

UWAGI DOTYCZĄCE OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZ W GLEBACH TESTEM TTC – FORMAZAN

Kazimierz Januszek, Ewa Błońska, Piotr Stanik

Katedra Gleboznawstwa Leśnego, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
Al. 29 Listopada 46, 31-425 Kraków
e-mail: rljanusz@cyf-kr.edu.pl

Streszczenie. Oznaczono aktywności dehydrogenaz (ADh) w glebach metodą Lenharda z zastosowaniem oryginalnej procedury Casida i in. (1964) oraz modyfikacji tej procedury polegającej na użyciu Na_2CO_3 lub $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zamiast CaCO_3 jak również metodą Thalmanna. Zbadano również pH suspensji. Najniższe wartości ADh otrzymano metodą Thalmanna, wyższe metodą Lenharda. Najniższe koncentracje formazanu otrzymano po zastosowaniu CaCO_3 , wyższe po zastosowaniu Na_2CO_3 , a najwyższe po zastosowaniu $\text{Ca}(\text{OH})_2$. W większości przypadków oznaczone wartości ADh w badanych glebach nie były proporcjonalne między poszczególnymi metodami. Użycie CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ jak również buforu w metodzie Thalmanna, w większości badanych gleb nie gwarantowało pH optymalnego ADh. Po inkubacji gleb wysterylizowanych z TTC i $\text{Ca}(\text{OH})_2$, otrzymano koncentracje formazanu na poziomie zbliżonym dla gleb niewysterylizowanych. Po inkubacji wysterylizowanej gleby piaszczystej z TTC i Na_2CO_3 , oznaczono koncentracje formazanu na poziomie 26% w odniesieniu do gleby niesterylizowanej. Przyczyny różnicowanej ADh w badanych próbkach są dyskutowane w pracy. Wnioskowano o nie regulowanie pH gleby przeznaczonej do oznaczania ADh, a kontrolne próby należy przygotowywać z gleby wysterylizowanej z dodatkiem TTC, z uwagi na możliwość chemicznej redukcji TTC.

Słowa kluczowe: aktywność dehydrogenaz, metody TTC-formazan, pH suspensji, redukcja chemiczna TTC

WSTĘP

Aktywność dehydrogenaz w glebie jest używana jako miara całkowitej aktywności mikrobiologicznej (Casida i in. 1964, Lenhard, 1956, Skujinś, 1967). W licznych pracach stwierdzono jak i nie znaleziono korelacji między aktywnością dehydrogenaz a ogólną liczbą mikroorganizmów w glebie (Skujinś, 1967). Uzyskane wyniki aktywności dehydrogenaz w glebie mogą być obarczone błędami z powodu oddziaływania na substrat innych oksydoreduktaz występujących w glebie, zdolnych do

redukcji TTC a nie biorących udziału w transporcie elektronów (Alef 1995), obecności w glebie azotanów (Skujiņš, 1967), związków Fe^{2+} (Stępniewska 1987) lub zawartości takich związków organicznych jak katechol (Skujiņš, 1967).

Jednym z warunków oznaczenia aktywności enzymatycznej jest zapewnienie optymalnego pH dla aktywności poszczególnych enzymów. Maksymalną aktywność dehydrogenaz Brzezińska i in. (2001) zaobserwowali przy pH *in situ* w zakresie wartości od 6,6 do 7,2. Trevors (1984) na podstawie własnych badań stwierdza, że aktywność dehydrogenaz zmniejsza się w miarę obniżania pH próbek gleby od początkowej wartości 7,7. Według von Mersi i Schinnera (1991) optymalne aktywności dehydrogenaz są przy pH 7-7,5.

Celem pracy było zbadanie czy użycie Na_2CO_3 , jako peptyzatora koloidów, zamiast CaCO_3 jako koagulatora koloidów, w jednej z najczęściej stosowanych procedur do oznaczania aktywności dehydrogenaz w glebie (Casida i in. 1964), spowoduje istotną zmianę w oznaczonych wartościach aktywności dehydrogenaz w glebach. Dla porównania oznaczono aktywności dehydrogenaz w badanych próbkach gleb metodą Thalmanna (Alef 1995) w której to metodzie stosowany jest bufor Tris-HCl. Innym celem było zbadanie pH suspensji glebowych przygotowanych do oznaczania aktywności dehydrogenaz metodą Lenharda (1956) i Thalmanna (1968) jak również próba zbadania ewentualnej redukcji TTC na drodze chemicznej oraz aktywności dehydrogenaz w glebach bez użycia soli modyfikujących pH.

