

***Bedeutung von Struktur und Funktion
mikrobieller Gemeinschaften für den
Kohlenstoff-Umsatz im landwirtschaftlich
genutzten Boden:
Modelluntersuchungen in
prozessorientierten Mikrokosmen***

Jost Liebich

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3896
ISSN 0944-2952
Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre
Institut IV: Agrosphäre Jül-3896
D 82 (Diss., Aachen, RWTH, 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Bedeutung von Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften für den Kohlenstoff-Umsatz im landwirtschaftlich genutzten Boden: Modelluntersuchungen in prozessorientierten Mikrokosmen

Die mikrobiellen Gemeinschaften des Bodens sind verantwortlich für die Stoffkreisläufe und damit auch den Erhalt der Fruchtbarkeit landwirtschaftlich genutzter Böden. Um den Einfluss anthropogener Aktivität, z.B. durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, auf den Boden, seine Mikroflora und die damit verbundenen Stoffkreisläufe beurteilen zu können, ist ein detailliertes Wissen über die Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften in Böden notwendig. In dieser Arbeit wurden die am Umsatz von Ernterückständen beteiligten Mikroorganismen in prozessorientierten Mikrokosmen unter anderem mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) amplifizierter 16S rDNA-Abschnitte untersucht. Die in den Mikrokosmen aufgebauten Huminsäuren dienten als Indikator für die Qualität des Humifizierungsprozesses und wurden mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert.

Boden (Parabraunerde) wurde durch Glühen bei 600 °C von organischem Kohlenstoff befreit. In diesem Boden wurde der Abbau und die Humifizierung ^{14}C -markiertem Maisstrohs durch definierte und durch die natürlich vorkommenden komplexen mikrobiellen Gemeinschaften untersucht. Die definierten Gemeinschaften bestanden aus Bodenisolaten, die am Umsatz von Maisstroh beteiligt sind. Sie wurden in Bodenmikrokosmen mit Maisstroh als einziger Kohlenstoffquelle angereichert. Nach verschieden langer Inkubationszeit wurden die Mikroorganismen aus den Mikrokosmen extrahiert und auf R2A (Standardmedium für Umweltbakterien), Bodenextraktagar (mit geringer Menge leicht verfügbaren Kohlenstoffs) und Malzextraktagar (zur Kultivierung von Pilzen) kultiviert.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsabschnitte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Zugabe einer anorganischen Stickstoffquelle förderte den Abbau von ^{14}C -markiertem Maisstroh im geglühten Boden nach Inokulation mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft. Nach 42 Tagen erreichte die Mineralisierung dort mit 40 % (± 2 %) der applizierten Radioaktivität vergleichbare Mengen wie in Boden mit nativer Kohlenstoffmatrix (42 % der applizierten Radioaktivität). Bei längerer Inkubation stieg die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nur noch geringfügig an und es zeigte sich, dass die Zugabe einer künstlichen Bodenlösung mit geringem Stickstoffgehalt einen weitergehenden Abbau zur Folge hat. In dieser Variante wurden die größten Mengen an $^{14}\text{CO}_2$ in geglühtem Boden produziert, vergleichbar mit der Mineralisation im nativen Boden (jeweils 53 % der applizierten Radioaktivität). Insgesamt betrachtet lag die Mineralisation von Maisstroh durch die komplexen Gemeinschaften in geglühtem sowie nativem Boden in einer ähnlichen Größenordnung.

- Die untersuchten mikrobiellen Prozesse und die Humifizierung von Maisstroh waren in den Mikrokosmen mit geglühtem, autoklaviertem bzw. nativem Boden nach Inokulation durch eine Bodensuspension mit komplexer mikrobieller Gemeinschaft vergleichbar. Keimzahlbestimmung und DGGE-Analysen zeigten, dass in den ersten Wochen der Inkubation vor allem einige schnellwachsende *r*-Strategen am Abbau des toten Pflanzenmaterials beteiligt waren, während im weiteren Verlauf die Pilzbiomasse ebenso wie die mikrobielle Diversität zunahm. Gleichzeitig wurde die Humifizierung des Stroh mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie verfolgt, wobei innerhalb von 26 Wochen in den Huminsäureextrakten der Anteil huminstofftypischer Strukturen und die mittlere Molekülgröße zunahmen.
- In den Mikrokosmen wurden verschiedene Mischkulturen mit Bodenisolaten (jeweils 10 Bakterien und 3 Pilze) eingesetzt, um die Bedeutung der mikrobiellen Diversität für die Humifizierungsprozesse festzustellen. Durch die komplexen Gemeinschaften wurden 41 % (± 4 %) des applizierten Radiokohlenstoffes mineralisiert. Dagegen kamen die effektivsten definierten Gemeinschaften lediglich auf 35 % (± 2 %). Die Untersuchung von Huminsäuren mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie ergab keinen Unterschied in der Entstehung huminstofftypischer funktioneller Gruppen während einer 6-wöchigen Inkubation in Mikrokosmen mit definierten und komplexen Gemeinschaften. Allerdings ergaben die GPC-Analysen, dass nach Inkubation mit den definierten Gemeinschaften keine Längenzunahme der Huminsäuren im Gegensatz zu den komplexen Gemeinschaften stattgefunden hat. Es können also nicht alle Prozesse der Humifizierung durch die hier ausgewählten definierten Gemeinschaften abgebildet werden.
- In einer Fallstudie wurde der Fungizidwirkstoff Dithianon in einer Konzentration von 50 mg kg^{-1} Boden eingesetzt, um die Sensibilität der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften am Beispiel des Einflusses durch ein Pflanzenschutzmittel zu testen. Die Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh und die mikrobielle Aktivität wurden durch die Pflanzenschutzmittel-Applikation geringfügig verringert. Dagegen wurde der Aufbau pilzlicher Biomasse in den ersten 2 Wochen unterdrückt. Auch 3 Wochen nach der Dithianon-Applikation lagen die Ergosterolgehalte im Boden noch unterhalb der in den Kontrollvarianten. Allerdings wurde trotz dieser Effekte auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden keine Veränderung der Humifizierungsprodukte festgestellt.

Significance of structure and function of microbial communities for carbon turnover in agricultural soil: Model studies in process-oriented microcosms

The microbial communities in the soil are responsible for material cycling and thus also for maintaining the fertility of agricultural soils. In order to assess the influence of anthropogenic activity, e.g. from the application of pesticides, on the soil, its microflora and the associated material cycles, detailed knowledge is required on the structure and function of microbial communities in soils. In the present study, the microorganisms involved in the conversion of crop residues were investigated in process-oriented microcosms, amongst other procedures, by means of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the amplified 16S rDNA sections. The humic acids synthesized in the microcosms served as indicators of the quality of the humification process and were analysed by ^{13}C -NMR spectroscopy and gel permeation chromatography (GPC).

The soil (an orthic luvisol) was freed from organic carbon by heating at 600 °C. In this soil, the degradation and humification of ^{14}C -labelled maize straw was studied by defined and naturally occurring complex microbial communities. The defined communities consisted of soil isolates involved in the conversion of maize straw. They accumulated in soil microcosms with maize straw as the sole carbon source. After various incubation periods, the microorganisms were extracted from the microcosms and cultivated on R2A (standard medium for environmental bacteria), soil extract agar (with a slight quantity of readily available carbon) and malt extract agar (to cultivate fungi).

The results of the various sections of the experiment can be summarized as follows:

- The addition of a source of inorganic nitrogen encouraged the degradation of ^{14}C -labelled maize straw in the heat-treated soil after inoculation with a complex microbial community. After 42 days, the mineralization there (40 % (± 2 %) of the applied radioactivity) reached comparable levels to those in soil with a native carbon matrix (42 % of the applied radioactivity). With a longer incubation period, the $^{14}\text{CO}_2$ production only increased slightly and it became apparent that the addition of a synthetic soil solution with a low nitrogen content resulted in more extensive degradation. In this variant, the greatest volumes of $^{14}\text{CO}_2$ were produced in the heat-treated soil, comparable to the mineralization in the native soil (in each case 53 % of the applied radioactivity). Considered as a whole, the mineralization of maize straw by the complex communities in heat-treated soil was in a similar order of magnitude to that of the native soil.

- The microbial processes investigated and the humification of maize straw were comparable in the microcosms with heated, autoclaved or native soil after inoculation with a soil suspension containing a complex microbial community. Bacterial counting and DGGE analyses showed that in the first few weeks of incubation primarily some rapidly growing *r*-strategists were involved in the degradation of dead plant material whereas in the further course of the investigation the fungal biomass increased as did the microbial diversity. At the same time, humification of the straw was monitored by ^{13}C -NMR spectroscopy and gel permeation chromatography revealing that within 26 weeks the fraction of structures typical of humic substances in the humic acid extracts and the average molecule size increased.
- Different mixed cultures with soil isolates (each consisting of 10 bacteria and 3 fungi) were used in the microcosms in order to determine the significance of microbial diversity for the humification processes. 41 % (± 4 %) of the applied radiocarbon was mineralized by the complex communities. In contrast, the most effective defined communities only achieved 35 % (± 2 %). The investigation of humic acids by ^{13}C -NMR spectroscopy did not indicate any difference in the formation of functional groups typical of humic substances during a 6-week incubation in microcosms with defined and complex communities. However, the GPC analyses revealed that after incubation with the defined communities no increase in the length of humic acids occurred in contrast to the complex communities. This therefore showed that not all humification processes can be simulated by the defined communities selected here.
- In a case study, the fungicide active ingredient dithianon was applied in a concentration of 50 mg kg⁻¹ of soil in order to test the sensitivity of the microcosms containing complex microbial communities with the example of the influence of a pesticide. The mineralization of ^{14}C -labelled maize straw and the microbial activity were only slightly reduced by the application of the pesticide. In contrast, the build-up of fungal biomass was suppressed in the first two weeks. Even three weeks after dithianon application, the ergosterol contents in the soil were still below those in the control variants. However, in spite of these effects on the microbial communities in the soil no change in the humification products was detected.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	THEORETISCHER HINTERGRUND	3
2.1	Das organische Material des Bodens	3
2.2	Mikrobielle Diversität im Boden	5
2.3	Moderne Verfahren der Bodenmikrobiologie	6
2.4	Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Beurteilung von Pflanzenschutzmitteleffekten auf Bodenmikroorganismen	11
2.5	Das Fungizid Dithianon	12
3	BESCHREIBUNG DER MIKROKOSMOS-EXPERIMENTE	13
3.1	Kultivierung und Charakterisierung prozessrelevanter Mikroorganismen	13
3.1.1	Kultivierung und Isolierung	13
3.1.2	Charakterisierung prozessrelevanter Mikroorganismen	17
3.1.2.1	Charakterisierung des Zellwandaufbaus	17
3.1.3	Identifizierung isolierter Bakterien mit dem BIOLOG-System	19
3.1.4	Identifizierung isolierter Pilze	20
3.2	Aufbau der Mikrokosmen	20
3.2.1	Boden	20
3.2.2	Maisstroh	21
3.2.3	Abbaugefäße	22
3.3	Vorversuch mit definierten und mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften	23
3.4	Einfluss der Nährstoffversorgung komplexer mikrobieller Gemeinschaften auf die Mineralisierung von Maisstroh	25
3.5	Umsatz von Maisstroh durch definierte mikrobielle Gemeinschaften	27

3.6	Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften	29
3.7	Einfluss von Dithianon auf die Mineralisierung des Maisstrohs und die beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften	30
4	BIOLOGISCHE UND CHEMISCHE ANALYTIK DER PROZESSE IN DEN MIKROKOSMEN	32
4.1	Bestimmung mikrobiologischer Summenparameter	32
4.1.1	Mineralisierung von ¹⁴ C-markiertem Maisstroh	32
4.1.2	Mikrobielle Aktivität: DMSO-Reduktase-Raten	32
4.1.3	Keimzahlbestimmung: Koloniebildende Einheiten	33
4.1.4	Pilzbiomasse: Ergosterolgehalt	34
4.2	Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften: DGGE-Muster	37
4.2.1	DNA-Extraktion aus Boden	37
4.2.1.1	Probenmenge	37
4.2.1.2	Vorinkubation und Zellaufschluss	37
4.2.1.3	Aufreinigung von DNA aus Boden	39
4.2.2	Extraktion von DNA aus Bakterien	42
4.2.3	Amplifikation speziesspezifischer DNA-Sequenzen	42
4.2.4	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	44
4.2.5	Silberfärbung	46
4.3	Bestimmung bodenphysikalischer Parameter	47
4.3.1	Bodenfeuchte	47
4.3.2	pH-Wert	47
4.3.3	Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte im Boden	47
4.3.4	Bestimmung der ¹⁴ C-Aktivität im Boden	47
4.4	Charakterisierung der Huminsäuren	48
4.4.1	Huminstoff-Extraktion	48
4.4.2	Flüssig- ¹³ C-NMR von Huminsäuren	49
4.4.3	Gelpermeationschromatographie	50

5	ERGEBNISSE	53
5.1	Isolierung prozessrelevanter Mikroorganismen	54
5.2	Optimierung der molekularbiologischen Methoden	56
5.2.1	Time-Travel-Experiment	56
5.2.2	Reproduzierbarkeit von DGGE-Mustern gleicher Proben bzw. Varianten	58
5.3	Vorversuch mit definierten und komplexen mikrobiellen Gemeinschaften	60
5.3.1	Mineralisation von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh	60
5.3.2	Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels DGGE	61
5.4	Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Mineralisierung von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften	66
5.4.1	Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh	66
5.4.2	Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten)	68
5.4.3	Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE	69
5.4.4	C/N-Verhältnisse im Boden	71
5.5	Umsatz von Maisstroh durch definierte mikrobielle Gemeinschaften	73
5.5.1	Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh durch definierte und durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften	73
5.5.2	Ergosterolgehalte im Boden	74
5.5.3	Molekularbiologische Aufarbeitung der definierten Bakterien-Gemeinschaften	75
5.5.4	Analyse von Huminsäuren mittels ^{13}C -flüssig-NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie	86
5.5.4.1	Vergleich von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh und aus einer nativen Parabraunerde	86
5.5.4.2	Huminsäuren-Extrakte nach 6-wöchiger Inkubation von Maisstrohrotten mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften	88

5.6	Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften	90
5.6.1	Abbau von uniform ¹⁴ C-markiertem Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften über 26 Wochen	91
5.6.2	Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen	93
5.6.3	Keimzahlen (Koloniebildende Einheiten)	95
5.6.4	Ergosterolgehalte im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen	97
5.6.5	Molekularbiologische Analyse der komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in den Mikrokosmen mittels DGGE	99
5.6.6	C/N-Verhältnisse im Boden	101
5.6.7	Analyse von Huminsäuren-Extrakten des Maisstrohs vor, nach 10-wöchiger und nach 26-wöchiger Inkubation mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften	102
5.7	Einfluss von Dithianon auf die Mineralisierung des Maisstrohs und auf die daran beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften	107
5.7.1	Abbau von uniform ¹⁴ C-markiertem Maisstroh	107
5.7.2	Einfluss von Dithianon auf die mikrobielle Aktivität in Maisstroh-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften	108
5.7.3	Einfluss von Dithianon auf die Ergosterolgehalte im Boden	109
5.7.4	Einfluss von Dithianon auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften	110
5.7.5	Aufnahme von ¹³ C-Flüssig-NMR-Spektren und Gelpermeationschromatogrammen neugebildeter Huminsäuren unter Dithianon-Einfluss	113

6	DISKUSSION	116
6.1	Diskussion der einzelnen Versuchsabschnitte	116
6.1.1	Isolate	116
6.1.2	Kritische Betrachtung der Mikrokosmos Experimente zum Maisstroh-Umsatz im Boden	118
6.1.3	Vorversuch mit definierten und mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften	121
6.1.4	Einfluss der Nährstoffversorgung komplexer mikrobieller Gemeinschaften auf die Mineralisierung des Maisstrohs	123
6.1.5	Umsatz von Maisstroh durch definierte und komplexe mikrobielle Gemeinschaften	126
6.1.6	Mikrokosmen Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften	128
6.1.7	Einfluss von Dithianon auf den Umsatz von Maisstroh und die daran beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften	132
6.2	Zusammenfassende Bewertung	136
6.2.1	Bedeutung einer hohen mikrobiellen Diversität für die Humifizierung von Ernterückständen	136
6.2.2	Untersuchung von Xenobiotika in prozessorientierten Mikrokosmen	138
6.2.3	Schlussfolgerungen	140
7	ZUSAMMENFASSUNG	143
8	LITERATUR	145
9	ANHANG	163

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Übersicht über das Prinzip und die Komponenten der Umsatzversuche.....	2
Abbildung 2-1	Verbleib und Umsatz von Ernterückständen im Krumenhorizont landwirtschaftlich genutzter Böden.....	4
Abbildung 2-2	Überblick über die Funktionen mikrobieller Gemeinschaften im Bodenmit einem Einfluss auf die Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit.....	5
Abbildung 2-3	Übersicht über die Methoden der mikrobiellen Ökologie (Erklärungen siehe Text).....	7
Abbildung 2-4	Molekularbiologische Charakterisierung von Bodenproben mittels DGGE.	9
Abbildung 2-5	Struktur der Basen der Desoxyribonukleinsäure und Art ihrer Paarung über Wasserstoffbrücken-Bindungen (gestrichelte Linien)	10
Abbildung 2-6	Strukturformel von Dithianon.....	12
Abbildung 3-1	Anreicherung von Mikroorganismen in Mikrokosmen (A) und Flüssigkulturen (B).....	16
Abbildung 3-2	Schematischer Aufbau eines Abbaugesäßes.....	22
Abbildung 4-1	Agarose Gelelektrophorese von aus Boden extrahierter DNA nach verschiedenen Schritten der Aufarbeitung (A, B, C: DNA extrahiert aus Bodenproben nach Ethanol-Fällung (1), Reinigung über QIAexII (2) oder DGGE-PCR (3), x: 100 bp Molekulargewichts-Marker; Färbung mit Ethidium-Bromid).....	41
Abbildung 4-2	Schema der Huminstoff-Fraktionierung.....	49
Abbildung 4-3	Kalibrationskurve der Molekülmassenstandards.....	52
Abbildung 5-1	Bestimmung der Lebendkeimzahl in den Maisstrohhrotten für die Isolierung prozessrelevanter Mikroorganismen.....	54
Abbildung 5-2	Auftrennung der einzelnen Komponenten des Standard-Mix in der DGGE. (Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h).....	57
Abbildung 5-3	Time-Travel-Experiment zur Bestimmung der optimalen zeitlichen Auflösung der DGGE mit dem Standard-Mix (links) und mit Boden-DNA (rechts). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V.....	58
Abbildung 5-4	DGGE-Gel von Parallel-Aufarbeitungen vergleichbarer Bodenproben zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit . A: Maisstrohhrotte mit geglühtem Boden nach 6 Wochen; B: Maisstrohhrotte mit geglühtem Boden und zusätzlicher N- Zufuhr nach 6 Wochen; 1, 2, 3: Parallelansätze der Mikrokosmen; I, II: Parallelaufarbeitungen gleicher Ansätze. DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.	59
Abbildung 5-5	Abbau von ¹⁴ C-markiertem Maisstroh (applizierte Radioaktivität = 100 %) in den Rotte-Experimenten des Vorversuches mit definierten (V 1 und V 2) und komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (V 3 und V4: Anreicherungskulturen, V 5: Bodensuspension, V 6: Maisstrohbesiedler). V 7 enthielt kein ¹⁴ C-markiertes Maisstroh.....	60

Abbildung 5-6	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA aus Bodenproben der Varianten mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (V 3 und V4: Anreicherungskulturen, V 5: Bodensuspension, V 6: Maisstrohbesiedler, V 7: Bodensuspension, nicht radioaktives Maisstroh) nach 6-wöchiger Inkubation (I und II: Parallel-Aufarbeitungen der gleichen Proben). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 50 V, 16 h.	62
Abbildung 5-7	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Variante V 1 eingesetzten Isolate (vgl. Anhang B), einer Mischung dieser Isolate (M) und aus der entsprechenden 6 Wochen alten Bodenprobe (V 1). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 45 V, 15 h.	63
Abbildung 5-8	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Variante V 2 eingesetzten Isolate (vgl. Anhang B), einer Mischung dieser Isolate (M) und aus der entsprechenden 6 Wochen alten Bodenprobe (V 2). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 45 V, 15 h.	65
Abbildung 5-9	Zeitlicher Verlauf der Maisstroh-Mineralisierung (Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelen; applizierte Radioaktivität = 100 %).	67
Abbildung 5-10	Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen nach 4-wöchiger Inkubation (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen, Ausreißer in Varianten B und G wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt). Zur Beschreibung der Varianten vgl. Tabelle 3-4.	69
Abbildung 5-11	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA komplexer mikrobieller Gemeinschaften in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit geglühtem Boden und verschiedener Nährstoffversorgung 6 Wochen nach Versuchsbeginn (jeweils 2 Parallel-Aufarbeitungen gezeigt; A: getrockneter Boden + H ₂ O; B: H ₂ O; C: Bodenlösung; D: SSE; E: H ₂ O + KAS; F: Bodenlösung + KAS; G: Bodenlösung + KAS (ohne Bodenorganismen); zur genauen Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.	70
Abbildung 5-12	C/N-Verhältnisse im Ausgangsmaterial (A) und in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit verschiedener Mineralstoffversorgung nach 6-wöchiger Inkubation (B; von Variante B (ohne Zugabe von Mineralstoffen) konnte das C/N-Verhältnis aufgrund mangelnden Probenmaterials nicht analysiert werden; zur Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4).	72
Abbildung 5-13	Mineralisierung von ¹⁴ C-markiertem Maisstroh durch eine komplexe (Bodenlösung) und 10 verschiedene definierte mikrobielle Gemeinschaften nach 1 und 6 Wochen (in % a. R. = applizierte Radioaktivität).	74
Abbildung 5-14	Ergosterolgehalte im Boden der Mikrokosmen mit komplexen (k) bzw. mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften (1 – 10).	75
Abbildung 5-15	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 1 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).	76
Abbildung 5-16	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 2 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).	77

Abbildung 5-17	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 3 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	78
Abbildung 5-18	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 4 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	79
Abbildung 5-19	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 5 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	80
Abbildung 5-20	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 6 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	81
Abbildung 5-21	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 7 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	82
Abbildung 5-22	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 8 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	83
Abbildung 5-23	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 9 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	84
Abbildung 5-24	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 10 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation, sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).....	85
Abbildung 5-25	¹³ C-NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh in geglühtem Boden vor der Inkubation (A, 200 000 Scans) und aus einer Typischen Parabraunerde (B, 70 000 Scans).....	87
Abbildung 5-26	Chromatogramme der Gelpermeationschromatographie von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh in geglühtem Boden vor der Inkubation (A) und aus einer Typischen Parabraunerde (B).	88
Abbildung 5-27	¹³ C-NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte in geglühtem Boden nach 6-wöchiger Inkubation (200 000 Scans).	89
Abbildung 5-28	Verlauf der Bodenfeuchte in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen.	91

Abbildung 5-29	Akkumulierte Mineralisierung des ^{14}C -markierten Maisstroh nach 1, 2, 4, 10, 20 und 26 Wochen (Linien sind verbundene Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelen (Punkte); applizierte Radioaktivität = 100 %).	92
Abbildung 5-30	Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen).	94
Abbildung 5-31	Anzahl koloniebildender Einheiten als cfu g ⁻¹ Boden (Trockenmasse) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Mittelwerte aus 4 – 6 Auszählungen, vgl. Tabelle 5-7).	96
Abbildung 5-32	Ergosterolgehalt im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in µg g ⁻¹ Boden (Trockenmasse; Linien sind verbundene Mittelwerte aus 3 Parallelen (Punkte) mit jeweils 3 unabhängigen Aufarbeitungen).	98
Abbildung 5-33	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der mikrobiellen Gemeinschaften nach 2-wöchiger und nach 10-wöchiger Inkubation. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 50 V, 16 h.	100
Abbildung 5-34	Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der mikrobiellen Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit geglühtem (A) und autoklaviertem Boden (B) nach 1-, 2- und 10-wöchiger Inkubation. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 50 V, 16 h.	100
Abbildung 5-35	C/N-Verhältnisse über 26 Wochen im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.	101
Abbildung 5-36	^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit geglühtem Boden vor, 10 und 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (jeweils 200 000 Scans).	103
Abbildung 5-37	^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit autoklaviertem Boden vor (62 000 Scans), 10 und 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).	104
Abbildung 5-38	^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit nativem Boden vor, 10 und 26 Wochen nach Beginn der Inkubation (200 000 Scans).	105
Abbildung 5-39	Akkumulierte Mineralisation von ^{14}C -markiertem Maisstroh in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften mit und ohne Dithianon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen, kleine Symbole sind Einzelwerte; a. R. = applizierte Radioaktivität = 100 %).	108
Abbildung 5-40	Mikrobielle Aktivität in den Maisstroh-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und Dithianon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen).	109
Abbildung 5-41	Ergosterolgehalt im Boden der Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und Dithianon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelen).	110
Abbildung 5-42	Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 2, 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. A: geglühter Boden, B: autoklavierter Boden. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 55 V, 16 h.	111
Abbildung 5-43	Vergleich mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen in geglühtem (A) bzw. autoklaviertem Boden (B) ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 2, 7, 14 oder 21 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. DGGE: Gradient 40 – 55 %, 55 V, 16 h.	112

Abbildung 5-44	¹³ C-NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit geglühtem Boden ohne und mit Dithianon-Behandlung 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).	114
Abbildung 5-45	¹³ C-NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit autoklaviertem Boden ohne bzw. mit Dithianon-Behandlung 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).	115
Abbildung 6-1	Ausschnitt der gelelektrophoretischen Auftrennung (DGGE) von PCR- Produkten der 16S rDNA komplexer mikrobieller Gemeinschaften in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit luftgetrocknetem Boden (A), mit geglühtem Boden ohne Nährstoff-Zugabe (B) bzw. mit KAS-Düngung (E) 6 Wochen nach Versuchsbeginn (Spuren aus Abbildung 5-11 neu geordnet; zur genauen Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.	124
Abbildung 6-2	Vergleich mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen in geglühtem (A) bzw. autoklaviertem Boden (B) ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 14 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. DGGE: Gradient 40 – 55 %, 55 V, 16 h.	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Lösungen und Kulturmedien zur Isolierung und Anreicherung von Bakterien und Pilzen aus Boden.....	15
Tabelle 3-2	Protokoll zur Gram-Färbung.	18
Tabelle 3-3	Chemisch-physikalische Charakterisierung des Versuchsbodens (Angaben sind Mittelwerte aus 2 Parallel-Messungen).	21
Tabelle 3-4	Übersicht über die Varianten im Experiment mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung der Mikrokosmen.	26
Tabelle 4-1	Übersicht über Vor- und Nachteile verschiedener Methoden zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse im Boden.....	35
Tabelle 4-2	Übersicht über die Versuchsbedingungen der DGGE.	45
Tabelle 5-1	Übersicht über die mittels BIOLOG auf Gattungs- oder Artebene identifizierten Bakterien-Isolate und ihre phylogenetische Gruppierung (nach WOESE, 1987).	55
Tabelle 5-2	Mineralisierung des ¹⁴ C-Maisstrohs nach 6 und 28 Wochen (in % a. R. = applizierte Radioaktivität).	67
Tabelle 5-3	Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen nach 4-wöchiger Inkubation (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen). Zur Beschreibung der Varianten vgl. Tabelle 3-4.....	68
Tabelle 5-4	Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte in den Ausgangsmaterialien für die Maisstrohhotte-Mikrokosmen (Mittelwerte aus 3 Parallelen).	71
Tabelle 5-5	Zeitlicher Verlauf der Mineralisierung von ¹⁴ C-Maisstroh in Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (a. R. = applizierte Radioaktivität = 100 %; v. R. = aktuell im Boden vorhandene Radioaktivität).	92
Tabelle 5-6	DMSO-Reduktase-Raten als Indikator für die mikrobielle Aktivität in Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.	94
Tabelle 5-7	Anzahl koloniebildender Einheiten als cfu g ⁻¹ Boden (Trockenmasse) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.	96
Tabelle 5-8	Ergosterolgehalt im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (bezogen auf die Trockenmasse).	98
Tabelle 5-9	Retentionszeiten und daraus errechnete Molekülgrößen (vgl. Kalibrationskurve in Abbildung 4-3) von Huminsäuren, vermessen mittels Gelpermeationschromatographie.	106
Tabelle 6-1	Vergleich von Ergosterolgehalten in Mikrokosmen mit gleichen Anfangsbedingungen in verschiedenen Versuchsabschnitten (H A und H B: Abbau von Maisstroh in Mikrokosmen über 26 Wochen; A I und B I: Mikrokosmen zur Beschreibung von Pflanzenschutzmittel-Effekten; angegeben sind Mittelwerte der Parallelen mit ihren Standardabweichungen). ...	121

Anhangsverzeichnis

Anhang A	Abkürzungsverzeichnis (teilweise mit Bemerkungen).....	163
Anhang B	Übersicht über die in Varianten V 1 und V 2 eingesetzten Isolate (mit internen Bezeichnungen).	165
Anhang C	Übersicht und Beschreibung der in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften (vgl. Kapitel 3.5) eingesetzten Bakterien (Medium R2A und BEA) und Pilze (ME).	166
Anhang D	BIOLOG-Profile und Identifizierung der Maisstrohrotte-Isolate (gute Verwertung der angegebenen Kohlenstoffquelle = „1“, schwache Verwertung = „?“ und keine Verwertung = „0“; weitere Erläuterungen in Abschnitt 3.1.3).	171
Anhang E	Basensequenzen der partiell amplifizierten 18S rDNA von Pilzisolaten ...	180

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die im Boden vorhandenen Mikroorganismen sind wesentlich verantwortlich für den natürlichen Stoffhaushalt und die Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit landwirtschaftlich genutzter Böden (SCHINNER und SONNLEITNER, 1996). Dabei ist insbesondere die Umsetzung organischen Materials von Bedeutung, wobei der Kohlenstoffgehalt im Boden einer jahreszeitlichen Dynamik mit Eintrags- und Austragsprozessen unterliegt. In landwirtschaftlichen Systemen kann ein Verlust an organischem Kohlenstoff als Folge von Mineralisierung oder Auswaschung durch die Rückführung von Ernterückständen ausgeglichen werden (PERUCCI et al., 1997). Das eingetragene organische Material wird im Boden durch abiotische und biologische Prozesse humifiziert, wodurch der Kohlenstoffhaushalt erhalten werden kann.

