

Tagungsbeitrag zu:

Jahrestagung der DBG,
AG Bodengase

Titel der Tagung:

Unsere Böden – Unser Leben

Veranstalter:

DBG

Termin und Ort der Tagung:

05.-10.09.15, München

Berichte der DBG (nicht begutachtete online Publikation), <http://www.dbges.de>

Effekt von N-Düngung und DMPP auf Spurengasemissionen sowie Enzymaktivität und Genkopien von Nitrifikanten und Denitrifikanten

Ivan Guzman-Bustamante^{1*}, Rudolf Schulz¹, Reinhardt Hähndel², Torsten Müller¹, Ingrid Class-Mahler³, Johannes Harter⁴, Sebastian Behrens⁴ und Reiner Ruser¹

Schlüsselworte

N₂O-Emission, CO₂-Emission, Nitrifikanten, Denitrifikanten, N-Düngung, DMPP, Nitrifikationsinhibitor

Einführung

Durch die gleichzeitige Applikation von Nitrifikationsinhibitoren (NI) und NH₄⁺-haltigen N-Düngern können die N₂O-Emissionen aus landwirtschaftlich genutzten Böden um ca. 35% verringert werden (Ruser und Schulz, 2015). NIs hemmen das erste Enzym der Nitrifikation, die durch das *amoA*-Gen kodierte Ammoniummonooxygenase (AMO). Dadurch entsteht weniger Nitrat (NO₃⁻), welches das Substrat für die Denitrifikation darstellt.

Ein in Europa kommerziell eingesetzter NI ist 3,4-Dimethylpyrazolphosphat (DMPP), welcher, verglichen mit anderen NIs, aufgrund seiner günstigen physikochemischen Eigenschaften in sehr niedrigen Konzentrationen (1% des applizierten NH₄-N) appliziert werden kann (Zerulla et al. 2001).

Kleineidam et al. (2011) zeigten in einem Feldversuch, dass eine DMPP-Applikation keinen Einfluss auf die *amoA*-Genkopienanzahl von nitrifizierenden Archaeen hatte. Im Gegensatz dazu verminderte sich in ihrem Versuch die Anzahl an Nitrifikationsbakterien. Müller et al. (2002) konnten in einem Laborversuch keinen DMPP-Effekt auf die Enzymaktivität von Denitrifizierern feststellen. Dies gelang selbst bei hohen Konzentrationen nicht (sie testeten Konzentrationen bis zum 14-fachen der für die Praxisanwendung empfohlenen Aufwandmenge). Obwohl ein Rückgang der Enzymaktivität von Nichtzielorganismen (Dehydrogenase- und Dimethylsulfoxid-Reduktase Aktivität) erst ab DMPP-Mengen zu verzeichnen waren, die 25- bis 90-mal höher lagen als empfohlen (Tindaon et al. 2012), wurde ein Rückgang der Bodenatmung in Feld- und Laborversuchen bei empfohlener Aufwandmenge nachgewiesen (Weiske et al. 2001, Pfab et al. 2011). Zudem berichteten Zhang et al. (2015), dass sich die Mineralisation von organischem Material durch DMPP-Zusatz bei der Kompostierung von Klärschlamm verlangsamt.

Um diese widersprüchlichen Zusammenhänge genauer zu beleuchten, wurde der Einfluss der DMPP- sowie der N-Applikation auf die N₂O-Freisetzung sowie auf die

¹ Universität Hohenheim, Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Düngung und Bodestoffhaushalt (340i), Fruwirthstr. 20, 70599 Stuttgart
*e-mail: Ivan.Guzman@uni-hohenheim.de

² EuroChem Agro GmbH, Reichskanzler-Müller-Straße 23, 68165 Mannheim

³ Universität Hohenheim, Institut für Bodenkunde und Standortslehre (310), 70563 Stuttgart

⁴ Universität Tübingen, Zentrum für Angewandte Geowissenschaften (ZAG) - Geomikrobiologie, 72074 Tübingen

Genkopienanzahl von Nitrifizierern und Denitrifizierern in einem zweifaktoriellen Laborversuch untersucht.

