

Originalarbeiten

(Aus der Bundesanstalt für Agrarbiologie, Linz, Leiter: Hofrat Dipl.-Ing. Dr. Josef Wimmer)

Die Verteilung und Streuung von Bodenenzymaktivitäten in einer einheitlichen Fläche und deren Einfluß auf Probenahme und Analyse

Von R. ÖHLINGER, A. EIBELHUBER und M. VINZENZ

(Mit 5 Abbildungen)

Zusammenfassung

Aus einem 1 ha großen und bodenkundlich einheitlichen Acker- und Grünland wurden aus dem Oberboden Proben nach verschiedenen Rastersystemen entnommen. Die Bodenproben wurden auf ihre Proteaseaktivität (aus naturfeuchtem Bodenmaterial) und ihre Phosphataseaktivität (aus lufttrockenem Boden) untersucht. Die Ergebnisse wurden mit klassischen und geostatistischen Verfahren ausgewertet:

- Um Lagerungsveränderungen in Enzymaktivitäten bei längerer Analysendauer zu begegnen, ist eine Mitführung eines internen Standards zu empfehlen. So konnten Aktivitätsabnahmen bei Phosphatase (Ackerland) von 30 %, im Grünland von 16 % und bei Protease (nur Grünland) von 24 % während des Analysenzeitraumes von rund zwei Monaten festgestellt und korrigiert werden.
- Folgende Streuungsursachen wurden abgeschätzt (Angabe des Variationskoeffizienten): Die Analysenstreuung (inklusive Tagesstreuung) lag bei <2 mm gesiebten Boden <8 %, bei <5 mm Siebung um 17 %. Die Feldstreuung (Streuung zwischen den Einstichen) betrug für Protease um 14 % (Acker + Grünland). Für die Phosphatase war ihr Anteil 24 % (Acker). Der Wiederholungsanalysenfehler erreichte bei <2 mm Siebung Werte <5 % und bei 5 mm um 10 %.
- Aus den Erfahrungen der Probenahmeprobereitung ist für die Bestimmung von Bodenenzymaktivitäten die Analyse von <2 mm gesiebten und naturfeuchten Proben am geeignetsten.
- Für eine bodenkundlich einheitliche und 1 ha große Fläche waren unter den (optimalen) Bedingungen der <2 mm-Siebung und der Verwendung des naturfeuchten Bodens die dreifache Analyse einer Mischprobe aus rund 30 Einstichen sinnvoll. Diese Forderung erreichte eine Präzision von ca. ± 10 % mit $P=95$ %.
- Die Proteaseaktivität war innerhalb des Untersuchungsgebietes trotz einheitlicher Beschaffenheit des Oberbodens deutlich ortsabhängig. Die Einflußzone eines Einstichpunktes reichte bis ca. 40 m. Eine ortsabhängige Probennahme

bei Kenntnis des entsprechenden Semivariogrammes (Geostatistik) reduziert die Probenzahl (Einstichzahl) auf neun Probennahmepunkte. Diese Probenahme sollte nach einem 40 × 40 m Raster erfolgen.

Schlüsselworte: Bodenenzymaktivitäten, Probenahme, Verteilung im Feld, Statistik.

Distribution and variation of soil enzyme activities in an uniform field and their influence on soil sampling and analysis

Summary

Surface soil samples of 1 ha plots (uniform soil type) of an arable land and of a grassland were taken according to a defined sampling pattern. The soil samples were analysed for protease activity (from fresh soil) and phosphatase activity (from air dried soil). The results were evaluated using different statistical techniques (classical and geostatistical):

- Changes of soil enzymatic activities were observed by storage at +4 °C (fresh soil) and at room temperature (air dried soil). After a period of 60 days phosphatase activity decreased by 30 % in arable land and by 16 % in grassland. In the same period grassland-protease was reduced of about 24 %. An internal standard is recommended to be carried along longer periods of analysis to correct a time dependent decline of enzyme activities.
- Following sources of variance could be estimated (expressed as coefficients of variation): Analysis (including day to day variance): < 8 % for < 2 mm sieving and about 17 % for < 5 mm sieving.
Within field: protease 14 % (arable land and grassland), phosphatase 24 % (arable land).
Repeatability: < 5 % (< 2 mm sieving) and 10 % (< 5 mm sieving).
- Thus enzyme activities are determined best using the sieving fraction < 2 mm of fresh soil samples.
- For a uniform field of 1 ha a blended sample obtained from about 30 individual soil samples is optimal under the above conditions. By a triple analysis a precision of 10 % (P = 95 %) can be achieved.
- Enzymatic activity (protease) was found to be spatially dependent within the field studied. The range of influence of one sample to another was approximately 40 meters, estimated by means of variogram calculation. Therefore a spatially dependent sampling can reduce the number of individual samples required to nine using a regular grid with 40 × 40 m.

Key-words: soil enzymes, soil sampling, spatial distribution, statistic.

1. Einleitung

Zur Charakterisierung eines Feldes hinsichtlich seiner Nährstoffversorgung ist eine genaue Probenahme die wichtigste Voraussetzung (VERMEULEN 1977, SIEGENTHALER 1979). Sämtliche der im Labor durchzuführenden Analysen sind als Fehlerquellen meistens ein Bruchteil dessen, was eine ungenaue Probenahme als Fehler liefert. So werden für die chemische Bodenanalyse 20 bis 30 Einstiche pro Hektar einheitlichen Feldes für eine Mischprobe verlangt (EBING und HOFFMANN 1975, HOFFMANN und SCHWEIGER 1981, CAMERON et al. 1971). GEIDEL und SCHÄFER (1976) führten theoretisch und praktisch die Zusammenhänge zwischen optimaler Proben- und Analysenzahl vor in Beziehung zu minimalem Kostenaufwand und möglichst kleiner Varianz des Mittelwertes.

Im allgemeinen sind chemische Bodenparameter anders zu bewerten als biochemische (hier enzymatische). Während dort meistens Konzentrationen von bestimmten chemischen Komponenten bestimmt werden, werden hier biochemische Stoffumsätze pro Zeiteinheit gemessen. Bei vorliegendem Probenahmeversuch zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eines Feldes lag das Hauptgewicht auf der statistischen Auswertung mit ihrer Möglichkeit einer differenzierten Fehlerabschätzung. Es wurde nach systematischer Beprobung je eines Hektar Ackerlandes und Grünlandes versucht folgende Fragen zu klären:

- Wie verteilen sich auf einer bodenkundlich einheitlichen landwirtschaftlichen Nutzfläche Bodenenzymaktivitäten?
- Wie groß sind Analysenfehler und Streuung im Feld?
- Welchen Einfluß üben nach der Probenahme verschiedene Behandlungsarten des Bodens auf Enzymaktivitäten aus (Siebung, Analyse von naturfeuchtem oder lufttrockenem Boden)?
- Wieviele Einstiche pro Hektar landwirtschaftlicher Nutzfläche lassen sich für eine repräsentative Mischprobe empfehlen unter Berücksichtigung günstiger Kosten und guter Präzision?
- Wieviele Wiederholungsmessungen pro Bodenprobe sind nötig?