MATERIAŁ I METODY

Aktywność dehydrogenaz (ADh) oznaczono w próbkach pobranych we wrześniu z poziomów próchnicznych (próchniczno-eluwialnych): piaszczystych gleb bielicowych (próbki nr 2-4,14), piaszczystych gleb rdzawych (próbka nr 1), pyłowych gleb płowych (próbki nr 5, 7, 8), gliniasto-pyłowych gleb brunatnych (próbki nr 6, 10, 11, 16), rędziny (próbka nr 9), pyłowej gleby deluwialnej próchnicznej (próbka nr 15), oraz gleb murszowych (próbki nr 12 i 13), z terenów leśnych w sąsiedztwie Krakowa.

Aktywność dehydrogenaz oznaczano w próbkach gleb o naturalnej wilgotności metodą Lenharda z zastosowaniem procedury Casida i in. (1964), oraz modyfikacją tej procedury, polegającej na użyciu Na_2CO_3 lub $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zamiast CaCO_3 (w ilości molarnie równoważnej) a także metodą Thalmanna (Alef 1995).

Ponadto, w próbkach gleb powietrznie suchych, oznaczono podstawowe właściwości badanych gleb (tab. 1), metodami powszechnie stosowanymi w gleboznawstwie (Ostrowska i in. 1991).

W celu zbadania redukcji TTC na drodze chemicznej oznaczono koncentrację formazanu w próbkach gleb (naważki po 6g) po sterylizacji w autoklawie w tem-

Tabela 1. Niektóre właściwości badanych gleb
Table 1. Some properties of investigated soils

Nr próbki Sample number	pH		Y	S	Th	V%	N og. Total N	C org. Org. C	C/N	Procent frakcji o średnicy (mm) % of fractions of diameter, in mm		Wilgotność gleby w % wagowych Moisture soil in % weight
	H ₂ O	KCl								cmol(+) kg ⁻¹		
1	5,9	4,7	4,25	4,1	8,35	49,1	0,1	1,53	16,03	11	1	42,4
2	3,8	2,9	4,59	0,1	4,69	2,1	0,04	0,42	11,57	11	3	32,4
3	4	2,9	6,69	0,28	6,97	4	0,08	1,53	18,41	6	3	42,3
4	3,9	2,8	4,23	0,1	4,33	2,3	0,05	0,79	16,61	8	3	33,5
5	6,2	5,5	6,84	22,24	29,08	76,5	0,34	6,05	17,63	47	4	82,4
6	4,9	3,6	13,31	12,46	25,77	48,4	0,36	4,06	11,2	50	19	76,8
7	3,6	2,7	22,33	2,68	25,01	10,7	0,38	6,19	16,45	54	7	78,6
8	4	3,1	17,64	4,08	21,72	18,8	0,29	4,92	17,13	25	7	94,5
9	8,3	7,7	0,54	n.o.	n.o.	n.o.	0,22	2	9,31	47	18	61,6
10	5,1	3,6	17,51	32,4	49,91	64,92	0,68	6,83	10,12	37	38	95,0
11	4,5	3,1	22,88	12,04	34,92	34,48	0,4	4,3	10,78	45	29	83,7
12	5,8	5,1	23,04	77,72	100,8	77,1	1,38	18,82	13,59	n.o.	n.o.	126,3
13	5,1	4,3	67,2	94,32	161,5	58,4	2,02	29,35	14,51	n.o.	n.o.	213,6
14	3,8	2,9	8	0,9	8,9	10,1	0,114	1,81	15,9	5	4	10,2
15	6,6	5,8	2,7	24,7	27,4	90,1	0,285	2,98	10,5	74	14	22,28
16	5	3,9	12	24,7	36,7	67,3	0,465	5,26	11,3	56	20	28,89

