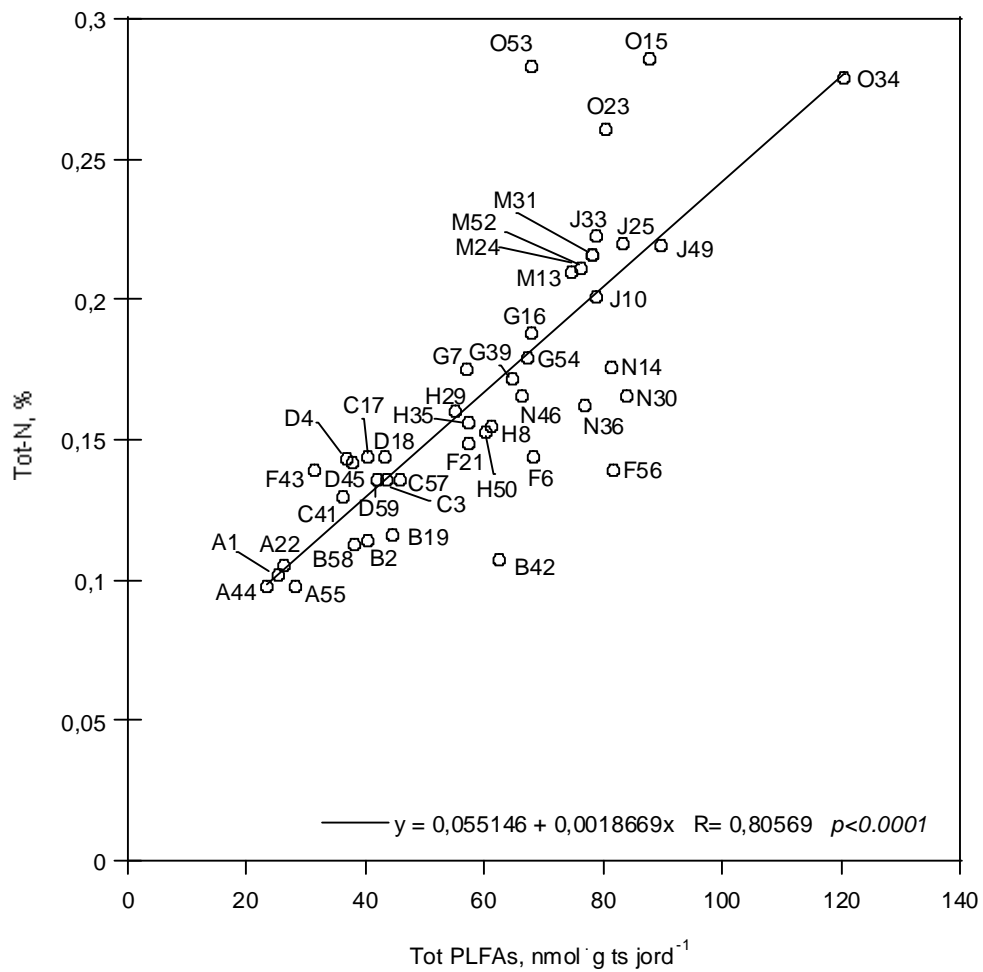
Det fanns en god korrelation mellan total PLFA i matjordsproverna och total C (figur 2A), men ännu bättre mellan total PLFA och total N (figur 2B). Här är det uppenbart att C-halterna i torven beror på organiskt material som inte hunnit omsättas till mikrobiell biomassa, medan rötslammet innehåller oorganiskt kväve som inte omsatts.

Sammansättningen av PLFA i de olika försöksleden redovisas i tabell 3. I matjordsproverna (tabell 3A) visar många PLFA mycket låga värden i trädan (A) och ammoniumsulfatbehandlingen (D), men i D-ledet kompenseras detta delvis genom att andra PLFA ligger på mera ”normala” nivåer. Värt att notera är den mycket låga halten av PLFA 16:1 ω 7 i D-ledet (1,204 nmol per g ts jord), en vanlig fettsyra hos gramnegativa bakterier, i synnerhet nitrifierare. Rötslamsledet (O) skiljer ut sig rejält, här fanns extremt höga halter av flera PLFA (i16:0, 16:0, i17:0, cy17:0, br18:0, 10Me17:0, 18:0, cy19:0 och 20:0), men också relativt låga halter av andra PLFA (i14:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5 och 10Me18:0). Behandling J (stallgödsel) hade signifikant högre halter av PLFA 18:1 ω 5 än alla andra behandlingar. Enkelomättade PLFA var f. ö. relativt vanliga även i behandling N (sågspån; tabell 3A).

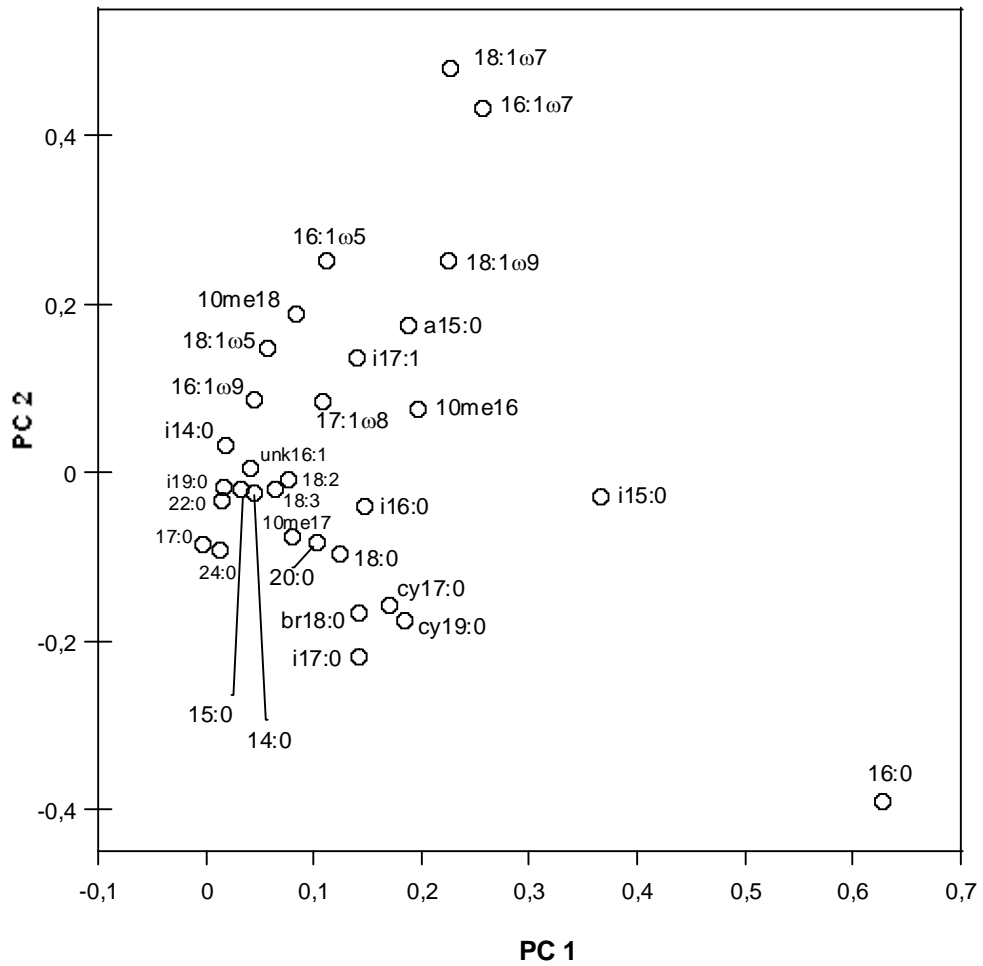
Ett annat anmärkningsvärt resultat var att svamp-biomarkören 18:2 endast skilde sig signifikant mellan behandlingarna A och B.



Figur 2A. Korrelation mellan total PLFA och total C i matjordsproverna.
 Figure 2A. Correlation between total PLFAs and total C in topsoil samples.

