

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Unkrautforschung, Braunschweig

Bewertung einiger Enzymaktivitäten in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Untersuchungen von Pflanzenschutzmitteln im Boden

Evaluation of some enzymatic activities in microbiological-ecotoxicological investigations of pesticides in soil

Hans-Peter Malkomes

Zusammenfassung

Alkalische Phosphatase- (APA), Arylsulfatase- (ASA) und Dehydrogenaseaktivität (DHA) gehören zu den am meisten untersuchten mikrobiellen Bodenenzymen. Auch in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Untersuchungen von Umweltchemikalien einschließlich Pflanzenschutzmitteln werden sie verwendet. Bei der Beurteilung der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenmikroorganismen ist es notwendig, dass unterschiedlich biozide Wirkungen differenzierbar sind. Es liegen jedoch Anhaltspunkte vor, dass dies nicht mit allen Bodenenzymen gleich gut möglich ist. Es wurden daher zwei Teilversuche durchgeführt, in denen die drei oben genannten Enzymaktivitäten im Boden mit und ohne Luzernemehlzugabe nach abgestuften bioziden Behandlungen mit chemischen und physikalischen Pflanzenschutzmaßnahmen (Dämpfen, Begasungsmittel Dazomet, Herbizide Dinoterb und Triclopyr) im Labor erfasst wurden. Dabei ließ sich mittels der APA im Allgemeinen keine Differenzierung der bioziden Effekte erzielen, während dies bei der ASA und DHA meistens möglich war. Wenn mikrobiologisch-ökotoxikologische Versuche zur Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln im Boden durchgeführt werden, ist daher zu empfehlen, vorher die verwendeten Enzymaktivitäten bzw. die Methodik auf ihre Eignung zu testen, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Stichwörter: Arylsulfataseaktivität, Dehydrogenaseaktivität, Phosphataseaktivität, Boden, Herbizid, Dinoterb, Triclopyr, Bodenuntersuchung, Dazomet, Dämpfen

Abstract

Alkaline phosphatase (APA), arylsulfatase (ASA) and dehydrogenase activity (DHA) belong to the most investigated microbial soil enzymes. They are also often included in microbiological-ecotoxicological tests of pollutants inclusive pesticides in soil. If the effects of pesticides on soil microorganisms have to be investigated than different biocidal effects should be distinguishable. Some indications, however, exist that this may not be the case with some soil enzymes. Therefore two subtrials were started under laboratory conditions. The three above mentioned common enzyme activities were investigated in soil with or without lucerne meal amendment and treated with several chemical or physical plant protection procedures (e.g. steaming, fumigant dazomet, herbicides dinoterb and triclopyr) to receive graduated biocidal effects. Normally it was impossible to distinguish those biocidal effects by APA, whereas ASA and DHA mostly

seem to be useful. Consequently it is recommended to test the suitability of soil enzyme activities and their methodology before starting microbiological-ecotoxicological investigations in soil to avoid misinterpretation.

Key words: Arylsulfatase activity, dehydrogenase activity, phosphatase activity, soil, herbicide, dinoterb, triclopyr, soil sterilization, dazomet, steaming

1 Einleitung

Enzymuntersuchungen sind heute – trotz zahlreicher neuerer Methoden zu Bestimmung von Biomasse und Diversität der Bodenmikroflora – innerhalb der Bodenbiologie nicht mehr wegzudenken (JOERGENSEN und EMMERLING, 2006). Seit etwa 1950 nahm die Anzahl an Veröffentlichungen über Bodenenzyme stark zu (SKUJINS, 1978). Darunter befindet sich ein sehr hoher Anteil an Arbeiten zur mikrobiologisch-ökotoxikologischen Bewertung von Pflanzenschutzmitteln im Boden (z. B. SCHÄFFER, 1993; SCHINNER und SONNLEITNER, 1997). Allerdings sind dabei einige Besonderheiten zu beachten. So wurden Pflanzenschutzmittel nicht entwickelt, um Bodenenzyme zu hemmen (SPEIR und ROSS, 2002). Folglich gibt es auch vergleichsweise wenig Veröffentlichungen über den direkten Einfluss derartiger Mittel auf Reinenzyme bzw. aus dem Boden isolierte Enzyme. Andererseits sind Enzyme an wichtigen Nährstoffzyklen im Boden beteiligt und werden daher auch durch zahlreiche Faktoren (z. B. die Substratverfügbarkeit: BALGAR et al., 2005) beeinflusst. Einige sind nur in lebenden Zellen aktiv, andere können ihre Wirksamkeit längere Zeit außerhalb von Pflanzen- oder Mikroorganismenzellen erhalten und werden durch Sorption an Bodenpartikel sogar konserviert. Die Korrelation von Bodenenzymaktivitäten zu anderen bodenmikrobiologischen Merkmalen ist jedoch sehr unterschiedlich (DOMSCH et al., 1979).

Bei Enzymuntersuchungen im Boden ist immer zu beachten, dass einmal das Enzym selbst durch Schadstoffe (z. B. Pflanzenschutzmittel) beeinträchtigt werden kann, zum anderen aber auch Organismen (z. B. Bakterien, Pilze), die an seiner Bildung beteiligt sind, sowie die Umgebungsbedingungen (z. B. pH-Wert, Nährstoffe). Hinzu kommen weitere Faktoren wie z. B. eine Störung der üblicherweise verwendeten spektralphotometrischen Nachweisreaktionen durch Farbstoffe, pH-Verschiebungen usw. In diesem Zusammenhang sind auch einige der am häufigsten in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Untersuchungen von Pflanzenschutzmitteln im Boden verwendeten Enzyme zu

Tab. 1. Angaben zu den eingesetzten Präparaten
Table 1. Information on the compounds used

Name (Name)	Präparat (compound) praxisübliche Aufwandmengen (field dosage)	angewandte einfache (= 1×) Dosierung im Boden (applied single dosage in soil = 1×)	Wirkstoff (active ingredient) Name (name)	Gehalt im Präparat (content in the compound)	angewandte einfache (= 1×) Dosierung im Boden (applied single dosage in soil = 1×)
Basamid Granulat*)	30; 40; 50 g/m ² ; 200 g/m ³	142,86 mg/kg	Dazomet	970 g/kg	138,57 mg/kg
Garlon 4	1; 2; 3 l/ha	4,28 µl/kg	Triclopyr	480 g/l	2,05 mg/kg
Herbogil Liquide D**)	3; 4; (5; 5,5) l/ha	7,86 µl/kg	Dinoterb	250 g/l	1,96 mg/kg

*) Das Präparat ist inzwischen in Deutschland nicht mehr zugelassen.

