

september 2012

rapport 1405

Enzymen als indicator voor bodempkwaliteit

**Naar een snelle, routine-
matige optische bepaling**

M.C. Hanegraaf (NMI)

J.J.F. van Veen (TNO)

M.J.G. de Haas (NMI)

D.W. Bussink (NMI)

nutriënten management instituut nmi bv
postbus 250
6700 ag wageningen
binnenhaven 5
6709 pd wageningen
tel. (088) 876 1280
e-mail nmi@nmi-agro.nl
internet www.nmi-agro.nl

© 2014 Wageningen, Nutriënten Management Instituut NMI B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit de inhoud mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, op welke wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de directie van Nutriënten Management Instituut NMI.

Rapporten van NMI dienen in eerste instantie ter informatie van de opdrachtgever. Over uitgebrachte rapporten, of delen daarvan, mag door de opdrachtgever slechts met vermelding van de naam van NMI worden gepubliceerd. Ieder ander gebruik (daaronder begrepen reclame-uitingen en integrale publicatie van uitgebrachte rapporten) is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van NMI.

Disclaimer

Nutriënten Management Instituut NMI stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen voortvloeiend uit het gebruik van door of namens NMI verstrekte onderzoeksresultaten en/of adviezen.

Verspreiding

Inhoud

	pagina
Samenvatting en conclusies	3
1 Inleiding	7
1.1 Probleemstelling en Kennisvraag	7
1.2 Doelstelling en werkwijze	8
2 State of the art	11
2.1 Enzymactiviteit in grond	11
2.1.1 Werking van enzymen	11
2.1.2 Aanwezigheid van enzymen in grond	12
2.1.3 Rol van enzymen bij kringlopen in de bodem.	12
2.2 Meetprotocollen	18
2.2.1 Monsternamen en seizoensvariatie	18
2.2.2 Analysemethoden	19
2.3 Enzymgroepen	22
2.3.1 Cellulasen	22
2.3.2 Proteasen	23
2.3.3 Dehydrogenasen	24
2.3.4 Ureasen	24
2.3.5 NAGase	24
2.3.6 Nitrogenasen	24
2.3.7 Fosfatasen	25
2.3.8 Arylsulfatasen	26
2.4 Indicator of index voor bodemkwaliteit?	27
3 Betekenis voor de landbouw	33
3.1 Rotatie en Bouwplan	33
3.1.1 Grasland	33
3.1.2 Maïsland	33
3.2 Effecten van landbouwkundige maatregelen	34
3.2.1 Bemesting	34
3.2.2 Bodembewerking	35
3.2.3 Bestrijdingsmiddelen	36
4 Toetsing Optische meetmethode	37
4.1 Principe	37
4.2 Proefopzet	37
4.3 Resultaten	40
4.3.1 Optische methode	40
4.3.2 Landbouwkundig grondonderzoek	41
4.3.3 Verband enzymactiviteit met grond- en/of gewassenmerken	42
4.4 Discussie	42
5 Conclusie en aanbevelingen	47
Bronnen	49

Samenvatting en conclusies

Het landbouwkundig handelen is van grote invloed op de bodemkwaliteit, bijvoorbeeld wat betreft het beschikbaar komen van mineralen en de opbouw van organische stof. De aandacht voor de bodemkwaliteit is in de melkveehouderij groeiende, en daarbij is sprake van een groeiende vraag naar nieuwe en betere meetmethoden en daarop gebaseerde adviezen. Vanuit de wetenschap is veel kennis beschikbaar over de rol die bodemenzymen kunnen spelen bij de bodemkwaliteit, in het bijzonder het beschikbaar komen van mineralen. Als melkveehouders zouden kunnen beschikken over een bemestingsadvies op basis van een enzymmeting, dan hebben zij een nieuwe ingang om de ruwvoerproductie op peil te houden.

Om te komen tot nieuwe adviezen voor bodem- en mineralenmanagement dient op twee punten een slag te worden gemaakt, namelijk wat betreft de ontwikkeling van a) meetmethode en b) landbouwkundig advies. Een in dit verband perspectiefvolle meetmethode is de optische meting die door TNO-Zeist is ontwikkeld voor gebruik in de voedingsmiddelenindustrie. Het Productschap Zuivel heeft aan NMI gevraagd om in samenwerking met TNO-Zeist een verkennende studie uit te voeren naar de betekenis van bodemenzymen voor de melkveehouderij en het perspectief van de optische meetmethode als snelle en betrouwbare meting. In dit rapport wordt van deze verkenning verslag gedaan.

Literatuuronderzoek

Chemisch gezien berust de werking van enzymen op een rol als katalysator van biochemische reacties; bij een katalytische reactie verandert het enzym zelf niet. Enzymreacties in grond worden uitgedrukt met de Michaelis-Menten vergelijking, gekenmerkt door de parameters Michaelis constante (K_m) en enzymactiviteit (V_m). Er zijn geen kinetische modellen beschikbaar voor enzymreacties in grond die rekenen met meerdere enzymen en/of substraten. Enzymreacties kunnen worden belemmerd door remstoffen ('inhibitors') of door het ontbreken van een zogenoemde co-factor.

De totale enzymniveaus in grond worden vooral bepaald door het bodemvoedselweb (samenstelling en activiteit) en de aanwezige organische stof (hoeveelheid en kwaliteit). In grond vindt continu nieuwe aanmaak van enzymen plaats, die vervolgens worden opgeslagen in cellen van organismen of extracellulair in de grond aanwezig zijn. In het laatste geval zijn ze onderhevig aan processen als verdunning in de bodemoplossing, binding aan het klei-humuscomplex (adsorptie), denaturatie en/of afbraak.

Relevant voor de landbouw is de betrokkenheid van enzymen bij onder andere de koolstof (C)-, stikstof (N)-, fosfaat (P)-, en zwavel (S)-cyclus in grond en bij de opbouw van een goede bodemstructuur. Ook kunnen enzymen worden beschouwd als een maat voor de bodembiodiversiteit. Belangrijk verschil tussen enzymmetingen en metingen van de bodembiodiversiteit is dat laatstgenoemde op de korte termijn (weken) sterk kan wisselen en enzymmetingen veelal een afspiegeling zijn van een door de tijd heen (jaren) opgebouwde bodemkwaliteit.

Er is nog geen bemonsteringsprotocol beschikbaar voor het nemen van grondmonsters in landbouwpercelen, specifiek ten behoeve van metingen aan bodemenzymen. Een dergelijk protocol moet onder andere aangeven wanneer en hoe vaak moet worden bemonsterd, hoeveel submonsters benodigd zijn per perceel en wat de bewaarcondities zijn tot aan de analyse. Verschillende onderzoekers vonden dat enzymdata van aan

de lucht gedroogde grondmonsters goed correleerden met data verkregen van grond onder veldvochtige condities. Dit is veelbelovend voor de ontwikkeling van snelle, routinematige meetmethoden die gebaseerd zijn op gedroogde grondmonsters. Het huidige protocol voor standaard grondonderzoek lijkt bruikbaar voor de monsternamen ten behoeve van enzymmetingen in grond.

Veelgebruikte klassieke enzymbepalingen zijn fluorescente en colorimetrische assays. Kenmerkende aspecten hiervan zijn het toedienen van substraat, een incubatieduur van enkele uren, het bufferen van de pH en/of het gebruik van remstoffen. Bij de interpretatie van meetresultaten dient onder andere rekening te worden gehouden met een mogelijke remming van de reactie door aanwezigheid van het eindproduct bij de meetopstelling, en met mogelijke bescherming van enzymen door bodemdeeltjes waardoor ze langer actief kunnen zijn dan in de veldsituatie.

In het bodemkundig onderzoek gaat tegenwoordig veel aandacht uit naar het vaststellen van de bodemkwaliteit door het meten van een speciaal samengestelde set van indicatoren in plaats van een reeks individueel te interpreteren parameters. Deze set zou naast biologische, ook chemische en fysische indicatoren moeten bevatten, waarvoor in beginsel het standaard grondonderzoek kan worden gebruikt. Over de samenstelling van een dergelijke set bestaat nog geen consensus, wel over de eisen waaraan de set en de afzonderlijke indicatoren moeten voldoen. Ook zijn verschillende statistische technieken beschikbaar voor de verwerking en interpretatie van meetresultaten.

Een groot aantal bodemenzymen is relevant voor de bodemkwaliteit en de gewasproductie. In grasland gaat het bijvoorbeeld om enzymen die een rol spelen bij de stikstofkringloop, zoals urease, protease en, bij grasklaver, nitrogenase. Meer kennis over de indicatorfunctie en de onderlinge verhoudingen van deze enzymen kan tot verbetering van de stikstofbenutting leiden. In maïsland spelen fosfatases een rol bij het beschikbaar maken van fosfaat uit de organische stof. Fosfatases kunnen verschillen in oorsprong (microbieel gevormd of als wortelxudaat van maïs en/of groenbemester) en zuurgraad (basisch of zuur). Hoewel het huidige P-advies uitgaat van anorganisch fosfaat, zal het belang van P-mineralisatie uit organische stof in de advisering waarschijnlijk toenemen. Zowel voor de beschikbaarheid van N als van P wordt het zinvol geacht om meer onderzoek te doen naar bodemenzymen.

Landbouwkundige maatregelen die de enzymstatus van een grond beïnvloeden zijn, voor een gegeven rotatie of bouwplan, in te delen in bemesting, bodembewerking en bestrijdingsmiddelen. Hiervan bieden vooral de bemesting en de bodembewerking aanknopingspunten om gericht te sturen. Uit de literatuur zijn veel onderzoeksresultaten beschikbaar van maatregelen / behandelingen met positieve effecten op de enzymactiviteit. Het betreft echter geen kennis die klaar is voor communicatie naar de praktijk. Hiervoor is praktijkonderzoek in de Nederlandse situatie gewenst.

Perspectief optische meetmethode

Het principe van de TNO-methode berust op een biopolymeer (enzym-specifiek vernet substraat) met een fluorescent label. Dit biopolymeer wordt verwerkt in een coating op stickers die in kleine glazen flesjes kunnen worden aangebracht. Als de coating in contact komt met extracellulaire enzymen, dan wordt het biopolymeer afgebroken. De enzymactiviteit kan worden bepaald door deze afbraak gedurende enkele uren te meten, waarbij een lage meetwaarde staat voor een hoge enzymactiviteit. Kenmerkend voor de methode is dat de meting niet-invasief en semi-kwantitatief is, en relatief weinig tijd kost en routinematig kan worden uitgevoerd.

Dit maakt dat de methode perspectief biedt voor toepassing in landbouwkundig grondonderzoek.

Voor een eerste toetsing is de methode toegepast bij een serie van acht bodemmonsters van zowel gras- als maïspancelen. Het doel van de toetsing was tweeledig: 1) testen of de technologie tot meetbare resultaten leidt in landbouwgrond, en 2) verkennen of de range van de meetresultaten een voor de landbouw zinvol onderscheid in bodemkenmerken mogelijk maakt. De toetsing van de optische meetmethode is uitgevoerd met de huidige uitvoering van de door TNO-Zeist ontwikkelde methode, die uitgaat van protease als testenzym en gecrosslinked (vernet) caseïne als substraat. Zowel testenzym als substraat worden ook in het klassieke enzymbepalingen voor grondonderzoek gebruikt.

De resultaten van de proefnemingen lieten zien dat de methode in principe technisch uitvoerbaar is in grond en dat de bandbreedte van de gemeten enzymactiviteit overeenkomt met die in grond. Er is echter sprake van een aantal knelpunten, waaronder de vraag of de gronddeeltjes in een geroerde grond suspensie de coating kunnen aantasten. Met de methode kan een brede range aan bodemenzymen worden gemeten, maar dit vraagt wellicht om aanpassingen in de coating. Deze en andere vragen verdienen nader aandacht. Wat betreft een mogelijke landbouwkundige betekenis van de meetresultaten zijn de bevindingen hoopgevend. Een aanwijzing hiervoor is het feit dat de hoogste protease activiteit werd gevonden in een grasperceel met een vijfjarige zode (de hoog productieve fase) en dat zowel in jonger als ouder grasland een lagere activiteit werd gemeten. Ook bleek uit een vergelijking van gegevens over de N-mineralisatie in de betrokken percelen en de protease activiteit dat er mogelijk tussen beide een verband bestaat. Een uitgebreide dataset is nodig om deze aanwijzingen nader te onderzoeken.

De bevindingen uit het literatuuronderzoek en de toetsing van de optische meetmethode bevestigen de veronderstelling dat de ontwikkeling van nieuwe adviesproducten op basis van een optische meting van de activiteit van bodemenzymen zinvol en mogelijk is. Zowel wat betreft de meting als de interpretatie van meetresultaten is aanvullend onderzoek nodig. Slotaanbeveling van deze verkenning is om een vervolgonderzoek te starten waarin beide aspecten aandacht krijgen. Concreet zou dit onderzoek zich kunnen richten op het verband tussen protease en N-mineralisatie in grasland en/of fosfatasen en de P-opname in maïspancelen.

1 Inleiding

1.1 *Probleemstelling en Kennisvraag*

Het belang van een goede bodemkwaliteit voor de landbouwkundige productie is het laatste decennium sterk toegenomen. Het begrip bodemkwaliteit kent vele aspecten en heeft, ook in een puur landbouwkundige context, nog geen eenduidige karakterisering. Een definitie van bodemkwaliteit is "Het vermogen van de bodem om, binnen de grenzen van het ecosysteem te functioneren" (Karlen et al., 1997; Trasar-Cepeda et al., 2000). Handhaven van een goede bodemkwaliteit is belangrijk voor het realiseren, ook op de langere termijn, van goede opbrengsten en een goede waterhuishouding bij een beperkt gebruik van meststoffen. De bodemkwaliteit wordt voor een deel bepaald door de oorsprong van het bodemmateriaal (minerale en organische delen), de vroegere bodemvormende processen en het historisch grondgebruik. Het verloop van lopende processen in de bodem is afhankelijk van abiotische omstandigheden, zoals pH, temperatuur, zuurstof- en vochtgehalte, de aanwezige organische stof (kwantiteit en kwaliteit) en het bodemleven. Laatstgenoemde vervult een essentiële rol in afzonderlijke processen zoals structuurstabiliteit, mineralisatie en ziektevering, en in het sluiten van kringlopen van onder andere koolstof (C), stikstof (N) en zwavel (S). Het doet dit door energie te halen uit afbraak van organische stof (ademhaling), een proces waarvoor enzymen worden gevormd (Dick & Tabatabai, 1984).

Het landbouwkundig handelen (grondbewerking, grasland scheuren, wisselbouw, de stikstofbemesting, ontwatering, etc.) is van grote invloed op de bodemkwaliteit, bijvoorbeeld wat betreft het beschikbaar komen van mineralen en de organische stof dynamiek. Voor een scherpe bemestingsadviesing is het echter niet voldoende om alleen naar totaalgehalten van mineralen en organische stof te kijken om te weten hoeveel een bodem kan leveren en of er sprake is van evenwicht situatie. Veranderingen in deze gehalten worden soms pas na jaren meetbaar, terwijl er in de actuele situatie sprake kan zijn van een tekort aan voedingsstoffen voor een optimale gewasopbrengst. Als mogelijke oplossingsrichting wordt gedacht aan het meenemen van de biologische bodemkwaliteit in de bemestingsadviesing. Een gedetailleerde analyse van de bodembiodiversiteit omvat veel parameters, die veelal in veldvochtige grond moeten worden gemeten, met een veelal arbeidsintensieve en tijdrovende bepaling. Als gevolg hiervan komen de resultaten laat en tegen hoge kosten beschikbaar. Al enkele decennia is bekend dat bodemenzymen een directe expressie zijn van de micro-organismen in grond en hun metabolisme (Caldwell, 2005), waaruit informatie kan worden afgeleid over de nutriëntenbeschikbaarheid, organische stof dynamiek en bodemweerbaarheid. Er kunnen veel verschillende enzymen in de bodem aanwezig zijn, waarvan een aantal kandidaat is om als indicator te dienen. De laatste tijd is de aandacht voor bodemenzymen als indicator voor bodemkwaliteit toegenomen.

Hier zijn drie redenen voor:

- Toegenomen belang van de bodemkwaliteit, in het kader van lagere mestgiften en duurzame teelt;
- Opkomende precisiebemesting en spuittechnieken om beter om te gaan met de heterogeniteit binnen percelen, en
- Nieuwe technologieën met nieuwe perspectieven voor een kosteneffectieve, routinematige bepaling van bodemenzymen.

Als men enzymactiviteiten kan meten en sturen, hebben melkveehouders een nieuwe ingang om de bodemkwaliteit en daarmee de ruwvoerproductie op peil te houden en/of te verhogen. Daarvoor dient op deze

twee punten een slag te worden gemaakt. Ten eerste dient een betrouwbare en kosteneffectieve meetmethode beschikbaar te zijn, en ten tweede is nodig om de meetgegevens te kunnen interpreteren in termen van een landbouwkundig advies. In dit rapport wordt verslag gedaan van een verkenning die is gericht op enerzijds het inventariseren van mogelijkheden om enzymen te benutten voor adviezen voor bemesting en/of bodembeheer, en anderzijds op het toetsen van een perspectiefvolle, snelle en goedkope techniek voor het meten van enzymactiviteiten.

1.2 Doelstelling en werkwijze

Doelstelling

Doelstelling van dit onderzoek is het verkennen van de opties om een adviesproduct te ontwikkelen op basis van metingen van de enzymactiviteit door:

- na te gaan in hoeverre meetgegevens van enzymactiviteiten kunnen dienen als basis van adviezen voor het in stand houden / verbeteren van de bodemkwaliteit, in het bijzonder de nutriëntenlevering; en
- vast te stellen of een bestaande snelle meettechniek uit de life-science en voedingsmiddelen industrie ook geschikt te maken is voor toepassing in het landbouwkundig bodemonderzoek.

