



Gregor Mendel-Straße 33
A – 1180 Wien

Vorstand:
o.Univ.Prof.Dipl.Ing.Dr.DDDr.h.c. Winfried E.H. Blum



Entwicklung und Einsatz eines Multi-Substrat Enzymassays (MSEA) zur Bestimmung von bodenenzymatischen Umsetzungsraten unter in-Situ Verhältnissen

Abschlußbericht

Forschungsprojekt Nr. 1214

GZ 24.002/8-IIA1a/00

August 2000 - September 2002

Univ. Ass. Dr. Mag. Michael Stemmer

Institut für Bodenforschung

Universität für Bodenkultur

Gregor-Mendel-Straße 33

1180 Wien

Inhalt

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Zusammenfassung | 4 |
| Summary | 5 |
| 1 Einleitung | 6 |
| 1.1 Allgemeines | 6 |
| 1.2 Zielsetzung | 8 |
| 2 Material und Methoden | 9 |
| 2.1 Versuchsböden | 9 |
| 2.2 Multi-Substrat Enzymassay (MSEA) | 11 |
| 2.2.1 <i>Substrate</i> | 11 |
| 2.2.2 <i>Pufferlösung</i> | 11 |
| 2.2.3 <i>Mischsubstratlösung</i> | 12 |
| 2.2.4 <i>Substratkonzentration</i> | 12 |
| 2.2.5 <i>Substratwechselwirkungen</i> | 15 |
| 2.2.6 <i>Inkubationsdauer</i> | 15 |
| 2.2.7 <i>Substratextraktion</i> | 15 |
| 2.2.8 <i>Flüssigchromatographische Auftrennung und Detektion der Substrate</i> | 15 |
| 2.3 Bestimmung der Bodenzymaktivität nach Standardverfahren | 18 |
| 2.3.1 <i>β-Glucosidase</i> | 18 |
| 2.3.2 <i>N-Acetyl-β-glucosaminidase</i> | 18 |
| 2.3.3 <i>β-Xylosidase</i> | 19 |
| 2.3.4 <i>β-Glucuronidase</i> | 20 |
| 2.3.5 <i>Phosphatesterase (bei neutralem pH-Wert)</i> | 20 |
| 2.3.6 <i>Sulfatesterase</i> | 21 |
| 2.3.7 <i>Leucin-Aminopeptidase</i> | 21 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4 | Bestimmung ergänzender bodenmikrobiologischer Parameter | 22 |
| 2.4.1 | <i>Substratinduzierte Respiration (SIR)</i> | 22 |
| 2.4.2 | <i>Ergosterol</i> | 23 |
| 2.5 | Statistik | 24 |
| | | |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion | 25 |
| | | |
| 3.1 | Entwicklung und Optimierung des Multi-Substrat Enzymassays (MSEA) | 25 |
| 3.1.1 | <i>Optimierte Substratkonzentrationen für den MSEA</i> | 25 |
| 3.1.2 | <i>Substratwechselwirkungen</i> | 31 |
| 3.1.3 | <i>Inkubationsdauer</i> | 33 |
| 3.1.4 | <i>Substratadsorption</i> | 33 |
| 3.1.5 | <i>Inkubationstemperatur</i> | 35 |
| 3.1.6 | <i>Optimierter Multi-Substrat Enzymassay (MSEA)</i> | 36 |
| | | |
| 3.2 | Anwendungsmöglichkeiten des MSEA für landwirtschaftliche Fragestellungen | 39 |
| 3.2.1 | <i>Mikrobielle Biomasse und Standardenzymaktivitäten der Versuchsböden</i> | 39 |
| 3.2.2 | <i>Vergleich MSEA – Standardmethoden</i> | 42 |
| | | |
| 3.3 | Anwendung des MSEA zur Bestimmung von in-situ Bodenenzymaktivitäten | 44 |
| | | |
| 4 | Schlußfolgerungen | 44 |
| | | |
| 5 | Publikationen | 44 |
| | | |
| 6 | Literatur | 44 |

Zusammenfassung

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung und Adaptierung eines neuartigen Multi-Substrat Enzymassays (MSEA), der die Bestimmung von mehreren Bodenzymen in einem einzigen Assay erlaubt. Anhand ausgewählter Bodenproben von unterschiedlichen Versuchstandorten wurde die optimale Substratzusammensetzung und -konzentration für landwirtschaftlich genutzte Böden ermittelt. Als künstliche Substrate wurden 4-Methylumbelliferon- und 7-Amino-4-methylcoumarin-Derivate eingesetzt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Enzymassays wurde nicht die Produktbildung sondern der Abbau der zugesetzten Substrate zur Kalkulation der Enzymaktivität herangezogen. Die zugesetzten Substrate wurden nach erfolgter Inkubation extrahiert, mittels HPLC aufgetrennt und via UV-Detektion (320 nm) quantifiziert. Auf diese Weise konnten die Bodenzymen β -Glucosidase, N-Acetyl- β -glucosaminidase, β -Xylosidase, β -Glucuronidase, Phosphatesterase und Leucin-Aminopetidase in einem Arbeitsschritt in ausreichender Genauigkeit ermittelt werden. Die Zusammensetzung des MSEA ist variabel, sodaß auch andere Enzyme bei adäquater Veränderung des Substratspektrums ermittelt werden können. Der Vergleich der Bodenzymaktivität von elf Versuchsböden ergab eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse ermittelt nach Standardverfahren bzw. mit Hilfe des MSEA, beide Ansätze führten zu ähnlicher Differenzierung der ausgewählten Versuchsböden. Unterschiedliche Enzymaktivitäten zwischen Standardmethode und MSEA ergaben sich in erster Linie durch den Einsatz unterschiedlicher Substrate, unterschiedlicher Extraktionsausbeuten sowie durch verschiedene pH-Werte und Temperaturen während der Inkubation. Zusätzlich konnten bei manchen Enzymen kompetitive Inhibitionseffekte durch stereochemisch ähnliche Substrate festgestellt werden. Die Ermittlung der in-situ Enzymaktivität (Bestimmung der Enzymaktivität bei Boden-pH und Boden-Temperatur) der elf Versuchsböden mittels MSEA erbrachte nur unwesentliche Abweichungen von pH-gepufferten Systemen. Da viele Hydrolasen ein pH-Optimum von etwa 5-6 aufweisen, liegen die Umsetzungsraten der einzelnen Enzyme, deren Aktivität außerhalb des optimalen pH-Wertes ermittelt wurde, nur unwesentlich unter denen bei pH-Optimum. Zusätzliche Temperatursteigerungsversuche führten zu dem Ergebnis, daß bei den meisten untersuchten Enzymaktivitäten pro 10 °C Temperaturerwärmung etwa eine Verdopplung der Umsetzungsrate eintritt, sodaß auch mit Inkubationen bei höheren Temperaturen (etwa 30 °C) auf die Enzymaktivität bei geringeren Temperaturen geschlossen werden kann.

Summary

This project focused on the development of a new multiple substrate enzyme assay (MSEA) to determine a series of soil enzymes within one enzyme assay. Soils from agricultural field sites differing in soil properties and management were used to optimize substrate composition and concentration of 4-methylumbelliferone and 7-amino-4-methylcoumarin derivatives as artificial substrates. In contrast to conventional enzyme assays substrate turnover was not calculated by measuring product formation but substrate depletion. After incubation the added substrates were extracted, separated by high-performance-liquid-chromatography and quantified by UV-absorption (320 nm). This new method allows the simultaneous detection of β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, β -xylosidase, β -glucuronidase, phosphatase and leucin-aminopeptidase within one assay and with sufficient accuracy. In addition, the substrate composition of the MSEA is variable and allows determination of further enzyme activities applying an adequate substrate spectrum. Regarding to conventional standard methods, no distinct differences could be detected at all, both assays, conventional and MSEA, led to similar differentiation of the soils investigated. Some differences in enzyme activities could be attributed to different substrates used, different extraction yields and differences in incubation pH and temperature. In addition, some competitive inhibition effects due to stereochemical similar substrates could be found. The determination of in-situ enzyme activities (at soil-pH) of the soils gave only slight differences in comparison to buffered systems. Since most of the hydrolases examined in these assays show pH-optima from 5 – 6, only a small decrease in enzyme activity was detectable, when incubation was not performed at the pH-optimum of the enzyme, e.g. at a pH of 7.5 (Tschernosem). Additional incubations at varying temperatures showed, that the enzyme turnover is more or less doubling with an increase of temperature of about 10 °C. Using this fact, estimation of enzyme activity at soil temperature can be done from data obtained from higher temperature incubation (which are more accurate). In conclusion, the enzyme assay developed and adopted in this project is an useful and time-saving alternative to standard enzyme assays to investigate agricultural soils.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Enzymatische Messungen zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität und deren Umsetzungs- und Abbauleistungen gehören in der bodenbiologischen Analytik seit geraumer Zeit zur Routine und werden ständig für eine Vielzahl an wissenschaftlichen Fragestellungen herangezogen. Bodenenzymaktivitätsmessungen geben Einblick in die biochemische Leistungsfähigkeit eines Bodens und erlauben den Nachweis von Veränderungen infolge natürlicher und anthropogener Einflüsse auf den Boden (Schinner und Sonnleitner, 1996). So dienen Bodenenzymaktivitäten zur indirekten Charakterisierung der mikrobiellen Biomasse (Burns, 1982, Kandeler und Böhm, 1996), der Rhizosphäreneffekte (Naseby und Lynch, 1997; Benitez *et al.*, 2000), des Mineralisierungspotential (Carter und Rennie, 1982), der Bodenproduktivität und des Abbaupotentials organischer Schadstoffe, die in den Boden gelangen. Die Analysenverfahren werden im großen Umfang besonders für vergleichende Studien (Veränderungen der mikrobiellen Aktivität im Zuge von veränderter Bodenbearbeitung und Bewirtschaftung) aber auch für Untersuchungen zu Schadstoffeinträgen und Klimaveränderungen verwendet.

Bodenenzyme liegen im Boden sowohl intrazellulär (Stoffwechsellzyme) als auch extrazellulär vor (Burns, 1982). Extrazelluläre Enzyme werden durch Mikroorganismen aktiv ausgeschieden um Makromoleküle (Biopolymere) außerhalb der Zelle abzubauen. Der Anteil an extrazellulären Bodenenzymen kann unabhängig von der Bodenmikroorganismenzahl mehrere Jahre persistieren, wird aber durch Verschiebungen in der mikrobiellen Population ständig verändert. Die Mehrzahl der extrazellulären Enzyme stellen Hydrolasen dar, die sowohl im C-, N-, P- als auch S-Kreislauf für die Spaltung von Makromolekülen (z. B. Zellulose, Xylan, Proteine) bzw. für die Freisetzung und Mineralisierung von Nährstoffen wie Ammonium, Phosphat oder Sulfat verantwortlich sind (Schinner und Sonnleitner, 1996).

Von der Vielzahl an Bodenenzymen, die bislang im Boden identifiziert wurden, werden im Folgenden kurz diejenigen skizziert, die in den nachfolgenden Experimenten untersucht wurden: β -Glucosidasen (IUBMB Enzyme Nomenclature: E.C. 3.2.1.21) katalysieren die Abspaltung von endständiger Glucose aus 1-4- β -glucosidischen Verbindungen und sind damit neben den Cellulasen für den vollständigen Abbau von Zellulose, häufigstes Biopolymer und mengenmäßig wichtigster Bestandteil der Pflanzen,

verantwortlich. β -Glucosidasen sind sehr weit verbreitet, werden jedoch primär von Pilzen ausgeschieden (Hayano und Tubaki, 1985). β -Xylosidasen (E.C. 3.2.1.37) sind Teil der meist aus Enzymkomplexen bestehenden Xylanasen und somit für den vollständigen Abbau von Xylan, einem ebenfalls sehr häufigen Polysaccharid in pflanzlichen Geweben notwendig. N-Acetyl- β -glucosaminidasen (E.C. 3.2.1.52) spielen im Abbau von Chitin (Pilzen) und bakteriellen Zellwandbestandteilen (Murein) eine Schlüsselrollen. β -Glucuronidasen (E.C. 3.2.1.31) sind in bodenbiologischen Fragestellungen bislang wenig untersucht worden (Merino-Trigo *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 2001), Glucuronsäure-hältige Biopolymere sind Xylane und bakterielle Ausscheidungen (Heteropolysaccharide; Schlegel, 1992). Leucin-Aminopeptidasen (E.C. 3.4.11.x) spalten als Exopeptidase (Protease) endständige Aminosäuren von einer Peptidkette ab und sind somit für den vollständigen Abbau von Proteinen notwendig. Für die Freisetzung der Nährstoffe Phosphat und Sulfat aus organischen Verbindungen sind die Phosphatesterasen (alkalisches pH-Optimum: EC 3.1.3.1, saures: E.C. 3.1.3.2) und die Sulfatesterase (E.C. 3.1.6.1) verantwortlich. Die Phosphatesterasen im Boden setzen sich aus Enzymen mit saurem (pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs) als auch alkalischen (bakteriell) pH-Optimum zusammen.

Fluoreszierende bzw. spezifisch UV-adsorbierende Substrate zur Bestimmung von enzymatischen Umsetzungen sind in der allgemeinen Mikrobiologie Standard und erfreuen sich aufgrund ihrer Empfindlichkeit zunehmend großer Beliebtheit (Ueno *et al.*, 1991; Freeman und Nevison, 1998; Marx *et al.*, 2001; Vepsäläinen *et al.*, 2001). Umfangreiche Methodenbeschreibungen liegen besonders für Systeme mit geringer biologischer Aktivität und geringen Umsetzungsraten vor (limnologische, marine Ökosysteme, Sedimente, etc.). Für terrestrischen Systeme werden ständig neue Enzym-Assays beschrieben, besonders innovative Techniken (HPLC, Plate-Reader, etc.) wurden von Freeman (1997) in Torfböden und von Marx *et al.* (2001) und Vepsäläinen *et al.* (2001) mit Hilfe der fluoreszierenden Substanz 4-Methylumbelliferon (MU) beschrieben. MU kann bereits in einer Vielzahl von MU-Derivaten als künstliche Substrate für Enzymassays im Handel bezogen werden, sodaß eine große Anzahl unterschiedlichster Enzymaktivitäten (allerdings nur Hydrolasen) mit einem einzigen Meßverfahren ermittelt werden kann. Neben den konventionellen Standardverfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten stellten erstmals Freeman und Nevison (1999) einen Multi-Substrat Enzymassays für Torfböden vor. Dieser Ansatz ermöglicht die zeitgleiche (simultane) Messung mehrerer Bodenenzymen in einem Ansatz, ist jedoch für Torfböden und deren besonderen Charakteristika ausgelegt und daher nicht unmittelbar auf terrestrische Böden übertragbar. Dieser Ansatz diene allerdings als Basis für die Entwicklung und

Adaptierung des in diesem Projekt vorgestellten Multi-Substrat Enzymassays (MSEA) für landwirtschaftliche Böden.

Allen enzymatischen Bestimmungsmethoden liegt das Prinzip der optimierten Meßbedingungen zu Grunde, daß bedeutet de facto die Ermittlung der „potentiellen Enzymaktivität“ bei optimalem, enzyspezifischen pH-Wert und Temperatur. Praktisch bedeutet das, daß die Messung oftmals weit außerhalb der tatsächlichen Bodenbedingungen stattfindet. Allerdings ermöglicht dieser Meßansatz eine Standardisierung der Meßmethodik zu Vergleichszwecken. Über die tatsächlichen Umsetzungsraten („aktuelle“ oder auch „in-situ Enzymaktivität“) im Boden bei Feldbedingungen (Boden-pH und -Temperatur) liegen bisher wenig Analysen vor.

1.2 Zielsetzung

Schwerpunkt dieses Projektes war, einen neuartigen Multi-Substrat Enzymassay (MSEA) zu entwickeln, der es ermöglicht, die Umsetzungsraten mehrerer relevanter Bodenenzyme aus dem C-, N-, P- und S-Kreislauf ohne größeren Aufwand und mit geringem Zeitaufwand in einem einzigen Assay zu bestimmen. Zu diesem Zweck sollte der erstmals von Freeman und Nevison (1999) an Torfböden vorgestellte Ansatz anhand unterschiedlicher landwirtschaftlicher Versuchsböden derart adaptiert werden, daß ein Einsatz eines MSEA für verschiedene Fragestellungen in der Landwirtschaft (Auswirkungen der Bodenbearbeitung, Bodenbewirtschaftung, in-Situ Enzymaktivität, etc.) möglich ist. In weiterer Folge sollen die Vor- und Nachteile als auch die Probleme beim Einsatz eines MSEA gegenüber der Verwendung von enzymanalytischen Standardmethoden aufgezeigt und diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsböden

Sämtliche Versuchsböden wurden im Frühjahr 2000 aus 0 – 10 cm Bodentiefe gewonnen und sofort tiefgefroren. Zur Analyse wurden die Böden aufgetaut, auf 2 mm gesiebt und bis zur weiteren Analysen (längstens jedoch 4 Wochen) bei 4° C aufbewahrt. Bei längeren Abständen Zwischen den Analysen wurden die Proben tiefgefroren gelagert. Die Bodencharakteristika der verwendeten Versuchsböden sind in Tab. 1 angeführt.