**) Das früher in Frankreich und als ähnlich formuliertes Herbizid auch in Deutschland zugelassene Präparat diente hier als Referenzmittel. Die Dosierung richtete sich nach der damals in Deutschland üblichen maximalen Aufwandmenge von 5,5 l/ha.

sehen, nämlich die alkalische Phosphatase-, Arylsulfatase- und Dehydrogenaseaktivität. Laborversuche mit unterschiedlich bioziden chemischen und physikalischen Pflanzenschutzmaßnahmen sollten daher unter Ausschaltung möglicher direkter und indirekter Einflüsse von Pflanzen dazu dienen, die Indikatorwirkung dieser Bodenzyme und damit ihre Aussagefähigkeit für die Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln zu erkennen.

2 Material und Methoden

Es wurden zwei Teilversuche durchgeführt. Im ersten Laborversuch wurden Bodenproben aus der oberen Schicht von zwei langjährig ackerbaulich genutzten Flächen der Umgebung von Braunschweig entnommen, die in den vorhergehenden Jahren nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt worden waren. Sie wiesen weitgehend die in der BBA-Richtlinie Teil VI, 1-1 zur Prüfung der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Bodenmikroflora (ANDERSON et al., 1990) geforderten Eigenschaften auf. Der lehmige Sandboden BBA hatte einen pH-Wert von 6,7 und einen organischen Kohlenstoffgehalt von 0,9%, der sandige Lehm Boden SA hatte einen pH-Wert von 7,4 und 1,7% C_{org}. Die Böden wurden auf 2 mm gesiebt und mindestens 14 Tage feldfeucht an die Versuchsbedingungen adaptiert, bevor sie mit den in Tabelle 1 aufgeführten Herbiziden behandelt bzw. für 20 min. bei 120 °C autoklaviert wurden. Dabei diente das Herbizid 'Herbogil Liquide D' (Dinoterb) wegen seiner aus früheren Untersuchungen (z. B. MALKOMES, 2002) bekannten deutlichen bioziden Wirkung auf Bodenmikroorganismen zusätzlich als Vergleichsmittel. Die im Labor verwendeten Konzentrationen im Boden ergeben sich nach ANDERSON et al. (1990) aus der angenommenen Penetration der praxisnahen flächenbezogenen Aufwandmengen in 5 cm Tiefe (= einfache Dosierung = 1×). Höhere Dosierungen beziehen sich entsprechend auf geringere Eindringtiefen. Die Mittel wurden in wässriger Suspension in die beiden Böden eingemischt, die auf 60% der maximalen Wasserkapazität angefeuchtet und anschließend in Plastikgefrierschalen mehrere Monate bei 20 °C im Dunkeln bebrütet wurden. Teilweise wurden den Böden in einem Parallelversuch noch 5 g/kg Luzernmehl zur Simulierung einer Gründüngung und damit zur Steigerung der mikrobiellen Aktivität zugemischt. Aus dem Vergleich der mikrobiellen Aktivitäten der Böden mit und ohne Luzernmehl lässt sich die als zusätzlicher Stressindikator erkannte LIA (= Luzernmehl-induzierte Aktivitätserhöhung; MALKOMES, 2001a) ermitteln.

Im zweiten Teilversuch wurde aus der oberen Schicht (20 cm) einer ein Jahr vorher gedämpften und danach mit Unkräutern bepflanzen Fläche („Unkrautgarten“) im Herbst 2004 BBA-Boden (lehmiger Sand) als Mischprobe entnommen und zum Versuchsbeginn in einer 20 cm dicken Bodenschicht teilsterilisiert. Hierzu

wurde er entweder mittels handelsüblichem transportablem Dämpfgerät (Turbo-Dämpfer TD 9; Fa. Möschle, Stollenberg) für 2 h auf 90 °C erhitzt oder es wurde praxisnah 'Basamid Granulat' (Dazomet; 40 g/m²) eingemischt. Der so behandelte Boden wurde mittels Folie für 7 d versiegelt, danach 3 d lang gelüftet und anschließend durchgemischt. Das vollständige Entweichen des aus dem 'Basamid Granulat' gebildeten gasförmigen Wirkstoffgemischs wurde mittels Kressetest überprüft. Diese so behandelten Bodenvarianten wurden anschließend auf 60% ihrer maximalen Wasserkapazität eingestellt und im Labor wie im vorherigen Teilversuch weiterbebrütet. Da alle Bodenvarianten nicht unter keimfreien Bedingungen weiterbehandelt wurden, fand – wie unter praxisüblichen Bedingungen auch – eine gewisse mikrobielle Wiederbesiedlung aus der Luft statt. Ein Teil dieses unbehandelten sowie des mit 'Basamid Granulat' behandelten Bodens wurde am Versuchsende in einem Folgeversuch zur Simulation erhöhter Stressbedingungen zusätzlich mit dem herbiziden Vergleichsmittel 'Herbogil Liquide D' behandelt und noch 84 Tage weiter bebrütet.

Während der jeweiligen 84-tägigen Bebrütung wurden Bodenproben gezogen und anschließend bei 6 °C maximal zwei Wochen zwischengelagert, bevor die drei bereits erwähnten Enzymaktivitäten spektralphotometrisch untersucht wurden. Nach VON MERSI und SCHINNER (1991) kann die Dehydrogenaseaktivität (= DHA) als Biomasse-bezogen gelten. In den vorliegenden Versuchen wurde die DHA über die Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid zu Triphenylformazan nach einer von MALKOMES (1993) modifizierten Methode ermittelt. Die nicht direkte Biomasse-bezogene alkalische Phosphatase (= APA) und Arylsulfataseaktivität (= ASA) wurden entsprechend den Angaben bei TABATABAI (1982) bestimmt. Allerdings wurde dabei u. a. wegen der kurzen Inkubationszeit vor der Messung auf die übliche Anwendung von Toluol verzichtet, und die Konzentrationen und Mengen der verwendeten Chemikalien wurden minimiert, um kleinere Gefäße verwenden zu können. Die Vergleichbarkeit war in – hier nicht dargestellten – Vorversuchen überprüft worden.

