

Hemmung der Ammoniumoxidation durch Nitrosomonas europaea
mit verschiedenen Nitrifikationshemmstoffen

B. Zacherl und A. Amberger

Institut für Pflanzenernährung
Technische Universität München-Weihenstephan

Zusammenfassung

Der hemmende Einfluß von Dicyandiamid (DCD), N-Serve (NS) und Thioharnstoff (TH) auf die Ammoniumoxidation durch *N. europaea* wurde sowohl in Versuchen mit einer statischen Reinkultur als auch mit Zellsuspensionen nachgewiesen.

Die applizierten DCD-Mengen waren den im Freiland üblicherweise verwendeten Konzentrationen vergleichbar. N-Serve und vor allem Thioharnstoff hemmten schon in geringen Konzentrationen (1 ppm bzw. 0,5 ppm) die Ammoniumoxidation, während 200 ppm DCD für eine ca. 70 %ige Hemmung notwendig waren. In Übereinstimmung mit anderen Autoren wurde für DCD eine bakteriostatische, für N-Serve und Thioharnstoff eine bakterizide Wirkung festgestellt.

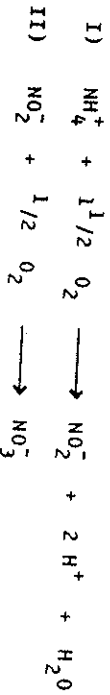
Summary: Inhibition of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* with different nitrification inhibitors

Inhibitory effects of dicyandiamide (DCD), N-Serve (NS) and thiourea (TH) on ammonia oxidation were detected in experiments with static cultures as well as cell suspensions.

Applied doses of DCD were similar to amounts practically used in fields. N-Serve and especially thiourea inhibited ammonia oxidation already at low concentrations (1 or 0,5 ppm resp.), while DCD required 200 ppm for 70 % inhibition. In agreement with other authors, DCD effect was shown to be bacteriostatic, N-Serve and thiourea effects bactericidal.

Einleitung

Wie allgemein bekannt ist, läuft die Nitrifikation, eine der wichtigsten Reaktionen im natürlichen N-Kreislauf, in zwei Schritten ab:



Beide Oxidationen liefern die gesamte Stoffwechselenergie für die ausführenden chemoautotrophen Bakterien. Der erste Nitrifikationsschritt wird neben anderen Mikroorganismen vor allem von Bakterien der Gattung Nitrosomonas durchgeführt. Da eine Nitrifikationshemmung in der Praxis nur sinnvoll ist, wenn sie am ersten Schritt ansetzt (NO_2^- ist ein starkes Pflanzengift), wird hauptsächlich der Einfluß von Nitrifikationshemmstoffen auf Nitrosomonas untersucht.

Material und Methoden

Nitrosomonas europaea (ATCC 19718) wurde bei 26 °C in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 80 ml Nährlösung von folgender Zusammensetzung kultiviert: 3,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg Fe (als Chelat); gelöst in 1 l dest. H_2O (modifiziertes ATCC-Medium 221); pH-Wert 8,2, eingestellt mit 5 %iger Na_2CO_3 -Lsg.

Nach dem Inokulieren wurden die Kolben in einem abgedunkelten Raum mit ca. 90 Upm auf einem Rundschüttler geschüttelt. Herstellung der Zellsuspensionen: Anreicherung über 17 Tage unter den oben genannten Bedingungen; während dieser Zeit mit steriler Na_2CO_3 -Lsg. zweimalige Korrektur des pH-Wertes, der durch die Protonenabgabe der Bakterien absinkt und im sauren Bereich das Wachstum hemmt. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3500 Upm) gesammelt, dreimal mit 0,1 molarem Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,6) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Zur Ermittlung des

Bakteriengehaltes der Suspension erfolgte eine Proteinnbestimmung nach LOWRY.

Wichtigster Parameter für das Wachstum von Nitrosomonas europaea war die Nitritbildung (kolorimetrische Bestimmung bei 546 nm mit Sulfanilamid und N-Naphthylethylendiammoniumdichlorid); die Atmung der Zellsuspensionen wurde im Warburg-Apparat gemessen.

