

## Untersuchungen zum biologischen Abbau des Nitrifikationshemmstoffes Dicyandiamid ("Didin")

S. Hallinger, H. Goldbach\*, P. Wallnöfer\*\* und A. Amberger\*

### 1. Einleitung

Im Zuge der Bestrebungen von Landwirtschaft und Gartenbau N-Verluste, besonders durch Nitratverlagerung zu vermindern, kommt Nitrifikationshemmstoffen wie Dicyandiamid (DCD) wachsende Bedeutung zu. Die Substanz, deren Wirkung bakteriostatisch ist, hemmt die Ammoniumoxidation durch *Nitrosomonas europaea* (Zacherl und Amberger, 1990a). Andere Bodenmikroorganismen ("Nicht-Nitrifikanten") werden durch DCD nicht beeinträchtigt (Hickisch et al., 1987; Zacherl und Amberger, 1990b).

Der im Boden beobachtete anorganisch-chemische Abbau beginnt mit der Anlagerung von Wasser an die Cyanogruppe der Verbindung und wird durch Metalloxide, besonders amorphe Eisenoxide katalysiert. Die Umsetzung wird gefördert durch höhere Temperaturen (Vilsmeier, 1980) und einen höheren Tongehalt (Amberger und Vilsmeier, 1988), wohingegen sich mit steigendem Wassergehalt die Beständigkeit der Verbindung erhöht (Amberger und Vilsmeier, 1979). Der entstehende Guanylharnstoff wird über Guanidin und vermutlich Harnstoff letztlich zu Ammonium und CO<sub>2</sub> abgebaut (Amberger 1984).

Neben der anorganisch-katalytischen Umsetzung besteht die Möglichkeit, DCD durch Mikroorganismen, die aus dem Boden extrahierbar sind, zu metabolisieren. Für diesen Abbau spielen in vitro Temperatur, Belüftung und DCD-Konzentration eine wichtige Rolle (Hauser und Haselwandter, 1990).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den biologischen Abbau von DCD mit Hilfe von Reinkulturen von Bodenbakterien näher zu untersuchen.

### 2. Material und Methoden

Alle Versuche mit Bakterienreinkulturen und daraus hergestellten Extrakten wurden in vitro unter Zellsuspensionsbedingungen durchgeführt.

-Nährmedium (Versuche zu Abbaugeschwindigkeit, Metabolismus und Wachstum): Standardmineralmedium, C-Quelle Glukose, ohne Vitaminzusatz, alleinige N-Quelle DCD bzw. Guanylharnstoff (200 µg N/ml)

\* Dipl.-Ing. agr. S. Hallinger, Dr. habil. H. Goldbach und Prof. Dr. A. Amberger, Lehrstuhl für Pflanzenernährung der TU München, D-8050 Freising

\*\* Prof. Dr. P. Wallnöfer, Bayer. Landesanstalt für Ernährung, Menzingerstr. 54, D-8000 München

- Pufferlösungen (Versuche mit zellfreien Extrakten): pH 4,3 Acetat-, pH 7,5 Borat-, pH 9,5 Glycinpuffer jeweils 0,1 molar
- Bedingungen der Zellsuspensionskultur: Schütteln von 10 ml Nährlösung in 100-ml Erlenmeyerkolben (Kapsenbergverschluss) mit 60 Upm und 25°C im Dunkeln
- Bakterienstämme und zellfreie Extrakte: Isolat 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) und Isolate 11.1 und 18.1 (*Pseudomonas* sp.) aus Schnittholzkompost; zellfreier Extrakt aus Stamm 16.1 durch Ultraschallaufschluß im Phosphatpuffer (0,1 molar pH 6,8)
- Bestimmungsmethoden:
  - \*DCD-quantitativ: HPLC
  - \*DCD, Guanylharnstoff, Guanidin, Cyanharnstoff, Harnstoff und Metabolite -qualitativ: DC (Platten Kieselgel 60; mobile Phase: Ethylacetat:Ethanol: Eisessig:Wasser 75:10:7,5:7,5 v/v; Anfärbung: KJ/Stärke nach Chlorierung)
  - \*Wachstum: Lebendkeimzahl auf Vollnähragar und Bakteriendichte (E 578 nm)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