Die statistische Auswertung wurde sowohl nach der klassischen Betrachtungsweise (es werden räumlich unabhängige Stichproben vorausgesetzt) als auch nach der geostatistischen Methode durchgeführt (das Kapitel Geostatistik wurde von M. VINZENZ bearbeitet). Diese berücksichtigt in ihrer Theorie der regionalisierten Variablen auch räumliche Abhängigkeiten (BURGESS und WEBSTER 1980 a, 1980 b, 1980 c und 1981, DUTTER 1985, McBRATNEY und WEBSTER 1983 und 1986).

2. Material und Methodik

2.1 Versuchsaufbau

In einem bodenkundlich einheitlichen Acker- (Lockersedimentbraunerde) und Grünland (Pseudogley) wurde eine 1 ha große Fläche ausgemessen, diese in verschieden große Einheiten (Serien) unterteilt und aus deren Mitte jeweils die Bodenprobe entnommen (vgl. AICHBERGER 1986):

100	Flächen je 100 m ² = Serie A
50	Flächen je 200 m ² = Serie B
25	Flächen je 400 m ² = Serie C
16	Flächen je 625 m ² = Serie D
9	Flächen je rund 1111 m ² = Serie E

Aus der 1 ha großen Fläche wurden zusätzlich eine 100 m² (= Serie F) und eine 1 m² (= Serie G) große Fläche willkürlich ausgewählt und diese wiederum systematisch 25- (Serie F) bzw. 50mal (Serie G) beprobt.

Im Ackerland reichte die Entnahmetiefe von 0 bis 25 cm und im Grünland von 0 bis 10 cm. Als biologische Parameter wurden die Proteaseaktivität nach LADD und BUTLER (1972) und die Phosphataseaktivität nach HOFFMANN (1968) gemessen (drei Analysenwiederholungen). Tabelle 1 gibt weiters noch über Siebgröße, Lagertemperatur und Feuchtigkeitszustand der Proben Auskunft.

Um etwaige Aktivitätsveränderungen durch Lagerung abschätzen und berichtigen zu können, wurde ein interner Standard MA (= Mischprobe aus allen 100 Proben der jeweiligen Serie A) über den gesamten Analysenzeitraum mitgeführt.

Tabelle 1

Siebgröße und Feuchtigkeit der Proben für die Parameter Protease und Phosphatase

Parameter	Ackerland	Grünland
Phosphatase:		
Siebgröße	< 2 mm	< 2 mm
Zustand	lufttrocken	lufttrocken
Probenlagerung	Raumtemperatur	Raumtemperatur
Protease:		
Siebgröße	< 5 mm	< 2 mm
Zustand	naturfeucht	naturfeucht
Probenlagerung	4 °C	4 °C

2.2 Statistische Auswertung

2.2.1 Die Ergebnisse wurden nach folgendem Schema ausgewertet:

Kolmogorov-Smirnov-Test (Signifikanzniveau = 95 %).

Prüfung der Güte der Anpassung der Stichprobenverteilung auf die theoretische Verteilung (vgl. WEBER 1986).

2.2.2 Prüfung auf signifikante Aktivitätsänderungen des internen Standards MA während des Analysenzeitraumes mit Hilfe einer Korrelationsanalyse zwischen den Variablen „Enzymaktivität“ und Zeitdauer (Tag).

2.2.3 Korrektur sämtlicher Analysenwerte:

Wurde ein deutlicher zeitlicher Trend (die Steigung der Regressionsgeraden mußte mit $P=99\%$ von 0 verschieden sein) beim internen Standard beobachtet, so wurden sämtliche Analysenwerte um den festgestellten Trend korrigiert. Der Lagerungseinfluß wurde somit minimiert.

2.2.4 Varianzanalyse des internen Standards MA:

Aufgliederung der Analysenstandardabweichung s_a (MA) in

— Analysenwiederholungsstreuung s_{aw} (MA) und

— Tagesstreuung s_{Tag} (= Streuung der Probe MA zwischen den Analysentagen).

Die Varianzanalyse geschah mit den entsprechend korrigierten Werten.

2.2.5 Varianzanalyse des gesamten Datenmaterials (Serie A—E) und nach Serien getrennt:

Aufgliederung der Gesamtvarianz s_g^2 ($s_g^2 = s_f^2 + s_a^2$) in:

— Analysenvarianz s_a^2 : Da die Tagesstreuung eine Form der Analysenstreuung darstellt, hingegen bei normal durchgeführter Varianzanalyse in der Feldstreuung wirksam würde, mußte letztere um die Tagesstreuung vermindert und die Analysenwiederholungsstreuung hingegen um diese vermehrt werden ($s_a^2 = s_{aw}^2 + s_{Tag}^2$)

— Analysenwiederholungsvarianz s_{aw}^2

— Feldvarianz s_f^2 (Streuung zwischen den Einzelproben bzw. Einstichen)

2.2.6 Fehlerabschätzung in Abhängigkeit von Proben- (n_1) und Analysenanzahl (n_2) nach der Gleichung $s_g^2 = s_f^2/n_1 + s_a^2/n_2$.

2.2.7 Ermittlung einer notwendigen Probenanzahl (Einstiche) nach vorgegebener Präzision G (\pm Abweichung in Aktivitätseinheiten vom „wahren“ Mittelwert mit $P=95\%$):

$$n_1 = \frac{t^2 \cdot s_f^2}{(G^2 - t^2 \cdot s_a^2/n_2)} \quad (\text{vgl. PETERSEN UND CALVIN 1965})$$

t = Student Faktor

2.2.8 Berechnung minimaler Kosten:

Aus der Fehlerabschätzungstabelle wurden die kostengünstigsten Kombinationen zwischen Proben- und Analysenanzahl bestimmt. Dabei diene ein nach den örtlichen Verhältnissen ermitteltes Kostenverhältnis zwischen einem Einstich im Felde und einer Laboranalyse als Grundlage.

