

# Ursache und Wirkung von atmosphärischen Stoffeinträgen in Kiefernforsten

Horst Schulz

## 1. Einleitung

In den Jahren zwischen 1991 bis 1999 wurden am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Kiefernbeständen an drei Standorten mit differenzierter Umweltbelastung umfangreiche Untersuchungen zur Vitalitätsbewertung von Kiefern durchgeführt. Die Ergebnisse mit unterschiedlichen Zielstellungen sind in SCHULZ et al. (2001, 2003) publiziert. Allerdings wurde bisher nicht der Versuch unternommen, die unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus und im Freiland erhobenen chemisch-biochemischen und ertragskundlichen Messdaten in ihrer Gesamtheit zu bewerten. Die Zielstellung ist von Interesse, da die Wachstumsverläufe der Kiefern unter Umweltbelastung erhebliche Abweichungen von der Dynamik bestehender Ertragstafeln zeigen (LEMBCKE et al. 1975). Insbesondere folgen die Wachstumsabläufe in Abhängigkeit von zeitlich veränderten atmosphärischen Stoffeinträgen keinem einheitlichen Trend (SCHULZ et al. 2019). Wahrscheinlich liegt die Ursache dafür auf ernährungsphysiologischer Ebene. In den folgenden Ausführungen wird daher unter Einbeziehung aller bisher erhobenen Messdaten der Versuch unternommen, die Frage zu beantworten, warum Kiefern auf wechselnde atmosphärische schwefel- und stickstoffhaltige Stoffeinträge im Zusammenhang mit dem Auftreten von Schadsymptomen an den Assimilationsorganen verschieden im Wachstum reagieren.

## 2. Material und Methoden

Die Untersuchungsgebiete Neuglobsow, Taura und Rösa sowie Methoden zur Analyse von chemischen und biochemischen Parametern (Biomarker) in Kiefernadeln, Humusaufgaben und Kiefernborke sind in diversen Arbeiten beschrieben. Für detaillierte Angaben zu einigen speziellen Methoden (z. B. natürliche Isotopenverhältnisse) sei auf SCHULZ et al. (1996, 2001, 2003, 2004, 2012, 2019) verwiesen.

### *Kiefernadeln*

Die Entnahme von Kiefernadeln erfolgte Mitte Oktober in 60- bis 80-jährigen Kiefernbeständen an 15 zufällig ausgewählten Probestämmen in jeweils 5 Testflächen pro Testgebiet unter Einsatz einer mobilen Hebebühne. Von jedem Baum wurde aus der lichten Krone ein Ast entnommen, von der Hauptachse und einem Seitenast je ein Jahrestrieb (1. Jahrgang, halbjährige Nadeln) abgetrennt und abgetrennte Nadeln zu gleichen Anteilen zu einer Mischprobe vereinigt. Ein Teil der Nadelmischprobe wurde in Flaschen aus Polyäthylen gefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu Probenaufarbeitung im Labor darin aufbewahrt. Der andere Teil der Nadelmischprobe wurde zu Nadeln trockenmaterial auch im Labor aufgearbeitet.

### *Nadelfrischmaterial*

Die Nadeln wurden mit einer Schere grob zerschnitten und in Teflon-Gefäßen mit Mahlkugeln in flüssigem Stickstoff für 2 Minuten mit einer Schwingmühle pulverisiert. Das Nadelfrischpulver wurde im Tiefkühlschrank bei  $-25^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse biochemischer Inhaltsstoffe, z. B. Pigmente, Aminosäuren, Antioxidantien (z. B. Glutathion, Glutathiondisulfid, Ascorbat, Dehydroascorbat) und Enzymen (z. B. Superoxiddismutase, Glutathionreduktase, Phosphoenolpyruvatcarboxylase) gelagert.

### *Nadeltrockenmaterial*

Frische Nadeln wurden zunächst für 1h bei 100 °C erhitzt und dann bis zur Gewichtskonstanz bei 60 °C für ca. 72 h getrocknet. In einer Kugelmühle wurden die trockenen Nadeln zu Trockenpulver gemahlen und in braunen Glasflaschen bei Zimmertemperatur bis zur chemischen Analyse z. B. von Gesamtstickstoff ( $N_t$ ), Nicht-Protein-Stickstoff (NPN), Gesamtschwefel ( $S_t$ ) und Sulfat-Schwefel ( $SO_4S$ ) aufbewahrt.

### ***Chemische Analyse von Nadelinhaltsstoffen im Trockenpulver (Nadeln nach Trocknung gemahlen und bei 20°C gelagert)***

#### ***Analyse von Gesamt-Stickstoff ( $N_t$ )***

Kjeldal-System von Büchi mit N-Aufschluß (B 435) und Destillations-Einheit (Unit B 339).

*Chemikalien für Aufschluß:* 95-97% Schwefelsäure z.A., Wieninger-Katalysator-Gemisch.

*Titration:* 32% Natronlauge z.A.; 2% Borsäure z.A. pH 4,5-4,7; Schwefelsäure 0,05 N.

#### *Chemische Analyse*

250 mg Nadeltrockenpulver wurden auf Zigarettenpapier eingewogen, zusammen im Kjeldal-Kolben unter Zusatz von 20 ml konz. Schwefelsäure und 5 g Wieninger-Katalysator-Gemisch versetzt und unter Sieden im Wasserbad für 40 Minuten aufgeschlossen. Die Aufschluß-Lösung wurde mit 60 ml 32% NaOH alkalisiert und mittels Wasserdampf-Destillation freigesetztes Ammoniak ( $NH_3$ ) in eine Borsäurevorlage (60 ml) destilliert. Anschließend wurde mit 0,05 N Schwefelsäure auf den Anfangs pH-Wert zurücktitriert. Eine Volumenkorrektur (0,05 N  $H_2SO_4$ ) wurde mit einer identisch behandelten Bestimmung (Blindprobe Zigarettenpapier) ohne Nadelpulver durchgeführt.

#### ***Analyse von löslichem Nicht-Protein-Stickstoff (NPN)***

*Chemikalien für Extraktion und Aufschluß:* Trichloressigsäure(TCA) 10% z.A., 95-97% Schwefelsäure z.A., Wieninger-Katalysator-Gemisch.

*Titration:* 32% Natronlauge z.A., 2% Borsäure Lösung z.A. pH 4,5-4,7, Schwefelsäure 0,05 N.

#### *Chemische Analyse*

500 mg Nadeltrockenpulver wurden auf Zigarettenpapier eingewogen, in 100 ml Maßkolben mit 20 ml TCA versetzt, der Meßkolben mit Inhalt gewogen (Anfangsgewicht) und im Wasserbad unter Sieden für 40 Minuten erhitzt. Zur vollständigen Proteinfällung wurden die Extrakte über Nacht bei 5°C im Kühlschrank aufbewahrt, anschließend auf das Anfangsgewicht mit bidest. Wasser wieder aufgefüllt, über Papierfilter filtriert und 10 ml Filtrat unter Zusatz von 20 ml konz. Schwefelsäure und 5 g Wieninger-Katalysator-Gemisch im Kjeldal-Kolben unter Sieden im Wasserbad für 40 min. aufgeschlossen. Die Aufschluß-Lösung wurde mit 60 ml 32% NaOH alkalisiert und mittels Wasserdampf-Destillation freigesetztes Ammoniak ( $NH_3$ ) in eine Borsäurevorlage (60 ml) destilliert und anschließend mit 0,05 N Schwefelsäure auf den Anfangs pH-Wert zurücktitriert. Eine Volumenkorrektur (0,05 N  $H_2SO_4$ ) erfolgte mit einer identisch behandelten Bestimmung (Blindprobe Zigarettenpapier) ohne Nadelpulver.