Y – kwasowość hydrolityczna; S – suma zasad wymiennych metodą Kappena; Th – pojemność hydrolityczna; V% – stopień wysycenia kationami zasadowymi; n.o. – nie oznaczono

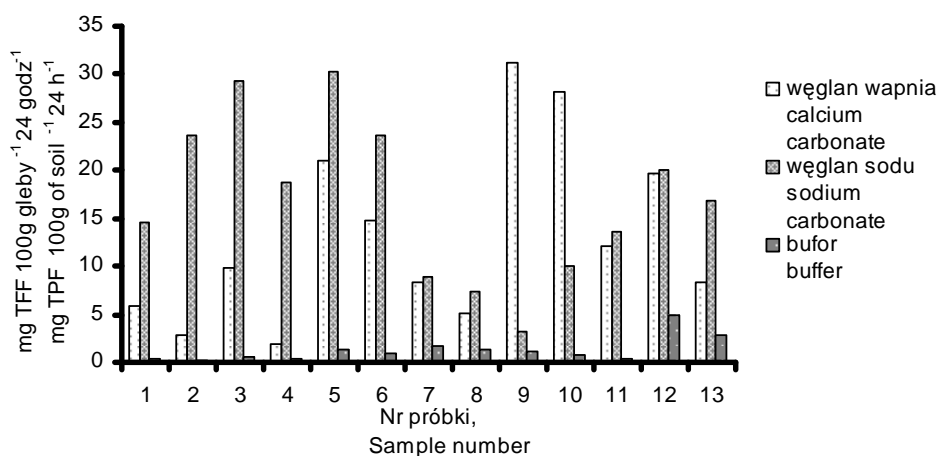
Y – hydrolytic acidity; S – total exchangeable base cations by Kappen method; Th – total hydrolytic capacity; V% - degree of base saturation; n.o. – not determined.

peraturze 120°C, pod ciśnieniem 1 atmosfery, przez 1 godzinę, w ciągu 2 kolejnych dni, z zastosowaniem tej samej procedury jak w próbkach nie sterylizowanych.

Do stwierdzenia istotności wpływu zastosowanych modyfikacji na aktywność dehydrogenaz w glebie wykorzystano analizę wariancji (po sprawdzeniu jednorodności wariancji) i test Kruskala-Wallisa.

WYNIKI BADAŃ

W badanych próbkach nr 1-13 najniższą koncentrację formazanu otrzymano po zastosowaniu metody Thalmanna (rys. 1). Wynika to prawdopodobnie z niższej temperatury w czasie inkubacji (30°C). Stosując metodę Thalmanna, najwyższą koncentrację formazanu stwierdzono w glebach murszowych, niższą w glebach pyłowych i gliniastych, najniższą zaś w glebach piaszczystych, w proporcjach, odpowiednio: 1:0,33:0,16:0,10. Stosując oryginalną procedurę Casida i in. (1964) z zastosowaniem CaCO_3 , najwyższą koncentrację formazanu otrzymano w glebach gliniastych, niższą w murszowych i pyłowych, najniższą zaś w piaszczystych, w proporcjach, odpowiednio: 1:0,62:0,54:0,22. Stosując modyfikację procedury Casida i in. (1964) z użyciem Na_2CO_3 zamiast CaCO_3 , najwyższą koncentrację formazanu otrzymano w glebach piaszczystych, niższą w glebach murszowych i pyłowych, a najniższą w glebach gliniastych, w proporcjach, odpowiednio: 1:0,86:0,82:0,62 (rys. 1).