Für die Entwicklung und Adaptierung des Multi-Substrat Enzymassays (MSEA) wurden folgende Versuchsböden ausgewählt (siehe auch Tab. 1):

- Fuchsenbigl-Pflug
- Fuchsenbigl-Frëssaat
- Großenzersdorf-Null (ohne Düngung)
- Spillern-Grünbrache-7J
- Hallein-Grünland

Tabelle 1 - Herkunft und Charakterisierung der Versuchböden.

| Herkunft | Bodenbearbeitung/ Bewirtschaftung | Feldfrucht | Bewirtschaftungs- beginn | Bodentyp | pH | C _{org} [mg g ⁻¹] |
|------------------------|--------------------------------------|------------------|-----------------------------|-------------|-----|-------------------------------------------|
| Fuchsenbigl (NÖ) | Pflug | Fruchtfolge | 1988 | Tschernosem | 7.7 | 16 |
| | Grubber | Fruchtfolge | 1988 | Tschernosem | 7.7 | 18 |
| | Fräsaat | Fruchtfolge | 1988 | Tschernosem | 7.7 | 19 |
| Großenzersdorf (NÖ) | ohne Düngung (Null) | Dauerroggen | 1925 | Tschernosem | 7.6 | 18 |
| | Mineralische Düngung | Dauerroggen | 1925 | Tschernosem | 7.6 | 14 |
| | Stallmistdüngung | Dauerroggen | 1925 | Tschernosem | 7.6 | 23 |
| Spillern (NÖ) | Grubber/Organisch | Fruchtfolge | 1998 | Tschernosem | 7.3 | 16 |
| | Grünbrache | Ansaat (Luzerne) | 1998 | Tschernosem | 7.3 | 15 |
| | Grubber/Organisch | Fruchtfolge | 1994 | Braunerde | 5.9 | 12 |
| | Grünbrache | Ansaat (Wiese) | 1994 | Braunerde | 5.8 | 14 |
| Hallein (SzbG) | Grünland | - | - | Braunerde | 6.3 | 37 |

2.2 Multi-Substrat Enzymassay (MSEA)

2.2.1 Substrate

Die chemische Struktur von 4-Methylumbelliferon (MU) und 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) und deren Derivate kann Abb. 1 und 2 entnommen werden. Im Folgenden werden die Substrate und Produkte mit der in runder Klammer angegebener Form abgekürzt! Sämtliche Chemikalien wurden von Fluka bezogen.

- 4-Methylumbelliferon (MU)
- MU – Derivate (Substrate):
 - 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid (MU-Glucose)
 - 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid Dihydrat (MU-N-Acetylglucosamin)
 - 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Trihydrat (MU-Glucuronsäure)
 - 4-Methylumbelliferyl- β -D-Xylopyranosid (MU-Xylose)
 - 4-Methylumbelliferyl-Phosphat Dinatriumsalz (MU-Phosphat)
 - 4-Methylumbelliferyl-Sulfat Kaliumsalz (MU-Sulfat)
- 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)
- AMC – Derivate (Substrate):
 - L-Leucin-4-Methylcoumarinylamid Hydrochlorid (AMC-Leucin)

2.2.2 Pufferlösung

- Universalpuffer-Stammlösung
 - 12.1 g Trishydroxymethylaminomethan, 11.6 g Maleinsäure, 14.0 g Citronensäure-Monohydrat, 6.3 g Borsäure und 500 ml 1 M Natronlauge in 1000 ml H₂O lösen.
- Universalpuffer-Gebrauchslösung
 - Universalpuffer-Stammlösung 1:5 verdünnen und pH-Wert im Bereich von 4 – 9 mit HCl einstellen.

2.2.3 *Mischsubstratlösung*

Zur Herstellung der Mischsubstratlösung mußten die einzelnen MU- bzw. AMC-Substrate in Lösung gebracht werden. Aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit einiger hydrophober MU-Substrate (z. B. MU-Glucose oder MU-Xylose) müssen diese Substanzen in geringen Mengen von organische Lösungsmitteln vorgelöst werden. Hier bietet sich in Übereinstimmung mit Freeman und Nevison (1999) Methoxyethanol an, das in der verwendeten Endkonzentration im MSEA (etwa 3 % v/v) die enzymatische Umsetzung nicht beeinflusst.

2.2.4 *Substratkonzentration*

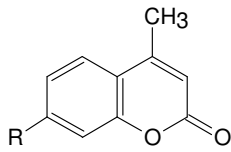
Zur Bestimmung der optimalen Substratkonzentration für den MSEA wurden die in Tab. 2 angeführten Konzentrationen bei pH 6.5 (200 mg Boden, 20 °C, 3 h) inkubiert.

Tabelle 2 - Substratkonzentrationsbereiche zur Bestimmung der optimalen Substratkonzentration für den MSEA.

| Substrat | Substratkonzentration min – max [μ M] |
|-----------------------|-----------------------------------------------|
| MU-Phosphat | 30 – 30000 |
| MU-Sulfat | 1 – 1000 |
| MU-Glucuronsäure | -* |
| MU-Glucose | 5 – 5000 |
| MU-N-Acetylglucosamin | 5 – 5000 |
| MU-Xylose | 2 – 2000 |
| AMC-Leucin | 5 – 5000 |

*MU-Glucuronsäure wurde erst später dem MSEA hinzugefügt.

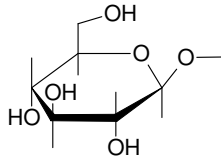
4-Methylumbelliferon-Grundstruktur



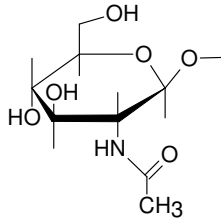
R = OH

4-Methylumbelliferon (MU)

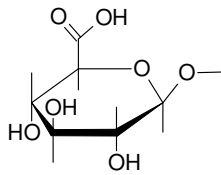
Substrate (R =)



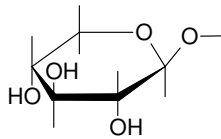
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid



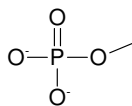
4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid



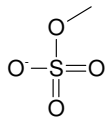
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid



4-Methylumbelliferyl- β -D-Xylopyranosid



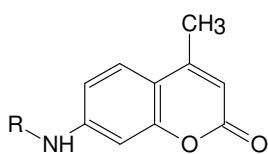
4-Methylumbelliferyl-Phosphat



4-Methylumbelliferyl-Sulfat

Abbildung 1 – Chemische Struktur von 4-Methylumbelliferon (MU) und der verwendeten MU-Derivate als Substrate für den MSEA.

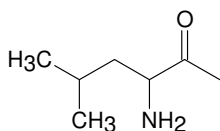
7-Amino-4-Methylcoumarin-Grundstruktur



R = H

7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)

Substrate (R =)



L-Leucin-4-Methylcoumarinylamid

Abbildung 2 – Chemische Struktur von 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) und der verwendeten AMC-Derivate als Substrate für den MSEA.

2.2.5 Substratwechselwirkungen

Zur Bestimmung möglicher Substratwechselwirkungen (Inhibition, etc.) wurden die MSEA-Substrate sowohl in Mischsubstratlösung als auch einzeln bei optimierter Substratkonzentration und pH 6.5 bebrütet.

2.2.6 Inkubationsdauer

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer wurden Bebrütungen mit 1, 2, 3 und 4 Stunden bei optimierter Substratkonzentration und pH 6.5 durchgeführt.

2.2.7 Substratextraktion

Zur quantitativen Bestimmung der nicht gespaltenen MU- und AMC-Derivate bzw. des freigesetzten MU und AMC nach erfolgter Inkubation mußten diese Stoffe zu einem möglichst hohen Ausmaß aus der Bodenmatrix wiedergewonnen werden. Adsorptionsmechanismen an der Bodenmatrix wurden bei sämtlichen zugesetzten Substraten als auch bei MU und AMC beobachtet, allerdings neigt besonders bei neutralen Boden-pH-Werten das doppelt negativ geladene MU-Phosphat sowie das positiv geladene AMC-Leucin zu hoher Adsorption an die Bodenmatrix. Um gut wasserlösliches MU-Phosphat und kaum wasserlösliche MU-Substrate zu einem möglichst hohen Prozentsatz wiederzugewinnen, wurde nach erfolgter Inkubation Methanol und anschließend eine 0.1 M KH_2PO_4 -Lösung (pH 6.1) zugesetzt. Diese Extraktionsmischung löst sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen, hat ein hohes Austauschpotential für MU-Phosphat und AMC-Leucin und wirkt denaturierend auf Enzyme (weitgehender Aktivitätsstopp; Freeman und Nevison, 1999).

2.2.8 Flüssigchromatographische Auftrennung und Detektion der Substrate

Eine vollständige Auftrennung der MU- und AMC-Derivate, bzw. von MU und AMC konnte nach erfolgter Inkubation in den Bodenextrakten mit einer Hig-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) unter Verwendung einer Gradientenpumpe erreicht werden. Dazu wurde nach erfolgter Probeninjektion das anfangs sehr polare Laufmittel (25 mM Phosphatpuffer, pH 6.1) kontinuierlich gegen ein organisches Laufmittel (Methanol) ersetzt. Die optimierten HPLC-Bedingungen können Tab. 3 entnommen werden. Für die Analyse

einer Injektion sind etwa 15 min zu veranschlagen. Die Detektion der MU- und AMC-Derivate bzw. des freigesetzten MU und AMC erfolgte mittels UV-Detektion bei 320 nm. Neben ihren sehr unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften (besonders ausgeprägt bei MU und AMC, aber auch manche MU-Derivate zeigen eine leichte Fluoreszenz) haben sämtliche zugesetzte Substrate eine ausgeprägte UV-Absorption bei 300 - 320 nm. Für die quantitative Analyse der Substrate im MSEA ist die Detektion mittels UV-Absorption ausreichend, sodaß nicht auf fluoreszenzspektroskopische Detektion zurückgegriffen werden mußte. Mittels UV-Detektion können Gehalte von 0.5 mg l^{-1} zufriedenstellend gemessen werden.

Table 3 - HPLC-Konditionen zur Bestimmung von MU- und AMC-Derivaten bzw. MU und AMC in MSEA-Extrakten.

| | |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC | HP 1050 |
| Detektor | Multiwave-Diodenarraydetektor |
| Detektionswellenlänge | 320 nm (± 20 nm) |
| Referenzwellenlänge | - |
| Hauptsäule | HP-Hypersil ODS, C18, 250 mm, \varnothing 5 mm |
| Vorsäule | ODS, C18, 3 mm, \varnothing 4 mm |
| Laufmittelzusammensetzung | A: 25 mM K_2HPO_4 , pH 6.1 B: Methanol $t_{0 \text{ min}}$: 90 % A, 10 % B $t_{11 \text{ min}}$: 10 % A, 90 % B $t_{12 \text{ min}}$: 90 % A, 10 % B |
| Laufzeit (gesamt, incl. Equilibrierung) | 15 min |
| Flußgeschwindigkeit | 0.8 ml min^{-1} |
| Injektionsvolumen | 30 μl |
| Säulentemperatur | 40 °C |

Abb. 3 zeigt typische HPLC-Chromatogramme einer MSEA-Standardlösung (Substratmischung) vor und nach 1- bzw. 4stündiger Inkubation. Neben einer vollständigen Trennung und einer optimalen Peakperformance ist hervorzuheben, daß kaum störende Matrikeffekte, die durch die (unausweichliche) Bodenextraktion zu erwarten sind, auftraten. Substanzen, die aus der Bodenmatrix mitextrahiert wurden (Absorptionsmaxima eher bei 200-260 nm) eluierten größtenteils bereits vor dem ersten MU-Peak (MU-Phosphat) und waren im Vergleich zur Menge an zugesetzten Substanzen bei allen untersuchten Böden vernachlässigbar.

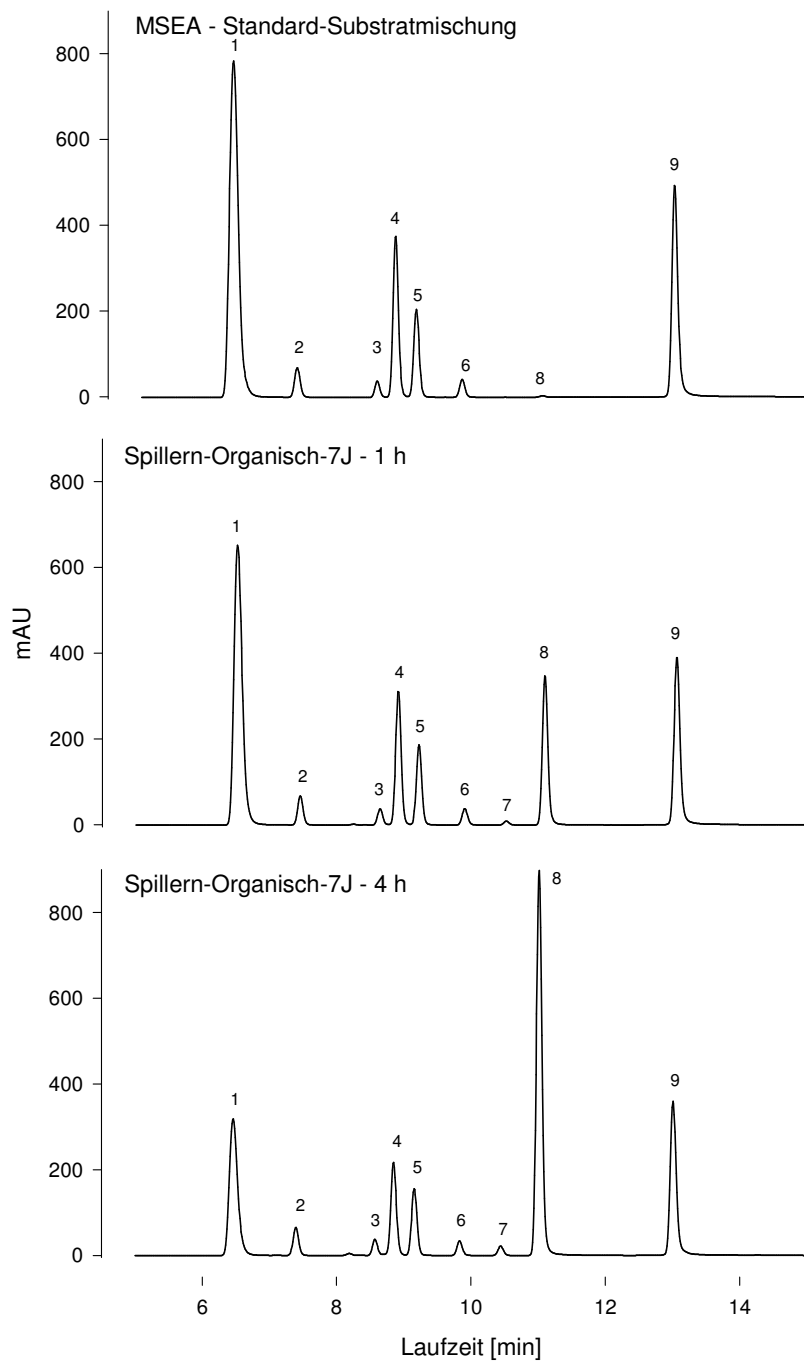


Abbildung 3 – Beispielchromatogramme einer MSEA-Standard-Substratmischung vor der Inkubation und nach 1- bzw. 4stündiger Inkubation (20 °C, 500 mg Boden; Spillern-Organisch-7J). Peaks: 1 – MU-Phosphat, 2 – MU-Glucuronsäure, 3 – MU-Sulfat, 4 – MU-Glucose, 5 – MU-N-Acetylglucosamin, 6 – MU-Xylose, 7 – AMC, 8 – MU, 9 – AMC-Leucin.

2.3 Bestimmung der Bodenzymaktivität nach Standardverfahren

2.3.1 β -Glucosidase

(Hoffmann und Dedeken, 1965, Schinner et al., 1996)

Chemikalien und Reagenzien

- Substratlösung (35 mM Salicin in H₂O)
- Acetatpuffer (2 M, pH 6.2)
- Natronlauge (1 M)
- Boratpuffer (0.2 M, pH 10.0)
- Farbreagenz – 2,6-Dibromchinon-Chlorimid (2 g l⁻¹ 60%ig Ethanol)
- Eichlösungen (0 – 7.6 – 15.2 – 22.7 – 30.3 – 37.9 µg Phenol ml⁻¹ H₂O entsprechen 0 – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 µg Saligenin ml⁻¹ H₂O)

Durchführung

5.0 g naturfeuchter Boden werden in 100-ml-Erlenmyerkolben eingewogen und mit 10 ml Acetatpuffer und 5 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben filtriert. 3 ml der Filtrate bzw. der Eichlösungen werden mit 5 ml Boratpuffer und 0.5 ml Farbreagenz versetzt und geschüttelt. Nach einer Stehzeit von 1 h werden alle Proben mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt und die Extinktion innerhalb 90 min bei 578 nm photometrisch gemessen.