Diesen natürlich vorkommenden Stoffkreisläufen steht der Eingriff in das Bodenökosystem durch menschliche Aktivität in Form von Bodenbearbeitung, Düngung, Pflanzenschutz, etc. gegenüber. Um deren Einfluss auf den Boden und speziell die Mikroflora beurteilen zu können, bedarf es detaillierter Kenntnisse über die mikrobiellen Prozesse und Interaktionen (BEESE et al., 1994; MCLAUGHLIN und MINEAU, 1995; PANKHURST et al., 1996; KENNEDY, 1999). Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf Mikroorganismen, die sich aus Boden isolieren ließen. Mit heute bekannten Methoden der Kultivierung lässt sich allerdings nur ein Bruchteil der im Boden vermuteten Arten anreichern, wobei diese kultivierbaren Organismen nicht unbedingt die unter natürlichen Bedingungen im Boden dominanten Arten repräsentieren (FELSKE et al., 1999). Mit Methoden der Molekularbiologie ist es seit einigen Jahren möglich, mikrobielle Gemeinschaften auch ohne vorherige Kultivierung zu analysieren (TIEDJE et al., 1999; OGRAM, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die mikrobielle Besiedlung eines Krumenbodens nach Zerstörung der Humusstruktur und die Humifizierung von Maisstroh untersucht. Dazu wurde eine Parabraunerde vom Standort Merzenhausen (Kreis Düren, NRW) durch Glühen bei 600°C thermisch zerstört. Der Vorteil dieser Vorbehandlung liegt darin, dass sich die in den Mikrokosmen entwickelnden Huminsäuren analysieren lassen, ohne dass die Kohlenstoffmatrix im Boden diese neugebildeten organischen Bestandteile überlagert (WAIS et al., 1996). Als Ernterückstand wurde Maisstroh eingesetzt (z.T. ^{14}C -markiert), welches durch eine definierte Mischkultur im Vergleich zu einem komplexeren Frischbodeninokulum abgebaut und humifiziert wurde. Die Laborstudien sollten zur Aufklärung der mikrobiologischen Prozesse beitragen, die an der Umsetzung und Humifizierung von Ernterückständen beteiligt sind. Veränderungen innerhalb der beobachteten mikrobiellen Gemeinschaften wurden mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht. Der Verlauf der Humifizierung in den verschiedenen Varianten wurde durch physikalisch-chemische Methoden, wie ^{13}C -NMR-Spektroskopie oder Gelpermeationschromatographie beobachtet. Einen Überblick über das Prinzip und die wichtigsten variierbaren Komponenten der Umsatzversuche gibt Abbildung 1-1.

Um die Struktur und Funktion der an der Humifizierung von Ernterückständen beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen, wurden verschiedene Aufgaben und Ziele verfolgt:

- Etablierung molekularbiologischer und biochemischer Methoden im Institut
- Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen, die am Abbau von abgestorbenem Pflanzenmaterial beteiligt sind
- Bedeutung der Isolate für den Kohlenstoff-Umsatz im Boden
- Bedeutung bislang nicht kultivierter Mikroorganismen und der mikrobiellen Diversität für die Humifizierung
- Einfluss eines Pflanzenschutzmittels auf den Maisstroh-Umsatz in einer Maisstrohrotte als Fallstudie mit dem Fungizidwirkstoff Dithianon

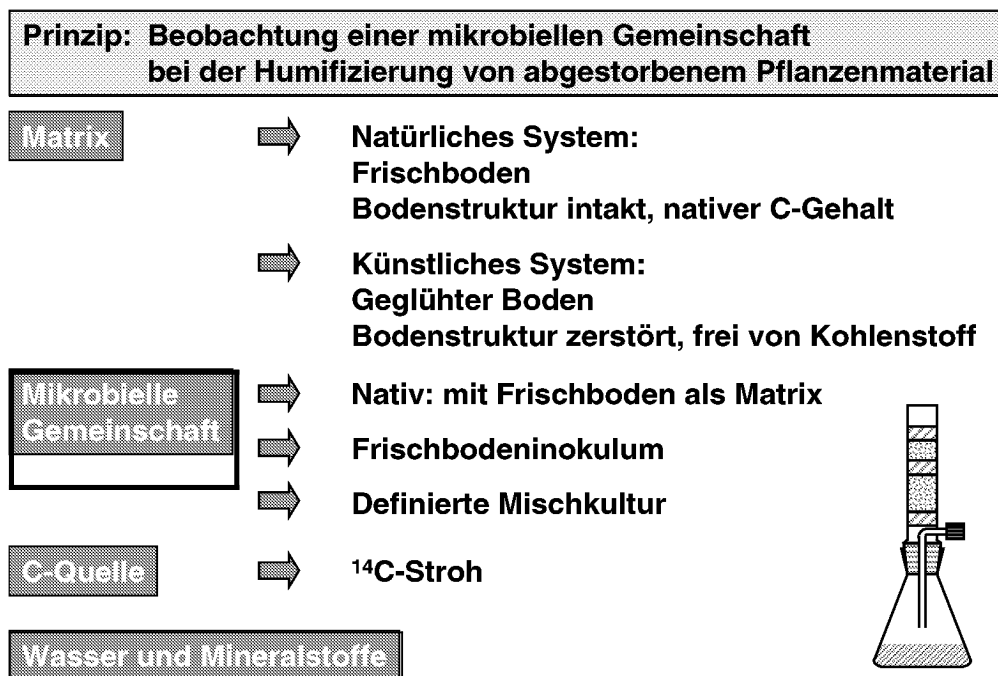


Abbildung 1-1 Übersicht über das Prinzip und die Komponenten der Umsatzversuche.

2 THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Das organische Material des Bodens

Das tote organische Material des Bodens besteht aus pflanzlicher und tierischer Biomasse und ihren Abbau- bzw. Umsatzprodukten in und auf Mineralböden (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Durch seine positiven Effekte auf die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften von Böden trägt diese organische Masse maßgeblich zur Bodenfruchtbarkeit bei (STEVENSON und COLE, 1999). Dabei spielt die organische Substanz sowohl als Nährstofflieferant als auch als Lebensraum für Pflanzen und speziell für Mikroorganismen eine zentrale Rolle (TORSVIK et al., 1990a; BORNEMANN et al., 1996). Letztere sind nicht nur am Abbau toter organischer Masse beteiligt, sondern tragen - durch die Produktion von Ausgangsstoffen für die Humifizierung - auch zum Aufbau der relativ stabilen Huminstoffe bei (HAIDER, 1999). Insbesondere die Stoffkreisläufe im Boden und die damit verbundene Mineralisierung und Humifizierung toten organischen Materials bestimmen neben Bodenstruktur und Kulturmaßnahmen, wie Bodenbearbeitung, Fruchtfolge, Düngung und Pflanzenschutz, die Produktivität in Agrarökosystemen (KENNEDY, 1999).

In landwirtschaftlich genutzten Böden stellt die Einarbeitung von Ernterückständen eine wesentliche Maßnahme zur Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit dar, weil dadurch dem System entzogene Nährstoffe zurückgeführt werden (PERUCCI et al., 1997). Im Rahmen einer Strohdüngung beispielsweise werden dem Boden bis zu 5000 kg ha⁻¹ organisches Material zugeführt (im Maisanbau bis zu 9000 kg ha⁻¹, FÜHR, 2000). Darüber hinaus gelangen in einer Vegetationsperiode bis zu 1500 kg ha⁻¹ a⁻¹ organische Kohlenstoff-Verbindungen in Form von Wurzelausscheidungen, absterbenden Pflanzen und Bodenorganismen in den Boden (SAUERBECK und JOHNEN, 1977; MARTIN und PUCKRIDGE, 1982). Dieser Eintrag führt auf der einen Seite zu einer Zunahme an mikrobieller Aktivität und Biomasse und auf der anderen Seite zur Erhöhung der strukturellen und funktionellen Diversität der Bodenmikroorganismen (SHARMA et al., 1998b). Die Umsatzprodukte tragen zum Aufbau und Erhalt des Humuskörpers im Bodens bei, welcher gleichzeitig den Lebensraum dieser Organismen darstellt. Die durch Humifizierung langfristig festgelegte Menge von jährlich 1-2 % des in den Boden eingetragenen organischen Materials stellt daher einen der wichtigsten Schritte im Kohlenstoffkreislauf landwirtschaftlich genutzter Böden dar (STEVENSON und COLE, 1999). Der Kohlenstoff- und Energiefluss der durch Ernterückstände in den Krumenhorizont eingebracht wird, ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

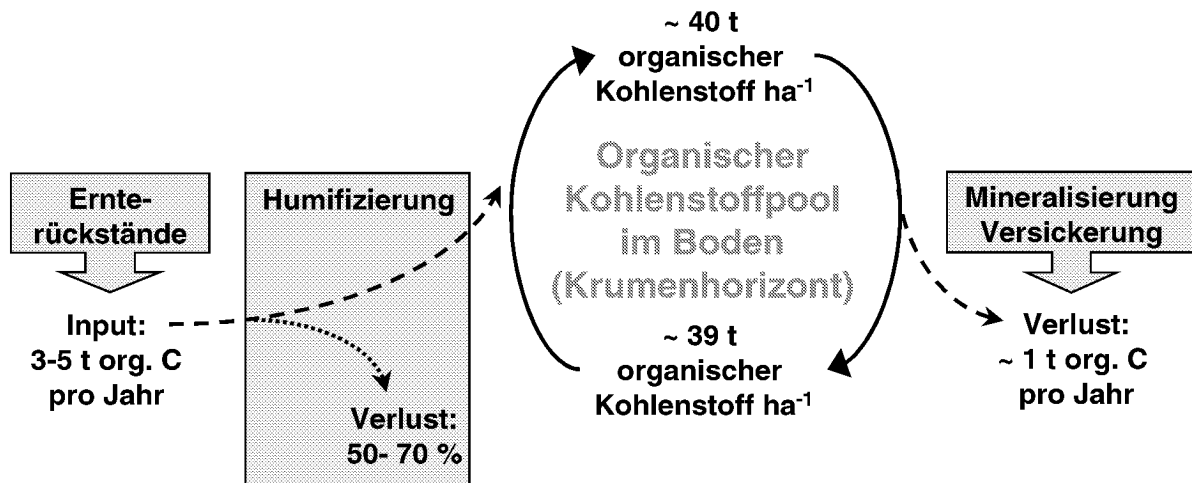


Abbildung 2-1 Verbleib und Umsatz von Ernterückständen im Krumenhorizont landwirtschaftlich genutzter Böden.

Für die Stoffkreisläufe im Boden haben die mikrobiellen Gemeinschaften durch ihre maßgebliche Beteiligung an der Fixierung und Überführung von Nährstoffen in pflanzenverfügbare Formen (SWIFT, 1979), sowie am Abbau und der Immobilisierung von Xenobiotika große Bedeutung (FÜHR, 1986; BURAUDEL et al., 1998; HUANG und BOLLAG, 1998). Darüber hinaus sind sie an der Aggregatbildung beteiligt (STOTZKY, 1986; GUPTA und GERMIDA, 1988; ANDERSON, 1991; KANDELER und MURER, 1993), welche wiederum die Durchwurzelbarkeit, das Filtervermögen und die Speicherkapazität beeinflussen (TISDALL und OADES, 1982). Sowohl die Beteiligung der Mikroorganismen an den Stoffkreisläufen als auch an der Aggregatbildung unterstreichen ihre Bedeutung für den Erhalt von Bodenfruchtbarkeit und Bodenqualität (ATLAS et al., 1990). Einen Überblick über die Bedeutung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden gibt Abbildung 2-2.

Bedeutung mikrobieller Gemeinschaften im Boden

Stoffkreisläufe:

- **Abbau von Xenobiotika**
- **Umsatz von abgestorbener Biomasse**
- **Abbau und Bildung von Huminstoffen**
- **Überführung von Nährstoffen in pflanzenverfügbare Formen**

Aggregatbildung:

- **Durchwurzelbarkeit**
- **Filtervermögen**
- **Speicherkapazität**

⇒ **Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit**

Abbildung 2-2 Überblick über die Funktionen mikrobieller Gemeinschaften im Boden mit Einfluss auf die Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit.

2.2 Mikrobielle Diversität im Boden

Die mikrobielle Tätigkeit in landwirtschaftlichen Böden konzentriert sich hauptsächlich auf den A_p-Horizont eines Bodenprofils (LAVAHUN et al., 1996). Natürliche Einflussfaktoren wie Temperatur-, Feuchte- und pH-Wechsel sowie Nährstoffverfügbarkeit spielen hier ebenso eine wichtige Rolle wie der pflanzliche Bewuchs (CHANITGNY et al., 1996), der selbst einige dieser Faktoren mit steuert. In 1 g Boden werden zwischen 10³ und 10⁴ verschiedene bakterielle Arten vermutet, von denen sich ein großer Teil (90-99 %) heute verfügbaren Kultivierungsmethoden entzieht und daher auch nicht bekannt ist (BORNEMANN et al., 1996; TORSVIK et al., 1990a; Tate, 1997). Gründe für diese „Unkultivierbarkeit“ liegen beispielsweise in der Selektivität von Nährmedien, die nicht an die realen Umweltbedingungen angepasst sind, in Problemen bei der Isolierung von Bakterien, die in Anwesenheit anderer Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht konkurrenzfähig sind, (TREVORS, 1998) und in zu geringen Wachstumsraten (FELSKE et al., 1999). Darüber hinaus unterliegt die mikrobielle Besiedlung von Böden einer großen zeitlichen und räumlichen Diversität (MOORE und DE RUITER, 1991; ANDERSON, 1994; Beare et al., 1995; TESSIER et al., 1998; WARDLE, 1998), so dass eine komplette Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften in Böden fast unmöglich ist.

Neben der Untersuchung der Struktur mikrobieller Gemeinschaften, ist gerade vor dem Hintergrund einer nachhaltigen Bodennutzung die funktionale Diversität von großer

Bedeutung (BEESE et al., 1994; MCLAUGHLIN und MINEAU, 1995; PANKHURST et al., 1996; KENNEDY, 1999). Diese beschreibt die Relevanz der Bodenbewohner für wichtige Schlüsselfunktionen wie Nährstoffkreisläufe und Abbauprozesse (ZAK et al., 1994). Dagegen beschreibt die strukturelle Diversität lediglich phänotypische oder genetische Merkmale, so dass ein Rückschluss auf die Prozesse im Boden nur bedingt gezogen werden kann (LEE und PANKHURST, 1992). TIEDJE et al. (1999) geben einen Überblick über geeignete Methoden zur Beschreibung von Struktur und Aktivität mikrobieller Gemeinschaften im Boden. Es ist zu erwarten, dass verschiedene Gemeinschaften in einem System sich auch unterschiedlich verhalten. Somit bedingt eine mögliche strukturelle Veränderung auch gleichzeitig eine funktionale (KEVIN und GEWIN, 1997).

Ein Vergleich mikrobieller Gemeinschaften in verschiedenen Bodentypen oder Standorten, sowie nach unterschiedlicher Bodennutzung ist für die Beurteilung möglicher Effekte von großem Interesse. So konnten SHARMA et al., 1998 a und b, zeigen, dass Maisstroh-Gaben in verschiedenen Böden bzw. Standorten einen unterschiedlichen Effekt auf die mikrobielle Diversität ausüben können. Darüber hinaus können – bei Einschluss der funktionalen Diversität in die Untersuchung von Ökosystemen – nachteilige Effekte auf die Nachhaltigkeit der Nutzung unserer natürlichen Ressourcen, z.B. durch Bodenbearbeitung oder den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, schnell erkannt werden (KENNEDY und GEWIN, 1997). Die Bestimmung dieser Diversität könnte sich somit zu einem wichtigen Kriterium für die Bewertung von Bodenqualitäten entwickeln.

2.3 Moderne Verfahren der Bodenmikrobiologie

Frühere Arbeiten zur mikrobiellen Diversität beschränkten sich auf die Untersuchung von isolierten Organismen mit Methoden der klassischen Mikrobiologie (Abbildung 2-3, z.B. MARTIN et al., 1980; MILLS und WASSEL 1980). Aufgrund der Unkultivierbarkeit vieler Organismen konnte so nur ein kleiner Teil der im Boden vorhandenen Organismen erfasst werden, wobei es sich meist um *r*-Strategen handelt (also Organismen, die sich durch hohe Wachstumsraten bei guter Nährstoffversorgung auszeichnen). Die für den Boden repräsentativeren *k*-Strategen entziehen sich dagegen häufig der Kultivierung (TORSVIK et al., 1990a). Zudem beschränkt sich die Beschreibung einer mikrobiellen Gemeinschaft meist auf Morphologie, Ökologie und Physiologie einzelner Isolate.

Seit einiger Zeit werden zusätzlich metabolische Fingerprints ganzer mikrobieller Gemeinschaften zur funktionalen Analyse substratspezifischer Aktivitäten erstellt (Garland und Mills, 1991; Zak et al., 1994), wobei diese Methode aber nur die kultivierbaren Organismen einer Gemeinschaft erfassen kann und nicht notwendigerweise das funktionale Potential im Boden widerspiegelt (SMALLA et al., 1998).

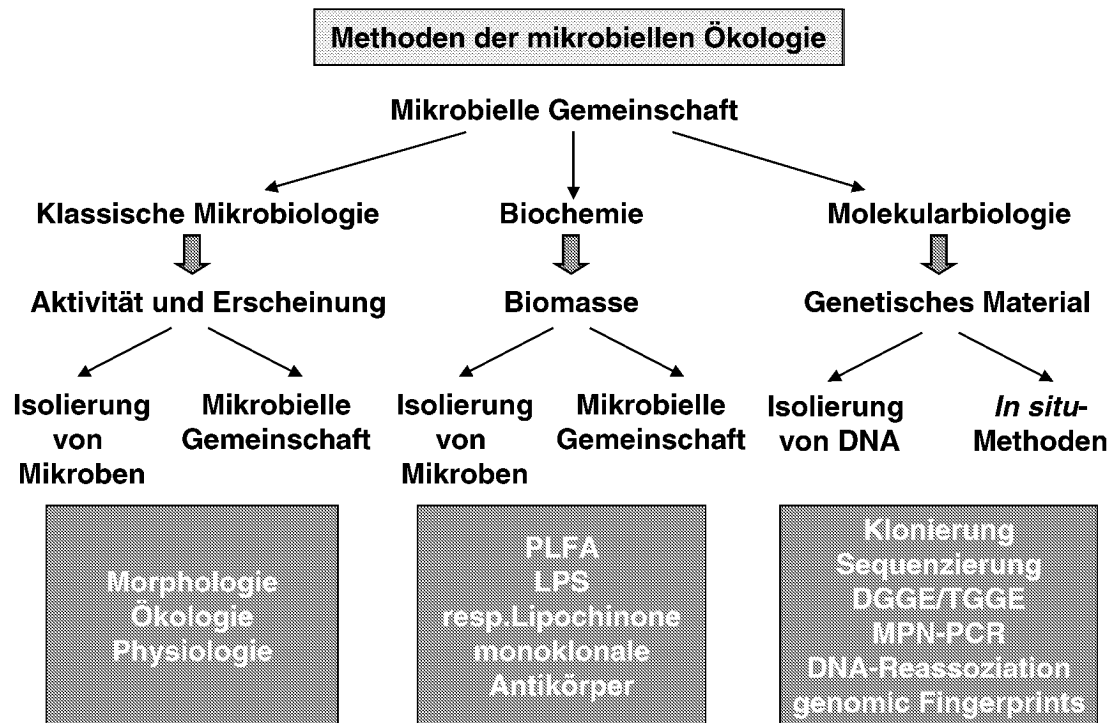


Abbildung 2-3 Übersicht über die Methoden der mikrobiellen Ökologie (Erklärungen siehe Text).

Dagegen sind die biochemischen und molekularbiologischen Methoden der Mikrobenökologie auch geeignet, die bisher nicht kultivierbaren Glieder einer Gemeinschaft zu erfassen. Die biochemischen Methoden zielen meist auf Zellwand- oder Membranbestandteile ab und beruhen auf ähnlichen Fettsäure-Syntheswegen bei taxonomisch verwandten Gruppen (Phospholipid-Fettsäuren = PLFA, Lipopolysaccharide = LPS, respiratorische Lipochinone, ZELLES, 1999; FUJIE et al., 1998; SAITOU et al., 1999). Darüber hinaus können Bakterien mit polyklonalen Antikörpern spezifisch detektiert werden (SCHLOTTER et al., 1998).

Dagegen konzentrieren sich die Methoden der Molekularbiologie auf das genetische Material der Mikroorganismen. Ein sehr wirkungsvolles Werkzeug für die Mikrobenökologie, das auf die Beschreibung der strukturellen Diversität abzielt, besteht in der Untersuchung von 16S rDNA (HUGENHOLTZ und PACE, 1996; RHEIMS et al., 1996; VAN VERSEFELD et al., 1997). Die 16S rDNA kommt in allen Bakterien und - in leicht veränderter Form (als 18S rDNA) - auch in Eukaryoten vor. Sie beinhaltet gleichzeitig stark konservierte Bereiche, die in allen Lebewesen identisch sind, und hochvariable Regionen, die spezifisch für einzelne Arten oder Stämme sind (WOESE, 1987; LUDWIG und SCHLEIFER, 1994). Sequenzanalysen dieser ribosomalen DNA bilden heute die Grundlage für die phylogenetische Klassifizierung der Prokaryoten (WOESE et al., 1990). Im Gegensatz zur 16S rDNA ist die Untersuchung

genomischer DNA bzw. RNA geeignet, eine funktionale Einordnung einzelner Organismen zu erzielen.

Neben der Sequenzierung von DNA-Abschnitten gibt es verschiedene Verfahren für die Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften im Boden. Dazu gehören beispielsweise molekulare Fingerprints, wie die Erstellung von DNA-Bandenmustern mittels DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese, MUYZER et al., 1993; FÜHR, 1996), RISA (ribosomal intergenic spacer analysis, MASSPÖ et al., 1995; HENDRYCKX et al., 1996; BORNEMANN und TRIPLET, 1997), ARDRA (amplified rDNA-restriction analysis, MASSPÖ et al., 1995; VANECHOUTTE et al., 1995; FERNANDEZ et al., 1999) und t-RFLP-Profil (terminal-restriction fragment length polymorphism, LIU et al., 1997; MOESENEDER et al., 1999). Darüber hinaus lässt sich die Heterogenität (= Diversität) aus Boden isolierter DNA durch photometrische Verfolgung der Reassoziationskurve einzelsträngiger DNA bestimmen (TORSVIK et al., 1990a). Daraus lässt sich die Anzahl verschiedener Genome abschätzen. Allerdings können verschiedene mikrobielle Gemeinschaften gleicher Diversität nicht unterschieden werden. Die Methode ist daher nur für spezielle Fragestellungen geeignet.

Radioaktiv oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Gensonden (HUGENHOLTZ und PACE, 1996) werden eingesetzt, um Organismen mit bestimmten Eigenschaften sichtbar zu machen. Nach Extraktion von DNA aus Bodenorganismen wird diese mit spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu Sequenzen funktionaler Gene sind, hybridisiert (BURAUER et al., 1991; KA et al., 1994; KA et al., 1995). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Mikroorganismen direkt in ihrer Umwelt zu beobachten (*in situ*). Dazu werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in die mikrobiellen Zellen eingeschleust. Diese hybridisieren dann mit der ribosomalen RNA. Überschüssige Gensonden werden ausgewaschen, so dass einzelne Zellen im Mikroskop sichtbar gemacht werden können (DELONG et al., 1989; WAGNER et al., 1994). Durch gleichzeitige Verwendung mehrerer Sonden mit unterschiedlicher Markierung ist eine Detektion verschiedener Mikroorganismen im selben mikroskopischen Feld möglich. Allerdings wirkt hierbei die Anzahl der zur Verfügung stehenden Markierungen limitierend auf die Anzahl der zu differenzierenden Stämme. Außerdem können nur bekannte Organismen spezifisch angefärbt werden, da zumindest ein Teil des Genoms für die Herstellung der Gensonde bekannt sein muss. Besonders interessant wird diese Methode dadurch, dass gerade die physiologisch aktiven Glieder einer mikrobiellen Gemeinschaft angefärbt werden, da die Menge an ribosomaler RNA in einer Zelle von ihrer Wachstumsrate bzw. ihrer Aktivität (DELONG et al., 1989; TESKE et al., 1996) abhängig ist.

Dagegen ist die DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) von 16S rDNA eine relativ schnelle und einfache Methode (MUYZER et al., 1993). Die DGGE beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung amplifizierter DNA-Fragmente in einem Polyacrylamidgel mit einem Konzentrationsgradienten eines denaturierenden Agens und ermöglicht die Bestimmung der Diversität der häufigsten Vertreter einer bakteriellen Gemeinschaft durch

einen Vergleich von Banden-Mustern (FELSKE et al., 1996; RÖLLEKE et al., 1996). Die DNA wird zunächst aus den Boden-Mikroorganismen extrahiert und aufgereinigt (z.B. über Agarose-Gelelektrophorese). Anschließend werden geeignete (variable) Sequenzen der 16S rDNA mittels "Polymerase Chain Reaction" (PCR, SAIKI et al., 1985; SAIKI et al., 1988) amplifiziert. Die Produkte werden elektrophoretisch aufgetrennt und können dann entweder sequenziert werden, wodurch eine phylogenetische Zuordnung der häufigsten Vertreter einer mikrobiellen Gemeinschaft möglich wird (FELSKE et al., 1998), oder sie dienen der Erstellung genetischer Fingerprints, durch die die Ähnlichkeit verschiedener Gemeinschaften oder das Auftreten bestimmter Organismen darin untersucht werden kann (Abbildung 2-4). Darüber hinaus kann die Hybridisierung geblotteter DGGE-Gele mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden weitere phylogenetische Informationen liefern (MUYZER et al., 1993).

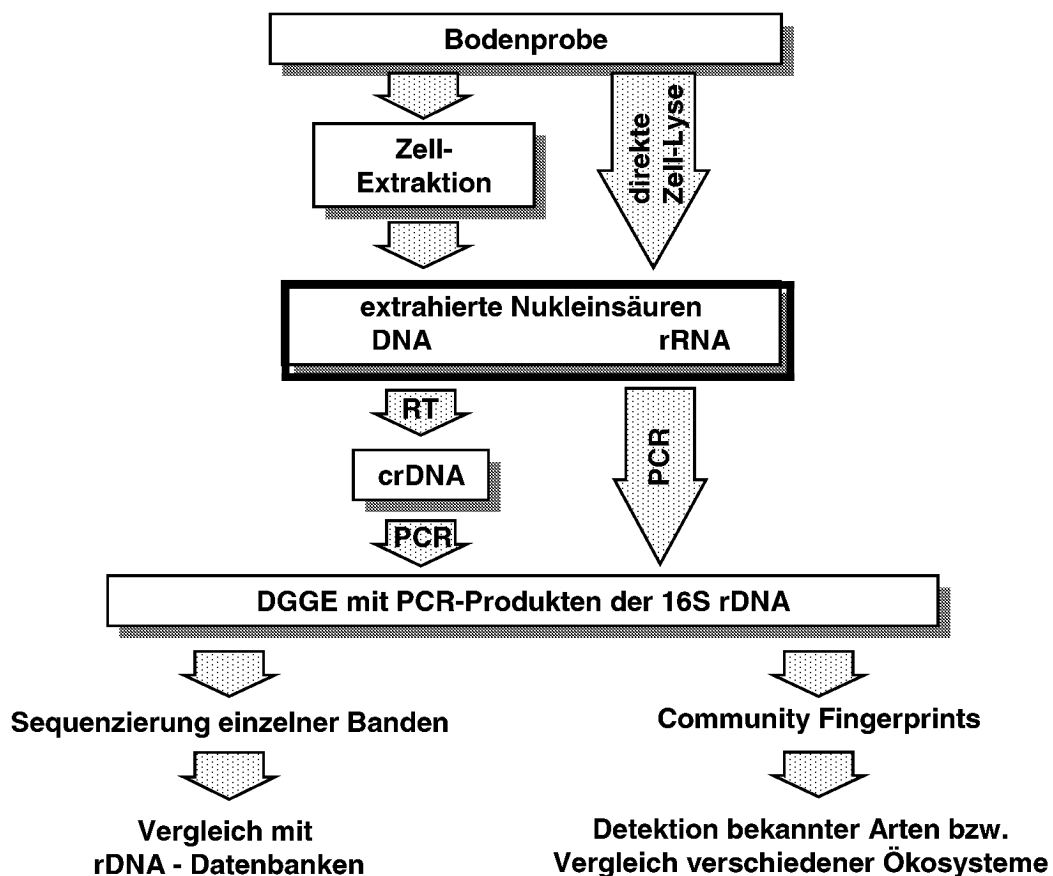


Abbildung 2-4 Molekularbiologische Charakterisierung von Bodenproben mittels DGGE.