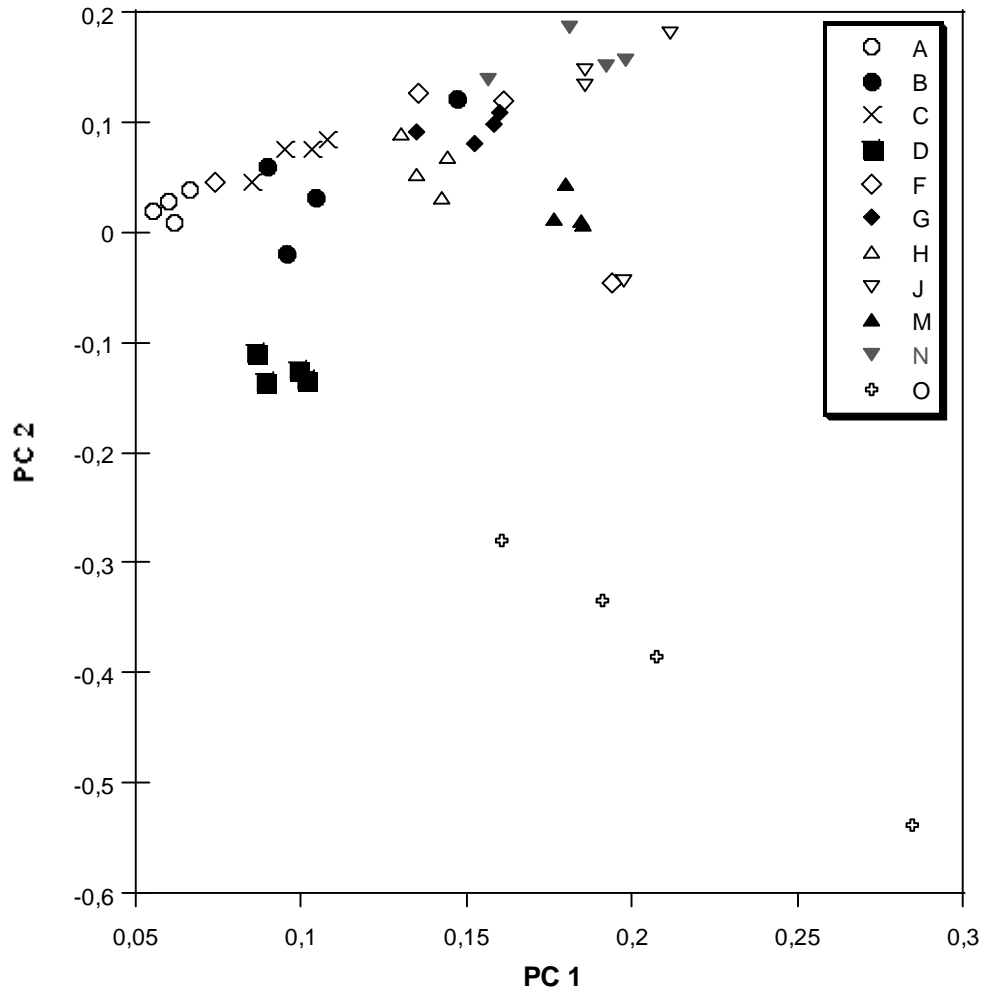


Figur 2B. Korrelation mellan total PLFA och total N i matjordsproverna.
 Figure 2B. Correlation between total PLFAs and total N in topsoil samples.



Figur 3A. Loading plot för PLFA i matjordsprover (kovariansmatris). PC 1 förklarar 70,4 % av variationen, PC 2 ytterligare 15,8 %

Figure 3A. Loading plot for PLFAs in topsoil samples (covariance matrix). PC 1 explains 70.4 % of the variation, PC 2 another 15.8 %



Figur 3B. Principalkomponenter för olika behandlingar, avseende PLFA i matjordsprover (kovariansmatrix). PC 1 förklarar 99,7 % av variationen, PC 2 ytterligare 0,17 %
Figure 3B. Principal components for PLFAs in plots with different treatments (covariance matrix). PC 1 explains 99.7 % of the variation, PC 2 another 0.17 %

Tabell 3A. Medelvärden ($n=4$) för individuella PLFA ($\text{nmol} \cdot \text{g ts jord}^{-1}$) i matjordsprover från de olika behandlingarna. Värden i fetstil är signifikant ($\alpha=0,05$) högre än alla andra behandlingar, medan understrukna värden är signifikant lägre. Kursiverade värden skiljer sig både från värden i fetstil och från alla andra behandlingar

Table 3A. Mean values ($n=4$) for individual PLFAs ($\text{nmol} \cdot \text{g dw soil}^{-1}$) in topsoil samples from the different treatments. Values in bold letters were significantly higher than all other treatments, while underlined values were significantly lower ($\alpha=0.05$). Values in italics were different from both the values in bold and from all other treatments

PLFA	A	B	C	D	F	G	H	J	M	N	O
i14:0	0,12	0,15	0,08	0,23	0,25	0,40	0,13	0,55	0,38	0,38	0,12
14:0	0,57	0,70	0,52	0,61	0,75	1,13	0,78	1,00	1,31	0,64	1,27
i15:0	2,30	3,59	2,77	3,74	4,60	6,11	4,61	6,42	7,37	6,55	8,06
a15:0	1,43	2,31	2,18	1,72	2,84	4,16	2,99	4,37	4,38	4,29	3,55
15:0	0,25	0,23	0,16	0,34	0,32	0,51	0,39	0,55	0,65	0,37	0,78
unk16:1	0,03	0,30	0,36	0,23	0,42	0,25	0,46	0,76	0,63	0,48	0,72
i16:0	<u>0,54</u>	1,15	1,22	1,33	1,57	1,84	1,60	2,64	2,18	2,20	3,24
16:1 ω 9	0,21	0,48	0,63	0,39	0,82	1,00	0,72	1,17	1,03	1,24	0,57
16:1 ω 7	<u>2,28</u>	3,77	3,67	<u>1,20</u>	5,23	4,75	4,77	6,30	6,02	6,75	4,16
16:1 ω 5	<u>0,37</u>	1,37	1,22	<u>0,43</u>	2,06	2,13	1,52	2,90	2,17	2,75	1,08
16:0	2,86	5,59	4,54	5,32	8,01	6,43	6,95	9,93	9,40	8,25	14,37
i17:1	<u>0,97</u>	2,01	1,57	<u>0,99</u>	2,46	2,35	2,39	3,24	3,06	3,09	2,60
10Me16:0	<u>1,33</u>	2,38	2,37	2,40	3,10	3,42	2,94	4,49	3,70	4,57	4,34
i17:0	0,47	0,82	0,83	1,49	1,12	1,33	1,091	1,71	1,66	1,52	4,01
17:1 ω 8	<u>0,61</u>	1,65	1,44	<u>0,89</u>	1,79	1,68	1,84	2,66	2,03	2,49	2,22
cy17:0	0,75	1,30	1,32	1,64	1,75	1,96	1,83	2,30	2,50	2,46	4,54
17:0	0,30	0,13	0,07	1,73	0,16	1,20	0,23	0,33	0,35	0,25	0,66
br18:0	0,13	0,44	0,88	0,09	0,72	0,29	0,75	1,44	0,84	1,26	3,52
10Me17:0	0,51	0,79	0,66	1,07	0,97	0,99	1,04	1,33	1,28	1,26	2,22
18:2	0,45	2,99	1,73	1,22	2,33	1,21	1,86	2,11	2,46	1,84	2,48
18:3	0,08	1,05	0,59	0,98	1,14	0,49	1,70	0,82	0,98	1,49	1,62
18:1 ω 9	1,80	2,91	3,09	2,16	4,12	4,39	4,07	5,57	3,984	6,01	4,41
18:1 ω 7	<u>1,35</u>	3,06	2,83	<u>1,20</u>	4,29	4,01	3,65	5,96	4,82	6,09	2,73
18:1 ω 5	0,36	0,61	0,59	0,52	1,00	1,01	1,52	2,97	0,93	0,74	0,50
18:0	<u>0,62</u>	1,32	1,11	1,27	1,40	1,52	1,42	2,10	2,08	1,85	3,31
10Me18:0	<u>0,94</u>	1,55	1,72	<u>0,78</u>	2,00	2,17	2,21	2,82	2,11	2,65	1,46
i19:0	0,19	0,22	0,08	0,50	0,28	0,43	0,29	0,38	0,37	0,30	0,47
cy19:0	0,77	1,42	1,31	2,31	1,87	1,97	2,01	2,87	2,98	2,63	4,81
20:0	0,46	1,04	0,95	0,73	1,24	0,80	1,25	1,40	2,07	1,38	2,70
22:0	1,42	0,67	0,70	1,07	0,75	2,10	1,08	0,98	1,65	0,86	1,36
24:0	1,27	<u>0,33</u>	<u>0,25</u>	1,41	<u>0,34</u>	2,24	<u>0,38</u>	<u>0,57</u>	1,42	<u>0,41</u>	1,34
SUMMA SUM	25,8	46,3	41,5	40,0	59,7	64,3	58,5	82,6	76,8	77,1	89,2