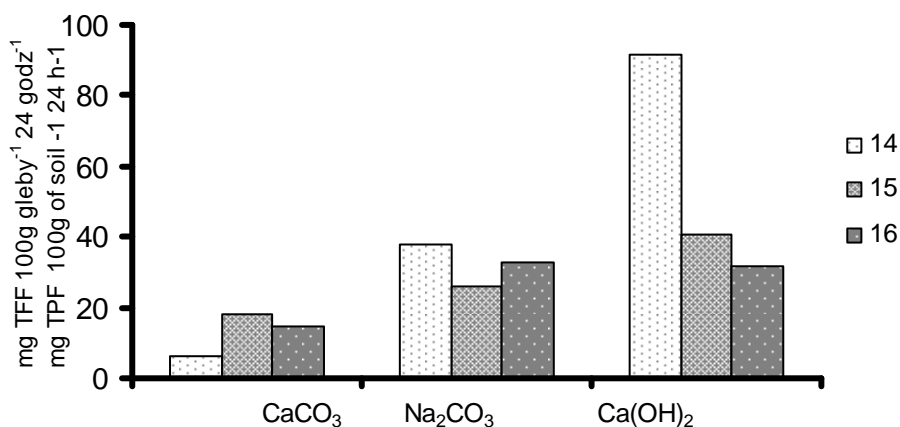


Rys. 1. Aktywności dehydrogenaz w badanych próbkach glebowych oznaczonych według procedury Casida i in. (1964) z użyciem CaCO_3 lub Na_2CO_3 oraz metodą Thalmanna (1968) z użyciem buforu

Fig. 1. Dehydrogenase activity in investigated soils samples, determined by the procedure of Casida *et al.* (1964) with the use of CaCO_3 or Na_2CO_3 and by the Thalmann method (1968) with buffer

W badanych próbkach (nr 1-13) oznaczone ADh z użyciem CaCO_3 , Na_2CO_3 i buforu wykazały brak jednorodności wariancji, a przeprowadzony test Kruskala-Wallisa wykazał statystycznie istotne różnice badanych aktywności ($\alpha = 0,05$).

W próbkach gleby piaszczystej, pyłowej i gliniastej (nr 14-16) najwyższą koncentrację oznaczono po zastosowaniu $\text{Ca}(\text{OH})_2$, w proporcjach odpowiednio: 1:0,44:0,35 (rys. 2). Niższe koncentracje formazanu otrzymano po zastosowaniu Na_2CO_3 , w proporcjach: 1:0,86:0,68 odpowiednio w glebie piaszczystej, gliniastej i pyłowej a najniższe po zastosowaniu CaCO_3 , w proporcjach: 1:0,80:0,35 odpowiednio w glebie pyłowej, gliniastej i piaszczystej (rys. 2). Żadna z użytych soli, jak i bufor w metodzie Thalmanna, nie zagwarantowały w większości badanych gleb optymalnego pH dla aktywności dehydrogenaz (tab. 2).



Rys. 2. Aktywności dehydrogenaz w badanych próbkach glebowych (nr 14-16) oznaczonych według procedury Casida i in. (1964) z użyciem CaCO_3 , Na_2CO_3 lub $\text{Ca}(\text{OH})_2$

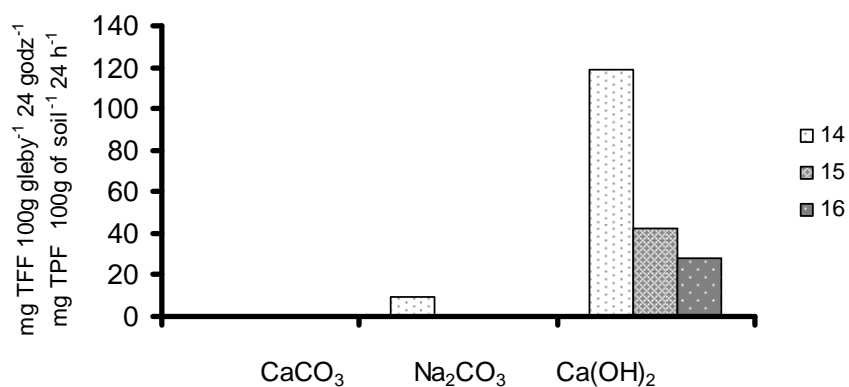
Fig. 2. Dehydrogenase activity in investigated soils samples (no 14-16) determined by the procedure of Casida et al. (1964) with the use of CaCO_3 , Na_2CO_3 or $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Koncentracja formazanu, w wysterylizowanych glebach piaszczystej, pyłowej i gliniastej (nr 14-16), po zastosowaniu procedury Casida i in. (1964) przy użyciu CaCO_3 , była śladowa, podobnie jak w glebie pyłowej i gliniastej po zastosowaniu Na_2CO_3 (rys. 3). W wysterylizowanej glebie piaszczystej po zastosowaniu Na_2CO_3 oznaczono koncentrację formazanu w ilości wynoszącej 26% koncentracji oznaczonej w glebie nie sterylizowanej. Najwyższe koncentracje formazanu w wysterylizowanych próbkach glebowych, bliskie lub przewyższające (w glebie piaszczystej) koncentracje w glebach nie sterylizowanych, zanotowano po zastosowaniu $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Tabela 2. pH suspensji badanych gleb z użyciem CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i buforu przed i po inkubacji
Table 2. The pH of suspensions of investigated soils with the use of CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or buffer, before and after incubation