2.2.9 Geostatistik:

Die Geostatistik ist ein Zweig der angewandten Statistik, die sich auf die Erfassung und Beschreibung der Strukturen örtlicher oder zeitlicher Abhängigkeiten von Daten der Erdwissenschaften konzentriert. Wie in der klassischen Statistik werden die gezogenen Stichproben als Realisierung einer Zufallsfunktion $Z(x)$ an bestimmten Orten betrachtet. Unter der Forderung einer Stationarität zweiter Ordnung besitzen diese Daten die Erwartung $E\{Z(x)\} = m$, welche im allgemeinen nicht bekannt ist (m ist der durchschnittliche Wert aller möglichen Realisierungen von Z an der Stelle x). Die Schätzung des Mittelwertes über ein Gebiet $V(x_0)$ erfolgt nach

$$Z_V(x_0) = \frac{1}{V} \int_{V(x_0)} Z(x) dx.$$

Die verwendeten Daten bestehen zumeist aus einem Satz diskreter Zahlenwerte $\{Z_\alpha, \alpha = 1, n\}$, z. B. als Meßwerte von definierten Punkten. Unter der Hypothese der Stationarität beträgt die Erwartung jedes einzelnen Punktes $E\{Z_\alpha\} = m, \forall \alpha$. Der örtliche Bezug der Proben untereinander wird durch den Vektor (h) beschrieben. Man wird erwarten, daß zwei an der selben Stelle gezogene Proben, abgesehen von Analysefehlern, den selben Wert besitzen. Mit zunehmendem Abstand der Proben zueinander werden auch die Analysenwerte verschiedener.

Eine geostatistische Bearbeitung gliedert sich üblicherweise in folgende Arbeitsschritte:

- explorative Datenanalyse
- Strukturanalyse
- Schätzverfahren
- Simulationsverfahren.

Die explorative Datenanalyse dient der Untersuchung von allgemeinen örtlichen Datenstrukturen. Dabei bedient man sich sowohl parametrischer als auch nichtparametrischer Methoden. Das wichtigste Instrument der geostatistischen Strukturanalyse stellt die Berechnung des Semivariogramms $\gamma(h)$ dar. Unter Einbeziehung des Ortsvektors (\vec{h}), beträgt die zentrierte Kovarianz $C(h) = E\{Z(x+h)Z(x)\} - m^2$. Diese Beziehung kann auch als Variogramm

$$2\gamma(h) = E\{[Z(x+h) - Z(x)]^2\}$$

angegeben werden, welches die ortsabhängigen Strukturparameter beschreibt. Zu den wichtigsten zählt das Verhalten am Ursprung, das heißt bei sehr kleinen Abständen der Probenahmepunkte zueinander. Ist $\gamma(h)$ bei $\vec{h} = 0$ ebenfalls 0 oder sehr klein, so ist die eingangs gestellte, intuitive Forderung erfüllt. Mit zunehmendem Abstand (\vec{h}) nimmt auch $\gamma(h)$ zu, um in einem bestimmten Abstand (Einflußzone, range) die „klassische“ statistische Varianz (Schwellwert, sill) zu erreichen. Innerhalb der Einflußzone besteht somit eine örtliche Abhängigkeit der Stichproben untereinander. Dies bedeutet, daß dieser Abstand bei einer repräsentativen Probenahme nicht unterschritten werden soll.

In den Geowissenschaften wird zudem häufig die Forderung nach einer räumlichen Darstellung der Verteilung der Stichproben erhoben (Isolinienkarten, Verteilungskarten usw.). Zur Berechnung dieser räumlichen Verteilung werden

in der Geostatistik besondere Schätzverfahren herangezogen, die allgemein als Kriging-Methoden bezeichnet werden. Das Kriging stellt eine Art der Interpolation dar, die es ermöglicht, die Datenwerte unter Berücksichtigung der ortsabhängigen Strukturen entweder punktuell oder flächenhaft zu verrechnen. Es liefert den besten linearen und unverzerrten Schätzer einer unbekanntem Variablen. Diese Methode wird auch als BLUE (best linear unbiased estimator) bezeichnet. Die Beschränkung auf die Klasse der linearen Schätzer ergibt sich dadurch, als nur das zweite Moment einer Zufallsfunktion (hier die Kovarianz oder das Variogramm der Daten) zur Verfügung steht. Wenn wie in diesem Fall das Variogramm bekannt ist, wird die Zufallsfunktion $Z(x)$ als intrinsisch bezeichnet. Der lineare Schätzer Z_K^* ist eine lineare Kombination der n -Datenwerte

$$Z_K^* = \sum_{\alpha=1}^n \lambda_{\alpha} Z_{\alpha}.$$

Die n -Gewichte λ_{α} müssen berechnet werden, um sicherzustellen, daß einerseits der Schätzer unverzerrt und die Schätzvarianz ein Minimum ist. Sind beide Forderungen gewährleistet, so spricht man von einem optimalen Schätzer Z_K^* , dem Krigingschätzer. Die Unverzerrtheitsbedingung

$$E \{ Z_K^* \} = m \sum_{\alpha} \lambda_{\alpha} = m = E \{ Z_V \}$$

wird dadurch erfüllt, daß die Summe der n Gewichte $\lambda_{\alpha} = 1$ sein muß.

Die Schätzvarianz $E \{ [Z_V - Z_K^*]^2 \}$ kann durch geeignete Ausdehnung in einer quadratischen Form ausgedrückt werden. Im Kriging-System wird die Schätzvarianz unter Beachtung der Unverzerrtheitsbedingung $\sum_{\alpha} \lambda_{\alpha} = 1$ minimiert.

Die optimierten Gewichte werden durch die standardmäßige Lagrange-Technik gewonnen, wobei jede der n -Partialgleichungen

$$\partial \left[E \{ [Z_V - Z_K^*]^2 \} - 2 \mu \sum_{\alpha} \lambda_{\alpha} \right] / \partial \lambda_{\alpha} = 0$$

gesetzt wird. Dadurch erhält man ein System von $(n+1)$ linearen Gleichungen mit $(n+1)$ Unbekannten (die n -Gewichte λ_{α} und den Lagrange-Parameter μ), welches das Kriging-System genannt wird. Das Kriging-System läßt sich auch durch die Semi-Variogrammfunktion $\gamma(h)$ ausdrücken, wenn es sich um eine intrinsische Zufallsfunktion handelt und die Kovarianzfunktion $C(h)$ nicht definiert ist:

$$\sum_{\beta} \lambda_{\beta} \bar{\gamma}(v_{\alpha}, v_{\beta}) + \mu = \bar{\gamma}(v_{\alpha}, V) \quad \forall \alpha = 1, n$$

und die korrespondierende Schätzvarianz erhält folgende Form:

$$\sigma_K^2 = \sum_{\alpha} \lambda_{\alpha} \bar{\gamma}(v_{\alpha}, V) + \mu - \bar{\gamma}(V, V)$$

Das Kriging-System und die Kriging-Varianzen werden nur von dem Strukturmodell $C(h)$ oder $\gamma(h)$ und der relativen Geometrie der Daten, aber nicht von den jeweiligen, absoluten Datenwerten Z_{α} beeinflusst.