### ***Analyse von Gesamtschwefel (S<sub>t</sub>)***

Analysator S-mat 5500 (Ströhlein GmbH).

*Chemikalien:* Silbersulfat z.A., Verbrennungsschiffchen aus Porzellan (unglasiert)

*Chemische Analyse*

100-150 mg Nadelnadelpulver wurden bei 1350 °C im Sauerstoffstrom (99,95% O<sub>2</sub>) verbrannt. Das freiwerdende Schwefeldioxid wurde in einer IR-Durchflußmeßzelle detektiert. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde ein Kohlestandard (National Institute of Standards and Technology, USA) verwendet. Die Kalibrierung des Gerätes wurde zusätzlich durch eine Referenzprobe (Nadelstandard) mit bekanten S-Gehalt überprüft.

### ***Analyse von Sulfat***

Dionex Ionenchromatograph DX 500.

Trennsäule: IonPac AS12A, Elutionsmittel: 2,7 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,3 mM NaHCO<sub>3</sub> und einer Flußrate von 1,5 ml/min, isokratisch. Die Datenauswertung mit Dionex Peaknet Version 4.11a.

*Chemische Analyse*

500 mg Nadelnadelpulver wurden mit 25 ml Reinst-Wasser 40 Minuten extrahiert (Schüttelmaschine). Der Extrakt wurde zentrifugiert und durch ein Celluloseacetat-Membran-filter (0,45 µm) filtriert. Je nach S-Gehalt wurde der Extrakt mit Reinst-Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt und 50 µl als Probevolumen zur ionenchromatischen Analyse eingesetzt.

### ***Biochemische Analyse von Nadelinhaltsstoffen im aufgearbeiteten Frischmaterial (Nadeln frisch bei -80°C pulverisiert und gelagert bei -25°C)***

#### ***Analyse von Pigmenten nach Lichtenthaler und Wellburn (1983)***

*Chemische Analyse*

250 mg Nadelfrischpulver wurden mit 5 ml Wasser und Seesand im Mörser mit Pistill homogenisiert, über Glaswolle filtriert und mit Aceton auf 25 ml im Maßkolben aufgefüllt. Die Extinktion (E) des Pigmentextraktes wurde mit einem Spektralphotometer bei 470 nm, 646 nm und 663 nm bestimmt.

*Berechnung der Pigmentgehalte:*

Chlorophylla bzw. Chla (µg pro ml Extrakt) = 12,21\* E (663nm) - 2,81\* E (646nm)

Chlorophyllb bzw. Chlb (µg ml pro ml Extrakt) = 20,13\* E (646nm) - 5,03\* E (663nm)

Carotinoide (µg pro ml Extrakt) = (1000\* E (470nm) - 3,27\* Chla - 104\* Chlb) / 229

Pigmentgehalt (µg pro g TM) = ((25 ml Acetonextrakt \* Pigmentkonzentration (µg pro ml Extrakt) / g Einwaage Trockenmasse (TM)).

#### ***Analyse von Aminosäuren***

HPLC-Anlage der Firma Merck (Merck, Darmstadt, Germany). Niederdruck-Gradientensystem bestehend aus: L-6200 Pumpe, AS-4000 Autosampler mit gekühlten Rack, Säulenofen und F-1080 wellenlängen-variablen Fluoreszenzdetektor; Excitationswellenlänge: 265 nm, Emissionswellenlänge: 310 nm. Die Integration der Chromatogramme und die Kontrolle des Gradienten erfolgte in Kombination mit einem D-6000 Interface und der Merck Software HPLC-Manager Version 2.0.

*Chemikalien:* Lösungsmittel: Acetonitril, Aceton, Tetrahydrofuran (HPLC-Reinheit), Triethylamin, 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC), Adamantylamin (ADAM) von höchst möglich lieferbarer Reinheit; Stammlösungen (1 mM): von Asparagin (ASN), Asparaginsäure (ASP), Glutamin (GLN), Glutaminsäure (GLU), Serin (SER), Arginin (ARG), Ornithin (ORN) und Norvalin (NOR) als interner Standard (IS). Verdünnungen der Standardgemische wurden vor der Analyse durchgeführt.

#### *Extraktion der Aminosäuren aus dem Nadelfrischpulver*

700 mg Nadelfrischpulvers wurden für 1 Minute in 7 ml 4 %-iger Sulfosalicylsäure und 200 µl einer 1 mM Norvalin-Lösung (IS) homogenisiert (Ultra Turrax T 25, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). Anschließend wurde das Homogenat für 1 h bei 4°C inkubiert und nachfolgend 5 min bei 4°C und 26500xg zentrifugiert. 4 ml des Überstands wurden in einen 5 ml Maßkolben pipettiert und nach Zugabe von 100 µl einer 30 %-igen NaOH mit 4 %-ige Sulfosalicylsäure (pH 3) aufgefüllt. Zur Entfernung von Schwebstoffen wurden die Extrakte membranfiltriert (Celluloseacetat-Membranen, 45 µm) und bei -30°C bis zur Analyse aufbewahrt.

#### *Derivatisierung*

Der Reaktionsansatz zur Derivatisierung der Aminosäuren enthielt: 30 µl Rohextrakt, 150 µl FMOC (2,5 mM in Aceton) und 100 µl Borat-Puffer (1 M Borsäure pH 7,8 eingestellt mit 30 %-ige NaOH). Nach 3-minütigem Schütteln ist die Reaktion beendet. Durch Zugabe von 200 µm ADAM (25 mM) wurde der Überschuss an FMOC entfernt, 1 min geschüttelt und anschließend die Reaktionslösung mit dem Start-Eluenten zur geeigneten Konzentration für die Analyse verdünnt. Die Aufbewahrung der FMOC-Aminosäurederivate erfolgte in gekühlten Racks von einem Autosampler bei 10°C bis zur chromatographischen Analyse.

#### *Bedingungen der chromatographischen Analyse*

Stationäre Phase: Supersphere C8-60 4 µm (Merck, Darmstadt, Germany); Säule: 125 x 4 mm I.D; Säulentemperatur: 30°C; Injektionsvolumen: 5 µL; Mobile Phase: Eluent A: Na-Acetat Puffer-Acetonitril-Tetrahydrofuran-Triethylamin-Lösung im Verhältnis 79:20:0,5:0,5 (v/v/v) die zusätzlich 0,1 mM EDTA enthält; Eluent B: Na-Acetat Puffer-Acetonitril-Tetrahydrofuran-Triethylamin-Lösung im Verhältnis 20:79:0,5:0,5 (v/v/v/v).

Na-Acetat Stammlösung: Eine 100 mM Essigsäurelösung wurde mit einer 30 %-igen NaOH auf den pH-Wert von 4,2 eingestellt, anschließend wurde die Pufferlösung membranfiltriert (0,45 µm). Gradient: 0 min, 50% B; 28 min 100% B; 28-35 min 100% B; Flußrate: 1 ml/min.