Da durch die PCR aus allen Organismen etwa gleich lange Abschnitte vervielfältigt werden, kann eine Charakterisierung mittels DGGE nicht auf Längenunterschieden beruhen. Die gleich langen Abschnitte werden über einen denaturierenden Gradienten getrennt, welcher entweder chemischer Natur (DGGE, z.B. Harnstoff) ist oder in Form ansteigender Temperatur über die Laufzeit bzw. -strecke (TTGE bzw. TGGE, ROSENBAUM und RIESNER, 1987) wirkt.

Die Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener DNA-Sequenzen gegenüber denaturierenden Bedingungen ergeben sich aus ihrer abweichenden Primärstruktur. Einen Überblick über die verschiedenen Varianten der Auftrennung gleich langer DNA-Fragmente mittels denaturierender Gradienten wird von LERMAN und BELDJORD (1998) gegeben.

In den nicht denaturierenden Gelen erfolgt die gelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten nach der Länge der Sequenzen und damit vorrangig in Abhängigkeit von der Porengröße der stationären Matrix und der Ladung der Moleküle. Die Chromatographie von PCR-Produkten in der DGGE verläuft dagegen nur solange nach diesen Gesetzmäßigkeiten, bis sie eine Stelle im Gradienten erreichen, die eine Konformationsänderung der Proben bedingt. Durch die denaturierenden Bedingungen werden die DNA-Doppelstränge, die durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen den einzelnen Basen zusammengehalten werden, teilweise „aufgeschmolzen“. Da zwischen den Basen Adenin (A) und Thymin (T) nur zwei, zwischen den Basen Guanin (G) und Cytosin (C, Abbildung 2-5) dagegen drei Wasserstoff-Brücken-Bindungen bestehen, werden erstere Basenpaare leichter aufgebrochen. Ein DNA-Strang mit einem hohen Anteil an Thymin und Adenin wird also leichter aufgespalten als eine GC-reiche Sequenz und er wird damit bereits bei weniger starken denaturierenden Bedingungen im Gel zurückgehalten. PCR-Produkte verschiedenen Ursprungs können daher direkt - aufgrund ihrer Mobilität in der denaturierenden Matrix – voneinander unterschieden werden.

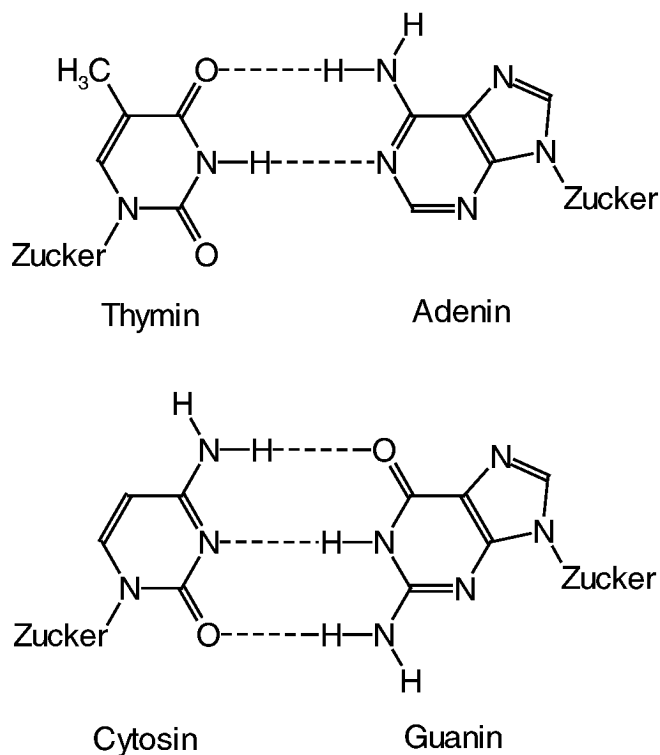


Abbildung 2-5

**Struktur der Basen der Desoxy-
ribonukleinsäure und Art ihrer
Paarung über Wasserstoff-
brücken-Bindungen (gestrichelte
Linien)**

2.4 Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Beurteilung von Pflanzenschutzmitteleffekten auf Bodenmikroorganismen

Die Extraktion mikrobieller Nukleinsäuren aus Boden und deren molekularbiologische Analytik hat es in den vergangenen 20 Jahren ermöglicht, die ökologische Bedeutung und die Diversität von Bodenmikroorganismen zu bestimmen. GELSOMINO et al. (1999) und OGRAM (2000) geben einen Überblick über die bisher durchgeführten Studien der molekularen Mikrobenökologie in Böden. Bislang standen dabei vor allem grundlagenorientierte Fragestellungen im Vordergrund, die sich beispielsweise mit der Diversität (Torsvik et al., 1990a und b) und der phylogenetischen Zuordnung der dominantesten Vertreter im Boden (FELSKE et al., 1998; NÜSSLEIN und TIEDJE, 1999), insbesondere von nitrifizierenden (STEPHEN et al., 1998) oder stickstofffixierenden Bakterien (ROSADO et al., 1998), sowie von Archaeobakterien (BINTRIM et al., 1997; BUCKLEY et al., 1998) befassten. Diese Grundlagen sind Voraussetzung für das Verständnis ökologischer Zusammenhänge in landwirtschaftlich genutzten Böden, welches wiederum von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Strategien zur Bodenbewirtschaftung in der nachhaltigen Landwirtschaft ist (BEESE et al., 1994).

Biologische Prozesse haben eine zentrale Bedeutung für die ökologischen Funktionen im Boden (s.o.). Aus diesem Grund beinhaltet heute das Zulassungsregelwerk für die Registrierung von Pflanzenschutzmitteln auch eine Bewertung der Wirksubstanzen bezüglich möglicher Nebeneffekte auf Bodenmikroorganismen und -prozesse (DOMSCH, 1992). Eine der ersten Arbeiten, die die Effekte durch Pflanzenschutzmittel auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden untersuchte, ist von ATLAS et al. (1991) beschrieben worden. Die Autoren fanden nach Applikation des Herbizidwirkstoffes 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) eine reduzierte mikrobielle Diversität im Boden, welche sie anhand der DNA-Reassoziationsnach TORSVIK et al. (1990b) bestimmten. Dieses war auch aus dem Grund besonders auffällig, da lange Zeit schädliche Nebeneffekte auf Bodenprozesse durch Pestizide meist auf den Einsatz von Fungiziden zurückgeführt wurden (WAINWRIGHT, 1978). Allerdings zeigten die parallel durchgeführten physiologischen Untersuchungen keine Schädigung, so dass der Bodenmikroflora eine hohe Anpassungsfähigkeit an Störfaktoren zugesprochen wurde.

In neueren Untersuchungen wurde vor allem die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) eingesetzt. Diese ergab nach einer Störung landwirtschaftlicher Böden durch Inkubation mit Stickstoff bzw. einem Methanol-Luft-Gemisch eine reduzierte mikrobielle Diversität (ØVREÅS et al., 1998), die teilweise begleitet war von einem physiologischen Wechsel der bakteriellen Bodengemeinschaft. ENGELEN et al. (1998) und EL FANTROUSSI et al. (1999) untersuchten Herbizidwirkungen auf die Struktur und das physiologische Potential mikrobieller Bodengemeinschaften mittels DGGE und BIOLOG-Platten. Letztere enthalten 95 verschiedene Kohlenstoffquellen und dienen dazu, Substrat-Nutzungs-Profile zu erstellen. Beide Untersuchungen wiesen einen empfindlichen Einfluss der Herbizidapplikation auf die

erwähnten Parameter nach und konnten zeigen, dass diese Methoden wertvolle Werkzeuge nicht nur in der Grundlagenforschung darstellen, sondern ihren Einsatz auch bei angewandten Fragestellungen, beispielsweise zur Bewertung von Nebenwirkungen durch Pflanzenschutzmittel auf die sogenannten „Nicht-Ziel-Organismen“, rechtfertigen.

2.5 Das Fungizid Dithianon

Dithianon (5,10-Dihydro-5,10-dioxo-naphtho[2,3-b]-1,4-dithiin-2,3-dicarbonitril, Produktname DELAN SC 750TM, Cyanamid) wird unter dem Handelsnamen Delan (Cyanamid) vertrieben und dient als nichtsystemisches Kontaktfungizid zur Bekämpfung verschiedener Pilzkrankheiten im Obst-, Wein-, Hopfen- und Feldgetreidebau (WANNER, 1999), wobei es in Aufwandmengen von 0,19 bis 1,5 kg ha⁻¹ eingesetzt wird. Es ist beispielsweise wirksam gegen Apfelschorf (*Venturia inequalis*), Mehltau (*Podosphaeria leucotricha*) und Lauchschwärze (*Alternaria porri*) und darüber hinaus auch gegen verschiedene durch Bakterien hervorgerufene Pflanzenkrankheiten (z.B. *Xanthomonas oryzae*). Seine Wirkung entfaltet es, indem es die Sporenkeimung und die Keimschlauchentwicklung bei Pilzen verhindert. DROBNICA et al. (1980) und ŠTURDIK und DROBNICA (1980) stellten außerdem eine vollständige Blockade der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase der Glykolyse fest, die die zytotoxischen Effekte dieser Substanz, die auch in der Medizin Anwendung findet, erklären.

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Verhalten von Dithianon im Boden befassen. UEOKA et al. (1997) stellten fest, dass es im Boden bereits in den ersten zwei Zentimetern immobilisiert und darüber hinaus rasch abgebaut wird. WANNER et al (2000) untersuchten den Verbleib von ¹⁴C-markiertem Dithianon nach Stimulierung der mikrobiellen Aktivität durch Strohzugabe und fanden eine Mineralisierung von 33 % und die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in Höhe von 63 % der eingesetzten Radioaktivität nach 64 Tagen.

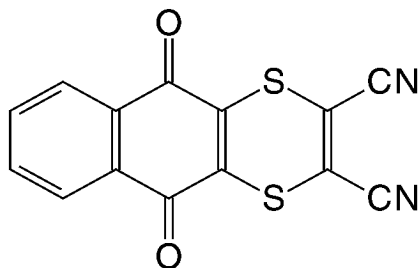


Abbildung 2-6 Strukturformel von Dithianon

3 BESCHREIBUNG DER MIKROKOSMOS-EXPERIMENTE

3.1 Kultivierung und Charakterisierung prozessrelevanter Mikroorganismen

3.1.1 Kultivierung und Isolierung

Der Humifizierungsprozess von Maisstroh im Boden wurde in verschiedenen Mikrokosmos-Experimenten (vgl. Kapitel 3.3 – 3.7) über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten beobachtet, sowie mikrobiologisch und chemisch charakterisiert. Um die Bedeutung bisher nicht kultivierter Arten aufzuklären, wurden – im Vergleich zum Umsatz durch die native mikrobielle Gemeinschaft im Boden – verschiedene definierte Mischkulturen mit kultivierbaren Spezies eingesetzt. Dazu wurden zunächst am Umsatz von Maisstroh im Boden beteiligte Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) in einer Maisstrohrotte kultiviert. Maisstroh wurde mit geglühter Parabraunerde vermischt und nach Inokulation mit einer geringen Menge Frischboden für 6 Monate inkubiert. Da sich mit der Veränderung des organischen Materials bei der Umsetzung auch die an den Prozessen beteiligte mikrobielle Gemeinschaft verändert (BRODER und WAGNER, 1988; INSAM et al., 1996), wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation Organismen isoliert und auf Festmedien kultiviert. Zusätzlich wurden Mikroorganismen in Flüssigkulturen mit Maisstroh als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angereichert.

Die Anreicherung von Mikroorganismen erfolgte gemäß Abbildung 3-1. Eine Maisstrohrotte aus 150 g geglühtem Boden mit 9 g Maisstroh wurde mit 2 g Frischboden (Typische Parabraunerde vom Standort Merzenhausen aus landwirtschaftlicher Nutzung) in einem Erlenmeyerkolben angesetzt. Zur Einstellung der Bodenfeuchte auf 40 % WK_{max} wurden dem Boden 26,25 mL SSE (= soil solution equivalent)-Medium nach ANGLE et al. (1991) zugegeben. Die Zusammensetzung des SSE-Mediums orientiert sich an der Mineralstoff-Zusammensetzung in der Bodenlösung. Es enthält 2,5 mM NO₃⁻, 2,5 mM NH₄⁺, 5 µM HPO₄²⁻, 2,5 mM Na⁺, 4,0 mM Ca²⁺, 2,0 mM Mg²⁺, 0,503 mM K⁺, 4,0 mM Cl⁻, 5,0 mM SO₄²⁻ und 20 µM Fe²⁺ in Form eines EDDHA- (= Ethylendiamin-di(*o*-hydroxyphenylsäure)) Komplexes. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von KOH auf 6,0 eingestellt. Als Puffersubstanz wurde MES (2-(*N*-morpholino)ethansulfonsäure) eingesetzt. Bei der Herstellung des Mediums wurde der Eisen-EDDHA-Komplex aufgrund seiner Hitzeempfindlichkeit erst nach Abkühlen der autoklavierten Lösung zugegeben. Der relativ geringe Gehalt an Stickstoff im SSE-Medium kann möglicherweise zu einer Beschleunigung der Humifizierung führen. So stellten DELL'AGNOLO und FERRARI (1979) eine Hemmung der am Umsatz von Sägemehl beteiligten Exoenzyme durch hohe anorganische Stickstoffgehalte fest.

Nach 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13 und 26 Wochen wurden aus der Maisstrohrotte Proben genommen und ein eventueller Feuchteverlust ausgeglichen. Von jeder Probe wurden durch Anzucht und Vereinzeln auf festen Kulturmedien Isolate in Reinkultur gewonnen. Für die Anzucht der Mikroorganismen wurden pro Probenahmetermin aus jeweils drei separaten Kolben Bodenproben mit einem Frischgewicht von 10 g entnommen und in einem sterilen Mörser homogenisiert. 1 g homogenisierter Boden wurde jeweils mit 9 mL Extraktionslösung versetzt (Tabelle 3-1) und 5 min in einer Schwingmühle (MM 2, Retsch) extrahiert. Vom Überstand wurden 0,5 mL zur Erstellung einer Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) entnommen. Von geeigneten Verdünnungen der Bodensuspensionen wurden jeweils 100 µL auf drei verschiedenen Nährböden ausplattiert (Verdünnungen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} für Wachstum auf Malzextrakt-Agar und Verdünnungen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} für Wachstum auf R2A und Bodenextrakt-Agar, vgl. Tabelle 3-1). R2A (nach REASONER und GELDREICH, 1985) wurde gewählt, da es ein häufig für die Anzucht mikrobieller Organismen aus Bodenproben eingesetztes Nährmedium ist (ALEF, 1994). Durch den Einsatz von 10 % (v/v) eines wässrigen Bodenextraktes (s.u.) im Bodenextrakt-Agar wurde versucht, die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Boden zu simulieren und somit bessere Kultivierungsbedingungen für Bodenbakterien zu schaffen. Aus diesem Grund wurde auch nur vergleichsweise wenig Glucose eingesetzt. Bei Malzextrakt-Agar handelt es sich um ein Selektivmedium, das durch seinen relativ niedrigen pH-Wert das Wachstum der meisten Bakterien unterdrückt.

Zur Herstellung des Bodenextraktes wurde Boden mit Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7) im Verhältnis 1:1 durch 60 min Schütteln bei 150 U min^{-1} extrahiert und anschließend mehrfach filtriert (nach FÜHR, 1996). Der gefilterte Extrakt wurde portioniert, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 15 min bei 121°C und einem Druck von $1,013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ autoklaviert. Die Agarplatten wurden nach der Inokulation bis zur Ausbildung deutlicher Kolonien bei 20°C inkubiert.

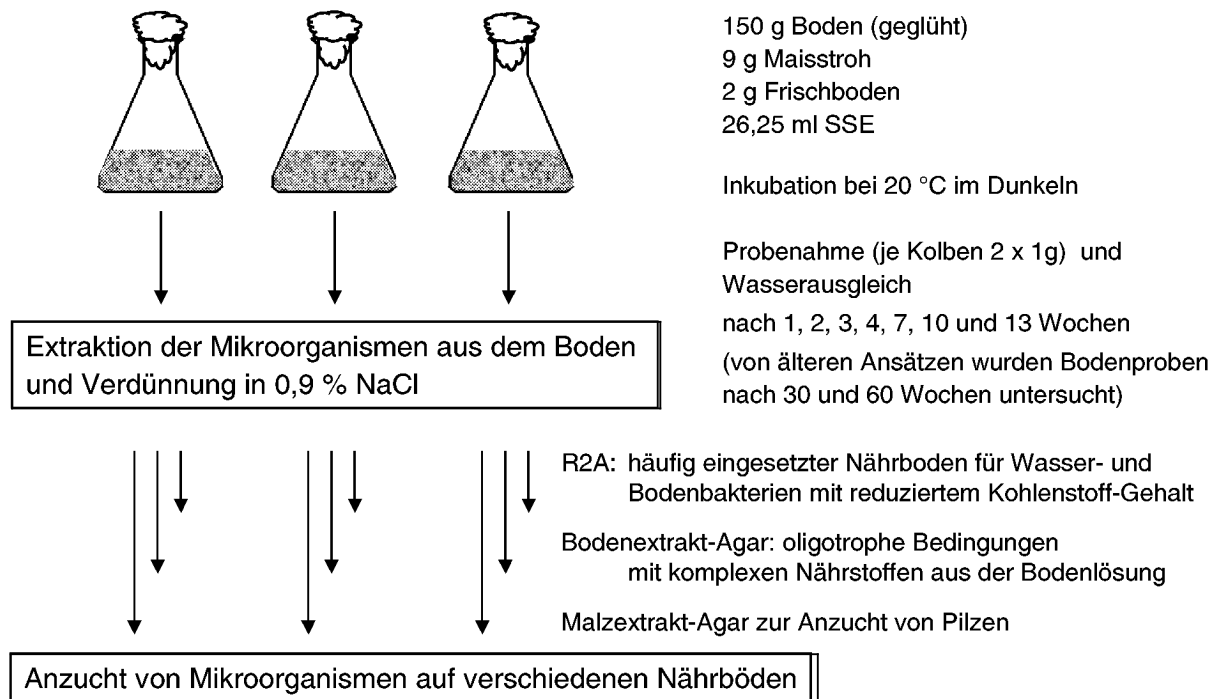
Tabelle 3-1 Lösungen und Kulturmedien zur Isolierung und Anreicherung von Bakterien und Pilzen aus Boden.

Medium	Zusammensetzung			Agar [%]	pH-Wert
Extraktionslösung	NaCl	0,1	g L ⁻¹	—	7,0
	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,02	g L ⁻¹		
	Mg ₂ SO ₄ ·7 H ₂ O	0,2	g L ⁻¹		
	Tween 80	5,0	g L ⁻¹		
SSE	NH ₄ NO ₃	0,20	g L ⁻¹	—	6,0
	MgCl ₂	0,19	g L ⁻¹		
	CaSO ₄ ·2 H ₂ O	0,69	g L ⁻¹		
	KH ₂ PO ₄	0,68	mg L ⁻¹		
	KOH	28	mg L ⁻¹		
	FeEDDHA	8,3	mg L ⁻¹		
	MES	1,95	g L ⁻¹		
R2A	Hefeextrakt	0,5	g L ⁻¹	1,5	7,2
	Proteosepepton	0,5	g L ⁻¹		
	Casaminosäuren	0,5	g L ⁻¹		
	Glucose	0,5	g L ⁻¹		
	lösliche Stärke	0,5	g L ⁻¹		
	Na-Pyruvat	0,3	g L ⁻¹		
	K ₂ HPO ₄	0,3	g L ⁻¹		
	Mg SO ₄	0,05	g L ⁻¹		
Bodenextrakt-Agar	Bodenextrakt	100	mL L ⁻¹	2	6,8
	Glucose	1,0	g L ⁻¹		
	NaCl	5,0	g L ⁻¹		
	K ₂ HPO ₄	2,5	g L ⁻¹		
Malzextrakt-Agar	Malzextrakt	30,0	g L ⁻¹	1,5	5,6
	Proteose-Pepton	3,0	g L ⁻¹		
Kartoffel-Glucose-Agar	Kartoffelextrakt	4,0	g L ⁻¹	1,5	5,6
	Glucose	20,0	g L ⁻¹		
Nährbouillon	Pepton	5,0	g L ⁻¹	—	7,0
	Fleischextrakt	3,0	g L ⁻¹		

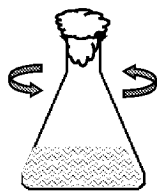
Übersicht über die Proben, aus denen Isolate gewonnen wurden:

- frisch angesetzte Maisstrohhrotte mit Isolierungen nach 1, 2, 3, 4, 7, 10 und 13 Wochen
- Flüssigkulturen mit Maisstroh als einzige Kohlenstoffquelle
- 6 Monate alte Maisstrohhrotte
- 14 Monate alte Maisstrohhrotte (mit gereiften Umsatzprodukten)

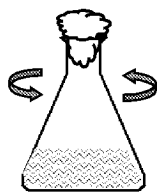
A. Mikrokosmen



B. Flüssigkulturen



30 oder 50 ml SSE (soil solution equivalent) Medium
1 g Maisstroh
0,5 g Frischboden



30 oder 50 ml BE (Bodenextrakt) Medium
1 g Maisstroh
0,5 g Frischboden

Abbildung 3-1 Anreicherung von Mikroorganismen in Mikrokosmen (A) und Flüssigkulturen (B).

3.1.2 Charakterisierung prozessrelevanter Mikroorganismen

Die Isolate wurden später teilweise anhand cytologischer, morphologischer und stoffwechselphysiologischer Merkmale, unter anderem mit Hilfe standardisierter Methoden oder BIOLOG (TUOMI et al., 1997), charakterisiert.

3.1.2.1 Charakterisierung des Zellwandaufbaus

Bakterien können aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellwandzusammensetzung in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Gram-positive und Gram-negative. Diese Einteilung beruht auf einem von GRAM (1884) eingeführten Färbeverfahren und beschreibt ein wichtiges taxonomisches Merkmal, mit dem auch andere Eigenschaften von Bakterien korreliert sind (s.u.). Hitzefixierte Zellen werden zunächst mit Kristallviolett angefärbt. Nach Behandlung mit einer Jod-Lösung lassen sich die Gram-negativen Zellen mit Alkohol entfärben. Gram-positive halten aufgrund ihres mehrschichtigen Mureinsacculus den Farbstoff-Jod-Komplex zurück und erscheinen im Lichtmikroskop dunkelviolett. Bei der Interpretation der gefärbten Präparate ist allerdings zu beachten, dass das Gram-Färbeverhalten einer Bakterienkolonie von ihrem Wachstumszustand abhängen kann. Aus diesem Grund wurde jeweils ein Gram-positives (*Corynebacterium glutamicum*) und ein Gram-negatives Bakterium (*Escherichia coli*) mitgeführt. Darüber hinaus wurden weitere Verfahren zur Charakterisierung der Zellwände durchgeführt.

Gram-Färbung

Die Bakterienstämme wurden über Nacht oder – falls notwendig auch länger – auf R2A-Platten angezogen. Von den Platten wurden einzelne Kolonien auf einem Objektträger in einem Tropfen steriler Kochsalz-Lösung (0,9 %) ausgestrichen. Die Ausstriche wurden an der Luft getrocknet und in der leuchtenden Flamme des Gasbrenners hitzefixiert. Die Färbung erfolgte durch Eintauchen in die verschiedenen Lösungen gemäß Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2 Protokoll zur Gram-Färbung.

Reagenz	Anmerkung
1. Kristallviolett-Lösung	Ca. 60 sec
2. H ₂ O dest.	Gut spülen
3. Lugol'sche Lösung	Min. 60 sec
4. Entfärb-Lösung (Isopropanol/Aceton 3:1)	Spülen bis keine Farbwolken mehr von dem Objektträger abgewaschen werden
5. H ₂ O dest.	Gut spülen
6. Safranin-O-Lösung	25-30 sec
7. H ₂ O dest.	Gut spülen
8. Lufttrocknen	

KOH-Test

Mit diesem Schnelltest auf die Empfindlichkeit gegen alkalische Lösungsmittel lässt sich die Dicke des Mureinsacculus charakterisieren (RYU, 1938). Dazu wurden gut gewachsene Kolonien mit einer Impföse von den Agarnährböden genommen und mit einem Tropfen KOH (1 M) auf einem Objektträger vermischt. Nach 5 – 10 Sekunden wurde die Impföse vorsichtig aus der Suspension gehoben. Durch die Lyse der Zellwand bei Gram-negativen Bakterien wird DNA freigesetzt – die Zellwand Gram-positiver Mikroorganismen widersteht der Alkalibehandlung. Das Bakteriengenom der lysierten Gram-negativen Bakterien lässt sich als viskoser Faden erkennen.

Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Zellwandaufbaus ist der Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase. Die L-Alanin-Aminopeptidase ist ein in der Bakterien-Zellhülle lokalisiertes Enzym, das fast ausschließlich bei Gram-negativen Bakterien gefunden wird. Der Nachweis beruht auf der Spaltung eines farblosen Substrates in ein farbiges (gelb):



Der Nachweis erfolgte mit Bactident[®] Teststäbchen nach Angaben des Herstellers (Merck).

3.1.3 Identifizierung isolierter Bakterien mit dem BIOLOG-System

Prinzip

Die BIOLOG-Mikrotiter-Platten werden eingesetzt, um isolierte Bakterienstämme anhand ihrer Fähigkeit zur Oxidation von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen zu charakterisieren. Durch die Veratmung der einzelnen Kohlenstoffquellen wird ein Tetrazolium-Farbstoff irreversibel reduziert (BOCHNER, 1989). Dies wird durch eine positive Farbreaktion in der entsprechenden Vertiefung angezeigt. Die sich daraus ergebenden „Veratmungs-Muster“ werden mit Hilfe einer Datenbank ausgewertet. Zumindest Gram-negative Bakterien und Gram-positive Bakterien des *Bacillus-Clostridium-Streptococcus*-Zweiges können sehr gut identifiziert werden. Dagegen wird nur ein Teil der Gram-positiven Bakterien des *Actinomyces*-Zweiges korrekt bestimmt (WÜNSCHE und BABEL, 1996). Bei letzteren handelt es sich um eine phylogenetisch geschlossene Gruppe von Bakterien mit hohen GCgehalten in ihrer chromosomalen DNA, die – im Gegensatz zu den Vertretern des *Bacillus-Clostridium-Streptococcus*-Zweiges – in der Lage sind, ein Pseudomycel zu bilden.

Durchführung

Zur Verhinderung möglicher Speicherstoff-Bildung in den Bakterien wurden die BIOLOG-Platten mit jungen, schnellwachsenden Kulturen beimpft. Die Kolonien wurden zunächst zweimal auf R2A-Agar bei 30°C kultiviert (1. 72 h, 2. 24 h), wobei der erste Kultivierungsschritt gleichzeitig der Reinheitskontrolle diene. Danach wurden die Kolonien zweimal für jeweils 24 h bei 20°C in Flüssigmedien auf einem Rundschüttler (150 U min⁻¹) inkubiert. Die als Gram-positiv erkannten Organismen wurden in Bacillus-Medium (6,0 g L⁻¹ Pepton, 3,0 g L⁻¹ Hefeextrakt, 3,0 g L⁻¹ Casein, 1,5 g L⁻¹ Malzextrakt) und die Gram-negativen in Nährbouillon (Merck) übertragen. Für die Inokulation der BIOLOG-Platten wurde – wenn möglich – Zellmaterial aus der zweiten Flüssigkultur genommen. Lediglich in den Fällen, in denen hier kein ausreichendes Zellwachstum zu beobachten gewesen ist, wurde Material des vorigen Tages genommen.

Die gut gewachsenen Kulturen wurden 3 x mit jeweils 10 mL steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen (10 min Zentrifugation bei 100 U min⁻¹). Nach dem Waschen wurde die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 436 nm bestimmt (UV/Vis Spectrometer Lambda 2, Perkin-Elmer). Letztere wurden anschließend auf eine optische Dichte von 0,5 verdünnt. Dann wurde jede der 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit 150 µL der verdünnten Zellsuspension beimpft. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 28°C im Dunkeln. Die Platten wurden nach dieser Zeit an einem Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 630 nm ausgelesen. Die Farbreaktion in den einzelnen Vertiefungen wurde in drei Kategorien eingeteilt, wobei eine positive Reaktion (Kategorie „1“) bei 60–100 % relativer Absorption eingeordnet wurde, eine negative („0“) bei 0–40 % relativer Absorption und eine nicht

eindeutige Zuordnung („?“) bei 40-60 % relativer Absorption. Die sich daraus ergebenden Zeichencodes wurden im Institut für Bodenökologie (GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg) mit der BIOLOG-Software und einer erweiterten Datenbank ausgewertet.