Het beoogde resultaat van de verkenning is een antwoord op de vraag of er perspectief is voor het ontwikkelen van een praktische methode voor enzymmetingen als indicator voor bodemkwaliteit in de landbouw. Of er perspectief is hangt af van zowel de landbouwkundige bruikbaarheid als de technische meetmogelijkheden. Verschillende aspecten dienen te worden meegewogen. Belangrijke kennisvragen zijn welke enzymen de meeste informatie geven, of de technologie werkzaam is in grondmonsters, en of uit de meetgegevens nieuwe inzichten voor landbouwkundige adviezen kunnen worden afgeleid. Op basis van de resultaten over deze aspecten kan beoordeeld worden of vervolg onderzoek zinvol is, welke partijen daarbij betrokken dienen te worden en op welke termijn een praktijkadvies beschikbaar kan komen. Bij goede resultaten van deze verkenning zal de meettechniek opgenomen kunnen worden in een formeel R&D-traject voor routinematig bodemonderzoek.

Het belang van het thema 'enzymen in grond' is voor de melkveehouderij is een nieuwe analysemethodiek met daaraan gekoppeld adviezen voor:

- 1) *Nutriëntenbeschikbaarheid*. Een hoge enzymactiviteit kan erop duiden dat nutriënten gemakkelijker beschikbaar komen door mineralisatie. Naast stikstof en fosfaat kan hierbij ook worden gedacht aan zwavel en spoorelementen.
- 2) *Handhaven / verbeteren bodemkwaliteit*. Een goede bodemkwaliteit is randvoorwaarde om optimaal te produceren. Het beoordelen van de bodemkwaliteit en het snel kunnen vast stellen of de bodem veranderd, zoals teruggang in organische stof (kwaliteit), is daarbij van groot belang om tijdig bij te sturen.

Werkwijze en verslaglegging

Als eerste is verslag gedaan van een literatuurstudie naar de mogelijke betekenis van enzymen voor de bodemkwaliteit in een landbouwkundige context (Hoofdstuk 2). Hierbij is de werking van enzymen in kaart gebracht, waarna is nagegaan bij welke aspecten van bodemkwaliteit enzymen een rol spelen. Na een beschrijving van de huidige klassieke meetmethoden zijn enkele belangrijke enzymgroepen beknopt

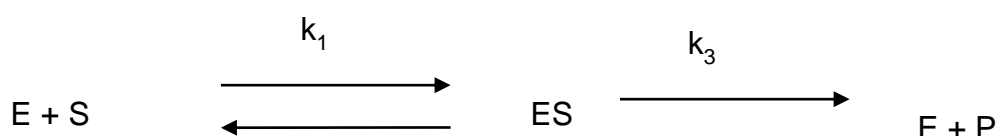
beschreven. Vervolgens wordt de betekenis van enzymmetingen voor de landbouw, met name de gras- en maïsproductie aangegeven (Hoofdstuk 3) en is nagegaan hoe landbouwkundige handelingen de enzymstatus van een grond beïnvloeden. Als tweede wordt verslag gedaan van het verkennend praktijkonderzoek met de door TNO-Zeist ontwikkelde meetmethode (Hoofdstuk 4) op basis van het enzym protease, dat in gronden aanwezig kan zijn. Om het succes van de meetmethode goed in beeld te brengen is een kleine, maar brede selectie gemaakt van te bemonsteren percelen. Opzet, uitvoering en resultaten van de toetsing worden besproken in termen van technische uitvoering en landbouwkundige betekenis. Tot slot zijn uit de verzamelde informatie worden conclusies getrokken over de mogelijkheden om uit meetresultaten van enzymen een landbouwkundig advies af te leiden, en hiervoor de TNO-meetmethode te gebruiken (Hoofdstuk 5).

2 State of the art

2.1 Enzymactiviteit in grond

2.1.1 Werking van enzymen

Chemisch gezien berust de werking van enzymen op een rol als katalysator van biochemische reacties, door verlaging van de startbehoefte aan energie. Bij een katalytische reactie verandert het enzym dus zelf niet. De snelheid (K) van de totale reactie is de resultante van verschillende deelreacties met snelheid (k). In grond worden kinetische data van enzymreacties berekend met de Michaelis-Menten vergelijking (Tabatabai & Dick, 2002):



De MM-vergelijking is opgebouwd uit de twee stappen. Het enzym (E) bindt aan een substraat (S) zodat een enzym-substraat (ES) complex ontstaat. Deze reactie is omkeerbaar. In de tweede stap wordt het complex omgezet in een product (P) en het enzym (E); deze stap is onomkeerbaar. De drie reacties worden gekenmerkt met de specifieke snelheidsparameters k_1 , k_2 en k_3 . De totale enzymconcentratie wordt uitgedrukt als de som van het 'vrije' enzym en het deel dat is gebonden aan het substraat. De beperkende stap in de omzetting is die waarin het product wordt gevormd (k_3). Het feitelijke resultaat van een reactie (snelheid en hoeveelheid eindproduct) is uiteraard onderhevig aan omgevingsfactoren. De snelheidsparameter over de gehele reactie wordt de Michaelis constante genoemd (K_m) en de enzymactiviteit wordt weergegeven met (V_m). Dit zijn de twee belangrijkste kengetallen voor een enzymgestuurde reactie, specifiek voor een enzym (Tabatabai & Bremner, 1971). Een kenmerk van enzymreacties is dat, bij toenemende concentratie van het substraat, de snelheid zich eerst volgens een 1^e order vergelijking gedraagt, dan afneemt per eenheid substraat en uiteindelijk met een lineaire relatie (zero-order) kan worden beschreven. De maximale snelheid van de reactie (V_{max}) is ontstaan wanneer de enzymconcentratie geheel in de vorm van enzymsubstraat aanwezig is. In deze toestand is het enzym verzadigd met substraat en geldt het zero-order verband. Bij het bepalen van K_m dient uiteraard voldoende substraat aanwezig te zijn. Een praktische definitie van K_m is 'de substraatconcentratie bij halve maximum snelheid'. Hoe kleine K_m , hoe groter de affiniteit van het enzym voor het substraat.

De MM-vergelijking brengt de reactie van steeds één enzym met één substraat in beeld. Kinetische modellen voor enzymreacties in grond die rekenen met meerdere enzymen en/of substraten zijn niet beschikbaar. In de praktijk komt het voor dat een reactie wordt belemmerd door de aanwezigheid van één of meer remstoffen (Engels: *inhibitors*). Voorbeeld van een remstof is inorganisch fosfaat, dat de activiteit van fosfatase vermindert. Men gaat ervan uit dat de remstof een dusdanig effect heeft op de reactie, dat deze als een lineaire reactie (zero-order) kan worden gezien.

Sommige enzymen hebben een co-factor nodig om hun activiteit te kunnen uitoefenen. Dit is bijvoorbeeld het geval bij nitrogenase, dat actief is bij de biologische N-binding. Nitrogenase bevat zowel een ijzer (Fe)-eiwit als een ijzer-molybdeen (FeMo) eiwit als co-factor; nitrogenasen met als co-factor Vanadium (Va) of alleen ijzer zijn ook mogelijk, maar minder effectief (Newton, 2007; Bothe, 1983). De aanwezige concentratie van de

co-factor is bepalend voor de activiteit van nitrogenase, reden waarom voor sommige gronden met lage MO-gehalten een bemesting met molybdeen wordt geadviseerd.

De naamgeving van enzymen werd traditioneel bepaald door de uitgang –ase te geven aan het substraat dat door het enzym werd omgezet. Bijvoorbeeld de naam urease: deze betekent dat urea wordt omgezet in koolstofdioxide en water. Niet alle enzymen werd echter op deze manier een naam gegeven. Daarom heeft in 1964 de internationale Enzym Commissie een classificatie ontwikkeld die nog steeds wordt bijgehouden en aangepast (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

2.1.2 Aanwezigheid van enzymen in grond

Enzymen worden behalve door micro-organismen ook afgescheiden door hogere planten en dieren (Figuur 2.1). Dit is een evolutionair proces geweest, waarbij succesvolle soorten bijvoorbeeld de capaciteit hebben ontwikkeld om enzymen uit te scheiden om de beschikbaarheid van nutriënten te verhogen. Bekend voorbeeld hiervan is de adaptatie aan P-arme omstandigheden door fosfatasen uit te scheiden (Baldwin et al., 2001). In een review suggereren Speir & Ross (1978) dat veruit het grootste deel van de enzymen in grond afkomstig is van micro-organismen en veel minder dan hogere planten en dieren. Als redenen worden de grote biomassa van micro-organismen, de hogere metabolische activiteit en uitscheiding van een relatief grote hoeveelheid extracellulaire enzymen genoemd.

Het totale enzymniveau in grond worden vooral bepaald door de aanwezige organische stof (hoeveelheid en kwaliteit), het bodemvoedselweb (samenstelling en activiteit), en de intensiteit van de biologische processen (Stevenson, 1986). In de grond vindt continu nieuwe aanmaak van enzymen plaats, die vervolgens worden opgeslagen in cellen, gebonden aan het klei-humuscomplex, gedeactiveerd en/of afgebroken (Tabatabai, 1994; Dick, 1994).

Een belangrijk onderscheid voor de bescherming van enzymen is of het enzym zich binnen of buiten levende cellen van micro-organismen bevindt. Extracellulaire enzymen kunnen aanwezig zijn in de bodemoplossing of gebonden en geïmmobiliseerd aan het klei/humuscomplex in de grond. Eenmaal uitgescheiden door organismen zijn ze onderhevig aan denaturatie, afbraak, adsorptie en verdunning. De ophoping van enzymen in grond kan echter zo groot en langdurig zijn dat een relatie met de actuele samenstelling van het bodemvoedselweb niet meer bestaat (Tabatabai & Dick, 2002). Zowel minerale als organische bodembestanddelen kunnen enzymen beschermen tegen afbraak.

2.1.3 Rol van enzymen bij kringlopen in de bodem.

Algemeen

Extracellulaire enzymen in grond katalyseren niet alleen de afbraak van plantaardige, dierlijke en microbiële macromoleculen, maar ook van veel milieuvreemde vervuilende stoffen. De hydrolasen vormen hiervan verreweg de grootste groep. Hydrolasen hebben geen co-factor nodig voor hun werking. Ze worden door micro-organismen uitgescheiden om organische polymerische substraten te kunnen afbreken (Tabatabai & Dick, 2002). Bij de afbraak van deze (onoplosbare) polymeren (cellulose, proteïnen, chitine) zijn vaak extracellulaire enzymen betrokken, die de complexe moleculen afbreken in eenvoudiger moleculen, zoals suikers, aminozuren, ammonium NH_4^+ en fosfaat PO_4^{3-} (Geisseler & Horwath, 2009). Bij de afbraak van de

meest algemene plantaardige polymeren, cellulose en lignine, is een reeks enzymen betrokken die gelijktijdig of in serie actief zijn. Het is waarschijnlijk dat voor de gehele afbraak van een blad tot C meer dan 50 enzymen nodig zijn (Burns & Wallenstein, 2010). Hoewel hydrolasen uit meerdere subunits bestaan, zijn het relatief eenvoudige en kleine enzymen, die redelijk goed bestand zijn tegen denaturatie door factoren als hoge temperatuur en uitdroging. In principe worden ze snel afgebroken door proteasen, maar er zijn verschillende chemisch-fysische mechanismen in grond die dit verhinderen. Eenmaal in de grond, kunnen ze hierdoor lang actief blijven.

Bodemorganismen scheiden soms enzymen uit als een mechanisme om substraat te detecteren. Blijkt het substraat aanwezig, dan geeft het enzym signaalmoleculen af die het organisme inzien dat een grotere enzymproductie gewenst is. Wanneer geen substraat aanwezig is, dan kan ophoping van de enzymen plaatsvinden, in afwachting van voor het organisme betere tijden. Complicerende factor is dat, als op enig moment wel substraat beschikbaar komt, het nog steeds afhangt van de correcte combinatie van enzymen en in de juiste volgorde om de katalyse te doen plaatsvinden (Burns & Wallenstein, 2010).

Koolstof (C) cyclus

Bij de organische stof dynamiek in grond spelen vele enzymen een rol. Enkele voorbeelden van enzymen die de mineralisatie van C katalyseren zijn cellulase, waaronder β -glucosidase, dehydrogenase, amylase en protease (Tabel 2.1). De activiteit van deze enzymen beperkt zich niet tot de dode organische stof in de grond. Ze hebben ook effect op de groei van micro-organismen en dragen zo ook bij aan de bodemgezondheid (Makoi & Ndakidemi, 2008). De activiteit van enzymen op de C-cyclus is afhankelijk van omgevingsfactoren (pH, temperatuur, water en zuurstof gehalten, plaats in bodemprofiel) en van de kwaliteit van het substraat (soort organische stof).

Tabel 2.1. Voorbeelden van specifieke activiteiten van bodemenzymen en beschikbare meetmethoden voor de C-, N- en P-kringloop in de bodem (bron: Caldwell, 2005).

Nutrient	Form	Compound	Enzyme	Examples
<i>Carbon</i>	Polysaccharide	Cellulose	Endo-cellulase	Deng and Tabatabai (1994)
			β -Glucosidase	Eivazi and Tabatabai (1988)
		β (1-3) glucan	β (1-3) glucanase	Lethbridge et al. (1978)
		Hemicellulose	Xylanase	Speir et al. (1984)
		Chitin	Endo-chitinase	Rodriguez-Kabana et al. (1983)
		Starch	<i>N</i> -acetylglucosaminidase Amylase	Parham and Deng (2000) Pancholy and Rice (1973)
	Aromatic	Lignin	Phenoloxidase Peroxidase Mn-peroxidase	Sinsabaugh et al. (1992) Sinsabaugh et al. (1992) Criquet et al. (2000)
	Aliphatic	Fatty acid esters	Lipase	Morgan and Cooper (1981)
<i>Nitrogen</i>	Peptide	Protein	Endo-protease	Ladd and Butler (1972), Garcia et al. (1994)
		Peptides	Aminopeptidase Carboxypeptidase	Saiya-Cork et al. (2002) Ladd and Butler (1972)
	Non-peptide	Primary amine	Amidase	Frankenberger and Tabatabai (1980), Dodor and Tabatabai (2003)
			Urease (Adenosine) deaminase (Aryl) deaminase	Sinsabaugh et al. (2000) Sato et al. (1986) Killham and Rashid (1986)
<i>Phosphorus</i>	Diester		Phosphodiesterase DNAase, RNAase	Sparling et al. (1986) Frankenberger et al. (1986)
			Phosphomonoesterase	Eivazi and Tabatabai (1977), Sparling et al. (1986)
	Monoester		Phytase	Svenson (1986)

		Enzymatic activity in soil						Endocellular enzymes of proliferating microorganisms, plant roots, soil fauna
		Abiotic enzymes					Continuously released extracellular enzymes	
Origin		Accumulated enzymes				From microorganisms		
		Bound to microbial cellular components			Not associated with cellular components			
		Location in soil	IN NON-PROLIFERATING CELLS	In intact dead cells	In cellular fragments	Originating from microorganisms and soil fauna		
Endocellular enzymes from disrupted cells	Extra-cellular enzymes					IN ORGANISMS		
In liquid phase								
BOUND TO SOIL COMPONENTS								

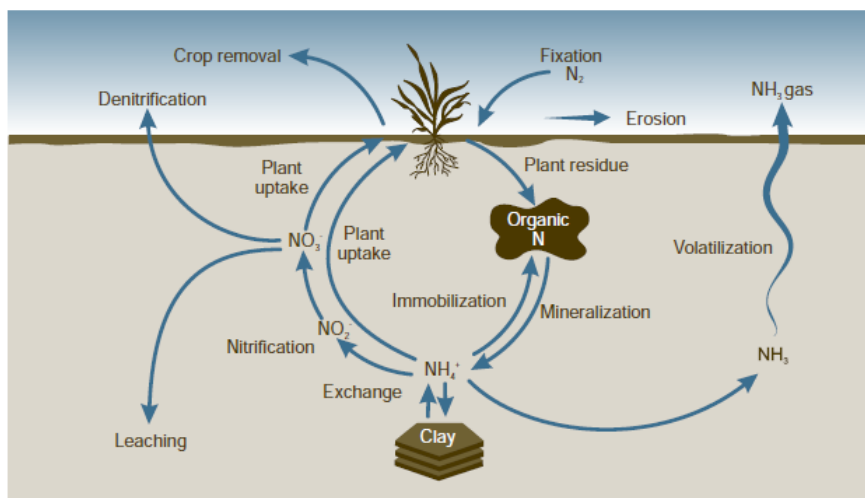
Figuur 2.1 Schema van enzymactiviteit (Tabatabai & Dick, 2002).

Geisseler & Horwat (2009) toonden aan dat de activiteit van cellulase en protease afhankelijk is van de kwaliteit van de organische stof. Zij vonden dat een toename in substraat (in dit geval: organische stof) leidde tot meer enzymactiviteit, afbraak van organische stof en N-omzettingen. Gaandeweg het proces werd de kwaliteit (uitgedrukt met de C/N-ratio) van het organische materiaal echter belangrijker. Organisch materiaal met een hoge C/N-ratio werd langzamer afgebroken dan materiaal met een lage C/N-ratio. Verschillende auteurs noemen een lage enzymactiviteit als mogelijk limiterende stap in het microbiel aangestuurd decompositieproces (Sinsabaugh, 1994; Schimel & Weintraub, 2003). Dit is mogelijk een verklaring voor het in de landbouw bekende ervaringsfeit dat er wel stikstof in de bodem aanwezig is, maar niet beschikbaar komt voor opname door het gewas.

Meer kennis van enzymactiviteit bij de C-cyclus in grond kan helpen om de variabiliteit in de C- en N-dynamiek in de bodem te begrijpen en te voorspellen. Daarmee kan beter dan voorheen worden gestuurd op evenwicht in de organische stofbalans (onder andere in maïspercelen), bodemgezondheid en koolstofvastlegging. Verwacht wordt dat deze kennis ook zal kunnen leiden tot een beter begrip van zowel achterblijvende N-levering als het zogenaamde 'priming-effect' (toevoeging van een kleine hoeveelheid substraat leidt tot meer dan evenredige vergroting van de mineralisatie).