#### *Kiefernborcken*

Zur Entnahme von Borckenproben in 0,5 mm Profiltiefe am Baumstamm wurde ein speziell dafür konstruierter Probenehmer eingesetzt (SCHULZ et al. 2001). Die Proben wurden von 25 Bäumen pro Testfläche (60- bis 80-jährige Kiefern) an der nicht von Flechten bewachsenen Baumseite in ca. 1,3 m Höhe (Brusthöhe) entnommen. Die Aufbewahrung und der Transport der Proben erfolgte in Polyethylen-Flaschen. Zur chemischen Analyse wurde das Probenmaterial mit einer Kugelmühle (Edelstahlkugeln mit Teflonbeschichtung) zu einem Pulver homogenisiert und vor der Analyse über Nacht gefriergetrocknet. Im Borckenpulver können lösliche Anionen u.a. Ammonium, Nitrat und Sulfat, lösliche Kationen u. a. Calcium, Eisen sowie sonstige Elemente, Schwermetalle und organische Fremdstoffe aller Art, z. B. Bestandteile von Heizungs- und Autoabgasen und Pestizide einschließlich natürliche Isotopenverhältnisse ( $\delta$ -Werte), z. B. von Koh-

lenstoff, Stickstoff, Schwefel und Sauerstoff nachgewiesen werden. Siehe auch UFZ-Bericht Nr. 21/1997.

### ***Analyse von Ammonium mit der gassensitiven Elektrode***

Für die Analyse wurde eine gassensitive Elektrode (NH 500/2, WTW) in Verbindung mit dem Microprocessor-Hochleistungs-pH-Ionen-Meter pMX 3000 eingesetzt.

*Chemikalien:* 1%-ige K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung; 10 M NaOH-Lösung; NH<sub>4</sub>Cl-Standardlösung 1 g pro L.

*Extraktion:* 6,25 g getrocknetes Borkenpulver wurden mit 25 ml 1%iger K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt, 40 Minuten bei 240 U min<sup>-1</sup> geschüttelt bzw. extrahiert und anschließend durch Papierfilter filtriert. Die Extraktionslösungen wurden je nach Ammonium-Gehalt bis zu 1:10 mit 1%tiger K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung verdünnt.

### ***Chemische Analyse***

Die Kalibrierung des Meßgerätes erfolgt durch eine 2-Punkt-Kalibrierung mit zwei Ammonium-Lösungen (30 ml von einer 0,5 bzw. 20 mg L<sup>-1</sup> Standardlösung in 1%iger K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung). Die Analysenlösung (30 ml) wurde zu Beginn der Messung mit 0,3 ml 10 M NaOH-Konditionierlösung alkalisiert.

*Berechnung:* Meßwert \* Verdünnungsfaktor \* 0,025 L / Einwaage = mg g<sup>-1</sup> TM Borke.

### ***Analyse von Nitrat und Sulfat***

Es wurde der Ionenchromatograph (DX 500, Dionex) mit Trennsäule PAC AS12A und einem Eluenten von 2,7 mM Natriumcarbonat/0,3 mM Natriumhydrogencarbonat bei einer Flußrate von 1,5 ml. Das Probevolumen betrug 50 µl eingesetzt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Datenauswertung Dionex Peaknet Version 4.11a.

*Chemikalien:* Natriumsulfat, Natriumnitrat Suprapur, Phthalsäure z.A., konz. Kalilauge, Aceton z.A.

*Extraktion:* 500 mg Borkenpulver wurden mit 25 ml deionisiertem Wasser versetzt, 40 Minuten bei 240 U min<sup>-1</sup> auf dem Schüttler extrahiert und der Extrakt durch Celluloseacetat-Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Die Analysenlösung wurde je nach Gehalt bis zu 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

### ***Bestimmung von Depositionsraten***

Die Bestimmung von Eintrags- bzw. Depositionsraten erfolgte auf der Basis von Kalibrierfunktionen, die durch Vergleichsmessungen mit Bulk-Sammlern in Kiefernbeständen entlang eines Depositionsgradienten ermittelt wurden (modifiziert nach SCHULZ et al. 1997, MEYER et al. 2008).

*Berechnung :*

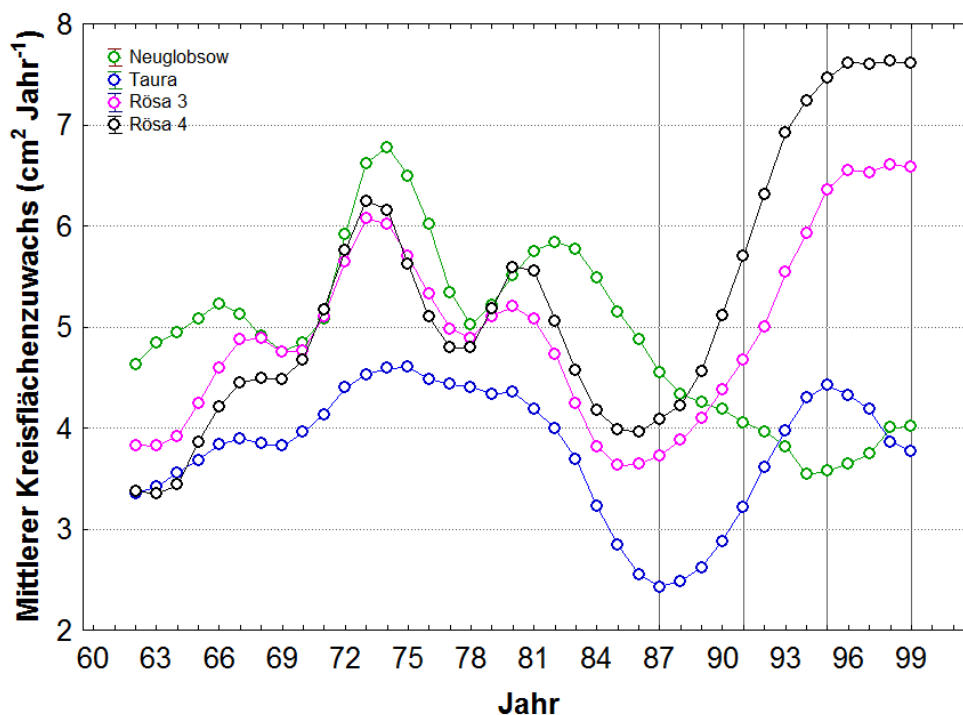
$$\text{SO}_4\text{S} \text{ (kg ha}^{-1} \text{ Jahr}^{-1}\text{)} = 8,4597 + 19,9282 * \log_{10} (\text{SO}_4\text{S}) \text{ mg g}^{-1} \text{ Borke}$$

$$\text{NO}_3\text{N} \text{ (kg ha}^{-1} \text{ Jahr}^{-1}\text{)} = 48,8668 + 40,7456 * \log_{10} (\text{NO}_3\text{N}) \text{ mg g}^{-1} \text{ Borke}$$

$$\text{NH}_4\text{N} \text{ (kg ha}^{-1} \text{ Jahr}^{-1}\text{)} = 12,3305 + 13,5359 * \log_{10} (\text{NH}_4\text{N}) \text{ mg g}^{-1} \text{ Borke}$$

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die mittleren Wachstumsverläufe der Kiefernbestände an den drei Untersuchungsstandorten Neuglobsow, Taura und Rösa zeigen im Zeitraum zwischen 1960 und 1999 signifikante Unterschiede. In Rösa waren die Standardabweichungen im jährlichen Kreisflächenwachstum zwischen den einzelnen Testflächen (Wiederholungen) so groß, dass zwischen zwei Gruppen Rösa 1 und Rösa 2 zu unterscheiden ist (**Abb.1**). Besonders auffällig waren die zeitlichen Wachstumsverläufe im Untersuchungszeitraum zwischen 1991 und 1999. Während die Kiefernbestände in Neuglobsow das Wachstum im Untersuchungszeitraum kontinuierlich verringerten, reagierten die Bestände in Taura zunächst mit einer Wachstumssteigerung bis 1995. Im Gegensatz dazu stieg das Wachstum der Kiefern in Rösa bis 1999 stetig an. Diese Trends im Wachstum der Kiefern waren mit den zeitlichen Veränderungen atmosphärischer Stoffeinträge in den Untersuchungsgebieten nicht zu erwarten zumal an allen drei Standorten sich sowohl die  $\text{SO}_2$ -Immissionen als auch die Depositionen von Sulfat im Untersuchungszeitraum signifikant reduziert haben.