2.3.2 *N*-Acetyl- β -glucosaminidase

(Brown 1985)

Chemikalien und Reagenzien

- Acetatpuffer (0.5 M, pH 5.8)
- Substratlösung (5 mM 4-Nitrophenyl-*N*-Acetyl- β -glucosaminid in Acetatpuffer), Substrat in Methoxyethanol (1 ml 100 ml⁻¹ Acetatpuffer) vorlösen.
- CaCl₂ (0.5 M)
- Natronlauge (0.5 M)
- Eichlösungen (0 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 µg 4-Nitrophenol ml⁻¹) in H₂O

Durchführung

1.0 g naturfeuchter Boden wird in 50-ml-Erlenmyerkolben eingewogen und mit 4 ml Acetatpuffer und 1 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben und 5 ml der Eichlösungen mit 1 ml CaCl₂-Lösung (Fällung der Huminstoffe) und 9 ml NaOH-Lösung versetzt, geschüttelt und filtriert. Die Intensität der entstehenden Gelbfärbung kann sofort bei 420 nm gegen den Blindwert photometrisch gemessen werden.

2.3.3 *β*-Xylosidase

(Brown, 1985)

Chemikalien und Reagenzien

- Acetatpuffer (0.5 M, pH 5.8)
- Substratlösung (5 mM 4-Nitrophenyl-*β*-Xylopyranosid in Acetatpuffer), Substrat in Methoxyethanol (1 ml 100 ml⁻¹ Acetatpuffer) vorlösen.
- CaCl₂ (0.5 M)
- NaOH (0.5 M)
- Eichlösungen (0 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 µg 4-Nitrophenol ml⁻¹) in H₂O

Durchführung

1.0 g naturfeuchter Boden wird in 50-ml-Erlenmyerkolben eingewogen und mit 4 ml Acetatpuffer und 1 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben und 5 ml der Eichlösungen mit 1 ml CaCl₂-Lösung (Fällung der Huminstoffe) und 9 ml NaOH-Lösung versetzt, geschüttelt und filtriert. Die Intensität der entstehenden Gelbfärbung kann sofort bei 420 nm gegen den Blindwert photometrisch gemessen werden.

2.3.4 *β -Glucuronidase*

(in Anlehnung an Brown 1985)

Chemikalien und Reagenzien

- Acetatpuffer (0.5 M, pH 5.8)
- Substratlösung (5 mM 4-Nitrophenyl- β -Glucuronid in Acetatpuffer), Substrat in Methoxyethanol (1 ml 100 ml⁻¹ Puffer) vorlösen.
- CaCl₂ (0.5 M)
- Natronlauge (0.5 M)
- Eichlösungen (0 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 μ g 4-Nitrophenol ml⁻¹) in H₂O

Durchführung

1.0 g naturfeuchter Boden wird in 50-ml-Erlenmyerkolben eingewogen und mit 4 ml Acetatpuffer und 1 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben und 5 ml der Eichlösungen mit 1 ml CaCl₂-Lösung (Fällung der Huminstoffe) und 9 ml NaOH-Lösung versetzt, geschüttelt und filtriert. Die Intensität der entstehenden Gelbfärbung kann sofort bei 420 nm gegen den Blindwert photometrisch gemessen werden.

2.3.5 *Phosphatesterase (bei neutralem pH-Wert)*

(Hoffmann 1968, Schinner et al., 1996)

Chemikalien und Reagenzien

- Citratpuffer (1.0 M, pH 7.0)
- Boratpuffer (0.5 M, pH 10.0)
- Substratsuspension (0.1 M Phenylphosphat-Dinatriumsalz in H₂O)
- Farbstoffreagenz – 2,6-Dibromchinon-Chlorimid (2 g l⁻¹ 60%ig Ethanol)
- Eichlösungen (0 – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 μ g Phenol ml⁻¹ H₂O)

Ausführung

5 g naturfeuchter Boden werden in 50-ml-Meßkolben mit 10 ml Citratpuffer versetzt, zu den Vollproben pipettiert man zusätzlich 5 ml Substratsuspension, zu den Leerproben 5 ml H₂O.

Unter Schütteln wird 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden alle Proben mit H₂O zur Marke aufgefüllt, gut geschüttelt und filtriert. 2 ml Filtrat bzw. Eichlösung werden in 100-ml-Meßkolben mit 5 ml Boratpuffer und 1 ml Farbstofflösung versetzt, geschüttelt, mit 25 ml H₂O versetzt und abermals gut geschüttelt. Nach 30 min Stehzeit werden die Proben mit H₂O zur Marke aufgefüllt und bei 614 nm photometrisch gemessen.

2.3.6 *Sulfatesterase*

(Tabatabai und Bremner 1970, Schinner et al., 1996)

Chemikalien und Reagenzien

- Acetatpuffer (0.5 M, pH 5.8)
- Substratlösung (20 mM Kalium-4-Nitrophenylsulfat in Acetatpuffer)
- Natronlauge (0.5 M)
- Eichlösungen (0 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 µg 4-Nitrophenol ml⁻¹) in H₂O

Durchführung

1.0 g naturfeuchter Boden wird in 50-ml-Erlenmyerkolben eingewogen und mit 4 ml Acetatpuffer und 1 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben und 5 ml der Eichlösungen mit 25 ml H₂O versetzt, geschüttelt und filtriert. 6 ml Filtrat bzw. Eichlösung werden mit 4 ml NaOH versetzt. Die Intensität der entstehenden Gelbfärbung kann sofort bei 420 nm gegen den Blindwert photometrisch gemessen werden.

2.3.7 *Leucin-Aminopeptidase*

(in Anlehnung an Brown 1985)

Chemikalien und Reagenzien

- Boratpuffer (0.5 M, pH 8)
- Substratlösung (5 mM L-Leucin-4-Nitroanilin in Acetatpuffer), Substrat in Methoxyethanol (1 ml 100 ml⁻¹ Boratpuffer) vorlösen.
- CaCl₂ (0.5 M)

- Methanol
- Eichlösungen (0 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 μg Nitroanilin ml^{-1} in Methanol)

Durchführung

1.0 g naturfeuchter Boden wird in Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 4 ml Boratpuffer und 1 ml Substratlösung versetzt, gut geschüttelt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder Probe werden 2 Vollproben und 1 Leerprobe (Substratzugabe nach Inkubation) angesetzt. Nach der Inkubation werden alle Proben und 5 ml der Eichlösungen mit 1 ml CaCl_2 -Lösung (Fällung der Huminstoffe) und 5 ml Methanol versetzt, geschüttelt und filtriert. Die Filtrate werden zusätzlich durch 0.45- μm -Membranfilter gepreßt und mittels HPLC (HPLC-Konditionen wie MSEA) analysiert.

2.4 Bestimmung ergänzender bodenmikrobiologischer Parameter

2.4.1 *Substratinduzierte Respiration (SIR)*

(Anderson und Domsch, 1978)

Material und Geräte

- 20-ml-Glasspritzen mit Glaskolben und Luer-Ansatz
- 2-ml-Glasampullen

Gaschromatograph

- GC: Hewlett Packard HP5890 Serie II
- Säule: Megabore Fused Silica Kapillarsäule GS-Q (J&W), 30 m, \varnothing 0.53 mm
- Detektor: Wärmeleitfähigkeitsdetektor, 150 °C
- Gasinjektion: automatisch gesteuertes Gasaufgabeventil, 120 °C
- Injektionsvolumen: 500 μl
- Injektor: 120 °C, split mode
- Ofentemperatur: 50 °C
- CO_2 -Eichgas: 0.2 % CO_2 in Stickstoff (v/v)

Durchführung

10 g Boden werden mit 40 mg Glucose versetzt und von Hand gut gemischt. Je 1.5 g werden in zuvor abgewogene Glasampullen eingewogen, die Glasampulle mit der Pinzette in die Spritze versenkt und bei offenem Hahn der Spritzenkolben bis zur 20-ml-Marke eingedrückt. Die Spritze wird mit geöffnetem Hahn auf den GC aufgesetzt und zur Blindwertmessung ein Probenaliquot (etwa 4 ml Gas) in die Probenschleife injiziert. Anschließend wird das Spritzenvolumen auf 15 ml eingestellt, der Hahn geschlossen und die Spritzen 4 h bei 25 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird die Spritze wiederum auf dem GC aufgesetzt, der Hahn geöffnet und ein Probenaliquot in die Probenschleife injiziert.

Berechnung

$$V_{\text{netto}} = V_{\text{brutto}} - (V_{\text{Ampulle}} + V_{\text{BTS}} + V_{\text{BW}})$$

| | |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| V_{netto} ... | Effektives Gasraumvolumen der Spritze [ml] |
| V_{brutto} ... | Gesamtgasraumvolumen der Spritze [ml, hier 15 ml] |
| V_{Ampulle} ... | Volumen der Glasampulle [ml], $\rho(\text{Quarz}) = 2.64 \text{ g ml}^{-1}$ |
| V_{BTS} ... | Volumen der Bodentrockensubstanz [ml], $\rho(\text{Boden}) \text{ ca. } 2.64 \text{ g ml}^{-1}$ |
| V_{BW} ... | Volumen des Bodenwassers [ml], $\rho(\text{Wasser}) = 1 \text{ g ml}^{-1}$ |

$$C\% = C\%_{\text{nach}} - C\%_{\text{vor}}$$

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| $C\%$... | CO ₂ -Anreicherungskonzentration [%] |
| $C\%_{\text{nach}}$... | CO ₂ -Anreicherungskonzentration nach der Inkubation [%] |
| $C\%_{\text{vor}}$... | CO ₂ -Anreicherungskonzentration vor der Inkubation [%] |

$$V = (V_{\text{netto}} \cdot C\%) \cdot 100^{-1}$$

| | |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| V ... | Angereichertes CO ₂ -Volumen während der Inkubation [ml] |
|---------|---------------------------------------------------------------------|

$$V_o = (V \cdot P_T \cdot 273) / (1013,25 \cdot (273 + T))$$

| | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| V_o ... | Angereichertes CO ₂ -Volumen unter Normalbedingungen [ml] |
| P_T ... | Luftdruck unter Versuchsbedingungen [hPa] |
| T ... | Temperatur unter Versuchsbedingungen [°C] |

$$V_o \cdot 44000 \cdot 22400^{-1} \cdot IZ^{-1} \cdot TS^{-1} = \text{mg CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ TS} \cdot \text{h}^{-1}$$

| | |
|-----------|-----------------------------------------------------|
| 44000 ... | Molgewicht von CO ₂ [mg] |
| 22400 ... | Molvolumen eines Gases unter Normalbedingungen [ml] |
| IZ ... | Inkubationszeit [h] |
| TS ... | Trockensubstanzeinwaage [g] |

2.4.2 Ergosterol

(Djajakirana *et al.*, 1996)

Chemikalien und Reagenzien

- Ethanol 96%
- Eichlösungen (0 – 1 – 2 – 4 – 6 und 8 mg l⁻¹ Ergosterol) in Methanol
- Methanol

Durchführung

1.0 g Boden wird in braune 100-ml-Glasflaschen eingewogen, mit 80 ml 96%igen Ethanol versetzt und 30 min am Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wird in 250-ml-Rundkolben filtriert. Das Filtrat wird bei 40 °C am Rotavapor im Vakuum zur Trockenen eingengt und der trockener Rückstand mit 4.0 ml 96%igen Ethanol rückgelöst. Anschließend wird durch 0.45- μ m-Nylon-Membranfilter in HPLC-vials filtriert.

HPLC-Konditionen

- Säule: RPC-18 Spherisorb ODS 2, 4 μ m, 250 x 4.6 mm
- Vorsäule: RPC-18 Lichrospher 100, 5 μ m, 4 x 4.6 mm
- Detektor: Diodenarray UV/Vis Detektor
- Wellenlänge: 283 \pm 5 nm
- Laufmittel: Wasser/Methanol = 5/95 (v% / v%)
- Temperatur: 40 °C
- Flußrate: 2 ml min⁻¹
- Injektionsvolumen: 50 μ l

2.5 Statistik

Sämtliche Daten sind auf ofen-trockenen (105 °C) Boden bezogen. Zur Differenzierung der einzelnen Versuchsböden wurde die Datensets nach Normierung einer Clusteranalyse unterworfen (Distanzmaß: Euclidische Distanzen, Fusionsregel: complete linkage). Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Enzymassays wurden mit Hilfe des t-Test auf Signifikanz ($p < 0.05$) überprüft. Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Software-Paket STATISTICA für Windows 5.1 (1997) eingesetzt. Die Kurvenfittings wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot für Windows 4.0 (1997) durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung und Optimierung des Multi-Substrat Enzymassays (MSEA)

3.1.1 Optimierte Substratkonzentrationen für den MSEA

Als zentraler und schwieriger Punkt bei der Anwendung des MSEAs zur Bestimmung von bodenenzymatischen Umsetzungsraten erwies sich die zu verwendende Substratkonzentration, da unterschiedliche Anforderungen seitens des Substratabbaus und der Detektion erfüllt werden mußten. In einem MSEA führt mit Ausnahme von AMC-Leucin der Umsatz aller MU-Derivate zur Bildung von freiem MU, sodaß zur Bestimmung des Substratumsatzes nicht das Produkt (MU), sondern das verbleibende Substrat (MU-Derivat) herangezogen werden muß (Theoretisch könnte man natürlich auch die beim Umsatz freigesetzten Hexosen, etc. zur Bestimmung des Umsatzes heranziehen, allerdings ist deren Bestimmung angesichts des Bodenhintergrundgehalts sehr problematisch). Damit ergibt sich als erste Anforderung, daß die während der Inkubation abgebaute Substratmenge meßbar sein muß. Geht man von einer durchschnittlichen Bestimmungsunsicherheit von MSEA-Substraten mittels HPLC von etwa 0.5 % aus, erscheint ein Abbau von mindestens 2-3 % notwendig, um aus der Differenz der Menge an zugesetztem Substrat und dem nach der Inkubation verbleibenden Substrat reale Abbauraten ermitteln zu können (je geringer der Abbau ist, um so fehleranfälliger wird die Analyse). Dem gegenüber steht als zweiter Punkt die allgemeine Anforderung an Enzymassays, daß das Substrat in ausreichender Menge (Substratsättigung) vorliegt und somit der maximale Substratumsatz ermittelt werden kann. Die „Kunst“ des MSEA liegt im Wesentlichen darin, einen optimalen Mittelweg zwischen ausreichender Substratsättigung und vernünftig meßbarem Substratabbau zu finden. Wie in Abb. 4 ersichtlich, weisen die Versuchsböden sehr unterschiedliche Umsatzpotentiale für die jeweiligen MSEA-Substrate auf. Die Abbauraten nehmen im Allgemeinen in der Reihenfolge MU-Phosphat > AMC-Leucin = MU-Glucose > MU-N-Acetylglucosamin > MU-Xylose > MU-Sulfat ab. Allerdings konnte für MU-Sulfat bei der in diesen Experimenten verwendeten Substratkonzentration (1 – 1000 µM) nur beim Versuchsboden Hallein-Grünland ein signifikanter Abbau gemessen werden. Besonders auffällig ist die teils sehr unterschiedliche Substrat-Umsatzleistung bei MU-Phosphat: Die enzymatisch besonders aktiven Böden Hallein-Grünland und Spillern-Grünbrache-7J (beide Braunerden mit eher saurem pH im

Gegensatz zu den neutralen Tschernosemen) hatten bereits bei einer Substratkonzentration von 1000 μM sämtliches MU-Phosphat umgesetzt, während die übrigen Versuchsböden erst etwa 5 % des zugesetzten Substrats verwertet hatten.

