

METODE-METODE PENETAPAN BIOMASSA MIKROORGANISME TANAH SECARA LANGSUNG DAN TIDAK LANGSUNG: KELEMAHAN DAN KEUNGGULANNYA

Direct and Indirect Methods of Soil Microbial-Biomass Determination: Weakness and Strength

G. Djajakirana

Staf Pengajar Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

PENDAHULUAN

Dalam dua dasawarsa terakhir ini telah terjadi peningkatan minat para pakar ilmu tanah dan lingkungan dalam menentukan jumlah total mikroorganisme dalam contoh tanah. Minat tersebut muncul karena para pakar menyadari pentingnya peranan mikroorganisme tanah di dalam berbagai proses biokimia yang terjadi di dalam sistem tanah, proses retensi dan pelepasan hara serta energi dalam tanah. Setiap usaha untuk menentukan aliran hara dan energi dalam sistem tanah harus mempertimbangkan peranan dari mikroorganisme tanah.

Menurut Haris (1988) metode apapun yang dipakai untuk menghitung jumlah mikroorganisme, terdapat dua aspek dari mikroorganisme yang tidak bisa dicakup oleh perkiraan jumlahnya. Salah satu dari aspek tersebut adalah ukuran dari mikroorganisme dan jumlah jaringan bermetabolisme yang mewakilinya. Walaupun semua organisme yang dibicarakan di sini semuanya termasuk "*mikroorganisme*", tetapi ini dapat sangat menyesatkan karena pada kenyataannya sebuah *Amoeba* mempunyai paling sedikit 1000 kali lebih banyak protoplasma daripada rata-rata sebuah bakteri. Membandingkan antara fungi dengan bakteri sukar dilaksanakan karena perbedaan dalam ukuran dan morfologi. Aspek yang kedua adalah penetapan jumlah mikroorganisme tidak menyampaikan apapun mengenai aktivitasnya. Banyak sekali mikroorganisme tanah menghasilkan struktur-struktur dorman yang spesifik, dan bahkan mereka yang tidak mampu menghasilkan struktur yang demikian seringkali mampu dorman untuk waktu yang lama dengan cara mereduksi aktivitas metabolismenya sampai tingkat yang minimum yang hanya untuk mempertahankan viabilitasnya. Dua kenyataan ini telah menyadarkan para pakar bahwa jika teknik penetapan jumlah mikroorganisme dapat ditingkatkan secara dramatis, metode tersebut hanya mampu menunjukkan apa yang ada di dalam tanah, tetapi sangat sedikit memberikan informasi mengenai apa yang terjadi di dalam tanah. Sebagai hasilnya perhatian para pakar meningkat pada pengukuran

total jaringan sel mikroorganisme (biomassa) dan aktivitasnya.

Jika kita berbicara mengenai biomassa mikroorganisme tanah, maka apakah sebenarnya yang disebut biomassa mikroorganisme tanah itu? Jenkinson dan Ladd (1981) mendefinisikan biomassa mikroorganisme tanah sebagai bagian hidup dari bahan organik tanah di luar akar-akar tanaman dan fauna tanah yang lebih besar daripada *Amoeba* terbesar yang mempunyai volume kira-kira $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

Secara sederhana metode-metode yang seringkali dipakai untuk menentukan jumlah biomassa mikroorganisme tanah dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok utama yaitu:

1. Metode-metode langsung
2. Metode-metode tidak langsung

METODE-METODE LANGSUNG

Yang termasuk dalam metode-metode langsung antara lain:

- Metode-metode yang menggunakan mikroskop.

 1. Pengamatan langsung tanah tanpa pewarnaan (keadaan tanah tidak terganggu) menggunakan teknik irisan tipis.
 2. Pewarnaan tanah dan pengamatan langsung dengan mikroskop cahaya biasa ataupun dengan mikroskop fluoresen.
 3. Metode slide kontak
 4. Metode rasio - usapan
 5. *Scanning Electron Microscope* (SEM)
 6. *Transmission Electron Microscope* (TEM).

Pengukuran dengan metode-metode ini sangat melelahkan, membutuhkan tenaga yang ahli dan berpengalaman, banyak menggunakan asumsi-asumsi dan banyak menghabiskan waktu. Oleh karena itu metode pengamatan langsung memiliki banyak kelemahan. Data yang diperoleh dari hasil pengukurannya seringkali sukar diinterpretasikan. Perbedaan antara sel organisme yang hidup dengan sel organisme yang mati sulit untuk diamati,

mikroorganisme yang memiliki morfologi yang mirip dapat menyulitkan identifikasi selanjutnya. Mikroorganisme berfilamen seperti fungi sukar dihitung, serta sukar untuk mendapatkan contoh tanah yang representatif karena contoh tanah yang sedikit sekalipun dapat dipergunakan, dan kadangkala terdapat ketidakpastian bahwa semua mikroorganisme yang ada telah dihitung atau telah diukur (Frederick, 1965; Parkinson dan Paul, 1982).

Di samping kelemahan-kelemahan yang ada seperti disebut di atas, tentunya metode-metode ini juga mempunyai keunggulan-keunggulan. Beberapa keunggulan dari metode mikroskop antara lain: - Semua sel dapat dihitung, morfologi dapat dilihat, dimensi organisme dapat diukur dan hubungan spasial antara sel-sel mikroorganisme dengan partikel-partikel tanah sebagaimana mereka hidup dalam lingkungan alamnya dapat diamati.

Mikroskop elektron memperbaiki secara drastis problem resolusi yang mempersulit pembedaan antara mikroorganisme dengan bahan-bahan *inert* tanah yang muncul pada mikroskop cahaya biasa, tetapi di lain pihak juga memunculkan problem baru. Resolusi yang tinggi pada TEM menyebabkan lapangan pengamatan menjadi sangat sempit, memerlukan persiapan contoh yang rumit dan adanya gangguan dari partikel tanah akibat pemotongan oleh *mikrotom*. Penggunaan SEM nampaknya menjanjikan dalam hal resolusi, terletak antara mikroskop cahaya dengan TEM, dan kemampuannya untuk menampilkan citra secara tiga dimensi untuk pengamatan mikrohabitat, tetapi penggunaannya untuk pengamatan dalam sistem tanah masih sangat jarang (Schmidt dan Paul, 1982).

Teknik pewarnaan yang baru, terutama dalam bidang mikroskop fluoresensi dan juga kemungkinan penggunaan analisis citra dengan bantuan komputer memberikan harapan baru bagi metode mikroskop di masa mendatang.

