

Hans-Peter Malkomes

## Die Wirkung anorganischer Bor-Verbindungen auf Mikroorganismen: Eine Literaturschau zur möglichen Einsatz als Referenzmittel in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Bodenuntersuchungen

Effect of inorganic boron compounds on microorganisms: Evaluation of literature data in view of their suitability as reference compounds in microbiological-ecotoxicological soil investigations

281

### Zusammenfassung

Mikrobiologisch-ökotoxikologische Tests von Pflanzenschutzmitteln und anderen Umweltchemikalien im Boden erhalten durch die Einbeziehung eines geeigneten Referenzmittels zusätzliche Aussagekraft. Da hierfür in einigen zoologischen Tests bereits Borsäure empfohlen wird, aber bisher noch keine zielgerichteten mikrobiologischen Untersuchungen vorliegen, wurde eine Sichtung der vorhandenen Literatur über den Bor-Einfluss durchgeführt. Bor gilt als essentielles Nährelement für höhere Pflanzen, aber offensichtlich kaum für Mikroorganismen und Tiere. Es kommt im Boden bereits natürlicherweise mit durchschnittlich 5 bis 100 mg/kg vor, doch kann diese Konzentration z.B. durch anthropogene Einträge ansteigen sowie durch Auswaschung und Pflanzenentzug abnehmen. Lösliches Bor kommt im Boden vorwiegend als Borsäure vor. Oberhalb von pH 6,3 wird die Bioverfügbarkeit von Borsäure durch Adsorption an Bodenbestandteile verringert. Anorganische Bor-Verbindungen werden bereits verbreitet in Industrie, Haushalt und der Landwirtschaft eingesetzt und gelten daher toxikologisch als recht gut untersucht.

Die Literatursichtung ergab eine sehr heterogene Verteilung hinsichtlich des Bor-Einflusses auf die im Boden erfassten mikrobiologischen Messgrößen. Mikrobielle

Populationen wurden zwar relativ häufig, oft aber nur in älteren Arbeiten untersucht. Neuere Angaben zu Bor-Einflüssen auf die mikrobielle Biomasse, Diversität und verschiedene Aktivitäten (z.B. Bodenatmung, N-Mineralisierung, Nitrifikation) sind dagegen spärlich. Als gut untersucht kann jedoch die symbiontische Stickstoffbindung gelten, wobei hier vor allem der Bor-Einfluss auf die Kulturpflanzen im Vordergrund stand. Wie die gesichteten Ergebnisse zeigen, können Dosierungen von Bor oder Borsäure, wie sie bereits natürlich vorkommen oder in neueren Collembolen-Tests empfohlen werden, durchaus bereits mikrobielle Populationen oder mikrobielle Aktivitäten beeinflussen. Je nach Dosierung und mikrobiellem Testparameter können dabei sowohl Stimulationen als auch – besonders mit steigender Dosierung – Hemmeffekte auftreten. Leider fehlen in vielen derartigen Untersuchungen Angaben zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Bor, so dass eine fundierte Aussage nur schwierig erfolgen kann. Wegen seiner relativ geringen Toxizität, der guten Handhabbarkeit im Labor sowie der wenigstens in einigen Versuchen festgestellten Dosis-Wirkungs-Beziehung gegenüber mikrobiellen Parametern sollte eine Verwendung von Borsäure als Referenzmittel geprüft werden. Hierfür wird empfohlen, zunächst anhand von ausführlichen (Ring-)Versuchen unter Laborbedingungen die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Borsäure

### Institut

Früher: Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

### Kontaktanschrift

Dr. H.-P. Malkomes, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany, E-Mail: a@jki.bund.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

19. Mai 2011

(oder alternativ von Boraten) gegenüber wichtigen mikrobiellen Parametern im Boden wie z.B. Biomasse, Diversität, Basal- und Substrat-induzierter Atmung, N-Mineralisierung und Nitrifikation, asymbiotischer N-Bindung und verschiedenen Enzymaktivitäten zu testen. Ökotoxikologische Routineversuche im Freiland oder mit Pflanzen sowie der Einsatz als Referenzmittel sollten allerdings erst nach Vorliegen entsprechender Erfahrungen folgen.

**Stichwörter:** Borat, Borsäure, Boden, Bakterien, Pilze, Antagonisten, Mykorrhiza, Stickstoffbindung, Stickstoffmineralisierung, Nitrifikation, Bodenenzyme, ökotoxikologische Tests

### Abstract

The significance of microbiological-ecotoxicological tests of pesticides and other pollutants in soils may be improved by including of a suitable reference substance. At present boric acid is already recommended in some zoological tests, but not in microbiological ones. Because no purposeful investigations in this field are available at the time, the following review on the effects of inorganic boron compounds on soil microorganisms should help to decide on the usefulness of boric acid. Boron is known as an essential nutrient for plants, but obviously not for microorganisms and animals. In soils average concentrations of 5–100 mg B/kg are naturally occurring. By anthropogenic additions the soil concentrations of boron can even be increased, whereas leaching or plant uptake may reduce these amounts. In soil the soluble boron mostly occurs as boric acid. Above pH 6.3 the bioavailability of boric acid is decreased by adsorption on soil particles. Inorganic boron compounds are worldwide used in industry, households and agriculture and, therefore, many toxicological investigations exist.

The present review shows a very heterogenic distribution of the available publications on the effects of boron on microbial parameters in soil. Relatively often several microbial populations have been investigated, but many of these publications are many years old. Newer results of boron effects on microbial biomass, diversity and several activities (e.g. soil respiration, N mineralization, nitrification) are seldom. Effects on symbiotic nitrogen fixation, however, have often been investigated, but in most cases the crop plant was the target. As the reviewed publications show, even those concentrations of boron or boric acid naturally occurring in soil or recommended for collembola tests may influence microbial populations or their activities. Depending on dosage and the microbial parameters stimulations and – especially with increasing boron amounts – inhibitions may occur. But often a sound interpretation may be difficult because dose-effect-relationships are lacking. Nevertheless the usage of boric acid as a reference compound in microbiological-ecotoxicological tests should be in consideration because of its low toxicity and good manageability in the laboratory and even of some results demonstrating a dose-effect-relationship

with some microbial parameters. But before its usage in routine tests it is recommended to further investigate by (ring-) tests under laboratory conditions the dose-effect-relationship between boric acid (or alternatively borates) and important microbial parameters in soil (e.g. biomass, diversity, basal and substrate-induced respiration, N mineralization, nitrification, asymbiotic N<sub>2</sub> fixation, several enzymatic activities). Before using boric acid in field trials – especially when plants are included – or as a reference compound further research is necessary, too.

**Key words:** Borate, boric acid, soil, bacteria, fungi, antagonists, mycorrhiza, nitrogen fixation, nitrogen mineralization, nitrification, soil enzymes, ecotoxicological tests

### Einleitung

Der Bedarf an verlässlichen Daten zur ökotoxikologischen Wirkung von Umweltchemikalien wird inzwischen allgemein akzeptiert. Allerdings erfordert speziell die Überprüfung der ökotoxischen Wirkung von Pflanzenschutzmitteln und anderen Umweltchemikalien auf den wichtigen „Produktionsfaktor Boden“ ein Testinstrumentarium, das bei optimaler Sensibilität und Reproduzierbarkeit vor allem Testparameter erfasst, die eine fundierte Aussage zulassen. Sinnvoll erscheint dabei die Einbeziehung von Referenzchemikalien, die unter Standardbedingungen weitgehend vergleichbare Ergebnisse liefern und so eine bessere Überprüfung der Tests ermöglichen, was letztlich zu einer objektiveren Bewertung der Umweltchemikalien führt.

Als nach jahrelanger Diskussionsphase auf einem internationalen Workshop 1989 in Basel (GERBER et al., 1991) schließlich europäische Empfehlungen für Labortests zur Prüfung der Wirkung von Pflanzenschutzmittel auf Bodenmikroorganismen festgelegt wurden, erschien die Einbeziehung von Referenzmitteln sowie von Dosis-Wirkungs-Beziehungen wegen des erwarteten Mehraufwands noch ebenso wenig notwendig wie bei später darauf aufbauenden europäischen OECD- und EPPO-Tests (ANONYM, 2000, 2003). Die sich an diese Empfehlungen ebenfalls anlehende frühere deutsche Richtlinie zur amtlichen Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf die Aktivität der Bodenmikroflora (ANDERSON et al., 1990) sah indessen bereits ein Referenzmittel vor, ohne dieses jedoch zu benennen. Allerdings hatten sich in jahrelangen Versuchen im damaligen Institut für Unkrautforschung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Dinitrophenol-Herbizide wegen ihrer starken bioziden Wirkung auf Bodenmikroorganismen quasi als „Ersatz“-Referenzmittel erwiesen (MALKOMES, 2002). Spätere Versuche, diese inzwischen nicht mehr als Herbizide zugelassenen Mittel durch toxikologisch weniger kritische, aber hoch dosierte Neutralsalze zu ersetzen, erfüllten jedoch nicht die Erwartungen (MALKOMES, 2007). Da auch das in der älteren Literatur gelegentlich als Referenzmittel eingesetzte Quecksilberchlorid aus toxikologischen und ökotoxikolo-

gischen Gründen heutigen Ansprüchen nicht mehr genügt, besteht hier nach wie vor eine merkliche Lücke.

Im bodenzoologischen Bereich scheint die Suche nach einem geeigneten Referenzmittel für ökotoxikologische Tests indessen weiter fortgeschritten zu sein. Dort hat sich Borsäure offensichtlich sowohl in Tests mit Enchytreen (AMORIM et al., 2008) und Oribatiden (PRINCEZ et al., 2010) als auch im *Folsomia*-Ringtest (KROGH, 2009) bewährt. Inzwischen wird Borsäure bereits als Referenzmittel in einem offiziellen OECD-Test mit Collembolen aufgeführt (ANONYM, 2009). Es wäre wünschenswert, wenn sich Borsäure auch in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Bodentests einsetzen ließe. So wären z.B. Rückschlüsse auf die in den erwähnten Tests nicht geprüften mikrobiellen Teile der Bodenbiozönose möglich und damit eine umfassendere ökotoxikologische Bewertung. Da bisher jedoch kaum entsprechende mikrobiologische Testergebnisse bekannt sind, bleibt zunächst nur die Möglichkeit, die bestehende Lücke aus der Literatur – dann allerdings mit wesentlich breiterer Basis als in einzelnen Tests – zu schließen. Einen Einstieg in die antimikrobielle Wirkung von Bor-Verbindungen bietet z.B. die Übersichtsarbeit von BOROKHOV und SCHUBERT (2007). Sehr viele der nachfolgend ausgewerteten Veröffentlichungen zum Einfluss von Bor beziehen sich bereits auf Borsäure, was eine Bewertung erleichtert.