Stikstof (N) cyclus

Een belangrijke fase in de N-cyclus in grond is de N-levering, waarbij verschillende enzymen een rol spelen. Voorbeelden zijn ureasen en nitrogenasen; ook C-gerelateerde enzymen als proteasen beïnvloeden de beschikbaarheid van N voor het gewas (Tabel 2.1). Het effect van ureasen op de stikstoflevering kan heel sterk zijn en leiden tot een direct verband met de aardappelopbrengst (He et al., 2010). De N-voorraad in de bodem kan worden aangevuld met biologische N-binding door vlinderbloemigen. Verantwoordelijk voor de N-binding is de bacterie *Rhizobium* die in de wortelknolletjes van klaver leeft en het enzym nitrogenase uitscheidt om luchtstikstof N_2 te kunnen binden. De symbiose tussen klaver en bacterie krijgt vorm door uitwisseling van N tegen C (glucose, uit de klaver). Veel praktische kennis is beschikbaar over de teelt en de voederwaarde van grasklaver, maar over het beïnvloeden van de activiteit van nitrogenase nauwelijks. Dit geldt in zekere zin ook voor de N-verliezen in de vorm van lachgas en nitraat. Deze stoffen komen vrij bij respectievelijk denitrificatie en nitrificatie van N in de bodem (Figuur 2.2). Ook deze bodemprocessen worden mede gereguleerd door de aanwezigheid van bodemenzymen (Kraft et al., 2011).



Figuur 2.2. Schematische voorstelling van de N-kringloop in de bodem.

Meer kennis over de enzymactiviteit in de verschillende bodem-N processen kan helpen om beter te kunnen sturen op een hogere benutting door het gewas van zowel organische als kunstmest-N en op het verminderen van N-verliezen uit de bodem. Aangezien de teelt van grasklaver tegenwoordig veel in de gangbare melkveehouderij wordt toegepast, is onderzoek zinvol naar de activiteit van nitrogenase, met name wat betreft landbouwkundige sturingsmogelijkheden.

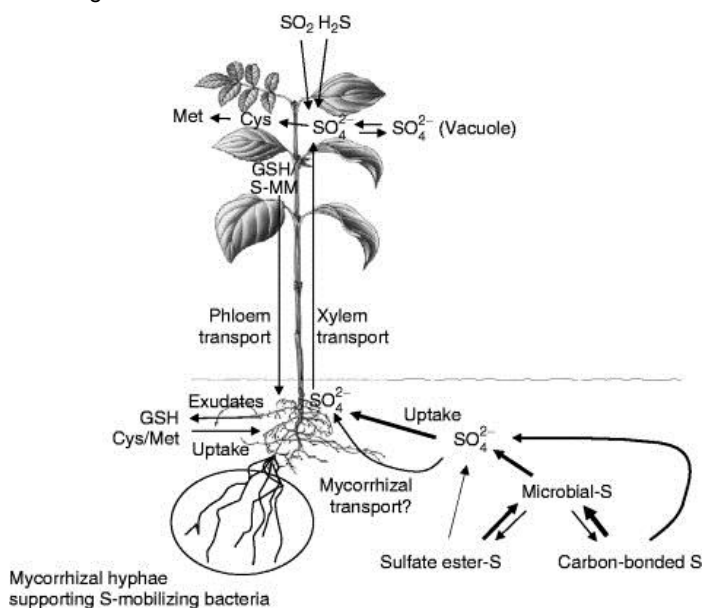
Fosfaat (P) cyclus

Fosfaat is in de bodem grotendeels in minerale vorm aanwezig, gecheleerd en/of geadsorbeerd aan het klei-humuscomplex, waardoor het niet direct voor het gewas opneembaar is. Slechts een klein deel van de totale P-voorraad in de bodem is in organische vorm aanwezig. Dit organische fosfaat komt beschikbaar door afbraak van de organische stof door fosfatasen (Tabel 2.1). Het betreft een brede groep enzymen die de hydrolyse van esters en anhydrides van fosforzuur katalyseren. Fosfatasen komen in twee vormen voor: zuur en alkalisch. Voorbeelden van landbouwgewassen die fosfatasen uitscheiden zijn maïs, graan en vlinderbloemigen. Laatstgenoemde scheiden meer fosfatasen uit dan granen (Yadav & Tarafdar, 2001). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat vlinderbloemigen meer P nodig hebben voor de symbiotische N-binding dan niet-vlinderbloemigen.

Om fosfatasen te benutten voor het verhogen van voor de plant opneembaar fosfaat is kennis nodig over de activiteit van fosfatasen, mede in relatie tot de pH, en de invloed van fosfaatbemesting op de activiteit (Dick, 1994). Ook het onderscheid tussen uitscheiding van fosfatasen door micro-organismen en door gewassen heeft aandacht nodig.

Zwavel (S) cyclus

Sinds de verlaging van het zwavelgehalte in brandstoffen is er sprake van een verminderde depositie van zwavel vanuit de lucht. Gewassen hebben zwavel nodig voor de vorming van eiwitten en vitamines, en zijn hiervoor nu meer afhankelijk geworden van de beschikbaarheid van zwavel vanuit de bodem. Belangrijke enzymgroep hiervoor zijn de arylsulfatasen, die van nature voorkomen in de meeste gronden. De aanwezigheid is vaak een antwoord van de microbiële biomassa op een zwaveltekort (Figuur 2.3).



Figuur 2.3. Schematische rol van microbiologie/sulfatase bij omzettingen van organische zwavel voor gewasopname (Kertesz et al., 2007).

Het is niet bekend of er sprake is van specifieke soorten organismen die arylsulfatasen produceren of dat het een algemeen voorkomende eigenschap is. Wel heeft onderzoek aangetoond dat schimmels, met name mycorrhiza's, een rol spelen bij de opname door een plant.

Gezien de hernieuwde aandacht voor de zwavelvoorziening van een aantal gewassen kan het zinvol zijn om meer kennis te ontwikkelen over de betrokken enzymen.

Bodemstructuur

Micro-organismen in de bodem zijn betrokken bij de aggregaatvorming en dragen zo bij aan de vorming van een bodemstructuur. Zij doen dit onder andere door de uitscheiding van kitstoffen die minerale bodemdeeltjes aan elkaar doen kleven. Deze kitstoffen bestaan uit verschillende polysacchariden. De ontstane aggregaten wisselen in vorm en grootte en kunnen worden ingedeeld in vier klassen (>2 mm, 1–2 mm, 250 µm–1 mm, en 2–250 µm). Fansler et al. (2005) onderzocht de mogelijke rol van de enzymen β -glucosidase en N-acetyl- β -glucosaminidase op de aggregaatvorming. Zij vonden zowel in landbouwpercelen als in natuurgrond een evenredige verdeling van de enzymactiviteit over de aggregaatklassen. In natuurgronden op voormalige landbouwgrond werd echter de hoogste enzymactiviteit gevonden in de micro-aggregaten (2–250 µm). Dit is volgens deze auteurs een aanwijzing dat het risico op C-verlies in dergelijke percelen groot is.

Meer kennis over de enzymactiviteit van micro-organismen bij de vorming van bodemstructuur kan helpen om bodemverdichting beter te begrijpen en maatregelen te benoemen die bijdragen aan een betere bodemstructuur. Gedacht kan worden aan maatregelen uit het brede spectrum van Niet Kerende Grondbewerking (NKG).

Bodembiodiversiteit

Meer en meer dringt het besef door dat taxonomische diversiteit alleen onvoldoende is voor de stabiliteit en productiviteit van ecosystemen (Caldwell, 2005). De vraag of enzymen kunnen dienen als indicator voor de biodiversiteit vraagt echter om een goede afbakening. De aanwezigheid van enzymen is weliswaar een expressie van bodembiodiversiteit, maar is daarmee nog geen reflectie van de actuele bodembiodiversiteit. Een groot deel van de bodemenzymen wordt voor langere tijd geadsorbeerd aan het klei-humuscomplex. De opgebouwde enzymstatus van een grond weerspiegelt de bodembiodiversiteit over enkele jaren. Dit kan tot uiting komen in termen van 1) veerkracht (Engels: 'resilience'), ofwel het herstelvermogen na een ingreep of een periode van stress, 2) algemene weerbaarheid tegen ziekten en plagen, door optimale biotische en abiotische omstandigheden (Arias et al., 2005). Voor beide aspecten is de aanwezigheid van een brede groep enzymen ('suite of enzymes') in principe indicatief. Bovenstaande is een belangrijk pluspunt van enzymen als indicator voor bodemkwaliteit ten opzichte van (eenmalige) metingen van het bodemleven.

Overig

Er is beperkt informatie beschikbaar over andere rollen die bodemenzymen vervullen in ecosystemen, zoals de vorming van groeistoffen in de rhizosfeer, de afbraak van organische verontreinigingen in grond (Zahir et al., 2001) en de vorming van een onkruid-onderdrukkende bouwvoor (Kremer & Li, 2003). De vorming van groeistoffen zoals auxine (indole-3-acetic acid, IAA) is een mooi voorbeeld van de interactie tussen bacteriën

en plantenwortels. Het enzym tryptofaan wordt uitgescheiden door de plantenwortels, waarna bacteriën het omzetten in IAA. Dit levert beide organismen winst op; bacteriën halen ook C (als energiebron) uit het wortelxudaat, en het kost de plant minder energie dan wanneer deze zelf IAA aanmaakt.

2.2 *Meetprotocollen*

2.2.1 Monsternamen en seizoensvariatie

Bemonstering

De activiteit van bodemenzymen vertoont een natuurlijke variatie in ruimte en tijd. Deze variatie kan reële verschillen maskeren die voortkomen uit het bodemmanagement en/of bodemtype en gewas. Een van de weinige studies naar de seizoensvariatie van enzymactiviteit is die van Garcia-Ruiz et al. (2009), waarin de enzymactiviteit elke twee maanden werd gemeten. De variatie in de activiteit van afzonderlijke enzymen bedroeg 29-71%. In deze wijde range kon bovendien geen consistente trend met de periode van het jaar worden vastgesteld. De variatie wordt veroorzaakt door omgevingsfactoren die de activiteit van het bodemleven beïnvloeden, zoals neerslag en temperatuur, factoren die ook van jaar tot jaar kunnen verschillen.

In hetzelfde onderzoek bleek ook de variatie tussen en in de percelen groot (respectievelijk 58 en 51%). Ter vergelijking, de variatie door het bodemmanagement (biologisch versus gangbaar) was in dit onderzoek ca. 26%. Kanttekening bij de gevonden ruimtelijke variatie is het relatief lage aantal plekken (vijf per perceel van 2 – 12 ha) per bemonstering, die bovendien bij elke bemonstering verschilden.

Bovenstaande betreft slechts de resultaten van één onderzoek. Voor het opstellen van een bemonsteringsprotocol zijn uiteraard ook gegevens nodig uit andere onderzoeken. Mochten deze de grote variatie in ruimte en tijd bevestigen, dan zou dit betekenen dat tijdstip en locatie van monsternamen van invloed zijn op de uitkomst van grondonderzoek naar bodemenzymen. Vooral de temporele variatie levert een knelpunt op voor de kosten van monitoring, omdat men waarschijnlijk niet kan volstaan met de gebruikelijke eenmalige bemonstering. Met de ruimtelijke variatie in een perceel wordt in het huidige Nederlandse grondonderzoek mogelijk al voldoende rekening gehouden door het nemen van een mengmonster (~ 20 stekken per ha).

Gedroogde of veldvochtige monsters

Bodembioologische bepalingen worden in de regel direct na monsternamen uitgevoerd in veldvochtige grondmonsters. De reden hiervoor is dat het bewaren en drogen van grond en eventuele vervolghandelingen (colloïd malen, herbevochtigen) tot veranderingen in de bodembioologische samenstelling kunnen leiden (Sparling et al., 1986). De aanwezigheid van enzymen in grond is voor een deel toe te schrijven aan levende organismen. Verwacht mag worden dat ook voor een meting van de actuele activiteit van bodemenzymen geldt dat dit het best kan gebeuren in een veldvochtig grondmonster. De huidige assays voor bodemenzymen gaan daar ook veelal van uit. Echter voor een deel zijn enzymen in grond het gevolg van ophoping van over een periode van jaren. Dit deel van de enzymen is tot op zeker hoogte beschermd tegen afbraak in het veld. Mogelijk is deze fractie minder aan verandering onderhevig wanneer een grondmonster wordt bewaard en/of gedroogd. Als dit het geval is dan zou er minder bezwaar zijn tegen deze uitvoeringspraktijk.

Een ander belangrijk argument in de discussie is of een meting in het laboratorium een directe afspiegeling moet zijn van de veldwaarde, of dat interpretatie ook, en wellicht beter, kan gebeuren door vergelijking aan

meetresultaten van bekende oorsprong. Aan de vertaling van laboratoriumwaarden in verse grondmonsters naar de situatie in het veld kleven de nodige haken en ogen (verschillende eenheden, momentopname, afwijkende condities waaronder verstoring grondmonsters). Met het oog op de interpretatie en ontwikkeling van adviezen verdient een gestandaardiseerde methode de voorkeur, waarvoor gedroogde grondmonsters een goede basis zijn. Bandick & Dick (1999) konden bij gebruik van gedroogde grondmonsters voor tien enzymen verschillen aantonen in de effecten van organische bemesting en management van organische stof. Ook Zornosa et al. (in Garcia-Ruiz et al., 2009) vond dat enzymdata van aan de lucht gedroogde grondmonsters goed correleerden met data verkregen van grond onder veldvochtige condities. Deze resultaten zijn veelbelovend voor de ontwikkeling van snelle, routinematige meetmethoden die gebaseerd zijn op gedroogde grondmonsters.

2.2.2 Analysemethoden

Klassieke methoden

Het onderzoek naar bodemenzymen kent verschillende ingangen. De belangrijkste zijn: (1) de activiteit van een enzym bij verschillende nutriëntenbronnen (substrate specificity); (2) de verschillende reactie mechanismen van een enzym, en (3) de bron van het enzym. In het grondonderzoek wordt aan eerstgenoemde veel aandacht besteed. De enzymactiviteit wordt veelal bepaald met fluorescent of met colorimetrische assays (Tabatabai & Dick, 2002). Hierbij wordt de afbraak van substraten gemeten en vertaald in een enzymactiviteit met behulp van een calibratieverband. Beide typen assays zijn nogal bewerkelijk en ze vereisen dure laboratoriumapparatuur.

Een variant van deze klassieke bepalingen is de geautomatiseerde bepaling met gebruik van substraten waaraan methylumbelliferone (MUB) is toegediend (Marx et al., 2001). MUB is sterk fluorescerend waardoor de gehydrolyseerde vorm al bij lage concentraties meetbaar is (uitgedrukt als $\text{nmol g. gr}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). De fluorescentie intensiteit is echter zeer pH-afhankelijk en een goede buffer is noodzakelijk.

Kenmerken van 'klassieke' meetmethoden voor bodemenzymen zijn:

- Het toedienen van (veelal kunstmatige) substraat aan een grondmonster, waarna gedurende één tot enkele uren de enzymactiviteit plaatsvindt. Schudden van het grond-substraat mengsel tijdens de reactie kan de uitkomsten beïnvloeden (Tabatabai & Bremner, 1971). Door schudden verkrijgt men een potentiële activiteit, wat met het oog op standaardisatie van methoden gewenst kan zijn. Het dient in elk geval te worden vastgelegd, zodat men bij de interpretatie hiermee rekening kan houden.
- Het bufferen van de pH in de bodemoplossing om snelheidsveranderingen in de enzymactiviteit door een andere zuurgraad tegen te gaan. De optimale pH is enzymafhankelijk, zowel zure als neutraal-alkalische pH optima zijn gerapporteerd.
- Het gebruik van inhibitors (onder andere toluen) heeft tot doel uitsluitel te krijgen over de activiteit (snelheid, duur) van een specifiek enzym en/of organisme door de activiteit van andere enzymen te blokkeren. Een andere manier is om het grondmonster steriel te maken door bijvoorbeeld gamma irradiation, om zo de enzymproductie te stoppen.

Van een groot aantal bodemenzymen is de optimale pH voor buffering tijdens het assay bekend. De optimale pH heeft mogelijk te maken met de enzymbron (bacteriën of schimmels). Tabel 2.2 geeft voor enkele

enzymen de hoogte van de pH-buffer aan. Om een indruk te geven van de orde van grootte van de enzymactiviteit bevat de tabel ook data van de gemeten activiteit. De gegevens zijn afkomstig van een vergelijkend onderzoek naar de enzymactiviteit in landbouw- en eikenbosgrond (Tracar-Cepeda et al., 2008). In dit onderzoek, en ook in het algemeen, wordt de enzymactiviteit van fosfatasen bepaald bij een temperatuur van 37 °C. Van de andere enzymen zijn hierover geen gegevens gevonden.

Voor de interpretatie van meetresultaten dient rekening te worden gehouden met enkele factoren die van invloed kunnen zijn op de activiteit van enzymen. De belangrijkste zijn (Burns, 1982):

- de aanwezigheid van het eindproduct; indien aanwezig dan kan dit de activiteit van het enzym afremmen; dit geldt bijvoorbeeld voor N en P, maar niet voor S;
- verschillen in het verband tussen gehalte respectievelijk activiteit van enzymen; en
- bodemdeeltjes kunnen extracellulaire enzymen beschermen tegen afbraak, waardoor hun halfwaardetijd toeneemt, en schudden kan hierop van invloed zijn.

Het eerder aangehaalde onderzoek van Tracar-Cepeda et al. (2008) toont een vierde factor, en dat is de eenheid waarin de enzymactiviteit wordt uitgedrukt. Veelal wordt de activiteit uitgedrukt per eenheid droog gewicht van de grond; Tracar-Cepeda et al. (2008) drukken de activiteit echter uit per eenheid C. Ter illustratie geeft Tabel 2.3 de enzymactiviteit uit dat onderzoek, nu uitgedrukt per eenheid C.

Tabel 2.3. Range in enzymactiviteit van enkele hydrolytische enzymen (Tracar-Cepeda et al., 2008).

Enzym	eenheid	grasland	maïspan	bos
C-cyclus				
invertase	$\mu\text{mol glucose g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	45-275 *	9-165 *	16-132
cellulase	$\mu\text{mol glucose g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	1,6-15,7 *	1,0-9,5	0,5-4,1
protease (BAA-P)	$\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	102-902 *	49-533 *	26-306
protease (casein-P)	$\mu\text{mol tyrosine g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	11-45 *	6-63 *	3-22
β -glucosidase	$\text{p-nitrofenol g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	8-114 *	8-49 *	4-41
N-cyclus				
urease	$\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	44-887 *	61-247	31-641
P-cyclus				
acid fosfomonoesterase	$\text{p-nitrofenol g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	44-311 *	32-239	21-151
fosfodiesterase	$\text{p-nitrofenol g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	7-49 *	2031	2-22
S-cyclus				
arylsulfatase	$\text{p-nitrofenol g}^{-1} \text{ C u}^{-1}$	2,2-23,8 *	0,4-8,8	0,6-10,0

Een asterix (*) in een cel in de kolom gras- of maïspan betekent dat de gemiddelde waarde significant ($P \leq 0,01$) verschilt van die in bosgrond.