Die enzymatische Umsetzung unterliegt im wesentlichen der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + S},$$

wobei V für die Reaktionsgeschwindigkeit [μmol Umsätze $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$], V_{\max} für die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit [μmol Umsätze $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$], K_M für die MICHAELIS-MENTEN-Konstante (Substratkonzentration [μM] bei halber V_{\max}) und S für die Substratkonzentration [μM] steht. Liegt das Substrat in Sättigung ($S \gg K_M$) vor, dann nähert sich V dem Wert von V_{\max} an. Durch einfache Umformung läßt sich aus der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung der prozentuelle Abbau des Substrates berechnen:

$$\text{Substratabbau [\% der zugesetzten Menge]} = \frac{V_{\max} \cdot 100 \cdot 1000 \cdot EW \cdot t}{(K_M + S) \cdot Vol}$$

Mit dieser Gleichung läßt sich die Menge an abgebautem Substrat [in % der zugesetzten Menge] bei gegebener Substratkonzentration (S [μM]) berechnen, wobei EW für die Bodeneinwaage [g], t für die Inkubationsdauer [h] und Vol für das Inkubationsvolumen [ml] steht. Diese Formel wurde im Folgenden dazu verwendet, um aus den experimentell ermittelten Substratabnahmen die K_M -Werte der einzelnen Substrate im MSEA zu ermitteln. Dazu wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot die oben genannte Gleichung an die experimentell ermittelten Abbauraten der zugesetzten MSEA-Substrate bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen [S] ohne Berücksichtigung von Adsorptionsprozessen bezogen auf 200 mg Boden, 20 °C Inkubationstemperatur und 3 h Inkubationszeit gefittet (Abb. 4). Die derart ermittelten K_M -Werte können Tab. 4 entnommen werden. MU-Sulfat scheint in dieser Tabelle nicht auf, da aufgrund der zu geringen Abbauraten keine adäquate Kurvenanpassungen vorgenommen werden konnten. MU-Glucuronsäure wurde erst später dem MSEA hinzugefügt. Experimentell ermittelte K_M - und V_{\max} -Werte von enzymatischen Umsetzungsraten sind stark vom verwendeten Substrat abhängig. Amutha *et al.* (1998) geben z. B. für eine aus Bakterien isolierte N-Acetyl- β -glucosaminidase K_M -Werte von 340 μM für deren natürliches Substrat Chitobiose an, für die künstlichen Substrate 4-Nitrophenyl-N-Acetylglucosaminid und das im MSEA verwendete MU-N-Acetylglucosaminid wurden wesentlich geringere Werte von 69 bzw. 17 μM ermittelt. Ähnlich unterschiedlich waren auch die V_{\max} -Werte für diese Substrate. Im Allgemeinen

lassen sich enzymatische Umsetzungsraten, die mittels künstlicher Substrate bestimmt wurden, nur schwer auf natürliche, im Boden vorliegende Substrate übertragen (Schinner und Sonnleitner, 1996).

Für die „optimierte“ Substratkonzentration im MSEA sollten folgende Anforderungen erfüllt sein:

- i) Substratabbau von mindesten 3 % aber nicht mehr als 80 %.
- ii) Substratkonzentration mindestens 2-3mal K_M -Konzentration

Abb. 5 zeigt die aus Abb.4 übernommenen typischerweise sigmoidalen Abbauraten der MSEA-Substrate sowie die 3%ige bzw. 80%ige-Abbaugrenze und die Lage der „optimierten“ Substratkonzentrationen.

Tabelle 4 - K_M -Werte [μM] und optimierte Substratkonzentration der einzelnen MU- und AMC-Derivate, ermittelt durch Kurvenanpassung an die experimentell bestimmten Abbauraten.

| Versuchsboden | MU-Glucose | MU-N-Acetylglucosamin | MU-Xylose | MU-Phosphat | AMC-Leucin |
|----------------------------------------------|-------------|-----------------------|------------|-------------|-------------|
| Großenzersdorf-Null | 107 | 84 | 9 | 151 | 420 |
| Fuchsenbigl-Pflug | 124 | 78 | 16 | 163 | 331 |
| Fuchsenbigl-Frässaat | 233 | 121 | 12 | 168 | 483 |
| Spillern-Grünbrache-7J | 352 | 237 | 43 | 2124 | 505 |
| Hallein-Grünland | 208 | 98 | 11 | 4320 | 626 |
| optimierte MSEA-Substratkonzentration | 1000 | 500 | 100 | 5000 | 1500 |

Tabelle 5 zeigt einen Vergleich der Substratkonzentrationen, die im MSEA eingesetzt wurde mit Substratkonzentrationen, die üblicherweise in Standardenzymassays verwendet werden. Auffällig ist die sehr weite Streuung sowohl der Substratkonzentration als auch der Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer in Abhängigkeit von der eingesetzten Bodenmenge und zu erwartender Enzymaktivität. In der Regel liegen die im MSEA verwendeten Substratkonzentrationen eher im unteren Bereich der angegebenen Bereichsspannen (Abnahme des Substrates muß ja meßbar sein), trotzdem kann von einer ausreichenden Substratsättigung zumindest bei den in diesem Projekt untersuchten Böden ausgegangen werden.

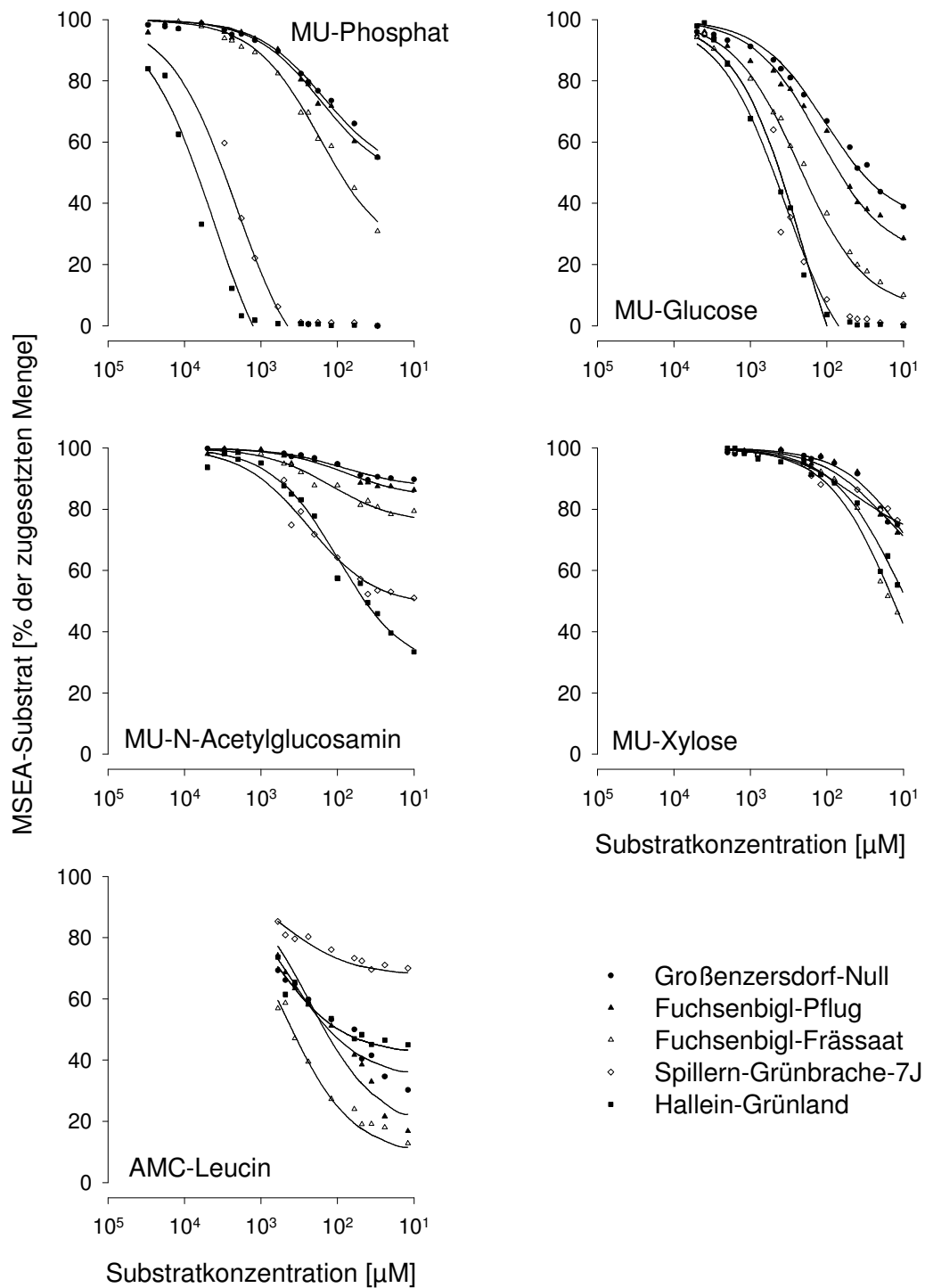


Abbildung 4 - Substratabnahme der MSEA-Substrate bei gegebener Substratkonzentration (200 mg Boden, 3 h Inkubation, 20 °C) und mittels MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gefitteter Kurvenverlauf.

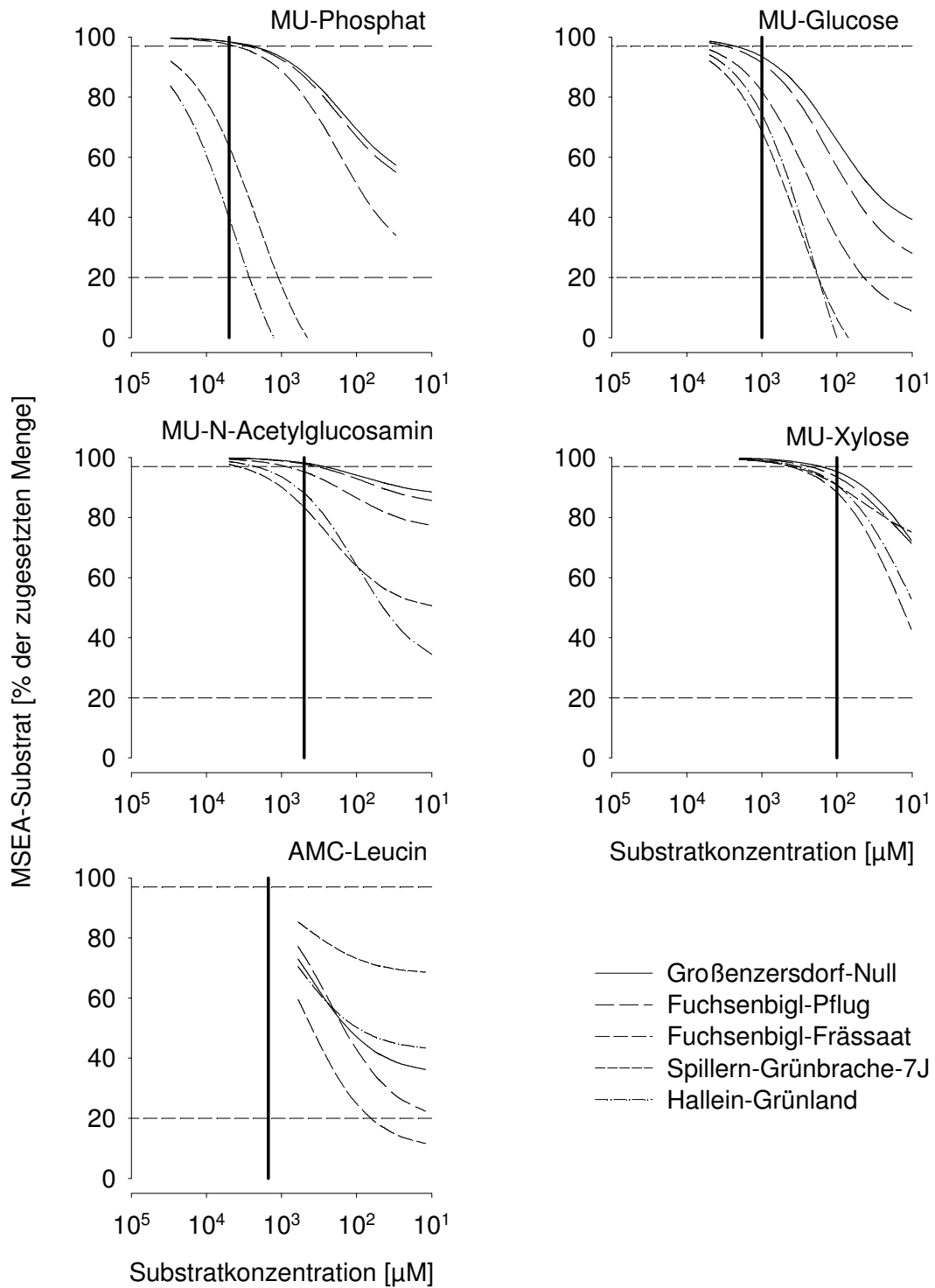


Abbildung 5 – Mittels MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gefittete Substratabnahme der MSEA-Substrate bei gegebener Substratkonzentration (200 mg Boden, 3 h Inkubation, 20 °C). Senkrechte Linie: Optimierte Substratkonzentration für den MSEA. Waagrechte Linien: 3%iger und 80%iger Substratabbau.

Tabelle 5 – Substratkonzentration, Inkubationsvolumen, Einwaage, Substrat/Boden-Verhältnis und Inkubationsbedingungen ausgewählter Standard-Enzymassays im Vergleich mit dem MSEA.

| Enzym | Autor | Substrat | Substrat- konzentration [mM] | Inkubations- volumen [ml] | Einwaage [g] | Substrat/ Boden [$\mu\text{mol g}^{-1}$] | Inkubations- bedingungen |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------|
| Phosphomonoesterase | Hoffmann (1968) | Phenyl-Phosphat | 33 | 15 | 5 | 100 | 3 h / 37 °C |
| | Tabatabai (1977) | 4-Nitrophenyl-Phosphat | 23 | 5 | 1 | 115 | 1 h / 37 °C |
| | Kourtev <i>et al.</i> (2002) | 4-Nitrophenyl-Phosphat | 10 | 2 | 2 ¹ | | 1 h / 20 °C |
| | Brown (1985) | MU-Phosphat | 1 | 5 | 1 | 5 | 3 h / 37 °C |
| | Freeman (1995) | MU-Phosphat | 0.6 | 16 | 10 ² | | 6 h / 11 °C |
| | MSEA | MU-Phosphat | 5 | 2 | 0.5 | 20 | 3 h / 20 °C |
| β -Glucosidase | Hoffmann und Dedeken (1966) | Salicin | 12 | 15 | 5 | 35 | 3 h / 37 °C |
| | Sarathchandra und Perrot (1984) | 4-Nitrophenyl-Glucosid | 10 | 5 | 1 | 50 | 0.5 h / 30 °C |
| | Martens <i>et al.</i> (1992) | 4-Nitrophenyl-Glucosid | 5 | 5 | 1 | 25 | 1 h / 37 °C |
| | Kourtev <i>et al.</i> (2002) | 4-Nitrophenyl-Glucosid | 10 | 2 | 2 ¹ | | 2 h / 20 °C |
| | Brown (1985) | MU-Glucosid | 1 | 5 | 1 | 5 | 3 h / 37 °C |
| | Freeman (1995) | MU-Glucosid | 0.15 | 16 | 10 ² | | 1 h / 11 °C |
| | Freeman (1999) | MU-Glucosid | 0.1 | 100 | 10 ² | | 6 h / 11 °C |
| | Vepsäläinen <i>et al.</i> (2001) | MU-Glucosid | 0.25 | 0.2 | 0.001 | 50 | 3 h / 30 °C |
| | MSEA | MU-Glucosid | 1 | 2 | 0.5 | 4 | 3 h / 20 °C |
| N-Acetyl- β -glucosamidase | Brown (1985) | 4-Nitrophenyl-N-Acetylglucosaminid | 1 | 5 | 1 | 5 | 3 h / 37 °C |
| | Martens <i>et al.</i> (1992) | 4-Nitrophenyl-N-Acetylglucosaminid | 5 | 5 | 1 | 25 | 1 h / 37 °C |
| | Kourtev <i>et al.</i> (2002) | 4-Nitrophenyl-N-Acetylglucosaminid | 10 | 2 | 2 ¹ | | 3 h / 20 °C |
| | Miller <i>et al.</i> (1998) | MU-N-Acetylglucosaminid | 0.020 | 10 | 0.1 | 2 | 0.5 h / 25 °C |
| | Ueno <i>et al.</i> (1991) | MU-N-Acetylglucosaminid | 0.033 | 3 | 0.5 | 0.2 | 0.4 h / 37 °C |
| | Vepsäläinen <i>et al.</i> (2001) | MU-N-Acetylglucosaminid | 0.25 | 0.2 | 0.001 | 50 | 3 h / 30 °C |
| | MSEA | MU-N-Acetylglucosaminid | 0.5 | 2 | 0.5 | 2 | 3 h / 20 °C |
| β -Xylosidase | Brown (1985) | 4-Nitrophenyl-Xylosid | 1 | 5 | 1 | 5 | 3 h / 37 °C |
| | Speir <i>et al.</i> (1984) | 4-Nitrophenyl-Xylosid | 10 | 2.5 | 0.5 | 50 | 4 h / 30 °C |
| | Freeman (1999) | MU-Xylosid | 0.1 | 100 | 10 ² | | 6 h / 11 °C |
| | Vepsäläinen <i>et al.</i> (2001) | MU-Xylosid | 0.5 | 0.2 | 0.001 | 50 | 3 h / 30 °C |
| | MSEA | MU-Xylosid | 0.1 | 2 | 0.5 | 0.4 | 3 h / 20 °C |
| Glycin-Aminopeptidase | Kourtev <i>et al.</i> (2002) | 4-Anilid-Glycin | 10 | 2 | 2 ¹ | | 6 h / 20 °C |
| Leucin-Aminopeptidase | Vepsäläinen <i>et al.</i> (2001) | AMC-Leucin | 0.25 | 0.2 | 0.001 | 50 | 3 h / 30 °C |
| MSEA | AMC-Leucin | 1.5 | 2 | 0.5 | 6 | 3 h / 20 °C | |
| β -Glucuronidase | Mering-Trigo <i>et al.</i> (1999) | 4-Nitrophenyl-Glucuronid | 1 | 0.5 | 0.025 ³ | | 0.5 h / 37 °C |
| | MSEA | MU-Glucuronid | 0.5 | 2 | 0.5 | 2 | 3 h / 20 °C |