### Vorkommen und biologische Wirkung von Bor

Über diesen Bereich liegen zahlreiche Übersichtsarbeiten vor. Ausführliche Angaben zu Bor und seinen Verbindungen finden sich z.B. in den Büchern von BAHADIR et al. (2000) und BLUME et al. (2010). Danach ist das Nichtmetall Bor mit 0,001% am Aufbau der Erdkruste beteiligt. Es ist chemisch sehr reaktionsträge und weist eine komplexe Chemie auf. In Verbindungen tritt Bor streng dreiwertig auf. In der freien Natur existiert das Element nur in Sauerstoffverbindungen. Der durchschnittliche Bor-Gehalt im Boden liegt etwa zwischen 5 und 100 mg/kg, wobei Oberböden meist höhere Gehalte aufweisen als Unterböden. Durch frühere Abwasserverrieselung und Klärschlammasubstratbringung können einige Böden darüber hinaus mit Bor belastet sein. Außerdem können die jährlichen Bor-Einträge durch Niederschläge – besonders in meernahen Gebieten – etwa 10 bis 80 g/ha betragen. Die jährliche Auswaschung von Bor aus dem Boden erreicht in Mitteleuropa Werte zwischen etwa 10 und 200 g/ha, wobei besonders Sandböden mit einem niedrigen pH-Wert bei hohen Niederschlägen betroffen sind. Außerdem kann es z.B. durch die Bor-Aufnahme durch Kulturpflanzen zu einem weiteren Bor-Entzug von jährlich etwa 150 bis 450 g B/ha kommen. Lösliches Bor kommt im Boden hauptsächlich als Borsäure vor. Die Bor-Konzentration in der Bodenlösung mitteleuropäischer Böden liegt oft zwischen 0,02 und 0,25 mg/kg. Oberhalb eines pH-Wertes von 6,3 wird Borsäure stark an Bodenpartikel (z.B. an Fe- und Al-Oxide, Tonminerale, organische Substanz) adsorbiert und verliert dadurch ihre Bioverfügbar-

keit. Borsäure selbst ist eine sehr schwache Säure. Ebenso wie ihre Salze ist sie leicht wasserlöslich.

Nach den obigen Literaturquellen ist Bor für die meisten Pflanzen ein essentielles Spurenelement, während dieser Status für Tiere und Mikroorganismen offensichtlich noch der endgültigen Klärung bedarf. Meistens wird es von Pflanzen in Form von Borsäure aufgenommen. Es ist Bestandteil der pflanzlichen Zellwände und an zahlreichen Stoffwechselfvorgängen beteiligt und somit für das Pflanzenwachstum erforderlich. Der Bor-Gehalt in den Pflanzen variiert je nach Pflanzenart und Bor-Versorgung oft zwischen 2 und 100 mg/kg (Trockensubstanz). Milchsäure führende Pflanzen sollen besonders hohe Bor-Gehalte aufweisen. Sowohl bei Bor-Mangel als auch bei höheren Konzentrationen treten Schäden (z.B. Nekrosen) an den Pflanzen auf. Der Bor-Bedarf variiert je nach Pflanzenart. In einer Züchtung von Bor-Toleranz bei Kulturpflanzen sehen YAU und RYAN (2008) eine Möglichkeit zur besseren Nutzung von mit Bor belasteten Böden und damit eine Alternative zur Bodensanierung. DEMBITSKY et al. (2002) geben in ihrer Übersichtsarbeit neben einigen anorganischen auch zahlreiche organische Bor-Verbindungen sowohl für höhere Pflanzen als auch für Algen und Mikroorganismen an.

Schließlich erfordert zumindest bei einigen Leguminosen die symbiontische Stickstoffbindung das Vorhandensein von Bor (O'HARA, 2001). Nach BOROKHOV und SCHUBERT (2007) soll Borsäure eine unspezifische Wirkung auf Mikroorganismenzellen haben, da sie an mehreren Targets angreift. Hauptwirkungswege sind die Hemmung von Membranproteinen sowie innerhalb der Zellen von Enzymen und Co-Enzymen (z.B. Hydrolasen: Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Ureasen; Oxidoreduktasen: Dehydrogenasen, Peroxidasen). Für das Ausmaß der Wirkung von Borsäure auf Mikroorganismen sind ihre Konzentration (z.B. häufig im Prozentbereich) sowie die Einwirkungszeit bedeutend, wobei sowohl bakteriostatische als auch bakterizide Effekte auftreten. Auch Cyanobacteria, Algen, mikroskopische Pilze sowie sogar Protozoen aus dem Verdauungstrakt von Termiten können durch Borsäure bzw. Borate verringert werden. Nach der vorliegenden Literatur stufen die beiden Autoren Borsäure als eine nur langsam gegen Mikroorganismen wirkende Substanz ein.

### Zusammenfassende Angaben aus Übersichtsarbeiten zur toxischen und ökotoxischen Wirkung von Bor

Nach BAHADIR et al. (2000) hat elementares Bor – im Gegensatz zu einigen seiner Verbindungen wie z.B. Borax – keine toxische Wirkung. Wie COX (2004) in ihrer Übersichtsarbeit feststellt, werden Borsäure und Borate oft als „least-toxic pesticides“ zur Bekämpfung von Insekten, Milben, Algen, Pilzen und höheren Pflanzen (Unkräuter) empfohlen. Außerdem sollen Labortests ergeben haben, dass es bei einer Borsäure-Exposition (z.B. als Pflanzenschutzmittel und als Borate) beim Menschen zu Gesundheitsschäden bis hin zur Reproduktionsbeeinflussung kommen

kann. Doch sollen diese Effekte im Allgemeinen erst bei hohen Borsäure-Dosierungen auftreten. Trotzdem wird beim Einsatz von Borsäure und ähnlichen Bor-Verbindungen als Pflanzenschutzmittel empfohlen, die Exposition möglichst wenig über die natürlicherweise vorkommenden Konzentrationen dieser verbreiteten Verbindungen zu erhöhen. Da Bor-haltige Pflanzenschutzmittel – anders als organische Pflanzenschutzmittel – bestenfalls zu den natürlich vorkommenden Bor-Verbindungen umgewandelt werden, dürfte der mit ihnen eingebrachte Bor-Gehalt im Boden weitgehend persistent sein und – wie bereits berichtet – sich nur durch Auswaschung und Pflanzenentzug merklich verringern. Nach BAHADIR et al. (2000) erfordert der Einsatz von Borsäure gegen Bakterien in der Lebensmittelindustrie hohe Konzentrationen (0,5 bis 1,5%) und ist wegen gesundheitlicher Bedenken inzwischen weitgehend verboten.

Anorganische Bor-Verbindungen (z.B. Borsäure) werden verbreitet in der Industrie, aber auch im Haushalt und in der Landwirtschaft eingesetzt. Daher liegen hierüber bereits zahlreiche zusammenfassende ökotoxikologische Angaben vor. So werden für Borsäure in aquatischen Tests z.B. LC<sub>50</sub>-Werte für Algen und Protozoen von 14,2 bis 1376 mg B/L und für zahlreiche andere Testparameter (darunter *Daphnia*, *Chlorella*, *Paramecium*, *Phragmites*) NOEC-Level von 0,1 bis 180 mg B/L genannt (ANONYM, 2005). Für terrestrische Invertebraten (z.B. *Eisenia*, *Lumbricus*, *Folsomia*, *Onychiurus*) liegen die entsprechende LC/LD<sub>50</sub>-Werte z.B. zwischen 116 und 689 mg B/kg, wobei die chronische Toxizität bereits bei 20 bis 99 mg B/kg einsetzt. Die NOEC-Angaben von Borsäure bzw. Boraten sind bei Mikroorganismen (z.B. *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Saccharomyces*) mit 5 bis 1200 mg B/kg sehr heterogen. Obwohl anorganische B-Verbindungen seit langem vereinzelt sogar als Pflanzenschutzmittel und Agrochemikalien eingesetzt werden, sind zusammenfassende Darstellungen über die für mikrobiologisch-öko-

toxikologische Tests von Böden wichtigen Kenngrößen (z.B. Arten, Diversität und Biomasse von Bodenmikroorganismen, mikrobielle Aktivitäten) derzeit noch sehr spärlich (z.B. LUCHETTI, 1938; SCHINNER und SONNLEITNER, 1997) bzw. es liegen teilweise sogar kaum Originaluntersuchungen vor, wie die nachfolgenden Ausführungen zeigen.

### Einfluss von Bor auf Bodenmikroorganismen

#### 1) Einfluss auf mikrobielle Populationen und die Diversität

Ältere medizinische Angaben vermitteln bereits einen ersten Eindruck über die – oft nur relativ geringe – Wirkung von Borsäure auf verschiedene Mikroorganismen. So fanden SCHNEGG und WEIGAND (1936) sogar in etwa 3%iger Borsäure noch beträchtliche Keimzahlen, wobei einige Hefe- und *Penicillium*-Arten noch mindestens ein Jahr lebensfähig waren, während andere allerdings bereits in 1%iger Lösung nach kurzer Zeit abstarben.

Zum Einfluss von Bor bzw. Borsäure auf Bodenmikroorganismen liegen vor allem ältere Veröffentlichungen vor. SMITH und DAWSON (1944) prüften die Eignung von Borsäure zur Zählung von Bodenmikroorganismenkeimen auf Platten mit Lipman und Brown-Nährmedium im Vergleich zu Bengalrosa. Dabei wurde die Pilzzahl je nach Bodenprobe (Wald- bzw. Feldböden) ab 0,1% Borsäure deutlich (um etwa 45 bis über 99%) gegenüber den Bengalrosaplaten reduziert (Tab. 1). Besonders stark fiel dieser Effekt in humusreicheren Böden aus. TYNER (1944) beobachtete ebenfalls auf Platten mit synthetischem und PDA-Nährboden zur Keimzählung von Bodenmikroorganismen indessen eine fast völlige Hemmung von Bakterien durch 3 g Borsäure/L, wobei trotzdem noch eine maximale Pilzzahl erfasst wurde. Während am zweiten Bebrütungstag noch eine annähernd dosisabhängige Hemmung

**Tab. 1. Einfluss von Borsäure auf die Anzahl Pilzkeime aus verschiedenen Böden auf Lipman-Brown-Nährboden (verändert nach SMITH und DAWSON, 1944)**

*Influence of boric acid on the number of fungi from several soils counted on Lipman and Brown medium (modified after SMITH and DAWSON, 1944)*

Bodenprobe (soil sample)	Anzahl Bodenpilze (counts of soil fungi) (10 <sup>3</sup> /g)		
	Vergleichsmittel Bengalrosa <sup>1</sup> (reference compound rose bengal <sup>1</sup> ) (0,0067%)	Borsäure (boric acid) (0,1%)	Borsäure (boric acid) (0,3%)
A	310 (100,0%)	169 (54,5%)	90 (29,0%)
B	210 (100,0%)	130 (61,9%)	35 (16,7%)
C <sup>2</sup>	170 (100,0%)	40 (23,5%)	15 (8,8%)
D <sup>2</sup>	155 (100,0%)	20 (12,9%)	10 (6,4%)
E <sup>2</sup>	195 (100,0%)	0,2 (0,1%)	0,2 (0,1%)