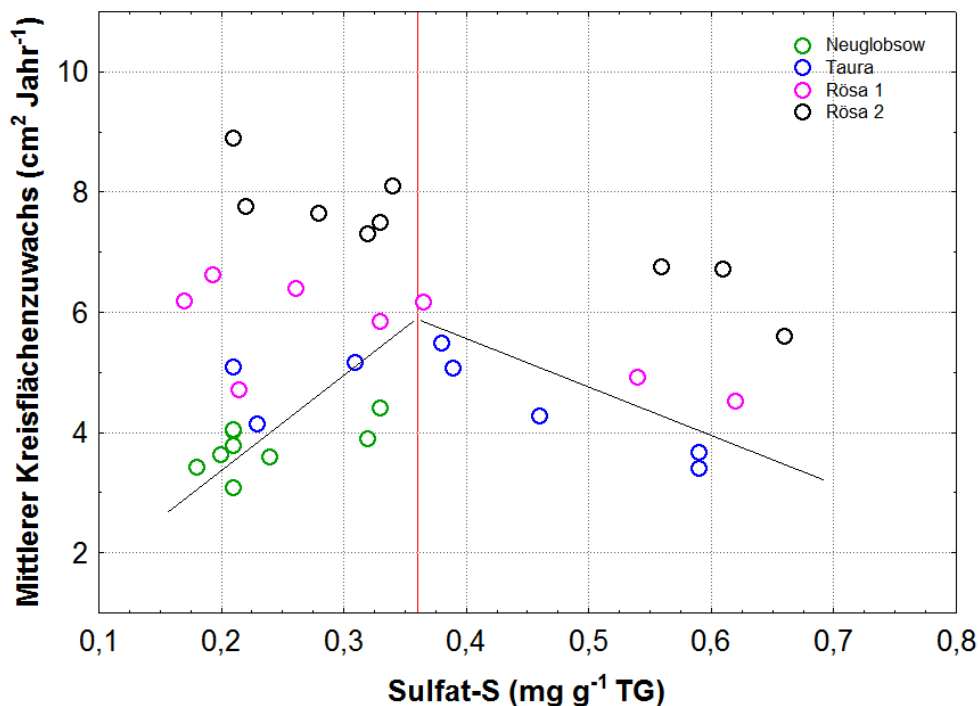


**Abb.1** Zeitlicher Verlauf des Kreisflächenzuwachses (Mittelwerte, Trenddarstellung, EPANECHNIKOV- Kern) von Kiefernbeständen an den Standorten Neuglobsow, Taura und Rösa.

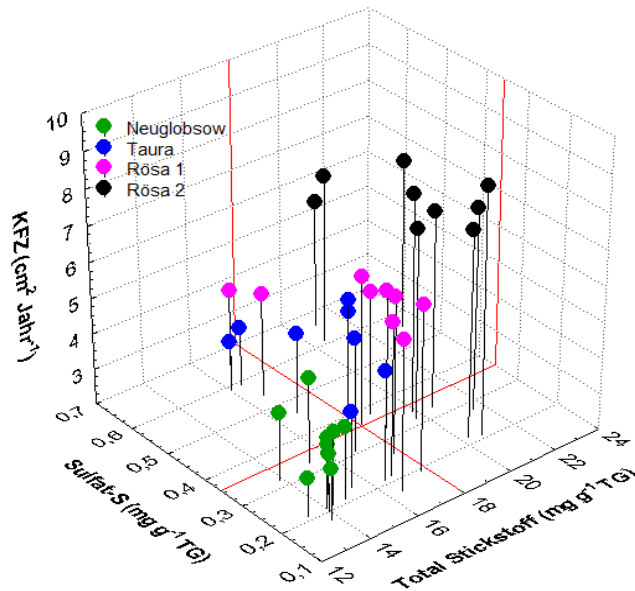
Ab 1987/88 verringerten sich die Immissionen und Depositionen von  $\text{SO}_2$  und Sulfat, aber nicht in gleichem Maße die Immissionen von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_x$ .

Zur Aufklärung der unterschiedlichen Wachstumsverläufe wurden die in Kiefernadeln analysierten Fraktionen schwefel- und stickstoffhaltiger Inhaltsstoffe herangezogen (SCHULZ et al. 1998). In **Abb.2** ist das Kreisflächenwachstum in Abhängigkeit vom Sulfat Gehalt der Kiefernadeln graphisch dargestellt. Die Grafik zeigt, dass das Wachstum der Kiefern nicht allein vom Sulfat Gehalt beeinflusst wird. Während das Wachstum der Kiefern am ehemals hoch belasteten Standort Rösa bei Sulfat Gehalten geringer  $0,36 \text{ mg S g}^{-1} \text{ TG}$  ansteigt, ist das Wachstum am ehemals geringer  $\text{SO}_2$ -belasteten Standorten Neuglobsow verringert. Der Befund stimmt mit den