Vergelijking van Tabel 2.2 met Tabel 2.3 leert dat in dit geval de andere uitdrukkingwijze van de enzymactiviteit tot een geheel andere interpretatie van de resultaten leidde. Uitgedrukt per eenheid C bleek de gemiddelde enzymactiviteit in beide landbouwpercelen hoger dan in de bosgrond, met als enige uitzondering de activiteit van urease in de maïspanpercelen die lager was dan in bosgrond. In grasland was de activiteit van de meeste enzymen meer dan tweemaal dan die in bosgrond. De uitdrukkingwijze is dus bepalend voor de interpretatie van meetresultaten en daarop gebaseerde adviezen.

Tabel 2.2. Optimale pH-buffer en range in enzymactiviteit van enkele hydrolytische enzymen (Tracar-Cepeda et al., 2008).

Enzym	pH- buffer	incubatielijd (uur)	substraat	eenheid	grasland	maïsland	bos
C-cyclus							
invertase	5,5	3,0	sucrose	$\mu\text{mol glucose g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	1,58-19,50	0,39-6,01 *	2,00-10,95
cellulase	5,5	24,0	carboxymethyl-cellulose	$\mu\text{mol glucose g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	0,06-0,38	0,02-0,28 *	0,06-0,47
			α -N-benzoyl-L-				
protease (BAA-P)	8,0	1,5	argininamide	$\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	3,8-50,7	1,0-14,1 *	2,7-34,3
protease (casein-P) ^a	9,0	2,0	1% caseine	$\mu\text{mol tyrosine g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	0,41-2,83 *	0,13-1,49 *	0,36-1,75
β -glucosidase	12,0	1,0	p-nitrofenyl	p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	0,45-3,09	0,20-1,73 *	0,67-4,58
N-cyclus							
urease	8,0	1,5	urea	$\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	2,2-44,4	1,6-12,9 *	3,2-49,8
P-cyclus							
acid fosfomonoesterase	5,0	0,5	p-nitrofenyl	p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	1,53-9,69 *	0,61-7,11 *	2,23-15,76
fosfodiesterase	5,0	1,0	p-nitrofenyl	p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	0,19-1,39 *	0,08-0,72 *	0,30-2,69
S-cyclus							
arylsulfatase	5,8	1,0	p-nitrofenyl	p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{ u}^{-1}$	0,07-1,43	0,02-0,40 *	0,07-0,91

^a Vergelijkbaar met de door ons gebruikte methode in hoofdstuk 4.

Een asterix (*) in een cel in de kolom gras- of maïsland betekent dat de gemiddelde waarde significant ($P \leq 0,01$) verschilt van die in bosgrond.

De verschillen in de enzymactiviteit tussen gras- en maïsland en bosgrond waren overigens niet verwacht. De algemene opvatting is dat landbouw, met name maïsland, leidt tot verliezen aan organische stof, in tegenstelling tot bosgrond. Er zijn overigens meerdere verklaringen mogelijk voor de relatief hoge activiteiten per eenheid C in de landbouwpercelen in vergelijking met die in bosgrond. Ten eerste kan er een verschil zijn in de kwaliteit van de organische stof; landbouwgrond met meer aanvoer van organisch materiaal bevat meer makkelijk afbreekbare organische stof dan bosgrond. Het is goed mogelijk dat juist dit makkelijk afbreekbare materiaal leidt tot meer enzymactiviteit. In de tweede plaats kunnen landbouwkundige maatregelen zoals bodembewerking een reactie oproepen bij de micro-organismen in de grond, waardoor zij meer enzymen produceren. Door sommigen wordt deze reactie overigens getypeerd als een ecologisch mechanisme (Burns, 1982), door anderen als microbiële stress (Doran, 1980).

Innovatieve methoden

Nieuwe benaderingen om bodemenzymen te meten richten zich op niet-invasief meten. Zo hebben Reeves et al. (2000) en Mimmo et al. (2002) aangetoond dat een redelijke NIRS calibratie is te ontwikkelen voor enzymen als dehydrogenase, fosfatase arylsulfatase en urease. De validatie was echter veelal minder goed (Cohen et al., 2005), wat betekent dat duizenden grondmonsters nodig zouden zijn om een robuuste en goede basisdataset te verkrijgen. Dit maakt de ontwikkeling een meetmethode gebaseerd op NIRS tot een dure ontwikkeling.

Een methode uit de hoek van de life-sciences en de voedingsmiddelenindustrie biedt mogelijk perspectief om ook te worden ingezet in het regulier grondonderzoek. Het gaat om een optische meetmethode, ontwikkeld door TNO- Zeist om de houdbaarheid van de verpakte voedingsmiddelen te testen. Voor de methode zijn weinig handelingen nodig en de feitelijke meting kan worden uitgevoerd met eenvoudige instrumentatie. De methode is operationeel, deugdelijk en kosteneffectief. Daarom is in het kader van de onderhavige verkenning deze methode gekozen voor een toetsing van de mogelijke toepassing om enzymen in grond te meten (zie volgende hoofdstuk).

Aan genoemde klassieke en innovatieve methoden kleeft echter het nadeel dat het een meting van de potentiële enzymactiviteit betreft, en niet de activiteit in het veld (*in situ*). Dit is het gevolg van de te gebruiken meetmethode die toediening van (kunstmatig verkregen) substraat onder geconditioneerde omstandigheden vereist. Wallenstein & Weintraub (2008) stellen terecht dat het ontbreken van een vertaalslag tussen de meting van de potentiële activiteit en die in het veld vooralsnog een beperking betekent voor het ontwikkelen van meer begrip over bodemenzymen en het afleiden van praktijkmaatregelen. Auteurs verwachten dat deze kloof op termijn wordt overbrugd door geavanceerde technieken uit genetisch onderzoek (genomics en proteomics).

2.3 *Enzymgroepen*

2.3.1 Cellulasen

Cellulose is één van de meest voorkomende vormen van organische stof. Voor micro-organismen in grond is cellulose belangrijk voor de groei en ontwikkeling. Om deze energiebron te kunnen benutten hebben micro-organismen cellulase nodig (Deng & Tabatabai, 1984). Cellulasen in grond zijn extracellulair en voor het grootste deel afkomstig van gewasresten en voor slechts een klein deel van bacteriën en schimmels (Richmond, in Makoi & Ndakidemi, 2008). Men onderscheidt drie groepen:

1. endo-1, 4-, β -glucanase, dat cellulose ketens op willekeurig plekken aanvalt;
2. exo-1, 4-, β -glucanase, dat glucose aan het eind van een cellulose keten losmaakt; en
3. β -D-glucosidase, dat cellodextrine hydrolyseert tot glucose en daarmee de laatste stap in de afbraak van cellulose realiseert.

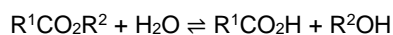
Cellulasen als groep spelen dus een belangrijk rol bij de omzettingen van organische stof en de C-mineralisatie.

Glucosidase wordt gezien als indicator voor bodemkwaliteit, omdat het informatie geeft over recente biologische activiteit en over de capaciteit van grond om koolstof vast te leggen (Bandick & Dick, 1999). Het geeft vroegtijds een signaal af van veranderingen in organische stof, lang voordat deze in organische stof gehalten tot uiting komen (Dick, 1994). Een andere rol van glucosidase in grond is als indicator van veranderingen in de zuurgraad (pH) en van verontreinigingen met zware metalen. Het is mogelijk toxisch voor planten.

De methode om cellulasen te bepalen wordt toegelicht voor β -D-glucosidase. Uitgaande van de standaard van de bepaling volgens Tabatabai (1994), mengden Geisseler & Horwath (2009) 1 g gedroogde grond met 2,5 ml acetaatbuffer (0,2 M; pH 5,0). Als substraat werd 2,5 ml p-nitrophenyl- β -D-glucoside toegediend (0,02 M). Het mengsel werd geschud gedurende 1 uur, waarna de reactie werd gestopt door toediening van 1 ml calciumchloride (0,5 M) en 4 ml Trisbuffer (0,1M, pH 12). De cumulatieve activiteit van β -D-glucosidase gedurende de incubatieperiode van 27 dagen, beliep van 237,7 – 270,6 $\mu\text{g p-nitrophenol (pNP) g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Een hogere aanvoer van cellulose leidde tot significant hogere activiteit van β -D-glucosidase. Voorts bleek de C/N-ratio van de cellulose bepalend; een C/N-ratio van 10 gaf een significant hogere (bijna 10%) activiteit dan een C/N-ratio van 40.

2.3.2 Proteasen

Proteasen spelen een significante rol bij de N-mineralisatie (Ladd & Jackson, 1982). Proteasen zijn enzymen die eiwitten en andere ketens van aminozuren afbreken. Deze enzymen zijn mogelijk een maat voor de aanwezige micro-organismen in een bodemecosysteem (Burns, 1982). Proteasen kunnen de verbinding tussen twee aminozuren hydrolyseren. Er kan onderscheid gemaakt worden tussen endoproteasen en exoproteasen. Een exoprotease kan alleen een aminozuur aan het eind van een keten eraf halen. Een endoprotease kan midden in een eiwitketen knippen. In de kern van een protease (de "actieve plek") zit een chemisch actieve groep zoals -OH of -SH. Deze "aanvallende groep" maakt deel uit van een aminozuur zoals serine, cysteïne of aspartaat. De andere aminozuren in de "actieve plek" helpen mee met het katalyseren van de hydrolyse reactie. Hydrolyse is de splitsing van een chemische verbinding onder opname van water (R^1 en R^2 zijn restgroepen):



Er zijn veel verschillende families van proteasen, die genoemd zijn naar het aminozuur dat de "aanvallende groep" bevat. Zo zijn er serine-, cysteïne- en aspartaatproteasen. Iedere soort proteasen kan een eiwit slechts op specifieke plaatsen aanvallen.

2.3.3 Dehydrogenasen

Dehydrogenase is een enzym dat in het wetenschappelijk onderzoek veel wordt gebruikt als indicator van de biologische activiteit (Burns, 1978). Het enzym is aanwezig in intacte cellen en wordt daarbuiten (extracellulair) niet opgeslagen in grond. Het enzym is effectief bij de oxidatie van organische stof, als onderdeel van de respiratie van micro-organismen; vandaar de functie als biologische indicator.

2.3.4 Ureasen

De groep van ureasen is verantwoordelijk voor de omzetting van urea kunstmest in ammonia (NH₃) en CO₂, waarbij de pH stijgt (Andrews et al., 1989) en een deel van de N verloren gaat als NH₃. Het enzym is vooral belangrijk voor tropische (C₄) gewassen, die een voorkeur hebben voor opname van ammonium boven nitraat. Maïs is van oorsprong een tropisch gewas en prefereert dus ook ammonium. Toch is in Nederland de efficiëntie van urea kunstmest laag in vergelijking met bijvoorbeeld KAS. Dit heeft te maken met de temperatuursafhankelijkheid van het enzym. Bremner & Mulvaney, 1978 vonden dat de werking van urease toeneemt met de temperatuur.

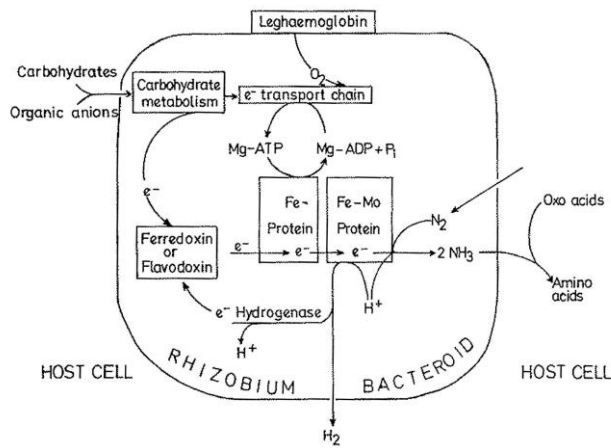
Voor urease zou de Michaelis constante (K_m) fluctueren met de microbiologische populatie (Paulson & Kurtz, in Tabatabai & Bremner, 1971). Onderzoek waarbij verschillende groenbemesters als voorvrucht in de maïsteelt werden ingezet liet een verband zien tussen groenbemester en urease activiteit (Cetin et al., 2010). Het werd daarom gesuggereerd dat de urease activiteit een indicator zou kunnen zijn voor de biologische bodemkwaliteit.

2.3.5 NAGase

NAGase (voluit: N-Acetyl-b-D-glucosaminidase) is een enzym dat hoort tot de groep van de glycosidasen. Het is betrokken bij de omzetting van organisch gebonden stikstof in grond. Uit onderzoek van Ekenler & Tabatabai (2002) bleek dat NGAase gecorreleerd is aan de organische C- en N-gehalten in grond, aan de microbiële biomassa en aan de hoeveelheid gemineraliseerde stikstof. Volgens Tabatabai (et al., 2010) zou NAGase een omzetting van stikstofverbindingen katalyseren die limiterend is voor de N-mineralisatie. In een screening van 8 enzymen als potentiële indicator voor de N-mineralisatie kwam NAGase als beste naar voren ($r=0,87^{***}$). Onderzoekers concludeerden dat NAGase kan worden gebruikt als index voor de N-mineralisatie.

2.3.6 Nitrogenasen

Nitrogenase is een belangrijk enzym bij de symbiotische stikstofbinding, zoals onder andere wordt gedaan door Rhizobium bacteriën in wortelknolletjes van klaver (Figuur 2.4). Het enzym bestaat uit een ijzer- en een zwavel+molybdeen houdend proteïne. Voor een goed functionerende N-binding moeten beide proteïnen aanwezig zijn, maar dit is niet altijd het geval.



Figuur 2.4. Nitrogenase en metabolische reacties in een Rhizobium knolletje (Mengel & Kirkby, 1987).

De N-binding bestaat uit een reeks van reacties waarbij nitrogenase actief is en die ertoe leiden dat N_2 gas uit de lucht wordt omgezet in NH_4^+ . De reacties gaan overigens gepaard met die van hydrogenase voor de omzetting van H_2 in H^+ -ionen (Paul & Clark, 1989). Het eindproduct NH_4^+ is een remstof voor nieuwe productie van nitrogenase. Nitraat NO_3^- werkt remmend op de vorming van wortelknolletjes en op het fixatieproces. Nitrogenase is zeer gevoelig voor zuurstof (O_2) en hoewel Rhizobium tot aerobische bacteriën hoort, vindt de feitelijke N-binding plaats onder zuurstofarme omstandigheden (Stacey, 2007). De activiteit van nitrogenase kan worden gemeten met behulp van de acetyleen reduction assay (ASA). Hiervoor wordt grond gedurende 1 uur geïncubeerd met 10% C_2H_2 en de ontsnapte ethyleen gemeten met gas chromatografie.

2.3.7 Fosfatasen

In grond kunnen zowel zure als basische fosfatasen voorkomen. De werking bestaat uit het beschikbaar maken van fosfaat uit een organische verbinding. Humus- en fulvozuren in de grond een remmende werking uitoefenen op enzymatische activiteit (Malcolm & Vaughan, 1979; Allison, 2006). Een veelgebruikt protocol voor de bepaling van fosfatasen maakt gebruik van het substraat natrium *p*-nitrofenyl fosfate (Tabatabasi, 1994; Tabatabai & Bremner 1971). Hierbij wordt uitgegaan van gedroogde en gezeefde (2-mm) grondmonsters. Incubatie vindt plaats van 1 g grond met 4 ml bufferoplossing, 0,25 ml toluen en 1 ml substraat, bij een temperatuur van $37^\circ C$ en een tijdsduur van 1 uur. Hierbij wordt een universele buffer gebruikt (pH 6,5). De emissie van *p*-nitrofenol (*p*NP) wordt colorimetrisch bepaald waaruit de maximale enzymactiviteit (V_{max}), uitgedrukt als μg *p*NP g $gr^{-1} \cdot h^{-1}$, en de Michaelis constante (K_m) worden berekend.

Studies naar de Michaelis constante (K_m) voor de activiteit van fosfatasen liet voor een serie van 9 gronden een range zien van $1,26 \times 10^{-3}$ tot $4,58 \times 10^{-3}$ M (Tabatabai & Bremner, 1971). De wijze waarop K_m werd bepaald bleek van invloed op het resultaat, daar schudden van het grond-substraat mengsel leidde tot een lagere K_m . De constante bleek niet significant gecorreleerd met andere bodemeigenschappen zoals pH, C.E.C., %C, %klei en % zand). Tabatabai & Bremner (1971) vergeleken de gevonden snelheden met die van fosfatasen waarvan de herkomst bekende was. Type I fosfatase was afkomstig van tarwekiemen, type II uit aardappels. In dit deelonderzoek werd de activiteit van de fosfatasen op vergelijkbare wijze bepaald als hierboven, met dit verschil dat 1 ml enzym oplossing en 3 ml buffer werden gebruikt in plaats van 1 g grond en 4 ml buffer. Ook voor arylsulfatase werden twee bronnen gebruikt. De resultaten laten zien dat de activiteit van beide fosfatasen en beide arylsulfatasen onderling markant verschilt (Tabel 2.4).

Tabel 2.4. Activiteit van fosfatase en arylsulfatase uit verschillende bronnen.

Enzymen	K _m		V _{max}	
	10 ⁻³ M		µg pNP g gr. ⁻¹ .u ⁻¹	
	niet geschud	wel geschud	niet geschud	wel geschud
Fosfatase				
Type I fosfatase (tarwekiem)	6,67	6,81	2080	2130
Type II fosfatase (aardappel)	19,8	32,8	1750	3450
Arylsulfatase				
Takadistase	0,7	0,19	80	96
Type II sulfatase (kokkels)	38,8	20,9	2340	1740

Wat opvalt in Tabel 2.4 is dat de K_m van beide fosfasen en arylsulfatasen onderling verschillen, en dat voor fosfatase de K_m toenemen als het mengsel werd geschud (vooral bij Type 2 fosfatase). Dit in tegenstelling tot het effect van schudden in bovengenoemde 9 gronden, en ook in tegenstelling tot arylsulfatase, waarvan de K_m van de arylsulfatasen afnemen als het mengsel werd geschud.