METODE-METODE TIDAK LANGSUNG

Metode Pengkulturan

Metode pengkulturan (*Cultural Methods*; juga dikenal sebagai teknik penghitungan hidup atau *Viable Count Technique*). Beberapa metode pengkulturan antara lain adalah:

1. Metode cawan tuang (*Plate Culture Method*)
2. Metode kultur pilihan (*Elective Culture Method*)
3. Metode „Most Probable Number“ (MPN).
4. Metode Pengkayaan Tanah (*Soil Enrichment Method*)

Dalam metode pengkulturan, partikel tanah atau larutan tanah encer yang sesuai ditaruh di atas atau di dalam media padatan atau media cairan yang cocok untuk pertumbuhan dari organisme yang diteliti. Organisme yang diinokulasikan dalam media, dalam proses pertumbuhannya akan menghasilkan berbagai para-meter yang bisa diamati

secara makroskopis atau parameter lain yang dapat diukur. Parameter-parameter yang bisa diamati antara lain:

- Media menjadi keruh
- Pigmentasi yang jelas
- Produksi gas
- Perubahan media, atau
- Pembentukan koloni (materi sel).

Sebagai tambahan atau alternatif pemeriksaan mikroskopis langsung ataupun pemeriksaan makroskopis dapat dilakukan pada metode pengkulturan untuk menentukan kehidupan dalam tanah.

Metode kultur pilihan (*Elective Culture Method*) menggunakan media nutrisi khusus yang telah diadaptasikan untuk pertumbuhan mikroorganisme kelompok tertentu, oleh karena itu metode ini juga disebut „metode kultur selektif“. Metode ini agak tidak praktis dan susah untuk dipakai karena menyangkut persiapan sejumlah besar media untuk perkembangan dari berbagai kelompok fisiologis dari mikroorganisme, dan memerlukan banyak wadah untuk berbagai pengenceran.

Metode MPN atau metode pengenceran sampai tak terukur (*dilution to extinction method*) digunakan juga untuk menetapkan mikroorganisme tanah dari kelompok khusus seperti: bakteri nitrifikasi, algae atau protozoa. Masalah-masalah mengenai dispersi dan separasi masih ada dalam metode ini dan ulangan yang cukup banyak dibutuhkan untuk memperoleh hasil yang nilainya dapat diandalkan (Harris, 1988).

Metode Pengkayaan Tanah lebih banyak menentukan aktivitas dari populasi mikroorganisme tanah daripada menetapkan secara kuantitatif jumlah total mikroorganisme tanah itu sendiri (Waksman, 1952).

Metode-metode penghitungan populasi mikroorganisme tanah berdasarkan metode-metode pengkulturan juga mempunyai beberapa titik kelemahan yaitu:

- Mempunyai masalah yang berhubungan dengan dispersi dan separasi antara sel-sel mikroorganisme dengan butiran fraksi-fraksi tanah
- Mengabaikan interaksi di antara mikroorganisme bilamana mereka tumbuh pada medium yang cocok
- Antibiotika yang dihasilkan oleh berbagai kelompok mikroorganisme tanah mempunyai efek besar terhadap organisme lain, dan berbagai antagonisme ada di antara mikroorganisme tanah
- Banyak mikroorganisme tanah tidak tumbuh pada media yang digunakan pada metode pengkulturan, biasanya yang mudah sekali tumbuh pada media nutrisi buatan yang digunakan dalam metode pengkulturan adalah bakteri aerobik-heterotropik, ragi tertentu, kapang dan aktinomisetes
- Mikroorganisme yang tumbuh pada media nutrisi kaya yang biasa dipakai pada metode pengkulturan

dapat berbeda ukurannya dari mikroorganisme tanah induknya, sehingga membuat tidak mungkin menggunakan turunan pengukuran biovolume dari mikroorganisme yang dilihat dari kultur untuk diterapkan pada mikroorganisme tanah induknya di dalam tanah.

Disebabkan oleh selektivitasnya yang tinggi dan kurangnya kapasitas cakupan pada mikroorganisme yang dorman, maka metode pengkulturan biasanya menilai populasi mikroorganisme tanah jauh lebih rendah daripada kenyataan sesungguhnya yang ada di dalam tanah (Atlas, 1982). Banyak sekali sel-sel mikroorganisme tanah gagal membentuk koloni-koloni pada kondisi yang disediakan, sehingga estimasi populasi mikroorganisme berdasarkan teknik pengkulturan biasanya sepersepuluh hingga seperseratus atau kadang-kadang seperseribu lebih kecil hasilnya daripada hasil yang didapat dari pengamatan langsung dengan menggunakan mikroskop (Parkinson *et al.*, 1971; Harris, 1988).

Untuk menyatakan hasil-hasil dari pengamatan langsung dengan teknik mikroskop dan teknik pengkulturan dalam bentuk biomassa mikroorganisme tanah (bobot hidup ataupun bobot kering) maka hasil-hasil tersebut perlu dikonversikan. Konversi tersebut dilakukan dengan cara mengkombinasikan hasil penghitungan jumlah mikroorganisme tanah dengan ukuran dari mikroorganisme yang bersangkutan dan perhitungan berdasarkan kerapatan jenis (*density*) dan asumsi komposisi mikroorganisme tersebut (van Veen dan Paul, 1979; Bakken dan Olsen, 1983). Stevenson (1986) menyarankan persamaan di bawah ini untuk menghitung biomassa mikroorganisme tanah.

$$\text{Biomassa} = \text{Jumlah sel} \times \text{Volume sel} \times \text{kerapatan jenis sel}$$

Faegri *et al.* (1977) menyarankan untuk menggunakan kerapatan jenis mikroorganisme tanah sebesar 1.3 g cm^{-3} , tetapi van Veen dan Paul (1979) menemukan bahwa bakteri yang diisolasi dari tanah dan dibiakkan pada kondisi kelembaban yang setara dengan kelembaban di dalam tanah dapat memiliki kerapatan jenis yang lebih besar. Oleh karena itu Stevenson (1986) menyarankan untuk menggunakan kerapatan jenis sel-sel mikroorganisme tanah setara dengan 1.5 g cm^{-3} . Jenkinson dan Ladd (1981) menyarankan untuk menggunakan faktor koreksi berat basah ke berat kering sebesar 25%. Schmidt dan Paul (1982) merekomendasikan untuk menggunakan faktor konversi biovolume ke biomassa sebesar 0.32. Jika faktor-faktor tersebut dipergunakan ternyata hasilnya sesuai dengan hasil penemuan van Veen dan Paul (1979) untuk fungi.