Alle Behandlungsvarianten lagen in dreifacher Wiederholung vor. In allen Tabellen mit Originaldaten wurden die Standardabweichungen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Laborversuch mit unterschiedlich bioziden Pflanzenschutzmaßnahmen

Alle drei Enzymaktivitäten waren im sandigen Lehm Boden SA mehr oder weniger höher als im lehmigen Sandboden BBA (Tab. 2). Der Zusatz von Luzernmehl erhöhte die Aktivitäten norma-

Tab. 2. Enzymaktivitäten in den Kontrollböden BBA (lehmgiger Sand) und SA (sandiger Lehm) mit und ohne Luzernemehlzusatz während der 84-tägigen Bebrütung**Table 2. Enzymatic activities in the control soils BBA (loamy sand) and SA (sandy loam) with and without lucerne meal amendment during the 84 days incubation**

Boden (Soil)	Probenahme (sampling time)	APA ($\mu\text{g NP/g Boden}$)		ASA ($\mu\text{g NP/g Boden}$)		DHA ($\mu\text{g TPF/g Boden}$)		
		oL	mL	oL	mL	oL	mL	
BBA	7 d	40,3 \pm 2,3	45,3 \pm 3,6	30,4 \pm 0,7	39,9 \pm 1,0	53,8 \pm 0,9	130,5 \pm 3,8	
	84 d	51,9 \pm 4,0	47,2 \pm 3,1	29,4 \pm 1,4	47,5 \pm 1,7	39,7 \pm 2,3	97,2 \pm 1,5	
	\emptyset 7, 14, 28, 56 und 84 d		47,9	48,7	28,0	44,8	46,6	115,5
SA	7 d	61,3 \pm 0,9	72,0 \pm 7,7	51,5 \pm 2,9	57,5 \pm 1,6	67,6 \pm 1,7	136,4 \pm 2,6	
	84 d	55,9 \pm 5,6	70,2 \pm 0,2	57,0 \pm 1,8	68,1 \pm 3,9	56,2 \pm 1,9	107,2 \pm 1,6	
	\emptyset 7, 14, 28, 56 und 84 d		58,2	72,8	52,7	65,4	61,2	119,9

APA = alkalische Phosphataseaktivität (alkaline phosphatase activity); ASA = Arylsulfataseaktivität (arylsulfatase activity); DHA = Dehydrogenaseaktivität (dehydrogenase activity); NP = p-Nitrophenol (p-nitrophenol); TPF = Triphenylformazan (triphenyl formazan); oL bzw. mL = ohne bzw. mit Luzernemehlzusatz (without resp. with lucerne meal amendment)

Tab. 3. Einfluss des Vergleichsmittels 'Herbogil Liquide D' (= He; Dinoterb) und des Autoklavierens (= Aut) auf die Arylsulfatase- (ASA) und Dehydrogenaseaktivität (DHA) im lehmigen Sandboden BBA mit und ohne Luzernemehldüngung**Table 3. Effect of the reference compound 'Herbogil Liquide D' (= He; dinoterb) and autoclaving (= Aut) on the arylsulfatase (ASA) and dehydrogenase activity (DHA) in the loamy sand soil BBA with and without lucerne meal amendment**

Behandlung (Treatment)	ASA ($\mu\text{g NP/g Boden}$)				DHA ($\mu\text{g TPF/g Boden}$)			
	14 d	28 d	56 d	84 d	14 d	28 d	56 d	84 d
ohne Luzernemehlzusatz (without lucerne meal amendment)								
K	29,7 \pm 0,3	31,3 \pm 0,6	29,5 \pm 0,6	29,4 \pm 1,4	48,8 \pm 2,7	46,7 \pm 1,3	44,2 \pm 3,5	39,7 \pm 2,3
He-1x	24,5 \pm 0,6	26,9 \pm 0,9	25,9 \pm 0,3	26,0 \pm 0,5	34,7 \pm 0,7	33,7 \pm 1,3	30,1 \pm 1,1	25,7 \pm 0,9
He-10x	22,0 \pm 1,5	22,0 \pm 0,3	18,3 \pm 0,3	16,3 \pm 0,2	17,8 \pm 0,3	16,2 \pm 1,2	8,3 \pm 0,5	6,9 \pm 0,3
Aut	2,9 \pm 0,9	6,4 \pm 1,1	7,1 \pm 0,5	7,1 \pm 0,6	17,9 \pm 4,4	16,8 \pm 1,2	10,9 \pm 0,6	9,1 \pm 0,8
mit Luzernemehlzusatz (with lucerne meal amendment)								
K	41,4 \pm 0,7	48,0 \pm 1,8	47,0 \pm 0,9	47,5 \pm 1,7	135,0 \pm 2,9	112,9 \pm 3,7	101,8 \pm 2,8	97,2 \pm 1,5
He-1x	36,7 \pm 1,2	45,2 \pm 0,6	44,4 \pm 1,4	43,0 \pm 1,8	114,7 \pm 2,4	107,5 \pm 3,8	96,1 \pm 3,4	90,3 \pm 1,8
He-10x	37,8 \pm 2,9	34,7 \pm 0,4	28,8 \pm 1,3	21,4 \pm 1,2	43,6 \pm 0,8	33,0 \pm 3,7	10,5 \pm 1,3	6,4 \pm 0,6
Aut	4,6 \pm 1,0	9,3 \pm 0,4	11,4 \pm 0,3	10,9 \pm 0,4	71,9 \pm 6,1	46,7 \pm 2,3	26,6 \pm 0,3	12,8 \pm 1,1

NP = p-Nitrophenol; TPF = Triphenylformazan; K = Kontrolle (control)

lerweise. Während der mehrwöchigen Bebrütung sank die Dehydrogenaseaktivität, während die anderen Aktivitäten keine einheitliche Tendenz aufwiesen.

Die APA wurde in diesem Teilversuch – unabhängig von der Düngung mit Luzernemehl – durch keins der chemischen Pflanzenschutzmittel merklich beeinflusst. Dagegen wurde die durchschnittliche APA aller Termine selbst durch das Autoklavieren im BBA-Boden ohne und mit Luzernemehlzusatz nur auf 37,2 % bzw. 46,5 % der Kontrollwerte reduziert, im SA-Boden sogar

noch etwas schwächer auf 44,5 % bzw. 58,4 %. Dies lässt darauf schließen, dass ein großer Teil der APA, z. B. der durch Sorption geschützte extrazelluläre Anteil, kaum beeinträchtigt wurde.