Das Kriging-System und die Kriging-Varianz berücksichtigen vier wichtige und bei jeder Interpolation intuitiv geforderte Bedingungen:

1. Die Beziehung zwischen dem zu interpolierenden Bereich V und jenem, welchem der Datenwert entstammt v_{α} (Punktproben, gemittelte Datenwerte usw.) erfolgt durch den Terminus $\bar{\gamma}(v_{\alpha}, V)$ im Kriging-System.
2. Die Geometrie der Datenkonfiguration wird ebenso durch die Einführung von $\bar{\gamma}(v_{\alpha}, v_{\beta})$ berücksichtigt. Die Genauigkeit einer Schätzung wird also nicht nur durch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Datenwerte, sondern auch

- durch ihre jeweiligen gegenseitigen, geometrischen Anordnungen in bezug auf die vorliegende Regionalisierung bestimmt, welche durch die Information von $\gamma(h)$ in den verschiedenen Termini $\bar{\gamma}(v_\alpha, v_\beta)$ inkludiert ist.
- Die ortsbezogenen Strukturen der Variabilität der untersuchten Variable werden durch das Semi-Variogramm-Modell $\gamma(h)$ beschrieben.
 - Die Kriging-Varianz ist demnach jener Wert, der dem Quadrat der Abweichungen vom Schätzwert eines Punktes zum nicht bekannten Mittelwert der Zufallsfunktion entspricht. Die Bedingung der Unverzerrtheit garantiert, daß die Summe aller Schätzfehler gleich Null ist.

2.2.10 Angabe der Aktivitätswerte:

Protease in mg Tyrosin-Äquivalente/g TS

Phosphatase in mg Phenol/g lufttrockenen Boden

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Prüfung auf Normalverteilung des Datenmaterials mit Hilfe des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Testes ($P_{KS}=95\%$)

Für die Aktivitäten der Protease wurde sowohl für das Ackerland als auch für das Grünland die Normalverteilung nicht abgelehnt. Ebenso verhielt es sich mit den Meßwerten der „Ackerland-Phosphatase“. Die Phosphataseaktivitäten des Grünlandes waren hingegen signifikant von einer Normalverteilung verschieden. Daher wurde in diesem Fall auch von einer Varianzanalyse abgesehen (Abb.1).

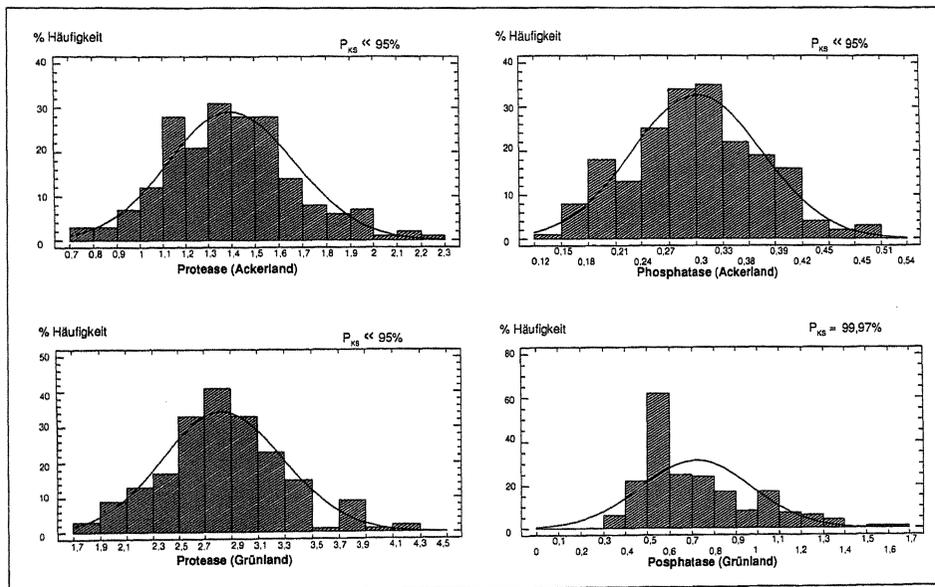


Abb. 1: Histogramm des Datenmaterials mit entsprechender theoretischer Verteilung und Signifikanz P_{KS} nach dem KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test

Der Grund für diese Abnormität könnte in der Lufttrocknung des humoseren Bodenmaterials liegen. THALMANN (1968) hatte schon bei Ausarbeitung der Dehydrogenasemethode darauf hingewiesen, daß die Lufttrocknung bei jenem Enzymsystem zu unspezifischen Reaktionen führt und somit der Trocknungs-

vorgang zu unterlassen sei. In ähnlicher Weise könnten nun auch diese unspezifischen Aktivitätsveränderungen die Abnormalität erklären, so daß von einer Lufttrocknung vor allem von Grünlandböden abzuraten wäre. Beim Ackerboden war auch schon eine fast doppelt so hohe Feldstreuung der Phosphataseaktivitäten im Vergleich zur Protease aufgefallen (siehe Tab. 3). Dort waren aber die Aktivitätswerte noch nicht signifikant von einer Normalverteilung verschieden.