Metode-metode Fisiologis

Yang dimaksud dengan metode fisiologis adalah metode-metode yang mengukur aktivitas metabolisme organisme sebagai parameter yang dapat diamati atau ditetapkan. Gas CO_2 yang dihasilkan atau gas O_2 yang dikonsumsi merupakan parameter umum yang biasanya dipakai sebagai indikator aktivitas metabolisme. Yang termasuk dalam kelompok metode-metode ini adalah:

1. Metode Respirasi Rangsangan-Substrat (*Substrate-Induced Respiration: SIR Method*)
2. Metode Simulasi Respirasi (*Respiration Simulation: RS Method*)

Metode respirasi rangsangan-substrat (*substrate-induced respiration: SIR method*)

Anderson dan Domsch (1973; 1975) menunjukkan bahwa tanah-tanah berbeda dalam tanggapannya terhadap respirasi awal bila tanah-tanah tersebut mendapat tambahan glukosa dengan konsentrasi yang optimal (konsentrasi yang optimal ini didapatkan pada uji pendahuluan untuk tiap tanah yang digunakan). Mereka menyimpulkan bahwa tanggapan pada respirasi awal (dicatat sebelum terdapat pertumbuhan dari mikroorganisme tanah yang ada akibat penambahan glukosa) dapat dipandang sebagai indeks dari total biomassa mikroorganisme tanah yang ada mula-mula. Walaupun tidak ada nilai biomassa mutlak dapat dihitung pada pengukuran seperti itu, tetapi pengukuran ini dapat dipergunakan sebagai nilai perbandingan.

Anderson dan Domsch (1978^b) mengembangkan metode yang cepat untuk tujuan penetapan jumlah karbon di dalam biomassa mikroorganisme tanah yang aktif. Metode ini didasarkan pada tanggapan respirasi awal dari populasi mikroorganisme terhadap penambahan sumber karbon dan sumber energi yang berlebihan dikuantifikasikan menggunakan versi yang diperluas dari teknik yang dikembangkan oleh Jenkinson. Perhitungan rata-rata substrat yang menghasilkan flux CO_2 dilakukan pada suhu 22°C , sedangkan penghitungan biomassa C (karbon) mikroorganisme di dalam tanah menggunakan rumus:

$$X = 40.04 y + 0.37$$

Di mana:

- X = biomassa mikroorganisme (mg C per satuan berat kering tanah)
y = kecepatan respirasi awal maksimum (mililiter CO_2 per satuan berat kering tanah per jam).

Parkinson dan Paul (1982) menyarankan beberapa pokok teknis utama yang berhubungan dengan metode ini yang harus dipertimbangkan yang antara lain adalah sebagai berikut:

1. Perhitungan yang seksama untuk menetapkan konsentrasi glukosa yang akan ditambahkan ke dalam tanah sangatlah penting.

2. Pengukuran dari flux CO₂ yang dihasilkan akibat metabolisme mikroorganisme harus dilakukan sebelum terjadi perubahan besarnya jumlah biomassa mikroorganisme tanah.
3. Hubungan kuantitatif yang diberikan di atas antara kecepatan flux CO₂ yang dihasilkan dengan biomassa C mikroorganisme hanya berlaku jika pengukuran dilakukan pada suhu 22 °C. Jika suhu lain di luar 22 °C dipergunakan, maka hubungan di atas harus dimodifikasikan.

Anderson dan Domsch (1978^b) juga membuat penelitian korelasi antara metode mereka dengan metode inkubasi fumigasi-chloroform (*Chloroform-Fumigation Incubation: CFI Method*) yang dikembangkan oleh Jenkinson dan Powlson (1976) dengan menggunakan 50 contoh tanah dari 12 jenis tanah, dan mereka mendapatkan bahwa kedua metode itu berkorelasi sangat nyata satu dengan lainnya ($r = 0.96$). Mereka menyimpulkan bahwa pada suhu 22 °C, kecepatan maksimum respirasi rangsangan-substrat dari satu ml CO₂ per jam dapat disamakan dengan kira-kira 40 mg biomassa C mikroorganisme.

Martens (1987) juga menemukan korelasi yang erat ($r = 0.98$) di antara biomassa yang diukur dengan kedua metode tersebut (*SIR* dengan *CFI*), sebaliknya Sparling (1981) tidak menemukan adanya korelasi di antara kedua metode tersebut. Alasan untuk hasil yang bertentangan ini belum diketahui, walaupun demikian ada kemungkinan hal tersebut disebabkan oleh beberapa contoh tanah yang dipergunakan oleh Sparling mengandung bahan organik tinggi dan bereaksi masam, yang telah diketahui bahwa tanah-tanah seperti itu untuk metode *CFI* menghasilkan hasil yang kurang dapat diandalkan. Martens (1987) menambahkan bahwa Sparling membiarkan CO₂ terakumulasi selama inkubasi, suatu tehnik yang dapat menyebabkan hasil yang lebih rendah untuk beberapa jenis tanah.

Sebagai prasyarat penggunaan dari tanggapan awal maksimum untuk pengukuran biomassa, dua kondisi harus dipenuhi yaitu:

1. sebuah substrat harus dipilih yang dapat tersedia bagi mayoritas mikroorganisme tanah.
2. sebuah konstanta harus diturunkan yang memungkinkan konversi pengukuran metabolisme relatif ke dalam biomassa mikroorganisme.

Substrat yang paling sering dipergunakan pada metode respirasi rangsangan-substrat (*SIR*) adalah glukosa, walaupun tidak semua biomassa mikroorganisme tanah memberikan tanggapan terhadap penambahan glukosa di bawah kondisi pengukuran dengan metode *SIR*. Smith *et al.* (1986) menemukan bahwa lebih banyak CO₂ dilepaskan dari glukosa yang ditambahkan kaldu nutrisi daripada hanya glukosa saja dan mereka menunjukkan bahwa CO₂ tambahan itu bukan berasal dari glukosa. Diduga substrat

yang ada dalam kaldu dimetabolisme oleh sebagian mikroorganisme yang tidak memberikan tanggapan terhadap pemberian glukosa. Sebuah asumsi yang secara implisit ada dalam metode *SIR* untuk pengukuran biomassa C mikroorganisme tanah adalah sebuah fraksi yang konstan dari mikroorganisme tanah memberikan tanggapan yang sama terhadap pemberian glukosa pada berbagai macam tanah, tetapi Anderson dan Domsch (1978^b) menemukan bahwa pola dari tanggapan populasi mikroorganisme tanah terhadap pemberian glukosa berbeda-beda di antara berbagai macam tanah.