Tabell 3B. Medelvärden ($n=4$) för individuella PLFA ($\text{nmol} \cdot \text{g ts jord}^{-1}$) i alvprover från de olika behandlingarna. Värden i fetstil är max. värden och understrukna värden är min. värde för varje PLFA

Table 3B. Mean values ($n=4$) for individual PLFAs ($\text{nmol} \cdot \text{g dw soil}^{-1}$) in subsoil samples from the different treatments. Values in bold letters denote maximum. values and underlined values denote minimum values for each PLFA

PLFA	A	B	C	F	G	H	J	M	N	O
i14:0	<u>0,05</u>	0,09	0,08	0,08	0,14	0,18	0,19	0,18	0,15	0,16
14:0	0,21	0,21	<u>0,13</u>	0,21	0,25	0,20	0,25	0,28	0,23	0,20
i15:0	0,72	1,04	<u>0,69</u>	1,01	1,34	1,26	1,62	1,70	0,86	1,37
a15:0	<u>0,57</u>	0,83	<u>0,65</u>	0,84	1,16	1,10	1,32	1,38	0,95	1,20
15:0	<u>0,05</u>	0,12	0,07	0,12	0,15	0,16	0,15	0,15	0,11	0,13
unk16:1	<u>0,05</u>	0,14	0,12	0,15	0,19	0,18	0,21	0,23	0,16	0,20
i16:0	<u>0,27</u>	0,48	0,42	0,53	0,68	0,64	0,75	0,72	0,54	0,70
16:1 ω 9	0,26	0,25	<u>0,17</u>	0,25	0,27	0,27	0,30	0,33	0,24	0,27
16:1 ω 7	<u>0,63</u>	1,14	0,81	1,04	1,46	1,10	1,45	1,46	1,01	1,10
16:1 ω 5	0,31	0,37	<u>0,27</u>	0,39	0,53	0,45	0,63	0,64	0,43	0,46
16:0	2,29	<u>1,89</u>	1,93	1,97	2,50	3,26	2,27	2,59	1,96	2,46
i17:1	<u>0,29</u>	0,61	0,41	0,50	0,65	0,57	0,74	0,80	0,48	0,68
10Me16:0	<u>0,78</u>	1,44	1,21	1,50	1,88	1,75	2,18	2,28	1,63	2,20
i17:0	<u>0,22</u>	0,36	0,29	0,37	0,45	0,43	0,54	0,56	0,40	0,57
17:1 ω 8	<u>0,31</u>	0,54	0,45	0,53	0,70	0,64	0,79	0,84	0,58	0,80
cy17:0	<u>0,32</u>	0,47	0,45	0,51	0,65	0,60	0,66	0,70	0,55	0,65
17:0	<u>0,03</u>	0,08	0,05	0,07	0,13	0,09	0,14	0,15	0,08	0,14
br18:0	<u>0,33</u>	0,51	0,53	0,55	0,68	0,68	0,70	0,70	0,64	0,88
10Me17:0	<u>0,17</u>	0,24	0,24	0,26	0,36	0,27	0,33	0,36	0,26	0,32
18:2	0,86	1,02	0,89	0,90	<u>0,83</u>	0,96	0,95	0,98	0,95	0,97
18:3	0,37	0,18	<u>0,17</u>	0,19	0,23	0,20	0,19	0,23	0,22	0,17
18:1 ω 9	<u>0,43</u>	1,02	0,88	1,04	1,41	1,04	1,51	1,43	1,10	1,15
18:1 ω 7	<u>0,53</u>	0,86	0,79	0,90	1,31	0,99	1,33	1,45	0,96	1,10
18:1 ω 5	0,19	0,20	<u>0,18</u>	0,20	0,30	0,25	0,43	0,31	0,20	0,23
18:0	<u>0,25</u>	0,35	0,38	0,42	0,52	0,45	0,61	0,58	0,46	0,55
10Me18:0	<u>0,33</u>	0,60	0,56	0,65	0,85	0,54	0,61	0,59	0,49	0,55
i19:0	0,24	<u>0,09</u>	0,11	0,11	0,15	0,27	0,40	0,37	0,28	0,36
cy19:0	<u>0,35</u>	0,92	0,61	0,69	0,86	0,85	1,08	1,19	0,86	1,07
20:0	<u>0,33</u>	0,58	0,33	0,38	0,43	0,36	0,45	0,48	0,35	0,42
22:0	<u>0,19</u>	0,26	0,25	0,27	0,36	0,31	0,36	0,38	0,297	0,40
24:0	<u>0,08</u>	0,21	0,10	0,12	0,16	0,16	0,20	0,20	0,11	0,16
SUMMA SUM	<u>12,0</u>	17,1	14,2	16,8	21,6	20,2	23,3	24,2	17,5	21,6

I analysen av principalkomponenter i matjordsprovernas PLFA-halter bildade de flesta proven kluster inom varje behandling, utom F-rutorna (figur 3B). Här framgår också den särställning som rötslam- (O) och ammoniumsulfatbehandlingen (D) har. Samvariationen (figur 3A) mellan cy17:0 och cy19:0 ger anledning att förmoda att de härrör från samma typ av organismer, liksom mellan 16:1 ω 7 och 18:1 ω 7, resp. mellan 18:2 och 18:3.