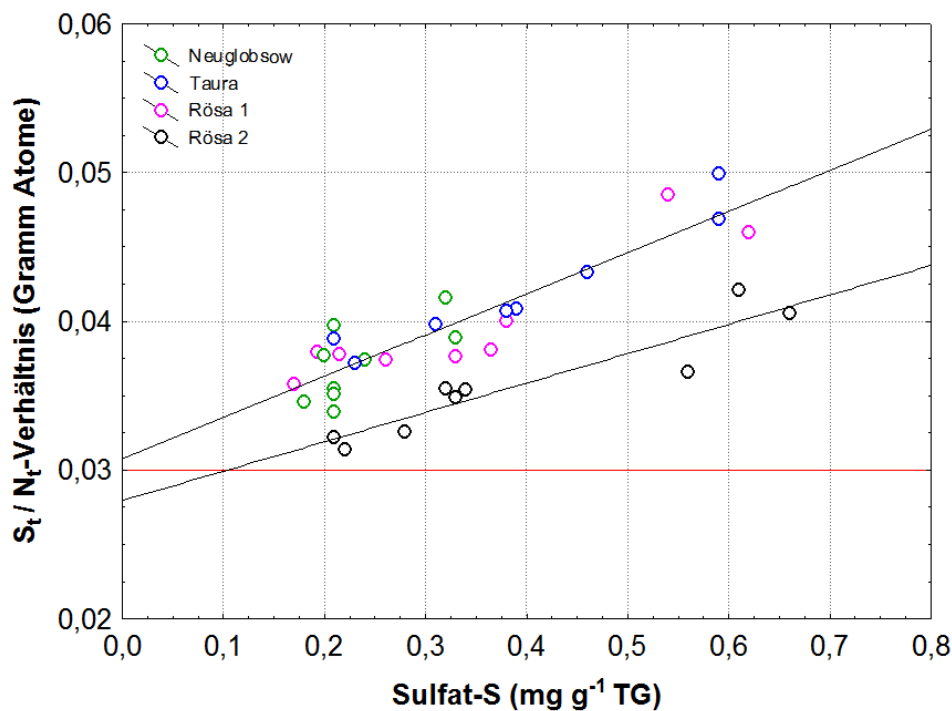
gemessenen Wachstumsverläufen überein (**Abb.1**). Ausschlaggebend ist der N-Gehalt der Kiefernadeln. Das Wachstum der Kiefern ist vom S- und N-Gehalt der Nadeln abhängig. Bis zu Nadelgehalten von maximal 0,36 mg Sulfat-S und 18 mg N<sub>t</sub> g<sup>-1</sup> TG kann die Kiefer Auswirkungen von Schwefeldioxyd auf das Wachstum kompensieren (**Abb.3**). Bei höheren Sulfat Gehalten stellen sich Ungleichgewichte in der S- und N-Ernährung mit Wachstumsstörungen ein. Nach MALCOLM und GARFORTH (1977) beträgt bei einer ausgewogenen S- und N-Ernährung der Kiefernadeln das Verhältnis von einem auf Gramm-Atome berechneten S-Gehalt (S<sub>t</sub>) und N-Gehalt (N<sub>t</sub>) konstant 0,030. Abweichungen von diesem Wert nach oben oder unten zeigen S-Überernährung durch Anreicherung von Sulfat-S (Neuglobsow, Taura und Rösa 1) oder N-Überernährung durch Anreicherung von NPN (Nicht-Protein-N) in Rösa 2 an (**Abb.4**). Die spezifischen Wachstumsabläufe der Kiefernbestände im Untersuchungszeitraum 1991 bis 1999 lassen sich also auf variierende Sulfat Gehalte bei unterschiedlicher N-Ernährung der Nadeln zurückführen. Bei N-Gehalten über 18 mg g<sup>-1</sup> TG folgt das Wachstum in Abhängigkeit vom Sulfat Gehalt nicht mehr einer Optimums-Kurve (Abb.2), sondern steigt bei einem sich verringernenden Sulfat Gehalt auch unter 0,36 mg S g<sup>-1</sup> TG weiter an. Daher konnten die in den 60er Jahren durch hohe SO<sub>2</sub>-Immissionen verursachten Wachstumsstörungen durch Düngung der Kiefernbestände mit 120 kg Harnstoff-N/ha zwischen 1970-85 kurzfristig kompensiert werden (**Abb.1**).



**Abb.2** Kreisflächenzuwachs in Abhängigkeit vom Sulfat Gehalt halbjähriger Kiefernadeln. Bei einem N-Gehalt unter 18 mg g<sup>-1</sup> TG durchläuft das Wachstum mit zunehmendem Sulfat Gehalt ein Optimum bei 0,36 mg S g<sup>-1</sup> TG.



**Abb.3** Kreisflächenzuwachs (KFZ) in Abhängigkeit vom Sulfat und Stickstoff Gehalt in halbjährigen Kiefernnadeln. Die Grenzkonzentrationen liegen bei 0,36 mg  $\text{SO}_4\text{-S}$  und 18 mg N pro g TG.



**Abb.4** S/N-Verhältnis in Abhängigkeit vom Sulfat Gehalt halbjähriger Kiefernnadeln. Bei einer ausgewogenen Ernährung mit Schwefel und Stickstoff ist das atomare S/N-Verhältnis = 0,030. Abweichungen nach oben oder unter indizieren Ernährungsstörungen.

Allerdings blieben im Rahmen der Feldstudie weitere Fragen offen. Unerklärlich waren zum Beispiel die an 2-jährigen Kiefernnadeln auftretenden Schadsymptome in Form von Spitzennekrosen. Selbst bei drastisch reduzierter  $\text{SO}_2$ -Belastung in 1999 zeigten Kiefernnadeln an den Standorten Taura und Rösa nach wie vor nekrotische Nadelspitzen. Zu Aufklärung der Ursachen wurden Metabolite des S- und N-Stoffwechsels einschließlich Isotopenverhältnisse des Schwe-



fels, Sauerstoffs und Stickstoffs in Kiefernadeln sowie Bodenkennwerte in Humusauflagen untersucht.

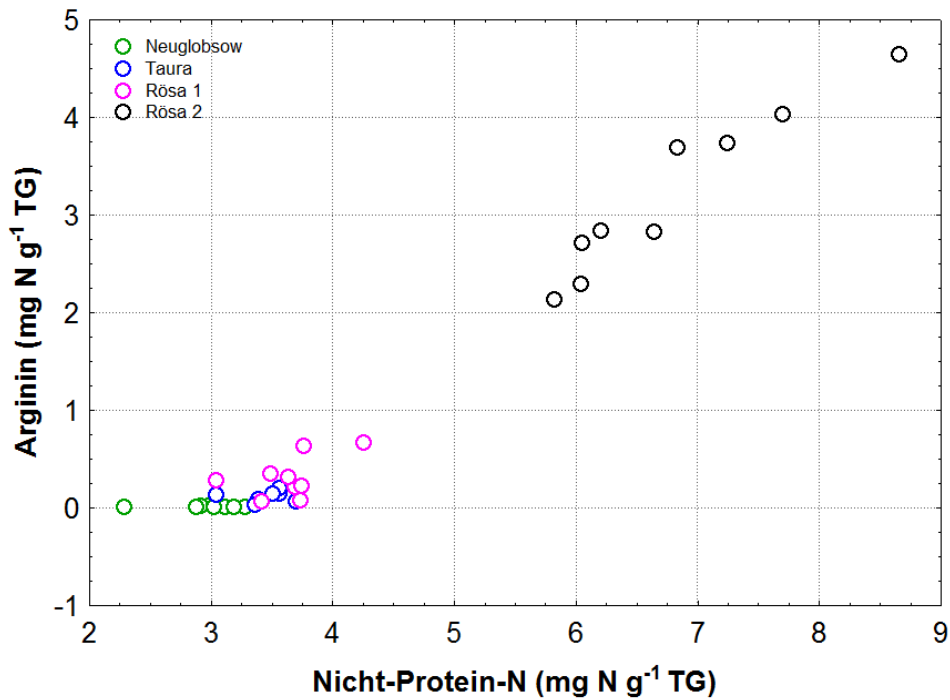
### **Oxidativer Stress**

Die Schadwirkung von  $\text{SO}_2$  beruht auf Oxidation von Hydrogensulfit-Ionen zu Sulfat im Photosystem II der Chloroplasten (ASADA und TAKAHASHI, 1987). Dabei entstehen Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid mit hohem Oxidationspotenzial. Zur Abwehr der Sauerstoffspezies bzw. von oxidativen Stress verfügen Pflanzenzellen über Schutzsysteme. Im Ascorbat-Glutathion-Zyklus (FOYER und MULLINEAUX, 1994) werden die reaktiven Sauerstoffspezies entgiftet, wobei über eine Redoxkette Elektronen von NADPH (Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat) durch die Enzyme Glutathion Reduktase, Dehydroascorbat Peroxidase, Ascorbat Reduktase und Superoxiddismutase über Glutathion und Ascorbat auf Sauerstoff übertragen werden. Ist das Schutzsystem bei hohen  $\text{SO}_2$ -Konzentrationen überfordert, zerstören die reaktiven Sauerstoffspezies die Zellmembranen der Nadeln. In Folge kommt es zum Chlorophyllabbau mit anschließender Ausbildung von Chlorosen und Nekrosen an den Nadelspitzen (**Abb.5**).