3.1.4 Identifizierung isolierter Pilze

Die phylogenetische Einordnung isolierter Pilze erfolgte anhand von Teilsequenzen ihrer 18S rDNA. Dazu wurden die Pilzkulturen in Schüttelkultur mit Malzextrakt-Bouillon (Tabelle 3-1, ohne Zugabe von Agar) angezogen, bis ein gutes Pilzwachstum erkennbar war. Die Kulturlösung wurde zentrifugiert und die Biomasse im Pellet mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Die nachfolgende Extraktion von DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) durchgeführt.

Teilsequenzen der 18S rDNA im gereinigten Extrakt wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Schlöter (GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Neuherberg) mit den Primern NS 1 und NS 2 (WHITE et al., 1990, vgl. Abschnitt 4.2.3) amplifiziert und durch die Firma Toplab sequenziert. Die so gewonnenen Gensequenzen wurden durch Dr. Schlöter mit Hilfe der Datenbank BLASTN 2.0.14 (ALTSCHUL et al., 1997) ausgewertet und die Verwandtschaft der Ascomyceten-Sequenzen in einem phylogenetischen Baum dargestellt.

3.2 Aufbau der Mikrokosmen

3.2.1 Boden

Die Mikrokosmos-Experimente wurden mit einer Typischen Parabraunerde aus Schwemmlöß in nativem Zustand oder nach Glühen (48 h bei 600°C) durchgeführt. Parabraunerden gehören zu den häufigsten Böden der gemäßigt humiden Klimagebiete Eurasiens und Amerikas, und unterliegen – als fruchtbare Ackerböden – intensiver landwirtschaftlicher Nutzung (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Der eingesetzte Boden entstammt dem A_p-Horizont des genannten Bodentypus vom landwirtschaftlich genutzten Versuchsstandort „Im Brühl“, Gemarkung Jülich/Merzenhausen in Merzenhausen (Nordrhein-Westfalen). Die Charakterisierung sowohl des nativen als auch des geglühten Bodens ohne Maisstrohzugabe wurde im Institut für Bodenkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Tabelle 3-3 Chemisch-physikalische Charakterisierung des Versuchsbodens (Angaben sind Mittelwerte aus 2 Parallel-Messungen).

		Native Parabraunerde		Geglühte Parabraunerde	
pH-Wert (CaCl ₂)		7,00		7,28	
C_{gesamt}		0,92 %		n.n.	
N_{gesamt}		0,081 %		n.n.	
Sand	grob		0,5 %		0,75 %
	mittel	3,3 %	1,0 %	11,25 %	5,25 %
	fein		1,8 %		5,25 %
Schluff	grob		56,5 %		61,35 %
	mittel	80,6 %	19,9 %	84,95 %	19,6 %
	fein		4,2 %		4,0 %
Ton		16,1 %		3,8 %	

3.2.2 Maisstroh

Zur Erstellung von Massenbilanzen wurde in den Mikrokosmos-Experimenten radioaktiv markiertes Maisstroh eingesetzt, welches in einer Pflanzenkammer mit ¹⁴CO₂-Atmosphäre (Phytotron der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) angezogen wurde. Eine genaue Beschreibung der Anzucht von markiertem Pflanzenmaterial ist bei WAIS (1997) beschrieben. Die spezifische Radioaktivität des ¹⁴C-markierten Maisstrohs betrug ~420 kBq g⁻¹ Trockenmasse. Neben ¹⁴C-markiertem Maisstroh wurde immer auch unmarkiertes verwendet, welches in der Vegetationsperiode 1996 aus der Lysimeteranlage des Instituts für Chemie und Dynamik der Geosphäre 5 (Radioagronomie) entnommen wurde.

3.2.3 Abbauegefäße

Für die Humifizierung des Maisstrohs wurden unmarkiertes Strohmaterial und jeweils eine geringe Menge uniform ^{14}C -markiertes Maisstroh eingesetzt. Als Matrices dienten sowohl eine luftgetrocknete als auch eine geglühte Parabraunerde, welche auf 0,5 mm gesiebt wurden. In den Ansätzen mit sterilisiertem Boden wurden 107 g feuchter Boden (entsprechend 100 g Trockenboden) in die Abbauegefäße eingewogen. Diese wurden mit Aluminiumfolie verschlossen. Der feuchte Boden wurde durch dreimaliges Autoklavieren (60 min, 121°C) tyndallisiert. Zwischen den Autoklavierungsschritten wurden die Gefäße bei 20°C feucht inkubiert.

In einem Abbauegefäß nach ANDERSON (1975) (250 mL Erlenmeyerkolben, schematische Darstellung in Abbildung 3-2) wurde gemahlenes Maisstroh (< 2 mm) zu der Bodenmatrix gegeben und im Kolben vermischt. Die Inkubation wurde bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ und 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WK_{max}) – entsprechend einer absoluten Feuchte von 18,9 % – im Dunkeln durchgeführt. Zusätzlich zu der benötigten Wassermenge wurden weitere 2 mL Wasser g^{-1} Maisstroh zur Kompensation der Wasseraufnahme durch Quellung des Strohs zugegeben. Das Inokulum wurde zusammen mit der Nährstofflösung auf den Boden aufgetropft.

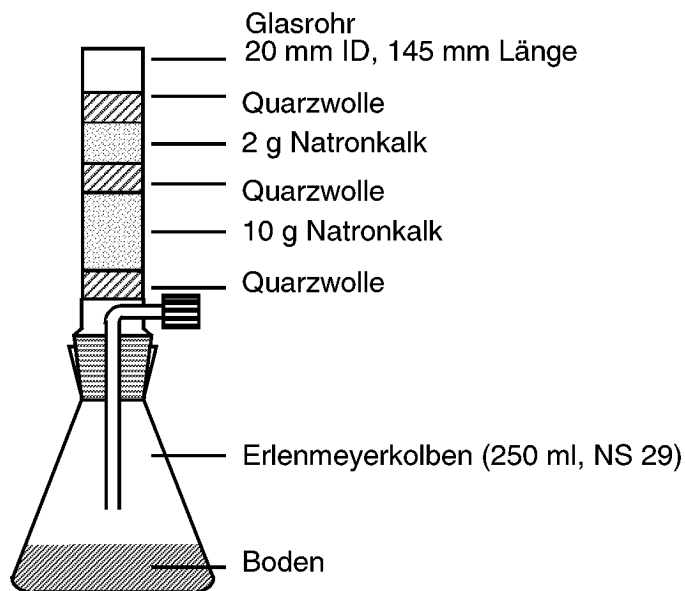


Abbildung 3-2 Schematischer Aufbau eines Abbauegefäßes (ANDERSON, 1975).

3.3 Vorversuch mit definierten und mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften

In diesem Vorversuch wurde der Abbau von ^{14}C -markiertem Maisstroh durch definierte und durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften in vereinfachten Boden-Mikrokosmen untersucht. Gleichzeitig wurde durch dieses Experiment die Eignung von definierten mikrobiellen Gemeinschaften für den Einsatz in den beschriebenen Boden-Mikrokosmen geprüft. Die molekularbiologischen Methoden wurden ebenfalls auf ihre Eignung für die Fragestellung getestet.

40 g geglähter Boden wurde mit 3 g Maisstroh vermischt. Letzteres wurde (abgesehen von einer nicht-radioaktiven Variante) ^{14}C -markiert zugegeben (120 kBq/Kolben). Die Feuchte wurde mit 8 ml SSE-Medium (vgl. Tabelle 3-1) auf 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Inkubation dauerte 6 Wochen bei 20°C.

Die Inokulation der Mikrokosmen erfolgte bei den Varianten V 1 und V 2 durch definierte mikrobielle Gemeinschaften, welche aus den in Kapitel 3.1 beschriebenen Anreicherungskulturen stammten. Die mikrobiellen Gemeinschaften wurden aus den Bodenisolaten (vgl. Kapitel 3.1) gebildet und setzten sich zusammen aus jeweils einem auf R2A isolierten Bakterienstamm der verschiedenen Probenahmeterminen (1., 2., 3., 4., 7., 10. Woche und 12 Monate), sowie jeweils 2 Stämmen, die auf BEA isoliert wurden, und 3 Pilzstämmen. Eine Übersicht über die in den Varianten V 1 und V 2 eingesetzten Mikroorganismen gibt Anhang B. Die Mikrokosmen der Varianten V 3 und V 4 wurden durch Anreicherungs-lösungen inokuliert. Dazu wurde SSE-Medium bzw. Bodenextrakt-Medium mit einer geringen Menge Frischboden und Maisstroh inokuliert und – wie in Abbildung 3.1 B beschrieben – inkubiert. In der Kulturlösung sollten sich Organismen anreichern, deren Wachstum auf dem Abbau des eingesetzten Maisstrohs basiert. V 5 und V 7 wurden durch eine Bodensuspension inokuliert, wobei V 7 allerdings kein ^{14}C -markiertes Maisstroh erhielt. V6 wurde nur durch nicht sterilisiertes Maisstroh angeimpft.

Übersicht über die Varianten des Vorversuches

- Variante V 1: definierte Mikroorganismen-Zusammensetzung 1
(7 Isolate von R2A, 2 von BEA, 3 von ME)
- Variante V 2: definierte Mikroorganismen-Zusammensetzung 2
(7 Isolate von R2A, 2 von BEA, 3 von ME)
- Variante V 3: Anreicherung von Mikroorganismen in Flüssigkultur mit Maisstroh
("Soil solution equivalent"-Medium)
- Variante V 4: Anreicherung von Mikroorganismen in Flüssigkultur mit Maisstroh
("Bodenextrakt"-Medium)
- Variante V 5: Bodensuspension
- Variante V 6: Inokulation nur durch nicht sterilisiertes Maisstroh
- Variante V 7: Bodensuspension, nur inaktives (= nicht radioaktiv markiertes) Maisstroh

Im Vorversuch durchgeführte Analytik

- Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh (vgl. Abschnitt 4.1.1)
- Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels DGGE (vgl. Kapitel 4.2)

3.4 Einfluss der Nährstoffversorgung komplexer mikrobieller Gemeinschaften auf die Mineralisierung von Maisstroh

In diesem Experiment wurde kontrolliert, ob die im geglühten Boden vorhandenen Mineralstoffe für eine effektive Mineralisierung des Maisstrohs ausreichend sind. Dabei wurde speziell die Rolle des verfügbaren anorganischen Stickstoffs im geglühten Boden, zusammen mit dem organischen Stickstoff des Maisstrohs untersucht. Der Einfluss zusätzlicher Mineralstoffgaben auf die Mineralisierung des Maisstrohs, die mikrobielle Aktivität und die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaften nach Inokulation mit einer Bodensuspension wurden beobachtet. Verschiedene Ansätze erhielten zur Einstellung der Bodenfeuchte entweder entmineralisiertes Wasser, eine künstliche oder eine natürlichen Bodenlösung (vgl. Abschnitt 3.1.1). Zusätzlich erfolgte bei einigen Varianten ein Stickstoffausgleich in Form eines handelsüblichen Kalk-Stickstoff-Düngers. Eine Übersicht über die Varianten gibt Tabelle 3-4.

Versuchsansatz:

- 40 g geglühter Boden (600 °C, 48 h), steril
- 2 g Maisstroh (1,8 g nicht markiert + 0,2 g uniform ^{14}C -markiert = 84,0 kBq applizierte Radioaktivität), steril
- Zugabe von 1 ml 3 %iger Kalkammonsalpeter (KAS)-Lösung (Varianten B, E und F, vgl. Tabelle 3-4) mit einem Stickstoffgehalt von 27 %
(~30 mg KAS/Ansatz = 8 mg Stickstoff/Ansatz = 20 mg/100 g Boden N-Düngung)
- Inokulation mit Bodensuspension (komplexe mikrobielle Gemeinschaft)
- 3 Parallelen pro Ansatz
- Inkubation: 28 Wochen bei 20 °C im Dunklen

Tabelle 3-4 Übersicht über die Varianten im Experiment mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung der Mikrokosmen.

<i>Variante</i>	<i>Boden</i>	<i>Inokulum</i>	<i>Feuchteausgleich</i>	<i>N-Ausgleich</i>
A	nativ	Bodensuspension	H ₂ O	
B	geglüht	Bodensuspension	H ₂ O	
C	geglüht	Bodensuspension	Bodenlösung	
D	geglüht	Bodensuspension	SSE	~ 2 mg N/100 g Boden (+ S, Ca, Mg, K, Fe and P)
E	geglüht	Bodensuspension	H ₂ O	20 mg N/100 g Boden
F	geglüht	Bodensuspension	Bodenlösung	20 mg N/100 g Boden
G	geglüht	Maisstroh	Bodenlösung	20 mg N/100 g Boden

Durchgeführte Analytik zur Beschreibung des Nährstoff-Einflusses

- Abbau von uniform ¹⁴C-markiertem Maisstroh (vgl. Abschnitt 4.1.1)
- Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) (vgl. Abschnitt 4.1.2)
- Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels DGGE (vgl. Kapitel 4.2)
- C/N-Verhältnisse im Boden (vgl. Abschnitt 4.3.3)

3.5 Umsatz von Maisstroh durch definierte mikrobielle Gemeinschaften

Bei diesem Experiment stand die Fragestellung im Vordergrund, ob eine mikrobielle Gemeinschaft mit einer geringen Diversität unter definierten Bedingungen Maisstroh in einer Rotte in gleichem Maße abbauen kann, wie eine natürliche, komplexe Gemeinschaft. Dabei wurde nicht nur die Mineralisierung des Maisstrohs, sondern gleichzeitig der Aufbau von Huminsäuren betrachtet. Aufgrund dieses Versuchsansatzes sollte auch die Bedeutung einer großen mikrobiellen Diversität für den Umsatz von Maisstroh gezeigt werden. Dazu wurden 10 verschiedene mikrobielle Gemeinschaften, bestehend aus jeweils 10 Bakterien- und 3 Pilz-Isolaten, 6 Wochen lang in einer Maisstrohrotte mit ^{14}C -markiertem Maisstroh und geglühtem Boden inkubiert. Die Vorgänge in diesen Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften wurden verglichen mit denen in Mikrokosmen mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft und hoher mikrobieller Diversität.

Versuchsansatz

- 40 g geglühter Boden (600 °C, 48 h), steril
- 2 g Maisstroh (Mischung von 99:1 nicht markiertes + uniform ^{14}C -markiertes Maisstroh = 5,6 kBq applizierte Radioaktivität), steril
- Zugabe von 1 ml 3 %iger Kalkammonsalpeter (KAS)-Lösung mit einem Stickstoffgehalt von 27 %
(~30 mg KAS/Ansatz = 8 mg Stickstoff/Ansatz = 20 mg/100 g Boden N-Düngung)
- 2 Parallelen pro Ansatz
- Inkubation: 6 Wochen bei 20 °C im Dunklen,

Varianten des Experimentes mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften

- Variante k: Komplexe mikrobielle Gemeinschaft (Inokulation durch eine Bodensuspension)
- Varianten 1 – 10: 10 verschiedene Varianten mit jeweils 10 Bakterien- und 3 Pilz-Isolaten (eine genaue Aufstellung der eingesetzten Bakterien und Pilzisolat erfolgt mit internen Bezeichnungen im Anhang C)

Im Experiment mit definierten Gemeinschaften durchgeführte Analytik

- Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh (vgl. Abschnitt 4.1.1)
- Ergosterolgehalte im Boden (vgl. Abschnitt 4.1.4)
- Molekularbiologische Aufarbeitung der definierten Bakterien-Gemeinschaften (vgl. Kapitel 4.2)
- Analyse von Huminsäuren mittels ^{13}C -flüssig-NMR-Spektroskopie (vgl. Abschnitt 4.4.2)

3.6 Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften

In diesem Langzeitexperiment wurde die Humifizierung von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften über einen Zeitraum von 26 Wochen beobachtet. Dabei stand der Aufbau von Huminstoffen aus Ernterückständen im künstlichen System im Vordergrund.

Jeweils 100 g Boden wurden mit 2 g Maisstroh vermischt (davon 0,2 g ^{14}C -markiert, ca. 8,4 kBq) und autoklaviert. Diese Menge entspricht einer Einarbeitung von 11 t Ernterückständen pro Hektar und Jahr und liegt in der Größenordnung praxisüblicher Strohdüngung im Getreideanbau (PRINTZ, 1995). Anschließend wurden die Ansätze mit einer Bodensuspension beimpft und mit entsalztem Wasser befeuchtet (40 % WK_{max}). Zusätzlich erhielten alle Kolben einen Stickstoff-Ausgleich in Form von Kalkammonsalpeter. Die Inokulation der tyndallisierten Ansätze erfolgte mit einer Bodenlösung. Dazu wurde 1 g Boden mit 9 mL Extraktionslösung versetzt (Tabelle 3-1) und 5 min in einer Schwingmühle (MM 2, Retsch) extrahiert. Mikrokosmen mit jeweils 100 g Boden wurden mit 1 mL dieser Suspension inokuliert.

Varianten

Variante H A: geglühter Boden + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension)

Variante H B: Frischboden, steril + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension)

Variante H C: Frischboden + Maisstroh (Inokulation durch eine Bodensuspension)

Im Experiment mit komplexen Gemeinschaften durchgeführte Analytik

- Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh (vgl. Abschnitt 4.1.1)
- Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) (vgl. Abschnitt 4.1.2)
- Keimzahlen (Koloniebildende Einheiten) (vgl. Abschnitt 4.1.3)
- Ergosterolgehalte im Boden (vgl. Abschnitt 4.1.4)
- Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE (vgl. Kapitel 4.2)
- C/N-Verhältnisse im Boden (vgl. Abschnitt 4.3.3)
- ^{13}C -Flüssig-NMR-Analysen der Huminsäuren (vgl. Abschnitt 4.4.2)

3.7 Einfluss von Dithianon auf die Mineralisierung des Maisstrohs und die beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften

In dieser Fallstudie wurde der Einfluss eines Pflanzenschutzmittels auf die Humifizierung von Maisstroh untersucht. Der Fungizidwirkstoff Dithianon diente als Testverbindung zur Überprüfung der Empfindlichkeit der beschriebenen Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften. Dithianon wurde in einer Konzentration von 50 mg kg^{-1} eingesetzt. Diese Menge liegt deutlich über der praxisüblichen Aufwandmenge von $0,96 \text{ mg kg}^{-1}$ (WANNER, 1999). Ebenso unterschied sich die Art der Ausbringung (direkt in den Boden) von der landwirtschaftlichen Praxis.

Für die Mikrokosmen, in die 50 mg kg^{-1} Dithianon appliziert wurden, wurde zunächst 100 mg Dithianon in Acetonitril gelöst, welches mit 1% Trifluoressigsäure angesäuert wurde (w/v). Diese Lösung wurde auf 100 g geglühten Boden pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurde der Boden im Mörser homogenisiert. Diese Dithianon-Vormischung wurde in 95 g autoklavierten bzw. geglühten Boden eingemischt. Die weitere Behandlung der Mikrokosmen erfolgte – ebenso wie die der Dithianon-freien Mikrokosmen – analog zu dem in Kapitel 3.6 beschriebenen Verfahren.

In den im Folgenden genannten Varianten wurde auch die mikrobielle Aktivität in Mikrokosmen ohne Zugabe von Maisstroh bestimmt.

Varianten

Variante A I: geglühter Boden + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension)

Variante A II: geglühter Boden + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension) + 50 ppm Dithianon

Variante B I: Frischboden, steril + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension)

Variante B II: Frischboden, steril + Maisstroh + komplexe mikrobielle Gemeinschaft
(Inokulation durch eine Bodensuspension) + 50 ppm Dithianon

Im Experiment mit dem Fungizid Dithianon durchgeführte Analytik

- Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh (vgl. Abschnitt 4.1.1)
- Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) (vgl. Abschnitt 4.1.2)
- Ergosterolgehalte im Boden (vgl. Abschnitt 4.1.4)
- Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE (vgl. Kapitel 4.2)
- ^{13}C -Flüssig-NMR-Analysen der Huminsäuren (vgl. Abschnitt 4.4.2)

4 BIOLOGISCHE UND CHEMISCHE ANALYTIK DER PROZESSE IN DEN MIKROKOSMEN

4.1 Bestimmung mikrobiologischer Summenparameter

4.1.1 Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh

In den aufgesetzten CO_2 -Fallen (vgl. Abbildung 3-2) wurde die Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh quantitativ erfasst. Vor der Entnahme der CO_2 -Fallen wurden die Abbaugefäße 5 min über den seitlichen Glasstutzen mit steril-gefiltertem Stickstoff gespült. Die Bodenfeuchte wurde bei jeder Probenahme kontrolliert und gegebenenfalls mit sterilem entionisiertem Wasser eingestellt. Die CO_2 -Fallen wurden bis zur Aufarbeitung in Plastikfolien eingeschweißt. Das im Natronkalk gebundene $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit 50 mL 6 N HCl freigesetzt und in 75 mL Methanol/Ethanolamin (70:30) wieder sorbiert. Aliquote von 1 ml wurden mit einem Szintillationscocktail (Instant Scint-Gel Plus, Canberra Packard) vermischt und im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (LSC, Tri-Carb 2500 TR, Canberra Packard) gemessen.

4.1.2 Mikrobielle Aktivität: DMSO-Reduktase-Raten

Prinzip

Die mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen wurde durch die Messung der Dimethylsulf-oxid (DMSO)-Reduktase in Bodenaliquoten nach ALEF und KLEINER (1989) bestimmt. Diese Methode wird zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in Böden, in Bodenaggregaten, Kompost und Abwässern eingesetzt (ALEF und KLEINER, 1989; ALEF, 1991). Diese Autoren stellten fest, dass die DMSO-Reduktion von fast allen Mikroorganismen (aerobe und anaerobe Bakterien und Pilze) in Böden und Gewässern katalysiert wird. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass die DMSO-Reduktion mit verschiedenen anderen Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität korreliert ist, sich diesen gegenüber jedoch durch ihren geringen Arbeitsaufwand auszeichnet (ALEF, 1990). Die Methode beruht auf der folgenden 2-Elektronen-Transfer-Reaktion:



Durchführung

Die Bestimmung von Dimethylsulfid (DMS), welches durch die mikrobielle Aktivität aus DMSO freigesetzt wird, erfolgte gaschromatographisch. Der verwendete Gaschromatograph von Hewlett-Packard (HP 8590 Series II) mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) war mit einer GS-Q Megabore Säule, $l = 30\text{ m}$, $\varnothing = 0,53\text{ mm}$ (Fisons Instrument) ausgerüstet. Vor der Messung wurde mittels DMS eine Eichgerade aufgenommen, um die erhaltenen Flächenintegrale (HP Integrator) in DMS-Massen umzurechnen zu können.

Sofort nach der Probenahme wurden 10 g Frischboden in zweifacher Wiederholung in luftdicht verschließbare Glasgefäße definierten Volumens eingewogen und nach Vorinkubation bei 40°C mit 2 mL einer 10 %igen DMSO-Lösung (w/v) versetzt. Es wurde darauf geachtet, dass der Boden vollständig von der DMSO-Lösung durchtränkt war. Die Gefäße wurden mit gasdichten Gummisepten verschlossen und für 3 h bei 40°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 250 µL aus dem Gasraum oberhalb der Bodenprobe mittels einer gasdichten Hamiltonspritze entnommen und direkt in die GC-Säule injiziert (on-column). Die gaschromatographische Trennung erfolgte bei einer isokratischen Temperatur von 160°C. Anschließend wurden die Proben bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, um die erhaltenen Reduktaseraten auf die Trockenmasse beziehen zu können. Die Angabe der Reduktaserate erfolgte in $\text{ng DMS g}^{-1} (\text{Trockenmasse}) \text{ h}^{-1}$. Bei Messungen mit mindestens 6 Parallelen wurden einzelne Ausreißer aus den Berechnungen herausgenommen (betrifft nur die Experimente mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen). Als Ausreißer galten dabei Werte, die mehr als das doppelte über dem Mittelwert lagen oder besonders niedrige Werte, die auf einen Fehler in der Probenvorbereitung schließen ließen.

4.1.3 Keimzahlbestimmung: Koloniebildende Einheiten

Die Anzahl koloniebildender Einheiten wurde in Anlehnung an WALLHÄUSER (1988) und ALEF (1994) ermittelt. 1 g homogenisierter Boden wurde mit 9 mL Extraktionslösung (siehe Tabelle 3-1) extrahiert. Von dem partikelfreien Überstand wurde unter Einhaltung steriler Bedingungen eine Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) erstellt. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} wurden jeweils 0,1 mL auf je zwei R2A-Agarplatten mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels und eines Drehtisches ausplattiert. Die Platten wurden 3-5 Tage bei 28°C inkubiert. Zur Zählung wurden die Verdünnungsplatten ausgewählt, bei denen die Zahl der Keime zwischen 20 und 200 lag.

Alle für die Keimzahlbestimmungen verwendeten Lösungen und Geräte wurden 30 min bei 121,5 °C (Druck: $2 \cdot 10^5\text{ Pa}$) sterilisiert. Das Nährmedium wurde nicht mit einem Antibiotikum gegen pilzliches Wachstum versehen, hatte aber mit einem pH-Wert von 7,2 und einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen selektive Vorteile für bakterielles Wachstum. Pilz-

kontaminationen kamen aus diesem Grund kaum vor. Bei der Durchführung der Versuche wurden an jedem Versuchstag Sterilitätskontrollen von Agarplatten, der physiologischen NaCl-Lösung und der Umgebungsluft durchgeführt. Drei Aliquote von 0,1 mL der für die Verdünnungsreihen eingesetzten physiologischen NaCl-Lösung wurden auf sterilen Agarplatten ausplattiert. Zur Überprüfung der Umgebungsluft wurde eine Agarplatte pro Versuchstag für 15 min geöffnet und der Luft im Versuchsbereich ausgesetzt. Die Agarplatte wurde anschließend wieder verschlossen und wie die übrigen Kontroll-Platten für 7-8 Tage bei 28 °C inkubiert.

4.1.4 Pilzbiomasse: Ergosterolgehalt

Die Extraktion und Quantifizierung von Ergosterol – einem Sterol, das häufig in pilzlichen Zellwänden vorkommt – ist eine Methode zur Bestimmung pilzlicher Biomasse im Boden und stellt eine Alternative zur mikroskopischen Auswertung dar (STAHL et al., 1995; EASH et al., 1996). Eine Reihe von Vor- und Nachteilen beider Methoden werden in Tabelle 4-1 aufgelistet. Der größte Nachteil dieser Methode bei der Quantifizierung von Ergosterol mittels HPLC liegt nach STAHL et al. (1995) in der schwierigen Umrechnung gemessener Ergosterol-Werte in pilzliche Biomasse. Dieses ist dadurch begründet, dass der spezifische Ergosterolgehalt in den verschiedenen Pilz-Spezies nicht einheitlich ist und zudem vom physiologischen Zustand der Zellen abhängt (SEITZ et al., 1979; SCHNÜRER, 1993; AXELSSON et al., 1995; PASANEN et al. 1999). Aus diesem Grund wurden in der Auswertung die gemessenen Ergosterolgehalte nicht in pilzliche Biomasse umgerechnet, sondern dienten lediglich als spezifischer Indikator.

Tabelle 4-1 Übersicht über Vor- und Nachteile verschiedener Methoden zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse im Boden

	Keimzahlen		Mikroskopie		Ergosterol-Extraktion
Vorteile	- Einfache Methode	-	direkte Beobachtung von Pilzhypen im Boden möglich	-	geringe Subjektivität und Variabilität
Nachteile	- Methode abhängig von Kultivierbarkeit	-	hoher Grad an Subjektivität	-	schwierige Umrechnung gemessener Ergosterol-Mengen in pilzliche Biomasse
	- Bestimmung der Biomasse mycelbildender Pilze anhand von Kolonien unzureichend	-	schlecht standardisierbar	-	unterschiedlich hoher spezifischer Gehalt an Ergosterol in verschiedenen Arten
		-	schlecht kalibrierbar		

Durchführung

Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an EASH et al. (1996). Abweichend davon wurden nur 3 g Boden aufgearbeitet. Die Extraktion des aufgeschlossenen Bodens erfolgte nicht mit Pentan, sondern mit n-Hexan, da dieses eine höhere Flüchtigkeit besitzt und somit bei Raumtemperatur abgedampft werden konnte. Dabei wurden Wiederfindungsraten von zugegebenem Ergosterol-Standard auf Boden zwischen 54 und 63 % erreicht.