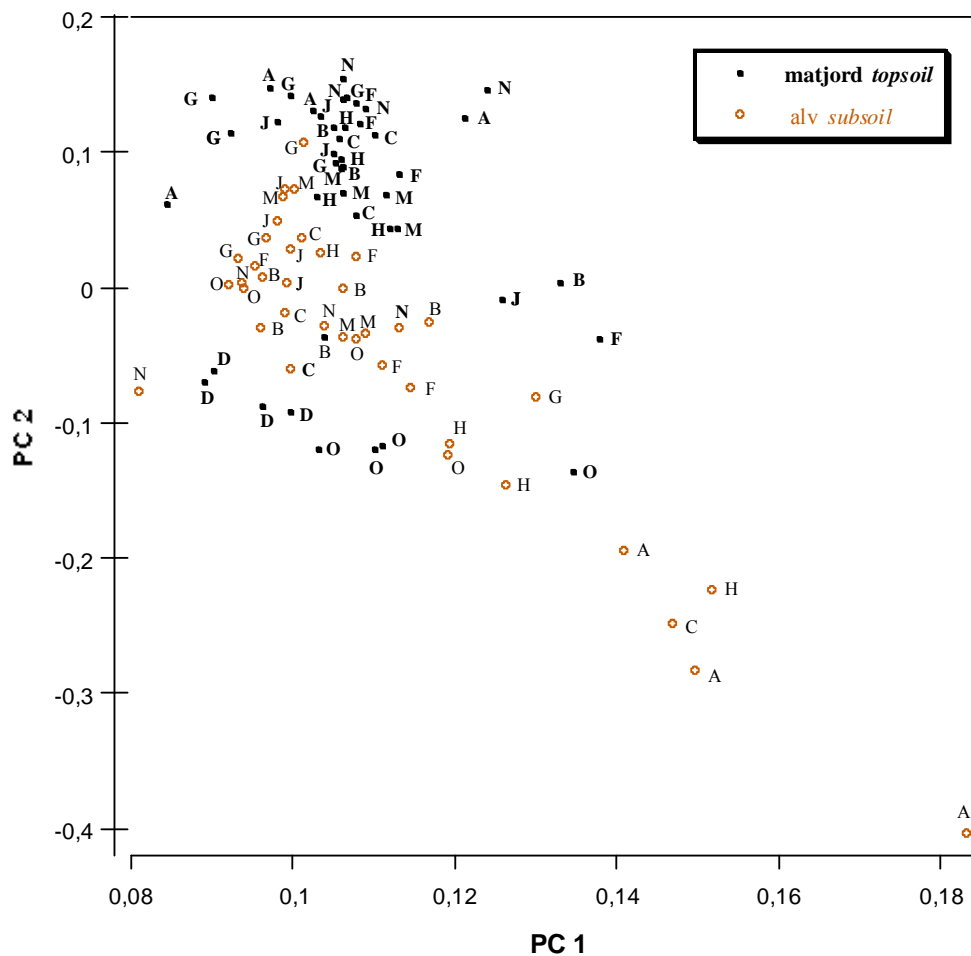
Vid analysen av den mikrobiella sammansättningen, konstaterades att nästan alla matjordsprover hade principalkomponenterna grupperade mera sammanhållna, oftast åtskilda från alvproverna (figur 4). De tydligaste undantagen var matjordsprover från ammoniumsulfatledet (D) och rötslamsledet (O), som utgjorde en separat gruppering. Orsakerna till detta har redan nämnts, den speciella sammansättningen av de mikrobiella populationerna i dessa två försöksled framgår också av tabell 3A. Anmärkningsvärd är den stora spridningen bland alvproverna, där sammansättningen av mikroorganismer i de olika försöksrutorna inte har något samband med ovanliggande lager, och det är också en väldigt stor variation inom behandlingarna, en spridning som också framgår av tabell 3B. Ett prov från trädan (A22) kunde betraktas som en outlier och uteslöts från vidare jämförelser, eftersom en PLFA, 18:3, dominerade med 11% av hela innehållet, vilket ska jämföras med ~1% i de övriga proverna. Det kan antas att provet innehöll en ovanligt stor mängd eukaryota celler, förmodligen från något markdjur.

Diskussion

Stora skillnader mellan PLFA-sammansättningen i jordprover från de olika försöksleden kunde noteras, framförallt i matjordsproverna men även i alven (tabell 2 och 3; figur 2-4). En viktig skillnad mellan matjordsproverna och alven är allmänt höga koncentrationer av 10Me16:0 i alven, vilket kan indikera anaeroba sulfatreducerande bakterier (White m fl 1996). Dessa bör rimligtvis vara mera talrika i alven än i matjorden.

Rötslamsproverna hade höga koncentrationer av PLFA cy19:0, både i matjorden och i alven. Petersen m fl (2002) fann att cyklopropyl-fettsyrorna ensamma kunde förklara mer än 60% av variationen i jordprover från ett försök med vårvete. I vår studie var cy17:0 och cy19:0 vara starkt korrelerade i matjordsproverna (figur 3A; $r = 0,97$). Cyklopropylfettsyror har antagits kunna indikera olika typer av stressituationer, som näringsbrist, jordbearbetning, osmotisk stress osv. (Petersen m fl 2002; Kaur m fl 2005), men också anaeroba förhål-

landen (Kieft m fl 1997; Drenovsky m fl 2010). En möjlighet är att den mikro-
biella



Figur 4. Principalkomponenter för alla PLFA-prover, baserade på kovariansmatris av sammansättningen uttryckt som mol-%. Ett av alvproverna (A22) har utelämnats som outlier (motsv. koordinaterna 0,011 i PC1 och 0,33 i PC2). PC 1 förklarar 83,8 %, PC 2 ytterligare 5,4 % av variationen

Figure 4. Principal components for all PLFA samples, based on a covariance matrix of samples normalised to mol-%. One of the subsoil samples (A22) was removed from the graph as an extreme outlier. PC 1 explains 83.8 % of the variation, PC 2 another 5.4 %.

omsättningen av rötslam till andra former av organiska och oorganiska ämnen, t.ex. nitrifikation, har förbrukat mycket syre i matjorden. Ett argument som talar emot syrestress är att innehållet av 10Me16:0 inte skilde sig mellan röt-slammet och andra behandlingar bland matjordsproverna. Det rådde dessutom ganska torra förhållanden före och under tiden för provtagning.

PLFA br18:0, som också var vanligare i prover från de rötslamsbehandlade rutorna, betraktas allmänt som en indikator för grampositiva bakterier (ex. Ehlers m fl 2008). Enkelomättade PLFA anses indikera bakterier, och i synnerhet 18:1 ω 7c används ofta som en indikator för gramnegativa bakterier (Kourtev m fl 2003; Joner m fl 2005). Eftersom 18:1 ω 7c också är utgångsämnet (precursor) för cy19:0 (White m fl 1996) kan vi förmoda en stressituation för gramnegativa bakterier i rötslamsbehandlingen. Anmärkningsvärt är också de låga halterna av enkelomättade PLFA i rötslamsledet. Dessa anses indikera gramnegativa bakterier, som bl. a. är mera resistent än andra organismer mot höga halter av tungmetaller, i synnerhet koppar (Wakelin m fl 2010) och kadmium (Abaye m fl 2005). Orsaken till att kolhalten inte har ökat i rötslamsledet under senare år (figur 1) kan eventuellt förklaras med utvecklandet av en mikrobiell population, dominerad av gram-positiva bakterier, som anpassat sig till slammet som substrat. Detta kan jämföras med att enkelomättade PLFA var vanligare i J- och N-leden (stallgödsel resp. sågspån), vilket indikerar att gramnegativa bakterier var vanligare i dessa behandlingar.

En annan förklaring till avvikelser i de rötslamsbehandlade rutorna, som tidigare föreslagits av Witter (1996) angående skillnader i kolbalansen i detta experiment, är att jorden i de rötslamsbehandlade rutorna är utsatt för tungmetaller, i halter som är toxiska för många mikroorganismer. En tolkning av våra resultat i den riktningen får också stöd i observationer av Frostegård m fl (1993), som noterade en ökning av PLFA br18:0 i två olika jordar som utsatts för tungmetaller. Bååth m fl (2005) fann också mera br18:0 i blyanrikade skogsjordar. Emellertid finns det också rapporter som delvis motsäger dessa resultat; t. ex. Joner m fl (2005), som rapporterade en förändring mot gram-positiva bakterier och aktinomycceter i aluminium-behandlade prover från skogsjord. Helt klart är också att olika metaller ger olika resultat (Bååth m fl 1998; Murata m fl 2005), men det har också rapporterats att olika jordar kan ge olika respons på samma typ av kontaminering (Turpeinen m fl 2004). Detta verkar logiskt, eftersom resistens mot tungmetaller oftast ligger i plasmider som är lätt överförbara mellan olika typer av mikroorganismer (Bååth 1989).

PLFA 10Me18:0, en indikator för aktinomycceter (Bossio m fl 1998), hade också låga halter i rötslamsproverna. Detta är mera svårförklarligt, eftersom aktinomycceter är vanliga i reningsverk. Möjligen kan det bero på konkurrens från

andra bakterier eller att den typ av aktinomyceter som finns i rötslammet är arter med lågt innehåll av 10Me18:0, men desto högre innehåll av 10Me17:0.