3.2 Interner Standard MA

Da während des gesamten Analysenzeitraumes (rund zwei Monate) Aktivitätsveränderungen durch Lagerung zu erwarten waren, wurde als Kontrolle ein interner Standard täglich mitanalysiert. So konnten bei Phosphatase (Acker + Grünland) und bei Protease-Grünland deutliche Aktivitätsabnahmen im Laufe des Analysenzeitraumes festgestellt werden (Abb. 2). Sie betragen am Ende für Phosphatase 30 % (Acker) bzw. 16 % (Grünland) und für Protease 24 % (Grünland). Die Analysendaten wurden nun sowohl für den internen Standard als auch für die Stichprobenwerte der Serien über die Regressionsgerade aufgerechnet. Die Korrektur erfolgte aber nur, wenn die Steigung der Regressionsgerade

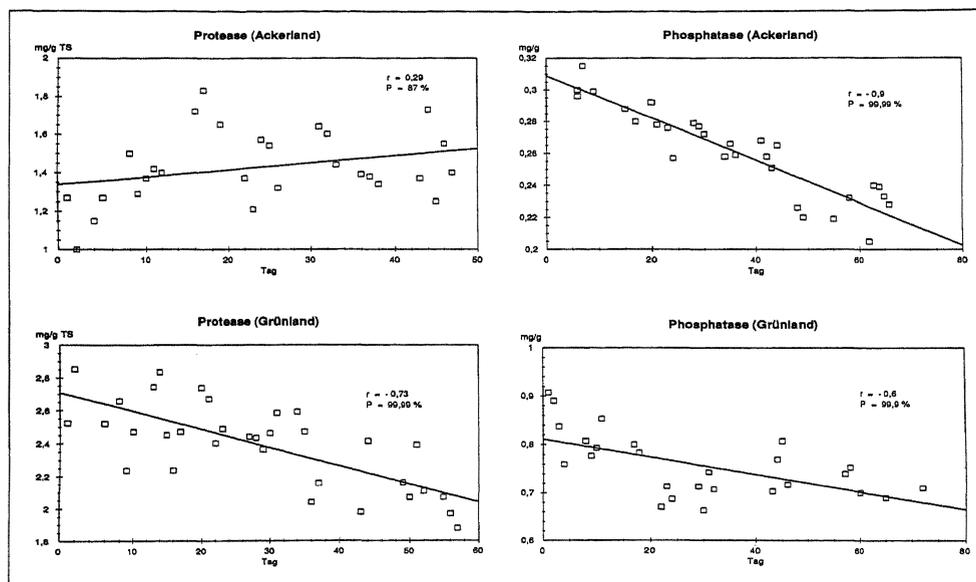


Abb. 2: Aktivitätsänderungen des internen Standards während des Analysenzeitraumes (r = Korrelationskoeffizient, P = Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden)

Tabelle 2

Varianzanalyse der internen Standards MA

	Ackerland		Grünland	
	Protease	Phosphatase	Protease	Phosphatase
n	28	29	33	33
\bar{x}	1,43	0,309	2,67	0,80
S_a	0,19	0,015	0,20	0,06
S_{aw}	0,09	0,011	0,09	0,04
S_{Tag}	0,18	0,013	0,19	0,05

sich hoch signifikant ($P=99\%$) von Null unterschied. Im Falle der Proteaseaktivität des internen Ackerbodenstandards wurde eine Korrektur daher nicht notwendig. Die Varianzanalyse des jeweiligen internen Standards ist in Tabelle 2 aufgezeigt.

Der deutlich erhöhte Analysenvarianzkoeffizient (13,3 %) bei der Proteaseaktivität im Ackerboden resultiert aus der größeren 5-mm-Siebung. Die geringere Homogenität dieser Bodenproben wirkt sich in höheren Analysenwiederholungs- und Tagesstreuungen aus. Der Anteil der Analysenstreuung am Mittelwert ist dabei rund doppelt so hoch als jener von 2 mm gesiebten naturfeuchten Böden (Protease-Grünland).

Im allgemeinen waren die naturfeuchten Proben stärkeren Tagesschwankungen unterworfen als die lufttrockenen.

3.3 Auswertung der Probenahmeserien

In Tabelle 3 sind die varianzanalytischen Ergebnisse der Probenahmeserien angeführt. Die statistischen Daten der Serie A—E spiegeln am besten die „wahren“ Verhältnisse im beprobten Feld hinsichtlich der untersuchten Parameter wider.

Tabelle 3

*Varianzanalyse der Enzymaktivitäten bei bestimmten Beprobungsmustern (Serie)
(s_g Gesamtstreuung, s_a Analysenstreuung, s_{aw} Analysenwiederholungsstreuung,
 s_f Feldstreuung)*

	n l	Ackerland					Grünland				
		\bar{x}	s_g	s_a	s_{aw}	s_f	\bar{x}	s_g	s_a	s_{aw}	s_f
Protease:											
Serie A—E	200	1,395	0,30	0,23	0,15	0,19	2,83	0,47	0,21	0,10	0,42
Serie A	100	1,38	0,42	0,24	0,16	0,24	2,78	0,50	0,22	0,11	0,45
Serie B	50	1,41	0,26	0,22	0,13	0,11	2,89	0,40	0,20	0,07	0,35
Serie C	25	1,36	0,26	0,23	0,14	0,13	2,79	0,49	0,22	0,11	0,44
Serie D	16	1,44	0,26	0,23	0,14	0,13	2,87	0,47	0,21	0,09	0,42
Serie E	9	1,47	0,39	0,25	0,17	0,30	3,04	0,45	0,20	0,07	0,40
Serie F	25	1,33	0,23	0,23	0,15	0	2,27	0,47	0,21	0,10	0,42
Serie G	50	1,33	0,27	0,22	0,13	0,16	2,15	0,26	0,21	0,08	0,16
Phosphatase:											
Serie A—E	200	0,302	0,075	0,022	0,018	0,072	0,72	0,25	Schiefe = 1,006 Exzeß = 0,47		
Serie A	100	0,312	0,074	0,021	0,016	0,071					
Serie B	50	0,306	0,076	0,024	0,020	0,072					
Serie C	25	0,300	0,070	0,020	0,016	0,067					
Serie D	16	0,263	0,060	0,023	0,019	0,056					
Serie E	9	0,247	0,072	0,018	0,013	0,069					
Serie F	25	0,315	0,041	0,020	0,015	0,035					
Serie G	50	0,311	0,029	0,023	0,019	0,017					

3.3.1 Protease

Im Vergleich Protease-Grünland versus Protease-Ackerland wird wiederum der Einfluß der Siebung (Acker <5 mm, Grünland <2 mm) im Varianzkoeffizienten von s_g (Acker 21,5 %, Grünland 16,6 %) sichtbar. Dieser erhöhte Koeffizient wird hauptsächlich von der Analysenwiederholungsstreuung verursacht, in welcher der Tagesfehler den Hauptanteil besitzt (vgl. interner Standard). Im <2 mm gesiebten Grünlandboden (Protease) trägt jedoch die Feldstreuung an der Gesamtstreuung den Hauptanteil.