DCD, als alleinige N-Quelle eingesetzt, konnte von Bodenbakterien in Zellsuspensionskulturen vollständig abgebaut werden. Sowohl Stamm 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) als auch Isolat 11.1 (*Pseudomonas* sp.) (nicht abgegildet) setzten DCD (200 µg N/ml Nährlösung) innerhalb von 3 Tagen um. Während dieser Zeit war ein beträchtlicher Anstieg der Lebendkeimzahl im Vergleich zu einer Kontrolle ohne N zu beobachten (Abb 1). Ein abiotischer Abbau in der Nährlösung ohne Bakterien fand nicht statt ("Sterilkontrolle").

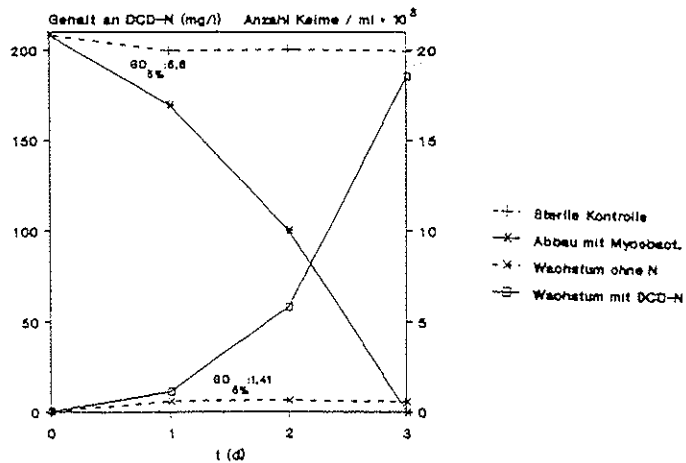
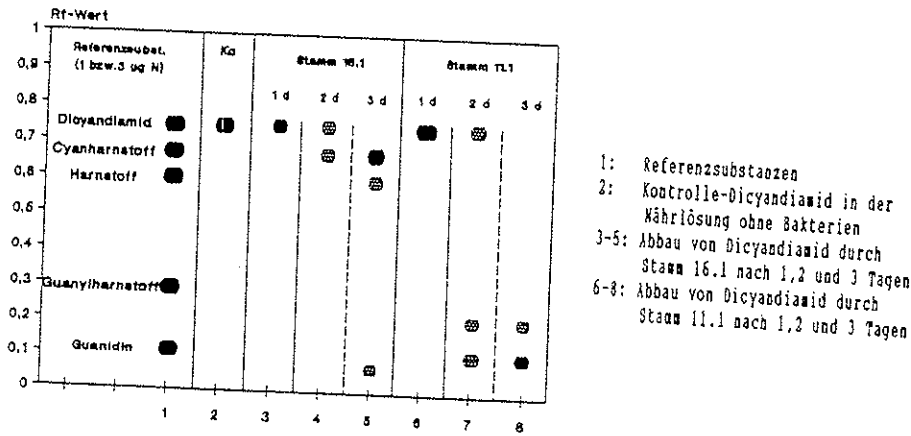


Abbildung 1: Abbau von Dicyandiamid (DCD) und Wachstum von Stamm 16.1 mit DCD als alleiniger N-Quelle (200 µg/ml Nährlösung) in Abhängigkeit von der Zeit