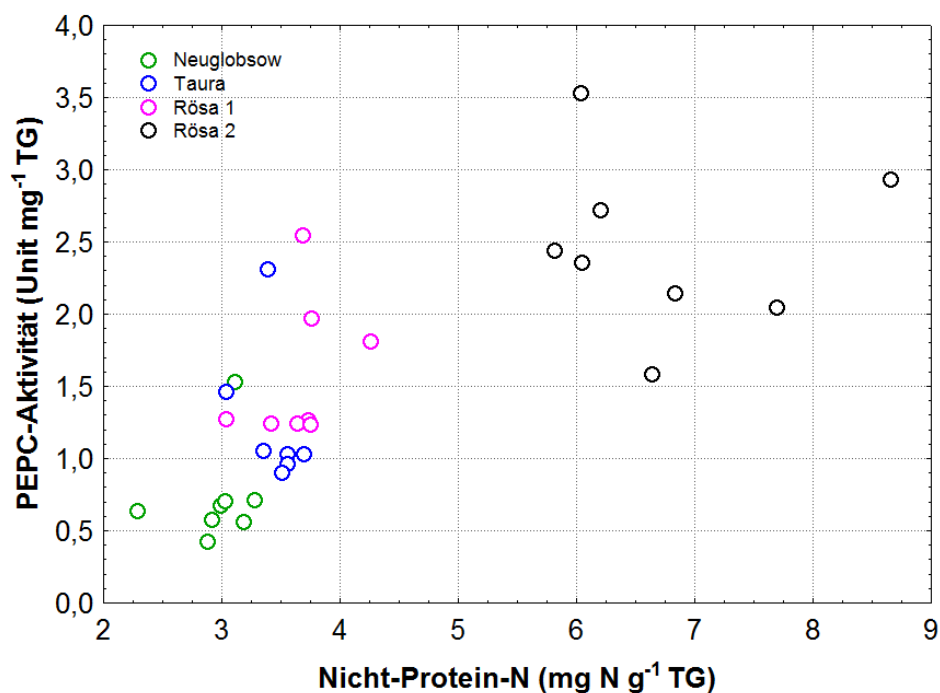


**Abb.5** Spitzennekrosen an Nadeln des 2. Jahrgangs (rechts). Nekrotische Nadelspitze im Vergleich zu einer grünen Nadelspitze einer vitalen Kiefernadel (links).

Es lag daher nahe, Kiefernadeln mit Spitzennekrosen auf oxidativen Stress durch Analyse spezifischer Biomarkern zu überprüfen. Allerdings konnten die zwischen 1992 und 1999 nachgewiesenen Enzymaktivitäts- und Gehaltsveränderungen der Oxidationsprodukte Glutathiondisulfid und Dehydroascorbat keinen direkten Zusammenhang zwischen oxidativen Stress und dem Schädigungsgrad der Nadeln in Form von Chlorosen und Nekrosen bestätigen (SCHULZ und



**Abb.6** Arginin Gehalt in Abhängigkeit vom NPN Gehalt halbjähriger Kiefernadeln. Arginin wird im Harnstoff-Zyklus gebildet, wenn  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  nicht mehr für die Protein-Synthese genutzt wird und zu toxischen Wirkungen im Stoffwechsel führt. Zur Entgiftung verbindet sich  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  mit  $\text{CO}_2$  und ATP zu Karbamylphosphat und reagiert mit Ornithin über Zitruillin unter Einbeziehung von Asparaginsäure zu Arginin. Folglich wurden im Vergleich zu Rösa 1 in Kiefernadeln von Rösa 2 auch ansteigende Gehalte von Ornithin im Mittel von 37 auf  $265 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TG}$  nachgewiesen.

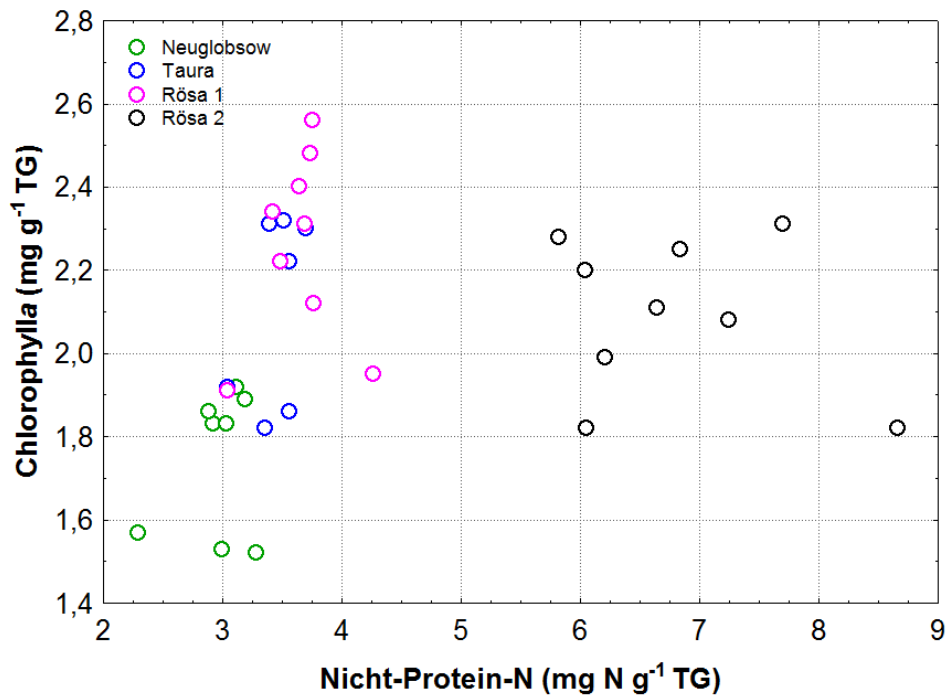


**Abb.7** Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) Aktivität in Abhängigkeit vom NPN Gehalt halbjähriger Kiefernadeln. Bei NPN Gehalten größer  $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ TG}$  erreicht die PEPC ihr Aktivitätsoptimum mit negativen Auswirkungen auf den Kohlenhydrathaushalt.