<sup>1</sup> Bei dieser Konzentration unterdrückt Bengalrosa das Wachstum von Aktinomyzeten und Bakterien stark, erlaubt jedoch die optimale Bildung von Pilzkolonien ohne Ausbreitungstendenz (At this concentration rose bengal strongly reduces growth of actinomycetes and bacteria, but allows optimal formation of fungal colonies without spreading)

<sup>2</sup> Humusreichere Böden (soils with higher C<sub>org</sub> content)

auftrat, wurde das Pilzwachstum am dritten Tag durch Borsäure ab 3,4 g/L sogar teilweise stimuliert. In Flüssig-nährmedien mit 0,2–200 mg Borsäure/L und 10 g Boden fand HERZINGER (1940) Einflüsse auf verschiedene Bodenmikroorganismen: beste Algen-Entwicklung etwa bei 10 mg/L, aber kein Wachstum von anaeroben Bakterien ab 10 mg/L. In Reinkulturen stellten SHEFNER und BURKHARDT (1957) eine Hemmung der Bodenbakterien *Rhizobium meliloti* ab 0,06% und *Azotobacter chroococcum* ab 0,12% Borsäure bei einem gleichzeitig abgesenkten pH-Wert fest. Bei einem stabilisierten pH-Wert von 7,0–7,8 waren jedoch größere Mengen an Borsäure notwendig: *R. meliloti* 0,16%, *A. chroococcum* 0,32%. *Streptomyces* sp. wurde ab 0,06% reduziert. LETUNOVA (1970) beobachtete, dass viele aus B-reichen Braunerden und Steppenböden isolierte Bakterien-, Aktinomyzeten- und Pilzarten besser auf Kulturmedien mit hohen Bor-Gehalten wuchsen, einige wenige bevorzugten allerdings niedrige Konzentrationen. Bor-Gehalte ab 7 g/L wirkten jedoch meistens toxisch. AHMED und FUJIWARA (2010) isolierten 6 Bakterien aus dem Boden, die eine hohe B-Toleranz (mmol/L) aufwiesen: *Arthrobacter* 80, *Rhodococcus* 100, *Lysinibacillus* 150, *Algoriphagus* 300, *Gracilibacillus* und *Bacillus* 450. Ebenfalls in Reinkulturversuchen wurden die beiden Bodenpilze *Penicillium expansum* und *Trichoderma koningi* bereits durch geringe Mengen an Borsäure (0,0001%) stimuliert (NIETHAMMER, 1940). Auch zwei aus arabischen Böden isolierte Pilze (*Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*) wuchsen in einem Nährmedium mit 150 mg B/L besser und wurden erst durch 350 mg B/L gehemmt (HASHIM und MOSLEM, 1995). Weitere aus dem Boden isolierte Pilze (z.B. *Aspergillus*-Arten, *Penicillium* sp.) wiesen auf einem Czapek-Dox-Medium mit 0,5 mM Borsäure ebenfalls ein stimuliertes Wachstum auf (SIVASWAMY und MAHADEVAN, 1988).

Die wenigen entsprechenden Untersuchungen zum Einfluss auf Mikroorganismen im Boden selbst beziehen sich häufig nicht direkt auf Borsäure, sondern auf Borate oder den B-Gehalt im Boden. Die Applikation von 10 und 20 lb/acre (= 10 und 20 ppm) Borax (Natriumtetraborat-Dekahydrat) zum Boden erhöhte die Pilzzahl sowohl im gekalkten als auch im ungekalkten Boden meistens mehr oder weniger dosisabhängig (HANNA und PURVIS, 1941). Bodenbakterien wurden dagegen oft geringfügig – aber nicht deutlich dosisabhängig – stimuliert. In einem mit Borsäure versetzten Boden erhöhte sich die Pilzpopulation durch 50 ppm Bor zunächst etwa um den Faktor 3, um bei 400 ppm auf den Faktor 2 abzusinken (SULOCHANA, 1952). Aktinomyzeten wurden dagegen kaum beeinflusst, während Bakterien nach einem Optimum zwischen 50 und 100 ppm B bei höheren Konzentrationen wieder abnahmen. Die Population heterotropher Bakterien und Aktinomyzeten in der Rhizosphäre von Luzerne wurde durch die Anwendung von 25 kg Borax/ha nicht merklich verändert, wobei die Einflüsse zum ersten Probenahmetermin am deutlichsten waren (MICEV, 1957). In einem Laborversuch zur Simulation geochemischer Bedingungen verursachten steigende Dosierungen von Borsäure (1–100 mg/kg) zu pseudopodsolierten Braun-

erden einen erhöhten Pilzanteil einschließlich dominierender Arten (KRASINSKAYA und LETUNOVA, 1985). Bei den höchsten Dosierungen (bis 20000 mg/kg) wurden jedoch sowohl Bakterien als auch Pilze stark reduziert.

Lediglich einige neuere Arbeiten befassen sich mit dem Einfluss von Bor oder Borsäure auf die mittels moderner Methoden ermittelte mikrobielle Diversität im Boden. Wo Bor in einigen Veröffentlichungen allerdings innerhalb eines komplexen Nährstoffgemischs angewandt wurde, sind diese Wirkungen kaum zuzuordnen und werden hier nicht weiter behandelt. NELSON und MELE (2007) untersuchten u.a. den Einfluss von Borsäure (12 und 24 mg B/kg) auf die mikrobielle Gemeinschaftsstruktur in der Rhizosphäre von Weizen mittels BIOLOG-Platten. Eine signifikante Abnahme der Diversität und des Artenreichtums wurde bei der höheren B-Belastung der Rhizosphäre beobachtet. Die Autoren vermuten, dass Bor hier indirekt wirkt, indem es über die Pflanze deren Wurzelexsudate und damit auch den osmotischen Druck im Boden verändert. IBEKWE et al. (2010) untersuchten u.a. den Einfluss von Bor-Dosierungen (0,7 bis 8 mg/L), wie sie bei Bewässerungen vorkommen, im Boden innerhalb und außerhalb der Rhizosphäre von Gurken auf die bakterielle Diversität mittels DGGE-Banden. Sie fanden während der mehrwöchigen Versuchszeit ebenfalls teilweise eine B-bedingte verringerte Diversität im Rhizosphärenboden, aber auch außerhalb. In ihren sehr komplexen Untersuchungen an borealen Böden der Ölsandgewinnung stellten MACKENZIE und QUIDEAU (2010) saisonale Fluktuationen der B-Verfügbarkeit fest, die sich ihrerseits in mikrobiellen PLFA-Profilen widerspiegeln. Auf direkte Bor-Effekte dürfte daraus zunächst kaum zu schließen sein.

## 2) Einfluss auf die Mykorrhiza

Über diesen Bereich liegen nur wenige verwertbare Veröffentlichungen vor. Da es sich um die Symbiose aus Pilzen und Pflanzen handelt, dürften einige Bor-Wirkungen auch dem Faktor Pflanze zuzuordnen sein.

SMIRNOVA (1959) beobachtete an einjährigen Eichen-sämlingen im Gefäßversuch, dass sich die (Ekto)-Mykorrhiza besser entwickelte, wenn die Pflanzen mit Borsäure besprüht wurden. Auch die Ektomykorrhiza an Coniferen wurde verbessert. So steigerte die Düngung mit Borsäure (25 mg/L) auf Blatt oder Boden den Mykorrhizapilz *Pisolithus tinctorius* an *Pinus echinata* signifikant (MITCHELL et al., 1987). Ebenso verursachte die Düngung mit Borax (1,5 kg/ha) in einem Forst mit *Picea abies* einen Anstieg der Besiedlung mit verschiedenen Ektomykorrhizapilzen (LEHTO, 1994). Allerdings beobachteten POLANCO et al. (2008) in ihrem Versuch zum Einfluss der Mykorrhiza-Beimpfung auf die Bor-Aufnahme von *Pinus banksiana* eine leichte Hemmung (*Hebeloma* sp., *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*) oder wenigstens Hemmtendenz (*Suillus tomentosus*) von 2 mM Borsäure auf die Besiedlung der Wurzeln mit diesen Pilzen.

Über Bor-Einflüsse auf die VA-Mykorrhiza liegen kaum Angaben vor. In einem sandigen Lehmboden führte Bor-Mangel teilweise zur verringerten Besiedlung der Wurzeln

von Luzerne mit VA-Mykorrhizapilzen (LAMBERT et al., 1980). Bei ebenfalls mit Bor unterversorgtem Rotklee hatte eine Düngung mit Na-Borat (1,1 ppm) trotzdem keinen signifikanten Einfluss auf die Mykorrhizabesiedlung der Wurzeln. Im Containerversuch mit *Citrus jambhiri* verursachte die Applikation von 25 mg B/L auf die Blätter einen Anstieg der Wurzelexsudation von reduzierenden Zuckern und Aminosäuren. In der Folgezeit entwickelte sich die Besiedlung der Wurzeln mit dem inokulierten Pilz *Glomus fasciculatum* deutlich besser (DIXON et al., 1989).

### 3) Einfluss auf Antagonisten phytopathogener Mikroorganismen sowie auf entomopathogene Mikroorganismen

Auch über diesen Themenbereich gibt es nur relativ wenig Literatur. Bereits 1945 beobachteten KOFFLER et al. in Flüssigkulturen, dass die Bildung des Antibiotikums Penicillin des Pilzes *Penicillium chrysogenum* u.a. durch Borax oder Borsäure gesteigert werden konnte. In Feldversuchen erzielte die Behandlung von Kartoffelknollen mit 3% Borsäure neben einer Reduzierung des Knollenbefalls mit *Rhizoctonia solani* und dessen Inokulums im Boden auch einen Anstieg der Bakterien- und Aktinomyzetenanzahl in der Rhizosphäre, darunter Antagonisten gegen den Schaderreger (KHANNA und SHARMA, 1996). In vitro-Versuche mit *Rhizoctonia solani* und dessen Antagonisten *Trichoderma harzianum* ergaben mit 100 ppm Borsäure jedoch keine Wuchshemmung beider Pilze (KHANDAKER et al., 2010). In weiteren Untersuchungen mit einem antagonistischen *Trichoderma*-Stamm und einem phytopathogenen *Fusarium* sp. reduzierte Borsäure von 10 bis 100 mg/L zwar das Wachstum beider Pilze dosisabhängig, doch reagierte *Trichoderma* etwas weniger stark (ZHUANG et al., 2004). Mit 1000 mg/L hemmte Borsäure jedoch beide Pilze total. In Versuchen mit *Trichoderma*-Stämmen und dem Schaderreger *Thielaviopsis paradoxa* wurde eine vollständige Hemmung des phytopathogenen Pilzes durch 0,3 und 1% Borax erreicht, während die Antagonisten auch hier geringer beeinflusst wurden und sich deshalb gegebenenfalls für eine kombinierte Bekämpfung eignen (RAMANUJAM et al., 2005).