Material und Methoden

Der Inkubationsversuch fand in einer Mikrokosmenanlage bei konstanter Temperatur (15°C) statt. Der Aufbau der Mikrokosmenanlage wurde bei Hantschel et al. (1994) detailliert beschrieben. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Behandlungen bzw. über die ausgebrachten N- und DMPP-Mengen.

Tab. 1: Versuchsbehandlungen und Aufwandmengen.

N-Düng.	NI	Düngerappli- kation	N-Menge mg MK ⁻¹	DMPP- Menge (kg ha ⁻¹)
-N	- DMPP	H ₂ O _{dest}		
-N	+ DMPP	DMPP-Lösung		1,8 (0,37)
+N	- DMPP	ASS Düngerkörner	250 (200)	
+N	+ DMPP	ASS+DMPP Düngerkörner	250 (200)	1,8 (0,37)

DMPP = 3,4 Dimethylpyrazolphosphat
ASS = Ammonsulfatsalpeter

Mikrokosmen aus Plexiglas (25 cm Höhe, 13 cm Durchmesser) wurden mit gesiebttem Oberboden einer Parabraunerde (schluffiger Lehm, <5 mm) gefüllt. Der Boden wurde auf eine Lagerungsdichte von 1,2 g cm⁻³ rückverdichtet. Die Säulen wurden täglich mit 13 mL einer 12,5 mM CaCl₂ beregnet. Dies entspricht einem Tagesniederschlag von 1,9 L m⁻². Neben den Spurengasflüssen wurden im wöchentlichen Rhythmus Perkolatproben die mit Hilfe einer Unterdruckanlage gewonnen wurden entnommen und die NO₃⁻-Konzentration im Sickerwasser bestimmt.

Die Bodensäulen wurden über 2 Monaten vorinkubiert, um einheitliche Startbedingungen zu schaffen.

Ein Tag vor, sowie 3, 30 und 60 Tage nach Applikation wurden in jedem Kosmos Bodenproben in 0-8 cm Tiefe entnommen und die N_{min}-Gehalte, potentielle Nitrifikation und Denitrifikation sowie Genkopienanzahl

von Nitrifikanten (archaeale und bakterielle *amoA*) und Denitrifikanten (*nirK*: Nitritreduktase und *nosZ*: N₂O-Reduktase) bestimmt. Gasproben zur Ermittlung der N₂O- und CO₂-Flüsse wurden im ersten Monat täglich, ab dem zweiten Monat zweitäglich entnommen.

Ergebnisse und Diskussion

Die N₂O-Emissionen zeigten eine große Heterogenität. Es konnte lediglich ein Trend von höheren N₂O-Emissionen mit N-Düngung festgestellt werden (Zweifaktorielle ANOVA $p=0,051$; Abb. 1). Die DMPP-Zugabe hatte darauf keinen Effekt. Grund für dieses Ergebnis könnte die Düngerapplikation als Granulat und nicht als Lösung sein. Obwohl die Nitrifikation stärker inhibiert wird, wenn DMPP auf das Düngegranulat gesprüht wird (Barth et al. 2008), könnte dies auf der geringen Bodenoberfläche für eine erhöhte Heterogenität gesorgt haben.

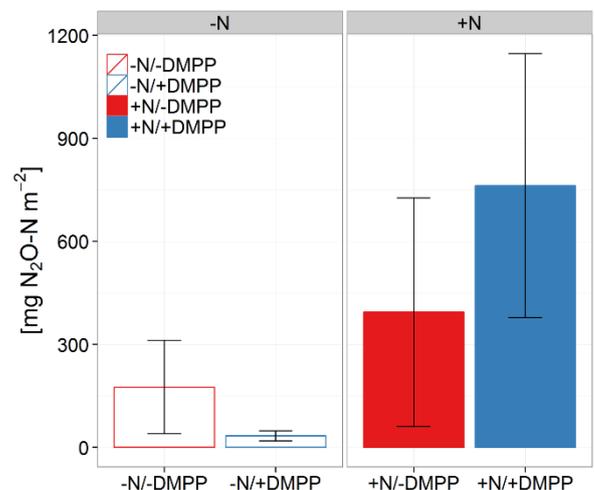


Abb. 1: Kumulative N₂O-Emission über den gesamten Versuchszeitraum (90 Tage) in Abhängigkeit von N- und DMPP-Applikation (MW±SE, n=5).