Der mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen verfolgte Abbauweg machte Unterschiede im DCD-Metabolismus zwischen den beiden Kulturen deutlich (Abb.2). Wurde DCD durch Stamm 16.1 umgesetzt (Abb.2 / 3-5), so war am 2. Tag das Auftreten eines ersten Zwischenproduktes erkennbar: eine Substanz, die mit Cyanharnstoff kochromatographierte und die nach 3 Tagen noch deutlicher nachweisbar war. Zusätzlich traten am 3. Tag zwei weitere Abbauprodukte auf: Harnstoff (durch enzymatische Tests bestätigt) und eine bisher noch nicht identifizierte Verbindung. Ganz andere Zwischenprodukte wurden im Verlauf des DCD-Abbaus mit den Stämmen 11.1 bzw. 18.1 beobachtet: eine Substanz mit dem Rf-Wert von Guanidin und eine weitere noch nicht bekannte Verbindung (Abb.2 / 6-8).



- 1: Referenzsubstanzen
- 2: Kontrolle-Dicyandiamid in der Nährlösung ohne Bakterien
- 3-5: Abbau von Dicyandiamid durch Stamm 16.1 nach 1, 2 und 3 Tagen
- 6-8: Abbau von Dicyandiamid durch Stamm 11.1 nach 1, 2 und 3 Tagen

Abbildung 2: Dünnschichtchromatogramm zum Abbau von Dicyandiamid durch die Stämme 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) und 11.1 (*Pseudomonas sp.*)

Weitere Hinweise auf unterschiedliche Abbauwege bestätigten sich durch das Verhalten der verschiedenen Stämme gegenüber Guanidylharnstoff (Produkt des anorganisch-katalytischen Abbaus von DCD) (Abb.3). Isolat 18.1 (*Pseudomonas sp.*) erreichte mit Guanidylharnstoff, angeboten als alleinige N-Quelle, sogar ein noch besseres Wachstum als mit DCD. Im Gegensatz dazu wies Stamm 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) mit Guanidylharnstoff eine weitaus geringere Bakteriendichte auf, als im gleichen Beobachtungszeitraum mit DCD ermöglicht wurde.

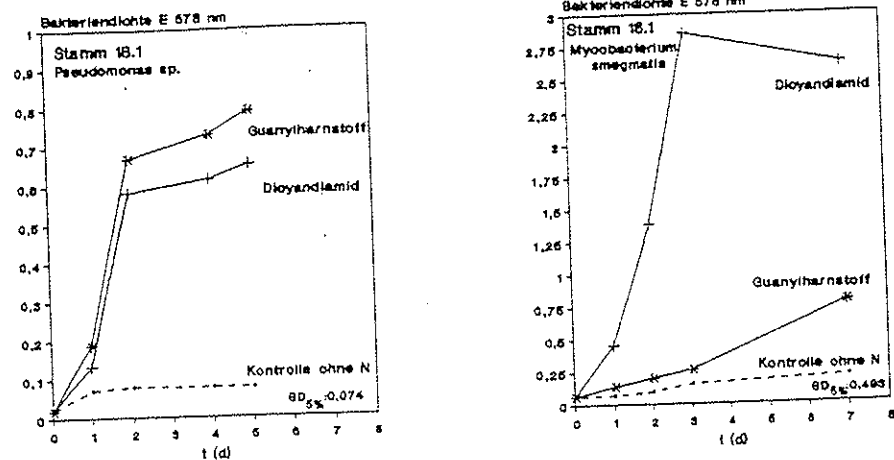


Abbildung 3: Wachstum von Stamm 18.1 (*Pseudomonas* sp.) und Stamm 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) mit Dicyandiamid bzw. Guanylharnstoff (je 200 µg/ml) als alleiniger N-Quelle in Abhängigkeit von der Zeit