Versuchsprotokoll zur Extraktion von Ergosterol aus Boden:

1. Suspendieren von 3 g Boden in 18 mL kaltem Methanol (-20°C) + 6 mL KOH (4 % KOH (w/v), in 95 % Ethanol)
2. 1 min mit Ultraschallstab beschallen (mittlere Intensität, Pulsierbetrieb Branson Digital Sonifier)
3. Inkubieren der Proben für 30 min im Wasserbad (85 °C)
4. Abkühlen auf Raumtemperatur
5. Zugabe von 5 mL Wasser
6. Vakuum-Filtration über Schleicher und Schüll 398¹, Schwarzband; Waschen des Filters mit 5 mL Methanol
7. Extraktion der Methanol-Lösungen mit 5 mL Hexan (z.B. Vortex)
8. Abnahme der Hexan-Phase mit einer Pipette - Überführung in Glas-Vial (20 mL)

9. Wiederholen der Schritte 7 und 8
10. Wiederholen der Schritte 7 und 8
11. Vereinigung der 3 Hexan-Phasen
12. Trocknen der Hexan-Phasen unter N₂
13. Aufnahme in 5 mL Methanol
14. Eindampfen auf 1-1,5 mL
15. Filtration der Proben über 0,2 µm Filter in braune HPLC-Vials

Quantifizierung des Ergosterol mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Aliquote der Ergosterol-Extrakte von 10 µL wurden über eine HPLC-Säule (LiChrospher Select-B 60 RP, 5 µm Korngröße, Innendurchmesser 4 mm, Länge 125 mm, mit einer Vorsäule analogen Materials, Innendurchmesser 4 mm, Länge 4 mm, beides Merck) bei einer Säulenofen-Temperatur von 25°C mit einem isokratischen Laufmittelgemisch von Acetonitril/Wasser (80:20 v/v) und einer kontinuierlichen Flußrate von 0,8 mL min⁻¹ chromatographiert. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarraydetektor (UV/Vis-Detektor UVD 340, Gynkotec) bei 282 nm. Die Retentionszeit des Ergosterol lag bei ca. 17 min. Die Quantifizierung erfolgte über Eichstandards (Sigma). Die untere Bestimmungsgrenze lag bei 0,5 µg mL⁻¹. Unterhalb dieser Grenze konnte nicht mehr zwischen Ergosterol der aktiven Pilzbiomasse und Matrix-Effekten, welche durch das in die Mikrokosmen eingebrachte Maisstroh hervorgerufen wurden, unterschieden werden. Zum eindeutigen Nachweis und zur Quantifizierung des Ergosterols in den Extrakten wurde neben der Retentionszeit gegebenenfalls, z.B. bei sehr niedrigen Ergosterolgehalten, das UV-Spektrum des Peaks mit einem Ergosterolstandard verglichen.

4.2 Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften: DGGE-Muster

Veränderungen in der Struktur der mikrobiellen Bodengemeinschaften wurden anhand von Fingerprints verfolgt. Dazu wurde DNA direkt aus Bodenproben gewonnen. Die genomische DNA wurde nach dem Aufbrechen der bakteriellen Zellwände nach einem veränderten Protokoll von SAMBROOK et al. (1989) mit Chloroform-Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Nachfolgende Aufreinigungsschritte führten zu einem enzymatisch amplifizierbarem Produkt. Es wurde anschließend eine 433 Basenpaar-Sequenz der eubakteriellen 16S rDNA vervielfältigt, wobei einer der Primer um eine GC-Klammer von 40 Basen Länge verlängert war. Die DNA-Fragmente wurden anschließend in einem Polyacrylamid-Gel mit einem denaturierenden chemischen Gradienten elektrophoretisch aufgetrennt (DGGE).

Die molekularbiologische Aufarbeitung erfolgte nach Protokollen der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Schlöter des Institut für Bodenökologie der GSF in Neuherberg. Die Protokolle wurden an die Möglichkeiten im Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre 5 (Radio-agronomie) angepasst und für die zu bearbeitende Fragestellung optimiert. Im folgenden werden die einzelnen Schritte der DNA-Aufarbeitung erklärt.

4.2.1 DNA-Extraktion aus Boden

4.2.1.1 Probenmenge

Bei der Probenahme stand die Größe der Bodenprobe im Vordergrund. Es wurden Vergleiche mit 5 g, 3 g, 1 g und 0,5 g Boden durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch aus den kleineren Probenmengen ausreichend DNA für die Analyse mittels DGGE gewonnen werden kann. Allerdings ist zu befürchten, dass kleinere Probenmengen nicht die gesamte Bodenmikroflora repräsentieren. Daher wurden für die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften jeweils 10 g Boden entnommen und mit einem sterilen Mörser vermahlen. Aus dem homogenisierten Boden wurden jeweils 2 x 3 g für die Extraktion von DNA entnommen.

4.2.1.2 Vorinkubation und Zellaufschluss

Zur Schwächung der bakteriellen Zellwände wurde Lysozym eingesetzt. Dieses ist geeignet, den Mureinsacculus der Bakterien anzugreifen, was vor allem für den Zellaufschluss von Gram-positiven Bakterien mit ihrer rigiden Zellwand notwendig ist. Darüber hinaus müssen die freigesetzten Nukleinsäuren vor den Huminstoffen geschützt werden, da letztere eine hohe Bindungskapazität für Phosphate und DNA besitzen und somit in der Lage sind, enzymatische Reaktionen wie die nachfolgende PCR zu hemmen (RHEIMS et al., 1996). Phenolische Substanzen, wie sie in Huminstoffen vorkommen, gehen mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) einen unlöslichen Komplex ein (EVANS et al., 1972). Sie sind dann nicht mehr in der Lage,

die Amplifikation zu unterbinden und werden daher zur einfachen Reinigung aus Boden extrahierter Nukleinsäuren von Bodenkohlenstoff eingesetzt (HOLBEN et al., 1988; STEFFAN et al., 1988). Neben der Vorinkubation mit PVPP ist auch eine spätere Aufreinigung mit Hilfe von PVPP beschrieben (YOUNG et al., 1993). Vor der Vorinkubation wurde das Polyvinylpolypyrrolidon entsprechend dem folgenden Protokoll säuregewaschen:

Säurewaschen des Polyvinylpolypyrrolidon:

1. 100 g PVPP in 1350 mL 3 M HCl suspendieren und 12-16 h bei Raumtemperatur rühren
2. Filtrieren der Suspension
3. Filter gründlich mit H₂O dest. waschen
4. Filtrerrückstand mit 0,02 M K-Phosphatpuffer (pH 7,4) waschen bis der pH-Wert des Filtrates $\geq 7,0$
5. Suspendieren des Filtrerrückstandes in 1350 mL 0,02 M K-Phosphatpuffer (pH 7,4) und Rühren der Suspension bei Raumtemperatur für 1 - 2 h
6. Vakuum-Filtration der Suspension
7. Schritte 5 und 6 solange wiederholen, bis in der Suspension ein pH-Wert von 7,0 erreicht ist
8. Filtrerrückstand unter gelegentlicher Auflockerung an der Luft trocknen lassen

Vorinkubation:

- 3 g Boden, gemörsert
- 0,6 g PVPP (=Polyvinylpolypyrrolidon), säuregewaschen
- 5 mL Lysis I (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 25 % Saccharose)
- 1 kleine Spatelspitze Lysozym
- 2 g Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm)

Die Vorinkubation erfolgte für 30 min bei 37°C in 50 mL Zentrifugenröhrchen. Die Dauer des sich anschließenden Zellaufschlusses kann ebenfalls die Ergebnisse beeinflussen. Nicht dokumentierte Vorversuche mit unterschiedlicher Dauer des Aufschlusses zeigten, dass Homogenisationszeiten von mehr als 120 Sekunden in einer Zelmühle nicht zu besseren Ergebnissen führen. Dagegen können längere Homogenisationszeiten eine Scherung der DNA zur Folge haben.

Zellaufschluss und Extraktion der DNA:

1. Zugabe von 2 mL Lysis II (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1 % SDS (w/v), 10 % Tris-gesättigtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, pH 7)
2. Homogenisation des Ansatzes in einer Zelmühle für 120 sec bei 4 °C
3. Inkubation für 60 min auf Eis
4. Extraktion der Nukleinsäuren mit 5 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) durch 15 sec vortexen
5. 15 min Zentrifugation bei 2700 x g, 4 °C
6. Abnahme des Überstandes und erneute Extraktion der Nukleinsäuren mit 5 mL Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) durch 15 sec vortexen
7. Wiederholen der Schritte 5 und 6
8. Überführung des Überstandes in Corex-Gläser (Zentrifugengläser für hohe Beschleunigungen)
9. Zugabe von 0,5 mL Kaliumacetat (3M, pH 4,8) und 10 mL Ethanol (abs. -20 °C)
10. Fällung der DNA für mindestens 16 h bei -20 °C

4.2.1.3 Aufreinigung von DNA aus Boden

Nach der Fällung der DNA wurden die Proben auf verschiedene Arten aufgereinigt. Zunächst wurde die gefällte DNA zweimal mit Ethanol gewaschen. Anschließend folgte eine Aufreinigung in einer präparativen Gelelektrophorese. In der Agarose-Gelelektrophorese werden lineare (d.h. chromosomale) Nukleinsäuren im elektrischen Feld vor allem nach ihrer Masse aufgetrennt. Hochmolekulare DNA, wie sie nach der Fällung vorliegt, wird dabei stärker zurückgehalten als die Huminstoffe, die ebenfalls im elektrischen Feld zur Kathode wandern. Auf diese Weise können die Huminstoffe, die die anschließende PCR hemmen, von den Nukleinsäuren getrennt werden. Doppelsträngige DNA wird durch Anfärben mit interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffen unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das die Nukleinsäuren enthaltende Gelsegment kann mit einem Skalpell ausgeschnitten werden und durch Aufarbeitung mit dem Qiagen-Kit QIAexII von der Agarose getrennt werden. Einfaches Auflösen der Agarose mit Agarase führte in Vorversuchen dagegen nicht zu einem amplifizierbaren Produkt. Die Aufreinigung mit dem QIAex II Gel-Extraktions-Kit basiert auf Auflösen der Agarose und selektiver Adsorption der Nukleinsäuren an QIAex II Silika-Gel Partikel. Nach verschiedenen Waschschritten wird die reine DNA mit einem Tris-Puffer eluiert.

Waschen mit kaltem Ethanol (-20 °C):

1. 30 min Zentrifugation der Corex-Gläser mit 10000 x g bei 4 °C
2. Verwerfen des Überstandes
3. Pellet trocknen lassen
4. Aufnahme des Pellets in 6 mL Ethanol
5. 30 min Zentrifugation der Corex-Gläser mit 10000 x g bei 4 °C
6. Verwerfen des Überstandes
7. Pellet bei 37°C trocknen
8. Aufnahme der DNA in 200 µL sterilem TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6)

Präparative Agarose-Gelelektrophorese (1 %)

1. 40 µL DNA-Lösung mit 10 µL Probenauftragspuffer (50 mM EDTA, 15 % Ficoll 400 (w/v), 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v), pH 8,0) mischen und auf 1 % Agarose-Gel auftragen
2. Elektrophorese-Puffer: 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0)
3. Laufbedingungen: 100 mA, 60 min
oder alternativ: 30 mA, 14-16 h
4. Vor dem Gießen des präparativen Agarose-Gels 3 µL/100 mL Ethidium-Bromid (1 %) zugeben (dadurch entfällt der sich an die Elektrophorese anschließende Färbeschritt)

Nach der Ethanol-Fällung (1, Abbildung 4-1) wandert die hochmolekulare mikrobielle DNA nur sehr langsam im Gel und ist als ± große Bande im Gel zu sehen. Diese Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten

Qiagen-Kit QIAex II

1. Überführen der ausgeschnittenen Gelfragmente in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße, Zugabe von 200 µL Extraktionspuffer QX1 und 10 µL Puffer QIAex II und 10 min Inkubation bei 50 °C (alle 2 min Schütteln der Gefäße)
2. 2 min Zentrifugation der Suspension in einer Tischzentrifuge (Hettich Micro Rapid) bei höchster Geschwindigkeit (10000 U min⁻¹)
3. Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets (1 x mit 500 µL Puffer QX1 und 2 x mit jeweils 500 µL Elutionspuffer PE)
4. Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur
5. Resuspendieren des Pellets in 20 µL Tris-Puffer (pH 7,6), 5 min Inkubation bei 50°C; erneute Zentrifugation und Überführen des Überstand in sterile 0,5 mL Reaktionsgefäße
6. Wiederholen von Schritt 5 und Vereinigung der Überstände

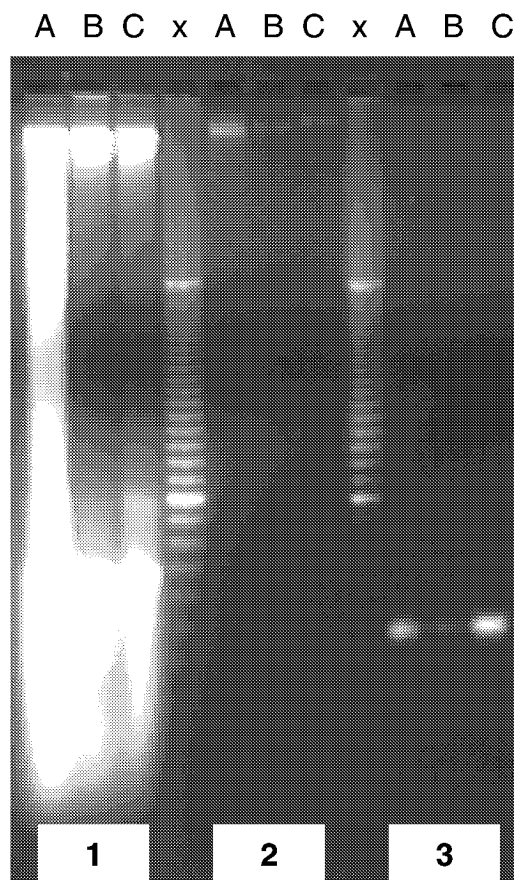


Abbildung 4-1

Agarose Gelelektrophorese von aus Boden extrahierter DNA nach verschiedenen Schritten der Aufarbeitung (A, B, C: DNA extrahiert aus Bodenproben nach Ethanol-Fällung (1), Reinigung über QIAexII (2) oder DGGE-PCR (3), x: 100 bp Molekulargewichts-Marker; Färbung mit Ethidium-Bromid).

4.2.2 Extraktion von DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von genomischer bakterieller DNA aus Bakterien-Isolaten wurden verschiedene Verfahren getestet. Das effektivste Verfahren, welches sowohl bei Gram-negativen als auch Gram-positiven zuverlässig amplifizierbare DNA lieferte, war ein Protokoll mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit (Qiagen). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.2.3 Amplifikation speziesspezifischer DNA-Sequenzen

Die extrahierte hochmolekulare genomische DNA wurde weiter zur Analyse mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) aufbereitet. Dazu wurden Abschnitte der 16S rDNA mittels der Polymerasekettenreaktion mit Primern analog zu den Positionen 968 (Primer U968GC) und 1401 (Primer L1401) der 16S rDNA von *Escherichia coli* amplifiziert. Die Amplifikation der zwischen diesen Positionen befindlichen variablen Regionen V6 bis V8 ist für die Analyse mittels DGGE bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (FERRIS et al., 1996; HEUER et al., 1997; ENGELN et al., 1998; SMALLA et al., 1998; ZOETENDAL et al., 1998). Der Primer U968GC enthält am 5'-Ende eine zusätzliche GC-reiche Sequenz. Diese GC-Klammer erhöht die thermische Stabilität der damit hergestellten PCR-Produkte und verhindert so in der nachfolgenden DGGE das vollständige Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge (MYERS et al., 1985; SHEFFIELD et al., 1989).

Wie sich im Verlauf der Versuche zeigte, war vor der Auftrennung in der DGGE eine Aufreinigung des PCR-Produktes notwendig. Diese erfolgte - wie bei HEUER et al. (1997) beschrieben - mit Hilfe des Qiagen-Kit QIAquick nach Angaben des Herstellers.

Standardansatz der PCR-Proben

Reaktionspuffer	10 µL (Applied Biotechnologies)
(750 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 °C, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 % (v/v) Tween, wird zusammen mit der Polymerase geliefert)	
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL (Applied Biotechnologies)
dNTP (jeweils 5 mM)	4 µL (Applied Biotechnologies)
DMSO	3 µL (Sigma)
Primer (10 pmol/µL, MWG Biotech)	
U968GC-E:	1 µL
L1401:	1 µL

Es wurden jeweils 10 µL der aus Boden extrahierten DNA, bzw. 1 µL der aus Reinkulturen gewonnenen DNA eingesetzt. Die Proben wurden mit sterilem hochreinen Wasser (18,2 MΩcm, Milli-Q 185 Plus, Millipore) auf 100 µL aufgefüllt und für 35 Zyklen im Thermo-

cycler (Techne, Progene) inkubiert. Die Zugabe von 0,5 µL Red Hot Taq Polymerase (Applied Biotechnologies) erfolgte nach einem „Hot Start“ in den heißen Ansatz. Dieses Verfahren wurde angewandt, um unspezifische Primer-Bindungen zu unterdrücken (D'AQUILA et al., 1991; MUYZER et al., 1993).

Temperaturprogramm für die Amplifikation

Hot Start 10 min 94 °C, anschl. 80 °C und Zugabe der Polymerase

1.-34. Zyklus:

Denaturierung	1 min 94 °C
Annealing	1 min 54 °C
Extension	1 min 72 °C

35. Zyklus: 10 min 72°C

Eingesetzte Primer

U968GC:

5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA
CGC GAA GAA CCT TAC -3'

L1401:

5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'

NS 1 (vgl. Abschnitt 3.1.4):

5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'

NS 2 (vgl. Abschnitt 3.1.4):

5'- GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC -3'

Das grundsätzliche Gelingen der enzymatischen Reaktion sowie das Einhalten der sterilen Bedingungen während der Probenvorbereitung wurde durch Mitführen einer Positivkontrolle (hochreine DNA, z.B. von *E. coli*, Sigma) und einer Negativkontrolle (steriles hochreines Wasser) bei jeder Amplifikation überprüft. Die erfolgte Polymerasekettenreaktion wurde anschließend mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 8 µL des PCR-Ansatzes mit 3 µL Probenauftragspuffer (vgl. Abschnitt 4.2.1.3) auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach 60 min Laufzeit bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA wurde die Länge der PCR-Produkte anhand eines Molekulargewichtsmarkers bestimmt.

4.2.4 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese trennt DNA-Sequenzen gleicher Länge auf der Grundlage unterschiedlicher Sensitivität gegenüber denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel (MYERS et al., 1985). Als denaturierende Reagenzien wurden Harnstoff und deionisiertes Formamid eingesetzt. Als maximale Konzentration wurden 7 M Harnstoff und 40 % Formamid (v/v) in einer 6 % Acrylamid-Lösung (w/v) gewählt (100 % denaturierende Lösung). Acrylamid-Lösungen ohne Formamid und Harnstoff wurden als 0 % denaturierende Lösung beschrieben. Für das Gießen der Gradienten-Gele wurden entsprechende Stammlösungen in 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) hergestellt (Tabelle 4-2). Die Stammlösungen wurden bei 4°C dunkel gelagert. Mit einem Gradientenmischer wurden 1 mm dicke Gele mit einer Fläche von 16 x 16 cm so gegossen, dass ein vertikaler Gradient des denaturierenden Agens entstand. Die Polymerisation wurde mit 1 mg Ammoniumpersulfat und 1 µL TEMED pro mL Gellösung gestartet. Die Gießgeschwindigkeit wurde auf ca. 10 mL min⁻¹ eingestellt. Das Gel wurde an einen Gel-Support-Film polymerisiert. Nach Entfernen des Probenkamms wurden die Probentaschen mit hochreinem Wasser und TAE-Puffer gespült. Die Gele wurden in die mit TAE-Puffer befüllte und auf 60°C vorgeheizte DCode-Apparatur (BioRad) eingesetzt. Die PCR-Proben wurden 1:1 mit Probenauftragspuffer (DGene Dye, BioRad) gemischt und in die Probentaschen gefüllt.

Geeignete Laufbedingungen für die DGGE wurden empirisch in einem Time-Travel-Experiment ermittelt, bei dem in regelmäßigen Abständen Proben aufgetragen wurden (vgl. Abschnitt 5.2.1). Neben Boden-DNA wurde auch ein Standard-Mix mit DNA aus Reinkulturen eingesetzt. Dieser Mix bestand aus DNA von *Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum irakense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherischia coli* und *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Tabelle 4-2 Übersicht über die Versuchsbedingungen der DGGE.

<u>Stammlösungen</u>		
	0 % denat. Lösung	100 % denat. Lösung
Acrylamid (40 %)	15 % (v/v)	15 % (v/v)
TAE (50 x)	2 % (v/v)	2 % (v/v)
Formamid (deionisiert)		40 % (v/v)
Harnstoff		42 % (w/v)
Volumen mit hochreinem Wasser (18,2 MΩcm, Milli-Q 185 Plus, MilliPore) auf entsprechendes Volumen einstellen und 15 min entgasen		

<u>Zusammensetzung der denaturierenden Lösungen</u>			
	40 % denat. Lösung	55 % denat. Lösung	60 % denat. Lösung
0 % denat. Lösung	9 mL	6,75 mL	6 mL
100 % denat. Lösung	6 mL	8,25 mL	9 mL
Dye Solution		150 µL	150 µL
APS	150 µL	150 µL	150 µL

4.2.5 Silberfärbung

Die Färbung der Nukleinsäuren in den DGGE-Gelen erfolgte mit Silbernitrat, da diese Methode weitaus sensibler ist als die Ethidiumbromidfärbung oder die Anfärbung mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen (HEUER und SMALLA, 1997). Die Gele wurden zusammen mit dem Gel-Support Film in einen Färbetrog gelegt. Bei allen Inkubationen war das Gel in den entsprechenden Lösungen (jeweils ca. 250 mL) vollständig untergetaucht und wurde vorsichtig geschüttelt. Die Gele wurden zunächst fixiert (1.) und anschließend silbergefärbt (2.). Nach sorgfältigem Entfernen des überschüssigen Silbernitrates (3.) wurde das Gel entwickelt, wobei einwertiges Silber zu elementarem Silber reduziert wird (4.). Die Reaktion wurde mit einem Stopp-Puffer unterbrochen (5.). Die Gele wurden anschließend in Folie eingeschweißt und mit Durchlicht gescannt.

Silberfärbeprotokoll

1. 3 x 3 min Puffer A:
10 % Ethanol (v/v)
0,5 % Essigsäure (v/v)
2. 10 min Puffer B:
0,1 % AgNO₃ (w/v)
3. Sorgfältiges spülen mit Reinstwasser
4. 20 min frisch angesetzter Puffer C:
1,5 % NaOH (w/v)
0,15 % Formaldehyd (w/v)
0,01 % NaBH₄ (w/v)
5. 5-10 min Puffer D:
0,75 % Na₂CO₃ (w/v)

4.3 Bestimmung bodenphysikalischer Parameter

4.3.1 Bodenfeuchte

Zur Bestimmung der Bodenfeuchte wurden 5 g Boden in 3 Parallelen (alternativ: 10 g Boden in 2 Parallelen) mindestens 16 h bei 105 °C getrocknet (verändert nach MÜCKENHAUSEN, 1975). Zur Berechnung des absoluten Wassergehaltes wurde das Gewicht des getrockneten Bodens von dem Frischgewicht abgezogen. Die relative Feuchte wurde aus der prozentualen Verrechnung der maximalen Wasserhaltekapazität (100 % relative Feuchte) mit der analytisch bestimmten Bodenfeuchte des Bodens berechnet.

4.3.2 pH-Wert

Vor der Bestimmung des pH-Wertes von Bodenproben wurden 10 g Feuchtboden über Nacht an der Luft getrocknet. Der getrocknete Boden wurde in einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung im Verhältnis 1:10 suspendiert. Nachdem sich der Boden abgesetzt hatte, wurde der pH-Wert im Überstand mittels einer kalibrierten Glaselektrode gemessen (InLab[®] 420, Mettler Toledo).

4.3.3 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte im Boden

Zur Bestimmung der C/N-Verhältnissen wurden die Bodenproben getrocknet und in einer Planetenschnellmühle (PM 4, Retsch) vermahlen. Jeweils 3 Parallelproben wurden verbrannt und mit Hilfe eines CHNS-Analysators untersucht. Bei der Verbrennung entstandenes CO_2 wurde über Infrarotabsorption und N_2 nach gaschromatographischer Trennung über die Wärmeleitfähigkeit bestimmt. Die Messungen erfolgten im Zentralinstitut für chemische Analyse (ZCH) des Forschungszentrums Jülich.

4.3.4 Bestimmung der ^{14}C -Aktivität im Boden

Veraschung von Bodenproben

Aliquote radioaktiver Bodenproben wurden bei 40 °C getrocknet und im Mörser homogenisiert. Jeweils 500 mg luftgetrockneter Boden wurden in drei Parallelen in Cellulosetücher eingewogen, welche auf einen Gesamt-Cellulosegehalt von ca. 600 mg mit Cellulose aufgefüllt wurden. Die Tücher wurden zu Pillen gepresst und 105 Sekunden verascht (Tri-Carb Sample Oxidizer 306, Canberra Packard). Dabei entstandenes $^{14}\text{CO}_2$ wurde in Carbosorb (Canberra Packard) fixiert und am LSC mit Permafluor (Canberra Packard) als Szintillationscocktail vermessen. Die gemessenen Werte wurden um die Wiederfindungsrate des Oxidizers korrigiert.

Bestimmung der Wiederfindungsrate des Oxidizers

Vor jeder Benutzung des Oxidizers wurden Eichfaktor und Nullwert bestimmt. Dazu wurden am Anfang jeder Eichung am Oxidizer sechs Verbrennungsvorgänge mit 500-600 mg Cellulose durchgeführt (Leerwert). Auf diese Weise wurde möglicherweise im Gerät verbliebene ^{14}C -Aktivität entfernt. Danach wurden 3 x 500-600 mg Cellulose verbrannt und die ^{14}C -Aktivität am Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer vermessen (Nullwert). Als nächstes wurden wiederum 3 x 500-600 mg Cellulose verascht. In die Szintillationsgefäße mit den aufgefangenen Carbosorb- und Permafluor-Lösungen wurden 50 μl eines Verbrennungsstandards (SPEC-CHEC™- ^{14}C , Canberra Packard, spezifische Aktivität: $14,2 \pm 3 \text{ \% kBq ml}^{-1}$) gegeben und die ^{14}C -Aktivität bestimmt (direkter Standard). Als letzter Schritt der Eichung wurden 3 x 500-600 mg Cellulose mit je 50 μl des gleichen Verbrennungsstandards versetzt. Diese wurden im Oxidizer verbrannt und die aufgefangene Radioaktivität dann vermessen (Recovery). Aus den Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und daraus die Wiederfindungsrate errechnet, die bei allen Verbrennungen mindestens 97 % betrug.

4.4 Charakterisierung der Huminsäuren

4.4.1 Huminstoff-Extraktion

Die Extraktion der Huminsäuren erfolgte durch Natronlaugeextraktion der Bodenproben mit anschließender Säure-Fällung der Huminsäuren (Abbildung 4-2). Es wurden jeweils 20 g Boden für die Extraktion eingesetzt. Dazu wurden die Proben der Parallelansätze vereinigt und im Mörser homogenisiert. 20 g Boden wurden in 100 mL Zentrifugengläsern 3 x mit 40 mL 0,5 M Natronlauge für jeweils 16 h auf einem Horizontalschüttler (200 U min^{-1}) extrahiert. Die Boden-Natronlauge-Suspension wurde jeweils 60 min mit $1200 \times g$ zentrifugiert. Zu den vereinigten Überständen wurden ca. 5 mL konzentrierte Salzsäure gegeben, so dass sich ein pH-Wert von 1-1,5 einstellte. Die gefällten Huminsäuren wurden 45 min bei $22000 \times g$ zentrifugiert. Durch dreifaches Waschen mit jeweils 50 mL H_2O bidest wurden die Huminsäuren von ihrer Salzfracht befreit und waren so für die nachfolgenden NMR-Messungen geeignet. Die einzelnen Waschschrte erfolgten durch 30 minütiges Schütteln auf einem Horizontalschüttler (180 U min^{-1}) gefolgt von 30 min Zentrifugation ($22000 \times g$).