Eine Interaktion der zwei Versuchsfaktoren wurde bei den CO₂-Flüssen beobachtet (Tab. 2). Die N-Düngung erhöhte die Bodenatmung während die DMPP-Zugabe sie herabsetzte. Eine Anregung der Mineralisation war wahrscheinlich für die höhere Atmung bei N-Zugabe verantwortlich. Zhang et al. (2015) gaben die bakteriostatische Wirkung von DMPP als mögliche

Erklärung für den verminderten Abbau der organischen Materie bei der Kompostierung von Klärschlamm mit DMPP an.

Tab. 2: Medianwerte der CO₂-Flüsse in Abhängigkeit von N- und DMPP-Zugabe.

N-Zugabe	DMPP-Zugabe	CO ₂ -Fluss (mg C m ⁻² h ⁻¹)
+ N	- DMPP	8,7 a
+ N	+ DMPP	7,3 b
- N	- DMPP	6,4 c
- N	+ DMPP	5,2 d

Medianwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen (LSD < 0.05)

Die Nitrifikation verlief wahrscheinlich aufgrund der hohen Bodenfeuchte verlangsamt ab (Abb. 2). Zwei Monate nach Applikation waren immer noch 97% in der +DMPP und 51% in der -DMPP des applizierten NH₄⁺-N in den Bodensäulen nachweisbar. Dies war vermutlich bedingt durch die schluffige, feinporige Bodenstruktur.

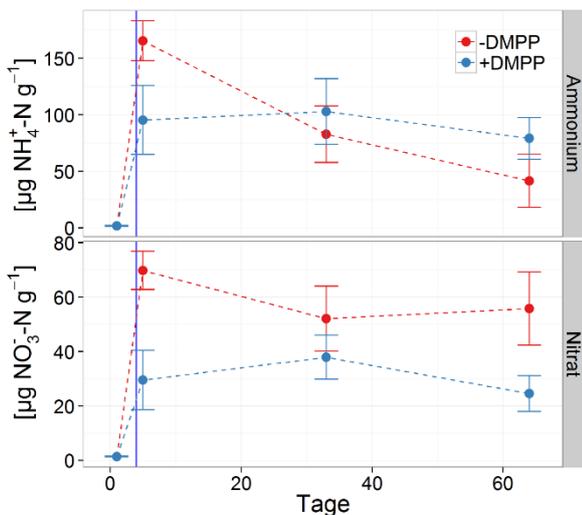


Abb. 2: Verlauf der mittleren Ammonium- und Nitratgehalte der gedüngten Varianten in Abhängigkeit der N-Zugabe (MW±SE, n=5). Durchgehende blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Applikation dar.

Die potentielle Nitrifikation war am höchsten in der N-gedüngten Variante ohne DMPP. Interessanterweise blieb die Nitrifikation in der Variante mit DMPP und N auf demselben Niveau wie in der ungedüngten Behandlungen (Abb. 3).