Auch der Einfluss von Bor auf antagonistische Bakterien wurde geprüft. In ihren Untersuchungen mit pelletierten Zuckerrübensamen zur Verbesserung des antagonistischen Verhaltens von *Pseudomonas fluorescens* gegenüber dem Phytopathogen *Pythium ultimum* beobachteten WIYONO et al. (2008) einen deutlichen – allerdings nicht dosisabhängigen – Anstieg der Biokontrolleigenschaften durch 0,05 und 0,2 mM Borsäure. Andererseits wies Borsäure jedoch mit 19,6 µM keine Wirkung gegenüber einem zur Bekämpfung von *Sclerotinia sclerotiorum* vorgesehenen, ebenfalls antagonistischen *Pseudomonas fluorescens* auf (ASHOFTEH et al., 2009).

Zum Einfluss von Bor oder Borsäure auf insektenpathogene Mikroorganismen scheint ebenfalls kaum Literatur zu existieren. In einem Kulturmedium wurde die Zellteilung des Bakteriums *Bacillus thuringiensis* durch Bor verringert (PERRON et al., 1967). In brasilianischen Böden konnten POLANCZYK et al. (2009) dagegen keine deutliche

Beziehung zwischen dem Bor-Gehalt im Boden und dem Vorkommen bzw. dem Anteil von *B. thuringiensis* an der Bakterienflora feststellen. SAMSON und MUMMIGUTTI (1979) setzten den Pilz *Beauveria bassiana* in einem Nährmedium Borsäure-Konzentrationen von 0,5 bis 2% aus, wobei bereits die niedrige Dosierung hemmte. Ebenfalls im Kulturmedium verringerte Borsäure (30 µg/L) die Konidienkeimung des Pilzes *Metarhizium anisopliae*, während seine Biomassebildung jedoch kaum verändert wurde (ZHANG, 2001).

### Einfluss von Bor auf mikrobielle Aktivitäten im Boden sowie die daran beteiligten Mikroorganismen

#### 1) Einfluss auf die Bodenatmung und den Kohlenstoffumsatz

Die wenigen hier vorliegenden Veröffentlichungen gestatten bisher keine Beurteilung des Einflusses von Bor oder Borsäure auf die Bodenatmung, vor allem wenn berücksichtigt wird, welche Aussage mit der jeweils verwendeten Messmethode verbunden ist. HANNA und PURVIS (1941) erfassten das in 14 d gebildete CO<sub>2</sub> nach Zugabe von 2,5 bzw. 5,0 g Dextrose/kg Boden in gekalktem und ungekalktem Boden. Borax erhöhte (wenigstens tendenziell) mit 10 ppm diese Substrat-induzierte Atmung in den ungekalkten und besonders in den gekalkten Varianten mit 5,0 g Dextrose. Eine Erhöhung der Borax-Dosierung auf 20 ppm veränderte dieses Verhalten kaum.

Bereits in Versuchen zur Konservierung von Holz erwies sich Borsäure als wirksam. So beobachteten HASHEMI et al. (2010) eine deutliche Verringerung des durch den Weißfäulepilz *Trametes versicolor* verursachten Abbaus, wenn das Holz 21 d in 2% Borsäure getränkt wurde. Im Laborversuch beobachteten CHANDRA et al. (1962) einen stimulierenden Einfluss von Borsäure (0,1–10 ppm B) auf die Kompostierung des mit Natriumnitrat versetzten Weizenstrohs, wobei das Optimum bei 1 ppm lag. Im Kulturmedium stimulierte Borsäure (0,3–0,75 mg B/L) den Zelluloseabbau von zahlreichen aus einem Waldboden isolierter Mikroorganismen (NAPLEKOVA und ANIKINA, 1970). Auch in Untersuchungen zur chemischen Belastung von Tschernosemböden wurden Einflüsse von Bor (als Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O bzw. B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) auf die zellulolytische Aktivität festgestellt (KOLESNIKOV et al., 2008). Während 100 mg B/kg (einfache Dosierung) keinen Effekt ausübten, hemmten die 10-fach Dosierung bereits stark und die 100-fache vollständig. Untersuchungen des Streuabbaus in nordischen Wäldern zeigten, dass eine variierte Bor-Versorgung die Zersetzung von Fichtennadeln offensichtlich wenig beeinflusste (LEHTO et al., 2010a), während Birkenblätter je nach Bor-Quelle (Blatt, Boden) besser oder schlechter abgebaut wurden (LEHTO et al., 2010b).

#### 2) Einfluss auf die Stickstoffbindung

Zu diesem Thema liegen über einen langen Zeitraum verteilt bereits zahlreiche Veröffentlichungen vor. Allerdings steht bei der symbiontischen Stickstoffbindung häufig

der Faktor Pflanze im Vordergrund, was eine mikrobiologische Zuordnung erschwert.

Bereits frühzeitig wies VOICU (1922) auf die Toxizität von Borsäure gegenüber *Azotobacter chroococcum* hin: Ab 25 mg B/L kam es in vitro zu einer dosisabhängig verringerten N-Bindung. Auch HERZINGER (1940) beobachtete eine Wuchshemmung von *Azotobacter* ab 2 mg/L, in Nährlösungen mit geringerem B-Gehalt jedoch auch eine Förderung. Ähnliche Effekte konnten JORDAN und ANDERSON (1950) in 6 amerikanischen Böden nach einer Düngung mit 20–320 lb Borax/acre anhand der N-Bindung durch *Azotobacter chroococcum* bestätigen. Je nach Boden und Versuchsdauer fand eine maximale N-Bindung bei einem verfügbaren B-Gehalt von etwa 0,7–1,6 ppm statt. Offensichtlich ist Bor für *Azotobacter* ein wichtiges Element, denn sowohl in Flüssig- wie auch in Sandkultur fanden GERRETSEN und DE HOOP (1954) beim Wachstum von *Azotobacter chroococcum* und dessen N-Bindung ein Optimum bei etwa 2 ppm B. Allerdings schlossen ANDERSON und JORDAN (1961) aus ihren Versuchen mit *Azotobacter chroococcum*, wo in Flüssignährmedien nach Zusatz von Borsäure (1,5–10 ppm B) zwar eine gesteigerte, aber auch im B-freien Medium eine N-Bindung festgestellt wurde, dass Bor für dieses Bakterium kein essentieller Wachstumsfaktor ist. Eine ähnliche Einschätzung lässt sich auch aus den Versuchen von BERTRAND und DE WOLF (1974) mit *A. chroococcum* in einem synthetischen Medium nach dem Zusatz von 0,1–2 mg Na-Borat pro Liter ableiten. Neuere Untersuchungen zum B-Einfluss auf die asymbiotische N-Bindung sind kaum durchgeführt worden.

Literaturangaben über die Bor-Wirkung auf N-bindende Cyanobakterien im Boden scheinen offensichtlich kaum vorzuliegen. Allerdings fanden JHA et al. (2004) in indischen Reisfeldern bereits bei einer empfohlenen Borax-Düngung von 1,5 kg B/ha eine Hemmung der N-Bindung autochthoner Cyanobakterien.

Bereits in frühen Untersuchungen zur symbiontischen N-Bindung durch Leguminosen stellten BRENCHELY und THORNTON (1925) eine fördernde Wirkung von Borsäure auf die Entwicklung von *Vicia faba*, deren Knöllchenentwicklung und N-Bindung fest. Allerdings fanden sie keinen Bor-Einfluss auf das Wachstum der symbiontischen Bakterien in Reinkultur. Ebenfalls an *Vicia faba* beobachtete DUFRENOY (1940), dass Borsäure die Beziehung zwischen den Knöllchenbakterien und den Wirtszellen und damit die Balance zwischen den Symbiosepartnern beeinflusst. Im Gewächshausexperiment fand TEWARI (1963) nach der Anwendung von Borsäure (10 lb/acre) ein reduziertes Wachstum von *Vigna sinensis* (Cowpea), was sich auch in einer verringerten Knöllchenbildung widerspiegelte. In den darauf folgenden Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere Untersuchungen zum Einfluss von Borsäure, Borax und dem Bor-Gehalt im Boden auf verschiedene Leguminosen (z.B. Ackerbohnen, Bohnen, Erdnüsse, Erbsen, Klee, Sojabohnen und tropische Leguminosen) und deren symbiontische Stickstoffbindung durchgeführt, die letztlich ähnliche Ergebnissen brachten. Ihre Aufzählung würde allerdings den Rahmen der vorliegenden Übersichtsarbeit sprengen, da sie zudem häufig auf pflan-

zenphysiologische Zusammenhänge ausgerichtet waren. Dies wird z.B. auch in neueren Untersuchungen von BELLALOU et al. (2010) deutlich. Sie fanden nach der Blattapplikation der 4-fachen empfohlenen Menge von Bor (1,8 kg/ha) zu Sojabohnen zwar eine gehemmte N-Bindung, aber auch eine erhöhte Nitrat-Reduktaseaktivität und einen gesteigerten B-Gehalt in den Blättern. REGUERA et al. (2010) wiederum beobachteten nach der Applikation geringer Mengen von Borsäure (0,1 mg/L) zu *Pisum sativum* bereits einen positiven Einfluss auf den Infektionsprozess mit *Rhizobium*.

Zum Einfluss von Bor auf die symbiontische N-Bindung durch Nicht-Leguminosen liegt dagegen kaum Literatur vor. Bor-Mangel verursachte jedoch auch eine verringerte Knöllchenbildung des Aktinomyzeten *Frankia* bei dem zu den Rhamnaceae gehörenden Gehölz *Discaria trinervis*, die durch eine Borsäuregabe (1 mg B/L) behoben werden konnte (BOLAÑOS et al., 2002). Außerdem konnte in chinesischen Untersuchungen bei dem zu den Myricaceae gehörenden und ebenfalls zur symbiontischen N-Bindung befähigten Gehölz *Myrica rubra* sowohl das Wachstum als auch die Knöllchenmasse und deren N-Bindung gefördert werden, wenn die Pflanzen mit 6,6–26,4 mg Borsäure pro Baum besprüht wurden (HE et al., 2008).

### 3) Einfluss auf die Stickstoffmineralisierung und Nitrifikation

Es liegen nur wenige verwertbare Veröffentlichungen zu diesem Bereich vor, die zudem keine abschließende Beurteilung erlauben. Da sogar nach bioziden Einwirkungen wie z.B. nach einer Bodenentseuchung im Boden sowohl eine erhöhte als auch verringerte N-Mineralisierung sowie zusätzlich eine vorübergehende N-Festlegung möglich ist, wobei das zunächst gebildete Ammonium üblicherweise weiter nitrifiziert werden kann, sind für eine umfassende Bewertung unbedingt bilanzierende Zeitreihen mit Angaben zum Ammonium-, Nitrat- und  $N_{\min}$ -Gehalt im Boden erforderlich (MALKOMES, 2001). Leider fehlen diese aber oft bei den nachfolgend zitierten Arbeiten. Wünschenswert wäre z.B. auch eine Aussage zur Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Boden, so wie dies für die Nitrifikation im Abwasser von BUCHHEISTER und WINTER (2003) für Borsäure belegt wurde. Dort wurde die gesamte Nitrifikation von Ammonium zu Nitrat durch niedrige B-Konzentrationen stimuliert, während bei der hohen Dosierung von 1016 mg B/L eine 40%ige Hemmung auftrat. Die Bildung von Nitrat aus Nitrit wurde jedoch durch alle getesteten B-Konzentrationen (128–1016 mg B/L) gefördert.