Die beiden anderen Enzymaktivitäten ASA und DHA wurden im BBA-Boden sowohl durch das Vergleichsmittel 'Herbogil Liquide D' dosisabhängig als auch durch das Autoklavieren deutlich reduziert (Tab. 3). Dabei nahmen die Effekte des Herbizids auf beide Enzymaktivitäten mit der Bebrütungszeit noch zu. Während sich der Einfluss des Autoklavierens auf die ASA mit

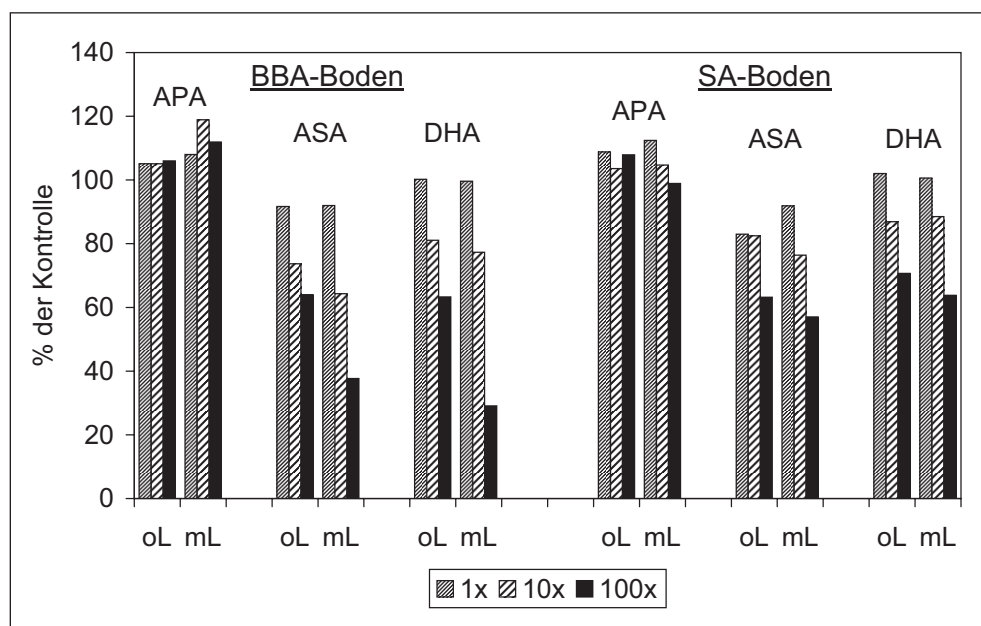


Abb. 1. Vergleich des Einflusses des Herbizids 'Garlon 4' (Triclopyr) auf die durchschnittlichen Enzymaktivitäten APA (alkalische Phosphatase), ASA (Arylsulfatase) und DHA (Dehydrogenase) in den beiden Testböden BBA und SA mit und ohne Luzernemehl. (Mittelwerte aus den Probenahmeterminen 7, 14, 28, 56 und 84 d; oL und mL = ohne und mit Luzernemehlzusatz)

Figure 1. Comparison of the effect of the herbicide 'Garlon 4' (triclopyr) on the average enzymatic activities APA (alkaline phosphatase), ASA (arylsulfatase) and DHA (dehydrogenase) in the test soils BBA and SA with and without lucerne meal amendment. (Average from the samplings 7, 14, 28, 56 and 84 d; oL and mL = without and with lucerne meal amendment)

Tab. 4. Einfluss des Vergleichsmittels 'Herbogil Liquide D' (= He; Dinoterb), des Herbizids 'Garlon 4' (= Gar; Triclopyr) und des Autoklavierens (= Aut) auf die durchschnittliche LIA-Auswertung aller Termine der alkalischen Phosphatase (APA), Arylsulfatase- (ASA) und Dehydrogenaseaktivität (DHA) im lehmigen Sandboden BBA und sandigen Lehmboden SA mit und ohne Luzernemehldüngung
Table 4. Effect of the reference compound 'Herbogil Liquide D' (= He; dinoterb), the herbicide 'Garlon 4' (= Gar; triclopyr) and autoclaving (= Aut) on the average LIA-evaluation of all sampling days of alkaline phosphatase (APA), arylsulfatase (ASA) and dehydrogenase activity (DHA) in the loamy sand soil BBA and sandy loam soil SA with and without lucerne meal amendment

Behandlung (Treatment)	BBA-Boden			SA-Boden		
	APA (µg NP/g Boden)	ASA (µg NP/g Boden)	DHA (µg TPF/g Boden)	APA (µg NP/g Boden)	ASA (µg NP/g Boden)	DHA (µg TPF/g Boden)
K	0,8	14,8	68,8	14,5	12,7	58,7
He-1x	2,9	16,0	70,9	12,6	11,9	61,4
He-10x	1,7	13,2	17,7	9,5	3,1	16,0
Gar-1x	3,4	13,7	68,4	9,7	11,1	58,2
Gar-10x	8,7	6,7	51,5	15,9	6,5	52,9
Gar-100x	4,9	-2,3	4,0	9,2	4,0	33,2
Aut	5,3	2,6	26,4	16,2	-1,6	22,0

NP = p-Nitrophenol; TPF = Triphenylformazan; K = Kontrolle (control)

Tab. 5. Einfluss des Entseuchungsmittels 'Basamid Granulat' (= Bas; Dazomet) und des Dämpfens (= Däm) auf die Arylsulfatase- (ASA) und Dehydrogenaseaktivität (DHA) im lehmigen Sandboden BBA mit und ohne Luzernemehldüngung
Table 5. Effect of the fumigant 'Basamid Granulat' (= Bas; dazomet) and of steaming (= Däm) on the arylsulfatase (ASA) and dehydrogenase activity (DHA) in the loamy sand soil BBA with and without lucerne meal amendment