De spreiding in de K_m-waarden van de enzymoplossingen is groot in vergelijking met de resultaten van bovengenoemde 9 gronden. Als mogelijke verklaringen voor de geringere spreiding in enzymwaarden in grond suggereren Tabatabai & Bremner (1971) dat de fosfasen en arylsulfatasen in grond van hetzelfde type zijn, en/of dat een zekere mate van 'uniformering' optreedt door binding van de enzymen aan bodembestanddelen.

In een interlaboratoir onderzoek pasten Creamer et al. (2009) de 4-MUB-methode toe bij twee laboratoria. Hierbij werden 5 gevriesdroogde grondmonsters gebruikt, waarbij van elk 0,5 g. grond werd uitgezet in een microplaat. Als buffer werd 50 ml 0,1 M MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic zuur) toegevoegd, om een optimale pH van 6,1 te verkrijgen. Hieraan werd een hoeveelheid van 100 µl of 1 mM MUB-substraat toegevoegd. Incubatie vond plaats bij een temperatuur van 30 °C gedurende 3 uur. De gemeten fluorescentie werd omgerekend naar de omzettingssnelheid. De range in de activiteit (V) van fosfatase in de incubatieperiode van 27 dagen beliep van 156-2508 nmol g. gr.⁻¹. u⁻¹ voor het ene laboratorium, en van 605-1856 nmol g. gr.⁻¹. u⁻¹ voor het andere laboratorium. Gemiddeld genomen bleken de verschillen tussen beide laboratoria gering, respectievelijk 13,5 en 16,3 nmol g. gr.⁻¹. u⁻¹.

2.3.8 Arylsulfatasen

Zwavel is een van de weinig elementen die aan de organische stof wordt gebonden en met behulp van enzymen daaruit vrijgemaakt. De beschikbaarheid van zwavel voor gewasopname (in de vorm van SO₄²⁻) hangt af van de activiteit van de enzymgroep arylsulfatasen. Deze enzymen zijn betrokken bij de extracellulaire hydrolyse van aromatische zwavelesters of bij de oxidatie van oplosbare organische stof, die in de microbiële cellen plaatsvindt (Makoi & Ndakidemi, 2008). Arylsulfatase kan worden gezien als indicator van schimmels, omdat schimmels wel, en bacteriën geen, estersulfaat bevatten, het substraat van arylsulfatase

(Bandick et al. 1999). De mineralisatie van zwavel verloopt onder invloed van arylsulfatase volgens een hydrolyse reactie:



waarbij R staat voor de arylgroep.

Een veelgebruikt protocol voor de bepaling van arylsulfatasen maakt gebruik van het substraat kalium *p*-nitrofenyl sulfaat (Tabatabai 1982; Tabatabai & Bremner 1971). Hierbij wordt uitgegaan van gedroogde en gezeefde (2-mm) grondmonsters. Incubatie vindt plaats van 1 g grond met 4 ml bufferoplossing, 0,25 ml toluen en 1 ml substraat, bij een temperatuur van 37°C en een tijdsduur van 1 uur. De gebruikte bufferoplossing is 0,5 M natriumacetaat (pH 5,8). De emissie van *p*-nitrofenol (*p*NP) wordt colorimetrisch bepaald waaruit de maximale enzymactiviteit (V_{\max}), uitgedrukt als $\mu\text{g } p\text{NP g gr}^{-1}\cdot\text{u}^{-1}$, en de Michaelis constante (K_m) worden berekend.

Resultaten met deze methode naar de activiteit van arylsulfatasen in 9 gronden gaf een range voor V_{\max} van 14 – 680 $\mu\text{g } p\text{NP g gr}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en voor K_m van $1,37 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ tot $5,69 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Tabatabai & Bremner, 2000). Schudden van het grond-substraat mengsel tijdens de incubatie leidde tot een lagere constante met bovendien minder variatie tussen de grondmonsters. Mogelijke verklaring hiervoor is het betere contact tussen enzym en substraat door het schudden. De constante bleek niet significant gecorreleerd met andere bodemeigenschappen zoals pH, C.E.C., %C, %klei of %zand. De variatie in de K_m van arylsulfatase in de 9 gronden is geringer dan die van twee enzymoplossingen (Tabel 2.4); voor een mogelijke verklaring zie bij fosfatase.

De fluorescentiemethode (MUB-variant) werd toegepast door Creamer et al. (2009) in een interlaboratoir onderzoek. Hierbij werden 5 gevriesdroogde grondmonsters gebruikt, waarbij van elk 0,5 g. grond werd uitgezet in een microplaat. Als buffer werd 50 ml 0,1 M MES (2-(*N*-morfolino)ethanesulfonic zuur) toegevoegd, om een optimale pH van 6,1 te verkrijgen. Hieraan werd een hoeveelheid van 100 μl of 1 mM MUB-substraat toegevoegd. Incubatie vond plaats bij een temperatuur van 30 °C gedurende 3 uur. De gemeten fluorescentie werd omgerekend naar de omzettingssnelheid. Gerekend over de incubatieperiode van 27 dagen beliep de range in de activiteit van arylsulfatase van 28-1152 $\text{nmol g. gr}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ voor het ene laboratorium, en van 142-993 $\text{nmol g. gr}^{-1}\cdot\text{u}^{-1}$ voor het andere laboratorium. De verschillen tussen beide laboratoria kwamen tot uiting in de berekende gemiddelden voor de snelheid, respectievelijk 7,7 en 14,5 $\text{nmol g. gr}^{-1}\cdot\text{u}^{-1}$.

2.4 Indicator of index voor bodemkwaliteit?

In de voorgaande paragrafen is de betekenis van bodemenzymen toegelicht aan de hand van individuele feiten. Het is echter zeer de vraag of, waar het gaat om microbiologische processen, met een enkele indicator een uitspraak over deze processen kan worden gedaan. Elk proces, of het nu gaat om N-mineralisatie of om P-beschikbaarheid, wordt immers door een aantal bodemfactoren gestuurd, die onderling op onregelmatige wijze sterk kunnen variëren in ruimte en tijd en bovendien in onderlinge wisselwerking staan.

Verschillen tussen bodemvoedselwebs komen naar voren door de verhouding tussen enzymactiviteiten aan te geven, bijvoorbeeld de ratio van op koolstof respectievelijk fosfaat gerichte enzymen. Ratio's tussen twee biochemische kenmerken kunnen worden gezien als een eenvoudige index voor de bodemkwaliteit. Dergelijke

ratio's zijn een afspiegeling van de combinatie van bodem en vegetatie (Caldwell et al., 1999; Garcia et al., 1997). Laatstgenoemde auteur vond een omslag in de ratio urease : protease van 0,05 naar 3,25 die zou duiden op een relatief groter belang (of beschikbaarheid) van proteïne-N versus urea-N. Sparling et al. (1986) vond in graslanden in Nieuw Zeeland ratio's van fosfodiesteran: fosfate pools van 0,19 tot 0,57 en concludeerde dat een zeer verschillend gebruik werd gemaakt van de organisch fosfaat pools. Ondanks deze en andere goede resultaten is gebleken dat aan deze eenvoudige index dezelfde bezwaren kleven als aan de enkelvoudige indicator (ontbreken van referentiewaarden, onverwachte uitkomsten in andere locaties, moeilijke interpretatie).

Om deze twee redenen (bodemprocessen worden gestuurd door meerdere bodemfactoren; de ratio tussen ecologische parameters is van meer betekenis dan afzonderlijke waarden) lijkt het gewenst om een set van indicatoren vast te stellen die minimaal moet worden gemeten om een enigszins betrouwbare uitspraak te kunnen doen. Deze set zou naast biologische, ook chemische en fysische indicatoren moeten bevatten, waarvoor in beginsel het standaard grondonderzoek kan worden gebruikt. De interpretatie van meetgegevens van enzymen zou dan relatief aan de gehele dataset kunnen plaatsvinden. Dilly & Blume (1998) stelden een set van tien biochemische kenmerken voor, bestaande uit: a) de microbiële biomassa; b) microbiële activiteit (basale respiratie, dehydrogenase, arginine ammonificatie, dimethyl sulfoxide (DMSO) reductie en c) specifieke activiteit (β -glucosidase, protease, en alkaline en niet-gebufferde fosfatase). De afzonderlijke data zouden het best in een sterplot kunnen worden weergegeven, waarbij de variatie in de vorm van de ster de diversiteit van de organismen weerspiegelt, en de oppervlakte van de ster een maat is voor de vitaliteit. Ondanks een aantrekkelijke visuele weergave heeft deze benadering weinig weerklank gevonden. De meerwaarde boven enkelvoudige en eenvoudige indices bleek voornamelijk te gering (Gil-Sotres et al., 2005).

Door velen is nagedacht over de eisen waaraan een indicator (enkelvoudig of samengesteld) voor bodemkwaliteit moet voldoen. Inmiddels bestaat er een redelijke consensus over de eisen die Dalal (in Gil-Sotres et al., 2005) noemt:

- meet één of meer bodemfuncties;
- is gevoelig voor veranderingen in management;
- bevat een referentie- of kritieke waarde;
- is gemakkelijk te interpreteren; en
- is eenvoudig en kosteneffectief uit te voeren.

Er zijn verschillende statistische methoden ontwikkeld voor de verwerking van meetresultaten en die een interpretatie van een combinatie van enzymen mogelijk maken. Zonder daarin uitputtend te willen zijn volgen onderstaand enkele mogelijkheden.

Geometrisch gemiddelde

Uitgaande van een activiteit van de afzonderlijke enzymen, berekenen Garcia-Ruiz et al. (2009) het geometrisch gemiddelde (GMea) van de door hen gemeten enzymen. Volgens Hinojosa et al., in Garcia-Ruiz et al., 2009 kan de GMea worden gezien als indicator van bodemkwaliteit. De volgende formule werd gehanteerd:

$$GMea = \sqrt{\text{enzym1} \times \text{enzym2} \times \text{enzym3} \dots}$$

De GMea werd voor elk bemonsteringstijdstip berekend. Vervolgens werd GNMea onderworpen aan een gangbare ANOVA waarbij de blokstructuur bestond uit Bodemmanagement, Locatie en Bemonstering en hun interacties. De meerwaarde van de GMea werd onder andere duidelijk uit de analyse van de trend tijdens het groeiseizoen. Voor afzonderlijke enzymen kon geen trend worden vastgesteld; echter de GMea liet zien dat de enzymactiviteit in voor- en najaar hoger was dan in de rest van het jaar.

Principal Components Analyse (PCA)

PCA is een wetenschappelijk geaccepteerde methode om een statistische analyse uit te voeren van een reeks mogelijk gecorreleerde variabelen. Hiertoe worden de variabelen getransformeerd naar waarden die niet meer lineair gecorreleerd zijn (de principal components). De transformatie wordt zo gekozen dat de 1^e principal component (PC) de meeste variantie verklaart, gevolgd door de 2^e principal component etc. Garcia-Ruiz et al. (2009) pasten PCA toe om de variantie in de data van de bodemenzymen, samen met die van het chemisch grondonderzoek, te analyseren. Resultaten van de PCA lieten zien dat de 1^e principal component 36% van de variantie kon verklaren. Hiermee waren, naast enkele chemisch-fysische bodemkenmerken, ook de fosfatasen, het β -glucosidase en arylsulfatase significant en positief gecorreleerd (pearson correlatie coëfficiënten > 0,85, $P \leq 0,01$). Ook bleek een hoge correlatie (0,94; $P \leq 0,01$) te bestaan tussen GMea en PC1. Auteurs concludeerden hieruit dat GMea, gebaseerd op een selectie van bodemenzymen, een voldoende integratieve indicator is om bodemkwaliteit mee te duiden. Zij stellen zelfs dat een fysisch-chemische analyse dan niet meer nodig is.

Geometrisch Gemiddelde Regressie (GMR)

Creamer et al. (2009) onderzochten de waarde van multi-enzyme profiling bij analyse door verschillende laboratoria. Basis van de data was een fluorimetrisch assay. Om de precisie en herhaalbaarheid tussen de gemeten enzymactiviteit te toetsen gebruikten auteurs een paarsgewijze regressie (toetsing of de paren hetzelfde zijn) en de methode Geometrisch Gemiddelde Regressie (GMR). Bij GMR worden weliswaar ook absolute verschillen tussen laboratoria berekend, maar de verklaarde variantie (R^2) van een lineair verband tussen de data van de laboratoria wordt gebruikt om aan te geven of uitkomsten verschillend zijn. Een systematisch verschil tussen laboratoria wordt daardoor anders beoordeeld dan willekeurige verschillen. Het resultaat van de GMR werd door Creamer et al. (2009) aangevuld met een PCA, waarbij de eerste twee principal components gebruikt werden voor één van de twee laboratoria. Uit de resultaten van de paarsgewijze regressie en de GMR bleek dat laatstgenoemde meer overkomsten tussen de laboratoria zag dan de paarsgewijze regressie. Dit werd bevestigd door de PCA, die aangaf dat het patroon van de verdeling van de enzymenvariantie over de assen in hoge mate gelijkvormig was. Auteurs concludeerden dat multi-enzyme profiling door verschillende laboratoria mogelijk is, maar dat aandacht nodig is voor het aantal herhalingen (drie is weinig) en voor uitzonderlijke bodemtypen (hier: kalkrijke gronden met hoge pH). De variatie tussen laboratoria kan mede het gevolg zijn van de zeer kleine hoeveelheid grond die nodig is voor de micro-plaat techniek (verkrijgen van homogeen monster, relatief grote invloed van klei, representatief voor veld). Volgens de auteurs is het mogelijk om verschillen tussen laboratoria grotendeels te voorkomen.

Multiple-variable indicator kriging (MVIK)

Met behulp van Multiple-Variable Indicator Kriging (MVIK) wordt een geografische kaart gemaakt waarin een set van bodemkenmerken is verwerkt tot één samengestelde index. Indicator variograms worden gemaakt, die de basis zijn om de kwaliteit van niet-bemonsterde plekken te schatten, mits dezelfde basisset van bodemkenmerken bekend is. Vervolgens kan de waarschijnlijkheid van de indexwaarde van een andere geografische plek worden geschat.

Gil-Sotres et al. (2005) geven aan dat de perspectieven om zinvolle samengestelde indices te vormen positief zijn. Waar het bij MVIK aan ontbreekt is validatie van de methoden en aan indices in andere locaties dan waar ze zijn ontwikkeld. Dit is volgens auteurs dan ook de belangrijkste opgave voor de verdere ontwikkeling van indices.

Discriminant en cluster analyse

Deze statistische techniek is vrij algemeen bekend en voor een uitleg wordt verwezen naar de literatuur. Volstaan wordt hier met een korte toelichting bij de resultaten van Monreal & Bergstrom (2000), die een systeem met zeven niveaus van enzymactiviteit ontwikkelden voor een groep van zes enzymen urease, b-glucosidase, dehydrogenase, alkaline fosfatase, arylsulfatase en L-glutaminase (Tabel 2.5).

Tabel 2.5. Zeven niveaus van enzymactiviteit (Monreal & Bergstrom (2000)).

	Enzyme activity in cluster number						
	1 V. low ^z	2 Low	3 M. low	4 Medium	5 M. high	6 High	7 V. high
	<i>L-glutaminase</i> ($\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	64-166	167-225	226-275	276-324	325-386	387-475	484-669
Mean	133.3	198.5	252.3	298.9	350.1	423.2	531.2
SD	25.4	16.8	14.1	14.1	16.4	26.0	47.5
<i>n</i> ^w (701)	58	152	160	153	108	54	16
	<i>Dehydrogenase</i> ($\mu\text{g TPF}^y \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	0-12	13-23	24-38	39-57	58-85	86-137	140-240
Mean	7.8	17.7	30.3	47.3	68.4	103.8	180.8
SD	2.8	3.3	4.1	5.9	7.8	13.5	28.3
<i>n</i> (758)	63	144	138	144	144	95	30
	<i>β-glucosidase</i> ($\mu\text{mole p-NP}^x \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	0.10-0.40	0.41-0.70	0.71-1.0	1.1-1.30	1.31-1.70	1.71-2.10	2.11-3.20
Mean	0.34	0.62	0.86	1.13	1.47	1.88	2.39
SD	0.09	0.07	0.07	0.09	0.11	0.12	0.24
<i>n</i> (760)	53	156	177	177	95	67	35
	<i>Alkaline phosphatase</i> ($\mu\text{mole p-NP}^x \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	0.8-1.90	1.91-2.8	2.81-3.9	3.91-5.0	5.1-6.5	6.51-8.9	9.0-14.6
Mean	1.48	2.37	3.37	4.47	5.63	7.62	10.48
SD	0.29	0.27	0.29	0.33	0.40	0.67	1.35
<i>n</i> (761)	81	166	189	118	100	81	26
	<i>Arylsulphatase</i> ($\mu\text{mole p-NP}^x \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	0.03-0.20	0.21-0.40	0.41-0.60	0.61-0.80	0.81-1.10	1.11-1.70	1.71-2.70
Mean	0.16	0.34	0.51	0.71	0.95	1.34	2.07
SD	0.06	0.05	0.05	0.06	0.08	0.15	0.32
<i>n</i> (759)	11	83	169	202	165	80	49
	<i>Urease</i> ($\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
Range	4-14	15-24	25-36	37-51	52-74	75-115	132-190
Mean	10.31	19.10	29.82	42.40	61.70	90.97	151.30
SD	2.73	2.71	3.18	4.31	7.12	11.43	19.13
<i>n</i> (760)	47	101	200	203	132	69	8

^zV = very, M = medium.

^yTPF = triphenyl formazan.

^xp-NP = para-nitrophenol.

^w*n* = number of cases; the total number of cases shown in parenthesis.

Deze enzymen zijn alle op één of andere manier betrokken bij de mineralisatie van nutriënten in landbouwgrond en natuurgebieden. De onderzoekers wilden weten wat de kenmerkende gehalten en de

onderlinge verhouding van de enzymen is. De dataset hiervoor werd in Canada samengesteld en bestond uit 760 grondmonsters, ingedeeld naar landgebruik (natuur, landbouw met gangbare grondbewerking en landbouw met beperkte grondbewerking) en bodemtype (drie groepen met minerale gronden). Het ontwikkelde model kan volgens de auteurs de basis zijn van een 'early warning' systeem van een veranderende bodemkwaliteit.