¹ Streuschlämmung [ml], ² Torfschlämmung [ml], ³ Enzymextrakt [ml]

3.1.2 Substratwechselwirkungen

Abb. 6 zeigt den Substratabbau von 4 Versuchsböden nach 3stündiger Inkubation bei 20 °C und pH 6.5 im Vergleich als MSEA und als Einzel-Substrat Assay. Die Bestimmung des Substratabbaues erfolgte in beiden Fällen mittels HPLC. Sowohl MU-Phosphat, MU-N-Acetylglucosamin als auch AMC-Leucin wurden sowohl in Mischung als auch Einzeln angeboten etwa zu gleichen Mengen abgebaut (kein signifikanter Unterschied), leicht unterschiedliche Umsetzungsraten konnten bei MU-Glucose festgestellt werden (besonders am sehr aktiven Versuchsstandort Hallein-Grünland). Im Gegensatz dazu wurden bei MU-Xylose und MU-Glucuronsäure in allen Fällen signifikant geringere Umsetzungsraten ermittelt, wenn diese in Mischung mit anderen MU-Substraten vorlagen. Die Ursachen dafür liegen wahrscheinlich in der zu geringen Substratspezifität der β -Xylosidase als auch der β -Glucuronidase, sodaß es durch stereochemische Ähnlichkeiten von MU-Glucose, MU-Xylose und MU-Glucuronsäure (vergl. Abb. 1) zu temporär gegenseitiger Behinderung am Enzym-Komplex kommt, was in der Folge die enzymatische Umsetzung verzögert. Baraznenok *et al.* (1999) stellten fest, daß isolierte Xylanasen neben ihrem primären Substrat Xylan in geringen Mengen auch MU-Xylosid, MU-Cellobiosid, MU-Lactosid oder auch 4-Nitrophenyl- α -Arabinopyranosid umzusetzen vermögen. Chinchetru *et al.* (1989) konnten zeigen, daß isolierte tierische β -Glucosidase mit einer eher weiten Spezifität auch 4-Nitrophenyl-Derivate von β -Galactose, β -Fucose, β -Xylose und α -Arabinose umsetzen. Derartige unspezifische Umsetzungen verlaufen wesentlich langsamer und blockieren das Enzym für das primäre Substrat. Da im MSEA MU-Glucose (1000 μ M) in deutlich höherer Konzentration vorliegt als MU-Xylose (100 μ M) oder MU-Glucuronsäure (250 μ M), ist zu erwarten, daß sowohl die β -Xylosidase als auch die β -Glucuronidase temporär von MU-Glucose blockiert werden. Keine sterische Behinderung liegt offensichtlich bei Abbau von MU-Phosphat, MU-N-Acetylglucosamin und AMC-Leucin vor. Möglich ist auch, daß ein hoher Anteil an freigesetztem MU (besonders aus der Umsetzung von MU-Phosphat) die Umsetzungsrate aller MU-Substrat-Umsetzungen durch Verschiebung des chemischen Reaktionsgleichgewichtes etwas reduziert. Stoffwechselphysiologische Inhibierungsprozesse sind nicht hingegen zu erwarten, da ein Großteil der Enzyme extrazellulär vorliegt und nicht mehr von Mikroorganismen aktiv beeinflusst werden kann bzw. auch die Inkubationszeit dazu zu kurz ist.

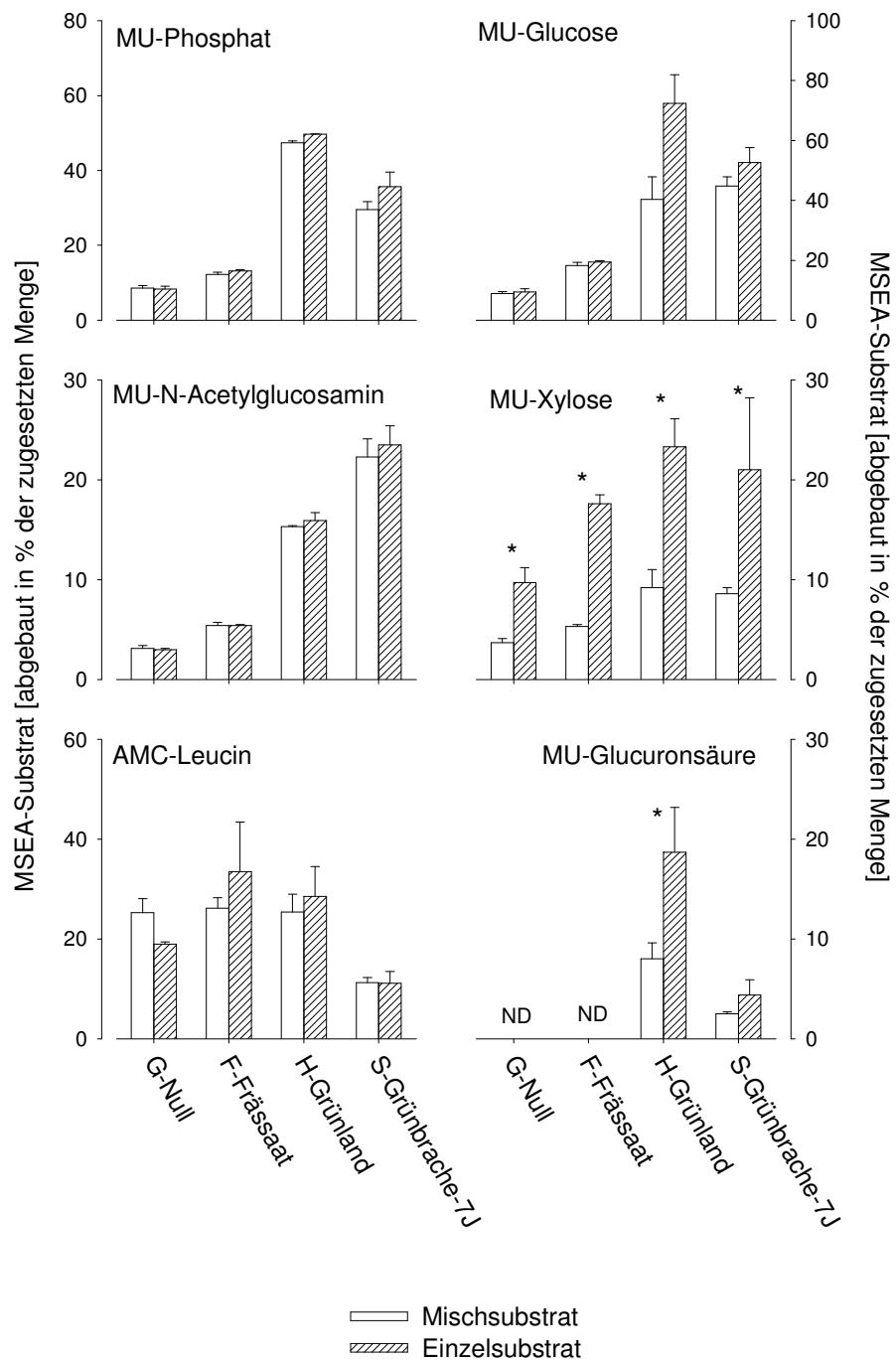


Abbildung 6 – Abbau von MSEA-Substraten als Mischsubstrat im MSEA und als Einzelsubstrat. Sternchen – signifikanter Unterschied zwischen Mischsubstrat und Einzelsubstrat ($p < 0.05$), ND – nicht bestimmt.

3.1.3 Inkubationsdauer

Mit Ausnahme von MU-Sulfat, bei dem auch über 4 Stunden Inkubation nur in sehr aktiven Böden (Hallein-Grünland) ein signifikanter Abbau feststellbar war, zeigten alle Substrate einen linearen Zusammenhang zwischen der Menge an abgebautem Substrat und der Inkubationsdauer von 1 bis 4 h (Abb. 7). Damit kann man davon ausgehen, daß die MSEA-Substrate während der ganzen Inkubationsdauer von 1 – 4 h in ausreichender Sättigung vorlagen.

3.1.4 Substratadsorption

Neben den zeitlichen Verläufen über die Inkubationsdauer sind aus Abb. 7 auch die Adsorptionsverhalten der MU- und AMC-Substrate ersichtlich. Durch Rückführung der linearen Substratabbaukurve zum Zeitpunkt t_0 läßt sich die Adsorption unter der Annahme, daß sich diese während der Inkubation nicht verändert, bestimmen. Hohe Adsorption zeigten vor allem die C_{org} -reichen und mikrobiell sehr aktiven Versuchsstandorte Hallein-Grünland und Spillern-Grünbrache-7J für MU-Phosphat (bis zu 30 % der zugesetzten Substratmenge adsorbiert) und AMC-Leucin (bis zu 55 %). Die C_{org} -ärmeren Tschernoseme adsorbierten entsprechend weniger (max. 15 %) der zugesetzten Substratmenge. In ähnlichem Ausmaß wurde auch aus den MSEA-Substraten freigesetztes MU und AMC an der Bodenmatrix sorbiert. Innerhalb der Substrate nahm die Neigung zur Adsorption mit MU-Sulfat < MU-Xylose = MU-N-Acetylglucosamin = MU-Glucuronsäure < MU-Glucose < MU-Phosphat < AMC-Leucin zu. Aufgrund dieser sehr unterschiedlichen Adsorptionserscheinungen konnte die enzymatische Umsatzrate nicht über eine 1-Punkt-Messung bestimmt werden, sondern mußte über zeitlich abgestufte Messungen der Abbauraten, wie in Abb. 7 dargestellt, ermittelt werden. Auf diese Weise konnte das sehr variable Adsorptionsverhalten der MESA-Substrate ohne großen Aufwand korrigiert werden.

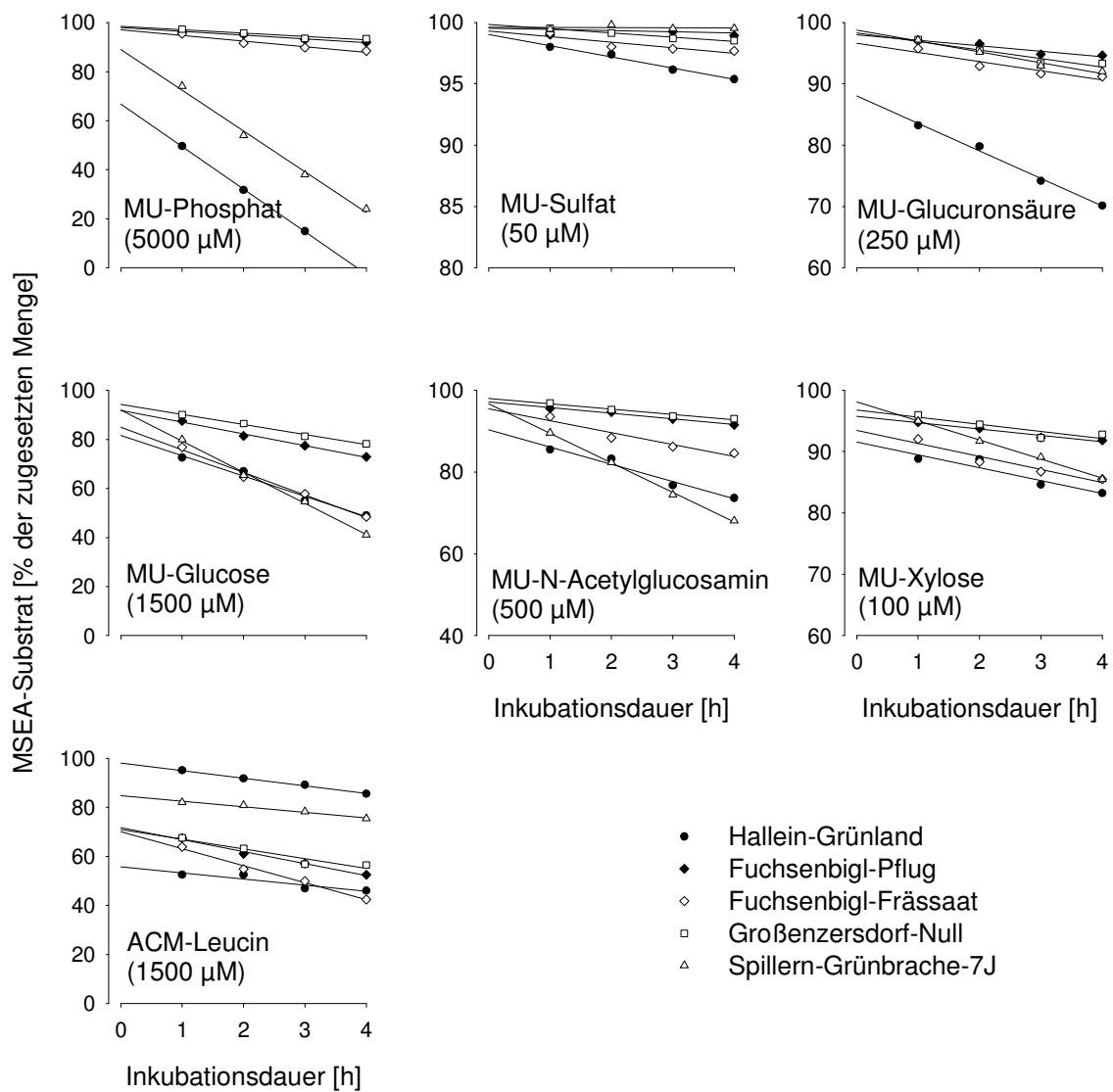


Abbildung 7 - Abbau der MSEA-Substrate nach 1, 2, 3 und 4 h Inkubation (500 mg Boden, 37 °C).

3.1.5 Inkubationstemperatur

Der Einfluß der Temperatursteigerung auf die Umsatzrate der untersuchten Bodenzyme entsprach weitgehend den für biologische Systeme häufig bestimmten Temperaturquotienten (Q_{10} -Wert) von etwa 2 (Schinner und Sonnleiter, 1996). Das bedeutet, daß bei einer Temperatursteigerung um 10 °C die Umsatzrate etwa verdoppelt wird. Diese Gesetzmäßigkeit gilt für viele enzymgesteuerte Reaktionen, allerdings nur in Temperaturbereichen von etwa 5 – 60 °C, darunter tritt Hemmung durch zu niedrige Temperatur ein, darüber denaturieren viele Enzyme. Die sehr konstanten Q_{10} -Werte für den Temperaturbereich von 20 – 40 °C (Tab. 6) weisen darauf hin, daß die MSEA-Substrate auch bei höheren Temperaturen (etwa 4fach erhöhte Umsatzrate bei 40 °C im Vergleich zu 20 °C) in ausreichender Menge (Substratsättigung) vorliegen und es in den meisten Fällen (Ausnahme: MU-Phosphat in sehr aktiven Böden) zu keinem vorzeitigen Substrataufbrauch kommt. Die etwas geringeren Q_{10} -Werte für die β -Glucuronidase und Leucin-Aminopeptidase können aus derzeitiger Sicht nicht erklärt werden, möglicherweise wirken erhöhte Adsorptionsmechanismen bei höheren Temperatur einer gesteigerten Umsatzrate entgegen.

Tabelle 6 – Experimentell ermittelte Q_{10} -Werte für die Enzymaktivitäten im MSEA.