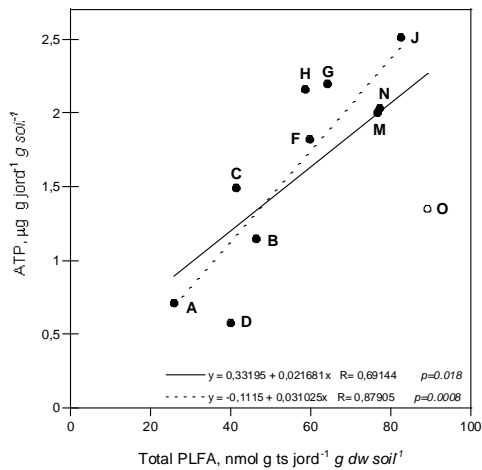
PLFA 18:2, som har flitigt använts som markör för svamp, skilde sig inte nämnvärt mellan behandlingarna, men denna PLFA är också vanlig i växtceller (Zelles 1999). 18:1 ω 9c och 16:1 ω 5c har också föreslagits som markörer för svamp (Zak m fl 2003), men dessa verkade inte vara korrelerade, varken sinsemellan eller med PLFA 18:2. Man kan också notera att Marschner m fl (2003) fann att svampbiomassa inte påverkades av gödsling. Liknande resultat, dvs. att mikrosvampar inte påverkades av olika gödselmedel, har observerats av Řezáčová m fl (2007).

Sammanfattningsvis kan vi konstatera att PLFA-analysen klart detekterar signifikanta skillnader mellan behandlingar, men att det på individuell PLFA-nivå är svårt att i detalj förklara dessa skillnader i generella termer, annat än i enskilda fall. Flera provtagningar är nödvändiga för att kunna prediktera förändringar i PLFA-mönster orsakade av odlingsåtgärder.

Jämförelser med andra metoder och mätningar

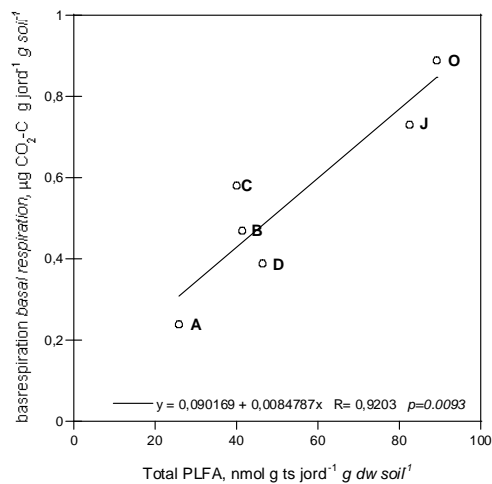
Jämförelserna mellan PLFA-proverna och jordarnas innehåll av kol och kväve visar på skillnader: De höga halterna av kväve i rötslamsledet motsvaras inte av PLFA-innehållet (figur 2B). Korrelationen med kol är sämre, mest p.g.a. att de torvbehandlade rutorna (M) avviker (figur 2A). Detta är naturligt eftersom en stor del av kolet i torven bryts ner långsamt.

En annan intressant jämförelse kan göras med ATP-innehållet i mätningarna 1990 (figur 5). Här avviker rötslamsledet starkt, med en relativt låg aktivitet 1990. Uppenbart är att den mikrobiella aktiviteten har ökat under de senaste 10-15 åren, vilket tydligt avspeglas i kolhalten som inte har ökat under de senaste åren (figur 1). En möjlig tolkning är att en flora av mikroorganismer har utvecklat tolerans mot tungmetaller och anpassat sig till detta substrat. Att denna flora skiljer sig från de övriga behandlingarna framgår också tydligt av PLFA-sammansättningen (figur 3B). Tungmetallinnehållet i slammet har också minskat avsevärt under åren, framförallt under slutet av 1980-talet, då halterna av t. ex. bly och kadmium gick ner till en fjärdedel (från omkr. 200 till 50, resp. från 9 till 1,9 mg per kg ts; Swedling 1992). Den minskade halten av tungmetaller kan givetvis också ha bidragit till att omsättningen av slammets organiska material kunnat öka.



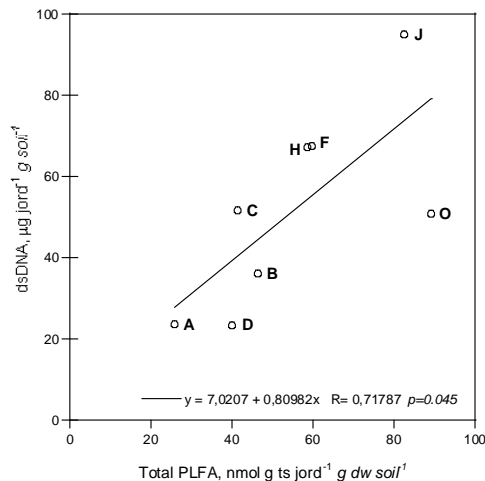
Figur 5. Korrelation mellan ATP i matjordsprover 1990 och totalinnehåll av PLFA i matjordsprover 2009-10. Uteslutning av behandling O (rötslam) förbättrar korrelationen (punkterad linje).

Figure 5. Correlation between ATP in topsoil samples 1990 and total PLFAs in topsoil samples 2009-2010. Dotted line is correlation without treatment O (sewage sludge).



Figur 6. Korrelation i matjordsprover från sex behandlingar mellan total PLFA 2009-10 och basrespiration uppmätt 2002 av Enwall m fl (2007).

Figure 6. Correlation in topsoil samples from six treatments between total PLFAs 2009 and basal respiration measured 2002 by Enwall et al (2007).



Figur 7. Korrelation mellan total PLFA 2009-2010 och dubbelsträngad DNA (Marstorp m fl 2000) i matjordsprover från åtta behandlingar.

Figure 7. Correlation between total PLFAs 2009-2010 and double-strained DNA (Marstorp et al. 2000) in topsoil samples from eight treatments.

Några av rutorna i samma långtidsförsök har tidigare analyserats med avseende på PLFA-innehåll (Elfstrand m fl 2007). Deras totalhalt av PLFA var obetydligt högre; i behandling H (grönmassa) fanns 77,7 och 65,7 nmol PLFAs g ts jord⁻¹ i juni resp. september 2003, medan motsvarande värden i vår undersökning uppmättes till 58,5. För behandling N (sågspån + kalciumnitrat) låg deras värden på 87,2 och 82,2 att jämföras med 77,1 i vår studie. Deras slutsats att behandling H (grönmassa) hade en annan sammansättning än andra behandlingar, t. ex. N (sågspån), kunde dock inte konfirmeras i vår studie. Möjligen kan tidpunkt för provtagning ha haft betydelse. Inte heller lyckades vi observera högre svamp/bakteriekvot i stallgödselledet (J). I vår undersökning var en sådan kvot istället högre i kontrollproverna och i C- och F-behandlingarna. Möjligen kan provtagningen med enkla stick i varje ruta lett till en större variation i våra prover jämfört med den tidigare analysen.

Senare rapporter från samma fältexperiment inkluderar också en studie av Enwall m fl (2007), som undersökte mikrobiella egenskaper i sex behandlingar provtagna 2002, bland annat respiration. De fann skillnader mellan basrespiration, där rötslamsproverna var högst, och substratinducerad respiration, där stallgödselledet låg avsevärt högre än övriga behandlingar. Basrespirationen

2002 var starkt korrelerad med total PLFA i våra matjordsprover (figur 6). Totalhalten av PLFA var också korrelerad med tidigare ATP-mätningar (figur 5; Witter m fl 1993). Uppenbarligen är PLFA-innehållet korrelerat med levande biomassa och inte med den del av biomassan som kan uppvisa potentiell tillväxt, och som kan iaktas t ex. vid fumigering (Appendix 1). Detta framgår också av det klara sambandet mellan fumigeringsmetoderna FIC (fumigering-inkubering) och FIN (fumigering-inkubering med mätning av kväve-mineralisering), som bygger på inkubering. Även SIR (substrat-inducerad respiration) bygger på inkubering, men jämfört med fumigering ger SIR en mera direkt respons från levande biomassa. PLFA och SIR visar oftast ett starkt samband, vilket också har visats i flera studier i andra länder, med en korrelation R^2 mellan 0,45 och 0,98 (Rinklebe och Langer 2010; inkl. referenser). En sämre korrelation kan antas bero på varierande innehåll av grampositiver, gramnegativer och svamp, där de två senare grupperna reagerar långsammare vid inkubering (Kemmitt m fl 2008).