Die Serien G (Acker) und F (Grünland) zeigten auch deutlich, daß bereits kleinräumig „Feld“streuungen auftreten können, die der Gesamtfeldstreuung ähnlich sind.

3.3.2 Phosphatase–Protease (Ackerland)

Im Vergleich Phosphatase – Protease (<5 mm) wurde eine ähnliche Gesamtstreuung abgeschätzt. Das ist insofern bemerkenswert, als man bei den <2 mm gesiebten Phosphataseproben eine deutlich niedrigere Streuung erwarten sollte. Die Ähnlichkeit der Analysenstreuung von Protease-Grünland und Phosphatase-Ackerland und der deutliche Unterschied in der Feldstreuung lassen auf einen streuungsfördernden Effekt der Lufttrocknung (einziges Unterscheidungsmerkmal) bei bodenenzymatischen Bestimmungen schließen. Somit verursacht die Lufttrocknung bei Bodenproben unspezifische Effekte in Enzymaktivitäten.

Wie oben erwähnt konnte aufgrund einer fehlenden Normalverteilung die Varianzanalyse für die Grünland-Phosphatase nicht durchgeführt werden.

Aus der varianzanalytischen Auswertung ist somit folgendes festzuhalten:

- Für bodenenzymatische Bestimmungen ist die Analyse von <2 mm gesiebten und naturfeuchten Proben vorzuziehen.
- An Streuungsursachen können folgende Größenordnungen abgeschätzt werden:
 - Gesamtvarianzkoeffizient ~ 17 %
 - Analysenvarianzkoeffizient ~ 7 %
 - Analysenwiederholungsvarianzkoeffizient ~ 4 %
 - Feldvarianzkoeffizient ~ 15 %

3.4 Fehlerabschätzung bei unterschiedlichen Probenzahlen und Wiederholungsanalysen

Nach den varianzanalytischen Ergebnissen der Serien erfüllte die Grünland-Protease am besten die beschriebenen Voraussetzungen (2-mm-Siebung, naturfeuchtes Probenmaterial). Es wurden daher nachfolgend nur mehr die Daten der Grünland-Protease für eine Fehlerabschätzung bei unterschiedlichen Probenzahlen und Wiederholungsanalysen verwendet.

Tabelle 4 zeigt die Gesamtstreuung in Abhängigkeit der Probenanzahl (n1) und der Wiederholungsanalysen (n2). Aufgrund der im Vergleich zur Feldstreu-

Tabelle 4

Protease (Grünland): Standardabweichung des Mittelwertes bei einer vorgegebenen Anzahl von Analysen und Proben ($s_a = 0,21$ und $s_f = 0,42$)

Zahl der Proben	Anzahl der Analysen						
	1	2	3	4	5	7	10
1	0,47	0,45	0,44	0,43	0,43	0,43	0,43
2	0,36	0,33	0,32	0,32	0,31	0,31	0,30
4	0,30	0,26	0,24	0,23	0,23	0,22	0,22
7	0,26	0,22	0,20	0,19	0,18	0,18	0,17
9	0,25	0,20	0,19	0,18	0,17	0,16	0,15
10	0,25	0,20	0,18	0,17	0,16	0,15	0,15
20	0,23	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,12
30	0,22	0,17	0,14	0,13	0,12	0,11	0,10
40	0,22	0,16	0,14	0,12	0,12	0,10	0,09
50	0,22	0,16	0,14	0,12	0,11	0,10	0,09
100	0,21	0,15	0,13	0,11	0,10	0,09	0,08
500	0,21	0,15	0,12	0,11	0,10	0,08	0,07
1000	0,21	0,15	0,12	0,11	0,09	0,08	0,07

ung (s_r) geringen Analysenstreuung (s_a) verursacht eine Erhöhung der Wiederholungsanalysezahl bei gleichbleibender Probenanzahl vergleichsweise eine geringe Fehlerverringern. Diese ist jedoch in vertikaler Betrachtungsweise der Tabelle 4 deutlich.

Nach der oben in Punkt 2.2.7 angeführten Gleichung ist es nach vorgegebener (oder gewünschter) Präzision (= % Abweichung vom „wahren“ Mittelwert) und Analysenzahl möglich die notwendige Probenzahl (Einstichzahl) zu ermitteln (Tab. 5).

Tabelle 5

Einstichzahl bei vorgegebener Präzision und notwendigen Wiederholungsanalysen mit $P=95\%$ (Protease-Grünland)

Präzision in $\pm\%$ von \bar{x}	Analysezahl			
	1	2	3	4
30	1	1	1	1
20	5	3	3	3
10	—	—	30	18
Probenanzahl bei außer- gewöhnlicher Präzision	76 ($\pm 15\%$)	60 ($\pm 11\%$)	87 ($\pm 9\%$)	81 ($\pm 8\%$)

In der angeführten Tabelle wurde auch jeweils die bestmöglich erreichbare Präzision mit den dazugehörigen Einstichzahlen abgeschätzt. Diese ergibt sich dadurch, daß der Quotient $t^2 \cdot s_a^2 / n_2$ nicht größer oder gleich G^2 sein darf und unter Annahme einer theoretischen Differenz von 0,01. Nach dieser Abschätzung wären für eine Genauigkeit von $\pm 8\%$ und vier Wiederholungsanalysen rund 80 Einstichproben notwendig bzw. ist unter der gegebenen Analysenstreuung und vier Wiederholungsanalysen auch mit Einstichzahlen ≥ 80 keine bessere Genauigkeit erzielbar als $\pm 8\%$.

Eine in der enzymatischen Bodenanalyse häufig verwendete Untersuchung einer Mischprobe aus ca. 30 gleichmäßig verteilten Einstichen pro Hektar mit drei Wiederholungsanalysen würde somit den „wahren“ Mittelwert mit einer Präzision von rund $\pm 10\%$ (Abweichung vom „wahren“ Mittelwert) treffen.