Behandlung (Treatment)	ASA (µg NP/g Boden)				DHA (µg TPF/g Boden)			
	7 d	28 d	56 d	84 d	7 d	28 d	56 d	84 d
ohne Luzernemehlzusatz (without lucerne meal amendment)								
K	18,6 ± 0,3	14,4 ± 0,5	13,3 ± 0,3	11,0 ± 0,7	48,1 ± 2,2	39,6 ± 3,0	35,5 ± 2,4	31,3 ± 1,5
Bas	12,5 ± 0,4	13,6 ± 1,2	10,7 ± 0,5	8,8 ± 0,5	13,4 ± 2,5	19,3 ± 2,0	21,0 ± 2,9	16,6 ± 2,4
Däm	5,3 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,5	14,6 ± 1,6	10,1 ± 0,7	9,7 ± 1,1	9,8 ± 1,5
mit Luzernemehlzusatz (with lucerne meal amendment)								
K	30,3 ± 1,1	26,5 ± 0,6	21,5 ± 1,1	17,6 ± 0,5	145,5 ± 7,9	98,5 ± 6,3	77,9 ± 2,4	63,1 ± 2,5
Bas	17,8 ± 1,5	24,1 ± 1,1	16,9 ± 2,1	13,5 ± 1,2	80,1 ± 2,7	88,6 ± 5,2	62,1 ± 9,6	49,8 ± 6,2
Däm	23,3 ± 1,9	10,9 ± 0,5	7,8 ± 0,6	7,5 ± 1,0	61,6 ± 3,6	32,5 ± 2,7	26,0 ± 1,1	25,6 ± 2,1

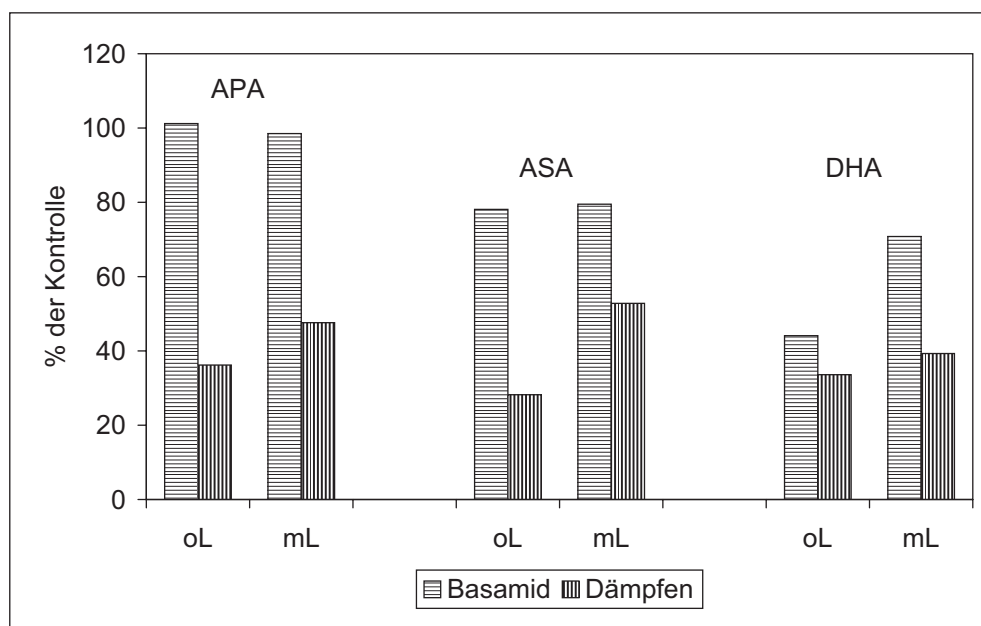
NP = p-nitrophenol; TPF = Triphenylformazan; K = Kontrolle (control)

der Zeit leicht abschwächte, verstärkte er sich auf die DHA. Ähnlich verhielt sich auch der hier nicht dargestellte SA-Boden.

Am Beispiel der Durchschnittswerte aller Termine zeigt sich, dass die APA in beiden Böden auch durch das Herbizid 'Garlon 4' (Triclopyr) nicht beeinflusst wurde (Abb. 1). Dagegen reduzierte das Herbizid die beiden anderen Enzymaktivitäten in beiden Böden und Düngevarianten meistens dosisabhängig. Auch hier nahmen die – in Abbildung 1 nicht einzeln dargestellten – Effekte teilweise während der mehrwöchigen Bebrütung noch leicht zu.

Die Differenzbildung der mikrobiellen Aktivitäten in den beiden Luzernemehlvarianten (= LIA-Auswertung) zeigt die Leistungsfähigkeit des gedüngten Bodens an. Am Beispiel der Durchschnittswerte aller Termine (Tab. 4) sowie der hier nicht dargestellten Einzelwerte ließ sich auch bei dieser Auswertungsart keine dosisabhängige Beeinflussung der APA durch die Herbizide feststellen. Die ASA und DHA wurden jedoch auch hier mehr oder weniger dosisabhängig verringert und auch das Autoklavieren hemmt diese Aktivitäten. Dabei war die Wirkung der 10-fachen Dosierung von 'Herbogil

Abb. 2. Vergleich des Einflusses des Entseuchungsmittels 'Basamid Granulat' (Dazomet) und des Dämpfens auf die durchschnittlichen Enzymaktivitäten APA (alkalische Phosphatase), ASA (Arylsulfatase) und DHA (Dehydrogenase) im Testboden BBA mit und ohne Luzernemehl. (Mittelwerte aus den Probenahmeterminen 7, 14, 28, 56 und 84 d; oL und mL = ohne und mit Luzernemehlzusatz)
Figure 2. Comparison of the effect of the fumigant 'Basamid Granulat' (dazomet) and of steaming on the average enzymatic activities APA (alkaline phosphatase), ASA (arylsulfatase) and DHA (dehydrogenase) in the test soil BBA with and without lucerne meal amendment. (Average from the samplings 7, 14, 28, 56 and 84 d; oL and mL = without and with lucerne meal amendment)



Tab. 6. Einfluss des Vergleichsmittels 'Herbogil Liquide D' (= He; Dinoterb) auf die Dehydrogenaseaktivität ($\mu\text{g TPF/g Boden}$) im vorher nicht behandelten bzw. im mit 'Basamid Granulat' (Dazomet) begasten lehmigen Sandboden BBA mit und ohne Luzernemehldüngung