Pengukuran dengan metode *SIR* dapat dilakukan secara otomatis. Brook dan Paul (1987) membuat sistem *sampling* yang otomatis penuh dikombinasikan dengan Gas Chromatografi dan komputer pengontrol dapat mengukur respirasi tanah secara berkesinambungan (*continuous*, 1 sampai 36 contoh). Heinemeyer *et al.* (1989) juga membuat alat yang serupa untuk mengukur respirasi tanah dan biomassa mikroorganisme tanah secara berkesinambungan berdasarkan analisis gas dengan infra merah dengan alat pengontrol yang dikendalikan komputer yang memungkinkan pengukuran setiap jam sekali sampai 24 contoh tanah jika interval pengukuran disetel setiap 2.5 menit. Dengan alat mereka ini, mereka mengukur biomassa mikroorganisme empat macam tanah dan kemudian membandingkan hasilnya dengan metode *CFI*, dan mendapatkan bahwa hasil kedua metode sangat mirip ($r=0.92$).

Kaiser *et al.* (1992) dengan menggunakan alat dari Heinemeyer *et al.* (1989) mengukur 27 macam contoh tanah mendapatkan hasil biomassa mikroorganisme tanah lebih besar daripada yang didapat dengan metode *CFI*. Walaupun demikian hasil kedua metode tersebut masih memiliki index korelasi yang tinggi, sehingga mereka menyarankan menggunakan nilai konstanta = 30 daripada 40.04. Sparling *et al.* (1990) berdasarkan pelepasan ¹⁴C dari mikroorganisme tanah yang dilabel *in situ* dengan ¹⁴C-glukosa, menggunakan nilai konstanta = 50 untuk menghitung biomassa C mikroorganisme tanah dengan metode *SIR*. Sebuah ciri penting dari sistem pengukuran otomatis adalah pengaliran gas secara berkesinambungan dari contoh yang dianalisis. Sebagaimana telah dijelaskan oleh Martens (1987), estimasi biomassa C mikroorganisme tanah mungkin tergantung pada tipe aerasi contoh. Dia menemukan bahwa pengaliran gas yang tidak berkesinambungan seperti pada metode *SIR* yang asli (Anderson dan Domsch, 1978^b), menyebabkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan sistem otomatis dan metode *CFI*. Hal ini antara lain disebabkan oleh akumulasi gas CO₂ pada fase cairan selama masa inkubasi, terutama terjadi pada tanah-tanah netral dan alkalin.

Pengukuran dengan metode respirasi rangsangan-substrat (*SIR*) harus dikalibrasikan terhadap metode lain seperti metode inkubasi fumigasi-chloroform (*CFI*), kandungan ATP atau dengan pengamatan langsung dengan mikroskop, jika metode ini akan dipakai untuk mengukur

biomassa mikroorganisme tanah. Lebih banyak pekerjaan diperlukan pada uji kalibrasi, terutama jika melihat ketidaksesuaian hasil-hasil yang didapat di antara para peneliti yang menggunakan metode ini (Sparling *et al.*, 1986; Martens, 1987).

Metode simulasi respirasi (*respiration simulation: RS method*)

Van der Werf dan Verstraete (1987^a) mengajukan sebuah metode baru untuk mengestimasi komponen yang aktif dari biomassa mikroorganisme tanah. Metode ini berdasarkan pada analisis kinetika respirasi dari tanah yang ditambahkan dengan sumber karbon yang segera dapat terdekomposisikan. Parameter biokinetika yang merupakan ciri-ciri biomassa mikroorganisme tanah diestimasi dari kurva respirasi dengan menggunakan simulasi matematika. Model matematika akan dihitung berdasarkan parameter biokinetika sebagai berikut:

- Kecepatan pertumbuhan khas maksimum
- Afinitas substrat
- Koefisien hasil pertumbuhan biomassa
- Koefisien pemeliharaan biomassa

Van der Werf dan Verstraete (1987^b) menggunakan model simulasi ini pada berbagai jenis tanah dan kemudian membuat korelasi antara konsumsi O₂ atau produksi CO₂ selama 10 jam dengan biomassa mikroorganisme tanah yang aktif. Dengan cara ini, prosedur untuk menetapkan biomassa mikroorganisme tanah yang aktif dapat disederhanakan dengan hanya mengukur konsumsi oksigen total atau produksi CO₂ selama 10 jam, dan mereka menemukan hubungan antara konsumsi O₂ atau produksi CO₂ selama 10 jam dengan biomassa mikroorganisme tanah yang aktif melalui persamaan:

$$X_0 = 0.788 Y_{O_2, 10}$$

Di mana:

X₀ = biomassa aktif mikroorganisme (mg berat kering biomassa per kg tanah basah).

Y_{O₂, 10} = konsumsi rata-rata O₂ selama 10 jam inkubasi (mg O₂ kg⁻¹ tanah basah per 10 jam).

Persamaan ini didasarkan pada data konsumsi O₂ yang bervariasi antara 3.5 – 350 mg O₂ per kg berat tanah basah per 10 jam. Persamaan dalam bentuk ini hanya berlaku untuk suhu inkubasi pada 20 °C, dan hubungan antara produksi CO₂ dengan biomassa mikroorganisme tanah yang aktif dinyatakan melalui persamaan:

$$X_0 = 0.283 Y_{CO_2, 10}$$

Di mana:

X₀ = biomassa aktif mikroorganisme (mg berat kering biomassa per kg tanah basah).

Y_{CO₂, 10} = produksi rata-rata CO₂ selama 10 jam inkubasi (mg CO₂ kg⁻¹ tanah basah per 10 jam).

Dari hasil-hasil penelitian mereka, van der Werf dan Verstraete (1987^b) menyimpulkan bahwa komunitas mikroorganisme tanah nampaknya sangat bervariasi dalam hubungannya dengan: afinitas terhadap substrat, koefisien pemeliharaan, dan terutama jumlah dari komponen biomassa yang aktif. Pada lahan pertanian jumlah komponen biomassa yang aktif rata-rata dapat mencapai 50 % dari total biomassa mikroorganisme. Pada ladang gandum, biomassa aktif (bukan biomassa total) sangat nyata dipengaruhi oleh pertumbuhan dari tanaman gandum. Dari tanah-tanah yang mereka amati, ternyata komposisi biomassa aktif bervariasi antara 4 hingga 49 % dari total biomassa mikroorganisme tanah.