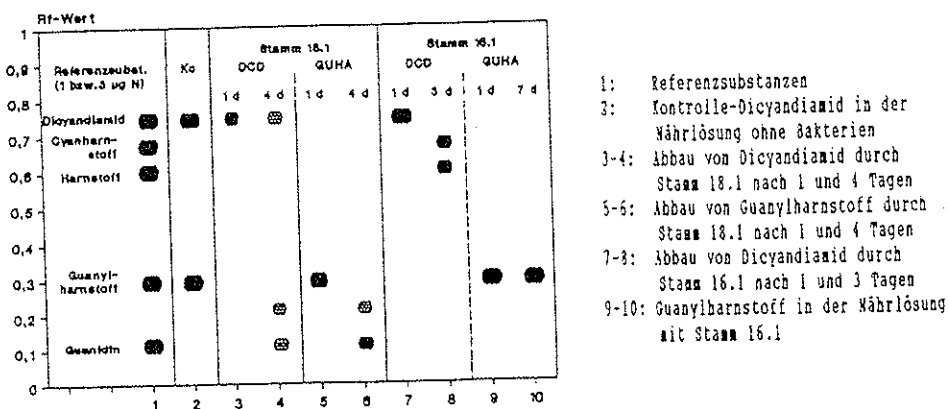


Abbildung 4: Dünnschichtchromatogramm zum Abbau von Dicyandiamid (DCD) und Guanylharnstoff (GUHA) durch die Stämme 18.1 und 16.1

Die dünnschichtchromatographische Auswertung zum Abbau verdeutlichte diese Unterschiede: während Stamm 18.1 Guanylharnstoff innerhalb von 4 Tagen metabolisiert hatte (Abb.4 / 5-6), war durch Stamm 16.1 selbst nach 7 Tagen noch keine Umsetzung feststellbar (Abb.4 / 9-10).

Eine weitere Auffälligkeit zeigte der Vergleich des Abbaus zwischen DCD und Guanylharnstoff: durch diesen Stamm der Gattung *Pseudomonas* wurden aus den beiden Verbindungen offenbar dieselben Zwischenprodukte gebildet (Abb.4 / 3-6). Diese traten in Kulturen mit *Mycobacterium smegmatis* nicht auf (Abb.4 / 7-10). In Kontrollen ohne Bakterien wurde keine der beiden Substanzen abgebaut (Abb.4 / 2).

Die Vermutung, daß zumindest die beiden Stämme 11.1 und 18.1 der Gattung *Pseudomonas* einen Abbauweg über Guanylharnstoff durchführen, konnte bisher nicht durch das Auffinden dieses Metaboliten im Verlauf der DCD-Umsetzung bestätigt werden. Die Annahme, daß für die Bildung von Guanidin aus Guanylharnstoff mikrobielle Prozesse eine Rolle spielen (Vilsmeier, 1980), konnte jedoch untermauert werden.

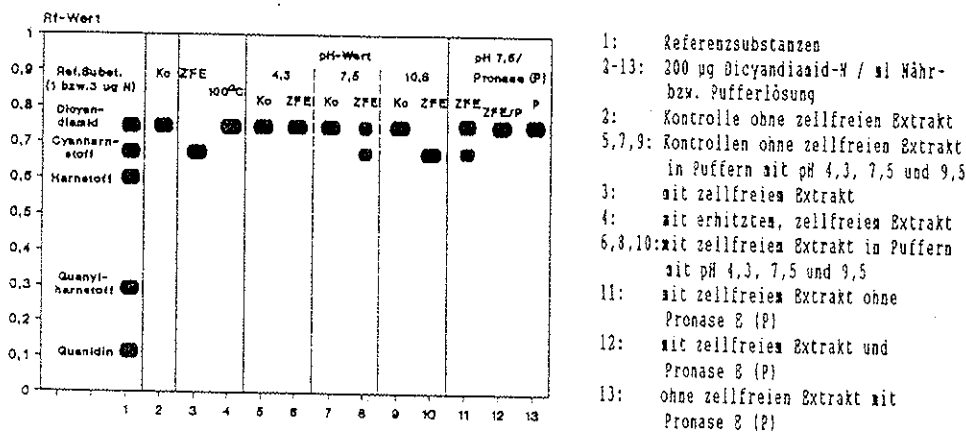


Abbildung 5: Dünnschichtchromatogramm zum Abbauverhalten des zellfreien Extraktes (ZFE) aus Stamm 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*)