Table 6. Effect of the reference compound 'Herbogil Liquide D' (= He; dinoterb) on the dehydrogenase activity ($\mu\text{g TPF/g soil}$) in the before not treated soil resp. in the loamy sand soil BBA fumigated with 'Basamid Granulat' (dazomet) and amended with or without lucerne meal

Behandlung (Treatment)	Unbehandelter Kontrollboden (untreated control soil)				begaster Boden (fumigated soil)			
	7 d	28 d	56 d	84 d	7 d	28 d	56 d	84 d
	ohne Luzernemehlzusatz (without lucerne meal amendment)							
K	37,3 \pm 3,3	25,9 \pm 2,8	26,2 \pm 2,8	27,7 \pm 1,4	14,7 \pm 1,5	10,9 \pm 2,1	9,4 \pm 2,1	9,9 \pm 2,2
He-1 \times	33,0 \pm 1,1	24,4 \pm 1,4	20,4 \pm 2,3	19,2 \pm 1,1	13,8 \pm 2,3	11,7 \pm 2,9	8,8 \pm 2,2	9,0 \pm 0,6
He-10 \times	27,2 \pm 1,3	17,0 \pm 1,1	12,1 \pm 1,1	9,4 \pm 2,0	15,7 \pm 1,0	11,2 \pm 0,8	7,0 \pm 1,2	4,8 \pm 1,1
	mit Luzernemehlzusatz (with lucerne meal amendment)							
K	130,2 \pm 6,0	100,7 \pm 3,7	72,0 \pm 3,5	67,0 \pm 6,8	75,6 \pm 7,4	50,4 \pm 3,6	43,4 \pm 2,8	41,3 \pm 1,9
He-1 \times	117,9 \pm 6,9	86,5 \pm 4,4	65,5 \pm 1,6	56,3 \pm 2,8	66,3 \pm 3,5	44,9 \pm 3,7	36,7 \pm 1,1	32,2 \pm 3,8
He-10 \times	79,7 \pm 4,1	30,3 \pm 2,3	9,2 \pm 1,0	6,9 \pm 1,0	67,9 \pm 4,8	32,6 \pm 1,7	18,1 \pm 1,5	2,7 \pm 0,9

TPF = Triphenylformazan; K = Kontrolle (control)

Liquide D' auf die DHA sogar noch stärker als die des Autoklavierens.

3.2 Laborversuch nach unterschiedlicher praxisnaher Bodensterilisierung

In diesem Teilversuch wurde der BBA-Boden stark bioziden Einflüssen ausgesetzt. Auch hier reagierte die APA nur auf das Dämpfen mit einer durchschnittlichen Verringerung auf 36,2 % (ohne Luzernemehl) bzw. 47,6 % (mit Luzernemehl) der Kontrollwerte, während die Behandlung mit 'Basamid Granulat' keinen merklichen Effekt (101,2 % der Kontrolle ohne bzw. 98,5 % mit Luzernemehl) verursachte (Abb. 2).

Die beiden anderen Enzymaktivitäten wurden meistens während der gesamten Versuchszeit in beiden Luzernemehlvarianten deutlich durch die Teilsterilisierung verringert (Tab. 5). Allerdings fiel die Hemmung durch das Dämpfen immer etwas stärker aus als durch das 'Basamid Granulat'. Eine Wiedererholung der Enzymaktivitäten konnte während der Versuchszeit nicht festgestellt werden.

Nach der mehrmonatigen Lagerung hatte die DHA im Kontrollboden – aber vergleichsweise weniger im begasten Boden – in beiden Luzernemehlvarianten weiter abgenommen. Die zusätzliche Behandlung mit dem Vergleichsmittel 'Herbogil Liquide D' verursachte auch hier eine dosisabhängige Hemmung der DHA, die jedoch je nach Vorbehandlung auf einem unterschiedlichen Aktivitätsniveau lag (Tab. 6).

Die hier nicht dargestellte LIA-Auswertung ergab bei der APA und ASA keine weitere Klärung. Die durchschnittliche LIA-DHA betrug bei 'Basamid Granulat' 88,3 % der Kontrolle und beim Dämpfen 42,1 % und bestätigte damit in etwa die Tendenzen beider Düngevarianten.

4 Diskussion

Das Ziel, durch die Verwendung unterschiedlich biozider Effekte eine differenzierte Reaktion der drei Bodenenzyme APA, ASA und DHA zu erreichen, wurde nur teilweise erreicht. Die APA wurde durch keins der chemischen Pflanzenschutzmittel eindeutig verändert; lediglich das Dämpfen bzw. Autoklavieren verursachte eine deutliche Verringerung. Dies entspricht in etwa auch den Beobachtungen von EIVAZI und TABATABAI (1977), NOVAK und PIASECKI (1981) sowie SERRASOLSAS und KHANNA (1995) zur Dampfsterilisation und von GADKARI (1984) zu einem wenig bioziden Herbizid.

Die ASA und besonders die DHA reagierten indessen sowohl differenziert auf die unterschiedlich bioziden Behandlungen als auch auf die verschiedenen Dosierungen der beiden Herbizidwirkstoffe. Damit ließ sich anhand der gehemmten DHA der

deutliche biozide Effekt von Dämpfen und Autoklavieren (MALKOMES und DIETZE, 1998) sowie der demgegenüber abgeschwächte von Dazomet (DOMSCH, 1992; YEGEN et al., 1998) und Dinoterb (HARDEN et al., 1993; ENGELEN et al., 1998) bestätigen. Für das bisher erst wenig mikrobiologisch-ökotoxikologisch untersuchte Herbizid Triclopyr lässt sich zudem anhand von ASA und DHA eine mit steigender Dosierung hemmende Wirkung auf Biomasse-bezogene Parameter nachweisen, die damit Angaben zur vergleichsweise mäßig bioziden Wirkung auf Ektomykorrhizapilze (CHAKRAVARTY und SIDHU, 1987; BUSSE et al., 2004) sowie auf Bodenmikroorganismen, die Bodenatmung und die N-Mineralisierung (SAPUNDZHIEVA, 1987; BAARSCHERS et al., 1988; HOUSTON et al., 1998) ergänzt.