Nr próbki Sample number	pH							
	z (with) CaCO_3		z (with) Na_2CO_3		bufor Tris-HCl buffer		pH z (with) $\text{Ca}(\text{OH})_2$	
	przed before	po after	przed before	po after	przed before	po after	przed before	po after
1	6,3	6,2	10	9,7	7	6,4	n.o.	n.o.
2	6,2	6	10,3	10,3	6,8	6,1	n.o.	n.o.
3	5,9	6	9,8	9,6	6,1	5,8	n.o.	n.o.
4	6,1	6,1	10,1	9,9	5,9	5,1	n.o.	n.o.
5	7,1	6,7	9,3	8,7	7,2	6,7	n.o.	n.o.
6	5,8	5,7	8,8	8,1	6,1	5,1	n.o.	n.o.
7	5,5	5,8	8,1	7,3	5,7	5,6	n.o.	n.o.
8	5,6	5,8	8,6	7,9	5,2	4,8	n.o.	n.o.
9	7,3	6,9	10	8,9	7,4	6,6	n.o.	n.o.
10	5,7	5,9	7,7	7,1	6,1	5,1	n.o.	n.o.
11	5,2	5,7	7,7	7,1	4,9	4,3	n.o.	n.o.
12	6,1	5,9	8	7,3	6,3	5,5	n.o.	n.o.
13	5,9	5,7	7,1	6,7	6,2	5,2	n.o.	n.o.
14	5,18	5,96	9,81	9,5	n.o.	n.o.	10,22	10,11
15	5,88	6,35	9,12	9,14	n.o.	n.o.	9,73	9,8
16	5,26	5,93	7,27	7,2	n.o.	n.o.	6,57	6,44

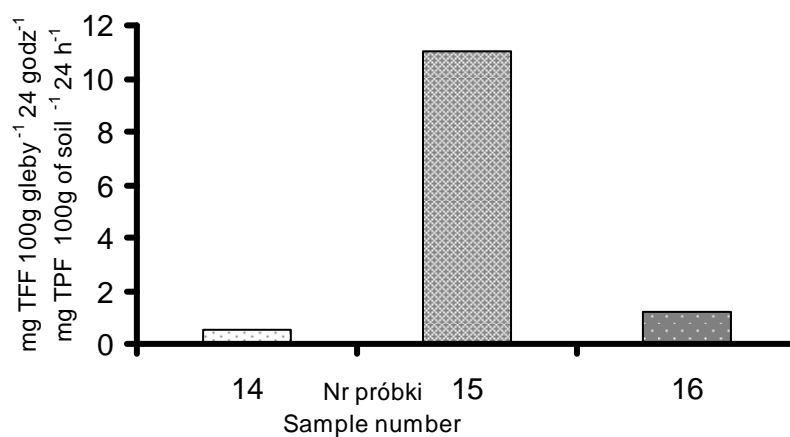
n.o.- nie oznaczono, not determined.



Rys. 3. Koncentracje formazanu w wysterylizowanych próbkach glebowych (nr 14-16) oznaczone z użyciem procedury Casida i in. (1964) z użyciem CaCO₃, Na₂CO₃ lub Ca(OH)₂

Fig. 3. Concentration of formazan in sterile soil samples (No. 14-16) determined by the procedure of Casida *et al.* (1964) with the use of CaCO₃, Na₂CO₃ or Ca(OH)₂

Aktywności dehydrogenaz oznaczone procedurą Casida i in. (1964) bez dodania soli regulujących pH, najwyższa w glebie pyłowej, niższa w gliniastej, a najniższa w piaszczystej, w proporcjach odpowiednio: 1:0,11:0,05 (rys. 4), wydają się prawidłowo odzwierciedlać aktywność mikrobiologiczną w badanych próbkach glebowych, pochodzących ze zróżnicowanych ekologicznie gleb.