Abkürzungen: F-P – Fuchsenbigl-Pflug, F-F – Fuchsenbigl-Fräsaaat, G-0 – Großenzersdorf-Null, S-B7 – Spillern-Grünbrache-7J, H-G – Hallein-Grünland.

| Temperaturbereich | Enzym | Versuchsböden | | | | | Mittel |
|-------------------|------------------------------------|---------------|-----|-----|------|-----|------------|
| | | F-P | F-F | G-0 | S-B7 | H-G | |
| 20 – 30 °C | β -Glucosidase | 2.1 | 1.9 | 2.0 | 1.6 | 1.9 | 1.9 |
| | N-Acetyl- β -glucosaminidase | 1.8 | 2.1 | 1.9 | 2.1 | 1.7 | 1.9 |
| | β -Xylosidase | 2.0 | 1.9 | 2.1 | 2.1 | 1.6 | 1.9 |
| | β -Glucuronidase | 1.3 | 1.6 | 1.5 | 1.6 | 1.2 | 1.4 |
| | Phosphatesterase | 2.1 | 2.5 | 1.9 | 2.5 | 2.0 | 2.2 |
| | Leucin-Aminopeptidase | 1.5 | 1.6 | 1.5 | 1.3 | 1.4 | 1.5 |
| 30 – 40 °C | β -Glucosidase | 2.2 | 2.1 | 1.8 | 1.7 | 2.1 | 2.0 |
| | N-Acetyl- β -glucosaminidase | 2.1 | 2.4 | 2.2 | 1.9 | 2.2 | 2.2 |
| | β -Xylosidase | 1.8 | 2.5 | 2.4 | 1.9 | 1.6 | 2.0 |
| | β -Glucuronidase | 1.4 | 1.4 | 1.7 | 1.5 | 1.2 | 1.4 |
| | Phosphatesterase | 2.7 | 2.5 | 2.5 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
| | Leucin-Aminopeptidase | 1.6 | 1.4 | 1.5 | 1.7 | 1.7 | 1.6 |

3.1.6 *Optimierter Multi-Substrat Enzymassay (MSEA)*

Im Folgenden wird die Durchführung des für landwirtschaftliche Böden optimierten MSEAs im Detail beschrieben und Besonderheiten dazu angeführt.

Chemikalien und Reagenzien

- Universalpuffer-Stammlösung
12.1 g Trishydroxymethylaminomethan, 11.6 g Maleinsäure, 14.0 g Citronensäure-Monohydrat, 6.3 g Borsäure in 1000 ml H₂O
- Universalpuffer-Gebrauchslösung (UPGL)
Universalpuffer-Stammlösung 1:5 verdünnen und pH-Wert mit NaOH auf 6.5 (mittlerer pH-Wert der verwendeten Versuchsböden) oder auf Boden-pH (in-Situ Ansatz) einstellen.
- MU- bzw. AMC-Substratmischung (Zusammenstellung siehe Tab. 7)
Substratmischung in 100-ml-Meßkolben einwiegen und in 3 ml Methoxyethanol (Ultraschall) weitgehend lösen, nach Zusatz von 3 ml UPGL vollständig lösen (Ultraschall) und mit UPGL bis zu Marke auffüllen.
- Extraktionslösung: 100 mM K₂HPO₄, pH 6.1
- Methanol

Durchführung

500 mg Boden werden in 4facher Wiederholung in 20-ml-Zentrifugengefäße eingefüllt und mit 2.0 ml Substratlösung versetzt. Die gut verschlossenen Ansätze werden bei 30 °C und 240 rpm (Horizontalschüttler) inkubiert. Nach je 1, 2, 3 und 4 Stunden wird jeweils 1 Ansatz mit 5.0 ml Methanol versetzt und geschüttelt. Anschließend werden 10 ml Extraktionslösung zugesetzt und 5 min geschüttelt (Überkopfschüttler). Nach erfolgter Zentrifugation bei 3000 g für 10 min wird der Überstand 0.45-µm-filtriert und für die HPLC (Einstellungen siehe Tab. 3) bereitgestellt.

Berechnung

Zur Berechnung werden die nach der Inkubation verbleibenden MU- und AMC-Substrate (in µmol g⁻¹) gegen deren Inkubationszeit aufgetragen. Aus der Steigung der 4 Punkte (Regression) ergibt sich die Enzymaktivität, der Bestimmungsfehler wird über den Standardfehler der Regressionsgeraden berechnet.

Anmerkungen:

- Dieser Enzymassay kann mit etwa 100 - 500 mg Boden durchgeführt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen ist allerdings darauf zu achten, daß das Verhältnis Bodeneinwaage / Substratlösung / Extraktionsvolumen etwa 1 / 4 / 40 beträgt. Die Fehleranfälligkeit erhöht sich mit geringer werdender Einwaage.
- Um Adsorptionsmechanismen weitgehendst konstant zu halten, sollte die Bodeneinwaage innerhalb einer Probe nicht allzusehr schwanken ($\pm 10 \%$).
- Die angegebenen Substratkonzentrationen sind auf die verwendeten Untersuchungsböden (siehe dort) abgestimmt, bei aktiveren Böden (Waldböden, streureiche Böden, etc.) sind die Substratmengen (besonders bei MU-Phosphat und MU-Glucose) entsprechend zu erhöhen oder (besser) die Inkubationszeiten zu verringern (z.B. 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h Inkubation). Im allgemeinen ist aufgrund der zeitgestaffelten Inkubation ein vorzeitiger Verbrauch der Substrate sofort zu erkennen und kann entsprechend korrigiert werden.
- Da alle Pippetierschritte möglichst quantitativ sein müssen ist auf akkurates Pipettieren zu achten (automatische Pipettoren).
- Die Inkubationstemperatur kann von etwa 15 bis 45 °C variiert werden, allerdings erhöht sich die Fehleranfälligkeit bei geringeren Temperaturen.

Tabelle 7 – Optimierte Substratzusammenstellung und –konzentrationen des MSEA für landwirtschaftliche Böden.

| Enzym | Substrat (handelsübliche Form) | Substratkonzentration | |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | | [μM] | [mg 100 ml ⁻¹] |
| β -Glucosidase | 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid | 1000 | 33.8 |
| N-Acetyl- β -glucosaminidase | 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid Dihydrat | 500 | 20.7 |
| β -Glucuronidase | 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Trihydrat | 250 | 10.2 |
| β -Xylosidase | 4-Methylumbelliferyl- β -D-Xylopyranosid | 100 | 3.10 |
| Phosphatesterase | 4-Methylumbelliferyl-Phosphat Dinatriumsalz | 5000 | 150 |
| Sulfatesterase | 4-Methylumbelliferyl-Sulfat Kaliumsalz | 50 | 1.40 |
| Leucin-Aminopeptidase | L-Leucin-4-Methylcumarinylamid Hydrochlorid | 1500 | 48.6 |

3.2 Anwendungsmöglichkeiten des MSEA für landwirtschaftliche Fragestellungen

3.2.1 Mikrobielle Biomasse und Standardenzymaktivitäten der Versuchsböden

Die mikrobielle Biomasse der elf Versuchsböden schwankte zwischen 225 und 1000 $\mu\text{g C}_{\text{mic}} \text{g}^{-1} \text{TS}$ und lag damit in Bereichen, die für landwirtschaftlich und als Grünland genutzte Flächen üblicherweise angegeben werden (Stemmer und Kandeler, 1995) (Tab. 8). Die Differenzierung der einzelnen Böden war im Besonderen in den schon über längere Zeit geführten Versuchsreihen Fuchsenbigl (Pflug – Grubber – Frässaat) und Grobenzersdorf (Null – Mineralisch – Stallmist) ausgeprägt und ist bereits von anderen Autoren teilweise ausführlich dokumentiert (Kandeler und Böhm, 1996, Kandeler *et al.*, 1999). Für die geringen mikrobiellen Biomassen in den Böden Fuchsenbigl-Pflug und Grobenzersdorf-Null sind in erster Linie die fehlenden oder geringen Einträge an organischen Nährstoffen verantwortlich, sodaß sich über die lange Dauer der Bearbeitungsversuche keine ausgeprägte Biomasse bilden konnte. Etwas uneinheitlicher stellte sich das Bild bei den Versuchsfeldern in Spillern dar, die erst vor 3 bzw. 7 Jahren von organisch bewirtschafteten Flächen auf Grünbrache umgestellt wurden. Die Biomasseverteilung in diesen Böden war uneinheitlich und höheren Schwankungen unterworfen. Ausgeprägte Differenzierungen zwischen diesen Versuchsfeldern (Organische Bewirtschaftung – Grünbrache) sind noch nicht zu erwarten, da der Umstellungsversuch wahrscheinlich noch zu kurz läuft (bes. bei den 3jährigen Versuchen) und beide Varianten hohe organische Nährstoffeinträge aufweisen. Relativ hoch war auch der Biomassegehalt des Versuchsfeldes in Hallein, der für Grünlandböden typisch ist (Stemmer und Kandeler, 1995).

Ein ähnliches Bild wie die mikrobielle Biomasse (die sowohl Bakterien als auch Pilzbiomasse beinhaltet) ergab auch der Gehalt an Ergosterol, der als Indikator für die pilzliche Biomasse gilt (Tab. 8). Leider stehen direkte Umrechnungen vom Ergosterolgehalt auf die pilzliche Biomasse bislang aus, da der Ergosterolgehalt zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien und den einzelnen Pilzspezies etwas schwankt. Im Mittel wird ein Ergosterolgehalt von etwa 0.5 – 1 % in der pilzlichen Biomasse angegeben (Schinner und Sonnleitner, 1996). Im großen und ganzen spiegelte der Ergosterolgehalt die Messungen der mikrobiellen Biomasse wider, allerdings zeigte sich bei den Versuchsfeldern in Spillern doch eine deutlichere Differenzierung zwischen den organisch bewirtschafteten Flächen und den Bracheflächen. Bezogen auf die mikrobielle Biomasse wurden im allgemeinen die höchsten

Anteile an Pilzbiomasse in den streureicheren Versuchsfeldern ermittelt. Offensichtlich begünstigt die organische Bewirtschaftung eher bakterielle Umsetzungen, während Grünbracheflächen auf Grund des höheren Streuanteiles zu höheren Pilzgehalten neigen (Paul und Clark, 1996).

Die Bestimmung der Bodenenzyme nach Standardverfahren ergab ein der Biomasse und dem Ergosterolgehalt weitgehend analoges Bild (Tab. 8). Sämtliche Enzymaktivitäten zeigten in hoher Korrelation zu den mikrobiellen Biomassen sowohl im Dauerversuch Fuchsenbigl als auch im Dauerversuch Großenzersdorf ansteigende Werte in den Reihen Pflug-Grubber-Frassaat bzw. Nulldüngung-Mineralisch-Stallmist. Ähnlich gut differenziert waren auch die Flächen in Spillern: Sowohl in der 3jährigen, besonders aber in der 7jährigen Umstellungsfläche wiesen mit wenigen Ausnahmen alle Bodenenzyme höhere Aktivitäten in den Grünbrachen auf als in den organisch bewirtschafteten Flächen.

Tabelle 8 – Mikrobielle Biomasse, Ergosterolgehalt und Bodenenzymaktivitäten der untersuchten Versuchsböden ermittelt nach Standardverfahren (Mittelwerte \pm Standardabweichungen).

| | | Mikrobielle Biomasse [$\mu\text{g g}^{-1}$ TS] | Ergosterol [$\mu\text{g g}^{-1}$ TS] | β -Glucosidase [nmol Ph g^{-1} TS h^{-1}] |
|----------------|---------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Fuchsenbigl | Pflug | 225 | 1.25 | 188 \pm 8 |
| | Grubber | 445 | 3.33 | 298 \pm 5 |
| | Frässaat | 571 | 4.11 | 387 \pm 5 |
| Großenzersdorf | Null | 263 | 0.93 | 125 \pm 2 |
| | Mineralisch | 334 | 2.20 | 259 \pm 4 |
| | Stallmist | 454 | 1.96 | 238 \pm 4 |
| Spillern | Organisch 3J | 998 | 3.01 | 407 \pm 9 |
| | Grünbrache 3J | 794 | 5.88 | 517 \pm 4 |
| | Organisch 7J | 605 | 2.96 | 382 \pm 40 |
| | Grünbrache 7J | 676 | 4.37 | 558 \pm 24 |
| Hallein | Grünland | 860 | 0.83 | 332 \pm 16 |

| | | N-Acetyl- β -glucosaminidase ----- [nmol 4NP g^{-1} TS h^{-1}] ----- | β -Xylosidase | β -Glucuronidase |
|----------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
| Fuchsenbigl | Pflug | 92 \pm 10 | 188 \pm 11 | 15 \pm 1 |
| | Grubber | 115 \pm 6 | 311 \pm 13 | 26 \pm 1 |
| | Frässaat | 146 \pm 0 | 333 \pm 1 | 24 \pm 8 |
| Großenzersdorf | Null | 60 \pm 1 | 196 \pm 3 | 9 \pm 0 |
| | Mineralisch | 83 \pm 0 | 228 \pm 4 | 14 \pm 2 |
| | Stallmist | 113 \pm 6 | 287 \pm 19 | 23 \pm 9 |
| Spillern | Organisch 3J | 176 \pm 14 | 387 \pm 20 | 32 \pm 11 |
| | Grünbrache 3J | 242 \pm 17 | 370 \pm 1 | 51 \pm 5 |
| | Organisch 7J | 240 \pm 3 | 218 \pm 27 | 38 \pm 10 |
| | Grünbrache 7J | 306 \pm 3 | 285 \pm 4 | 62 \pm 1 |
| Hallein | Grünland | 220 \pm 4 | 362 \pm 6 | 82 \pm 19 |

| | | Phosphatesterase (neutrale) [nmol Ph g^{-1} TS h^{-1}] | Sulfatesterase [nmol 4NP g^{-1} TS h^{-1}] | Leucin-Amino-peptidase [nmol NA g^{-1} TS h^{-1}] |
|----------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Fuchsenbigl | Pflug | 304 \pm 10 | 100 \pm 29 | 410 \pm 22 |
| | Grubber | 386 \pm 6 | 123 \pm 58 | 429 \pm 84 |
| | Frässaat | 373 \pm 193 | 153 \pm 24 | 675 \pm 48 |
| Großenzersdorf | Null | 347 \pm 33 | 96 \pm 33 | 492 \pm 46 |
| | Mineralisch | 342 \pm 40 | 73 \pm 15 | 540 \pm 23 |
| | Stallmist | 407 \pm 22 | 121 \pm 44 | 592 \pm 20 |
| Spillern | Organisch 3J | 577 \pm 65 | 221 \pm 21 | 725 \pm 133 |
| | Grünbrache 3J | 721 \pm 53 | 228 \pm 26 | 848 \pm 21 |
| | Organisch 7J | 1532 \pm 24 | 123 \pm 81 | 219 \pm 29 |
| | Grünbrache 7J | 2615 \pm 172 | 163 \pm 40 | 243 \pm 7 |
| Hallein | Grünland | 4091 \pm 96 | 1626 \pm 25 | 442 \pm 55 |

Abk.: Ph – Phenol, 4NP – 4-Nitrophenol, NA – Nitroanilin, TS - Tockensubstanz

3.2.2 Vergleich MSEA – Standardmethoden

Die Bestimmung der Bodenzymaktivitäten mittels MSEA (gepufferter Ansatz, pH 6.5) korrelierte hoch mit den korrespondierenden Standardmethoden (Abb. 8 und 9). Besonders gute Übereinstimmung der beiden unterschiedlichen Ansätze ergab sich bei der Bestimmung der Phosphatesterase ($r = 0.94$), der β -Glucosidase ($r = 0.90$), der β -Glucuronidase ($r = 0.84$), der N-Acetyl- β -glucosaminidase ($r = 0.80$)) und Leucin-Aminopeptidase ($r = 0.78$). Etwas schlechter korreliert waren die beiden Assays bei der β -Xylosidase ($r = 0.72$, 2 Ausreißer). Keine Korrelation konnte bei der Bestimmung der Sulfatesterase festgestellt werden. Wie schon darauf hingewiesen, sind die Abbauraten vom MU-Sulfat im MSEA bei den Versuchsböden praktisch nicht nachweisbar. Unterschiedliche Größenordnungen der Umsetzungsraten zwischen den beiden Enzymassays ergaben sich in erster Linie durch die höheren Inkubationstemperaturen beim Standardassay (meist um 37 °C, MSEA 20 °C), durch unterschiedliche Substrate, unterschiedliche Puffer (Frankenberger und Johanson, 1983) und unterschiedliche Extraktionsausbeuten der Substrate bzw. der Produkte. Brown (1985) gibt Wiederfindungsverluste durch Adsorption für 4-Nitrophenol von bis zu 30 % an.