Die je nach Behandlung und Dosierung unterschiedlich starken Hemmeffekte auf die ASA und DHA und die andererseits aus der Literatur bekannten Wirkungen auf die mikrobielle Biomasse unterstützen die Annahme, dass zumindest die DHA ein Indikator für Biomasse-abhängige Schädigungen im Boden sein kann. Dies dürfte darauf beruhen, dass die DHA in extrazellulärer Form im Boden weitgehend inaktiv ist und somit in direkter Beziehung zur mikrobiellen Biomasse stehen kann (MORRA, 1997). Umso erstaunlicher erscheint zunächst die ähnliche Reaktion der ASA auf die bioziden Einflüsse, da sie im Boden zu einem großen Teil extrazellulär vorliegt (LI und SARAH, 2003). Allerdings kann der Anteil der Biomasse-bezogenen intrazellulären an der gesamten Arylsulfataseaktivität im Boden durchaus über 70 % erreichen (KLOSE und TABATABAI, 1999), was die beobachtete Reaktion erklären könnte. Andererseits bedingt der hohe Anteil extrazellulärer Phosphatase im Boden, der zudem infolge der Sorption an Ton- und Humusbestandteile (SPEIR und ROSS, 1978; TIWARI et al., 1988) offensichtlich den durch biozide Einflüsse verursachten Biomasseveränderungen nicht unmittelbar folgen kann, die schlechte kurzfristige Indikatorwirkung der APA für mikrobiologisch-ökotoxikologische Bodenuntersuchungen von Pflanzenschutzmitteln.

Der anhand ihrer Beobachtungen mit Insektiziden von BURNS (1978) und später von STENBERG (1999) im anderen Zusammenhang unterbreitete Vorschlag, die mit Pflanzenschutzmitteln behandelten Böden noch längere Zeit (etwa einen Monat) nach dem Verschwinden des Ausgangsmoleküls zu untersuchen, da die indigene Enzymaktivität im Boden einige Zeit akkumuliert hat und daher mehrere Mikroorganismengenerationen reflektiert, ist im Prinzip zuzustimmen. Allerdings hat sich in den vorliegenden Versuchen auch in den fast drei Monate bebrüteten behandelten Böden keine von der potenziellen bioziden Wirkung der Pflanzenschutzmittel ableitbare Reaktion der APA gezeigt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen weitgehend die aus der Literatur bekannte Empfindlichkeit der DHA gegen-

über bioziden Pflanzenschutzmitteln (z. B. MALKOMES, 1991; DOMSCH, 1992; SCHÄFFER, 1993) und lassen sie als geeigneten Indikator im Boden für zahlreiche mikrobiologisch-ökotoxikologische Fragestellungen zur Differenzierung unterschiedlich biozider Einflüsse erscheinen. Auch die ASA scheint – wenigstens in vergleichbaren Untersuchungen – ähnliche Eigenschaften aufzuweisen und könnte damit zusätzliche Informationen zur Beurteilung mikrobiologisch-ökotoxikologischer Effekte von Pflanzenschutzmitteln im Boden liefern. Allerdings sollten die hier vorliegenden Erfahrungen zukünftig noch untermauert werden. Die APA scheidet indessen nach den vorliegenden Ergebnissen zumindest als kurzfristiger Indikator aus. Die Untersuchung mehrerer unterschiedlich empfindlicher Enzymaktivitäten könnte jedoch zur Erstellung boden- bzw. behandlingstypischer Aktivitätsmuster genutzt werden (FRANK und MALKOMES, 1993).

Nach DICK (1997) sind Bodenenzyme (allerdings weniger die DHA) von zahlreichen Umweltfaktoren abhängig und ihr Indikatorwert daher schwierig einzuschätzen. Er schlägt daher vor, bei Enzymuntersuchungen möglichst immer eine Kontrollvariante mit gleichen ökologischen Bedingungen als Bezugsbasis einzusetzen und die Messungen durch andere mikrobiologische, chemische und physikalische Untersuchungen zu ergänzen, um Veränderungen der Bodengesundheit vollständig und korrekt zu erfassen. Dies kommt auch der Forderung von DOMSCH (1991) entgegen, der mindestens 5 Testparameter zur ausreichenden Beurteilung des mikrobiologisch-ökotoxikologischen Risikos von Pflanzenschutzmitteln im Boden vorschlägt. Gesteigert werden kann die Aussagefähigkeit jedoch noch, wenn der Versuchsumfang z. B. hinsichtlich der Anzahl Böden, Vergleichsmittel, mehrerer Dosierungen und der Versuchsdauer optimiert wird (MALKOMES, 2001b).

Dank

Der Autor dankt den landwirtschaftlich-technischen Assistentinnen Karin HAUFFE und Carmen WZIONTEK für die sorgfältige Durchführung der umfangreichen Versuche.