Bereits 1904 stellten BOULLANGER und MASSOL in ihren umfangreichen Versuchen fest, dass die Nitrifikation durch 0,5 g Borat/L nicht beeinträchtigt wurde. In weiteren frühen Untersuchungen zur B-Düngung mit Borax und Colemanit brachten COOK und WILSON (1918) zwischen 0,00176 und 0,0058% Borsäure in die obere Bodenschicht ein. Der Ammonium- und Nitrat- und damit auch der  $N_{\min}$ -Gehalt im Boden wurden hierdurch nicht eindeutig verändert, wohl aber gab es einzelne positive und negative Abweichungen. VERONA (1937) fand in Nährlösungen keine Beeinträchtigung der Nitrifikation, wenn

die in Form von Borsäure oder Borax zugefügten B-Konzentrationen 0,1% nicht überschritten. SMITH und BELL (1947) beobachteten dagegen in Florida nach einer Borax-Düngung eine gesteigerte Nitrifikation, wobei 20 lb/acre effektiver waren als 10 lb/acre. In ihren umfangreichen Untersuchungen mit Spurenelementen fanden LIANG und TABATABAI (1977) in ihren 4 Testböden nach der Anwendung von 5  $\mu\text{mol B/g}$  als  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  eine Beeinträchtigung der N-Mineralisierung von 7 bzw. 14%. Auch die Nitrifikation wurde je nach Boden um 42, 74 bzw. 92% reduziert (LIANG und TABATABAI, 1978). In China verringerte Bor die Ammonifikation um 5,5 bis 18,3% und die Nitrifikation um 1,4 bis 12,7% (SUN et al., 2005). In anderen Untersuchungen stimulierten 50 ppm Bor die Ammonifikation in Salzböden unter anaeroben Bedingungen, während die Nitrifikation deutlich verringert wurde (HOWLADER et al., 2008). Nach 28 Tagen Bebrütung unter Laborbedingungen beobachteten BECKER et al. (2011) in einem mit Luzernemehl versetzten Standardboden einen durch 300 mg Borsäure/kg gegenüber der Kontrolle um 15% erhöhten Nitratgehalt, der bei 600 mg/kg mit 59% ein Maximum erreichte, um danach über 30% bei 1200 mg/kg schließlich bei 2400 mg/kg wieder auf das Ausgangsniveau zu fallen. Aber auch ammonifizierende Bakterien selbst können durch Bor beeinflusst werden. So erhöhten alle getesteten niedrigen Dosierungen (0,1, 0,3, 3 mg B/kg) die Population fast einheitlich um den Faktor 10 (POTATUEVA et al., 1982). Dagegen verringerten in einem Tschernosem mit niedrigem Humusgehalt höhere Dosierungen von Bor (100, 1000 und 10000 mg B/kg als  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{B}_2\text{O}_3$ ) die Anzahl ammonifizierender Bakterien fast einheitlich um mehr als 50% (KOLEJNIKOV et al., 2008). Die N-Mineralisierung aus Pflanzenmaterial von Wasserhyazinthen (*Eichhornia crassipes*) wurde durch Bor-Mengen bis zu 2,5 (Küsten- und Alluvialböden) bzw. 3,75 mg/kg (saure Sulfatböden) gefördert (MANDAL und KABIR, 2000).

#### 4) Einfluss auf mikrobielle Enzymaktivitäten

Verglichen mit anderen mikrobiellen Aktivitäten im Boden liegen über den Einfluss von Bor auf Bodenenzyme zahlreiche Untersuchungen vor, wobei allerdings pro Enzymaktivität oft nur einzelne Arbeiten existieren. Leider wurden in vielen Untersuchungen keine Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt. Da die an verschiedenen Nährstoffkreisläufen beteiligten Bodenenzyme – analytisch bedingt – häufig potenzielle Umsatzleistungen kennzeichnen, außerdem durch Sorption an Bodenpartikel auch außerhalb lebender Mikroorganismenzellen überdauern können und im Nachweisverfahren z.B. durch pH-verändernde oder gefärbte Testsubstanzen gestört werden können, ist die Interpretation der Wirkung von Bor (z.B. als Borsäure) hier teilweise schwierig.

Die Dehydrogenaseaktivität als Summenparameter, an dem zahlreiche verschiedene Dehydrogenasen beteiligt sind, kommt im Boden kaum außerhalb lebender Organismenzellen vor und ist daher oft enger mit der mikrobiellen Biomasse korreliert. Aus diesem Grund wird sie auch häufig zur mikrobiologisch-ökotoxikologischen Charakterisierung chemischer Umwelteinflüsse im Boden eingesetzt (z.B. MALKOMES, 2007b). Nach der Anwendung von Natriumborat fanden ROGERS und LI (1985) eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittels TTC-Reduktion bestimmten Dehydrogenaseaktivität, wobei die Hemmung allerdings erst ab 500 ppm des Borat-Ions auftrat (Tab. 2). Dabei konnten die Autoren eine mögliche Störung der Nachweisreaktion des Enzyms durch die hohen B-Konzentrationen ausschließen. In neueren Untersuchungen zur Düngung von *Pinus radiata* mit dem Borhaltigen Ulexit beobachteten KHAN et al. (2010) unter Gewächshausbedingungen sogar eine dosisabhängige Hemmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden ab 16 kg B/ha.

**Tab. 2. Einfluss von Natriumborat auf die durchschnittliche Dehydrogenaseaktivität im Boden mit und ohne Luzernemehlzusatz (verändert nach ROGERS und LI, 1985)**

*Influence of sodium borate on the average dehydrogenase activity in soil with and without lucerne meal amendment (modified after ROGERS and Li, 1985)*

Dosierung von $\text{BO}_3^{3-}$ (dosage of $\text{BO}_3^{3-}$ ) (mg/kg)	Dehydrogenaseaktivität: % der Kontrolle (dehydrogenase activity: % of control)	
	Boden ohne Luzernemehl (soil without lucerne meal)	Boden mit 1% Luzernemehl (soil with 1% lucerne meal)
0	100,0	100,0
30	109,5	94,5
150	104,0	98,5
300	92,0	101,0
500	81,5	100,5
1000	33,0	82,0
3000	21,0	29,5
5000	12,0	21,0



Besonders die Arbeitsgruppe um M.A. TABATABAI in den USA hat sich über viele Jahre mit dem Einfluss von Spurenelementen, darunter allerdings Bor meistens nur in einer Dosierung, auf verschiedenen Nährstoffkreisläufen zuzuordnende enzymatische Aktivitäten im Boden beschäftigt, wovon nachfolgend einige Ergebnisse vorgestellt werden sollen. So fanden FRANKENBERGER und TABATABAI (1981) unter Laborbedingungen in ihren 4 Testböden nur eine geringe Veränderung (5–9% Hemmung) der dem N-Kreislauf zuzuordnenden Amidaseaktivität durch 5 µmol B/g (als Natriumborat). Dagegen wurde die ebenfalls dem N-Kreislauf zugehörige Urease – je nach Boden stark variierend – durch Natriumborat um 13, 14, 18, 27 oder sogar 98% gehemmt (TABATABAI, 1977). Abweichend von diesem Verhalten beobachteten ACOSTA-MARTINEZ und TABATABAI (2001) in ihren 3 Testböden eine Stimulation der wiederum dem N-Kreislauf zuzuordnenden Arylamidaseaktivität von 3–23% durch die gleiche Dosierung von Natriumborat, wobei in zwei Fällen eine vorherige Lufttrocknung des Bodens zu verstärkten Effekten führte. Mit gleicher Dosierung hemmte Natriumborat allerdings die dem S-Kreislauf zuzuordnende Arylsulfataseaktivität in den 5 Testböden von AL-KHAFAJI und TABATABAI (1979) bereits um 60, 65, 67, 70 und 72%. Die dem P-Kreislauf zugehörige saure Phosphatase wurde unter ähnlichen Bedingungen durch Natriumborat je nach Boden um 1–33% gehemmt und die alkalische Phosphataseaktivität um 12–14% (JUMA und TABATABAI, 1977). Weiterhin wurde die Pyrophosphataseaktivität je nach Boden um 21–68% gehemmt (STOTT et al., 1985). Auch die am Abbau von Kohlenhydraten beteiligten Galactosidasen und Glucosidasen wurden in zwei Testböden durch die gleiche Dosierung von Natriumborat um 25–57% bzw. um 12–42% gehemmt, wobei die α-Form meistens stärker reagierte als die β-Form (EIVAZI und TABATABAI, 1990).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen über den Einfluss von Bor auf Bodenenzyme sind indessen seltener. In ihren Versuchen zur Mikronährstoffdüngung von Reisfeldern fanden SHEUDZHEN et al. (1991) anfangs eine durch Borsäure gehemmte Ureaseaktivität, die später in eine Stimulation überging, während die Nitratreduktase unbeeinflusst blieb. Allerdings liegen zusätzliche Angaben zur Wirkung von Borsäure auf die Urease selbst vor. So schlossen BENINI et al. (2004) aus ihren Untersuchungen mit dem Reinenzym, dass die Hemmwirkung von Borsäure auf ihrer Substratanalogie zum Harnstoff beruht. Auch bei einer aus Samen gewonnenen Urease verursachte Borsäure eine vollständige Hemmung, wobei die Maximalwirkung bei pH 5,0 und die Minimalwirkung bei pH 10,0 auftraten (REDDY und KAYASTHA, 2006). In chinesischen Feld- und Gefäßversuchen wurde jedoch auch eine Hemmung der Boden-Urease durch eine Borat-Düngung festgestellt (WANG et al., 1992). Steigende Dosierungen von Borsäure führten in weiteren chinesischen Untersuchungen ebenfalls zu einer zunehmenden Hemmung der Urease im Boden, wobei diese offensichtlich nicht kompetitiv war (LI und XU, 2010). In einem russischen Tschernosemboden wurde schließlich die Katala-

seaktivität durch Natriumborat ab 1000 mg B/kg stark dosisabhängig gehemmt, während die Invertaseaktivität kaum beeinflusst war (KOLESNIKOV et al., 2008).

### Kombinationswirkungen von Bor mit anderen Umweltchemikalien und ökologischen Einflüssen

Angesichts der vielfältigen Wechselbeziehungen in einem Ökosystem wäre zu erwarten, dass auch die Wirkung von Bor auf Bodenmikroorganismen durch zahlreiche Faktoren modifiziert werden kann. Allerdings ist die hierzu verfügbare Literatur nicht sehr umfangreich und aussagefähig.