Folgende Nitrifikationshemmstoffe wurden getestet: Dicyandiamid ("Didin"), "N-Serve" und Thioharnstoff. Die Applikation erfolgte in Reinkulturversuchen zu Beginn der Hauptwachstumsphase, in Suspensionsversuchen zum Versuchsbeginn.

Ergebnisse und Diskussion1. N. europaea in Reinkultur

Wächst N. europaea in einer statischen Kultur, d.h. in einem Medium, in dem nach der Inokulation Nährstoffe oder pH-Wert nicht mehr ergänzt oder geändert werden, erhält man eine typische mehrphasige Wachstumskurve, die auch vielen anderen Mikroorganismen eigen ist.

Wie der Verlauf der unbehandelten Kultur (Ko) in den Abbildungen 1, 2 und 3 zeigt, ist die Wachstumskurve in drei Phasen unterteilt, nämlich eine Anlaufphase mit geringem Wachstum, die logarithmische Hauptwachstumsphase und eine stationäre Phase, in der das Wachstum zum Stillstand kommt. Durch die Applikation eines Nitrifikationshemmstoffes zu Beginn der Hauptwachstumsphase wird je nach dessen Wirksamkeit die Wachstumskurve mehr oder weniger stark abgeflacht.

Abb. 1 zeigt den Einfluß von 200 ppm und 300 ppm DCD auf die Nitritbildung von N. europaea; die Hemmung beträgt gegenüber der Kontrolle 71 % bzw. 83 %. Unter analogen Bedingungen führen 1 ppm bzw. 10 ppm N-Serve (Abb. 2) bereits zu einer völligen Unterdrückung der logarithmischen Wachstumsphase, die Hemmung beträgt 97 % bzw. 100 %. Auch Thioharn-

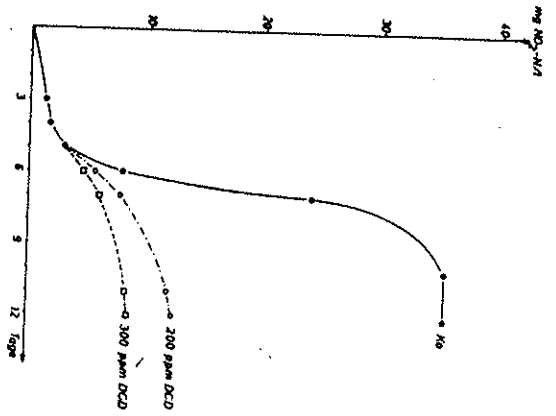


Abb. 1: Einfluss von Dicyandiamid (DCD) auf die Nitritbildung durch *N. europaea* in Reinkultur

Fig. 1: Effect of dicyandiamide (DCD) on the rate of nitrite production by *N. europaea* in pure culture

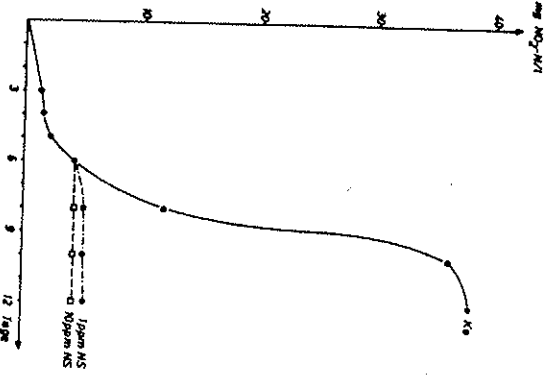


Abb. 2: Einfluss von N-Serve (NS) auf die Nitritbildung durch *N. europaea* in Reinkultur

Fig. 2: Effect of N-Serve (NS) on the rate of nitrite production by *N. europaea* in pure culture

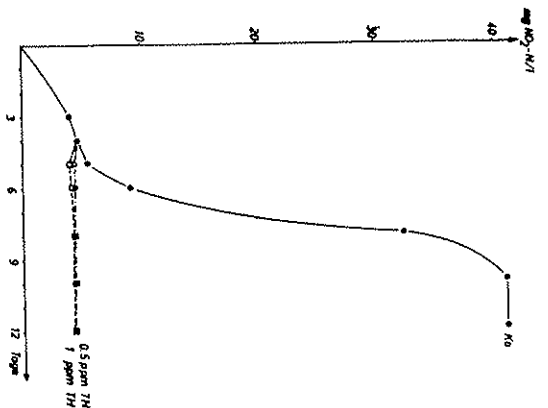


Abb. 3: Einfluss von Thioharnstoff (TH) auf die Nitritbildung durch *N. europaea* in Reinkultur

Fig. 3: Effect of thiourea (TH) on the rate of nitrite production by *N. europaea* in pure culture

stoff (Abb. 3) hemmt die Nitritbildung schon in Konzentrationen von 0,5 ppm bzw. 1 ppm zu 100 %.