Van der Werf dan Verstraete (1987^b) menganalisis kurva-kurva respirasi dari berbagai contoh tanah yang diberi perlakuan fumigasi dan rekolonisasi, dan mendapatkan bahwa komunitas mikroorganisme tanah telah mengalami pergeseran kepada kecepatan pertumbuhan yang lebih tinggi dan afinitas terhadap substrat yang lebih rendah. Mereka menyarankan hubungan stokiometri untuk tanah-tanah yang telah difumigasi dan direinokulasi untuk menghubungkan konsumsi O₂ dengan biomassa total mikroorganisme. Mereka juga memverifikasi konsep di belakang teknik fumigasi-inkubasi untuk mengukur biomassa total mikroorganisme dalam sebuah cara yang bebas dalam artian menggunakan model matematika secara penuh, dan mereka menemukan bahwa ada korelasi yang sangat baik antara biomassa total mikroorganisme yang ditetapkan dengan metode CFI dengan yang dihitung berdasarkan analisis matematika dari kurva respirasi. Sebuah versi modifikasi dari metode simulasi telah diajukan untuk mengestimasi baik biomassa aktif maupun biomassa total mikroorganisme dengan tes respirasi secara paralel.

Alef (1991) menelaah metode-metode fisiologis dan dia menyatakan bahwa perubahan dalam parameter-parameter fisiologis tidak harus diikuti oleh perubahan dalam biomassa mikroorganisme, oleh karena itu penggunaan parameter seperti itu untuk mengukur biomassa mikroorganisme di dalam tanah hanya berlaku untuk kondisi-kondisi tertentu saja. Dengan penetapan biomassa mikroorganisme tanah, mikroorganisme tanah akan dipandang sebagai sebuah kesatuan, walaupun dalam kenyataannya berbagai kelompok mikroorganisme yang berbeda baik dalam hal sifat fisiologis maupun morfologisnya berhubungan satu dengan lainnya dan mereka terjerat kuat pada mineral liat, hidup dalam tanah.

Metode-metode Fumigasi

Metode-metode ini umumnya mempergunakan chloroform untuk memfumigasi contoh tanah. Yang termasuk dalam metode ini antara lain adalah:

1. Metode Inkubasi Fumigasi-Chloroform (*Chloroform Fumigation Incubation: CFI Method*)
2. Metode Ekstraksi Fumigasi-Chloroform (*Chloroform Fumigation Extraction: CFE Method*)

Metode inkubasi fumigasi - chloroform (*chloroform fumigation incubation: CFI method*)

Penggunaan bahan kimia sebagai fumigan untuk mengontrol patogen tanaman yang berasal dari tanah telah secara drastis mengubah metabolisme tanah. Fenomena ini telah lama diketahui sejak awal abad ini. Banyak tulisan ilmiah mengenai hal ini telah dipublikasikan (Darbyshire dan Russell, 1907; Russell dan Hutchinson, 1909; dalam Waksman dan Starkey, 1923^{a,b}) dan secara tetap tentu masih dilaporkan hingga kini.

Jika tanah difumigasi, kecepatan respirasi tanah tersebut segera setelah fumigan dibuang akan lebih kecil daripada tanah yang tidak difumigasi. Beberapa waktu kemudian, kecepatan respirasi tanah yang difumigasi tersebut akan meningkat dengan pesat mencapai nilai melebihi nilai respirasi tanah yang tidak difumigasi dan kemudian menurun lagi. Dengan demikian untuk waktu yang singkat tanah yang difumigasi mengkonsumsi O₂ lebih banyak daripada tanah yang tidak difumigasi atau dengan kata lain terdapat evolusi CO₂ yang melebihi normal secara sementara pada tanah yang sebelumnya mengalami fumigasi [banjiran (*flush*) CO₂ akibat dekomposisi]. Jenkinson (1966) menyimpulkan bahwa banjir CO₂ akibat dekomposisi dalam jumlah besar adalah hasil dari dekomposisi sel-sel mikroorganisme yang terbunuh oleh fumigasi. Dia menyarankan bahwa banjir CO₂ akibat dekomposisi ini dapat dipergunakan sebagai sebuah perkiraan untuk mengukur biomassa mikroorganisme tanah dengan menggunakan hubungan persamaan sebagai berikut:

$$B_C = F_C/k_C$$

Di mana:

- B_C : biomassa karbon tanah.
- F_C : CO₂-C yang dievolusikan oleh tanah yang difumigasi dikurangi CO₂-C yang dievolusikan oleh tanah yang tidak difumigasi yang diinkubasi pada waktu dan kondisi yang sama.
- k_C : fraksi dari biomassa C yang dimineralisasikan menjadi CO₂ selama inkubasi setelah tanah difumigasi.

Dua kondisi utama merupakan hal yang sangat penting untuk ketepatan metode ini. Pertama, fraksi *k*, yang dapat diturunkan dari percobaan dengan cara menentukan persentase karbon mikroorganisme yang telah diketahui jumlahnya yang dimineralisasikan di dalam tanah yang telah difumigasi, harus kira-kira sama dengan nilai sebuah

konstanta. Kedua, uap chloroform (CHCl₃) yang dipergunakan untuk membunuh mikroorganisme harus tidak mengubah susunan residu karbon yang berhubungan dengan sel-sel yang mati, seperti misalnya membuat residu tersebut menjadi lebih mudah termineralisasikan.

Sejumlah asumsi pokok menjadi dasar dari metode ini. Asumsi-asumsi yang menjadi dasar metode fumigasi-inkubasi diringkas oleh Jenkinson dan Ladd (1981) sebagai berikut:

1. Karbon dalam mikroorganisme yang telah mati lebih cepat termineralisasikan daripada yang ada di dalam organisme yang hidup.
2. Semua mikroorganisme terbunuh selama proses fumigasi.
3. Kematian dari mikroorganisme pada tanah yang tidak difumigasi (kontrol) dapat diabaikan dibandingkan pada tanah yang difumigasi.
4. Satu-satunya efek dari fumigasi hanyalah membunuh biomassa mikro-organisme.
5. Fraksi dari biomassa C yang mati yang termineralisasikan untuk waktu yang ditetapkan adalah sama untuk semua jenis tanah.

Tentu, tidak semua peneliti setuju dengan asumsi-asumsi ini. Shields *et al.* (1974) menyatakan bahwa fumigasi dengan chloroform, walau memang membunuh mikroorganisme, tetapi juga mengubah senyawa metabolik tertentu diluar sel (*extra cellular*) mikroorganisme dan senyawa C-organik pada sistem non-kehidupan sehingga senyawa-senyawa tersebut menjadi lebih mudah terdekomposisi. Powlson dan Jenkinson (1976) menemukan bahwa pada penambahan glukosa yang sama, banjir CO₂ yang ditandai dengan ¹⁴C akibat dekomposisi karena fumigasi pada tanah masam hanya separuh daripada yang terdapat di tanah netral, sehingga lebih sedikit bahan organik yang telah ditandai yang dapat dianggap menyumbang dekomposisi oleh fumigasi pada tanah masam. Menurut mereka, ada dua kemungkinan yang dapat dijadikan alasan mengapa tanah masam memberikan hasil banjir CO₂ yang lebih rendah bila tanah difumigasi, yaitu pertama, fumigasi tidak melepaskan banyak substrat yang mudah terdekomposisi dan kedua, proses dekomposisi dari substrat yang dilepas oleh fumigasi terhambat di bawah keadaan masam.