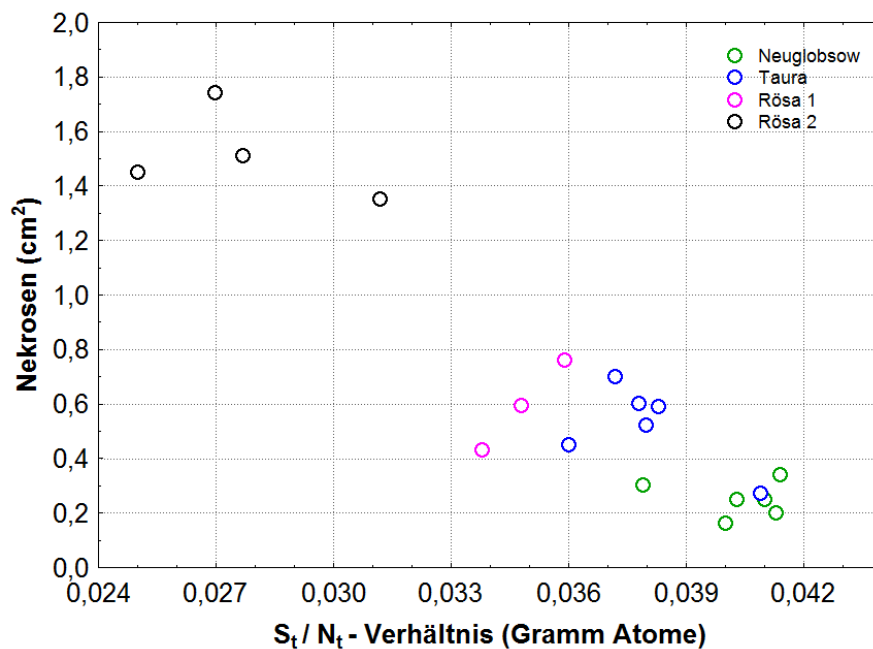
HÄRTLING 2001). Im Vergleich zu 1992 waren 1999 die Aktivitäten der Glutathion Reduktase und Gehalte von Glutathion in Kiefernadeln bei abnehmenden SO<sub>2</sub>-Konzentrationen an den Standorten zwar signifikant verringert, aber Nadeln in den ehemals stark SO<sub>2</sub>-belasteten Kiefernbeständen von Taura und Rösa zeigten nach wie vor Spitzennekrosen bei signifikant verringerten Sulfat Gehalten von 0,20 mg g<sup>-1</sup> TG. Der geringe Sulfat Gehalt war ein deutlicher Hinweis dafür, dass Sulfat in den Nadeln nicht mehr durch SO<sub>2</sub>-Oxidation über den Nadelpfad ange-reichert wurde, sondern durch Aufnahme über den Wurzelpfad (SLOVIC 1995). Der Beweis hier-für konnte durch Messung natürlicher Isotopenverhältnisse von Schwefel und Sauerstoff im Sul-fat extrahiert aus Humusaufgaben und Nadeln geführt werden (SCHULZ et al. 2004). Auch Mes-sungen zur photochemischen Effizienz (Fv/Fm) nekrotischer Nadeln indizierten trotz nekroti-scher Nadelspitzen keine Kapazitätsverringern in der Photosynthese (SCHULZ et al. 2001). Zudem wurden in den Nadeln bei N-Gehalten bis 18 mg g<sup>-1</sup> TG ansteigende Chlorophylla Ge-halte gemessen. Bemerkenswert war auch, dass in Nadeln vom geringer SO<sub>2</sub>-belasteten Standort Neuglobsow erhöhte chlorotische Nadelflächen gemessen wurden, die aber nicht zu nekrotischen Nadelspitzen an den gleichen Nadeln im darauffolgenden Jahr führten (SCHULZ und HÄRTLING 2001). Somit war anzunehmen, dass die nach wie vor nachzuweisenden Spitzennekrosen an den Nadeln nicht durch oxidativen Stress verursacht wurden, sondern vielmehr das Ergebnis einer Überernährung der Kiefern mit Stickstoff waren.

### **Nährstoff-Ungleichgewichte**

Die Richtigkeit der oben genannten Hypothese konnte durch Analyse von Metaboliten des N-Stoffwechsels sowie Bestimmung von N-Mineralisationsraten und Aufnahmeraten von Stickstoff bestätigt werden (SCHULZ et al. 2012). Nach reduzierten SO<sub>2</sub>-Immissionen und atmosphärischen S-Einträgen in die Kiefernbestände enthielten halbjährige Nadeln von Rösa 2 bei weniger Sulfat in den Humusaufgaben und verringerten Sulfat Gehalten nach wie vor abnormale Stickstoff Ge-halte von maximal 24 mg N g<sup>-1</sup> TG (SCHULZ et al. 1998). Durch experimentelle Untersuchungen mit Kiefernsetzlingen kultiviert in Humusaufgaben aus den Kiefernbeständen konnte nachgewie-sen werden, dass die Aufnahme von Ammonium und/oder Nitrat von der Mycorrhizierung der Feinwurzeln abhängig ist (SCHULZ et al. 2012). Bei hoher N-Aufnahme bzw. Nadelgehalten über 18 mg N g<sup>-1</sup> TG erfolgt eine Umstellung in der Aminosäuresynthese. N-Überschuß wird in halb-jährigen Kiefernadeln nicht mehr ausschließlich in Glutamin gespeichert, sondern in Arginin aufgrund eines engeren C/N-Verhältnisses dieser Aminosäure (HUHN und SCHULZ 1996). In die-sem Falle reicherte sich Arginin in der NPN-Fraktion an, wodurch Ungleichgewichte in der S/N-Ernährung entstanden (**Abb.6**). Andererseits wird bei hoher N-Aufnahme zusätzlicher Kohlen-stoff benötigt, der bei gleichbleibender photosynthetischer Aktivität (SCHULZ et al. 2001) durch Aktivierung der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) bereitgestellt wird (TIETZ und WILD 1991). Aus **Abb.7** geht hervor, dass bei einem NPN-Gehalt über 5 mg g<sup>-1</sup> TG das Enzym einen Sättigungsbereich erreicht, so dass die PEPC nicht mehr den gesamt benötigten Kohlenstoff zur Aminosäure-Synthese zur Verfügung stellen konnte und ein Teil des Kohlenstoffs dem Kohlenhydrathaushalt entzogen wurde. Infolge verringerten sich in Kiefernadeln die Gehalte von Glu-cose im Mittel von 4,0 (Rösa 1) auf 3,0 mg g<sup>-1</sup> TG in Rösa 2.



**Abb.8** Chlorophylla Gehalt in Abhängigkeit vom NPN Gehalt halbjähriger Kiefernnadeln. Bei NPN Gehalten größer 5 mg g<sup>-1</sup>TG verringert sich der Chlorophylla Gehalt aufgrund von Ernährungsstörungen.



**Abb.9** Flächenanteile von Spitzennekrosen am 2. Nadeljahrgang in Abhängigkeit vom atomaren S/N-Verhältnis halbjähriger Kiefernnadeln (SCHULZ und HÄRTLING 2001).

Zudem zeigten die Kiefern in Rösa 2 bei hohen Arginin Gehalten und geringer Verfügbarkeit von Phosphat in den Humusauflagen ein Ungleichgewicht in der P-Ernährung (SCHULZ et al. 2012). Bei NPN Gehalten über  $5 \text{ mg N g}^{-1} \text{ TG}$  verringerten sich letztlich auch die Chlorophylla Gehalte in halbjährigen Nadeln (**Abb.8**) verbunden mit Ungleichgewichten in der S/N-Ernährung und einem erhöhten Auftreten sichtbarer Schadsymptome an 2-jährigen Kiefernnadeln, insbesondere in Rösa 2 (**Abb.9**).



**Abb.10** Nachhaltig durch S- und N-haltige Stoffeinträge geschädigter Kiefernbestand bei Laußig (Dübener Heide, Land Sachsen). Charakteristisch für solche Kiefernbestände sind deformierte Kronenabschnitte mit Zwieselbildung und hohem Totholzanteil.