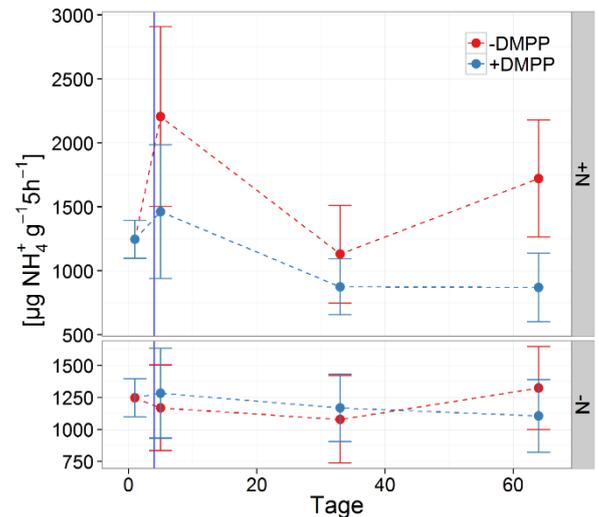


Abb. 3: Verlauf der mittleren potentielle Nitrifikation in Abhängigkeit von N- und DMPP-Zugabe (MW±SE, n=5). Durchgehende blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Applikation dar.

Analog zu den Ergebnissen der potentiellen Nitrifikation war die Anzahl der bakteriellen *amoA*-Gene in der +N-DMPP Variante am höchsten. Die +N+DMPP Behandlung zeigte hier mit ca. 10⁷ Genkopien ähnliche Werte wie die ungedüngten Behandlungen (Abb. 4). Wahrscheinlich konnten Nitrifikanten ohne Substrat nicht anwachsen und so das bei der Analyse der potentiellen Nitrifikation vorgelegte NH₄⁺ nicht verwerten. Wie in Feldversuchen beobachtet (Kleineidam et al. 2011), stoppte DMPP auch in unserem Versuch das Wachstum der bakteriellen Nitrifizierer.

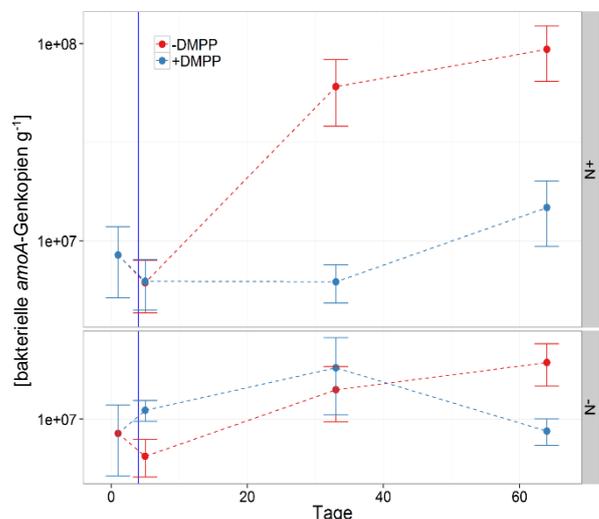


Abb. 4: Verlauf der mittleren Genkopienanzahl der bakterielle *amoA*-Gene in Abhängigkeit von N- und DMPP-Zugabe (MW±SE, n=3). Durchgehende blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Applikation dar.

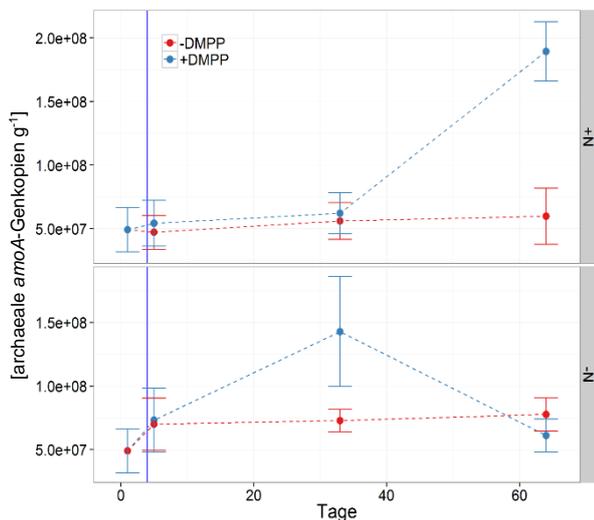


Abb. 5: Verlauf der mittleren Genkopienanzahl der archaealen *amoA*-Gene in Abhängigkeit von N- und DMPP-Zugabe ($MW \pm SE$, $n=3$). Durchgehende blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Applikation dar.