Untersuchungen zum Prinzip des DCD-Abbaus, die mit Hilfe von zellfreien Extrakten aus Stamm 16.1 (*Mycobacterium smegmatis*) durchgeführt wurden, zeigten, daß DCD, das diesen Extrakten (wiederholt) zugesetzt wurde, erneut zu einer Substanz mit dem Rf-Wert von Cyanharnstoff metabolisiert werden konnte; diese Eigenschaft war hitzelabil (Abb.5 / 3-4). Die Umsetzung war vom pH-Wert abhängig: ausgehend von einem pH-Wert von 4,3 (kein Ab-

bau) verbesserten sich die Bedingungen mit steigendem pH-Wert bis pH 9,5 (vollständiger Abbau) (Abb.5 / 5-10) im Vergleich zur Kontrolle ohne Extrakt. Wurde der zellfreie Extrakt 7 Tagen lang mit Pronase E inkubiert, so konnte das System des DCD-Abbaus offenbar geschädigt werden; die Bildung von Cyanharnstoff wurde gehemmt (Abb.5 / 11-13).

#### 4. Schlußfolgerung und Zusammenfassung

Dicyandiamid (200 µg N/ml) konnte von Bakterienreinkulturen (isoliert aus Komposten) innerhalb von 3 Tagen abgebaut werden. Untersuchungen zum Metabolismus wiesen auf 2 unterschiedliche Abbauewege hin, von denen zumindest ein Weg gewisse Parallelen zu der im Boden beobachteten Umsetzung zeigte (Guanylharnstoffabbau). Das Abbauprinzip, das mit Hilfe eines zellfreien Extraktes näher untersucht wurde, wies folgende Charakteristika auf:

- hohe Beständigkeit der Abaufähigkeit aber Hitzelabilität
- hohes pH-Optimum der Umsetzungsreaktion
- hohe Beständigkeit gegenüber Proteasen und gute Wasserlöslichkeit

#### 5. Literatur

- Amberger, A., 1984: Wirkung und Einsatzmöglichkeiten des Nitrifikationshemmstoffes Dicyandiamid. VDLUFA-Schriftenreihe, 11, 22-47
- Amberger, A. und Vilsmeier, K., 1979: Dicyandiamidabbau in Quarzsand und Böden. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd., 142, 778-785
- Amberger, A. und Vilsmeier, K., 1988: Untersuchungen zur Auswaschung von Dicyandiamid und dessen Abbau in überstauten Böden. Z. Wasser-Abwasser-Forsch., 21, 140-144
- Hauser, M. und Haselwandter, K., 1990: Degradation of Dicyandiamid by Soil Bacteria. Soil Biol. Biochem., 22, 113-114
- Hickisch, B., Hartbrich, H.J. und Moritz, C., 1987: Der Einfluß von 1-Carbamoyl-3(5)-methylpyrazol (CMP) auf die Nitrifikation und bodenbiologische Kennwerte im Vergleich zu Nitrapyrin (NP) und Dicyandiamid (DCD). Zentralbl. Mikrobiol., 142, 417-430
- Vilsmeier, K., 1980: Dicyandiamidabbau im Boden in Abhängigkeit von der Temperatur. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd., 143, 113-118
- Zacherl, B. und Amberger, A., 1990a: Effect of the nitrification inhibitors Dicyandiamid, Nitrapyrin and Thiourea on *Nitrosomonas europaea*. Fertilizer Research, 22, 37-44
- Zacherl, B. und Amberger, A., 1990b: Effect of nitrification inhibitors on N-fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter chroococcum*. Fertilizer Research, 22, 137-139