Hasil penelitian Shield *et al.* (1974), menunjukkan bahwa jumlah fungi, bakteri dan aktinomisetes yang mampu membentuk koloni pada metode cawan tuang menurun 90 hingga 100% akibat fumigasi dengan chloroform (juga hasil penelitian Lynch dan Panting, 1980; dan McGill *et al.*, 1986).

Persamaan $B_C = F_C/k_C$ menunjukkan, bahwa nilai *k_C* yang dipergunakan di sini memiliki nilai yang sangat penting. Jenkinson (1976) menghitung $k_C = 0.50 \pm 0.08$ pada suhu 25 °C, sedangkan Anderson dan Domsch (1978^a) menghitung nilai rata-rata tertimbang *k_C* sebesar 0.41 pada suhu 22 °C. Voroney dan Paul (1984) juga menemukan

nilai *in situ* k_C sebesar 0.41 pada suhu 21 °C. Nicolardot *et al.* (1986) menemukan nilai k_C antara 0.38 hingga 0.43 untuk *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan *in vitro* dengan ^{14}C -glukosa dan $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan ditumbuhkan pada tiga jenis tanah. Jenkinson dan Ladd (1981) menyarankan nilai untuk $k_C = 0.45$ pada 25 °C cocok dengan data yang telah dipublikasikan. Telah banyak diperdebatkan bahwa penggunaan nilai k_C yang berlaku untuk semua jenis tanah dapat menuntun kepada kesalahan, tetapi penelitian Anderson dan Domsch (1978^a) menunjukkan bahwa nilai k_C baik untuk bakteri maupun fungi tidak menyebar jauh satu dengan yang lain. Jika terdapat kesamaan pola distribusi dari berbagai tipe mikroorganisme di dalam tanah di antara berbagai jenis tanah yang berbeda, maka sebuah nilai k_C sangatlah berguna. Parkinson dan Paul (1982) menyarankan, bila tanah sangat masam dipelajari, maka nilai k_C lebih kecil dari 0.50 haruslah dipergunakan.

Metode *CFI* mungkin tidak memberikan hasil yang dapat diandalkan bila dipergunakan pada tanah-tanah yang baru saja mendapat tambahan bahan organik segar. Bila mempelajari tanah-tanah *calcareous* (tanah-tanah yang mengandung banyak CaCO_3 bebas), haruslah diingat bahwa dekomposisi dari bikarbonat dapat menyebabkan kesalahan pengukuran. Kesalahan ini dapat dikurangi dengan cara menempatkan gelas piala yang diisi dengan 25 g kapur soda di dalam eksikator tempat menginkubasikan contoh tanah (baik yang difumigasi maupun kontrol) (Martens, 1985). Contoh tanah untuk penetapan biomassa mikroorganisme tanah janganlah dikering-udarkan sebelum pengukuran dilakukan, sebab mengering-udarkan tanah dapat menyebabkan senyawa C-organik non-biomassa menjadi mudah terdekomposisi dan akan membunuh sebagian dari biomassa mikroorganisme tanah (Shen *et al.*, 1987). Metode fumigasi-inkubasi juga memberikan hasil yang kurang dapat diandalkan pada tanah-tanah tergenang (Inubushi *et al.*, 1989), atau pada tanah-tanah dengan pH di bawah 4.5 (Vance *et al.*, 1987^a).

Melakukan prainkubasi dari contoh tanah sebelum pengukuran biomassa tanah akan meningkatkan kualitas data yang diperoleh, sebab prainkubasi akan menghindarkan pengaruh-pengaruh dari suplai substrat yang mungkin berasal dari potongan akar segar (Sparling *et al.*, 1985); menghilangkan pengaruh dari proses pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan (gangguan pada contoh tanah seperti pembasahan dan pengeringan) (Jenkinson, 1988; Ross dan Tate, 1984; Shen *et al.*, 1987), tetapi bila penelitian tersebut membutuhkan data biomassa mikroorganisme tanah pada saat pengambilan contoh, maka tehnik prainkubasi ini tidak dapat diterapkan.

Metoda *CFI* telah dipergunakan secara luas sejak diperkenalkan dan hasil-hasil yang diperoleh telah sesuai dengan hasil-hasil pengukuran yang diperoleh dari pengamatan langsung dengan mikroskop (Jenkinson *et al.*, 1976; Vance *et al.*, 1987^a). Biomassa C hasil pengukuran dapat dikonversikan menjadi total biomassa dengan

mengasumsikan bahwa biomassa mikroorganisme tanah mengandung kira-kira 45% C berdasarkan bobot kering.

Metode ekstraksi fumigasi-chloroform (*chloroform fumigation extraction: CFE method*)

Jenkinson (1976) telah mendiskusikan, bahwa di samping inkubasi, terdapat kemungkinan untuk proses ekstraksi setelah proses fumigasi. Powlson dan Jenkinson (1976) menemukan bahwa terdapat korelasi yang erat antara karbon (C) yang dapat diekstraks dengan 0.5 M K_2SO_4 dengan banjir CO₂ setelah perlakuan fumigasi-inkubasi. Voroney (1983, dalam Jenkinson, 1988) menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang erat antara biomassa C dengan C yang dianggap terekstrak oleh larutan K_2SO_4 setelah fumigasi. Vance *et al.* (1987^b) menunjukkan bahwa biomassa C (B_C) dapat diperkirakan dari persamaan:

$$B_C = F_C \cdot E_C$$

Di mana:

E_C = selisih antara C-organik terekstrak oleh 0.5 M K_2SO_4 dari tanah yang difumigasi dengan tanah yang tidak difumigasi.