Da Borsäure im Boden pH-abhängig adsorbiert wird, könnten z.B. auch durch eine Kalkung verursachte pH-Verschiebungen mikrobielle Veränderungen bewirken. HANNA und PURVIS (1941) beobachteten nach der Applikation von Borax eine erhöhte Substrat-induzierte CO<sub>2</sub>-Bildung im Boden, die bei pH 7,7 stärker war als bei pH 5,1. Diesen Effekt konnten sie allerdings bei der Bakterien- und Pilzzahl nicht eindeutig nachweisen. In einem mit 1% Luzernemehl versetzten Boden hemmte das Borat-Ion die Dehydrogenaseaktivität erst ab 1000 ppm um 18%, im ungedüngten Ausgangsboden aber bereits mit 500 ppm (ROGERS und LI, 1985). Bei Gurken beeinflussten die Salinität, der pH-Wert (6,5; 8) und der Bor-Gehalt (0,7–8 mg/L) das Pflanzenwachstum und die Rhizosphärenmikroflora (IBEKWE et al., 2010). Während beim Pflanzenwachstum keine Interaktionen dieser Einflussfaktoren auftraten, wurden in der Rhizosphäre zeitweise die heterotrophe Bakterienflora sowie deren Artenreichtum und Diversität verändert. Im Laborversuch registrierten DENG und TABATABAI (1995) nach der Anwendung von 25 µmol B als Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> in 3 luftgetrockneten Testböden fast keinen Einfluss auf die Cellulaseaktivität, während diese in feldfeuchten Böden um 12,6–23,7% gehemmt wurde. Auch aus dem Bereich der symbiontischen N-Bindung liegen Beispiele von Wechselwirkungen vor. So wurden Reinkulturen von *Rhizobium meliloti* durch 26 mM Borsäure gehemmt, doch konnte dieser Effekt durch 110 mM Mannitol aufgehoben werden (SHEFNER und BURKHARD, 1957). Die Knöllchenbildung von *Phaseolus vulgaris* wurde durch 5 kg B/ha (als Borsäure) erhöht, wobei der Effekt sowohl durch Kalk als auch Magnesiumsulfat noch verstärkt wurde (RUSCHEL et al., 1966). Bei *Vicia faba* verursachten sowohl eine Chlorid-Salinität als auch Borax eine reduzierte Knöllchenbildung (MOLA-DOILA et al., 1998). Zusätzlich kam es zu synergistischen Effekten. Die Anwendung von 75 mM NaCl verursachte bei Erbsen eine Wuchshemmung (EL-HAMDAOUI et al., 2003). Die hierdurch ebenfalls bewirkte verringerte Knöllchenbildung konnte durch 9,3–93 µM und die N-Fixierung durch 55,8 µM Borsäure abgeschwächt werden. Bei einem aus dem Boden isolierten Stamm von *Rhizobium leguminosarum* verringerte Borsäure das Wachstum, wobei dieser Effekt durch eine erhöhte Salinität noch verstärkt wurde (FAITURI et al., 2001).

### Schlussfolgerungen und Forschungsdefizite zum möglichen Einsatz anorganischer Bor-Verbindungen als Referenzmittel

In ihrer kurzen Diskussion über die „Ideal soil toxicity test reference substance“ formulierten RÖMBKE und AHTIAINEN (2007) – wohl eher im Hinblick auf kurzfristige Untersuchungen im zoologischen Bereich – mehrere Kriterien: So sollen ihre Bioverfügbarkeit und die Wirkung auf die Testspezies während der Versuchsdauer in einer reproduzierbaren Weise gewährleistet sein. Außerdem soll die Testsubstanz nicht zu schwierig zu beschaffen sein. Weiterhin soll sie im Labor ohne Gefahr für Gesundheit und Umwelt handhabbar sein. Auch sollte eine praktikable Analysenmethode vorliegen. Ergänzend nennen sie noch eine erwünschte Wirksamkeit der Referenzsubstanz bereits unterhalb einer Dosierung von 1000 mg/kg. Mikrobiologisch-ökotoxikologische Untersuchungen im Boden sollten jedoch nach unserer Meinung durchaus auch eine mehrwöchige Bebrütung unter kontrollierten Umweltbedingungen beinhalten, da mit ihnen auch bodenbiologisch und produktionstechnisch wichtige und aussagefähige Umsetzungsprozesse erfasst werden müssen. Dies setzt in vielen Fällen die kontinuierliche Messung mehrerer relevanter Umsetzungsprodukte (z.B. CO<sub>2</sub>, Nitrat, Ammonium) voraus. Reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Beziehungen, wie sie im Idealfall durch den Einsatz einer Reihe unterschiedlicher Dosierungen zu erzielen sind, können die Interpretation dabei erheblich fördern.

Eine umfassende Einschätzung mikrobiologisch-ökotoxikologischer Einflüsse von Pflanzenschutzmitteln und anderer Umweltchemikalien im Boden kann letztlich nur anhand mehrerer mikrobieller Parameter (z.B. mikrobielle Biomasse, Diversität, Aktivitäten) erbracht werden. DOMSCH (1991) leitete aus umfangreichen Literaturstudien für eine ausreichende Beurteilung der ökotoxikologischen Wirkung von Pflanzenschutzmitteln im Boden sogar eine Mindestanzahl von fünf mikrobiologischen Testparametern ab. In ihrem offiziellen Collembolen-Test nennt die OECD-Richtlinie 232 (ANONYM, 2009) Dosierungen für das Referenzmittel Borsäure von etwa 100 mg/kg, um eine 50%ige Hemmung zu erreichen. Das sind allerdings Bor-Mengen, die – wie vorher zitiert – im normalen Boden bereits vorkommen können. KROGH (2009) schlägt in den empfohlenen Tests im Boden sogar Aufwandmengen von 25–800 mg/kg Borsäure vor. In diesem Bereich sollte daher Borsäure auch in mikrobiologischen Tests wirksam sein, um einen Vergleich zu den zoologischen Versuchen zu ermöglichen.

Wie die vorangehende Literatursichtung zeigt, können diese Dosierungen von Bor, Borsäure und ihren Salzen zumindest unter Laborbedingungen durchaus bereits mikrobielle Populationen im Boden beeinflussen. Je nach Dosierung und Testorganismus können dabei sowohl Stimulationen als auch – besonders mit steigender Dosierung – Hemmeffekte auftreten. Ähnliche Reaktionen sind bei der Bodenatmung, N-Mineralisierung und Nitrifikation zu erwarten. Alle symbiontischen mikrobiellen Popu-

lationen und Aktivitäten, bei denen Pflanzen beteiligt sind, unterliegen jedoch weiteren Einflüssen. Da Bor – im Gegensatz zu Mikroorganismen – für höhere Pflanzen ein essentielles Spurenelement darstellt, kann es dort bei einer Unterversorgung zunächst zu einem fördernden Einfluss kommen, während hohe Dosierungen bereits phytotoxisch sind. Beides wirkt sich wiederum auf mikrobielle Symbiosepartner (z.B. Rhizobien, Mykorrhizapilze) aus und kann direkte Bor-Einflüsse maskieren. Entsprechend sorgfältig muss bei mikrobiologischen Versuchen zusammen mit Pflanzen vorgegangen werden, besonders unter oft nur ungenau definierten Freilandbedingungen. Leider sind die bisher vorliegenden Literaturangaben zur Wirkung von Bor, Borsäure und Boraten auf die einzelnen mikrobiellen Parameter vom Umfang und Aussagekraft her sehr unterschiedlich und ermöglichen derzeit meistens noch keine fundierte Aussage. Zudem sind zahlreiche Untersuchungen bereits mehrere Jahrzehnte alt und decken damit teilweise heutige Fragestellungen nur unvollständig ab. Größere Defizite existieren z.B. bei den auch für potenzielle ökotoxikologische Tests wichtigen Parametern mikrobielle Biomasse und Diversität, Bodenatmung und C-Mineralisierung, N-Mineralisierung und Nitrifikation. Auch die Aussagekraft der relativ zahlreichen Enzymuntersuchungen lässt sich mangels Dosis-Wirkungs-Beziehungen oft nur schwer einschätzen.

Wie bereits vorher berichtet, wird die Bioverfügbarkeit von Bor im Boden besonders oberhalb von pH 6,3 durch Adsorption an Bodenpartikel verringert. Dies könnte einen Vergleich der Wirkung von Bor in unterschiedlichen Böden erschweren. Wie die leider noch viel zu wenig untersuchten Kombinationswirkungen von Bor mit ökologischen Faktoren und weiteren ökotoxischen Substanzen erkennen lassen, kann es durchaus zu einer modifizierten Wirkung kommen, die ebenfalls eine fundierte Aussage einschränkt. Wie die Untersuchungen von BECKER et al. (2011) zeigen, sollte die Wirkung von Bor auf die Bodenfauna sowie auf Pflanzen nicht unterschätzt werden, die ihrerseits als Teil der Bodenbiozönose wiederum in Wechselwirkung mit den Mikroorganismen stehen und somit ebenfalls modifizierend wirken. Ähnlich dürfte auch die Beeinflussung von antagonistischen Mikroorganismen einzuordnen sein.

Insgesamt erscheint die Überprüfung der Eignung von Borsäure als Referenzmittel in mikrobiologisch-ökotoxikologische Bodenuntersuchungen sinnvoll. Dafür sprechen die – im Vergleich zu früheren Vergleichsmitteln – relativ geringe Toxizität und die gute Handhabbarkeit im Labor. Auch die wenigen bisher beobachteten Dosis-Wirkungs-Beziehungen weisen in diese Richtung. Allerdings sollte vor einem empfohlenen Routineeinsatz zunächst in umfangreichen (Ring-)Versuchen unter Laborbedingungen die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Borsäure (oder alternativ von Boraten) auf wichtige mikrobielle Parameter wie Biomasse und Diversität, Basal- und Substrat-induzierte Bodenatmung, N-Mineralisierung und Nitrifikation, asymbiontische N-Bindung und Enzymaktivitäten (z.B. Arylsulfatase, Dehydrogenase, Katalase, Protease, Phosphatase, Urease) im Boden getestet werden. Dabei

dürfen die Untersuchungen nicht nur wenige Tage laufen, sondern sie müssen – teilweise unter Einbeziehung verschiedener Umsetzungsprodukte – wenigstens mehrere Wochen (bis Monate) durchgeführt werden, um auch Stoffbilanzen erstellen zu können. Erst nach Vorliegen entsprechender Ergebnisse sollte Borsäure in Routineversuchen bei ausgewählten mikrobiellen Testparametern als Referenzsubstanz unter Laborbedingungen eingesetzt werden. Freilandversuche oder Versuche mit Pflanzen erfordern nach unserer Auffassung sogar noch weitere Erfahrungen in einer zusätzlichen Testphase.