Clusteranalysen (nach Normierung der Daten) sowohl mit Standardmethoden als auch mit dem MSEA (ohne Sulfatesterase) führten zu ähnlichen Differenzierungen der einzelnen Versuchsböden mit nur geringen Unterschieden (Abb. 10). Beide Ansätze differenzierten deutlich zwischen den sauren Versuchstandorten Hallein und Spillern-7J. Die Ergebnisse mittels Standardmethoden sonderten allerdings den Standort Hallein-Grünland nochmals klar von den Versuchsflächen Spillern-7J ab, die Ergebnisse des MSEA gruppieren die beiden aus bodenbiologischer Sicht ähnlichen Flächen Spillern-Grünbrache-7J, Spillern-Organisch-7J und Hallein-Grünland. Innerhalb der kalkhaltigen Tschernoseme faßte der MSEA die an verfügbarem C_{org} verarmten Standorte Fuchsenbigl-Pflug, Großenzersdorf-Null und Großenzersdorf -Mineralisch zusammen, während die streu- und somit C_{org} -reicheren Standorte Fuchsenbigl-Grubber, Fuchsenbigl-Frässaat und Spillern-Organisch-3J ebenfalls eine homogene Gruppe bildeten. Die Versuchsfläche Großenzersdorf-Stallmist und Spillern-Grünbrache-3J wurde zwischen den Gruppen angesiedelt. Die Ergebnisse der Standardmessungen gruppieren bei den Tschernosemen geringfügig anders, hier wurden alle Großenzersdorf-Versuchsflächen zu einer Gruppe zusammengefaßt. Daneben bildeten die Böden Fuchsenbigl-Pflug und Fuchsenbigl-Grubber, sowie Fuchsenbigl-Frässaat, Spillern-Organisch-3J und Spillern-Grünbrache-3J abgetrennte Gruppen. Beiden Ansätzen ist gemein,

daß sie sowohl Böden mit ähnlichem pH-Wert als auch Böden mit ähnlichem Gehalt an mikrobieller Biomasse und leicht verfügbaren C_{org} zusammenfaßten.

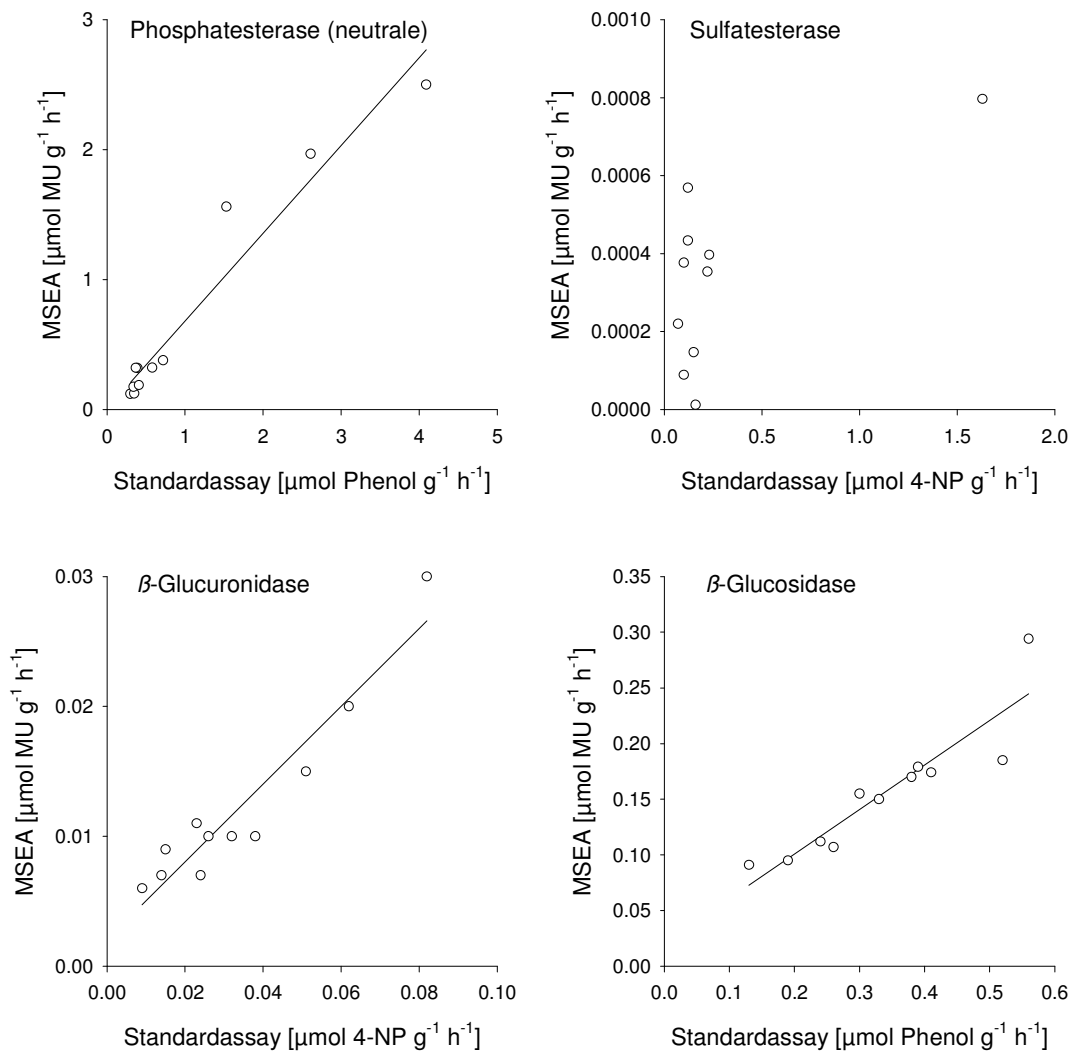


Abbildung 8 – Korrelation zwischen Standardmethode und MSEA (bei pH 6.5) zur Bestimmung der Phosphatesterase, Sulfatesterase, β -Glucuronidase und β -Glucosidase.

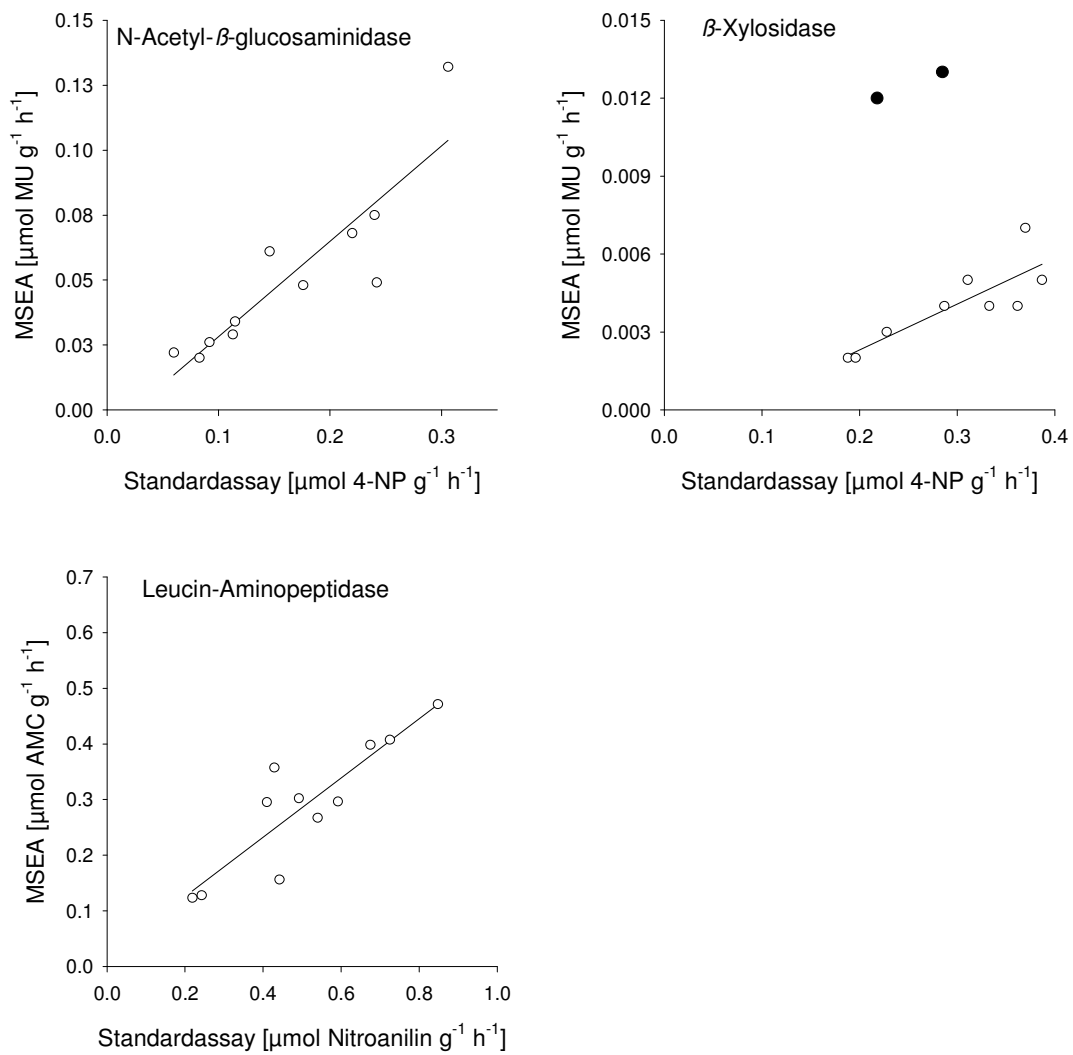


Abbildung 9 – Korrelation zwischen Standardmethode und MSEA (bei pH 6.5) zur Bestimmung der N-Acetyl-β-glucosaminidase, β-Xylosidase und Leucin-Aminopeptidase. Gefüllte Punkte (β-Xylosidase) – nicht in die Korrelation mit einbezogen (Spillern-Grünbrache-7J).

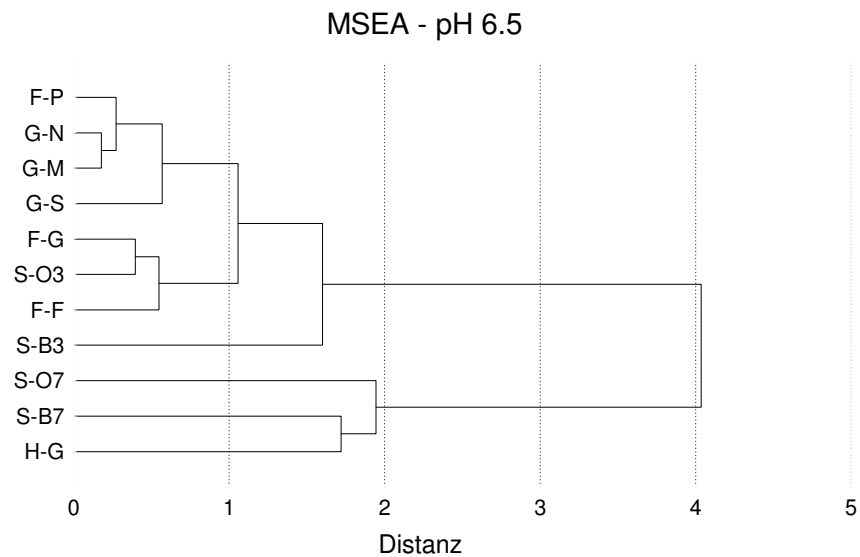
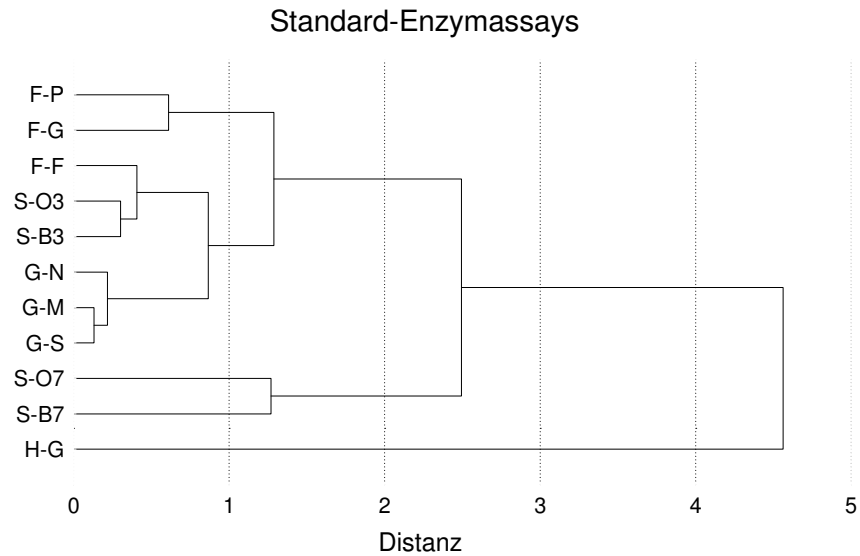


Abbildung 10 – Clusteranalyse (Euklidische Distanzen, complete Linkage) der Versuchstandorte anhand der untersuchten Bodenenzyme (ohne Sulfatesterase) mit Standardmethoden (oben) bzw. mittels MSEA pH 6.5 (unten). Abkürzungen: F-P – Fuchsenbigl-Pflug, F-G – Fuchsenbigl-Grubber, F-F – Fuchsenbigl-Frässaat, G-N – Großenzersdorf-Null, G-M – Großenzersdorf-Mineralisch, G-S – Großenzersdorf-Stallmist, S-O3 – Spillern-Organisch-3J, S-B3 – Spillern-Grünbrache-3J, S-O7 – Spillern-Organisch-7J, S-B7 – Spillern-Grünbrache-7J, H-G – Hallein-Grünland.

3.3 Anwendung des MSEA zur Bestimmung von in-situ Bodenenzymaktivitäten

Die Bestimmung der in-situ Bodenenzymaktivität mittels MSEA konnte lediglich bei Boden-pH durchgeführt werden. Zur Bestimmung der bodenenzymatischen Umsatzraten bei reduzierten Temperaturen (Bodentemperatur z. B. 10 °C) erwies sich der MSEA als nicht zweckmäßig, da die Abbauraten bei derart niedrigen Temperaturen mit diesem Verfahren kaum mehr bestimmbar waren. Allerdings haben die Versuche zur Bestimmung der Bodenenzymaktivität bei unterschiedlicher Temperatur (20 – 40 °C) gezeigt, daß bei einer Temperatursteigerung um 10 °C die Umsatzleistung etwa verdoppelt wird. Das bedeutet, daß die Enzymaktivität bei einer Bodentemperatur von etwa 10 °C auf ein 1/8 der bei 40 °C ermittelten Aktivität sinkt. Bei so geringen Umsatzleistungen ist der MSEA nicht mehr anwendbar, sodaß es zweckmäßiger erscheint, die bei 30 oder 40 °C ermittelten Aktivitäten entsprechen diesen Faktor rechnerisch zu korrigieren.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten bei Boden-pH führte in erster Linie bei Enzymen, deren pH-Optimum deutlich außerhalb des Boden-pHs liegt zu etwas verringerten Umsatzleistungen. So weisen die Polysaccharid-Hydrolasen β -Glucosidase, N-Acetyl- β -glucosaminidase, β -Glucuronidase und β -Xylosidase pH-Optima im Bereich von etwa 5 – 6 auf (Schinner und Sonnleitner, 1996). Wurde der Enzymassay z. B. in den Tschernosemen bei deren Boden-pH von 7.5 durchgeführt, lagen die Umsatzraten außerhalb des Optimalbereichs und führten zu teils signifikanter Verringerung der Umsatzleistungen (Abb. 11 und 12). Allerdings wurden diese Abweichungen weitestgehend von anderen Faktoren wie dem Gehalt an mikrobieller Biomasse oder organischem Kohlenstoff überdeckt, sodaß die Notwendigkeit einer in-situ Messung in Frage zu stellen ist. Aus dem vorliegenden Datenmaterial ergibt sich, daß ein in-situ Ansatz zur Bestimmung von Bodenenzymaktivitäten nicht zu wesentlich veränderten Ergebnissen führt.

Abb. 13 zeigt die Clusterung der Versuchsböden ermittelt bei Boden-pH unter Verwendung eines MSEA und 20 °C. Die Unterschiede zum MSEA im gepufferten Ansatz (pH 6.5) und zu den Messungen mittels Standardmethoden (Abb. 10) fielen gering aus. Ebenfalls deutlich differenziert wurden die Böden mit eher saurem pH-Wert von den neutralen Böden, die Clusterung innerhalb der Tschernoseme richtete sich ähnlich wie im gepufferten Ansatz nach der Menge an aktiver mikrobieller Biomasse, die in erster Linie vom Angebot an leicht verfügbaren Nährstoffen abhängig ist.