F_C = faktor proporsionalitas yang ditetapkan secara empirik

Mereka juga menemukan bahwa terdapat hubungan linier yang erat antara biomassa C mikroorganisme yang diukur dengan metoda *CFI* dengan E_C ($r^2 = 0.986$). Dari hubungan ini mereka dapat menghitung F_C dan mendapatkan $F_C = 2.64 \pm 0.06$. Sparling dan West (1988) mengkalibrasikan metode CFE dengan biomassa mikroorganisme yang ditetapkan dengan metode SIR dan juga dengan pelepasan ^{14}C oleh mikroorganisme yang diberi label *in situ* dengan ^{14}C -glukosa, dan menemukan bahwa kedua metode tersebut memberikan nilai kalibrasi yang serupa untuk 26 contoh tanah mineral yang mempunyai kadar C dan pH yang berbeda-beda. Mereka menyarankan nilai $F_C = 3.03 \pm 0.78$. Nilai yang sama juga disarankan oleh Tate *et al.* (1988). Nilai ini dapat diterapkan pada tanah-tanah dengan pH rendah tetapi kurang cocok untuk contoh tanah yang mempunyai kadar bahan organik > 10% atau untuk bahan serasah (bahan dari horison O). Sparling *et al.* (1990) menerapkan metode CFE untuk mengestimasi biomassa mikroorganisme tujuh macam tanah yang mengandung bahan organik sampai 47%, dan kemudian membandingkan hasilnya dengan biomassa C mikroorganisme yang diukur dengan metode SIR yang telah dimodifikasi, juga dibandingkan dengan sel-sel mikroorganisme yang dilabel *in situ* dengan ^{14}C -glukosa. Mereka menemukan $F_C = 2.70$ untuk metode SIR yang dimodifikasi dan $F_C = 2.38$ untuk metode dengan ^{14}C -glukosa. Dengan mengambil kemungkinan bahwa mereka mendapatkan hasil pengukuran biomassa mikroorganisme lebih rendah dari perkiraan pada

kalibrasinya, nilai $F_C = 2.86$ disarankan sebagai nilai faktor F_C yang paling mewakili bagi tanah-tanah di New Zealand.

Semua peneliti yang disebut di atas mengukur hasil ekstraksi C-nya dengan metode pencernaan dichromat (*dichromate digestion method*). Wu *et al.* (1990) menggunakan sistem pengukuran otomatis menggunakan persulfat dan oksidasi ultra violet, mengukur hasil ekstraksi C dengan K_2SO_4 pada berbagai selang konsentrasi C dari tanah yang difumigasi dan yang tidak difumigasi, mendapatkan rata-rata 20 % lebih tinggi organik C terukur dibandingkan dengan metode dichromat. Mereka menunjukkan adanya hubungan linier yang sangat erat ($r=0.997$) antara C yang diukur dengan kedua metode tersebut, hal ini menunjukkan bahwa kesalahan pada metode dichromat adalah konsisten. Disebabkan oleh efisiensi yang lebih tinggi dari metode ultra violet – persulfat maka mereka menyarankan faktor $F_C = 2.64$ pada metode CFE yang asli diubah menjadi faktor $F_C = 2.22$. Dengan perubahan ini persamaan menjadi $B_C = 2.22 E_C$ mereka mendapatkan hubungan linier 1:1 yang sangat erat antara biomassa mikroorganisme yang diukur dengan CFI dengan CFE ($B_C CFE = 0.99 \pm 0.02 B_C CFI$; $r = 0.99$).

Metode CFE menawarkan beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode CFI. Pengukuran biomassa C dan N dengan metode CFE dapat dilakukan: pada selang pH yang sangat lebar (Vance *et al.*, 1987^a), pada tanah yang mengandung bahan organik yang sedang aktif terdekomposisi (Ocio dan Brooks, 1990), pada contoh tanah yang baru saja diambil. Keadaan yang baru disebut ini adalah keadaan di mana metode CFI memberikan hasil yang kurang dapat diandalkan. Hasil pengukuran biomassa yang dapat diandalkan dengan metode CFE juga telah dilaporkan pada tanah-tanah tergenang (Inubushi *et al.*, 1989). Metode CFE juga cocok untuk dipergunakan pada penelitian yang menggunakan isotop untuk pelabelan. Metode CFE mempunyai keunggulan bahwa biomassa yang diberi label isotop yang berkembang sebagai substrat yang kemudian terdekomposisi dapat diukur, hal ini sangat tidak mungkin dengan metode CFI (Wu *et al.*, 1989).

KESIMPULAN

Dari uraian di atas maka dapat disimpulkan, bahwa banyak metode yang dapat dipakai untuk pengukuran biomassa mikroorganisme tanah, tetapi masing-masing metode memiliki kelemahan dan keunggulan masing-masing. Pemilihan tiap metode hendaknya didasarkan pada kebutuhan dan tujuan penelitian, tersedianya peralatan dan penguasaan metode tersebut.

Metode yang memiliki banyak keunggulan dan relatif mudah dilakukan dan tidak memerlukan peralatan yang canggih, sampai saat ini adalah metode CFE, walaupun demikian metode ini juga tidak luput dari kelemahan. Salah satu kelemahan metode CFE adalah menganggap biomassa mikroorganisme tanah sebagai suatu kesatuan,

sehingga tidak dapat memisah-misahkan kelompok-kelompok mikroorganisme yang ada. Pada kenyataannya mikroorganisme tanah sangatlah beragam baik fungsi maupun morfologinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alef, K. 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Ecomed. 284 pp.
- Anderson, J.P.E., and K.H. Domsch. 1973. Quantification of bacterial and fungal contribution to soil respiration. *Arch. Mikrobiol.*, 93:113-127.
- Anderson, J.P.E., and K.H. Domsch. 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Can. J. Microbiol.*, 21:314-322.
- Anderson, J.P.E., and K.H. Domsch. 1978^a. Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10:207-213.
- Anderson, J.P.E., and K.H. Domsch. 1978^b. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10:215-221.
- Atlas, R.M. 1982. Enumeration and estimation of microbial biomass. In R.G. Burns and J.H. Slater (eds.). *Experimental Microbial Ecology*. Blackwell, Oxford. p. 85-102.
- Bakken, L.R., and R.A. Olsen. 1983. Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: Conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1188-1195.
- Brooks, P.D., and E.A. Paul. 1987. A new automated technique for measuring respiration in soil samples. *Plant and Soil*, 101:183-187.
- Faegri, A., V.L. Torsvik, and J. Goksöyr. 1977. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractional centrifugation technique. *Soil Biol. Biochem.*, 9:105-112.
- Frederick, L.R. 1965. Microbial Populations by Direct Microscopy. In C.A. Black (ed.). *Methods of Soil Analysis*. Vol. 2. Agronomy Series No. 9. ASA. Madison. p. 1452-1459.
- Harris, P.J. 1988. Ecology of the Soil Population. In A. Wild. (ed.). *Russell's Soil Condition and Plant Growth*. 11th ed. Longman Scientific & Technical. p. 472-499.
- Heinemeyer, O., H. Insam, E.A. Kaiser, and G. Walenzik. 1989. Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil*, 116:191-195.
- Inubushi, K., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1989. A comparison of the fumigation-extraction, fumigation-incubation and ATP methods for measuring microbial biomass in waterlogged soils. 5th International Symposium on Microbial Ecology, Kyoto, Japan. Abstract 69.
- Jenkinson, D.S. 1966. Studies on the decomposition of plant material in soil - II. Partial sterilisation of soil and the soil biomass. *J. Soil Sci.*, 17:280-302.