Die widerstandsfähigeren Archaeen haben vermutlich von der Inhibierung der Nitrifikationsbakterien profitiert, was sich aufgrund der höheren Kopienanzahl der archaealen *amoA*-Gene bei der +N+DMPP Behandlung 60 Tage nach Applikation vermuten lässt (Abb. 5).

Die Denitrifikation war von der N- und DMPP-Zugabe unbeeinflusst. Die Enzymaktivität und Genkopienanzahl der Nitrit- und N_2O -Reduktasegene zeigten eine hohe zeitliche Variabilität und kein klares Bild über die Wirkung beider Faktoren.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Applikation des NI (DMPP) verlangsamte in diesem Inkubationsversuch die Nitrifikation auch zwei Monate nach Applikation. Es konnte kein Effekt auf die untersuchten Denitrifikationsgene und die Enzymaktivität der Denitrifizierer festgestellt werden. Die Faktoren N- und DMPP-Applikation hatten keine Auswirkung auf die N_2O -Emission, da sie, vermutlich applikationsbedingt, eine sehr hohe Variabilität aufwies. Eine Interaktion der beiden Faktoren wurde jedoch bei der Bodenatmung nachgewiesen. Dabei setzte die DMPP-Zugabe die CO_2 -Freisetzung herab.

Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung von N-Düngung und DMPP-Zugabe auf weitere Steuergrößen von N-Transformationsprozessen in Böden scheinen interessant. Es wäre sinnvoll, diese Untersuchungen auf ribosomaler Ebene, sowie, zur Prozessidentifikation, mit Hilfe von Isotopenanwendungen durchzuführen. Daneben sollten weitere Böden mit unterschiedlichen physikochemischen und mikrobiellen Eigenschaften (Textur, Humusgehalte, mikrobielle Biomasse, etc.) untersucht werden, um die strukturelle und funktionelle Heterogenität in Böden näher zu beleuchten.

Literatur

- Barth, G., von Tucher, S., Schmidhalter, U., 2008. Effectiveness of 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate as Nitrification Inhibitor in Soil as Influenced by Inhibitor Concentration, Application Form, and Soil Matrix Potential. *Pedosphere* 18, 378–385.
- Hantschel, R.E., Flessa, H., Beese, F., 1994. An Automated Microcosm System for Studying Soil Ecological Processes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 401
- Kleineidam, K., Košmrlj, K., Kublik, S., Palmer, I., Pfab, H., Ruser, R., Fiedler, S., Schloter, M., 2011. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 84, 182–6.
- Müller, C., Stevens, R.J., Laughlin, R.J., Azam, F., Ottow, J.C.G., 2002. The nitrification inhibitor DMPP had no effect on denitrifying enzyme activity. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1825–1827.
- Pfab, H., Palmer, I., Buegger, F., Fiedler, S., Müller, T., Ruser, R., 2012. Influence of a nitrification inhibitor and of placed N-fertilization on N_2O fluxes from a vegetable cropped loamy soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 150, 91–101.
- Ruser, R., Schulz, R., 2015. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N_2O) release from agricultural soils—a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 171–188.
- Tindaon, F., Benckiser, G., Ottow, J.C.G., 2012. Evaluation of ecological doses of the nitrification inhibitors 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and 4-chloromethylpyrazole (CIMP) in comparison to dicyandiamide (DCD) in their effects on dehydrogenase and dimethyl sulfoxide reductase activity in soil. *Biol. Fertil. Soils* 48, 643–650.
- Weiske, A., Benckiser, G., Herbert, T., Ottow, J.C.G., 2001. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on N_2O emissions, CO_2 fluxes and CH_4 oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biol. Fertil. Soils* 34, 109–117.
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler von Locquenghien, K., Pasda, G., Rädle, M., Wissemeyer, A., 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol. Fertil. Soils* 34, 79–84.
- Zhang, J., Sui, Q., Li, K., Chen, M., Tong, J., Qi, L., Wei, Y., 2015. Influence of natural zeolite and nitrification inhibitor on organics degradation and nitrogen transformation during sludge composting. *Environ. Sci. Pollut. Res.*