Unter Annahme eines bestimmten Kostenverhältnisses zwischen einer Wiederholungsanalyse und einer zusätzlichen Probenentnahme (unabhängig von

Tabelle 6

Berechnung der minimalen Kosten für optimale Kombinationen von Proben- und Analysezahl (Kosten für eine Wiederholungsanalyse = 1, Kosten für eine zusätzliche Probenentnahme = 0,02)

n1	n2	s_a (%)	Kosten	Präzision ($\pm\%$)
1	1	0,47 (100)	1,02	33
2	1	0,38 (80)	1,04	27
4	1	0,30 (64)	1,08	21
14	1	0,24 (51)	1,28	17
12	2	0,19 (41)	2,24	14
19	3	0,15 (33)	3,38	11
46	4	0,12 (26)	4,92	9
75	6	0,10 (21)	7,50	7
120	9	0,08 (17)	11,40	6
311	21	0,05 (11)	27,22	4
760	52	0,03 (7)	67,20	2

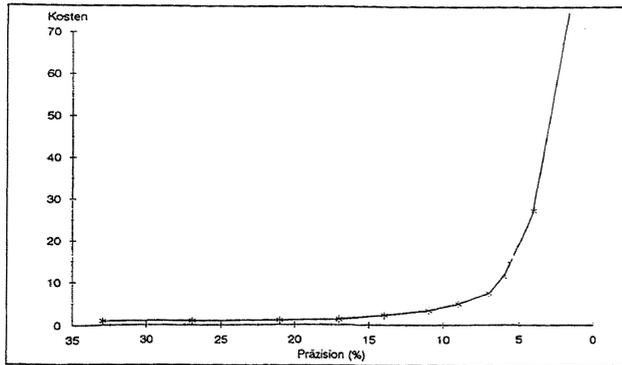


Abb. 3: Erhöhung der Kosten durch Präzisionsgewinn

Fixkosten) wurde in Tabelle 6 die kostengünstigste Kombination zwischen Probenanzahl (Einstich) und Analyse bei vorgegebener Gesamtstreuung s_g angegeben.

Die oben angeführte Kombination von 30 Einstichen und drei Analysen erhöht angenommene Fixkosten um 3,6. Als kostengünstige Kombination wurde jedoch diese Variante nicht ausgewiesen. Ein weiterer Präzisionsgewinn ab ca. $\pm 10\%$ ist nach der Tabelle mit deutlich höheren Kosten verbunden. Die Tabelle 6 wird in Abbildung 3 graphisch veranschaulicht. Hier wird die Präzision dem Kostenfaktor gegenübergestellt. Dieser beginnt ab einer Präzision $< 15\%$ leicht zu steigen und erhöht sich ab $< 10\%$ deutlich.

3.5 Geostatistik

Anhand der Meßdaten der Proteaseaktivität des Grünlandes wird eine geostatistische Bearbeitung dokumentiert. Als Datenbasis wurde der Datensatz mit 225 Meßpunkten (Serien A—F) herangezogen, denen aufgrund des Beprobungsrasters die korrespondierenden, relativen Koordinaten des 1 ha großen Meßfeldes zugewiesen wurden. Das an diesen Daten bestimmte Variogramm (Abb. 4) besitzt ein richtungsabhängiges Verhalten.

Es zeigt in Nord-Süd-Richtung eine höhere Variabilität als senkrecht dazu. Für die Bestimmung der Variabilität nahe dem Ursprung wurden die Abstände verkleinert und gesondert untersucht. Hier zeigte sich, daß die Werte sehr stark von wenigen Ausreißern beeinflusst werden. Aus diesem Grunde wurde für diesen Bereich ein robustes Verfahren (Madogramm) eingesetzt, welches an dieser

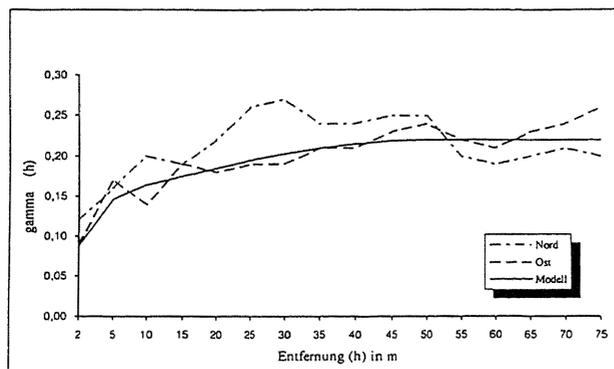


Abb. 4: Variogramm der Variable Protease (Grünland)

Stelle nicht näher diskutiert werden kann. Diesen beiden Variogrammen wurde ein Durchschnittsvariogramm (Modell) angepaßt, welches aus zwei sphärischen Modellen zusammengesetzt ist. Die Varianz am Ursprung (nugget effect) konnte mit 0,04 bestimmt werden, dies entspricht ungefähr der Analysenvarianz. Die beiden größeren Einflußzonen werden durch die räumliche Struktur innerhalb des Untersuchungsgebietes bestimmt. In der Nord-Süd-Richtung ändern sich die Werte im Kleinbereich rascher (in der Größenordnung des ersten Schwellwertes) als in der Ost-West-Richtung. Das für die Interpolation mittels Kriging verwendete Modell und seine Parameter waren:

- Ursprungsvarianz (nugget effect): 0,04
 1. Schwellwert: 0,10 Einflußzone: 6,25 m
 2. Schwellwert: 0,08 Einflußzone: 50 m

Zuerst wurde das gefundene empirische Modell auf seine Anwendbarkeit getestet. Dabei wird ein punktuelles Kriging an den jeweiligen Datenpunkten durchgeführt, ohne jedoch dabei diesen Wert in die Berechnung miteinzubeziehen (Kreuzvalidierung). Im direkten Vergleich mit dem bekannten Meßwert und den daraus resultierenden Differenzen, lassen sich bereits einige Aussagen über die „Güte“ des eingesetzten Modells treffen. Der mittlere arithmetische Fehler zwischen den Meßwerten und den geschätzten Werten betrug $-0,00112$, was durch die Unverzerrtheitsbedingung des Algorithmus bedingt wird. Die dadurch ermittelte Kriging-Varianz betrug 0,15578 bei einem mittleren Fehler von 0,026. Im Vergleich dazu lag die mit Hilfe der klassischen Statistik geschätzte Varianz bei 0,22 mit einem mittleren Fehler von 0,033.

Im Anschluß an die Kreuzvalidierung erfolgte die Interpolation der Proteaseaktivität im Untersuchungsgebiet mit Hilfe eines Blockkrigings. Dabei wurden aufgrund des regelmäßigen Beprobungsmusters keine Punkte berechnet, da viele Stützstellen wiederum direkt auf den Meßstellen zu liegen gekommen wären und der Kriging-Algorithmus als exakter Schätzer den Meßwert ergeben hätte. Vielmehr wurde der Erwartungswert von 5×5 m großen Flächen berechnet, was ein regelmäßiges Gitter von 21×21 Punkten ergab. Die daraus resultierenden Isolinien sind auf Abbildung 5 dargestellt.