## Literatur

- ACOSTA-MARTINEZ, V., M.A. TABATABAI, 2001: Arylamidase activity in soils: Effect of trace elements and relationships to soil properties and activities of amidohydrolases. *Soil Biol Biochem.* **33**, 17-23.
- AHMED, I., T. FUJIWARA, 2010: Mechanism of boron tolerance in soil bacteria. *Canad. J. Microb.* **56**, 22-26.
- AL-KHAFAJI, A.A., M.A. TABATABAI, 1979: Effects of trace elements on arylsulfatase activity in soils. *Soil Sci.* **127**, 129-133.
- AMORIM, M.J.B., S. NOVAIS, J. RÖMBKE, A.M.V.M. SOARES, 2008: *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environ. Internat.* **34**, 363-371.
- 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: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. 24 S.
- ANDERSON, G.R., J.V. JORDAN, 1961: Boron: a non-essential growth factor for *Azotobacter chroococcum*. *Soil Sci.* **92**, 113-116.
- ANONYM, 2000: OECD guideline for the testing of chemicals: Soil microorganisms: Nitrogen transformation test (216); carbon transformation test (217), (adopted 21<sup>st</sup> January 2000). Paris: OECD.
- ANONYM, 2003: Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8: Soil organisms and functions. EPPO Bull. **33**, 195-209.
- ANONYM, 2005: HERA (Human and environmental risk assessment on ingredients of household cleaning products) – Substance: boric acid (edition 1.0), 81 pp.
- ANONYM, 2009: OECD guideline for the testing of chemicals: Collobolan reproduction test in soil (232), (adopted 7<sup>th</sup> September 2009). Paris: OECD.
- ASHOFTEH, F., M. AHMADZADEH, V. FALLAHZADEH MAMAGHANI, 2009: Effect of mineral components of the medium used to grow biocontrol strain UTPF61 of *Pseudomonas fluorescens* on its antagonistic activity against sclerotinia wilt of sunflower and its survival during and after the formulation process. *J. Plant Path.* **91**, 607-613.
- BAHADIR, M., H. PARLAR, M. SPITTELER (Hrsg.), 2000: Springer Umweltlexikon, 2. Aufl., Berlin, Heidelberg, Springer 1455 S.
- BECKER, L., A. SCHEFFCZYK, B. FÖRSTER, J. OEHLMANN, J. PRINZ, J. RÖMBKE, T. MOSER, 2011: Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. *J. Soils Sedim.* **11**, 238-248.
- BELLALOUJ, N., K.N. REDDY, A.M. GILLEN, C.A. ABEL, 2010: Nitrogen metabolism and seed composition as influenced by foliar boron application in soybean. *Plant Soil* **336**, 143-155.
- BENINI, S., W.R. RYPNIEWSKI, K.S. WILSON, S. MANGANI, S. CIURLI, 2004: Molecular details of urease inhibition by boric acid: Insights into the catalytic mechanism. *J. Amer. Chem. Soc.* **126**, 3714-3715.
- BERTRAND, D., A. DE WOLF, 1974: Le bore est-il un oligo-élément essentiel pour *Azotobacter chroococcum*? *Compt. Rendus Séances Acad. Sci.*, **D 278**, 2071-2074.
- BLUME, H.-P., G.W. BRÜMMER, R. HORN, E. KANDELER, I. KÖGEL-KNABNER, R. KRETZSCHMAR, K. STAHR, B.-M. WILKE (Bearb.), 2010: Scheffer-Schachtschabel – Lehrbuch der Bodenkunde, 16. Aufl., Heidelberg, Spektrum Akad. Verl., 569 S.
- BOLAÑOS, L., M. REDONDO-NIETO, I. BONILLA, L.G. WALL, 2002: Boron requirement in the *Discarica trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiotic relationship. Its essentiality for *Frankia* BCU110501 growth and nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* **115**, 563-570.
- BOROKHOV, O., D. SCHUBERT, 2007: Antimicrobial properties of boron derivatives. *ACS Symp. Series*, **967**, 412-435.
- BOULLANGER, E., L. MASSOL, 1904: Études sur les microbes nitrificateurs. Deuxième mémoire. *Ann. Inst. Pasteur* **18**, 181-196.
- BRENCHLEY, W.E., H.G. THORNTON, 1925: The relation between the development, structure and functioning of the nodules of *Vicia faba*, as influenced by the presence or absence of boron in the nutrient medium. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* **98**, 373-399.
- BUCHHEISTER, F., J. WINTER, 2003: Der Einfluss von Bor auf die Nitrifikation. *Gas-Wasser-Fach, Wasser Abwasser* **144** (1), 66-70.
- CHANDRA, P., J.G. SHRIKHANDE, W.B. BOLLEN, 1962: The influence of trace elements on the composting of wheat straw. *Folia Microb.* **7**, 364-371.
- COOK, F.C., J.B. WILSON, 1918: Boron: Its effect on crops and its distribution in plants and soil in different parts of the United States. *J. Agric. Res.* **13**, 451-470.
- COX, C., 2004: Boric acid and borates. *J. Pesticide Reform*, **24** (2), 10-15.
- DEMBITSKY V.M., R. SMOUM, A.A. AL-QUNTAR, H.A. ALI, I. PERGAMENT, M. SREBNIK, 2002: Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Sci.* **163**, 931-942.
- DENG, S.P., M.A. TABATABAI, 1995: Cellulase activity of soils: Effect of trace elements. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 977-979.
- DIXON, R.K., H.E. GARRETT, G.S. COX, 1989: Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. *J. Plant Nutr.* **12**, 687-700.
- DOMSCH, K.H., 1991: Status and perspectives of side-effect testing. *Toxicol. Environ. Chem.* **30**, 147-152.
- DUFRENOY, J., 1940: The relation of boron to the root-nodules of *Vicia faba*. *Growth* **4**, 323-326.
- EIVAZI, F., M.A. TABATABAI, 1990: Factors affecting glucosidase and galactosidase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 891-897.
- EL-HAMDAOULI, A., M. REDONDO-NIETO, B. TORRALBA, R. RIVILLA, I. BONILLA, L. BOLAÑOS, 2003: Influence of boron and calcium on the tolerance to salinity of nitrogen-fixing pea plants. *Plant Soil* **251**, 93-103.
- FAITURI, M.Y., Y.E. EL-MAHI, G.A. EL-HASSAN, 2001: Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminarum* bv. *viceae* strain isolated from a salt-affected soil. *Canad. J. Microb.* **47**, 807-812.
- FRANKENBERGER, W.T., M.A. TABATABAI, 1981: Amidase activity in soils: IV. Effects of trace elements and pesticides. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **45**, 1120-1124.
- GERBER, H.R., J.P.E. ANDERSON, B. BÜGEL-MOGENSEN, D. CASTLE, K.H. DOMSCH, H.-P. MALKOMES, L. SOMERVILLE, D.J. ARNOLD, H. VAN DE WERF, R. VERBEKEN, J.W. VONK, 1991: 1989 revision of recommended laboratory tests for assessing side-effects of pesticides on the soil microflora from the 4<sup>th</sup> International Workshop in Basle, Switzerland, 18-21 September 1989. *Toxicol. Environ. Chem.* **30**, 249-261.
- GERRITSEN, F.C., H. DE HOOP, 1954: Boron, an essential micro-element for *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* **5**, 349-367.
- HANNA, W.J., E.R. PURVIS, 1941: Effect of borax and lime on activity of soil microorganisms in Norfolk fine sandy loam. *Soil Sci.* **52**, 275-281.
- HASHEM, A.R., M.A. MOSLEM, 1995: Boron tolerance and accumulation in *Aspergillus flavus* und *Penicillium citrinum* isolated from Saudi Arabian soil. *J. King Saud Univ., Sci.* **7** (1), 13-20.
- HASHEMI, S.K.H., A.J. LATIBARI, H. KHADEMI-ESLAM, R.F. ALAMUTI, 2010: Effect of boric acid treatment on decay resistance and mechanical properties of poplar wood. *BioResources*, **5**, 690-698.
- HE, X.-H., H. PAN, F. LI, H.-Y. QIN, Y. LUO, 2008: (*Myrica rubra* plant growth, nodulation, and nitrogen fixation using a boron spray). *J. Zhejiang Forestry Coll.* **25**, 689-691 (in Chin.).
- HERZINGER, F., 1940: Beiträge zum Wirkungskreislauf des Bors. *Bodenk. Pflanzenernähr.* **16**, 141-168.
- HOWLADER, S.H., A.K.M. FARUK-E-ATAM, M. MANIRUZZAMAN, I.M. SHARIFUL, 2008: Nitrogen mineralization during incubation of Kuakata saline soils. *J. Subtrop. Agric. Res. Dev.* **6**, 487-489 (zit.: CABI).
- IBEKWE, A.M., J.A. POSS, S.R. GRATTAN, C.M. GRIEVE, D. SUAREZ, 2010: Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 567-575.
- JHA, M.N., A.N. PRASAD, S.K. MISRA, 2004: Effect of micronutrients on diazotrophic cyanobacteria and yield of paddy. *Indian J. Microb.* **44**, 171-174.
- JORDAN, J.V., G.R. ANDERSON, 1950: The effect of boron on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Soil Sci.* **69**, 311-319.
- JUMA, N.G., M.A. TABATABAI, 1977: Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **41**, 343-346.
- KHAN, R.U., C.W.N. ANDERSON, P. LOGANATHAN, J. XUE, P. CLINTON, 2010: Response of *Pinus radiata* (D. Don) to boron fertilisation under greenhouse conditions. 19<sup>th</sup> World Congr. Soil Sci. 'Soil solutions for a changing world', Brisbane, 208-211.