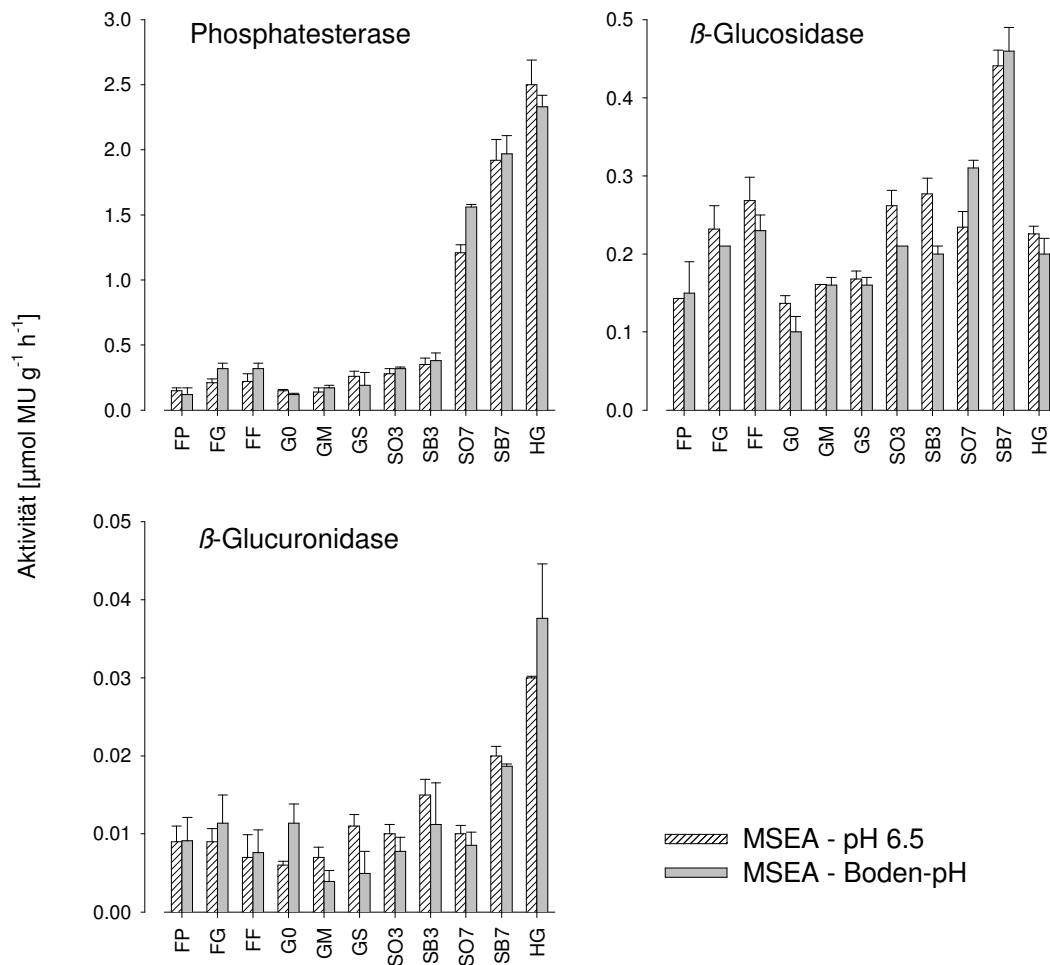


Abbildung 11 – Phosphatase, β-Glucosidase und β-Glucuronidase-Aktivität der Versuchsböden analysiert mittels MSEA bei pH 6.5 und bei Boden-pH (in-situ).
 Abkürzungen: FP – Fuchsenbigl-Pflug, FG – Fuchsenbigl-Grubber, FF – Fuchsenbigl-Frässaar, G0 – Großenzersdorf-Nulldüngung, GM – Großenzersdorf-Mineralisch, GS – Großenzersdorf-Stallmist, SO3 – Spillern-Organisch-3J, SB3 – Spillern-Grünbrache-3J, SO7 – Spillern-Organisch-7J, SB7 – Spillern-Grünbrache-7J, HG – Hallein-Grünland.

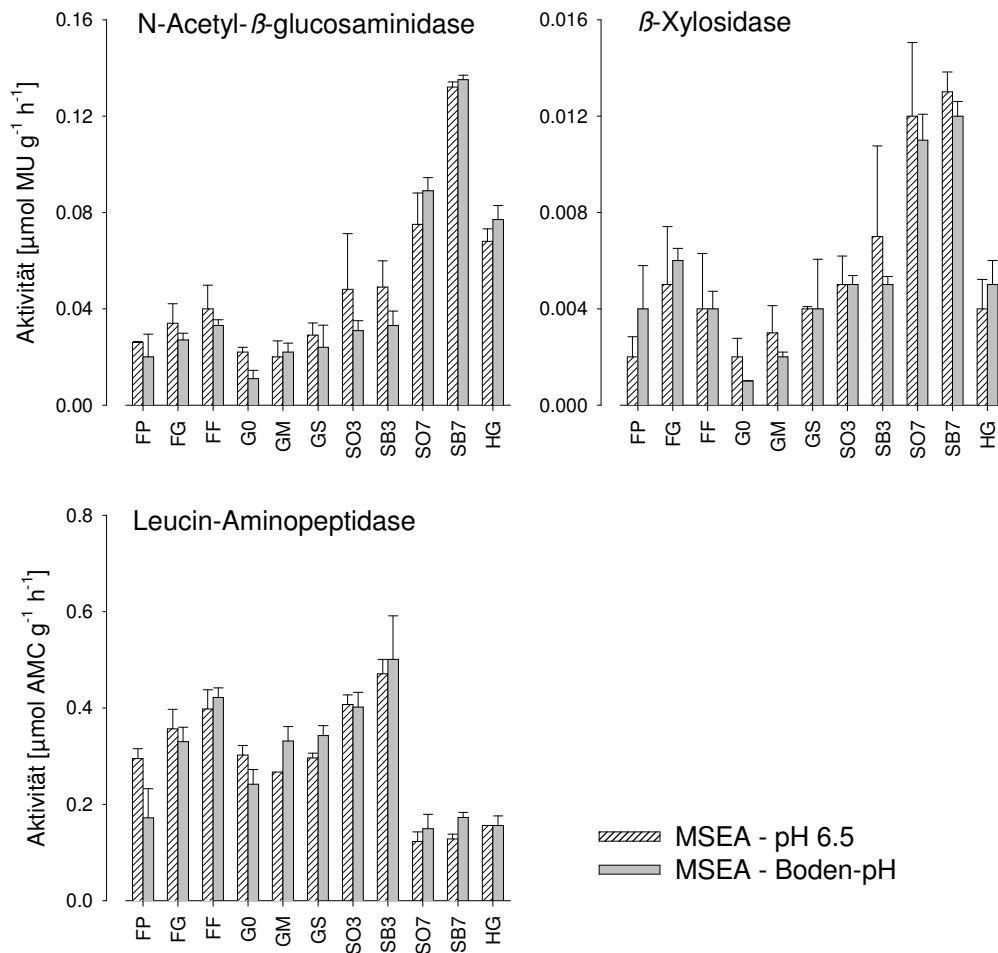


Abbildung 12 – N-Acetyl- β -glucosaminidase, β -Xylosidase und Leucin-Aminopeptidase-Aktivität der Versuchsböden analysiert mittels MSEA bei pH 6.5 und bei Boden-pH (in-situ). Abkürzungen: FP – Fuchsenbigl-Pflug, FG – Fuchsenbigl-Grubber, FF – Fuchsenbigl-Frössaat, G0 – Großenzersdorf-Nulldüngung, GM – Großenzersdorf-Mineralisch, GS – Großenzersdorf-Stallmist, SO3 – Spillern-Organisch-3J, SB3 – Spillern-Grünbrache-3J, SO7 – Spillern-Organisch-7J, SB7 – Spillern-Grünbrache-7J, HG – Hallein-Grünland.

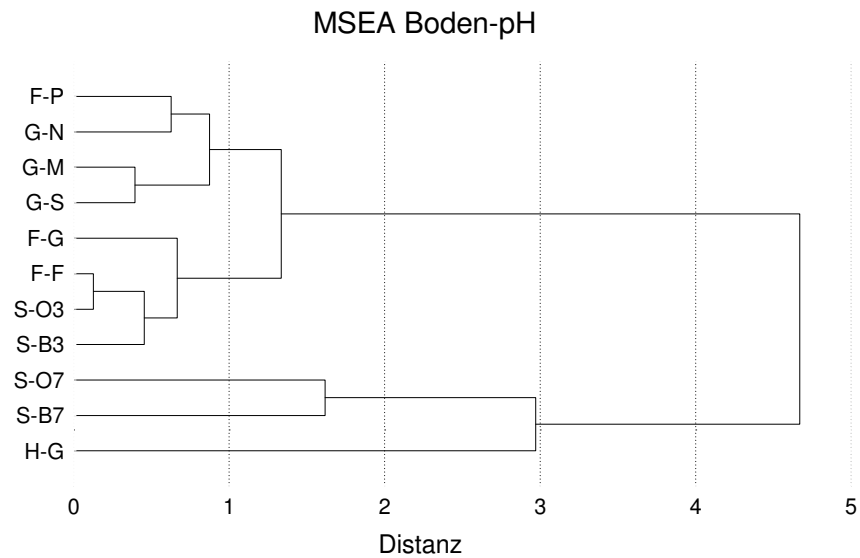


Abbildung 13 – Clusteranalyse (Euklidische Distanzen, complete Linkage) der Versuchstandorte anhand der untersuchten Bodenenzyme (ohne Sulfat-Esterase) mittels MSEA-Boden-pH. Abkürzungen: F-P – Fuchsenbigl-Pflug, F-G – Fuchsenbigl-Grubber, F-F – Fuchsenbigl-Frässaat, G-N – Großenzersdorf-Null, G-M – Großenzersdorf-Mineralisch, G-S – Großenzersdorf-Stallmist, S-O3 – Spillern-Organisch-3J, S-B3 – Spillern-Grünbrache-3J, S-O7 – Spillern-Organisch-7J, S-B7 – Spillern-Grünbrache-7J, H-G – Hallein-Grünland.

4 Schlußfolgerungen

Der Einsatz von Multi-Substrat Enzymassays (MSEAs) zur Bestimmung von bodenenzymatischen Umsetzungsraten erlaubt die zeitgleiche Messung der Enzyme β -Glucosidase, N-Acetyl- β -glucosaminidase, β -Xylosidase, β -Glucuronidase, Leucin-Aminopeptidase und Phosphatesterase. Für die Sulfatesterase konnten meist keine ausreichend hohen Umsetzungsraten ermittelt werden. Die bodenenzymatischen Umsetzungsraten, die mit diesem inovativen Bestimmungsverfahren ermittelt wurden, korrelierten im hohen Ausmaß mit den Ergebnissen von Standardmethoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (z.B. Schinner *et al.*, 1996), allerdings waren die Größenordnungen der Umsetzungsraten teils verschieden. Im Vergleich zu den Standardmethoden bringt der Einsatz eines MSEA eine große zeitliche Ersparung, da er die Analyse von etwa 12 Proben und 6 - 7 Enzymen an einem Tag erlaubt. Zusätzlich ist die Zusammensetzung des MSEA variabel, sodaß je nach Fragestellung unterschiedliche Substrate eingesetzt werden können. Nachteilig ist neben den relativ hohen Kosten für die Substrate der im Vergleich zu Standardassays apparativ deutlich größere Aufwand (HPLC mit Gradientenpumpe).

Die Bestimmung der Bodenenzyme mittels MSEA ergab eine den Standardmethoden analoge Differenzierung der elf untersuchten Versuchsböden (Bodenbearbeitungsversuche, Düngerversuche, Umstellungsversuche, etc.), die sich sowohl im Boden-pH als auch im Gehalt an mikrobiellen Biomasse und C_{org} signifikant unterschieden. Der Einsatz des MSEA zur Bestimmung von in-situ Enzymaktivitäten bei bodenspezifischen pH-Werten brachte keine wesentlichen Veränderungen der Ergebnisse im Vergleich zu gepufferten Ansätzen. Zur Bestimmung der bodenenzymatischen Umsetzungsraten bei reduzierten Temperaturen (z. B. 10 °C) erwies sich der MSEA als nicht zweckmäßig, da die Abbauraten bei derart niedrigen Temperaturen mit diesem Verfahren kaum mehr bestimmbar waren.

5 Publikationen

Publikationen zu den in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen sind in Arbeit und werden nach Veröffentlichung dem BMLFUW zugesandt.

6 Literatur

- Amutha, B., Khire, J.M. und Khan, M.I. (1998) Characterization of a novel exo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase from thermotolerant *Bacillus* sp. NCIM 5120. *Biochemica et Biophysica Acta* 1425, 300-310.
- Anderson, J.P.E. und Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221.
- Baraznenok, V.A., Becker, E.G., Ankudimova, N.V. und Okunev, N.N. (1999) Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 651-659.
- Benitez, E., Melgar, R., Sainz, H., Gomez, M. und Nogales, R. (2000) Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum*, L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1829-1835.
- Brown, K.A. (1985) Acid deposition: effects of sulfuric acid at pH 3 on chemical and biochemical properties of bracken litter. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 31-38.
- Burns, R.G. (1982) Enzyme activity in soils: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.
- Carter, M.R. und Rennie, D.A. (1982) Changes in soil quality under zero tillage farming systems: distribution of microbial biomass and mineralizable C and N potentials. *Canadian Journal of Soil Science* 62, 587-597.
- Chinchetru, M.A., Cabezas, J.A., Calvo, P. (1989) Purification and characterization of a broad specificity beta-glucosidase from sheep liver. *International Journal of Biochemistry* 21, 469-76.
- Djajakirana, G.R., Joergensen, G. und Meyer, B. (1996) Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 299-304.
- Frankenberger J.R., W.T und Johanson, J.B. (1983) Methods of measuring invertase activity in soils. *Plant and Soil* 74, 301-311.
- Freeman, C., Liska, G., Ostle, N.J., Jones, S.E. und Lock, M.A. (1995) The use of fluorogenic substrates for measuring enzyme activity in peatlands. *Plant and Soil* 175, 147-152.
- Freeman, C. (1997) Using HPLC to eliminate quench-interference in fluorogenic-substrate assays of microbial enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 203-205.

- Freeman, C., Nevison G.B., Huges S., Reynolds, B. und Hudson, J. (1998) Enzymatic involvement in the biogeochemical responses of a Welsh peatland to a rainfall enhancement manipulation. *Biology and Fertility of Soils* 27, 173-178.
- Freeman, C. und Nevison, G.B. (1999) Simultaneous analysis of multiple enzymes in environmental samples using methylumbelliferyl substrates and HPLC. *Environmental Quality* 28, 1378-1380.
- Hoffmann, G. (1968) Eine photometrische Methode zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 118, 161-172.
- Hoffmann, G. und Dedeken, M. (1965) Eine Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität in Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 108, 195-201.
- Hayano, K. und Tubaki, K. (1985) Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 553-557.
- Kandeler, E. und Böhm, K.E. (1996) Temporal dynamics of microbial biomass, xylanase activity, N-mineralization and potential nitrification in different tillage systems. *Applied Soil Ecology* 5, 221-230.
- Kandeler, E., Stemmer, M., Palli, S. und Gerzabek, M. H. (1999) Xylanase, invertase and urease activity in particle-size fractions of soils. In: Bertelin, J, Huang, P.M. und Bollag, J.M.: Effect on Mineral-Organic-Microorganism Interaction on Soil and Freshwater Environments, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 275-286.
- Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G. und Huang, W.Z. (2002) Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1207-1218.
- Martens, D.A., Johanson, J.B. und Frankenberger, W.T. (1992) Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Science* 153, 53-61.
- Marx, M.-C., Wood, M. und Jarvis, S.C. (2001) A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1633-1640.
- Merino-Trigo, A., Sampedro, L., Rodriguez-Berrocal, F.J., Mato, S. und de la Cadena, M.P. (1999) Activity and partial characterisation of xylanolytic enzymes in the earthworm *Eisenia andrei* fed on organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1735-1740.
- Miller, M., Palojarvi, A., Rangger, A., Reeslev, M. und Kjoller, A. (1998) The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64 no. 2, 613-617.

- Naseby, D.C. und Lynch, J.M. (1997) Rhizospere soil enzymes as indicators of perturbations caused by enzyme substrate addition and inoculation of a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat see. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1353-1362.
- Paul, E.A. und Clark, F.E. (1996) Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press, San Diego, London, New York, pp. 340.
- Perucci, P., Vischetti, C. und Battistoni, F. (1999) Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 195-204.
- Sarathchandra, S.U. und Perrot, K.W. (1984) Assay of β -glucosidase activities in soils. *Soil Science* 138, 15-19.
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. und Margesin, R. (Eds) (1996) Methods in Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 425.
- Schinner, F. und Sonnleitner, R. (1996) Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik Band I. Grundlagen, Klima, Vegetation und Bodentyp. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 450.
- Schlegel, H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, pp 634.
- Speir, T.W., Ross, D.J. und Orchard, V.A. (1984) Spatial variability of biochemical properties in a taxonomically-uniform soil under grazed pasture. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 153-160.
- Stemmer, M. und Kandeler, E. (1995) Bodenmikrobiologische Untersuchungen am Integrated-Monitoring-Standort Zöbelboden. Endbericht über die Untersuchungsjahre 1993 und 1994. Umweltbundesamt Wien.
- Tabatabai, M.A. und Bremner, J.M. (1970) Arylsulfatase activity of soils. *Journal of Soil Science Society America* 34, 225-229.
- Ueno, H., Miyashita, K., Sawada, Y. und Oba, Y. (1991) Assay of chitinase and N-acetylglucosaminidase activity in forest soils with 4-methylumbelliferyl derivatives. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 154, 171-175.
- Vepsäläinen, M., Kukkonen, S., Vestberg, M., Sirviö, H. und Niemi, M. (2001) Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1665-1672.