- Jenkinson, D.S. 1988. Determination of Microbial Biomass Carbon and Nitrogen in Soil. In J. R. Wilson (ed.). Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems. CAB International, Wallingford GB, p 368-386.
- Jenkinson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 8:203-208.
- Jenkinson, D.S., and D. S. Powlson. 1976. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil - V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8:209-213.
- Jenkinson, D.S., D.S. Powlson, and R.W.M. Wedderburn. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil.- III. The relationship between soil biovolume measured by optical microscopy, and the flush of decomposition caused by fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 8:189-202.
- Jenkinson, D.S., and J.N. Ladd. 1981. Microbial Biomass in Soil, Measurement and Turnover. In E.A. Paul and J.N. Ladd (eds.). Soil Biochemistry. Vol. 5. Dekker, New York. p. 415-472.
- Kaiser, E.A., T. Mueller, R.G. Joergensen, H. Insam, and O. Heinemeyer. 1992. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relation-ship with soil texture and organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 24:675-683.
- Lynch, J.M., and L.M. Panting. 1980. Cultivation and the soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 12:29-33.
- Martens, R. 1985. Limitations in the application of the fumigation technique for biomass estimation in amended soils. *Soil Biol. Biochem.*, 17:57-63.
- Martens, R. 1987. Estimation of microbial biomass in soil by the respiration method: importance of soil pH and flushing methods for measurement of respired CO₂. *Soil Biol. Biochem.*, 19:77-81.
- McGill, W.B., K.R. Cannon, J.A. Robertson, and F.D. Cook. 1986. Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic C in Breton L after 50 years of cropping to two rotations. *Can. J. Soil Sci.*, 66:1-19.
- Nicolardot, B., G. Guiraud, R. Chaussod, and G. Catroux. 1986. Mineralisation dans les sols de materiaux microbiens marquer au carbone 14 et l'azote 15: Quantification de l'azote de la biomasse microbienne. *Soil Biol. Biochem.* 18:263-273.
- Ocio, J.A., and P.C. Brookes. 1990. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. *Soil Biol. Biochem.*, 22:685-694.
- Parkinson, D.T., T.R.G. Gray, and S.T. William. 1971. Methods for Studying the Ecology of Soil Micoorganisms. Blackwell, Oxford.
- Parkinson, D., and E.A. Paul. 1982. Microbial Biomass. In A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agronomy Series No. 9. ASA, SSSA. Madison. p.821-830.
- Powlson, D.S., and D.S. Jenkinson. 1976. The effect of biocidal treatment on metabolism in soil-II. Gamma irradiation, autoclaving, air drying and fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 8:179-188.
- Ross, D.J., and K.R. Tate. 1984. Microbial biomass in soil: Effect of some experimental variables on biochemical estimations. *Soil Biol. Biochem.*, 16:161-167.
- Schmidt, E.L., and E.A. Paul. 1982. Microscopic Methods for Soil Microorganisms. In A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agronomy Series No. 9. ASA, SSSA. Madison. p.803-814.
- Shen, S.M., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1987. Soil respiration and the measurement of microbial biomass carbon by the fumigation technique in fresh and air-dried soil. *Soil Biol. Biochem.*, 19:153-158.
- Sparling, G.P. 1981. Microcalorimetry and other methods to assess biomass and activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 13:93-98.
- Sparling, G.P., A.W. West, and K.N. Whale. 1985. Interference of plant root in the estimation of soil microbial ATP, C, N, and P. *Soil Biol. Biochem.*, 17:275-278.
- Sparling, G.P., T.W. Speir, and K.N. Whale. 1986. Changes in microbial biomass C, ATP content, soil phospho-monoesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 18:363-370.
- Sparling, G.P., and A.W. West. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration *in situ* using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. *Soil Biol. Biochem.*, 20:337-343.
- Sparling, G.P., C.W. Feltham, J. Reynolds, A.W. West, and P. Singleton. 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the *k_{EC}*-factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22:301-307.
- Smith, J.L., B.L. McNeal, H.H. Cheng, and G.S. Chambell. 1986. Calculation of microbial maintenance rates and net nitrogen mineralization in soil at steady state. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 50:332-338.
- Shield, J.A., E.A. Paul, and W.E. Lowe. 1974. Factors influencing the stability of labelled microbial materials in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 6:31-37.
- Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 380 pp.
- Tate, K.R., D.J. Ross, and C.W. Feltham. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 20:329-335.
- Van De Werf, H., and W. Verstraete. 1987^a. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: Development and verification of the model. *Soil Biol. Biochem.*, 19:253-260.
- Van De Werf, H., and W. Verstraete. 1987^b. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: Calibration of the test procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 19:261-265.

- Van De Werf, H., and W. Verstraete. 1987^c. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: Relation to conventional estimation of total biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19:267-271.
- Van Veen, J.A., and E.A. Paul. 1979. Conversion of biovolume measurements of soil organisms, grown under various moisture tensions, to biomass and their nutrient content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:686-692.
- Vance, E.D., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1987^a. Microbial biomass measurement in forest soils: the use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. *Soil Biol. Biochem.*, 19:697-702.
- Vance, E.D., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1987^b. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19:703-707.
- Voroney, R.P., and E.A. Paul. 1984. Determination of k_C and k_N *in situ* for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biol. Biochem.*, 16:9-14.
- Waksman, S.A., and R.L. Starkey. 1923^a. Partial sterilisation of soil, microbial activities, and soil fertility I. *Soil Sci.*, 16:137-157.
- Waksman, S.A., and R.L. Starkey. 1923^b. Partial sterilisation of soil, microbial activities, and soil fertility II. *Soil Sci.*, 16:257-268.
- Waksman, S.A. 1952. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York. Chapman & Hall, Limited, London. 356 pp.
- Wu, J., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1989. Measuring the dynamics of the turnover of biomass carbon in soil. 5th International Symposium on Microbial Ecology, Kyoto, Japan. Abstract 148.
- Wu, J., R.G. Joergensen, B. Pommerening, R. Chaussod, and P.C. Brookes. 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 22:1167-1169.
-