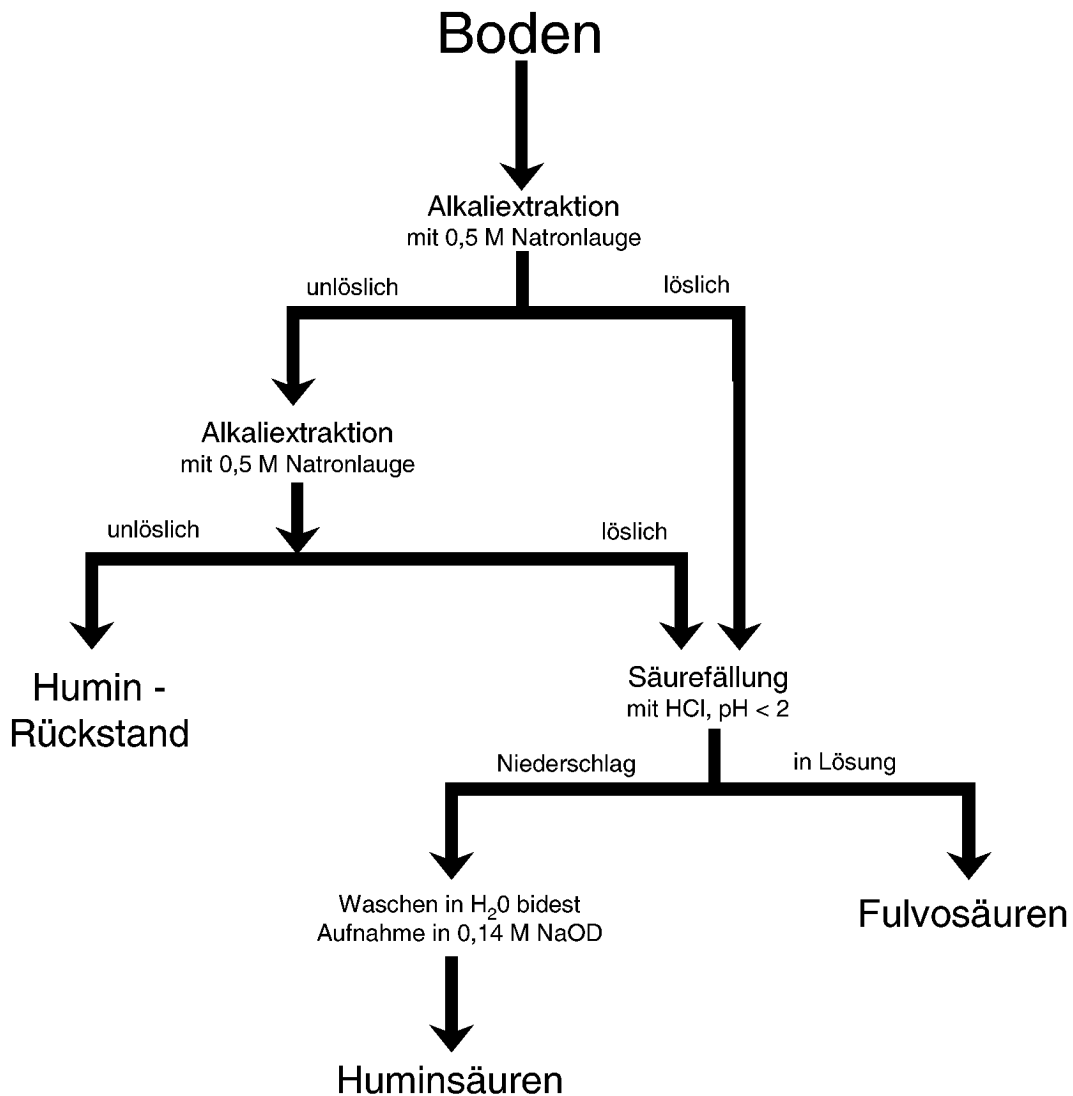


Abbildung 4-2 Schema der Huminstoff-Fraktionierung.

4.4.2 Flüssig-¹³C-NMR von Huminsäuren

Prinzip

Organische Kohlenstoffverbindungen des Bodens werden seit mehr als 30 Jahren mit Hilfe der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) untersucht (WILSON, 1987; PRESTON, 1996; MAHIEU et al., 1999). Sie bietet die Möglichkeit, die Strukturbestandteile der organischen Substanz des Bodens aufzuklären. So konnte gezeigt werden, dass Aromaten den größten Anteil an den funktionellen Gruppen in Huminsäuren aus Böden haben (durchschnittlich 30 %), wogegen O-Alkyl und Alkyl-Gruppen seltener vorkommen (26 % bzw. 25 %, MAHIEU et al., 1999). Carbonyl-Gruppen haben immerhin noch einen Anteil von durchschnittlich 16 %.

Durchführung

Die Flüssig ^{13}C -NMR Untersuchungen von Huminsäuren wurden in Analogie zu den Messungen von WAIS (1997) und WANNER (1999) unter Verwendung der inversgeschalteten Entkopplung (invers gated decoupling) durchgeführt. Hierzu stand ein NMR-Spektrometer der Firma Bruker (AMX 400) mit 100,6 MHz für ^{13}C -Kerne zur Verfügung. Die Messungen erfolgten in Einweg-NMR-Röhrchen aus Quarzglas mit einem Außendurchmesser von 10 mm. Die gesamte Menge an extrahierten Huminsäuren aus 20 g der entsprechenden Bodenprobe wurde in 3-4 mL NaOD (0,14 M) aufgenommen und vermessen. Diese Menge entsprach einem Konzentrationsbereich von 2-12 mg C mL $^{-1}$. Die chemischen Verschiebungen wurden gegen einen externen Standard im Bezug auf Trimethylsilan (TMS) berechnet. Zur Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses wurde eine Linienverbreiterung von 50 Hz vorgenommen.

Messbedingungen der Flüssig ^{13}C -NMR Spektroskopie

- Akquisitionszeit 0,172 sec
- Pulsweite 45°
- Relaxationszeit 1,0 sec
- Entkoppler ausgeschaltet während der Relaxation
- Linienbreite 50 Hz (exponentiell)
- Anzahl der Scans >200000 (in einigen Fällen nur ca. 70 000 Scans)
- Solvens 0,14 M NaOD

4.4.3 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie stellt eine sensitive und reproduzierbare Methode zur Charakterisierung der Größenverteilung von Huminstoffen dar und ist mehrfach als präparatives und analytisches Werkzeug der Umweltchemie in der Literatur beschrieben (HINE und BURSILL, 1984; CANDLER et al., 1988; DE NOBILI et al., 1989; HUBER und FRIMMEL, 1994; WAIS, 1997; WANNER, 1999; KAPPLER et al., 2000). Das Trennungsprinzip beruht darauf, dass nur kleinere Moleküle in der Lage sind, in kleinere Poren des Gelmaterials zu diffundieren. Sie nehmen daher den Umweg durch die innere Struktur der Gelpartikel und eluieren somit langsamer als große Moleküle, die das Gel fast ungehindert passieren können.

Die gelpermeationschromatographischen Untersuchungen der Huminstoffe wurden mit der GPC-Säule MCX (Innendurchmesser 8 mm, Partikelgröße 5 μm , Porendurchmesser 1000 Å, PSS) durchgeführt. Die verwendete Säule hatte eine Länge von 300 mm, der eine MCX-Vorsäule (Innendurchmesser 8 mm, Partikelgröße 5 μm , Porendurchmesser 100 Å, PSS) von 40 mm Länge vorgeschaltet war. Die Säule wurde angeschlossen an das HPLC-System (Berthold) mit der Software Win Flow 1.22 (Berthold) und der Gradientenpumpe L 6100 (Hitachi). Die GPC-Untersuchungen wurden isokratisch mit 0,043 M K_2CO_3 als Laufmittel bei einer Flußrate von 0,5 mL min^{-1} durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen Diodenarraydetektor (UVD-160, Gynkotheke) bei einer Wellenlänge von 200 nm (Molekularmassenstandards) bzw. bei 254 nm (Huminsäuren). Alle Proben wurden zur Reinigung zentrifugiert und mit Milliporewasser auf einen Kohlenstoffgehalt von 2,5 g L^{-1} verdünnt. Mit einem Probengeber (Gynkotheke) wurden jeweils 10 μl Probe injiziert. Das Verwenden gleicher Probenvolumina und Konzentrationen war nötig, da die Retentionszeiten von der Probenmenge abhängig war.

Die Qualität der Trennleistung der Säule wurde mittels Kalibration mit Molekülen bekannter Masse aus Polystyrolsulfonat (PSS), die in K_2CO_3 gelöst wurden, überprüft (208, 840, 2290, 5280, 13000, 451000 und 86500 g mol^{-1} , Abbildung 4-3). Dabei zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Retentionszeiten vom Logarithmus der Molekülmassen. Lediglich der Standard mit einer Molekülmasse von 86,5 kd passt nicht in diese Abhängigkeit. Offensichtlich können Moleküle mit einer Masse oberhalb ca. 50 kd nicht mehr mit der verwendeten GPC-Säule aufgetrennt werden. Die frühen Retentionszeiten der großen Moleküle sind nicht mehr abhängig von Größenunterschieden, sondern beruhen auf Größenausschlußchromatographie. Da sich die Retentionszeiten an unterschiedlichen Meßtagen leicht veränderten, wurden alle Proben, die mittels Gelpermeationschromatographie analysiert wurden, innerhalb eines Meßdurchganges untersucht.

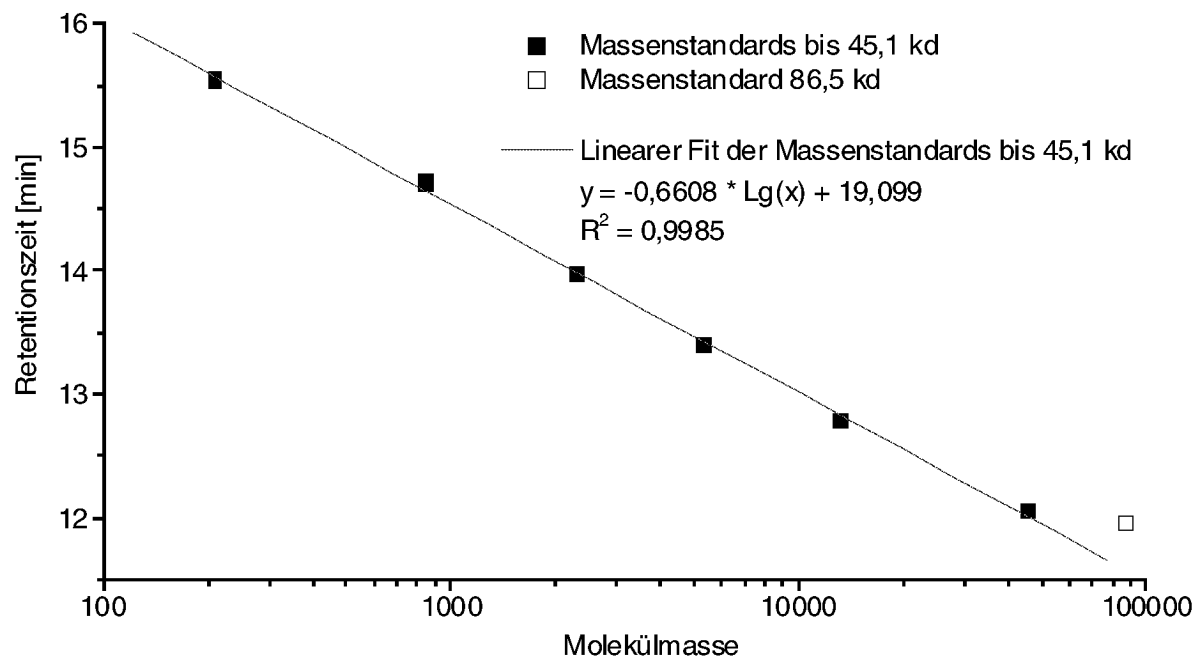


Abbildung 4-3 Kalibrationskurve der Molekülmassenstandards.

5 ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden klassische Methoden der Bodenbiologie zusammen mit einem molekularbiologischen Ansatz eingesetzt, um Prozesse im Boden zu beschreiben, die am Umsatz von Ernterückständen beteiligt sind. Die Ergebnisse wurden ergänzt durch chemisch-physikalische Untersuchungen, die geeignet sind, die Umsatz-Produkte im Boden zu charakterisieren. Dieses sollte eine Verknüpfung der gewonnenen Informationen zur mikrobiellen Struktur mit der Bildung von Huminstoffen ermöglichen. In einem ersten Schritt wurde die Eignung der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) von partiell amplifizierten Sequenzen der 16S rDNA für die Beschreibung komplexer mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen untersucht. In diesen Mikrokosmen wurde darüber hinaus das Vorkommen gezielt eingesetzter Bodenisolats mit Hilfe der DGGE überprüft (vgl. Kapitel 3.3). Diese wurden zuvor aus Maisstrohrotten gewonnen, die über 26 Monate insgesamt 9 mal beprobt wurden (vgl. Kapitel 3.1).

Da der Versuchsboden durch den Glühvorgang degeneriert wird, wurde in einem Versuchsabschnitt der Einfluss verschiedener Mineralstoff-Zugaben in die Mikrokosmen untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Zugabe verfügbaren Stickstoffs gelegt wurde (vgl. Kapitel 3.4). Die Charakterisierung der Prozesse erfolgte anhand der Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh, anhand von DMSO-Reduktase-Raten zur Beschreibung der mikrobiellen Aktivität und von DNA-Fingerprints der mikrobiellen Gemeinschaften im denaturierenden Gel. Daran anschließend wurde die Mineralisation von ^{14}C -Maisstroh in Mikrokosmen mit einer geringen mikrobiellen Diversität, bestehend aus Bodenisolaten betrachtet (vgl. Kapitel 3.5). Gleichzeitig wurden die bei diesem Umsatz nach 6 Wochen entstandenen Huminstoffe mit ^{13}C -Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie vermessen.

In einem Langzeitversuch mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen wurden die chemische und die mikrobielle Dynamik erfasst (vgl. Kapitel 3.6). Über einen Zeitraum von 26 Wochen wurden die Mineralisierung von ^{14}C -Maisstroh, die mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) und die pilzliche Biomasse bestimmt (Biomarker: Ergosterolgehalt im Boden). Die gewonnenen Daten wurden durch DNA-Fingerprints und ^{13}C -NMR-Spektren der Huminsäuren-Extrakte ergänzt.

Abschließend wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die mikrobiellen Prozesse und die Entstehung von Huminstoffen unter Beeinflussung durch den Fungizidwirkstoff Dithianon untersucht wurden (vgl. Kapitel 3.7). Das Ziel dieses Versuches lag in der Bestimmung der Empfindlichkeit der Mikrokosmen auf äußere Einflüsse. Aus diesem Grund wurde der Fungizidwirkstoff in einer vergleichsweise hohen Aufwandmenge eingesetzt, die weit oberhalb üblicherweise zu erwartenden Feld-Konzentrationen lag.

5.1 Isolierung prozessrelevanter Mikroorganismen

Zunächst wurden Mikroorganismen in einer Maisstrohhrotte angereichert, deren einzige organische Kohlenstoffquelle in dem zugesetzten Maisstroh bestand (vgl. Kapitel 3.1). Nach verschiedenen Zeitpunkten der Umsetzung wurden Proben zur Isolierung von Bakterien und Pilzen entnommen. Diese wurden durch Vereinzelung aufgereinigt und charakterisiert. Eine Auswahl an Isolaten wurde als definierte mikrobielle Gemeinschaften in den späteren Umsatzversuchen eingesetzt (vgl. Kapitel 5.3 und 5.5).

Zu allen Probenahme-Terminen wurden vergleichbare Mengen an koloniebildenden Einheiten von Bakterien gefunden (vgl. Abbildung 5-1). Die Ausgangszelldichte, mit der die Mikrokosmen angeimpft wurden, betrug ca. 10^5 cfu g⁻¹ Boden. Die Zahl an koloniebildenden Einheiten auf R2A-Platten nahm bis zur 3. Woche auf $8 \cdot 10^8$ cfu g⁻¹ Boden zu, und sank darauf bis zur 7. Woche auf $3 \cdot 10^8$ cfu g⁻¹ Boden ab (Abbildung 5-1). In der 13. Woche wurden wieder etwas höhere Werte ermittelt ($8 \cdot 10^8$ cfu g⁻¹ Boden), die sich aufgrund eines besonders hohen Variationskoeffizienten (>50 %) allerdings nicht signifikant von den vorherigen unterschieden. Die Werte für die Anzahl koloniebildender Einheiten auf Bodenextrakt-Agar lagen nur in der ersten Woche auf gleichem Niveau wie die Zahlen auf R2A-Platten ($2,0 \cdot 10^8$ cfu g⁻¹ Boden). Sie sanken danach bis auf $3,6 \cdot 10^7$ cfu g⁻¹ Boden. Allerdings stiegen die Werte – ähnlich wie auf den R2A-Platten - in der 13. Woche wieder auf $2,1 \cdot 10^8$ cfu g⁻¹ Boden an. Auf den Malzextrakt-Platten ließen sich koloniebildende Einheiten in der Größenordnung von 10^6 cfu g⁻¹ Boden finden. Eine genauere Auszählung war nicht möglich, da die Platten schon nach wenigen Tagen mit Pilzmycel überzogen waren.

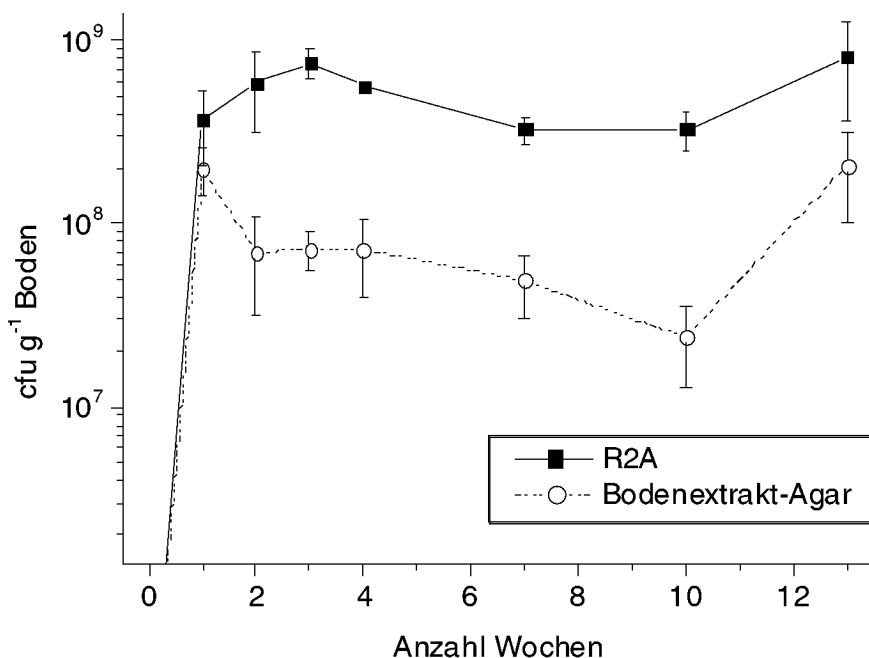


Abbildung 5-1 Bestimmung der Lebendkeimzahl in den Maisstrohhrotten für die Isolierung prozessrelevanter Mikroorganismen.

Einzelne Isolate, die in den Umsatzversuchen mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe des Biolog-Systems identifiziert. Allerdings entzog sich etwa 1/3 der so untersuchten Isolate einer Zuordnung und ein weiteres Drittel konnte nur mit einer Sicherheit von weniger als 50 % einer Art oder Gattung zugeordnet werden. 1/3 der Isolate ließ sich bis auf Gattungs- oder Artebene identifizieren (Tabelle 5-1 und Anhang D).

Tabelle 5-1 Übersicht über die mittels BIOLOG auf Gattungs- oder Artebene identifizierten Bakterien-Isolate und ihre phylogenetische Gruppierung (nach WOESE, 1987).

	Phylogenetische Gruppierung	Alter der Maisstrohrotte	Isolierungs-Medium
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	α -Proteobakterien	3 Wochen	BEA
<i>Burkholderia gladioli</i>	β -Proteobakterien	4 Wochen	BEA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	γ -Proteobakterien	3 Wochen	R2A
		4 Wochen	R2A
		26 Wochen	R2A
<i>Xanthomonas spec.</i>	γ -Proteobakterien	2 Wochen	R2A
<i>Pseudomonas spec.</i>	Proteobakterien (verschieden Cluster)	1 Woche	BEA
		3 Wochen	BEA
<i>Clavibacter michiganense ssp. sepedonicum</i>	Gram-positive Bakterien	1 Woche	R2A

Neben der Identifizierung von Bakterien-Isolaten wurden auch einige der Pilzkulturen auf ihre phylogenetische Verwandtschaft hin untersucht. Dieses geschah mit Hilfe von Basensequenzen partiell amplifizierter 18S rDNA (vgl. Abschnitt 3.1.4). Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Datenbank BLASTN 2.0.14 ausgewertet (ALTSCHUL et al., 1997) und sind in Anhang E dargestellt.

5.2 Optimierung der molekularbiologischen Methoden

5.2.1 Time-Travel-Experiment

Das Time-Travel-Experiment diente der Bestimmung der optimalen Elektrophorese-Dauer. Diese ist erreicht, wenn alle PCR-Produkte einer Probe eine Konformationsänderung durch die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen im DNA-Doppelstrang erfahren haben und nicht weiter elektrophoretisch aufgetrennt werden. Um die benötigte Laufzeit für die Gелеlektrophorese zu ermitteln, wurden deshalb Proben zeitlich versetzt auf ein Gradientengel aufgetragen. Dazu wurden sowohl PCR-Produkte von DNA eines Bakterien-Standardmixes als auch von Boden-DNA eingesetzt (vgl. Abschnitt 4.2.4).

Die Bakterien des Standard-Mixes wurden zunächst in Einzelauftragung untersucht. Hierbei zeigte *Acetobacter diazotrophicus* im Gradientengel (Abbildung 5-2) allerdings mehrere Banden, die im Bakterien-Mix mit einer geringeren spezifischen Konzentration weniger stark zu Tage treten. Das PCR-Produkt von *Azospirillum irakense* zeigt eine scharfe deutliche Bande im mittleren Bereich der Gesamt-Laufstrecke und eine sehr schwache diffuse am Ende. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, wonach ein sehr hoher G+C-Gehalt für eine Bande am Ende sorgen sollte. Eine mikroskopische Kontrolle der Kulturen deutete auf Stäbchen-Bakterien, so dass von einer Kontamination auszugehen ist. Auf eine Aufreinigung der Kultur wurde jedoch verzichtet, da dieser Organismus für die weiteren Versuche nicht benötigt wurde. Die amplifizierten DNA-Abschnitte von *Herbaspirillum rubrisubalbicans* zeigten bei einer relativ schwachen aber scharfen Bande das erwartete Laufverhalten. Das PCR-Produkt von *Corynebacterium glutamicum* war im DGGE-Gel durch zwei scharfe Banden gekennzeichnet, was für eine Sequenzheterologie spricht. Die DNA von *Escherischia coli* hatte eine unsaubere Bande, was aber auch durch eine zu hohe Auftragsmenge hervorgerufen sein kann. Im Mix waren alle deutlichen Banden, die nach der Einzelauftragung vorkamen, ebenfalls vorhanden.

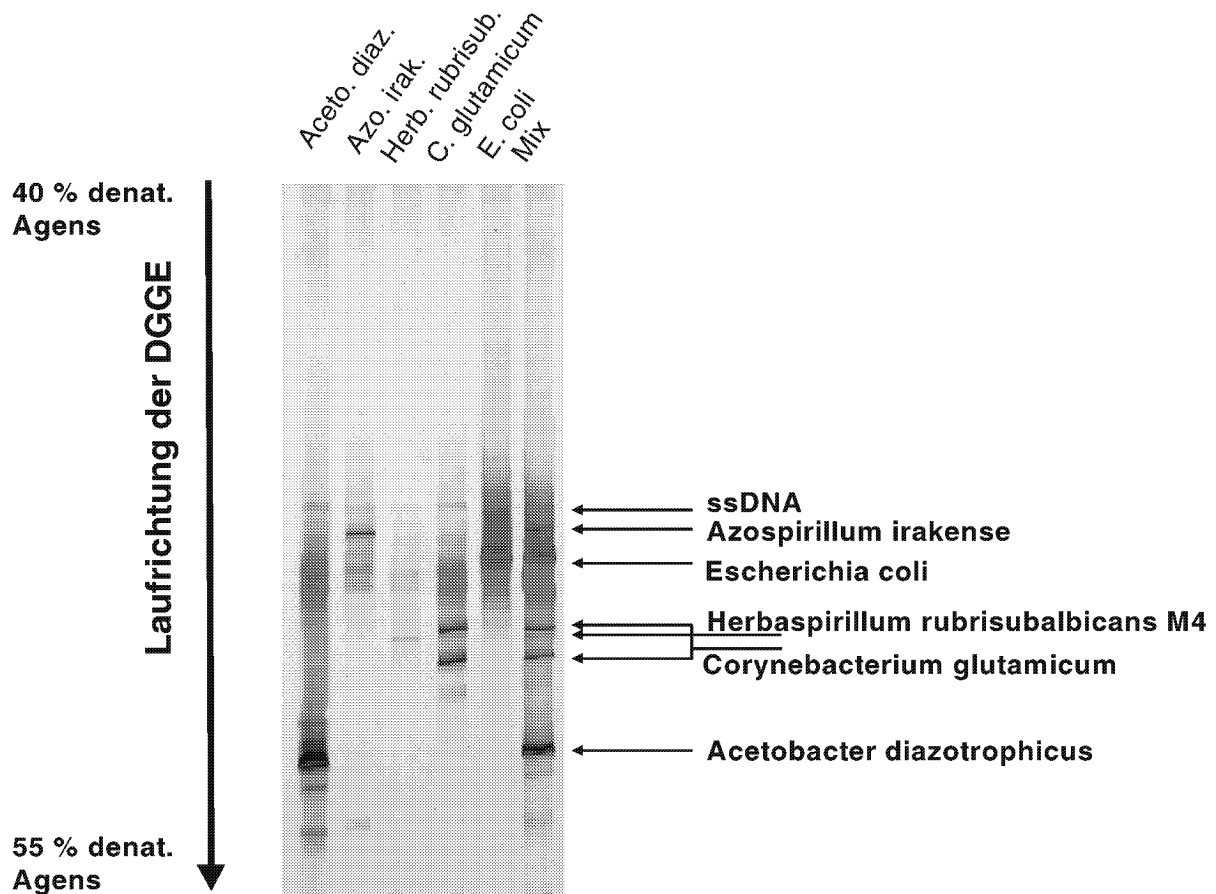


Abbildung 5-2 Auftrennung der einzelnen Komponenten des Standard-Mix in der DGGE.
(Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h).

Im Time-Travel-Experiment wurden PCR-Produkte der DNA von Standard-Organismen (Abbildung 5-3, links) und der Boden-DNA (Abbildung 5-3, rechts) im zeitlichen Abstand von 30 bzw. 60 min auf ein DGGE-Gel aufgetragen, so dass am Ende verschiedene Laufzeiten resultierten. Mit dem Standard-Mix war ab einer Elektrophorese-Dauer von 5,5 h eine gute Auftrennung der verschiedenen Banden erkennbar. Diese Auftrennung konnte durch eine längere Elektrophorese-Dauer nicht mehr verbessert werden. Ab 6,5 h war sogar eine Verengung des Spektrums zu beobachten. Für die Boden-DNA wurde die beste Auftrennung nach 6 h erreicht. Nach dieser Zeit war das Bandenmuster fast über die gesamte theoretisch verfügbare Laufstrecke verteilt. Eine Stunde später (nach 7 Stunden) verteilte sich das Bandenmuster tatsächlich über die gesamte Strecke, so dass sogar ein Verlust von DNA am Ende nicht ausgeschlossen werden konnte. Als Schlussfolgerung aus diesem Time-Travel-Experiment lässt sich also eine optimale Elektrophorese-Dauer für die amplifizierten 16S rDNA-Segmente von 433 Basenpaaren von 6 h bei 60 °C und 130 V ableiten.

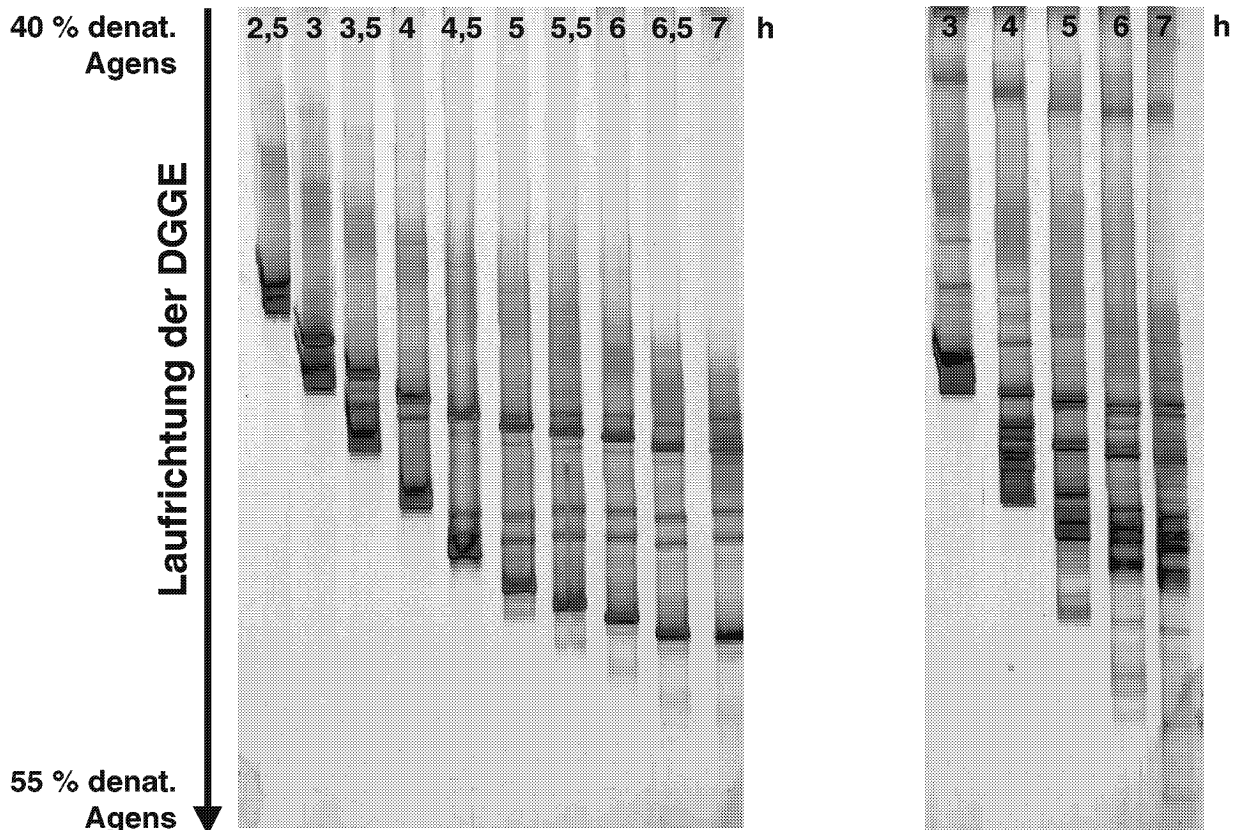


Abbildung 5-3 Time-Travel-Experiment zur Bestimmung der optimalen zeitlichen Auflösung der DGGE mit dem Standard-Mix (links) und mit Boden-DNA (rechts).
DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V.