- KHANDAKER, M.M., M.K.A. BHUIYAN, A. KHAIR, 2010: In vitro evaluation of fungicidal responses on the growth of pathogenic *Rhizoctonia solani* Kuhn, antagonistic binucleate *Rhizoctonia* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Bangladesh J. Bot.* **39**, 107-110.
- KHANNA, R.N., J. SHARMA, 1996: Effect of boric acid treatment on seed and soil borne *Rhizoctonia solani* inocula and rhizosphere microflora. *J. Indian Potato Assoc.* **23** (1-2), 1-7.
- KOFFLER, H., S.G. KNIGH, R.L. EMERSON, R.H. BURRIS, 1945: The effect of certain chemicals on penicillin production and mold metabolism in shake flask fermentations. *J. Bacter.* **50**, 549-559.
- KOLESNIKOV, S.I., A.A. POPOVICH, K.Sh. KAZEEV, V.F. VAL'KOV, 2008: The influence of fluorine, boron, selenium, and arsenic pollution on the biological properties of ordinary chernozems. *Eurasian Soil Sci.* **41**, 400-404.
- KRASINSKAYA, N.P., S.V. LETUNOVA, 1985: (Effect of zinc, molybdenum and boron on the microorganism complex in Abkhazian pseudopedzolized brown soils). *Biol. Nauki*, (5), 95-99 (in Russ.).
- KROGH, P.H., 2009: Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environ. Protection Agency: Environ. Project no. 1256, 66 pp.
- LAMBERT, D.H., H. COLE, D.E. BAKER, 1980: The role of boron in plant response to mycorrhizal infection. *Plant Soil* **57**, 431-438.
- LEHTO, T., 1994: Effects of liming and boron fertilization on mycorrhizas of *Picea abies*. *Plant Soil* **163**, 65-68.
- LEHTO, T., P.J. APHALO, P. SARANPÄÄ, T. LAAKSO, A. SMOLANDER, 2010a: Decomposition and element concentrations of Norway spruce needle litter with differing B, N, or P status. *Plant Soil* **330**, 225-238.
- LEHTO, T., A. SMOLANDER, P.J. APHALO, 2010b: Decomposition and element concentrations of silver birch leaf litter as affected by boron status of litter and soil. *Plant Soil* **329**, 195-208.
- LETUNOVA, S.V., 1970: (Geochemical ecology of micro-organisms in soils and silts containing various amounts of boron). *Agrokimiya*, (6), 98-104 (in Russ.).
- LI, C.-M., M.-H. XU, 2010: (Effect of boric acid treatment on kinetic parameters of soil urease). *J. Southwest China Normal Univ., Nat. Sci. Edit.* **35** (2), 124-126 (in Chin.).
- LIANG, C.N., M.A. TABATABAI, 1977: Effects of trace elements on nitrogen mineralization in soils. *Environ. Pollut.* **12**, 141-147.
- LIANG, C.N., M.A. TABATABAI, 1978: Effects of trace elements on nitrification in soils. *J. Environ. Qual.* **7**, 291-293.
- LUCCHETTI, G., 1938: Ricerche sui terreni della zona boracifera di Larderello. II. Il boro ed i microorganismi. *Ann. Fac. Agr. Univ. Pisa*, **1**, 196-214.
- MACKENZIE, M.D., S.A. QUIDEAU, 2010: Microbial community structure and nutrient availability in oil sands reclaimed boreal soils. *Appl. Soil Ecol.* **44**, 32-41.
- MALKOMES, H.-P., 2001: Microbiological tests of the effects of plant protection products in soil: Experience and proposals to improve ecotoxicological significance. *EPPPO 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., 2007a: Untersuchungen zur Eignung von Neutralsalzen als Referenzmittel bei der mikrobiologisch-ökotoxikologischen Bewertung von Pflanzenschutzmitteln im Boden. *UWSF Z. Umweltchem. Ökotoxikol.* **19**, 96-102.
- MALKOMES, H.-P., 2007b: Bewertung einiger Enzymaktivitäten in mikrobiologisch-ökotoxikologischen Untersuchungen von Pflanzenschutzmitteln im Boden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **59**, 62-68.
- MANDAL, R., S.M. KABIR, 2000: Impact of boron on release of mineral-N from water hyacinth in coastal and alluvial soils. *J. Phytol. Res.* **13** (2), 149-152.
- MICEV, N., 1957: (The effect of superphosphate and borax on the microbial population in the rhizosphere of lucerne). *Annu. Fac. Agric. Sylv. Univ. Skopje* **10**, 133-139 (in Serb.).
- MITCHELL, R.J., H.E. GARRETT, G.S. COX, A. ATALAY, R.K. DIXON, 1987: Boron fertilization, ectomycorrhizal colonization, and growth of *Pinus echinata* seedlings. *Canad. J. Forest Res.* **17**, 1153-1156.
- MOLA-DOILA, Y.A.A., K.S. DATTA, R. ANGRISH, B. KUMAR, J. DAYAL, P. KUMARI, 1998: Salinity and boron effects on nodulation and carbon and nitrogen contents of nodules of broad bean (*Vicia faba* L.). *Indian J. Plant Physiol.* **3**, 279-282.
- NAPLEKOVA, N.N., A.P. ANIKINA, 1970: Assimilation of boron by cellulose-decomposing microorganisms. *Microbiology* **39**, 547-550.
- NELSON, D.R., P.M. MELE, 2007: Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 340-351.
- NIETHAMMER, A., 1940: Verhalten mikroskopischer Bodenpilze gegenüber in der Natur verbreiteten Wuchsstoffen. *Arch. Mikrob.* **11**, 73-79.
- O'HARA, G.W., 2001: Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: A review. *Austr. J. Exper. Agric.* **41**, 417-433.
- PERRON, J.M., W.A. SMIRNOFF, L. HUOT, 1967: Comparison of toxicity of several elements on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berl. *Canad. J. Microb.* **13**, 81-91.
- POLANCO, M.C., J.J. ZWIAZEK, M.D. JONES, M.D. MACKINNON, 2008: Responses of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings to NaCl and boron. *Trees: Structure and Function* **22**, 825-834.
- POLANCZYK, R.A., J.C. ZANUNCIO, S.B. ALVES, 2009: Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Rural* **39**, 1-5.
- POTATUEVA, Yu.A., L.S. KUZ'MICH, I.A. YANCHUK, 1982: (Effect of excessive boron rates on plants and soil). *Agrokimiya*, (10), 108-112 (in Russ.).
- PRINCZ, J.I., V.M. BEHAN-PELLETIER, R.P. SCROGGINS, S.D. SICILIANO, 2010: Oribatid mites in soil toxicity testing – the use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a new test species. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 971-979.
- RAMANUJAM, B., K.K.N. NAMBIAR, R. IYR, 2005: Effect of systemic fungicides, aqueous extracts of oil cakes and inorganic soil amendments on *Thielaviopsis paradoxa* and its antagonistic fungi in vitro. *J. Plant. Crops* **33** (2), 107-111.
- REDDY, K.R.C., A.M. KAYASTHA, 2006: Boric acid and boronic acids inhibition of pigeonpea urease. *J. Enzyme Inhib. Medic. Chem.* **21**, 467-470.
- REGUERA, M., I. ABREU, N.J. BREWIN, I. BONILLA, L. BOLAÑOS, 2010: Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and rhamnogalacturonan II and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules. *Plant Cell Environ.* **33**, 2112-2120.
- ROGERS, J.E., S.W. LI, 1985: Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity: Soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 858-865.
- RÖMBKE, J., J. AHTIAINEN, 2007: The search for the "ideal" soil toxicity test reference substance. *Integr. Environ. Assess. Manag.* (P.M. CHAPMAN, ed.), **3** (3), 464-466.
- RUSCHEL, A.P., D.P.P. DE S. BRITTO, J. DÖBEREINER, 1966: (Effects of magnesium, boron and molybdenum on symbiotic nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.)). *Pesqu. Agropecu. Brasil.* **1**, 141-145 (in Port.).
- SAMSON, M.V., S.G. MUMMIGUTTI, 1979: In-vitro screening of chemicals against *Beauveria bassiana*. *Indian J. Sericult.* **18** (1), 48-50 (zit. Web of Sci.).
- SCHINNER, F., R. SONNLEITNER, 1997: *Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik*, Band IV: Anorganische Schadstoffe. Berlin, Heidelberg: Springer, 459 S.
- SCHNEGG, H., K. WEIGAND, 1936: Borsäure-Studien. *Zbl. Bakteriol.*, **2. Abt.** **95**, 154-167.
- SHEFNER, A.M., B.J. BURKHARDT, 1957: Reversal of boric acid inhibition of growth in certain soil micro-organisms. *Nature* **180**, 1207-1208.
- SHEUDZHEN, A.Kh., E.P. ALESHIN, O.A. DOSEVA, 1991: (Change in the fermentative activity of rice-field soil under the influence of microfertilizers). *Dokl. Vses. Ordena Lenina Ordena Trud. Krasnogo Znameni Akad. Sel'sk. Nauk*, (8), 16-18 (in Russ.).
- SIVASWAMY, S.N., A. MAHADEVAN, 1988: Effects of tannery effluents and tannins on soil fungi. *J. Environ. Biol.* **9** (1), 61-67.
- SMIRNOVA, A.D., 1959: (On the physiological role of mycorrhiza). *Uchenye Zap. Saratov Univ.* **64**, 135-138 (in Russ.).
- SMITH, F.B., C.E. BELL, 1947: Interrelationship of microbiological action in soils and cropping systems in Florida. *Florida Agric. Exp. Stat. Annu. Rept.*, p. 97.
- SMITH, N.R., V.T. DAWSON, 1944: The bacteriostatic action of rose bengal in media used for plate counts of soil fungi. *Soil Sci.* **58**, 467-471.
- STOTT, D.E., W.A. DICK, M.A. TABATABAI, 1985: Inhibition of pyrophosphatase activity in soils by trace elements. *Soil Sci.* **139**, 112-117.
- SULOCHANA, C.B., 1952: Soil conditions and root diseases. IV. The effect of micro-elements on the occurrence of bacteria, actinomycetes and fungi in soils. *Proc. Nat. Acad. Sci. India* **36** (1), 19-33.
- SUN, X., W. LI, H. DING, 2005: (Effect of danly (wheat straw) and boron on ammonification and nitrification of urea and availability of phosphorus in soil). *Phosphate Compound Fertil.* **20** (1), 68-69 (in Chin.), (zit. Google).
- TABATABAI, M.A., 1977: Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* **9**, 9-13.
- TEWARI, G.P., 1963: Note on effects of soil sterilization and some mineral nutrients on commercial strains of cowpea *Rhizobium* in western Nigeria. *Emp. J. Exp. Agric.* **31** (121), 50-52.
- TYNER, L.E., 1944: Effect of media composition on the numbers of bacterial and fungal colonies developing in Petri plates. *Soil Sci.* **57**, 271-274.

- VERONA, O., 1937: A propos de l'influence du bore sur le processus de nitrification. Soc. Intern. Microb. Boll. Sez. Ital. **9**, 65-66.
- VOICU, J., 1922: Influence de l'humus sur la sensibilité de l'*Azotobacter chroococcum* vis-à-vis du bore. Compt. Rendus Séances Acad. Sci. **175**, 317-319.
- WANG, D., P. GUO, G. CHENG, X. DONG, 1992: (The fertilizer response of crops to urea containing borate). J. Shenyang Agric. Univ. **23** (2), 108-113 (in Chin.).
- WIYONO, S., D.F. SCHULZ, G.A. WOLF, 2008: Improvement of the formation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. Biol. Control **46**, 348-357.
- YAU, S.K., J. RYAN, 2008: Boron toxicity tolerance in crops: A viable alternative to soil amelioration. Crop Sci. **48**, 854-865.
- ZHANG, S., 2001: (Studies on sporulation of *Metarhizium anisopliae* in submerged culture). Scientia Silvae Sinicae **37** (5), 134-139 (in Chin.).
- ZHUANG, J.-H., Z.-G. GAO, X. LIU, J. CHEN, Y. YANG, 2004: (Effect of nutrition elements on biocontrol efficiency of *Trichoderma* against melon wilt). Acta Phytolacica Sinica **31** (4), 359-364 (in Chin.).