En intressant jämförelse kan också göras med de resultat som rapporterades av Marstorp m fl (2000), där korrelationen liknar basrespirationen 2002, med undantag för rötslamsledet. Möjligen kan en förändring mot ökad tillväxt av den mikrobiella biomassan i rötslamsrutorna ha skett mellan Marstorps provtagning och 2002.

Hallin m fl (2009) rapporterade att antalet genkopior av de flesta bakterier involverade i kväveomsättning var högre i stallgödselbehandlingen (J) än i andra behandlingar. Detta motsvaras av SIR-resultaten, vilket kan tolkas som att i antalet genkopior också ingår en stor mängd inaktiva organismer. Ännu mera intressant är att Hallin m fl (2009) fann att antalet genkopior för N-omsättning var extremt lågt i D-ledet. Detta motsvaras i vår PLFA-analys av mycket låga halter av PLFA 16:1 ω 7 och 18:1 ω 7, som är dominerande fettsyror hos N-oxiderande bakterier, t.ex. *Nitrosomonas* och *Nitrobacter* (Petersen m fl 2004). Extremt låga skördenivåer med gula blad tyder också på att ammoniumsulfaten i stort sett har slagit ut kväveleveransen, förmodligen beroende på den låga pH-nivån (4,15 år 2009).

Effekten av några månaders lagring i kyl kan inte ha varit särskilt stor, eftersom totalhalterna i våra prover låg på samma nivå som Elfstrand m fl (2007) rapporterade från samma försöksyta. Petersen och Klug (1994) rapporterade också att kylförvaring under 7 veckor endast hade mycket små effekter på enskilda PLFA. Även ur lagringssynpunkt bör alltså D-ledet, där PLFA analyserades på färska prover, vara jämförbart. Dessutom togs proverna vid samma årstid.

Kan skillnader vara årstidsbundna? Förmodligen inte: Jangid m fl (2008) rapporterade att, trots att totalmängden PLFA ändrades med årstiden, kunde man inte observera några förändringar i den mikrobiella sammansättningen. Jangid m fl (2008) fann också att gödslingstillfällena orsakade mera dramatiska förändringar än förändrad markanvändning eller årstid.

Användandet av PLFA-analys kan utöver mått på levande biomassa ge information om metaboliska strategier, så har det till exempel visats med kolisotoper att gram-positiva bakterier företrädesvis omsätter äldre organiskt material, medan gram-negativa föredrar färskt växtmaterial (Rethemeyer m fl 2005; Kramer och Gleixner 2008); vilket också kan förklara att gramnegativa bakterier oftast är vanligare nära växtrötterna (Söderberg m fl 2004).

PLFA bör kombineras med åtminstone ytterligare en kompletterande metod för att man ska kunna få en bättre bild av en jords status med avseende på användning i ett större program för markbiologisk uppföljning. En sådan metod kan lämpligen vara någon form av CLPP (community level physiological profiles). För det senare ändamålet finns flera tekniker: En sedan länge etablerad metod är Biolog[®]. Metoden går ut på att ett jordprov slammats upp och sedan droppas i små brunnar på plattor, som i förhand har tillsatts olika substrat. Om mikroorganismerna i jordprovet använder substratet kan detta ses som ett färgomslag i en speciell läsapparat som företaget säljer. Genom att många olika substrat används erhålls ett mönster, som gör att jordprover med olika ursprung kan särskiljas. Fördelen är att metoden går snabbt och att plattorna är lätta att hantera. Nackdelen är att jorden inkuberas och man mäter inte direkt vad som finns i jorden, utan man inkluderar också tillväxt (se diskussion hos Garland 1997). Degens och Harris (1997) har presenterat en metod där man har vänt på förhållandena, dvs. substratet droppas på jordprovet i stället för tvärtom. Denna variant ger ett mera direkt mått på aktuell status i ett jordprov, och metoden har vidareutvecklats till färdiga kit, t. ex. MicroResp[™] (Campbell m fl (2003).

Grayston m fl (2004) har redovisat en jämförelse mellan CLPP (i detta fall GN-plattor från Biolog[®]), PLFA och några molekylärbiologiska metoder för att beskriva mikrosamhällena i tio olika jordar i Storbritannien. Man noterade att CLPP- och PLFA-mönstren i stort överensstämde, båda var starkt korrelerade med natrium, organiskt material och pH, men PLFA var också korrelerat med kalcium, fosfor och kväve. Liknande slutsatser kom Widmer m fl (2001) fram till, efter att ha jämfört Biolog[™] med PLFA och en variant på T-RFLP för analys av pesticidnedbrytande organismer i jord, och man rekommenderade att flera metoder bör användas för att komplettera varandra.

I det ringtest som gjordes av Creamer m fl (2009), använde man en variant av CLPP, den så kallade MicroResp™, som utarbetats av Campbell m fl (2003). Här konstaterades stora skillnader i resultat mellan de tre laboratorier som ingick i testet, trots att man använt samma batch av jordar, enzymer m.m. Det krävs således rigorösa protokoll, men ännu hellre att samma laboratorium används för all provtagning inom ett program.

Slutsatser

PLFA-analysen gav stora skillnader mellan behandlingarna i RAM-försöket. I linje med vad andra forskargrupper kommit fram till bör detta vara en användbar metod för markbiologisk uppföljning, eftersom förändringar av den mikrobiella populationen i en jord kan detekteras, förutom att man får ett jämförbart mått på total mikrobiell biomassa. Ett noggrant protokoll för extraktioner och gaskromatografiska analyser bör upprättas för det fortsatta arbetet.

PLFA bör ändå kombineras med andra metoder för att säkert kunna fastställa förändringar hos jordar. Någon form av CLPP ligger förmodligen närmast tillhands.

Referenser

Abaye, D.A., Lawlor, K., Hirsch, P.R. & Brookes, P.C. 2005. Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. *Eur. J. Soil Sci.* 56 (1), 93-102.

Bispo, A., Cluzeau, D., Creamer, R., Dombos M., Graefe, U., Krogh, P.H., Sousa, J.P., Peres, G., Rutgers, M., Winding, A. & Roembke, J. 2009. Indicators for monitoring soil biodiversity. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5(4), 717-719.

Bossio, D.A., Scow, K.M., Gunapala, N. & Graham, K.J. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profile. *Microb. Ecol.* 36, 1-12.

Brussaard, L., Kuiper, T.W., Didden, W.A.M., de Goede, R.G.M. & Bloem, J. 2003. Biological soil quality from biomass to biodiversity - Importance and resilience to management stress and disturbance. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture* (Red. Schjøning, P., Elmholt, S., Christensen, B.T.), pp. 139-161. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, Storbritannien.

Bååth, E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Pollut.* 47, 335-379.

Bååth, E., Frostegård, Å., Díaz-Raviña, M., Tunlid, A. 1998. Microbial community-based measurements to estimate heavy metal effects in soil: The use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. *Ambio* 27 (1), 58-61.

Bååth, E., Díaz-Raviña M., Bakken L.R. 2005. Microbial biomass, community structure and metal tolerance of a naturally Pb-enriched forest soil. *Microb. Ecol.* 50, 496-505.

Börjesson, G., Sundh, I., Tunlid, A. & Svensson, B.H. 1998. Methane oxidation in landfill cover soils, as revealed by potential oxidation measurements and phospholipid fatty acid analyses. *Soil Biol. Biochem.* 30 (10-11), 1423-1433.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3593-3599.