Alle drei Substanzen hemmen also den ersten Nitrifikations-schritt; Thioharnstoff und N-Serve sind bereits in sehr geringen Konzentrationen hoch wirksam. Die für eine ausreichende Hemmung notwendigen DCD-Konzentrationen von 200 - 300 ppm erscheinen zunächst sehr hoch, sie entsprechen aber den praxisüblichen Applikationsmengen im Freiland (ca. 25 - 35 kg/ha), wie die nachfolgende (überschlägige) Berechnung zeigt:

Bei einer Einarbeitungstiefe von 6 - 8 cm ergeben 30 kg DCD/ha ca. 30 mg DCD/kg Boden (30 ppm). Bezieht man letztere auf das verfügbare Bodenwasser (1 kg Boden enthält bei normalem Wassergehalt ca. 200 ml Wasser), so errechnet sich eine DCD-Konzentration von 150 ppm (30 mg DCD/kg Boden = 150 mg DCD/l Bodenlösung). Diese Konzentration erhöht sich noch bei geringerem Wassergehalt bzw. bei Verwendung von Granulaten.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß mikrobiologische Laborversuche generell schwer mit Freilandbedingungen vergleichbar sind, da für die Bakterien in der Reinkultur optimale Lebensbedingungen vorherrschen, wie z.B. die hohe Temperatur und der stark alkalische pH-Wert.

2. Zellsuspensionen von *N. europaea*

Die Arbeit mit Zellsuspensionen bietet den Vorteil, daß aufgrund der hohen Keimdichte sehr gute Aktivitäten erhalten und die gewünschten Versuchsbedingungen genau kontrolliert werden können.

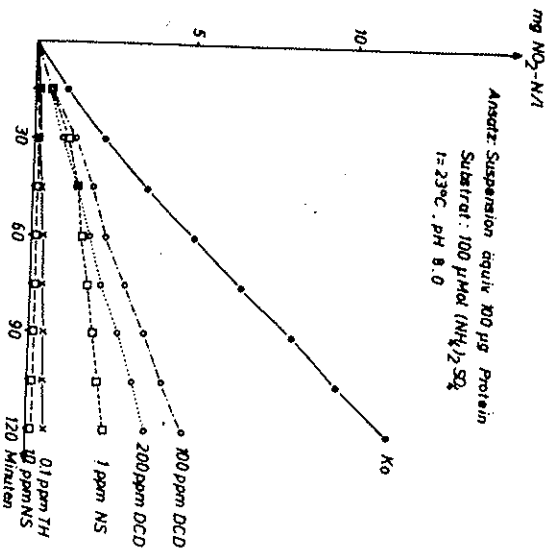


Abb. 4: Einfluß von Nitrifikationshemmstoffen auf die Nitritbildung einer Zellsuspension von *N. europaea*

Fig. 4: Effect of nitrification inhibitors on the rate of nitrite production of a *N. europaea* cell suspension

Abb. 4 zeigt die Wirkung von DCD, N-Serve und Thioharnstoff auf die Nitritbildung einer Zellsuspension von *N. europaea*. Bezüglich des Hemmeffektes ergibt sich ein analoges Bild wie in den Versuchen mit Bakterien in Reinkultur: mit 200 ppm DCD beträgt die Hemmung 67 %, mit 1 ppm N-Serve 78 %, 10 ppm N-Serve sowie 0,1 ppm Thioharnstoff bewirken eine fast vollständige Hemmung (99 % bzw. 95 %).