3 Betekenis voor de landbouw

3.1 Rotatie en Bouwplan

3.1.1 Grasland

Het is algemeen bekend dat de verlaging van de stikstofbemesting ertoe heeft geleid dat de grasproductie meer afhankelijk is geworden van de bodemkwaliteit, in het bijzonder van de stikstoflevering. De mineralisatie van organisch gebonden stikstof is daarom één van de belangrijkste kengetallen van bodemkwaliteit. Van invloed op de mineralisatie zijn chemische parameters zoals het Nt-gehalte, organische stofgehalte en de pH, maar ook bodembioologische parameters zoals bacteriën en schimmels (soorten, aantallen, activiteit). De enzymen (waaronder urease en protease) die door een bacterie- en schimmelgemeenschap wordt uitgescheiden spelen een rol bij vele N-processen uit de bodemkringloop. Huygens et al. (2011) vonden weinig verschillen in de enzymactiviteit tussen bacterie- en schimmelgemeenschappen in graslanden. Wel bleek de samenstelling van de bacterie- en schimmelgemeenschappen afhankelijk van het management van de percelen (bemestingsniveau 's, gebruik organische mest, bodembewerking. Bovendien bleek de ene gemeenschap gevoeliger te zijn voor frequente afwisseling in droge en natte perioden dan de andere. Hierdoor ontstond toch een verschil in N-mineralisatie.

Het effect van protease op de N-levering speelt zich volgens Jan et al. (2009) af aan het begin van de afbraakprocessen van organisch gebonden stikstof in grond. Deze auteurs stelden vast dat, in grasland, de afbraak van proteïnen (door protease) in aminozuren ca. 20 x langzamer verloopt dan de afbraak van aminozuren in ammonium (NH_4^+). Bemesting met minerale stikstof had weinig effect op de protease activiteit, maar er was een sterke afhankelijkheid van de temperatuur. De resultaten van Huygens et al. (2011) en Jan et al. (2009) kunnen worden gezien als een aanscherping van de landbouwkundige kennis over N-mineralisatie en bieden perspectief voor aanpassing van de advisering in de N-bemesting.

3.1.2 Maïsland

Maïs is een gewas met een relatief diep wortelstelsel, dat daardoor ook van grotere diepte voedingsstoffen kan opnemen. Wanneer deze voedingsstoffen onvoldoende beschikbaar zijn, dan kan maïs enzymen vrijmaken door wortellexudatie. Dick et al. (1983) vonden dat maïswortels twee soorten fosfatase aanmaken, zure fosfatase (optimum pH 4,0) en pyrofosfatase (optimum pH 6,5). Maïswortels scheiden geen basische fosfatasen uit (optimum pH 7,0), en de auteurs stelden daarom dat basische fosfatasen een indicatie kunnen zijn van de activiteit van bodemorganismen. In grond kunnen de door maïs uitgescheiden fosfatasen inactief worden gemaakt door 1) lage concentraties metalen; 2) afbraak door andere enzymen en 3) aanwezigheid van fosfaat. Echter het inactief maken wordt ten dele tegen gegaan door een bufferende werking van andere wortellexudaten van maïs.

Teeltmaatregelen om het gehalte fosfaat in de bodemoplossing te vergroten zouden gericht kunnen zijn op het beperken van de bindingsplaatsen van fosfaat aan het klei-humuscomplex. Dit is wellicht mogelijk door te zorgen voor een hoger aandeel labiele organische stof (Dissolved Organic Carbon (DOC), dat dezelfde bindingsplaatsen als fosfaat kan innemen (pers. med. D. Los- van Rotterdam). Op het DOC-gehalte zijn onder andere de bodembewerking en de teelt van groenbemesters van invloed. Zibilske & Bradford (2003) vonden een positief effect van NKG op de bodemademhaling en de fosfatase activiteit. Zij concludeerden dat met

NKG, door een minieme verhoging van het organische stof gehalte en/of verandering in de kwaliteit van organische stof een meetbare verhoging van de P-mineralisatie mogelijk was.

In grond met maïsresten als mulch vonden Buck (et al., 1999) ophoping van fosfatasen in de uitwerpselen (Engels: 'casts') van regenwormen zoals *Lumbricus terrestris* in vergelijking met het fosfatasegehalte in de grond. Het aantal uitwerpselen was hoger naarmate het N-gehalte in de maïsresten hoger was. Dat verschillende soorten organische mest een ander effect kunnen hebben op de fosfaatbeschikbaarheid, bleek uit onderzoek van Vajantha et al. (2010). Deze onderzoekers vergeleken het basische fosfatasegehalte in grond waaraan onder andere kippenmest en runderdrijfmest (RDM) was toegediend. Het gehalte was bij gebruik van kippenmest 2x zo hoog als bij gebruik van RDM.

Groenbemesters

Voor akkerbouwmatig geteelde gewassen zoals maïs is de bedekking van de grond tijdens de winter van groot belang voor de enzymactiviteit in het komende groeiseizoen. Veelal worden hiervoor groenbemesters gebruikt. Bij de teelt van groenbemesters in het winterseizoen is er continu voedsel voor het bodemleven. In vergelijking met braakliggende grond is de enzymproductie in teeltsystemen met winterbedekking hoger (Bandick et al, 1999). De keuze van de groenbemester speelt hierbij mogelijk een rol (Schaller, 2009). Dora (2009) vond echter voor alle geteste groenbemesters (lupine, koolzaad, haver, raaigras) een significante verhoging van de enzymen dehydrogenase, catalase en fosfatase (in zure en alkalische vorm). Kunze et al. (2011) testten verschillende soorten groenbemesters in een praktijkproef in Brazilië. Bladrammenas bleek een stimulerend effect te hebben op de activiteit van het enzym zure fosfatase. Dit effect was ook na het einde van de teelt nog aanwezig.

3.2 *Effecten van landbouwkundige maatregelen*

3.2.1 Bemesting

Precisie bemesting

Bemesten volgens de regels van precisie bemesting betekent rekening houden met de ruimtelijke variatie in een perceel. Waar een hoge opbrengst wordt verwacht, kan men meer meststoffen toedienen. Schloter et al. (2003) onderzochten de effecten van precisiebemesting in maïsland op de enzymactiviteit. Percelen van bekende langdurige hoge en lage productiviteit werd een deel op conventionele wijze bemest en op een andere deel werd precisie bemesting toegepast. In de vier blokken werden de biologische N-omzettingen gemeten en de activiteit van het enzym protease. De hoogste enzymactiviteit werd gevonden in het blok met de lage productiviteit, in het deel waarin precisie bemesting werd toegepast. Ook de N-verliezen naar lucht en water bleken lager dan in de andere blokken. In het perceel met een van oorsprong hoge productiviteit werd geen verschil gevonden van de bemesting op de protease activiteit.

Minerale meststoffen

Een voorbeeld van de positieve effecten van minerale bemesting op de enzymwerking is voor spoorelementen aangetoond door Nowak et al. (2004). Deze auteurs voerden laboratoriumproeven uit waarin het effect van verschillende concentraties selenium op de activiteit van het enzym nitraat reductase werd getest. In alle gevallen was dit effect positief. Ook borium kan de enzym activiteit stimuleren. Zo vonden Bilen et al. (2011)

de hoogste urease activiteit bij toediening van 6 kg B per ha; de activiteit van fosfatase en dehydrogenase was het hoogst bij toediening van 3 kg B per ha.

Ander onderzoek liet een positief effect zien van de meststof fosfogypsum op het bodemleven en de enzymactiviteit. Ook Nayak et al. (2011) vonden meer schimmels, bacteriën en enzymactiviteit bij toevoeging van fosfogypsum. Deze toevoeging ging gepaard met een hoog C-verlies, een gevolg van het pH-verhogende effect en de versnelde afbraak van organische stof. Minerale meststoffen verlagen mogelijk de enzymactiviteit, vonden Leinweber et al. (2008) in een vergelijking van de enzymactiviteit in onbemeste en met NPK (mineraal) bemeste percelen. Voor alle getoetste enzymen vonden ze een lagere activiteit in de bemeste percelen, behalve voor de basische fosfatase. Deze was hoger in de NPK bemeste percelen dan in de onbemeste percelen.

Organische meststoffen

De effecten van bodemverbeteraars als compost en biochar op de enzymactiviteit hangen waarschijnlijk samen met de interactie tussen organische stof en enzymsubstraat. Bailey et al. (2010) toetsten de enzymactiviteit van (b-glucosidase, b-N-acetylglucosaminidase, lipase, en leucine aminopeptidase) na toediening van een biochar aan grond. Zij vonden een sterk variabel effect en schreven dat toe aan de verschillen in binding van de afzonderlijke enzym substraten aan de biochar. Schaller (2009) vond positieve effecten van zowel compost als stro.

Bodemverbeteraars

In de literatuur zijn voorbeelden te vinden van bodemverbeteraars in de vorm van toevoegmiddelen (schimmel- of bacteriehoudende producten) die de enzymactiviteit positief beïnvloeden. Inoculatie met de schimmel *Mortierella* sp. bleek gunstig voor de enzymactiviteit in natuurgebieden (Zhang et al., 2011). Deze schimmel heeft een fosfaatoplossend effect door de productie van fosfatase en cellulase. Het beste effect werd bereikt in combinatie met arbusculaire mycorrhiza's (AM). Ook in een bosbouwgebied in Brazilië bleken AM gecorreleerd met enzymactiviteit (Burke et al., 2011). In low-input landbouw zijn met toediening van bacteriën en organische meststoffen positieve effecten bereikt op de activiteit van enkele, maar niet alle, gemeten enzymen. Deze auteurs vonden overigens ook een positief significante relatie tussen de enzymactiviteit en het gehalte beschikbaar kalium (K). Opgemerkt wordt dat deze voorbeelden geen betrekking hebben op de landbouwsituatie zoals die in Nederland aanwezig is.

3.2.2 Bodembewerking

Het is bekend dat bodembewerking de activiteit van het bodemleven sterk kan beïnvloeden. Ploegen leidt tot een verstoring van de grond en een lagere toestand van het bodemleven en minder enzymactiviteit (Balota et al., 2011). Dit verklaart waarom blijvend grasland hogere enzymgehalten heeft dan bouwland dat elk jaar wordt geploegd (Gupta & Germide, 1988). Echter ook de continue voedselvoorziening van het bodemleven speelt hierbij een rol (Bopaiah et al., 1985). In Nederland wordt tegenwoordig veel gebruik gemaakt van niet-kerende grondbewerking (NKG). Hiermee wordt een eventuele verdichting in de grond verminderd zonder het bodemleven erg te verstoren. NKG kan op verschillende manieren worden uitgevoerd, en kan daardoor meer of minder effect hebben op de activiteit van bodemenzymen. Veel is hierover niet bekend. Monreal & Bergstrom (2000) deden onderzoek naar de activiteit van enzymen op de nutriëntenlevering in teeltsystemen met verschillende bodembewerking. De resultaten laten zien dat arylsulfatase, een extracellulair enzym,

mogelijk een indicatie afgeeft van de bodemstructuur en/of het effect van grondbewerking. Basis voor deze veronderstelling is de toename in enzymactiviteit met afnemende bodembewerking (percelen met gangbare bodembewerking < beperkte bodembewerking < ongecultiveerde grond). Zie verder paragraaf 3.1.2 voor een voorbeeld een enzymeffect van NKG in maïsland.

3.2.3 Bestrijdingsmiddelen

Bestrijdingsmiddelen bevatten per definitie een component die ingrijpt op levende organismen. De specificiteit van deze middelen is uiteraard belangrijk bij het optreden van eventuele effecten op de bodembioïologie. Het gebruik van pesticiden kan de enzymstatus van grond zowel negatief als positief beïnvloeden. Zo is de activiteit van cellulase gevoelig voor de aanwezigheid van fungiciden. Van een reeks middelen waaronder captan, cosan, thiram is aangetoond dat de activiteit van cellulase afnam bij toenemende concentratie van het middel (Petkar & Rai, 1992; Arinze & Yubedee, 2000). De gehalten aan sporelementen in fungiciden spelen hierbij een rol.

Van de gevoeligheid van enzymen voor pesticiden en andere bodemvreemde stoffen wordt gebruik gemaakt door dehydrogenase te meten als indicator voor verontreiniging in grond. Bij lage doses pesticiden is de activiteit van dehydrogenase hoger dan bij hoge doses pesticiden (Baruah & Mishra, 1986).

Tussenconclusie

Bovenstaande beschrijving van landbouwkundige maatregelen geeft een beeld van het type maatregelen waarmee men de enzymstatus van een perceel kan sturen. Er lijkt wat dat betreft veel mogelijk te zijn, maar de bruikbaarheid van de beschikbare informatie voor de Nederlandse situatie is beperkt. Het is daarom gewenst dat er praktijkonderzoek komt naar de effecten van maatregelen die de enzymactiviteit zouden verhogen.

4 Toetsing Optische meetmethode

4.1 *Principe*

Het principe van de TNO-methode berust op een biopolymeer (enzym-specifiek substraat) met een fluorescent label. Dit biomolecuul wordt verwerkt in een coating op stickers die in kleine glazen flesjes (20 ml) kunnen worden aangebracht. Als de coating in contact komt met extra-cellulaire enzymen, dan wordt het biomolecuul afgebroken, wat te zien is aan een veranderende fluorescentie van de sticker. De enzymactiviteit kan worden bepaald door de afbraak van het biopolymeer gedurende enkele uren te meten. De snelheid van signaalverandering is een maat voor de enzymactiviteit, waarbij geldt dat een afname in het fluorescerende signaal een toename van de enzymactiviteit (uitgedrukt als $\log[\text{protease}]$) betekent.

Het feit dat door de glaswand van een flesje heen kan worden gemeten maakt dat dit een niet-invasieve meting is. Dit heeft als voordeel dat er geen nabesmetting van het monster kan plaatsvinden. Momenteel wordt de methode gebruikt om de houdbaarheid van levensmiddelen te testen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de techniek zelfs kon worden gebruikt om de steriliteit van media zoals toegepast bij weefselkweek te garanderen. Tevens zijn er indicaties dat deze techniek bruikbaar is voor het semi-kwantitatief bepalen van het celgetal (totale concentratie micro-organismen) in verpakte levensmiddelen. De methode is snel en kan geautomatiseerd worden uitgevoerd. Deze kenmerken, het niet-invasief en semi-kwantitatief kunnen meten en de routinematige uitvoeringswijze, maken dat de methode perspectief biedt voor toepassing in grondonderzoek. Bijkomend voordeel is dat in principe kan worden gewerkt met hetzelfde extractiemiddel (0,01 M CaCl_2) als in het regulier grondonderzoek. Met de methode zou het mogelijk kunnen worden om in korte tijd de enzymactiviteit in grote aantallen grondmonsters te bepalen. Hiermee zou nieuwe en aanvullende informatie beschikbaar komen die als basis kan dienen voor de bemestingsadvisering in de land- en tuinbouw.

4.2 *Proefopzet*

Doelstelling

De toetsing van de optische meetmethode is uitgevoerd met protease als testenzym en caseïne als substraat. Dit was pragmatische keuze, ingegeven door het feit dat de huidige meetmethode bij TNO-Zeist hiervan gebruikt maakt. Bijkomend voordeel van de toetsing met protease als testenzym was dat proteasen in grond actief zijn op het voor de landbouw belangrijke gebied van de C- en N-mineralisatie. Caseïne wordt ook in het klassieke grondonderzoek gebruikt als substraat voor het meten van protease-activiteit (Schloter et al., 2003). Proteasen knippen door hun activiteit grote eiwitmoleculen in stukken. De protolytische activiteit in de bodem is mogelijk een maat voor de N-levering en/of de dynamiek in organische stof. Daarom zal voor de toetsing van de optische meetmethode de protease coating worden gebruikt voor een meting van de enzymactiviteit in landbouwgrond.

Het doel van de verkenning is tweeledig:

- testen of de technologie tot meetbare resultaten leidt in landbouwgrond; en
- verkennen of de range van de meetresultaten een voor de landbouw zinvol onderscheid in bodemkenmerken mogelijk maakt.

Selectie van grondmonsters

Om de bruikbaarheid van de technologie te verkennen is de methodiek in een serie bodemmonsters van uiteenlopende landbouwpercelen is toegepast. In de test zijn zowel gras- als maïspancelen meegenomen. Met protease als testenzym zijn percelen gezocht die verschillen in N-levering en/of dynamiek organische stof. Hiervoor is een schema opgesteld van percelen die verschillen in 1) het gewas; 2) de intensiteit van de bemesting en 3) duur van de teelt (leeftijd graszode, duur van de maïsteelt). De beoogde percelen zijn gevonden binnen lopende projecten van NMI (Tabel 4.1). De percelen zijn bemonsterd in juli 2011 door NMI; de grondmonsters zijn gekoeld getransporteerd naar TNO en daar opgeslagen in de koelcel (7 °C) tot de ingebruikname.

Tabel 4.1. Herkomst grondmonsters.

Naam	Locatie	Grondsoort	Gewas	Diepte (cm)	N-niveau	Leeftijd/teeltduur
M1	Beek en Donk	dekzand	gras	0-10	270	10 jr
M2	Beek en Donk	dekzand	gras	0-25	250	1e jaar, was maïs
M3	Meppel	beekeerd	maïs	0-25		continu
M4	Meppel	beekeerd	maïs	0-25		continu
M5	Meppel	beekeerd	gras	0-10	200	10 jr
M6	Silvolde	rivierklei	gras	0-10	200	5 jr
M7	Silvolde	rivierklei	gras	0-10	400	jong gras
M8	Silvolde	rivierklei	maïs	0-25		scheurperceel

Als extra test is een kleine verdiepingsslag gemaakt door in drie grondmonsters een aanvullend grondonderzoek uit te voeren. Het doel hiervan was om een beeld te verkrijgen omtrent de mogelijke betekenis van protease als indicator voor de C- en/of N-mineralisatie. In drie grondmonsters is, naast routine grondonderzoek door BLGG AgroXpertus, een aantal onderzoeksmethoden gebruikt: aerobe N-mineralisatie, potentieel mineraliseerbare N (PMN), Hot Water extractable Carbon (HWC) en potentiële C-mineralisatie. Deze analyses zijn uitgevoerd door Centrum Bodem van Wageningen Universiteit.