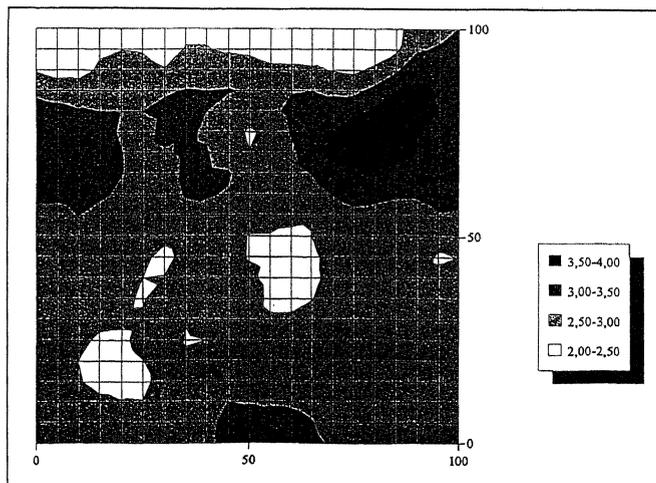


Abb. 5: Verteilung der Proteaseaktivität im 1 ha großen Grasland (Blockkriging)

Die geostatistische Bearbeitung der Variablen Protease im Grünland konnte eine Ortsabhängigkeit dieser Meßgröße innerhalb eines Hektars nachweisen. Für eine repräsentative Beprobung mit möglichst wenigen Einstichen muß für die Ermittlung eines signifikanten Mittelwertes ein Mindestabstand von 40 m eingehalten werden, da erst ab diesem Abstand keine gegenseitige Beeinflussung der Probenahmepunkte vorliegt. Die daraus resultierende Probenanzahl pro Hektar liegt demnach bei neun Einstichen.

Bei Kenntnis des Variogramms für eine bestimmte Fläche reduzieren sich die Einzelproben deutlich. Unter Annahme eines bodenkundlich einheitlichen Feldes beträgt diese Reduktion rund zwei Drittel der normalerweise geforderten Probenanzahl (ca. 30) bei gleichbleibender Signifikanz.

Diese gefundenen Erkenntnisse wurden abschließend an einem mittels geostatistischer Simulation erstellten künstlichen Datensatz überprüft. Dabei wurde mit einer modifizierten Monte-Carlo-Methode der bestehende Datensatz unter Verwendung des Semivariogramms auf eine Million Daten erweitert. An diesem erweiterten Datensatz konnten die diversen Probenahmemuster getestet und bestätigt werden.

Danksagung

Für die Hilfe bei der Durchführung der Enzymaktivitätsbestimmungen sei Frau Johanna FISCHERLEHNER und Herrn Andreas EDLINGER herzlich gedankt.

Literatur

- AICHBERGER, K., 1986: Soil sampling for trace element analyses and its statistical evaluation. *Comm. Eur. Communities, Probl. Chem. Anal. Sludge, Soils Plants*, 38–44.
- BURGESS, T. M. and R. WEBSTER, 1980a: Optimal interpolation and isarithmic mapping of soil properties. I. The semi-variogram and punctual kriging. *Journal of Soil Science* 31, 315–331.
- BURGESS, T. M. and R. WEBSTER, 1980b: II. Block kriging. *Journal of Soil Science* 31, 333–341.
- BURGESS, T. M. and R. WEBSTER, 1980c: III. Changing drift and universal kriging. *Journal of Soil Science* 31, 505–524.
- BURGESS, T. M. and R. WEBSTER, 1981: IV. Sampling strategy. *Journal of Soil Science* 32, 643–659.
- CAMERON, D. R., M. NYBORG, J. A. TOOGOOD and D. H. LAVERTY, 1971: Accuracy of field sampling for soil test. *Can. J. Soil Sci.* 51, 165–175.
- DUTTER, R., 1985: Geostatistik. Aus: *Mathematische Methoden in der Technik*. B. G. Teubner, Stuttgart.
- EBING, W. and G. HOFFMANN, 1975: Richtlinie zur Probenahme von Böden, die auf Spuren organischer oder anorganischer Fremdstoffe von Umweltschutzinteresse untersucht werden sollen. *Z. Anal. Chem.* 275, 11–13.
- GEIDEL, H. und P. SCHÄFER, 1976: Stichprobenprobleme bei der Entnahme und Analyse von Bodenproben. *Landw. Forschung* 29, 149–160.
- HOFFMANN, G., 1968: Eine photometrische Methodik zur Bestimmung der Phosphataseaktivität im Boden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 113, 161–172.
- HOFFMANN, G. und P. SCHWEIGER, 1981: Entnahme von Boden- und Pflanzenproben zur Untersuchung auf Schwermetalle. *Staub-Reinhalt. Luft* 41, 443–444.
- LADD, J. N. and J. H. A. BUTLER, 1972: Short term assays of soil proteolytic enzymes activities using proteins and dipeptides. *Soil Biol. Biochem.* 4, 19–30.
- MCBRATNEY, A. B. and R. WEBSTER, 1983: How many observations are needed for regional estimation of soil properties? *Soil Sci.* 135, 177–183.
- MCBRATNEY, A. B. and R. WEBSTER, 1986: Choosing functions for semi-variograms of soil properties and fitting them to sampling estimates. *Journal of Soil Science* 37, 617–639.
- PETERSEN, R. G. and L. D. CALVIN, 1965: *Sampling. Methods of soil analysis Part 1*. American society of agronomy, Inc., Publisher Madison, Wisconsin, USA.
- SIEGENTHALER, A., 1979: Fehlerquellen bei der Entnahme und Analyse von Bodenproben. *Information des Schweizerischen Verbandes der Ingenieur-Agronomen und der Lebensmittelingenieure*.

- THALMANN, A., 1968: Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität der Böden mit TTC. *Landw. Forschung* 31, 249.
- VERMEULEN, F. H. B., 1977: Der Einsatz des Computers bei der Analyse von Bodenproben und bei der Erstellung von Düngerempfehlungen. *Landw. Forschung* 30, 331—338.
- WEBER, E., 1986: *Grundriß der biologischen Statistik*. 9. Aufl., Stuttgart, Gustav-Fischer-Verlag.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Richard ÖHLINGER und Dipl.-Ing. Anton EIBELHUBER, Bundesanstalt für Agrarbiologie, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz; Dr. Martin VINZENZ, Esplanade 2, A-4820 Bad Ischl