Creamer, R.E., Bellamy, P., Black, H.I.J., Cameron, C.M., Campbell, C.D., Chamberlain, P., Harris, J., Parekh, N., Pawlett, M., Poskitt, J., Stone, D. & Ritz, K. 2009. An inter-laboratory comparison of multi-enzyme and multiple substrate-induced respiration assays to assess method consistency in soil monitoring. *Biol Fertil. Soils* 45, 623–633.

Degens, B.P. & Harris, J.A. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1309-1320.

Drenovsky, R.E., Steenwerth, K.L., Jackson, L.E. & Scow, K.M. 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecol. Biogeogr.* 19, 27-39.

Ehlers, K., Bünemann, E.K., Oberson, A., Frossard, E., Frostegård, Å., Yuejia, M. & Bakken, L.R. 2008. Extraction of soil bacteria from a Ferralsol. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1940-1946.

Elfstrand, S., Hedlund, K. & Mårtensson, A. 2007. Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. *Appl. Soil Ecol.* 35, 610-621.

Enwall, K., Nyberg, K., Bertilsson, S., Cederlund, H., Stenström, J. & Hallin, S. 2007. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 39, 106-115.

E.G.K. = Europeiska Gemenskapernas Kommission 2006a. Meddelande från Kommissionen till Rådet, Europaparlamentet, Europeiska Ekonomiska och Sociala Kommitten och Regionkommitten. En temainriktad strategi för markskydd. COM/2006/0231. *

E.G.K. = Europeiska Gemenskapernas Kommission 2006b. Förslag till Europaparlamentets och Rådets Direktiv om inrättande av rambestämmelser för markskydd och om ändring av direktiv 2004/35/EG. COM/2006/0232. *

Frostegård, Å., Tunlid, A. & Bååth, E. 1993. Phospholipid fatty-acid composition, biomass, and activity of microbial communities from 2 soil types experi-

mentally exposed to different heavy-metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (11), 3605-3617.

Gardi, C., Montanarella, L., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., Jolivet, C., Mulder, C., Ranjard, L., Römbke, J., Rutgers, M. & Menta, C. 2009. Soil biodiversity monitoring in Europe: ongoing activities and challenges. *Eur. J. Soil Sci.* 60 (5), 807-819.

Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24(4), 289 -300.

Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths, B.S., Rodwell, J.S., Edwards S.J., Davies, W.J., Elston, D.J. & Millard, P. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Appl. Soil Ecol.* 25, 63–84.

Hallin, S., Jones, C.M., Schloter, M. & Philippot, L. 2009. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *ISME J.* 3, 597-605.

Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., Endale, D.M., Coleman, D.C. & Whitman, W.B. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2843-2853.

Joner, E.J., Eldhuset, T.D., Lange, H. & Frostegård, Å. 2005. Changes in the microbial community in a forest soil amended with aluminium *in situ*. *Plant Soil* 275 (1-2), 295-304.

J.R.C. (Joint Research Centre) 2010. Work Programme 2010
“http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/library/jrc_soil/WP/WP2010.pdf”. 3 pp.

Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R. & Kaushik, R. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci. India* 89 (7), 1103-1112.

Kemmitt, S.J., Lanyon, C.V., Waite, I.S., Wen, Q., Addiscott, T.M., Bird, N.R.A., O'Donnell, A.G. & Brookes, P.C. 2008. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective. *Soil Biol. Biochem.* 40, 61-73.

- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B. & White, D.C. 1997. Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4), 1531-1542.
- Kirchmann, H., Persson, J. & Carlgren, K. 1994. The Ultuna Long-term Soil Organic Matter Experiment. Reports and Dissertations 17, Department of Soil Sciences, Swedish Univ. Agric. Sciences, Uppsala, Sweden. 55 pp.
- Kourtev, PS, Ehrenfeld, J.G. & Häggblom, M. 2003. Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 35, 895-905.
- Kramer, C. & Gleixner G. 2008. Soil organic matter in soil depth profiles: Distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. *Soil Biol. Biochem.* 40, 425-433.
- Liesack, W. & Dunfield, P.F. 2004. T-RFLP analysis. A rapid fingerprinting method for studying diversity, structure, and dynamics of microbial communities. *Environmental Microbiology - Methods and Protocols* (Spencer JFT och Ragout de Spencer AL, red.), pp. 23-37. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Marschner, P, Kandeler, E. & Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35, 453-461.
- Marstorp, H., Guan X. & Gong, P. 2000. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol. Biochem.* 32, 879-882.
- Mattsson, L. 2010. RAM-56 Mullhaltsförsök. Ramförsöket på Ultuna. "<http://www-mv.slu.se/vaxtnaring/forsok/RAM-56/ramallm.htm>".
- Morvan, X., Saby, N.P.A., Arrouys, D., Le Bas, C., Jones, R.J.A., Verheijen, F.G.A., Bellamy, P.H., Stephens, M. & Kibblewhite, M.G. 2007. Soil monitoring in Europe: A review of existing systems and requirements for harmonisation. *Sci. Total Environ.* 391, 1-12.
- Murata, T., Kanao-Koshikawa, M. & Takamatsu, T. 2005. Effects Of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water Air Soil Poll.* 164, 103-118.

Mårtensson, A. & Witter, E. 1990. Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil-microorganisms in a long-term field experiment, with special reference to sewage-sludge. *Soil Biol. Biochem.* 22(7), 977-982.

Persson, J. & Kirchmann, H. 1994. Carbon and nitrogen in arable soils as affected by supply of N fertilizers and organic manures. *Agric. Ecosys. Environ.* 51, 249-255.

Petersen, S.O. & Klug, M.J. 1994. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2421-2430.

Petersen, S.O., Frohne, P.S. & Kennedy, A.C. 2002. Dynamics of a soil microbial community under spring wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 826-833.

Petersen, S.O., Roslev, P. & Bol, R. 2004. Dynamics of a pasture soil microbial community after deposition of cattle urine amended with [¹³C]urea. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6363-6369.

Rethemeyer, J., Kramer, C., Gleixner, G., John, B., Yamashita, T., Flessa, H., Andersen, N., Nadeau M.J. & Grootes P.M. 2005. Transformation of organic matter in agricultural soils: radiocarbon concentration versus soil depth. *Geoderma* 128, 94-105.

Řezáčová, V., Baldrian, P., Hršelová, H., Larsen, J. & Gryndler, M. 2007. Influence of mineral and organic fertilization on soil fungi, enzyme activities and humic substances in a long-term field experiment. *Folia Microbiol.* 52 (4), 415-422.

Rinklebe, J. & Langer U. 2010. Relationship between soil microbial biomass determined by SIR and PLFA analysis in floodplain soils. *J. Soils Sediments* 10 (1), 4-8.

Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris J.A. & Wood C. 2009. Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecol. Indicators* 9 (6), 1212-1221. (Inkluderar online-material)

Schnürer, J., Clarholm, M. & Rosswall, T. 1985. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic-matter contents. *Soil Biol. Biochem.* 17(5), 611-618.

- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ Microbiol* 67(9), 4215-4224.
- Steger, K., Jarvis, Å., Smårs, S. & Sundh, I. 2003. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *J. Microbiol. Meth.* 55(2), 371-382.
- Sundh, I., Nilsson, M. & Borgå, P. 1997. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1476-1482.
- Swedling, E.-O. 1992. Analys av slam från Kungsängsverket 1968-1991. Brev till K. Carlgren, SLU, daterat 1992-12-01.
- Söderberg, K.H., Probanza, A., Jumpponen, A. & Bååth, E. 2004. The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Appl. Soil Ecol.* 25, 135-145.
- Tunlid, A. & White, D.C. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. *Soil Biochemistry Vol. 7* (Stotzky, G. & Bollag, J.-M., Red.), pp. 229-262. Marcel Dekker Inc., New York.
- Turpeinen, R., Kairesalo T. & Häggblom, M.M. 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 39-50.
- Wakelin, S.A., Chu G.X., Lardner R., Liang Y. & McLaughlin, M. 2010. A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia* 53 (2), 149-158.
- Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, JK. & Hallin, S. 2010. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Appl. Soil Ecol.* 45 (3),193-200.
- White, D.C., Stair J.O. & Ringelberg, D.B. 1996. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.* 17, 185-196.