Foto: Horst Schulz, September 2023

#### 4. Schlussbemerkung und Ausblick

Die hier über mehrere Jahre in Kiefernbeständen bei wechselnden S- und N-haltigen Stoffeinträgen durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die an Kiefernnadeln beobachteten Spitzennekrosen mit einher gehenden Wachstumsstörungen auf Stresszustände im C- und N-Stoffwechsel zurückzuführen sind, die hauptsächlich bei hoher N-Aufnahme durch Ungleichgewichte in der S/N-Ernährung ausgelöst wurden. Wiederholungsuntersuchungen in 2003 und 2007 zeigten, dass bei weiter reduzierten  $\text{SO}_2$ -Immissionen, die Sulfat Gehalte in Kiefernnadeln an den Standorten Neuglobsow und Rösa mit einem Sulfat Gehalt von  $0,10 \text{ mg S g}^{-1} \text{ TG}$  Background-Niveau erreicht haben. Dennoch zeigen Kiefernbestände in der Dübener Heide Wachstumsstörungen mit hohen Mortalitätsraten. Besonders betroffen sind Kiefernbestände in Nähe landwirtschaftlich genutzter Ackerflächen und Produktionsanlagen. Teilweise wurden die Bestände inzwischen kahl geschlagen und wieder aufgeforstet oder sind durch Entnahme abgestor-

bener Bäume stark aufgelichtet (**Abb.10**). Wahrscheinlich haben sich die Kiefernbestände auch nach 20 Jahren bei ehemals hohem N-Eintrag, N-Akkumulation und hohen Mineralisationsraten in den Humusaufgaben sowie hohen Aufnahmeleistungen von pflanzenverfügbarem Stickstoff noch immer nicht auf eine ausgewogene S/N-Ernährung einstellen können. Auch oxidativer Stress kann aufgrund steigender Ozonkonzentrationen in der Atmosphäre wieder an Bedeutung gewinnen. Insofern sind weiterhin Untersuchungen zur Überprüfung der atmosphärischen Stoffeinträge durch kostengünstige Depositionsmessungen (SCHULZ et al. 1997) verbunden mit Analysen zur Vitalitätsbestimmung auf ernährungsphysiologischer Basis der Kiefernbestände unabdingbar (SCHULZ und HÄRTLING 2003).

In ein modernes forstliches Monitoring sind daher Biomarker zu integrieren, die die Stressbelastung der Bäume schon abbilden, wenn noch keine Schadsymptome in Form von Nadelverfärbung, Nadelverlust und Kronendehformierung sichtbar sind. Zur objektiven Vitalitätsbewertung von Kiefernbeständen gehört aber auch die Verknüpfung von Biomarkern mit Parametern des Kronenzustandes, des Zuwachses und des Bodenzustandes sowie des Klimas. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Vergleichbarkeit von langjährigen Datenreihen unter Beibehaltung erprobter Untersuchungsparameter unter Einsatz etablierter Untersuchungsmethoden sowie die Konzentrierung auf repräsentative Kieferbestände als Testflächen einschließlich der Aufbau von Datenbanken zur multiplen Datenauswertung unausweichlich. Zuständig für Routineuntersuchungen sind weiterhin die Landesforstanstalten. Spezielle Biomarker können aber nur in Forschungseinrichtungen mit entsprechend analytischer Ausrüstung untersucht werden. Inwieweit Inventuren durch multitemporale Übersichtserhebungen auf Basis hyperspektraler Fernerkundungssensoren im nahen Infrarot-Bereich (VNIR) ergänzend durchführbar sind, bleibt abzuwarten.

## 5. Literatur

Asada, K., und M. Takahashi (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Photoinhibition. Keyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J. Eds.) Elsevier, Amsterdam. pp. 224-234.

Foyer, C. H., and P. Mullineaux (1994): Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton. FL. ISBN. 0-8493-5443-9.

Huhn, G., and H. Schulz (1996): Contents of Free Amino Acids of Scots Pine Needles from Field Sites with Different Levels of Nitrogen Deposition. *New Phytol.* 134, 95-101.

Lembcke, G.; Knapp, E. und O. Dittmar (1975): DDR-Kieferntragstafel. Institut für Forstwissenschaften. Eberswalde. 1-30.

Slovic, S., Sigmund, A., Kindermann, G., and Ch. Körner (1995): Stomatal SO<sub>2</sub> uptake and sulfate accumulation in needles of Norway spruce stands (*Picea abies*) in Central Europe. *Plant and Soil*, 168/169, 405-419.

Schulz, H., Huhn, G., Schüürmann, G., Niehus, B., and G. Liebergeld (1997): Determination of throughfall rates on the basis of pine tree barks: Results of a field study. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 47, 510-516.

Schulz, H., Huhn, G., and S. Härtling (1998): Responses of sulphur- and nitrogen-containing compounds in Scots pine needles along a deposition gradient in eastern Germany. In: Changes of Atmospheric Chemistry and Effects on Forest Ecosystems. A Roof Experiment without a Roof. Hüttl, R.F. and K. Bellmann (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Nutrient in Ecosystems, Vol. 3, p.p. 37-63.

Schulz, H., Gehre, M., Hofmann, D., and K. Jung (2001): Nitrogen isotope ratios in pine bark as an indicator of N emissions from anthropogenic sources. *Environmental Monitoring & Assessment*. 69, 283-297.

Schulz, H. und S. Härtling (2001): Biochemical Parameters as Biomarkers for Early Recognition of Environmental Pollution on Scots Pine Trees. II. The Antioxidative Metabolites Ascorbic Acid, Glutathione,  $\alpha$ -Tocopherol and the Enzymes Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase. *Z. Naturforschung*. 56c, 767-780.

Schulz, H. und S. Härtling (2003): Vitality analysis of Scots pines on basis of a multivariate approach. *Forest Ecology and Management*. 186, 73-84.

Schulz, H., Giesemann, A., and M. Gehre (2004): Influence of Reduced S Inputs on the Sulfate Pool in the Humus Layer and Sulfate Uptake in *Pinus sylvestris* L. as indicated by Natural Isotope Variations of Sulfur and Oxygen. *Journal of Applied Botany*. 78, 18-24.

Meyer, B., Mühle, H., Boehme, F., Knappe, S., Russow, R. and H. Schulz (2008): Measurement and regionalisation of nitrogen deposition for the risk assessment of nitrogen leaching in agricultural landscapes. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 54, 1-17.

Malcolm, D. C. and M. F. Garforth (1977): The sulphur:nitrogen ratio of conifer foliage in relation to atmospheric pollution with sulphur dioxide. *Plant and Soil*. 47, 89-102.

Schulz, H., Schäfer, T., Storbeck, V., Härtling, S., Rudloff, R., Köck, M. and F., Buscot (2012): Effect of raw humus under two adult Scots pine stands on ectomycorrhization, nutritional status, nitrogen uptake, phosphorus uptake and growth of *Pinus sylvestris* seedlings. *Tree Physiology* 32, 36-48.

Schulz, H., Beck, W. and A. Lausch (2019): Atmospheric depositions affect the growth patterns of Scots pines (*Pinus sylvestris* L.) - a long-term cause-effect monitoring study using biomarkers. *Environmental Monitoring Assessment*. 191, 158-172.

Tietz, S. and A. Wild (1991): Investigations on the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity of Spruce Needle Relative to the Occurrence of Novel Forest Decline. *J. Plant Physiol.*, 137, 327-331.