5.2.2 Reproduzierbarkeit von DGGE-Mustern gleicher Proben bzw. Varianten

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden Proben aus zwei verschiedenen Varianten (A: Maisstrohrotte nach 6 Wochen Inkubation und B: Maisstrohrotte mit Stickstoffausgleich nach 6 Wochen Inkubation) mit jeweils drei parallelen Ansätzen (1, 2 und 3, vgl. Abbildung 5-4) und jeweils zwei Parallel-Aufarbeitungen (I bzw. II) mittels DGGE analysiert. Es zeigte sich, dass in allen Spuren einer Variante die gleichen Banden vorhanden waren, wobei diese sich allerdings in ihrer Intensität unterschieden. Letzteres galt auch für die parallel aufgearbeiteten Proben des selben Versuchskolbens.

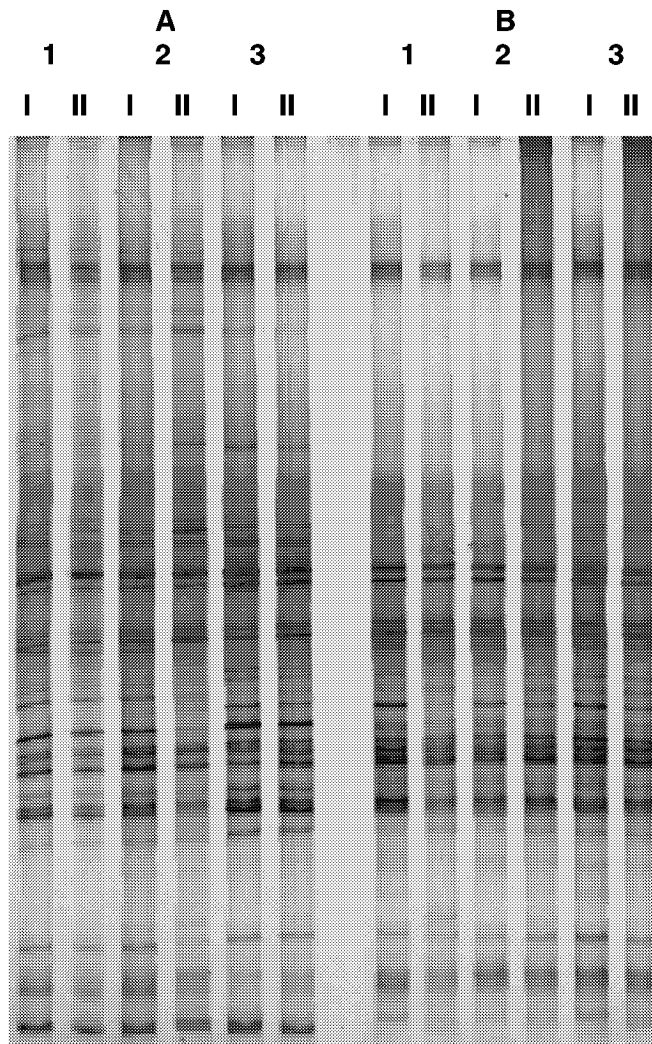


Abbildung 5-4 DGGE-Gel von Parallel-Aufarbeitungen vergleichbarer Bodenproben zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit . A: Maisstrohrotte mit geglühtem Boden nach 6 Wochen; B: Maisstrohrotte mit geglühtem Boden und zusätzlicher N-Zufuhr nach 6 Wochen; 1, 2, 3: Parallelansätze der Mikrokosmen; I, II: Parallelaufarbeitungen gleicher Ansätze. DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.

5.3 Vorversuch mit definierten und komplexen mikrobiellen Gemeinschaften

In diesem Versuchsteil wurde der Einsatz der in Kapitel 4.2 beschriebenen molekularbiologischen Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Struktur in einer Maisstrohrotte erprobt und ihre Eignung für die späteren Umsatzversuche erprobt. Im Vordergrund stand– wie schon in Abschnitt 5.2.1 beschrieben – die Reproduzierbarkeit der molekularbiologischen Aufarbeitung bis zum denaturierenden Gel. Darüber hinaus wurden auch definierte mikrobielle Gemeinschaften eingesetzt und ihr Verbleib nach 6 Wochen in den Mikrokosmen mit Maisstrohverrottung mit Hilfe der DGGE überprüft.

5.3.1 Mineralisation von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh

Die Varianten V 1 und V 2 mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften mineralisierten ca. 27 % des eingesetzten ^{14}C -markierten Maisstroh-Kohlenstoffes. In den Varianten V3, V4 und V5 mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften wurden nur ca. 21 % des radioaktiven Materials als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt. Die stärkste Mineralisierung erfolgte jedoch in Variante V6, die mit nicht sterilisiertem Maisstroh angeimpft wurde. Die mikrobiellen Gemeinschaften dieser Variante entwickelten sich aus den auf dem Maisstroh befindlichen Organismen.

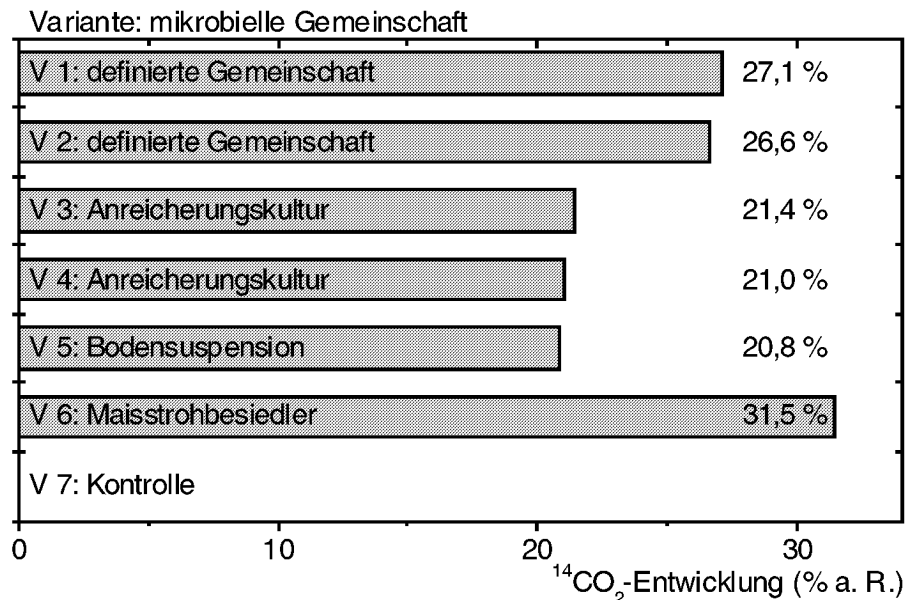


Abbildung 5-5 Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh (applizierte Radioaktivität = a. R. = 100 %) in den Rotte-Experimenten des Vorversuches mit definierten (V 1 und V 2) und komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (V 3 und V 4: Anreicherungskulturen, V 5: Bodensuspension, V 6: Maisstrohbesiedler). V 7 enthielt kein ^{14}C -markiertes Maisstroh.

5.3.2 Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels DGGE

Beim Vergleich der Bandenmuster der PCR-Produkte der komplexen Gemeinschaften im denaturierenden Gel wird die Reproduzierbarkeit der Parallel-Aufarbeitungen (I und II) deutlich (Abbildung 5-6). Lediglich in V3 ist in Spur I ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen. Bei dieser Probe handelte es sich um ein PCR-Produkt, welches über mehrere Monate bei -20°C gelagert wurde, und somit zu einer Abnahme der Qualität geführt hat. Dieses ist auch an der gleichmäßigen dunklen Hintergrundfärbung der Spur zu erkennen. Dagegen waren alle übrigen Proben frische PCR-Produkte der jeweiligen Varianten.

Die Bandenmuster der Bodenproben, die mit einer Anreicherungskultur angeimpft wurden (V 3 und V 4), waren nach sechswöchiger Inkubation sehr ähnlich. Dabei führte die Inokulation mit der SSE-Anreicherungskultur zu einer etwas größeren Anzahl an DNA-Banden, was jedoch möglicherweise auch durch eine größere DNA-Menge verursacht sein kann. Am stärksten vergleichbar sind diese Bandenmuster mit denen der Variante V 6, die durch unsteriles Maisstroh inokuliert wurde. Dieses zeichnet sich durch eine besonders dominante Bande bei einer Laufstrecke von ca. 90 mm aus, die in den beiden übrigen Varianten nur schwach zu sehen ist. Die Varianten, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden (V 5 und V 7), unterscheiden sich zum Teil in ihren Bandenmustern von den Varianten V 3, V 4 und V 6: Während eine typische Bande bei ca. 18 mm kaum noch zu erkennen war, lag die stärkste Bande der Varianten V 5 und V 7 bei ca. 74 mm. Diese war zuvor nicht oder nur sehr gering in Erscheinung getreten. Die Inokulation durch eine Bodensuspension bringt also zusätzliche Mikroorganismen in die Mikrokosmen, welche nicht durch die Anreicherungskulturen mit Maisstroh oder durch das Maisstroh direkt eingetragen werden. Gleichzeitig kommt es nicht nur zu einer Zunahme der mikrobiellen Diversität, sondern auch zu einer Verschiebung des Spektrums.

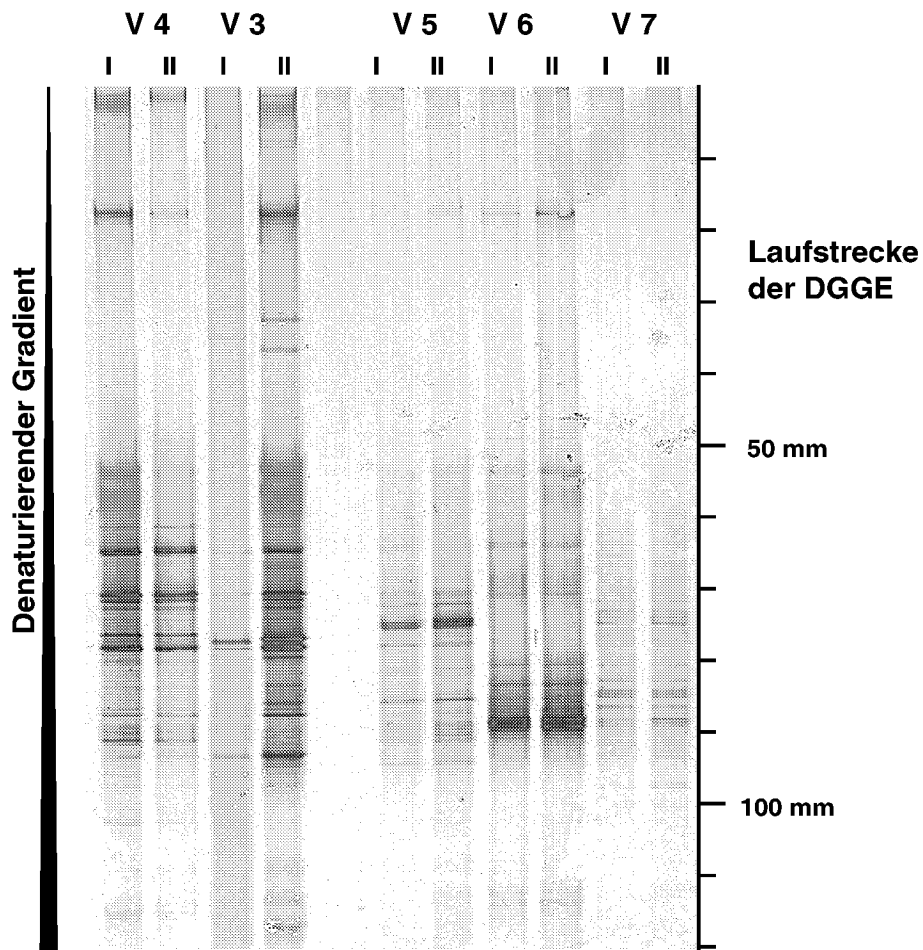


Abbildung 5-6 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA aus Bodenproben der Varianten mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (V 3 und V4: Anreicherungskulturen, V 5: Bodensuspension, V 6: Maisstrohbesiedler, V 7: Bodensuspension, nicht radioaktives Maisstroh) nach 6-wöchiger Inkubation (I und II: Parallel-Aufarbeitungen der gleichen Proben). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 50 V, 16 h.

In dem DGGE-Gel mit den PCR-Produkten der Isolate aus Variante V 1 sowie der entsprechenden Bodenprobe war für jedes Isolat eine oder mehrere Banden zu erkennen (Abbildung 5-7). Allerdings lagen diese Banden in vielen Fällen sehr dicht beieinander. So finden sich die Banden der Isolate *II C* (BEA), *III J* und *V C* bei einer Laufstrecke von 102 mm, die von *VI E* und *I A* bei 104 mm und die Bande von Isolat *alt A* bei 106 mm Laufstrecke. Gleichzeitig waren die Banden im Gel relativ dick. Dieses läßt auf eine hohe DNA-Menge schließen, wodurch eine eindeutige Zuordnung erschwert wird.

Die Banden der Isolate *IV A* (BEA) (Laufweite: 84 mm) und *II D* (88 mm) unterschieden sich in ihrem Laufverhalten deutlich von den übrigen Isolaten. Diese Banden lassen sich auch in dem PCR-Produkt der Bakterien-Mischung der genannten Isolate wiederfinden. Allerdings bleibt anzumerken, dass die Spur des PCR-Produktes von *II D* weitere Banden aufweist, die

nicht im Bandenmuster der DNA aller Bakterien (M) auftauchen. Die bei einer Laufstrecke von 102 und 104 mm gefundenen Banden lassen sich nicht eindeutig zuordnen.

Entsprechendes gilt für das Bandenmuster des PCR-Produktes der Boden-DNA. Hier ist eine besonders deutliche Bande bei einer Laufstrecke von 84 mm zu sehen, was darauf hindeutet, dass Isolat *IV A (BEA)* in der Bodenprobe häufig vorkommt. Weitere deutliche Banden sind im Bereich von 102-104 mm Laufweite zu erkennen, die jedoch aus den genannten Gründen nicht eindeutig einzelnen Isolaten zugeordnet werden können. Schwache Banden sind noch bei 88 mm und 106 mm vorhanden und deuten darauf hin, dass die Isolate *II D* und *alt A* – wenn auch in geringerer Zahl – in der 6 Wochen alten Bodenprobe von V 1 vorhanden sind.

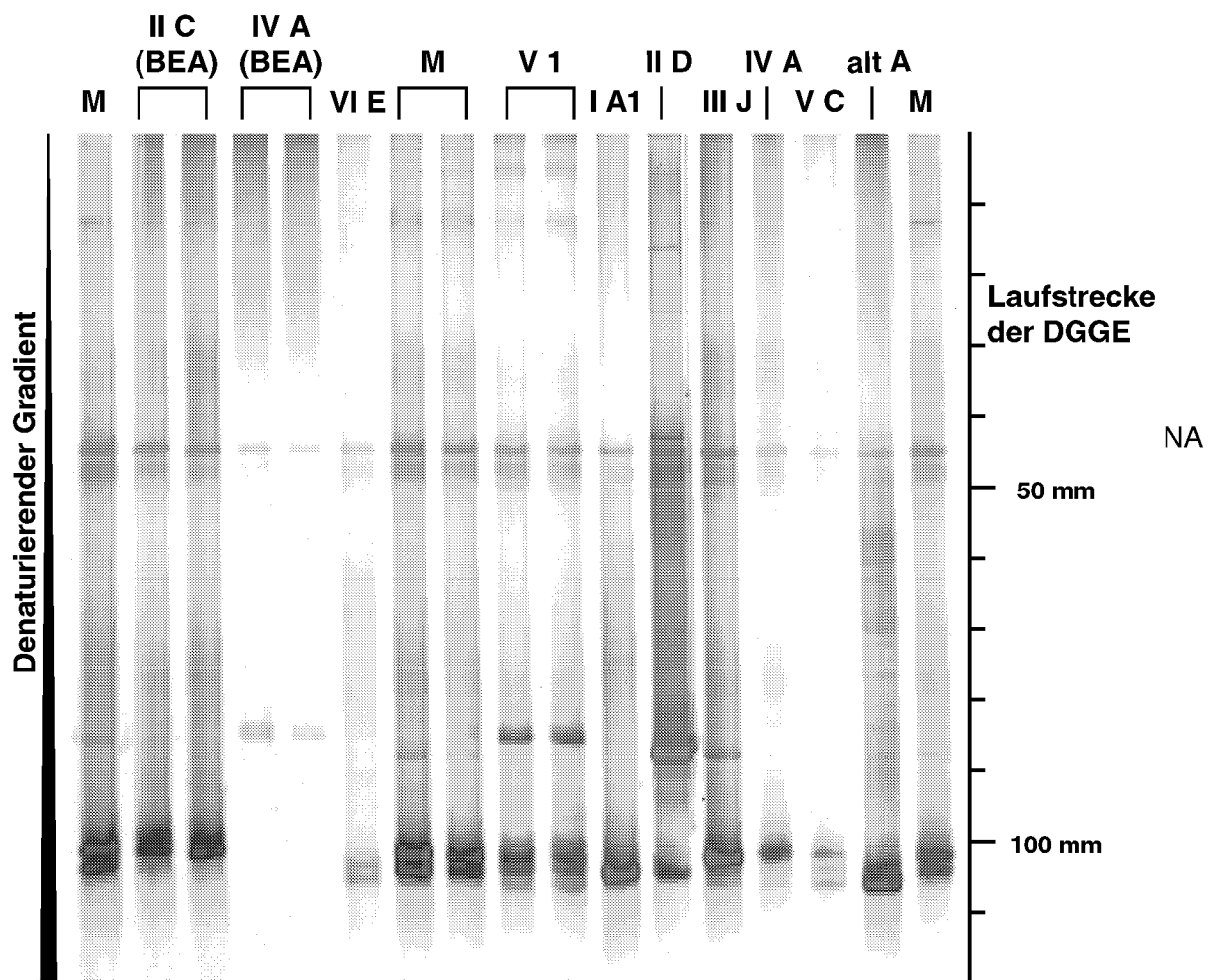


Abbildung 5-7 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Variante V 1 eingesetzten Isolate (vgl. Anhang B), einer Mischung dieser Isolate (M) und aus der entsprechenden 6 Wochen alten Bodenprobe (V 1). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 45 V, 15 h.

In dem DGGE-Gel mit den PCR-Produkten der Isolate aus Variante V 2 sowie der entsprechenden Bodenprobe sind ebenfalls für jedes Isolat eine oder mehrere Banden zu erkennen (Abbildung 5-8). Wiederum liegen diese Banden in vielen Fällen sehr dicht beieinander und waren teilweise sehr dick und dadurch bedingt unscharf. So finden sich die Banden der Isolate *III A* und *IV K* bei einer Laufstrecke von 102 mm, die von *II C (BEA)* und *I B1* bei 104-106 mm, und die von *VI F*, *II B*, *V C* und *alt D* bei 108 mm. Lediglich die Bande von Isolat *IV B (BEA)* lag deutlich von den anderen getrennt bei einer Laufweite von 88 mm. Im Bandenmuster der PCR-Produkte von der DNA des Bakterien-Mixes ließen sich die genannten Banden wiederfinden.

Im Bandenmuster der PCR-Produkte der Boden-DNA sind diese Banden ebenfalls zu erkennen, wobei die stärkste Bande bei 88 mm lag und somit auf das Isolat *IV B (BEA)* als häufigen Organismus in der 6 Wochen alten Bodenprobe von V 2 hinweist. Weitere Banden sind bei 102, 106 und 108 mm zu erkennen, wobei die Bande bei 108 mm vergleichsweise schwach ist. Allerdings können in diesem Bereich keine Rückschlüsse auf das Vorkommen einzelner Isolate in der Bodenprobe gezogen werden.

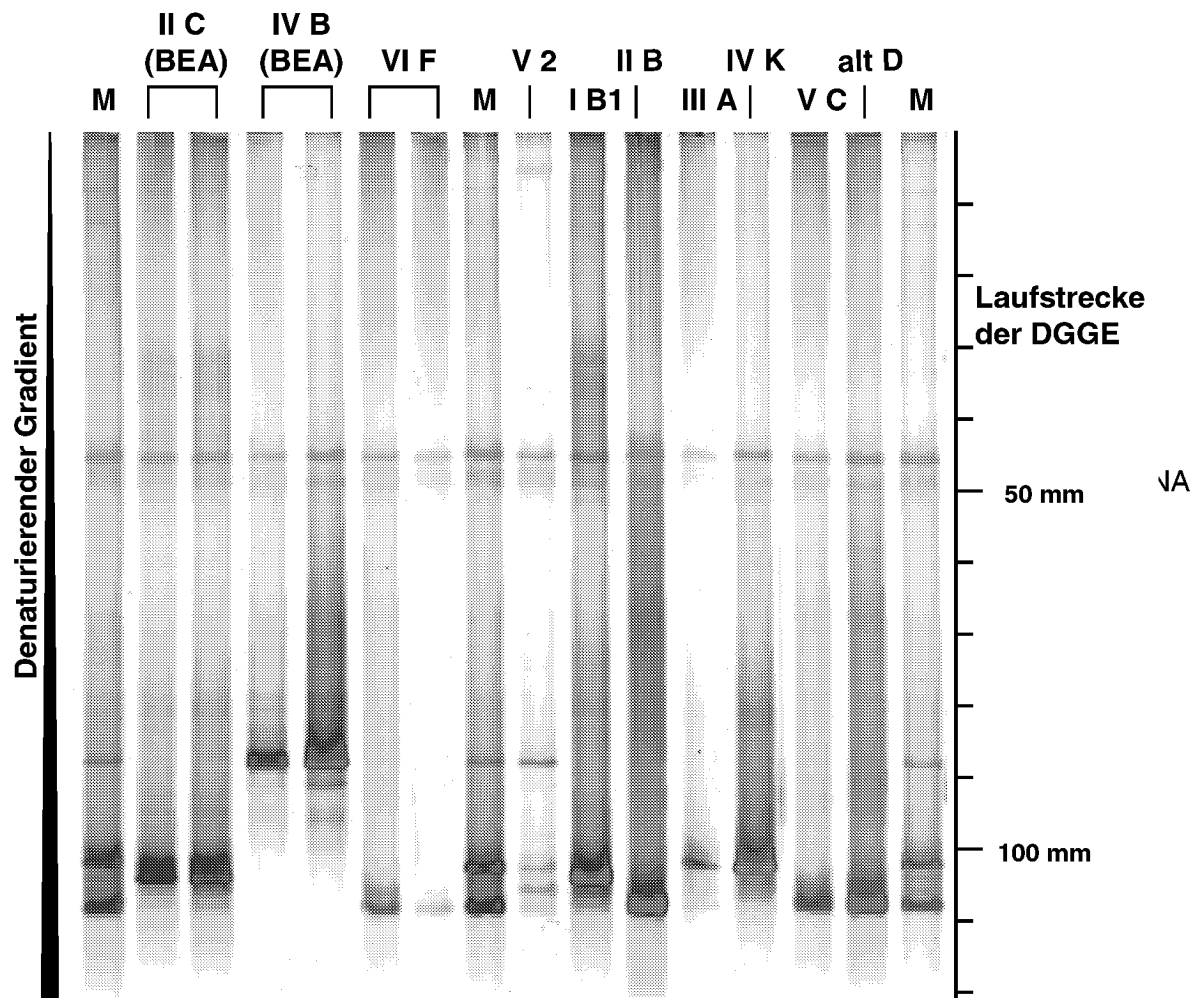


Abbildung 5-8 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Variante V 2 eingesetzten Isolate (vgl. Anhang B), einer Mischung dieser Isolate (M) und aus der entsprechenden 6 Wochen alten Bodenprobe (V 2). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 45 V, 15 h.

5.4 Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Mineralisierung von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften

Durch den Glühvorgang bei 600°C wird die Struktur der Bodenmatrix verändert (vgl. Tabelle 3-3). In diesem Experiment wurden Mikrokosmen mit intakter (Variante A) und geglühter Bodenmatrix (Varianten B – G) unter verschiedenen Nährstoffbedingungen nach Inokulation mit einer Bodensuspension bezüglich der Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh, der DMSO-Reduktase-Raten und der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften (über DGGE-Muster) verglichen (vgl. Tabelle 3-4). Besonderes Augenmerk wurde auf die Verfügbarkeit von Stickstoff als häufig wachstumslimitierenden Faktor im Boden gelegt. 3 Varianten (E, F und G) wurden daher mit dem handelsüblichen Calcium- und Stickstoff-Dünger Kalkammonsalpeter (KAS) in praxisüblicher Menge (20 mg N 100 g⁻¹ Boden) behandelt. Von den KAS-freien Varianten erhielt Variante A keine Zugabe von Mineralstoffen, Variante C eine natürliche Bodenlösung und Variante D eine künstliche Bodenlösung (~2 mg N 100 g⁻¹ Boden).

5.4.1 Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh

Nach 2 Wochen wurde in allen Varianten durchschnittlich $27,5 \pm 3,1$ % der applizierten Radioaktivität mineralisiert (Abbildung 5-9). Erst nach diesem Zeitpunkt wurde ein Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Mineralisierung des Maisstrohs deutlich. Nach 6 Wochen war in allen untersuchten Varianten mindestens 32 % des eingesetzten ^{14}C -markierten Maisstroh-Kohlenstoffes durch die komplexen mikrobiellen Gemeinschaften aus den Bodensuspensionen mineralisiert (Tabelle 5-2). Dabei lagen die Varianten, die einen Stickstoffausgleich in Form von KAS erhalten hatten (Varianten E, F und G), mit einer $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung von 40 – 41 % der applizierten Radioaktivität (a. R.) im Bereich des Maisstrohumsatzes in der nativen Bodenmatrix (Variante A: 42 % der applizierten Radioaktivität). Eine ebenfalls vergleichbare Mineralisierung von 39 % des applizierten Radiokohlenstoffes wurde in Variante D erreicht, die eine geringere Menge Stickstoff und zusätzlich weitere Mineralstoffe erhalten hatte.

Nach 6 Wochen nahm die Bedeutung der Stickstoffdüngung für die Mineralisierung des ^{14}C -markierten Maisstrohs ab. Während bis zur 6. Woche die Mineralisierung in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden, die mit Kalkammonsalpeter behandelt wurden (Varianten E, F und G), am stärksten vorangeschritten war, wurde in diesen Varianten von der 7. bis zur 28. Woche kaum noch weiteres Maisstroh bis zu CO_2 abgebaut (vgl. Abbildung 5-9). Dabei verhielten sich die Varianten E, F und G sehr ähnlich, was sich in der geringen Standardabweichung von 2,3 % der applizierten Radioaktivität widerspiegelt. Dagegen nahm die Mineralisierung in den Varianten B und C (ohne Zugabe von Mineralstoffen) weiter zu und erreichte bis zum Versuchsende vergleichbare Werte wie bei den zuvor genannten Varianten mit Kalkammonsalpeter-Zugabe (durchschnittlich 45 % der applizierten Radioaktivität).

Lediglich in Variante D, die zu Versuchsbeginn weitere Nährstoffe in Form einer künstlichen Bodenlösung (SSE nach ANGLE et al., 1994) erhalten hatte, wurde genau so viel des applizierten Radiokohlenstoffes in $^{14}\text{CO}_2$ umgewandelt wie in Variante A mit getrocknetem Boden und der intakten Kohlenstoffmatrix. Nach 197 Tagen wurden in diesen beiden Varianten durchschnittlich 53 % der applizierten Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ in den CO_2 -Fallen gefunden. Es bleibt festzuhalten, dass die Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs in geglühtem Boden, sowohl was den zeitlichen Verlauf als auch die gesamte Menge betrifft, nach Applikation einer simulierten Bodenlösung (SSE, vgl. Tabelle 3.1) am besten die Mineralisierung in der nativen Bodenmatrix widerspiegelt.