Rys. 4. Aktywności dehydrogenaz w badanych próbkach glebowych oznaczonych według procedury Casida i in. (1964) bez zastosowania środków modyfikujących pH

Fig. 4. Dehydrogenase activity in investigated soils samples determined by the procedure of Casida *et al.* (1964) without chemicals regulating pH

W próbkach nr 14-16, w których oznaczono ADh z użyciem CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i bez dodania związków regulujących pH uzyskane wyniki aktywności dehydrogenaz wykazały statystycznie istotne różnice.

DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można stwierdzić aby użycie Na_2CO_3 zamiast CaCO_3 w procedurze Casida i in. (1964), przyczyniło się do wykrycia większej aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów uwolnionych z wnętrza mikroagregatów glebowych z powodu peptyzacji koloidów. Podwyższoną koncentrację formazanu otrzymano również po zastosowaniu $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Stwierdzona koncentracja formazanu w glebach wysterylizowanych, niewielka w przypadku gleby piaszczystej po zastosowaniu Na_2CO_3 i bardzo wysoka po zastosowaniu $\text{Ca}(\text{OH})_2$ we wszystkich badanych glebach, jest dowodem na chemiczną redukcję TTC. Większa koncentracja formazanu w glebach wysterylizowanych niż nie wysterylizowanych (rys. 2 i 3), wynika zapewne z wysokiej mikroheterogeniczności gleby. Zróżnicowana koncentracja formazanu w wysterylizowanych próbkach glebowych jest dowodem na nie zasiedlenie mikroorganizmami próbek wysterylizowanych w czasie przygotowywania ich do analizy w warunkach niesterylnych.

O wpływie niektórych nieorganicznych substancji na aktywność dehydrogenaz w glebach pisali Bremner i Tabatabai (1972), Stępniewska (1987) oraz Brzezińska i in. (2001). Bremner i Tabatabai (1972) doszli do wniosku, że azotany i Fe wpływają hamująco na aktywność dehydrogenaz, podczas gdy takie związki jak tlenek żelaza, tlenek manganu, siarczany, fosforany i chlorki powodują wzrost. Według Brzezińskiej i in. (2001) aktywność pozytywnie koreluje z zawartością Fe^{2+} . Stępniewska (1987) stwierdziła, że Fe^{2+} w obecność toluenu działa jako reduktor TTC i z tego powodu wnioskuje aby przy oznaczaniu aktywności dehydrogenaz w glebach zredukowanych uwzględniać chemiczną aktywność Fe^{2+} . W badanych próbkach glebowych, pochodzących z dobrze napowietrzonych poziomów próchnicznych, ilość Fe^{2+} nie powinna być wysoka, a zróżnicowany poziom redukcji chemicznej TTC był raczej związany z odczynem suspensji, chociaż w glebie piaszczystej przy zastosowaniu Na_2CO_3 i $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pomimo zbliżonej wartości pH różnica w koncentracji TFF była znaczna. Według niektórych badaczy przy oznaczaniu aktywności dehydrogenaz w glebie, modyfikujące działanie może wywierać zjawisko sorpcji na koloidach glebowych, zarówno TTC jak i powstałego formazanu (Ulfig – wypowiedź ustna), czym można by tłumaczyć wyższą aktywność dehydrogenaz w niektórych glebach piaszczystych a niższą w gliniastych. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Używanie związków jak i buforów do podwyższenia pH, do zakresu pH optymalnego dla aktywności dehydrogenaz i oznaczanie tzw. aktywności potencjalnej jest

mylące, ponieważ żadna z użytych związków jak i użyty bufor nie gwarantuje podobnego zakresu pH w glebach, z uwagi na różny stopień ich zbuforowania.