Literatur

- ANDERSON, J. P. E., D. CASTLE, H. EHLE, D. EICHLER, H.-T. LAERMANN, G. MAAS, H.-P. MALKOMES, 1990: Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil VI, 1-1 (2. Aufl.): Auswirkungen auf die Aktivität der Bodenmikroflora. Braunschweig: Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft, 24 S.
- BAARSCHERS, W. H., J. G. DONNELLY, H. S. HEITLAND, 1988: Microbial toxicity of triclopyr and related herbicides. *Toxic. Assess.* **3**, 127–136.
- BALIGAR, V. C., R. J. WRIGHT, J. L. HERN, 2005: Enzyme activities in soil influenced by levels of applied sulphur and phosphorus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **36**, 1727–1735.
- BURNS, R. G., 1978: Enzymatic activity in soil: Some theoretical and practical considerations. In: BURNS, R. G. (ed.): *Soil enzymes*. London, New York: Acad. Press, pp. 295–340.
- BUSSE, M. D., G. O. FIEDLER, A. W. RATCLIFF, 2004: Ectomycorrhizal formation in herbicide-treated soils of differing clay and organic matter content. *Water, Air Soil Pollut.* **152**, 23–34.
- CHAKRAVARTY, P., S. S. SIDHU, 1987: Effect of glyphosate, hexazinone and triclopyr on in vitro growth of 5 species of ectomycorrhizal fungi. *Europ. J. Forest Path.* **17**, 204–210.
- DICK, R. P., 1997: Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, C. E., B. M. DOUBE, V. V. S. R. GUPTA (eds.): *Biological indicators of soil health*. Wallingford: CAB Intern., pp. 121–156.
- DOMSCH, K. H., 1991: Status and perspectives of side-effect testing. *Toxicol. Environ. Chem.* **30**, 147–152.
- DOMSCH, K. H., 1992: Pestizide im Boden: Mikrobieller Abbau und Nebenwirkungen auf Mikroorganismen. Weinheim: VCH, 575 S.
- DOMSCH, K. H., T. BECK, J. P. E. ANDERSON, B. SÖDERSTRÖM, D. PARKINSON, G. TROLLDENIER, 1979: A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **142**, 520–533.
- EIVAZI, F., M. A. TABATABAI, 1977: Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* **9**, 167–172.
- ENGELLEN, B., K. MEINKEN, F. VON WINTZINGERODE, H. HEUER, H.-P. MALKOMES, H. BACKHAUS, 1998: Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microb.* **64**, 2814–2821.
- FRANK, T., H.-P. MALKOMES, 1993: Mikrobielle Aktivitäten in landwirtschaftlich genutzten Böden Niedersachsens. II. Bodencharakterisierung anhand mikrobieller Stoffwechselaktivitäten. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **156**, 491–494.
- GADKARI, D., 1984: Influence of the herbicide Goltix on extracellular urease and phosphatase in suspended soil. *Zentralbl. Mikrobiol.* **139**, 415–424.
- HARDEN, T., R. G. JOERGENSEN, B. MEYER, V. WOLTERS, 1993: Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 679–683.
- HOUSTON, A. P. C., S. VISSER, R. A. LAUTENSCHLAGER, 1998: Response of microbial processes and fungal community structure to vegetation management in mixedwood forest soils. *Canad. J. Bot.* **76**, 2002–2010.
- JOERGENSEN, R. G., C. EMMERLING, 2006: Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **169**, 295–309.
- KLOSE, S., M. A. TABATABAI, 1999: Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **63**, 569–574.
- LI, X. Z., P. SARAH, 2003: Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 925–934.
- MALKOMES, H.-P., 1991: Existing alternative tests to measure side-effects of pesticides on soil microorganisms: dehydrogenase activity. *Toxicol. Environ. Chem.* **30**, 167–178.
- MALKOMES, H.-P., 1993: Eine modifizierte Methode zur Erfassung der Dehydrogenaseaktivität (TTC-Reduktion) im Boden nach Herbizidanwendung. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **45**, 180–185.
- MALKOMES, H.-P., 2001a: Luzernemehl-induzierte Aktivitätserhöhung (LIA) in ökotoxikologisch-mikrobiologischen Tests: Wirkung von zwei als Referenzmittel eingesetzten Dinitrophenol-Herbiziden. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotoxikol.* **13**, 192–196.
- MALKOMES, H.-P., 2001b: Microbiological tests of the effects of plant protection products in soil: experience and proposals to improve ecotoxicological significance. *EPPO Bull.* **31**, 159–167.
- MALKOMES, H.-P., 2002: Vergleich der Eignung von Dinitrophenol-Herbiziden als Referenzmittel in ökotoxikologisch-mikrobiologischen Tests von Pflanzenschutzmitteln im Boden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **54**, 36–42.
- MALKOMES, H.-P., T. DIETZE, 1998: Einfluss von Dampf sowie von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenmikroorganismen unter Laborbedingungen. II. Wirkung der Teilsterilisation sowie der Kombination mit Pflanzenschutzmitteln. *Agrobiol. Res.* **51**, 155–165.
- VON MERSI, W., F. SCHINNER, 1991: An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* **11**, 216–220.
- MORRA, M. J., 1997: Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. In: HURST, C. J., G. R. KNUDSEN, M. J. MCINERNEY, L. D. STEZENBACH, M. V. WALTER (eds.): *Manual of environmental microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 459–465.
- NOVAK, A., J. PIASECKI, 1981: Einfluss der Sterilisierung des Bodens auf die Biomasse und Phosphataseaktivität. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, Sonderh.* **IX**, 271–276.
- SAPUNDZHIEVA, K., 1987: (Effect of Garlon 3A on soil microbial activity). *Pochvozn. Agrokhim. Rast. Zashchita* **22**, (4), 48–55 (in Bulg.).
- SCHÄFFER, A., 1993: Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. In: BOLLAG, J.-M., G. STOTZKY (eds.): *Soil biochemistry*, vol. 8. New York: M. Dekker, pp. 273–340.
- SCHINNER, F., R. SONNLEITNER, 1997: *Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik*, Band III: Pflanzenschutzmittel, Agrarhilfsstoffe und organische Umweltchemikalien. Berlin, Heidelberg: Springer-Verl., 386 S.
- SERRASOLSAS, I., P. K. KHANNA, 1995: Changes in heated and autoclaved forest soils of SE Australia. 2. Phosphorus and phosphatase activity. *Bio-geochemistry* **29**, 25–41.
- SKUIJNS, J., 1978: History of abiotic soil enzyme research. In: BURNS, R. G. (ed.): *Soil enzymes*. London, New York: Acad. Press, pp. 1–49.
- SPEIR, T. W., D. J. ROSS, 1978: Soil phosphatase and sulphatase. In: BURNS, R. G. (ed.): *Soil enzymes*. London, New York: Acad. Press, pp. 197–250.
- SPEIR, T. W., D. J. ROSS, 2002: Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. In: BURNS, R. G., R. P. DICK (eds.): *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. New York, Basel: M. Dekker, pp. 407–431.

STENBERG, B., 1999: Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Acta Agric. Scand., Sect. B* **49**, 1–24.

TABATABAI, M. A., 1982: Soil enzymes. In: PAGE, A. L. (ed.): *Methods of soil analysis, part 2*. 2nd ed. Madison: Amer. Soc. Agron., pp. 903–947.

TIWARI, S. C., B. K. TIWARI, R. R. MISHRA, 1988: Enzyme activities in soils: effects of leaching, ignition, autoclaving and fumigation. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 583–585.

YEGEN, O., A. ÜNLÜ, B. M. BERGER, 1998: Einsatz und Nebenwirkungen auf bodenmikrobielle Aktivitäten des etherischen Öls aus *Thymbra*

spicata bei der Bekämpfung der Wurzelhalskrankheit an Paprika *Phytoththora capsici*. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **105**, 602–610.

Zur Veröffentlichung angenommen: November 2006

Kontaktanschrift: Dr. H.-P. Malkomes, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Unkrautforschung, Messeweg 11–12, 38104 Braunschweig, Germany. E-Mail: H.Malkomes@bba.de