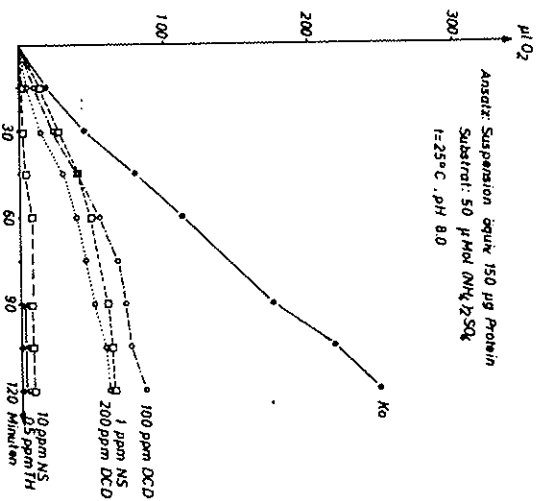


Abb. 5: Einfluß von Nitrifikationshemmstoffen auf die Atmung einer Zellsuspension von *N. europaea*

Fig. 5: Effect of nitrification inhibitors on the respiration of a *N. europaea* cell suspension

Nahezu identische Auswirkungen zeigen die Hemmstoffe auf den Sauerstoffverbrauch einer Zellsuspension, also die Atmung (Abb. 5). Während die unbehandelte Kontrolle im Verlauf von zwei Stunden ca. 250 µl O₂ verbraucht, bewirken 200 ppm DCD eine Hemmung von 75 %, 1 ppm N-Serve von 74 %, 10 ppm N-Serve und 0,5 ppm Thioharnstoff unterbinden die Atmung fast vollständig zu 96 % bzw. 98 %.

Die Verminderung des O_2 -Verbrauches zeigt eine Drosselung der Endoxidation in der Atmungskette an, wo die angelieferten Elektronen von der Cytochromoxidase auf den Sauerstoff übertragen werden. Dies führt zu einem geringeren Elektronenfluß, es wird also weniger Substrat oxidiert und damit weniger Energie gewonnen.

Auffallend ist in allen Versuchen die starke Wirkung von N-Serve und Thioharnstoff; schon geringe Konzentrationen wirken bakterizid. Mit DCD hingegen werden relativ hohe Mengen für eine gute Nitrifikationshemmung benötigt, die Wirkung ist aber immer bakteriostatisch, d.h. nach einer gewissen Zeit erlangen die Nitrosomonas-Bakterien die Fähigkeit zur Ammoniumoxidation zurück. Dies wurde dadurch nachgewiesen, daß Bakterien aus einer durch DCD gehemmten Kultur in einem frischen Medium ohne DCD keine Wachstumsdepressionen zeigten; mit N-Serve und Thioharnstoff setzte dagegen keine bakterielle Aktivität mehr ein.

Die bakteriostatische Eigenschaft des DCD wurde bereits von RODGERS und ASHWORTH (1982) festgestellt. Die starke bakterizide Wirkung des Thioharnstoffs auf Nitrosomonas ist schon länger bekannt (LEES 1963); in jüngerer Zeit haben z.B. MAHLI et al. (1978) sowie WOOD et al. (1981) darauf erneut hingewiesen.

Literatur

- CAMPBELL, N.E.R. and M.I.H. ALEEM, 1965a: The effect of 2-chloro, 6-(trichloromethyl)pyridine on the chemoautotrophic metabolism of nitrifying bacteria. I. The Ammonia and hydroxylamine oxidation by Nitrosomonas. *Antonie van Leeuwenhoek* **31**, 124-136.
- LEES, H., 1963: Inhibitors of nitrification. In: 'Metabolic Inhibitors: Comprehensive Treatise' (Hochster, R.M. and Quastel, H., Eds.), Vol. 2, 615-629. Academic Press, New York.
- MAHLI, S.S., COOK, F.D. and M. NYBORG, 1978: Inhibition of nitrite formation by thiourea in pure cultures of Nitrosomonas. *Soil Biol. Biochem.* **11**, 431-432.
- NUTI, U.P., NEGLIA, R.C. and O. VERONA, 1975: Azione del solfato di diclandramidina sul metabolismo chemoautotrofo di Nitrosomonas europaea. L'agricoltura **104**, 219-225.
- RODGERS, G.A. and J. ASHWORTH, 1982: Bacteriostatic action of nitrification inhibitors. *Canad. J. Microbiol.* **28**, 1093-1101.
- WOOD, L.B. et al., 1981: Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification. *Water Research* **15**, 543-553.