WNIOSKI

1. Aktywności dehydrogenaz w glebach oznaczone metodą Lenharda, z zastosowaniem procedury Casida i in. (1964) bez użycia CaCO_3 , wskazują na prawidłowe odzwierciedlenie aktywności mikrobiologicznej badanych gleb.
2. W zawiesinach glebowych o wysokim pH, spowodowanym użyciem Na_2CO_3 lub $\text{Ca}(\text{OH})_2$ stwierdzono chemiczną redukcję TTC.
3. Kontrolne próby glebowe przygotowywane do oznaczenia aktywności dehydrogenaz w glebach należy przygotowywać z gleb wysterylizowanych z wprowadzeniem substratu.
4. Z uwagi na możliwość chemicznej redukcji TTC w glebach, bezpieczniej porównywać aktywność dehydrogenaz w glebach o zbliżonych warunkach ekologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Alef K., 1995. Dehydrogenase activity, in: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (Alef K., Nannipieri P. (red.). Academic Press, London, 228-231.
- Bremner J.M., Tabatabai M.A., 1972. Effects of some inorganic substances on TTC assay of dehydrogenase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 385-386.
- Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., Włodarczyk T., Przywara G., Bennicelli R., 2001. Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity (pot experiment with barley). *Int. Agrophysics*, 15, 3-7.
- Casida L.E., Klein D.A., Santoro T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98, 371-376.
- Ladd J.N., Foster R.C., Nannipieri P., Oades J.M., 1996. Soil structure and biological activity, in: *Soil Biochemistry*. Stotzky G., Bollag J.-M. (red.). Marcel Dekker, New York, 23-78.
- Lenhard G., 1956. The dehydrogenase activity as a measure of the microbial activity in soils. *Z. Pflanzenernahr. Düng.Bodenk.*, 73, 1-11.
- Ostrowska A., Gawliński S., Szczubiałka Z., 1991. *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. IOŚ Warszawa.
- Skujinš J.J., 1967. Enzyme in soil. [W:] *Soil Biochemistry*. Red. A.D. McLaren, G.H. Peterson, Marcel Dekker, New York, 371-414.
- Stępniewska Z., 1987. Fe^{2+} interference in determination of dehydrogenase activity of soil. *Polish J. Soil Sci. Soil Chem.*, XX/1, 25-31.
- Trevors J.T., 1984. Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O_2 concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Plant and Soil*, 77, 285-293.
- von Mersi W., Schinner F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, 11, 216-220.

COMMENTS CONCERNING DETERMINATION
OF DEHYDROGENASE ACTIVITY IN SOIL
BY THE TTC-FORMAZAN TEST

Kazimierz Januszek, Ewa Błońska, Piotr Stanik

Department of Forest Soils, Agricultural University
Al. 29 Listopada 46, 31-425 Kraków
e-mail: rljanusz@cyf-kr.edu.pl

Abstract. Dehydrogenase activity (DhA) in soils was determined by the Lenhard method using the original procedure of Casida et al. (1964) and the modification of this procedure with the use of Na_2CO_3 , or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ instead of CaCO_3 , and also by the Thalman method. Also pH of soil suspensions was tested. The lowest values of DhA were obtained by the Thalman method, higher by the Lenhard method. The lowest concentrations of formazan were obtained with the use of CaCO_3 , intermediate with the use of Na_2CO_3 , and the highest concentrations with the use of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. In most cases the determined values of DhA in tested soils were not proportional between respective methods. The use of CaCO_3 or Na_2CO_3 , as well as of a buffer, in the Thalman method, did not assure the optimum pH for dehydrogenases. After sterilization of tested soils and incubation with TTC and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ the obtained formazan concentration was close to that of non-sterilized soils. After sterilization of the sandy soil and incubation with TTC and Na_2CO_3 the obtained formazan concentration was on the level of 26% in relation to non-sterilized soil. The causes for diversified DhA in tested samples are discussed in the paper. It was concluded that pH of the soil designated for DhA determination should not be regulated and the control samples should be prepared from a sterilized soil with addition of TTC, taking into account the possibility of chemical reduction of TTC.

Key words: dehydrogenase activity, TTC-formazan methods, pH of suspension, chemical reduction of TTC