



## **Samenvatting en conclusies rapport 1405.N.10 “Enzymen als indicator voor bodemkwaliteit - Naar een snelle, routinematige optische bepaling”**

**Auteur(s): M.C. Hanegraaf; J.J.F. van Veen; M.J.G. de Haas; D.W. Bussink**

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, bijvoorbeeld, 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 meetmethode en van 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 enzymniveau 's 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 fosfatasen een rol bij het beschikbaar maken van fosfaat uit de organische stof. Fosfatasen 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 proefneming 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.