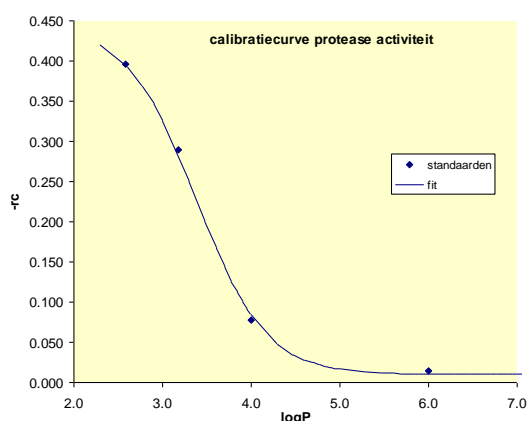
Uitvoering

Voor de verkenning van de enzymmethode heeft TNO een protease gevoelige coating gemaakt en aangebracht aan de binnenzijde van zogenoemde telflesjes. Hiervoor is een coating op basis van een ruthenium complex in een venette caseïne matrix gebruikt. Kenmerk van de gebruikte coating is dat deze wordt geëxciteerd met blauw licht (400-500 nm) en fluoresceert bij 610 nm. De fluorescentie wordt opgewekt met een 470 nm LED, uitgelezen met een 'fotomultiplier tube' (PMT) en genormaliseerd. Als de coating in aanraking komt met proteasen dan zullen twee effecten optreden; de intensiteit van de fluorescentie wordt lager (omdat de coating wordt afgebroken) en de fluorescentie levensduur wordt korter omdat de coating een meer open structuur krijgt. De fluorescentie levensduur is in dit onderzoek niet verder onderzocht op bruikbaarheid.

De meting van fluorescentie intensiteit als functie van protease concentratie laat een lineaire afname zien. De gemeten waarde van de fluorescentie wordt met behulp van een ijklijn vertaald in een waarde voor de

protease concentratie. De protease activiteit wordt uitgedrukt in logP, dat is de logaritme van de verdunningsfactor van een geconcentreerde protease oplossing. De detectiegrens ligt ongeveer bij log P = 5.

Voor het bepalen van de ijklijn is Flavourzyme gebruikt, dit is een commercieel verkrijgbare protease suspensie van Novozyme. Dit enzym heeft een optimale werking bij pH 5-7 en een temperatuur van 40 – 60 °C; bij kamertemperatuur blijft nog ca. 40% van de maximale activiteit over. Een aantal verdunningen is gemaakt met Flavourzyme, die vervolgens in contact zijn gebracht met de coating en waarvan de intensiteit van de fluorescentie gemeten is. De blanco, in dit geval een oneindige protease verdunning in PBS buffer, liet vrijwel geen afname zien; -0.0003 / hr over een periode van 2 uur Door nu de richtingscoëfficiënt van de intensiteitsafname per uur uit te zetten tegen de logaritme van de proteaseverdunding wordt een ijklijn verkregen (Figuur 4.1).



Figuur 4.1. Ijklijn protease activiteit.

Bij de eerste testen bleek dat de coating losliet van de glaswand van het flesje, waardoor geen meting mogelijk was. Met de nodige aanpassingen, te weten twee stukjes duct tape, bleek het uiteindelijk mogelijk om een coating op basis van proteasesubstraat te maken die wel vast bleef zitten. Daarmee is de volgende meetprocedure uitgevoerd:

- de grondmonsters eerst een half uur voorconditioneren in PBS buffer pH 7 (gefilterd over 0.22 µm filter);
- daarna ca. 3 g grond suspenderen in ca. 17 g PBS buffer pH7 (gefilterd over 0.22 µm filter); en
- daarna direct meten; het verloop in te tijd is gevolgd bij 20 °C met een meetfrequentie van 1 meting per 10 seconden. De suspensie is continu geroerd.

Als extra test is van een viertal monsters de enzymactiviteit geëlimineerd door ze uit te stoken, dat wil zeggen door ze gedurende een aantal dagen in een oven bij 120 °C te plaatsen. Het idee hierbij is dat er daarna geen microbiële activiteit en dus geen enzymactiviteit meer aanwezig is in deze monsters. Het is te verwachten dat er dan geen intensiteitsafname of in ieder geval veel minder afname zal zijn.

4.3 Resultaten

4.3.1 Optische methode

Meetwaarden

Bij veel grondmonsters bleek de signaalafname pas na een lag-time, een periode waarin nog geen activiteit wordt gemeten, van een aantal uren zichtbaar. Dit is een langere periode dan bekend is uit een andere toepassing van deze methode (bepaling van de houdbaarheid van levensmiddelen). In Tabel 4.2 zijn de resultaten met de grondmonsters samengevat. De waarde voor logP is een berekende waarde uit de ijklijn in Figuur 6. Waarden voor logP > 5 zijn niet erg betrouwbaar omdat de ijklijn in dat gebied vrij vlak is. Het werkgebied met deze methode is van logP = 2 tot 5. Meestal is er aan het begin sprake van een lag-time. Het getal bij dt in Tabel 4.2 geeft aan na hoeveel uur er een lineaire afname zichtbaar was waarin de richtingscoëfficiënt is bepaald. In de laatste kolom wordt een inschatting gegeven van de betrouwbaarheid, op basis van het ruispatroon, van het getal voor logP.

Tabel 4.2. Resultaten enzymactiviteit grondmonsters.

Monster	-rc (intensiteit per uur)	Log P	dt (uren)	betrouwbaarheid
blanco	0,0003	>6		+
M1	0,0662	4,1	1	+/-
M2	0,0049	>6	10*	+
M3	0,1898	3,5	2,7	+
M4	0,1011	3,9	3	+/-
M5	0,0186	4,9	3	-
M6	0,4231	2,2	0,25	-
M7	0,0165	5,0	4,5	+/-
M8	0,1103	3,9	2,7	+

* Van 0-3 uur een grillig verloop, van 3-8 uur vrijwel geen afname.

Effect hittebehandeling

De extra test met de hitte behandeling van een viertal monsters gaf een verrassend resultaat: in alle gevallen werd na de hitte behandeling zoals verwacht een snelle afname (min of meer exponentieel) zichtbaar, die echter niet daalde tot nul. De coating werd dus sneller afgebroken, maar de activiteit was niet geheel gestopt door de hittebehandeling. Een mogelijke verklaring is dat de gronddeeltjes zelf ook de coating aantasten, bijvoorbeeld door schuurwerking. Een verschil met de monsters die niet uitgestookt zijn is dat door het uitstoken een veel fijnere korrelstructuur wordt verkregen. Dit kan een schuureffect van de gronddeeltjes vergroten. Uit een lineaire fit over een vergelijkbare periode als bij de niet uitgegloeide monsters bleek dat in drie van de vier gevallen het uitgloeien leidde tot een afname van de enzymactiviteit (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Resultaten enzymactiviteit met uitgegloeide monsters.

Monster	-rc	Log P na uitgloeien	Log P voor uitgloeien
M3	0,0554	4,2	3,5
M4	0,0187	5,3	3,9
M6	0,1342	4,9	2,2
M8	0,0130	3,7	3,9

4.3.2 Landbouwkundig grondonderzoek

Het extra grondonderzoek is uitgevoerd in drie monsters uit de regio Meppel en betreft één gras- en twee maïspancelen (Tabel 4.4). De grondsoort van de drie percelen is een beekerdgrond. De twee maïspancelen liggen in elkaars verlengde en hebben een verschillende droogtegevoeligheid. De veehouder rapporteerde dat ook de gewasproductie verschillend is.

Tabel 4.5. Resultaten grondonderzoek drie gras- en maïspancelen.

Bepaling	gras (0-10 cm)	maïs1 (0-25 cm)	maïs2 (0-25 cm)
	M2	M3	M4
<i>Standaard grondonderzoek</i>			
OS%	7,4	3,6	4,9
Nt (N mg/kg)	2640	1470	1920
C/N-ratio	16	14	15
N-leverend vermogen (N kg/ha)	153	72	82
pH	5,3	4,9	4,7
C.E.C. (mmol ⁺ /kg)	67	38	53
bodemleven (N mg/kg)	108	37	64
<i>Aanvullend grondonderzoek</i>			
Ct (g/kg)	54	28	42
HWC (mg/kg)	2587	950	1067
Cum. Pot. C-mineralisatie 56 d. (g/kg)	0,53	0,29	0,33
Nt (mg/kg)	3,4	1,7	2,6
PMN (mg/kg)	130	47	54
N-mineralisatie op d. 56 (mg/kg)	162	91	94
Cum. N-mineralisatie 56 d. (mg/kg)	351	291	289

Het grondmonster uit grasland heeft zoals verwacht een betere bodemkwaliteit heeft dan de twee grondmonsters uit maïspancelen. De laatste twee onderscheiden zich van elkaar doordat maïs1 op vrijwel alle indicatoren lager scoort dan maïs2. Het patroon in de hoogte van alle waarnemingen is daardoor steeds gras > maïs2 > maïs1. Landbouwkundig hebben de meest in het oog springende verschillen te maken met de aanwezige stikstof (N), koolstof (C) en bodemleven, en verder met de C.E.C. (Cation Exchange Capacity).

4.3.3 Verband enzymactiviteit met grond- en/of gewassenmerken

Bandbreedte meetresultaat

Tabel 4.6 combineert de informatie over de herkomst van de grondmonsters met log P en de rangorde in protease activiteit. Zoals eerder gemeld is de activiteit van de protease activiteit omgekeerd aan log P. Wat opvalt in tabel 4-6 is dat voor de graspercelen de laagste log P (2,2) en dus de hoogste protease activiteit werd gevonden in het perceel gras op kleigrond (M6), direct gevolgd door de drie maïspancelen. De hoogste log P en dus de laagste protease activiteit werd gevonden in de twee percelen met jong grasland (M2 en M7). Het perceel met oud grasland (M1) scoort tussen de lage en de hoge waarden in.

De verschillen in protease activiteit van de drie maïspancelen zijn niet groot (log P 3,5 – 3,9). De waarden liggen rond het midden van de gemeten range (0-6).

Aanwijzing voor kwantitatief verband?

Uit combinatie van de gegevens van de drie percelen uit Tabel 4.5 met die uit Tabel 4.6 blijkt dat de protease activiteit (Log P) hetzelfde patroon volgt als de gemeten kenmerken van bodemkwaliteit. De hoogste waarde voor Log P werd gevonden voor het grasperceel, gevolgd door maïs2 en maïs1. Dit is een indicatie dat de gemeten activiteit van de proteasen mogelijk verband houdt met één of meer van de vastgestelde verschillen in bodemkenmerken.

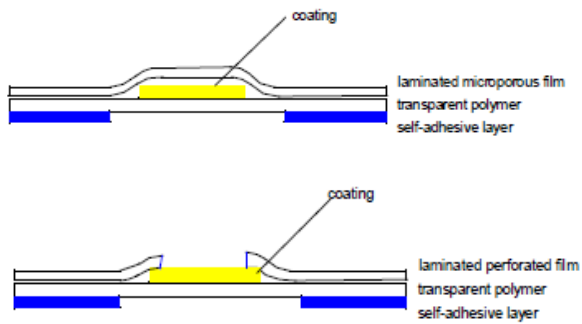
4.4 *Discussie*

Technische uitvoering

Een sterk punt van het gebruik van een sticker met coating is dat meerdere coatings tegelijk kunnen worden aangebracht. Dit biedt in principe de mogelijkheid om meerdere enzymactiviteiten tegelijk te meten. Om dit voordeel te kunnen benutten dient een aantal vragen te worden beantwoord. De eerste vraag betreft de oorzaak van het loslaten van de coating van de wand van het flesje; dit kon weliswaar met een aanpassing in de coating en met tape worden opgelost. Echter als de coating van elk enzym een aanpassing in de formulering vraagt, dan zal dit een extra inspanning vergen wat betreft de ontwikkeling van de methode. Het loslaten heeft mogelijk te maken met een schurende werking van de gronddeeltjes op de coating. Als van een schurende werking inderdaad sprake is, dan zou dit de meetresultaten nadelig beïnvloeden. Eens te meer omdat het mogelijk geen systematische fout zou zijn aangezien grondmonsters verschillen in textuur en daardoor mogelijk in schurende effect. Wat betreft de technische uitvoerbaarheid van de optische meetmethode is de vraag aan de orde of het gebruik van een sticker met coating voldoende robuust is voor toepassing in grond. Een mogelijk alternatief is het ontwikkelen van een sticker met ingebouwde coating die aan de ene kant goed op de glaswand kan worden bevestigd en aan de andere kant in contact staat met de suspensie van het grondmonster. In Figuur 4.2 zijn twee mogelijke uitvoeringen geschetst.

Tabel 4.6. Rangorde hoogste protease activiteit.

Monster	Grondsoort	Gewas	Diepte (cm)	N-niveau (N kg/ha)	Leeftijd/teeltduur	Log P	Rangorde enzymact.
blanco						>6	
M1	dekzand	gras	0-10	270	10 jr	4,1	4
M2	dekzand	gras	0-25	250	1e jaar, was maïs	>6	7
M3	beekeerd	maïs	0-25		continu	3,5	2
M4	beekeerd	maïs	0-25		continu	3,9	3
M5	beekeerd	gras	0-10	200	10 jr	4,9	5
M6	rivierklei	gras	0-10	200	5 jr	2,2	1
M7	rivierklei	gras	0-10	400	jong gras	5,0	6
M8	rivierklei	maïs	0-25		scheurperceel	3,9	3



Figuur 4.2. Mogelijke verbeteringen in de coating door gebruik van 1) microporeuze film; 2) geperforeerde film.

Het eerste alternatief is technisch makkelijker te maken maar kan tot een tragere respons leiden. De tweede suggestie is moeilijker te realiseren maar het gedrag van de coating zal vergelijkbaar zijn met de huidige aanpak. Overigens zijn voor de meting van andere enzymen dan proteasen, coatings met andere enzymsubstraten dan caseïne nodig. Ook dit is in principe mogelijk, maar de zoektocht naar de juiste biopolymeren zal enige tijd vergen.

Meting van enzymen in grond

In grond kunnen vele enzymen voorkomen en actief zijn. Gezien het principe waarop de meetmethode berust, is de methode alleen geschikt voor enzymen die gemeten kunnen worden met een fluorescerend assay. Voor zover dit kon worden nagegaan is dit voor de meeste bodemenzymen het geval.

De meetmethode is ontwikkeld met het oog op toepassing bij de houdbaarheid van levensmiddelen. De aanwezigheid van enzymen in grond is biochemisch gezien een geheel andere situatie, en de vraag dient zich aan of en op welke punten hiermee moet worden rekening gehouden. In de gekozen uitvoering is zoveel mogelijk aangesloten bij de bekende procedures uit zowel het enzym- als het grondonderzoek. Zo is een hoeveelheid van 3 g grond in suspensie gebracht met PBS als standaard buffer voor chemische oplossingen. In principe is het mogelijk om de suspensie te maken in een oplossing van 0,1M CaCl₂, zijnde het standaard extractiemiddel voor mineralen in grond. Het is echter niet bekend of CaCl₂ ook het juiste extractiemiddel is voor bodemenzymen, en wat het effect is van de combinatie van PBV en extractiemiddel op de enzymactiviteit in de suspensie.

Uit het literatuuronderzoek bleek onder andere dat enzymen tegen afbraak kunnen worden beschermd door adsorptie aan het klei-humuscomplex en dan al dan niet actief kunnen zijn. Van de klassieke enzymbepalingen is bekend dat schudden van het grondmonsters de meetwaarden beïnvloedt. Waarschijnlijk geldt dit ook voor het constant roeren van de suspensie zoals dat in deze meetronde heeft plaatsgevonden. Het is mogelijk dat door het roeren meer enzymen los komen van het klei-humuscomplex en actief worden. Dit kan betekenen dat de meting veeleer een potentiële dan een actuele waarde geeft van de enzymactiviteit. Ook kan het betekenen dat de meetwaarde betrekking heeft op voorheen opgebouwde enzymconcentraties en zo een directe relatie tussen maatregel en meetwaarde versluieren. Voor de resultaten van de onderhavige verkenning hebben deze zaken geen doorslaggevende betekenis. Het belang van genoemde punten dient echter nader te worden vastgesteld.

Bescherming door adsorptie zou ook een verklaring kunnen zijn voor het feit dat in één van de vier grondmonsters waarin de hittebehandeling was uitgevoerd, nog steeds enzymactiviteit werd gemeten. Wil men ten behoeve van het onderzoek enzymactiviteit kunnen uitsluiten, dan kan er wellicht een betere geschikte remstof worden gevonden (tolueen, gamma irradiatie). Afhankelijk van de specifieke enzymen waarvoor de methode verder wordt ontwikkelt, is nadere afstemming gewenst met de klassieke methoden van enzymonderzoek in grond.

Het meten van de enzymactiviteit vertoonde een 'lagfase' van enkele uren. Een verklaring hiervoor is dat de microbiologische activiteit (bacteriën, schimmels) eerst goed op gang moest komen om voldoende protease in de suspensie te verkrijgen. De waarneming van een lagfase is ook bekend uit incubatieproeven waarin de activiteit van bodemorganismen worden gevolgd in de tijd (bijvoorbeeld CO₂ onder aerobe omstandigheden, NH₃ onder anaerobe omstandigheden). Uiteraard hangt de duur van de lagfase mede af van de detectiegrens van de gebruikte apparatuur.

Mogelijk verband protease en N-levering in grasland

Aangezien het een verkenning betreft is volstaan met een dataset van beperkte omvang (geen herhalingen). Op voorhand zij gesteld dat de resultaten van deze dataset een indicatieve betekenis hebben waaraan geen absolute geldigheid mag worden toegekend.

De dataset bestond uit grondmonsters die verschilden in grondsoort, gewas (en daarmee bemonsteringsdiepte), N-niveau (alleen bij gras) en leeftijd/teeltduur. Uit vergelijking van de bandbreedte van de meetresultaten en deze bodem- en gewaskenmerken blijkt dat uit de metingen een onderscheid tussen deze bodem- en gewaskenmerken mogelijk maakt. Meest duidelijk is dit voor het kenmerk 'leeftijd/teeltduur', waarvoor de resultaten suggereren dat in een hoog productieve grasmat de proteaseactiviteit hoger is dan in een grasmat waarvan de productie hetzij nog op gang moet komen hetzij over het hoogtepunt heen is. Dit zou een aanwijzing zijn dat de concentratie en/of activiteit van protease groter is in een hoog productieve grasmat. Dit onderstreept het belang om deze activiteit te kunnen meten en sturen.