Widmer, F., Fließbach, A., Laczkó, E., Schulze-Aurich, J. & Zeyer J. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog™-analyses. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1029-1036.

Winding, A, Hund-Rinke, K. & Rutgers, M. 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotox. Environ. Safety* 62, 230-248.

Witter, E. 1996. Soil C balance in a long-term field experiment in relation to the size of the microbial biomass. *Biol. Fertil. Soils* 23,33-37.

Witter, E., Mårtensson, A.M. & Garcia, F.V. 1993. Size of the soil microbial biomass in a long-term field experiment as affected by different N-fertilizers and organic manures. *Soil Biol. Biochem.* 25(6), 659-669.

Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D. & Tilman, D. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology* 84(8), 2042-2050.

Zelles, L. 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35, 275-294.

Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 111-129.

Zibilske, L.M., 1994. Carbon mineralization. *Methods of Soil Analysis, Part 2-Microbiological and Biochemical Properties, SSSA Book Series, volume 5* (R.W. Weaver, Red.), pp. 835–863. Soil Science Society of America, Madison, WI.

* Dokument tillgängligt via "http://ec.europa.eu/environment/soil/index_en.htm"

Appendix 1. Parvisa jämförelser (r = korrelation) mellan medelvärden i behandlingar (n) från olika analyser/metoder som använts vid skattning av biomassa inom RAM-försöket.

Pairwise Student's t correlations (r) between mean values for comparable fertiliser treatments (n) in different analyses/methods used for estimating biomass in the Ultuna frame experiment.

Variabel	Tot C (%) 2009 ^a	Tot N (%) 2009 ^a	pH 2009 ^a	respiration 2009 ^a	basresp. 2002 ^b	SIR 2002 ^c	ergosterol 2000 ^d	dsDNA 2000 ^d	ATP 1990 ^e	FIC 1990 ^e	FIN 1990 ^e
PLFA 2009	$r=0,797^{**}$ $p=0,0033$ $n=11$	$r=0,895^{***}$ $p=0,0002$ $n=11$	$r=-0,056$ $p=0,87$ $n=11$	$r=0,900^{**}$ $p=0,0057$ $n=7$	$r=0,920^{*}$ $p=0,0093$ $n=6$	$r=0,717$ $p=0,11$ $n=6$	$r=0,668$ $p=0,073$ $n=8$	$r=0,718^{*}$ $p=0,045$ $n=8$	$r=0,691^{*}$ $p=0,018$ $n=11$	$r=0,312$ $p=0,25$ $n=11$	$r=0,618^{*}$ $p=0,043$ $n=11$
Tot C (%) 2009		$r=0,744^{**}$ $p=0,0015$ $n=15$	$r=-0,153$ $p=0,59$ $n=15$	$r=0,914^{**}$ $p=0,0040$ $n=7$	$r=0,939^{**}$ $p=0,0054$ $n=6$	$r=0,669$ $p=0,15$ $n=6$	$r=0,619$ $p=0,10$ $n=8$	$r=0,588$ $p=0,13$ $n=8$	$r=0,513$ $p=0,060$ $n=14$	$r=-0,203$ $p=0,49$ $n=14$	$r=0,295$ $p=0,31$ $n=14$
Tot N (%) 2009			$r=-0,257$ $p=0,35$ $n=15$	$r=0,797$ $p=0,032$ $n=7$	$r=0,958^{**}$ $p=0,0026$ $n=6$	$r=0,596$ $p=0,21$ $n=6$	$r=0,612$ $p=0,11$ $n=8$	$r=0,490$ $p=0,22$ $n=8$	$r=0,455$ $p=0,10$ $n=14$	$r=-0,044$ $p=0,88$ $n=14$	$r=0,302$ $p=0,29$ $n=14$
pH 2009				$r=0,402$ $p=0,37$ $n=7$	$r=-0,406$ $p=0,42$ $n=6$	$r=0,389$ $p=0,45$ $n=8$	$r=-0,202$ $p=0,63$ $n=8$	$r=0,490$ $p=0,22$ $n=8$	$r=0,439$ $p=0,12$ $n=14$	$r=0,774^{**}$ $p=0,0011$ $n=14$	$r=0,565^{*}$ $p=0,035$ $n=14$
respiration 2009					$r=0,962^{*}$ $p=0,038$ $n=4$	$r=0,952^{*}$ $p=0,048$ $n=4$	$r=0,767$ $p=0,13$ $n=5$	$r=0,922^{*}$ $p=0,026$ $n=5$	$r=0,864^{*}$ $p=0,012$ $n=7$	$r=0,804^{*}$ $p=0,029$ $n=7$	$r=0,848^{*}$ $p=0,016$ $n=8$
basresp. 2002						$r=0,669$ $p=0,22$ $n=5$	$r=0,909^{*}$ $p=0,012$ $n=6$	$r=0,567$ $p=0,24$ $n=6$	$r=0,498$ $p=0,31$ $n=6$	$r=0,077$ $p=0,89$ $n=6$	$r=0,412$ $p=0,42$ $n=6$
SIR 2002						$r=0,408$ $p=0,42$ $n=6$	$r=0,982^{***}$ $p=0,0005$ $n=6$	$r=0,967^{**}$ $p=0,0016$ $n=6$	$r=0,809$ $p=0,052$ $n=6$	$r=0,938^{**}$ $p=0,0056$ $n=6$	
ergosterol 2000							$r=0,469$ $p=0,24$ $n=8$	$r=0,461$ $p=0,25$ $n=8$	$r=0,228$ $p=0,59$ $n=8$	$r=0,434$ $p=0,28$ $n=8$	
dsDNA 2000								$r=0,979^{***}$ $p<0,0001$ $n=8$	$r=0,853^{**}$ $p=0,0071$ $n=8$	$r=0,960^{***}$ $p=0,0002$ $n=8$	
ATP 1990									$r=0,653^{*}$ $p=0,013$ $n=14$	$r=0,912^{***}$ $p<0,0001$ $n=14$	
FIC 1990											$r=0,800^{***}$ $p=0,0006$ $n=14$

* : $p=0,01-0,05$; ** : $p=0,001-0,01$; *** : $p<0,001$ ^a = denna undersökning *this experiment*; ^b = Enwall *et al.* 2007; ^c = Enwall, ej publ. *not publ.*; ^d = Marstorp *et al.* 2000; ^e = Witter *et al.* 1993

Rapporter från institutionen för mark och miljö

- 1 2009 Wiklander, G. & Aronsson, H. (Red.) Mark- och miljödagen 2009. Marken och klimatet. *Soil and Climate*.
- 2 2009 Ulén, B. & Eriksson, A. K. Observationsfält med lerjord – karakterisering av fosfors löslighet och sorption. *Observation fields with clay soils – characterisation of soil phosphorus solubility and sorption*.
- 3 2009 Bjäresten, I, Rosén, K & Jönsson, B. Erfarenheter och motåtgärder inom jordbruket i Jämtlands län efter Tjernobylnedfallet, 1986-1992. *Experiences and countermeasures in Jämtland county after Chernobyl fallout, 1986-1992*
- 4 2010 Wetterlind, J. Mätningar med Yara N-sensor för att skatta markens kvävelevererande förmåga. *Using Yara N-sensor to estimate soil nitrogen mineralisation*
- 5 2010 Mattsson, L. Geologiskt ursprung och kornstorlek avgör kalkeffekten. *Origin and size fractions of lime products determine the liming effect*.
- 6 2010 Delin, S., Stenberg, B., Nyberg, A. & Brohede, L. Potentiella mätmetoder för att uppskatta kvävegödslingsvärdet hos organiska gödselmedel. *Potential methods for estimating the nitrogen fertilization value of organic fertilizers*

xxxxxxxxxx