Het is voorts positief dat de eerste meetresultaten suggereren dat er sprake is van een correlatie tussen protease activiteit en N-mineralisatie. In de drie grondmonsters waarin aanvullend grondonderzoek is gedaan, blijken de proteaseactiviteit en de waarden van verschillende bodemkenmerken af te nemen in de volgorde Gras > Maïs 2 > Maïs 1. Dit komt overeen met resultaten die in wetenschappelijk onderzoek zijn gevonden. Zo is een verband tussen de protease activiteit en de C/N-ratio van verschillende substraten gerapporteerd door Geisseler & Horwath (2009), zij het bij een groter verschil in C/N-ratio's dan in onze dataset. De auteurs concludeerden dat proteasen en andere bodemenzymen waardevolle informatie kunnen geven over de mineralisatie van verschillende kwaliteiten organische stof. Ook Breulmann (et al., 2012) vonden sterke verbanden tussen de activiteit van onder andere proteasen en verschillende indicatoren voor het bodemleven en de kwaliteit van organische stof. Zij vergeleken laag en hoog productieve graslanden met elkaar en vonden dat hot water extractable carbon (HWC) niet alleen een centrale rol speelde in de activiteit van het gehele bodemvoedselweb, maar ook sterk gecorreleerd was met de protease activiteit in de bodem.

Deze eerste resultaten van een mogelijk kwantitatief verband tussen protease en N-levering levert een positief beeld op van een mogelijk kwantitatief verband tussen protease en N-levering in grasland. Gezien het belang van de N-mineralisatie voor de grasproductie doen we de aanbeveling om specifiek naar dit verband een vervolgonderzoek te starten. De benodigde acties hiervoor zijn:

- vaststellen van een goed verband tussen klassieke enzymmetingen voor protease en de metingen van de optische methode;
- afleiden van een calibratieverband tussen protease-activiteit (optische meetmethode) en N-mineralisatie en/of N-opname door het gewas, en
- validatie van het gevonden verband voor N-mineralisatie en/of N-opname.

5 Conclusie en aanbevelingen

Uit het literatuuronderzoek over de rol van bodemenzymen voor de bodemkwaliteit en de gewasproductie bleek dat bodemenzymen essentieel zijn voor de nutriëntenlevering aan de plant. Voorts spelen ze een rol bij de vorming van de bodemstructuur en de stabiliteit van ecosystemen. Voor de gewasproductie in de landbouw neemt het belang van enzymen toe bij afnemende bemestingsniveau's. Algemene conclusie is dat dit de noodzaak onderstreept om bodemmanagement op te nemen in een duurzame bedrijfsvoering. Het gewenste management is bij voorkeur gericht op het verkrijgen en in stand houden van optimale wisselwerking tussen organische stof en het bodemleven. Voor de advisering hierover is het gewenst dat meer relaties tussen teelt- en bodemaatregelen op de enzymactiviteit kwantitatief beschikbaar komen.

De belangrijkste conclusie uit de literatuur is dat er, zowel voor de gras- als de maïsteelt, perspectief is voor de ontwikkeling van bemestingsadviezen die rekening houden met de activiteit van enzymen. Concrete aanknopingspunten doen zich voor bij de teelt van gras wat betreft de N-mineralisatie en de enzymen protease en NAGase en bij de maïsteelt wat betreft de beschikbaarheid van fosfaat en zure fosfatasen en de rol van groenbemesters hierbij. Vervolgonderzoek naar deze opties is van harte aanbevolen.

De verkenning van de optische meetmethode heeft laten zien dat het technisch gezien mogelijk is om met deze methode enzymen in grond te meten. Echter de weg naar een adviesproduct op basis van deze technologie is nog lang. Het perspectief is voor één enzym vastgesteld, waarbij veel aandacht nodig was voor het vinden van een geschikte coating. Nog lang niet alle technische vragen zijn beantwoord, bijvoorbeeld de vraag of gronddeeltjes de coating aantasten. Voor andere enzymen zullen andere coatings moeten worden ontwikkeld.

De gehalten van het enzym protease in grondmonsters uit gras- en maïsland op zowel zand- en kleipercelen, bevinden zich niet alleen binnen de meetbare range van de optische technologie, ook lijkt er een correlatie te zijn tussen de gemeten enzymactiviteit en bodemkenmerken. Concreet suggereren de resultaten een relatie tussen de protease activiteit en de leeftijd van de graszode. Ook is er een aanwijzing gevonden voor een mogelijke correlatie van de gemeten enzymactiviteit van proteasen met bodemkenmerken aangaande de C- en N-mineralisatie en het bodemleven. Als deze waarnemingen in uitgebreider onderzoek bevestigd zouden kunnen worden, dan zou dit een directe aanleiding kunnen zijn om de meetmethode verder te ontwikkelen. Eerste eindproduct op basis van deze methodiek zou een N-bemestingsadvies kunnen zijn.

De bevindingen uit het literatuuronderzoek en de toetsing van de optische meetmethode bevestigen de veronderstelling dat de ontwikkeling van nieuwe adviesproducten op basis van bodemenzymen zinvol en mogelijk is. Zowel wat betreft de meting als de interpretatie van meetresultaten is aanvullend onderzoek nodig. Slotaanbeveling van deze verkenning is om in vervolgonderzoek beide aspecten op te nemen, waar nodig met aparte aandacht voor afzonderlijke kennisvragen, waar mogelijk gecombineerd en toewerkend naar een gevalideerd eindproduct.

Bronnen

- Allison SD (2006) Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem process. *Biogeochemistry* 81:361-373.
- Andrews RK, RL Blakeley & B Zerner (1989) Urease: A Ni(II)metalloenzyme. In: JR Lancaster Ed. *The bioinorganic chemistry of nickel*, pp.141-166. VCH Publishers, NY.
- Arias ME, JA González-Pérez, FJ González-Vila & AS Ball (2005) Soil health—a new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology* 8:13-21.
- Arinze AE & AG Yubedee (2000) Effect of fungicides on Fusarium grain rot and enzyme production in maize (*Zea mays* L.) *Global Journal Applied Science* 6(4):629-634.
- Bailey S, SJ Fansler, J L Smith & H Bolton Jr. (2010) Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biology & Biochemistry* 43:296-301.
- Baldwin JC, AS Karthikeyan & KG Raghothama (2001) LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology* 125:728-737.
- Balota EL, O Machineski, PV Truber & PAM Auler (2011) Effect of tillage systems and permanent groundcover intercropped with orange trees on soil enzyme activities. *Braz..Arch.Biol. Techn.* (54)2: 221-228.
- Bandick AK & RP Dick (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* 31:1471-1479.
- Baruah M & RR Mishra (1986) Effect of herbicides butachlor, 2,4-d and oxyfluorfen on enzyme activities and CO₂ evolution in submerged paddy field soil. *Plant Soil* 96:287-291.
- Bilen S, M Bilen & S Bardhan (2011) Effects The effects of boron management on soil microbial population and enzyme activities. *African Journal of Biotechnology* 10(27):5311-5319.
- Bopaiiah Jr H, LF Elliot, RI Papendick & DF Bezdicsek (1985) Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biology & Biochemistry* 17:297-302.
- Bothe H, MG Yates & FC Cannon (1983) Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. In: *Inorganic plant nutrition, Encycl. Plant Physiol. New Series Vol 15A* (A. Läuchli en RL Bielecki, eds.) p. 241-285, Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Bremner JM & RL Mulvaney (1978) Urease activity in soils. In: RG Burns (Ed.) *Soil Enzymes*, pp 146-196. Academic Press, London.
- Breulmann M, E Schultz, K Weißhuhn & F Buscot (2012) Impact of the plant community composition on labile soil organic carbon, soil microbial activity and community structure in semi-natural grassland ecosystems of different productivity. *Plant & Soil* 352:253-265.
- Buck C, M Langmaack & S Schrader (1999). Nutrient content of earthworm casts influenced by different mulch types. *Nutrient content of earthworm casts influenced by different mulch types. European Journal of Soil Biology* 35(1): 23-30.
- Burke DJ, MN Weintraub, CR Hewins & S Kalisz (2011) Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry* (43)4:795-803.
- Burns RG (1978) *Soil Enzymes*. Academic Press, NY.
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry* 14:423-427.
- Burns RG & MD Wallenstein (2010) Microbial extracellular enzymes and natural and synthetic polymer degradation in soil: current research and future prospects. In: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a changing world, 1-6 August 2010, Brisbane, Australië. pp. 67-69.
- Caldwell BA (2005) Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49:637-644.

- Caldwell BA, RP Griffiths & P Sollins (1999) Soil enzyme response to vegetation disturbance in two lowland Costa Rican soils. *Soil Biology & Biochemistry* 31:1603-1608.
- Cetin SC, S Iptas, I Duman, S Oztekin, O Duzdemir & AR Brohi (2010) Response of rhizospheric urease activity on cultivation of different pre-crops and different levels of N-fertilizer application in silage maize. *Fresenius Environmental Bulletin* 19(12a):2993-2999.
- Cohen MJ, JP Prenger & WF DeBusk (2005). Visible-Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Rapid, Nondestructive Assessment of Wetland Soil Quality. *Journal of Environmental Quality* 34:1422-1434.
- Creamer RE, P Bellamy, HIJ Black, CM Cameron, CD Campbell, P Chamberlain, J Harris, N Paresh, M Pawlett, J Poskitt, D Stone & K Ritz (2009) An inter-laboratory comparison of multi-enzyme and multiple substrate-induced respiration assays to assess method consistency in soil monitoring. *Biological Fertility of Soils* 45:623-633.
- Deng SP & MA Tabatabai (1994) Cellulase activity of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 26:1347-1354.
- Dick WA (1994) Soil enzymes activities as indicators of soil quality. In: JV Doran, DC Coleman, DF Bezdicek & BA Stewart (Eds.) *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA Special Publication No. 35, Soil Science Society of America & American Society of Agriculture, Madison, pp. 107-124.
- Dick, WA, Juma NG & MA Tabatabai (1983) Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. *Soil Science* 136(1):19-25.
- Dick WA & MA Tabatabai (1984) Kinetic parameters of phosphatase in soil and organic waste materials. *Soil Science* 137:7-15.
- Dilly O & HP Blume (1998) Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Catena supplement* (31):29 -36.
- Dora SA (2009) Long term fertilization on enzymatic activities in a preluvosol. *Analele Universității din Oradea*, Vol. XIV, pp. 259 -263.
- Doran JW (1980) Soil Microbial and Biochemical Changes Associated with Reduced Tillage *Soil Science Society America Journal* 44:765-771.
- Ekenler M & MATabatabai (2002) b-Glucosaminidase activity of soils: Effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils* 36:367–376.
- Fansler SJ, JL Smith, H Bolton & VL Bailey (2005) Distribution of two C cycle enzymes in soil aggregates of a prairie chronosequence. *Biology and fertility of soils* 42(1):17 -23.
- García-Ruiz R, V Ochoa, B Viñegla, MB Hinojosa, R Pena-Santiago, G Liébanas, JC Linares & JA Carreira (2009) Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: influence of seasonality and site features. *Applied Soil Ecology* 41: 305-314.
- García C & T Hernandez (1997) Biological and biochemical indicators in derelict soil subject to erosion. *Soil Biology & Biochemistry* 29:171-177.
- Geisseler D & WR Horwath (2009) Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzym activities in soil. *Pedobiologia* 53:87-98.
- Gil-Sotres F, C Trasar-Cepeda, MC Leirós & S Seoane (2005) Different approaches to evaluatin soil quality using biochemical properties *Soil Biology & Biochemistry* 37:877-887.
- Gupta VVSR & JJ Germide (1988) Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology & Biochemistry* 20: 777-786.
- He ZQ, CW Honeycutt, TS Griffin, RP Larkin, M Olanya, JM Halloran (2010) Increases of soil phosphatase and urease activities in potato fields by cropping rotation practices. *Journal of Food Agriculture & Environment* (8-2)2: 1112-1117.

- Huygens D, Schoupe J, Roobroeck D, Alvarezd M, Balocchie O, Valenzuelaf E, Pinocheta D & P Boeckx (2011) Drying–rewetting effects on N cycling in grassland soils of varying microbial community composition and management intensity in south central Chile. *Applied Soil Ecology* 48:270–279.
- Jan MT, P Roberts, SK Tonheim & DL Jones (2009) Pretein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 41:2272-2282.
- Karlen D L, Mausbach MJ, Doran JW, Cline RG, Harris RF & GE Schuma (1997) Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation. *Soil Science Society America Journal* 61:4-10.
- Kertesz MA, E Fellows & A Schmalenberger (2007) Rhizobacteria and Plant Sulfur Supply. *Advances in Applied Microbiology* 62:235-268.
- Kraft B, Strous M & HE Tegetmeyer (2011) Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology* 155:104– 117.
- Kremer RJ & J Li (2003) Developing weed-suppressive soils through improved soil quality management. *Soil & Tillage Research* 71:193-202.
- Kunze A, MD Costa, J Epping, JC Loffaguen, R Schuh & PE Lovato (2011) Phosphatase activity in sandy soil influenced by mycorrhizal and non-mycorrhizal cover crops. *Rev. Brasil. Ciencia Solo.* 2011(35)3: 705-711.
- Ladd, JN & RB Jackson. 1982. Biochemistry of ammonification. p. 173-210, 221-228. *In* F.J. Stevenson (ed), *Nitrogen in Agricultural Soils*. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Leinweber P, Jandl G, Baum C, Eckhardt KU & E Kandeler (2008) Stability and composition of soil organic matter control respiration and soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1496-1505.
- Makoi JHJR & PA Nsokidemi (2008) Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* Vol 7(3): 181-191.
- Malcolm RE & D Vaughan (1979) Comparative effects of soil organic matter fractions on phosphatase activities in wheat roots. *Plant & Soil* 117;126.
- Marx MC, M Wood & SC Jarvis (2001) A micro-plate fluorimetric assay for the study of enzyme activity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33:1633-1640.
- Mengel K & EA Kirkby (1987) *Principels of plant nutrition*. International Potash Institute, Bern.
- Mimmo T, JB Reeves III, GW McCarty & G Galletti (2002). Determination of Biological Measures By Mid-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy in Soils Within A Landscape. *Soil Science* 167: 281-287.
- Monreal CM & DW Bergstrom (2000) Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Canadian journal of soil science* 80(3):419 -428.
- Newton WE (2007) Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. *In: Biology of the nitrogen cycle*. Bothe H, Ferguson SJ & WE Newton (eds). Elsevier, Amsterdam. Pp. 109-131.
- Nayak S, Mishra CSK, Guru BC & M Rath (2011) Effect of phosphogypsum amendment on soil physico-chemical properties, microbial load and enzyme activities. *Journal Environmental Biology* (32)5:613-617.
- Nowaks J, K Kaklewskia & M Ligockib (2004) Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1553-1558.
- Paul EA & FE Clark (1989) *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press Inc., New York.
- Petkar AS & PK Rai (1992) Effect of fungicides on activity, secretion of some extra cellular enzymes and growth of *Alternaria Alternata*. *Ind. J. Appl. Pure Biol.* 7(1):57-59.
- Reeves JB III, GW McCarty & JJ Meisinger (2000). Near infrared reflectance spectroscopy for the determination of biological activity in agricultural soils. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 8: 161-170.
- Schaller K (2009) Soil Enzymes – Valuable Indicators of Soil Fertility and Environmental Impact. *Bulletin UASVM Horticulture*, 66(2):911-915.

- Schimel JP & MN Weintraub (2003) The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology & Biochemistry* 35:549-563.
- Schlöter M, HJ Bach, S Metz, U Sehy & JC Munch (2003) Influence of precision farming on the microbial community structure and functions in nitrogen turnover. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98:295-304.
- Sinsabaugh RL (1994) Enzymatic analysis of microbial pattern and processes. *Biology Fertility of Soils* 17:69-74.
- Sparling GP, TW Speir, KN Whale (1986) Changes in microbial biomass C, ATP content, soil phospho-monoesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 18(4):363-370.
- Speir TW & DJ Ross (1978) Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns RG (Ed.) *Soil Enzymes*, pp. 197-250. Academic Press, NY.
- Stacey G (2007) The rhizobium-legume nitrogen-fixing symbiosis. In: Bothe H, SJ Ferguson & WE Newton, *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam.
- Stevenson FJ (1986) *Cycles of Soil: C, N, P, S, Micronutrients*. John Wiley & Sons, NY
- Tabatabai MA (1982) Soil Enzymes. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical properties*. Soil Science Society of America Book Series No. 5.
- Tabatabai MA & JM Bremner (1971) Michaelis constants of enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* 3:317-323.
- Tabatabai MA (1994) Soil Enzymes. In: Weaver RW, Angle JS, Bottomley PS (Eds.) *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties*. SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America, Madison, Wis., pp. 773-833.
- Tabatabai MA & WA Dick (2002). Enzymes in soil. In: Burns, RG & Dick RP (eds.). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 567–596.
- Tabatabai MA, M Ekenler & ZN Senwo (2010): Significance of Enzyme Activities in Soil Nitrogen Mineralization, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(5): 595-605.
- Trasar-Cepeda C, MC Leiros M & F Gil-sotres (2008) Hydrolitic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2146-2155.
- Trasar-Cepeda M, M Leiros, S Seoane & F Gilsotres (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1867-1875.
- Vajantha B, KS Reddy & N Ramavatharam (2010) Effect of integrated nitrogen management on soil enzyme activities in maize. *Research on crops* 11(1):31-36.
- Wallenstein MD & MN Weintraub (2008) Emerging tools for measuring and modelling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2098-2106.
- Yadav RS & JC Tarafdar (2001) Influence of organic and inorganic phosphorous supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology Fertility of Soils* 34:140-143.
- Zhang H, W XiangHua, L Gang & Q Pei (2011) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Koeleria virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biology and Fertility of Soils* (47)5: 543-554.
- Zahir AZ, M Ateeq ur Rehman Malik & M Arshad (2001) Soil Enzymes: A review. *Journal of Biological Sciences* 1(5):299-307.
- Zibilske LM & JM Bradford (2003) Tillage effects on phosphorus mineralisation and microbial activity. *Soil Science* 168(10):677-685.