Tabelle 5-2 Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs nach 6 und 28 Wochen (in % a. R. = applizierte Radioaktivität).

	Nativer Boden	Ohne KAS-Düngung				Mit KAS-Düngung			ohne KAS (B, C, D)	+ KAS (E, F, G)
	A	B	C	D	E	F	G			
Mineralisierung von ¹⁴ C-markiertem Maisstroh (% a. R., Mittelwerte aus 3 Parallelen)										
Nach 6 Wochen	42	36	32	39	41	40	40	36	40	
σ(% a. R.)	0,5	4,3	5,1	2,3	3,8	2,1	1,3	4,4	2,3	
Nach 28 Wochen	53	44	39	53	46	45	45	45	45	
σ(% a. R.)	3,0	4,1	5,9	4,1	3,6	1,8	1,7	7,2	2,2	

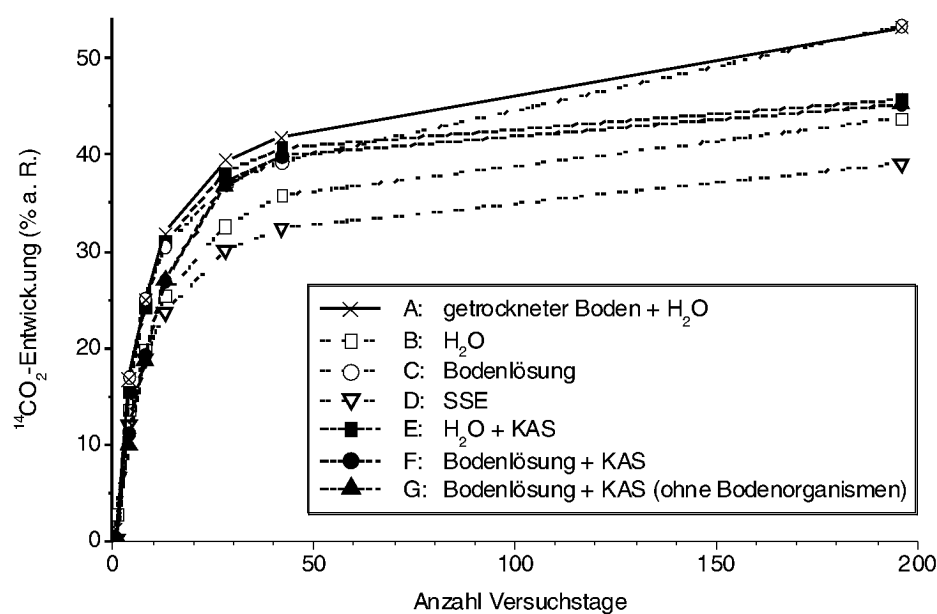


Abbildung 5-9 Zeitlicher Verlauf der Maisstroh-Mineralisierung (akkumulierte Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelen; applizierte Radioaktivität = a. R. = 100 %).

5.4.2 Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten)

In den Mikrokosmen mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung wurde die mikrobielle Aktivität nach 4 Wochen gemessen. Die DMSO-Reduktase-Raten sind in Tabelle 5-3 angegeben. In den Ansätzen, die durch eine Bodenlösung inokuliert wurden und eine Stickstoffdüngung in Form von Kalkammonsalpeter erhalten haben (Varianten E und F, vgl. Tabelle 3-4), zeigte sich mit 240 bzw. 290 ng DMS g^{-1} (Trockenmasse) h^{-1} eine höhere mikrobielle Aktivität als in den Ansätzen ohne Zugabe von Stickstoff. Gleichzeitig unterschied sich die mikrobielle Aktivität in diesen beiden Ansätzen nicht signifikant von der in Variante A mit der intakten Frischboden-Matrix (270 ng DMS g^{-1} h^{-1}). Die Varianten B und G zeichnen sich mit 240 bzw. 220 ng DMS g^{-1} h^{-1} ebenfalls durch relativ hohe mikrobielle Aktivitäten aus. Allerdings sind dabei die besonders hohen Variationskoeffizienten von 68 bzw. 37 zu beachten. Betrachtet man bei diesen Varianten jeweils den vom arithmetischen Mittelwert am stärksten abweichenden Parallelansatz als Ausreißer und nimmt die Werte aus der Berechnung, so ergeben sich mikrobielle Aktivitäten von 150 bzw. 170 ng DMS g^{-1} h^{-1} bei Variationskoeffizienten von 32 bzw. 13. Der zuvor angedeutete Einfluss der Kalkammonsalpeter-Zugabe auf die mikrobielle Aktivität wird dann noch deutlicher sichtbar (Abbildung 5-10).

Tabelle 5-3 Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen nach 4-wöchiger Inkubation (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen). Zur Beschreibung der Varianten vgl. Tabelle 3-4.

Variante	Mikrobielle Aktivität (ng DMS g^{-1} h^{-1})	Variations- koeffizient
A	270	13
B*	240	68
C	80	22
D	130	10
E	260	16
F	290	5
G*	220	37

* Die hohen Variationskoeffizienten wurden durch besonders hohe Werte von Ausreißern verursacht. Bei Nichtberücksichtigung ergibt sich für Variante B eine DMSO-Reduktase-Rate von 150 ng g^{-1} h^{-1} und für Variante G von 170 ng g^{-1} h^{-1} (vgl. Abbildung 5-10).

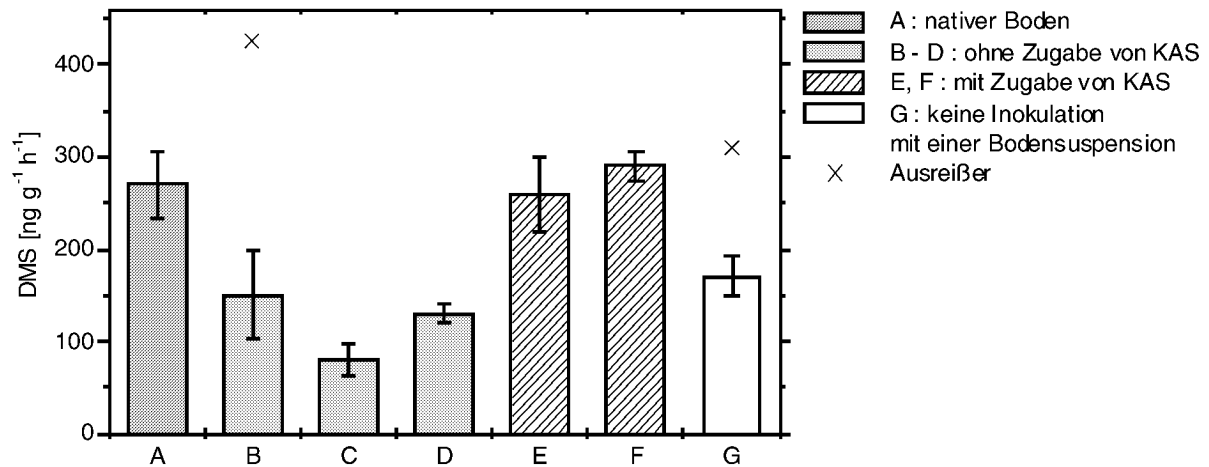


Abbildung 5-10 Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen nach 4-wöchiger Inkubation
 (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen, Ausreißer in Varianten B und G wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt). Zur Beschreibung der Varianten vgl. Tabelle 3-4.

5.4.3 Molekularbiologische Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE

Beim Vergleich der Bandenmuster von PCR-Produkten der 16S rDNA im Boden der Mikrokosmen nach 4 Wochen zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung innerhalb der Parallelen aber auch zwischen den verschiedenen Varianten (Abbildung 5-11). Lediglich die Spuren der Variante B mit geblühtem Boden und Maisstroh ohne weitere Nährstoffversorgung unterschieden sich von den übrigen Varianten. Dabei sollte beachtet werden, dass bei dieser Variante versehentlich der anfängliche Wassergehalt bei 80 % der maximalen Wasserhaltekapazität lag. So waren vor allem bei einer Laufstrecke von 10-35 mm zusätzliche Banden zu erkennen. Es war hier also eine höhere mikrobielle Diversität zu verzeichnen.

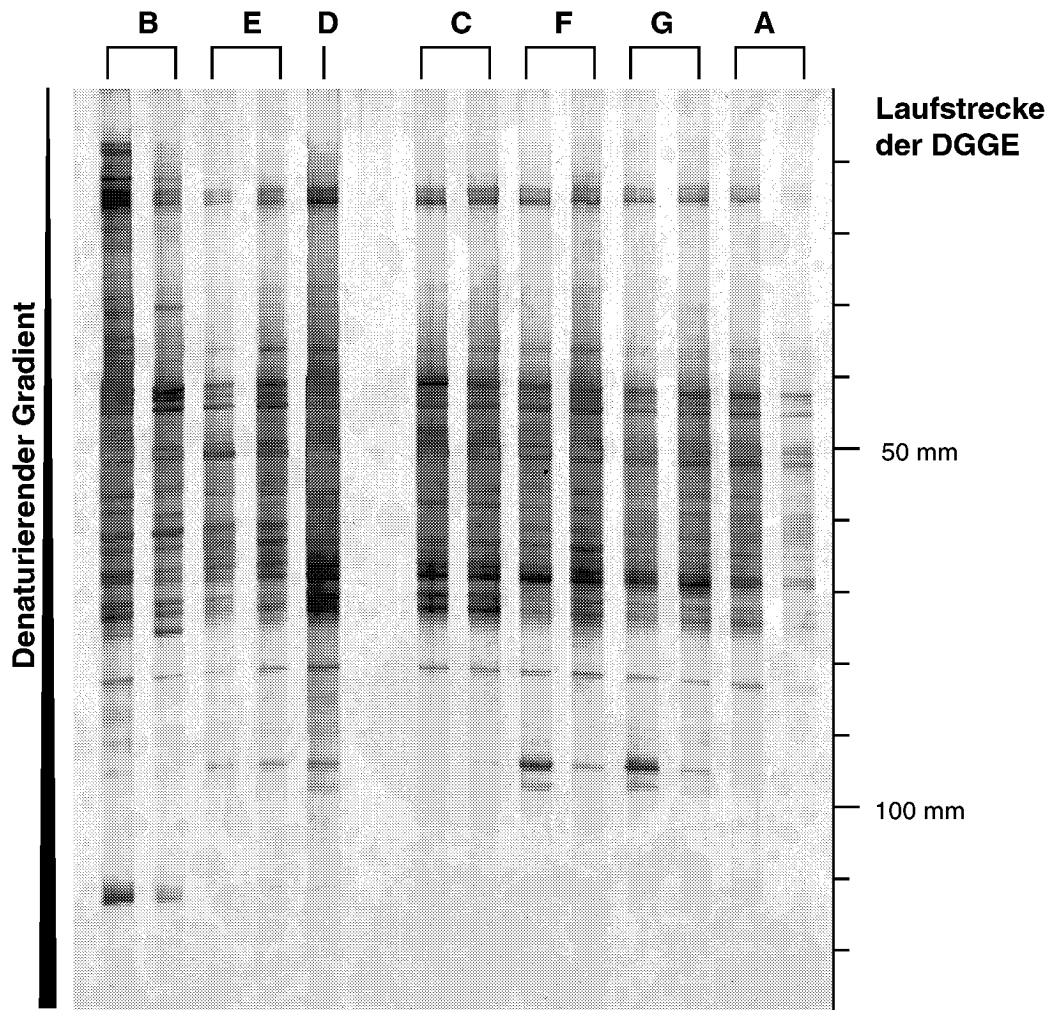


Abbildung 5-11 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA komplexer mikrobieller Gemeinschaften in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit geglühtem Boden und verschiedener Nährstoffversorgung 6 Wochen nach Versuchsbeginn (jeweils 2 Parallel-Aufarbeitungen gezeigt; A: getrockneter Boden + H₂O; B: H₂O; C: Bodenlösung; D: SSE; E: H₂O + KAS; F: Bodenlösung + KAS; G: Bodenlösung + KAS (ohne Bodenorganismen); zur genauen Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.

5.4.4 C/N-Verhältnisse im Boden

Bei der Untersuchung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte im Boden durch das Zentral-labor für Chemische Analysen des Forschungszentrum Jülich wurde in der nativen Parabraunerde ein C/N-Verhältnis von 7,2:1 bestimmt (Tabelle 5-4 und Abbildung 5-12 A). Dieser Wert liegt deutlich unter dem im Institut für Bodenkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ermittelten Verhältnis von 11,4:1 (vgl. Abschnitt 3.2.1). Insgesamt wurden im Forschungszentrum höhere Werte für den Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt des Bodens ermittelt als an der Universität Bonn (vgl. Tabelle 5-4 und Tabelle 3-3). Der Gehalt an Kohlenstoff im geglühten Boden war - wie zu erwarten - sehr gering. Gleichzeitig wurde aber auch der Stickstoffgehalt durch die Hitze-Behandlung stark reduziert (Faktor 10). Im inaktiven und im ^{14}C -markiertem Maisstroh wurden nur geringe Unterschiede bezüglich des Kohlenstoffgehaltes festgestellt. Allerdings zeichnete sich das radioaktiv markierte Strohmaterial durch einen wesentlich höheren Stickstoffgehalt aus, was sich auch in den verschiedenen C/N-Verhältnissen ausdrückt (33,9:1 im inaktiven Maisstroh und 19,2:1 im ^{14}C -markierten).

Tabelle 5-4 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte in den Ausgangsmaterialien für die Maisstrohrotte-Mikrokosmen (Mittelwerte aus 3 Parallelen).

	Kohlenstoff		Stickstoff		C/N- Verhältnis
	Mittelwert	Streuung	Mittelwert	Streuung	
	in Gew.-%		in Gew.-%		
Geglühter Boden	0,016	0,004	0,015	0,010	1,1 : 1
Native Parabraunerde	1,05	0,03	0,15	0,01	7,2 : 1
Maisstroh, inaktiv	40,76	0,11	1,20	0,04	33,9 : 1
¹⁴ C-markiertes Maisstroh	37,60	0,06	1,96	0,02	19,2 : 1

Die C/N-Verhältnisse in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung unterschieden sich nach einer Inkubation von 6 Wochen nicht wesentlich voneinander. Sie lagen durchschnittlich zwischen 9:1 und 12:1 (Abbildung 5-12). Ein mit Microcal™ Origin® 6.0 durchgeführter Ein-Wege-ANOVA-Test konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten feststellen ($F = 0,90609$, $p = 0,51385$). Es wird nach 6-wöchiger Inkubation also nicht das Verhältnis in einer nativen Parabraunerde

erreicht. Allerdings liegen die Werte deutlich unterhalb des eingesetzten Maisstrohs (vgl. Tabelle 5-4).

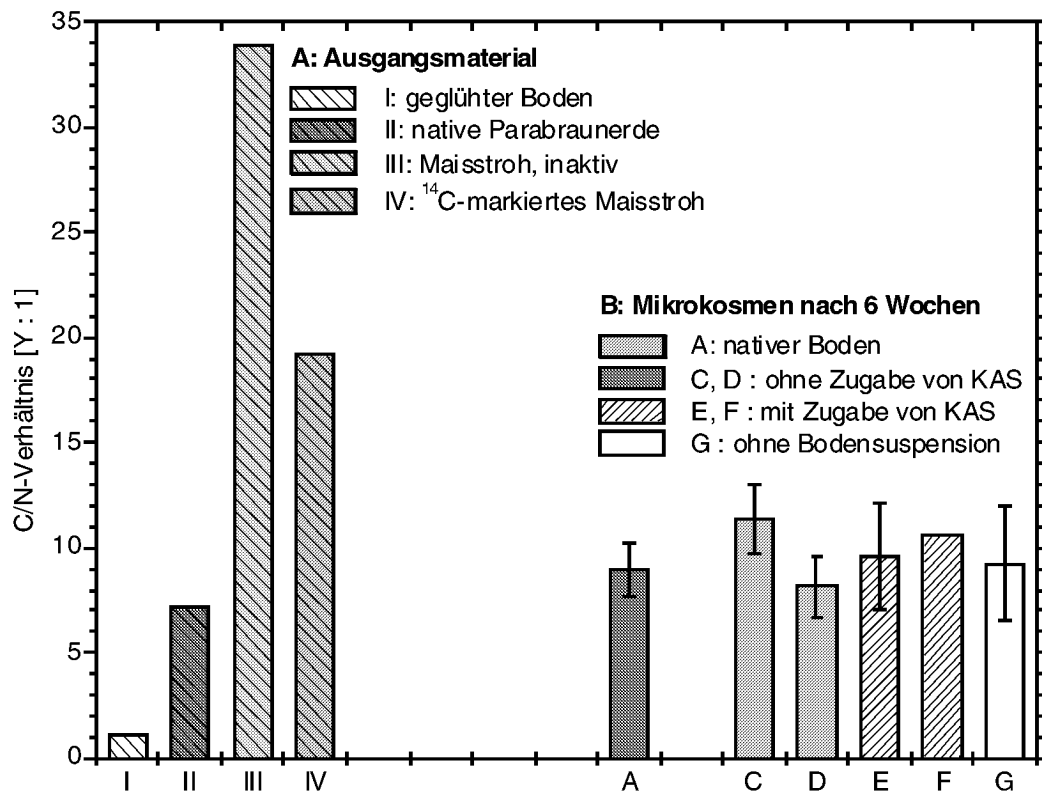


Abbildung 5-12 C/N-Verhältnisse im Ausgangsmaterial (A) und in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit verschiedener Mineralstoffversorgung nach 6-wöchiger Inkubation (B; von Variante B (ohne Zugabe von Mineralstoffen) konnte das C/N-Verhältnis aufgrund mangelnden Probenmaterials nicht analysiert werden; zur Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4).

5.5 Umsatz von Maisstroh durch definierte mikrobielle Gemeinschaften

In diesem Versuchsteil wurden Mikrokosmen (geglühter Boden) mit 10 verschiedenen definierten mikrobiellen Gemeinschaften angeimpft (vgl. Kapitel 3.5). Die mikrobiellen Gemeinschaften setzten sich aus den prozessrelevanten Bodenisolaten (Bakterien und Pilze) zusammen. Der Abbau von Maisstroh durch die definierten Gemeinschaften innerhalb von 6 Wochen und die Bildung von Huminstoffen in dieser Zeit wurde mit den Umsätzen in Mikrokosmen mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden, verglichen. Durch den Vergleich von Mikrokosmen mit einer hohen Diversität und solchen mit geringer, die sich ausschließlich aus kultivierbaren Spezies zusammensetzt, sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der mikrobiellen Diversität für den Umsatz von Ernterückständen sowie die Rolle der bislang nicht kultivierten Organismen gezogen werden.

5.5.1 Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh durch definierte und durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften

In den Mikrokosmen, die mit einer Bodensuspension beimpft wurden, wurde innerhalb einer Woche ca. 23 % des eingesetzten Radiokohlenstoffs mineralisiert (Variante k, siehe Abbildung 5-13). Annähernd gleich hohe Werte (21-22 % der applizierten Radioaktivität) wurden auch durch 3 definierte Gemeinschaften erzielt (Varianten 4, 7 und 9, vgl. Kapitel 3.5). Durch die übrigen mikrobiellen Gemeinschaften wurde vom ^{14}C -markierten Maisstroh in der ersten Woche nur zu 11 – 19 % als CO_2 freigesetzt. Bis zur 6. Woche waren in allen Varianten durchschnittlich 14 bis 41 % des eingesetzten Radiokohlenstoffs mineralisiert, wobei der Umsatz in den Mikrokosmen, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden, am stärksten war. Annähernd gleich hohe Werte wie in den Mikrokosmen mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft wurden auch durch die definierten Gemeinschaften der Varianten 6 und 7 erreicht (34 bzw. 35 % der applizierten Radioaktivität). Die beiden Varianten mit dem niedrigsten Umsatz von Maisstroh (Variante 1: 14 % des applizierten Radiokohlenstoffs und Variante 2: 17 %) zeichneten sich dadurch aus, dass die Mineralisierung fast ausschließlich (zu 75 % bzw. 77 %) innerhalb der ersten Woche erfolgte. Dagegen verteilte sich die Mineralisierung in den übrigen Varianten zu 53 – 69 % auf die erste Woche und der Rest auf die folgenden 5 Wochen. Bei Inokulation durch die komplexe mikrobielle Gemeinschaft lag das Verhältnis von Mineralisation in der ersten Woche zur Mineralisation in der 2. bis 6. Woche bei 56:44.

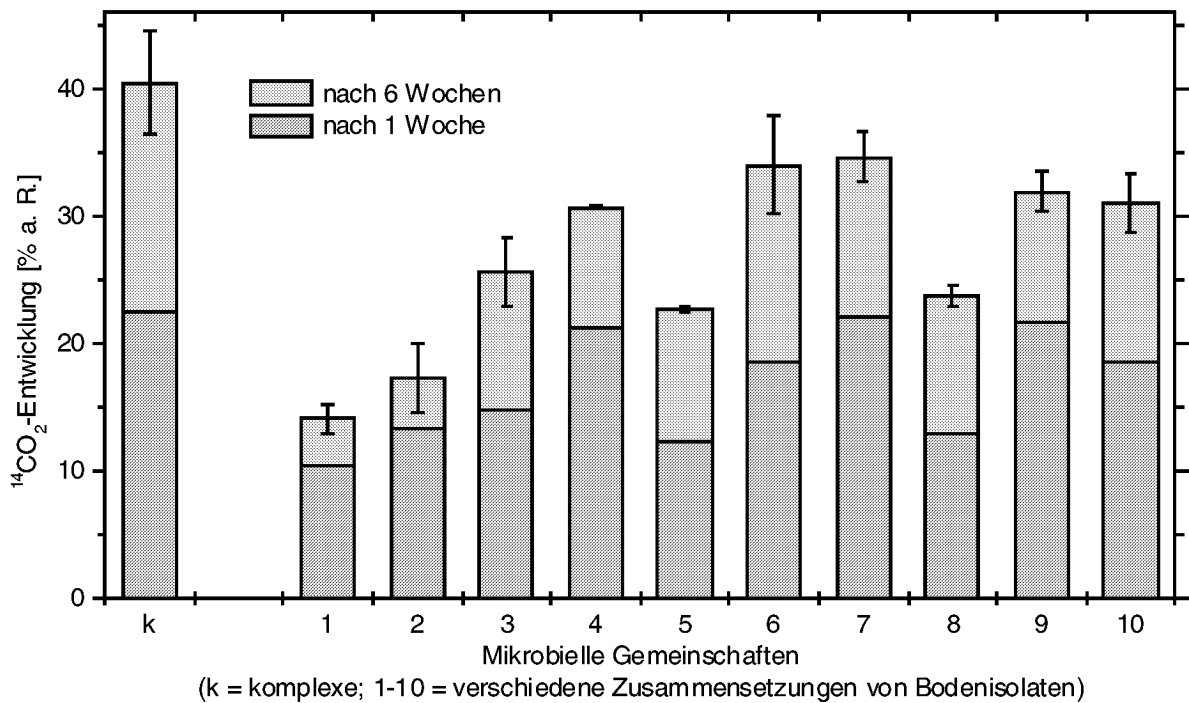


Abbildung 5-13 Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh durch eine komplexe (Bodenlösung) und 10 verschiedene definierte mikrobielle Gemeinschaften nach 1 und 6 Wochen (in % a. R. = applizierte Radioaktivität).

5.5.2 Ergosterolgehalte im Boden

In diesem Experiment mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften wurde nach 6 Wochen der Gehalt an Ergosterol im Boden der Mikrokosmen bestimmt (vgl. Abschnitt 4.1.4). Hohe Gehalte von $8,8 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden (Trockensubstanz) wurden in den Mikrokosmen, die mit einer Bodensuspension angeimpft wurden, festgestellt (Abbildung 5-14). In zwei Varianten der Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften wurde dieser Gehalt nach 6-wöchiger Inkubation sogar noch übertroffen (Variante 4 mit $9,5 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden und Variante 8 mit $9,0 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden). In den Varianten 1 und 2, in denen die geringste Mineralisation von ^{14}C -markiertem Maisstroh gemessen wurde (vgl. Abbildung 5-13), konnte kein Ergosterol festgestellt werden. Allerdings lässt sich keine generelle Abhängigkeit der Mineralisation vom Ergosterolgehalt in den Mikrokosmen ableiten. Dieses wird an den beiden Varianten mit dem stärksten Maisstrohumsatz deutlich (Varianten 6 und 7). Diese zeichnen sich gleichzeitig durch relativ niedrige Ergosterolgehalte von $0,9 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden bzw. $3,2 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden aus.

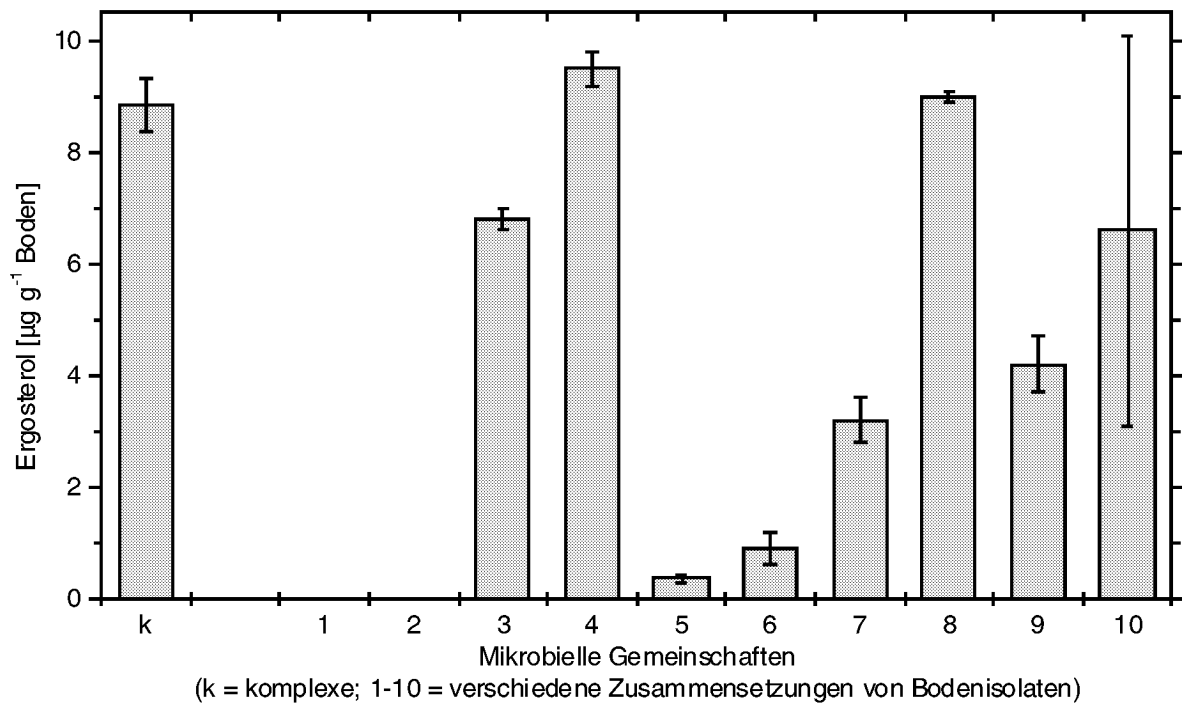


Abbildung 5-14 Ergosterolgehalte im Boden der Mikrokosmen mit komplexen (k) bzw. mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften (1 – 10) nach 6 Wochen Inkubation.

5.5.3 Molekularbiologische Aufarbeitung der definierten Bakterien-Gemeinschaften

Aus dem Boden der Mikrokosmen wurde die Gesamt-DNA nach ein- und nach 6-wöchiger Inkubation– wie in Kapitel 4.2 beschrieben – extrahiert und Sequenzen der bakteriellen 16S rDNA amplifiziert. Diese wurden auf einem denaturierenden Gel (40-60 % denaturierenden Gradient, 60 °C, 16 h) aufgetrennt. Nach der Silberfärbung konnte von fast allen Reinkulturen jeweils eine Bande mit dem PCR-Produkt eines Teiles der 16S rDNA sichtbar gemacht werden (Abbildung 5-15 bis Abbildung 5-24). 28 dieser artspezifischen Banden (von 75 verschiedenen eingesetzten Isolaten) konnten eindeutig einem entsprechenden Signal in den Ansätzen mit den mikrobiellen Gemeinschaften nach 1 oder 6 Wochen Inkubation zugeordnet werden. Allerdings zeigten die Banden der PCR-Produkte einiger Isolate teilweise übereinstimmendes Laufverhalten innerhalb eines Ansatzes, so dass keine direkte Zuordnung möglich war. PCR-Produkte von 62 Isolaten wurden in den Bandenmustern der PCR-Produkte von Bodenproben nach einer Inkubation von 1 oder 6 Wochen wiedergefunden. Davon konnten 34 nicht eindeutig im Bandenmuster der PCR-Produkte der Boden-DNA zugeordnet werden, da die amplifizierten DNA-Abschnitte mehrerer Isolate eines Ansatzes ein gleiches Laufverhalten im DGGE-Gel zeigten. DNA-Banden von 12 der eingesetzten Isolate konnten in den PCR-Produkten der Boden-DNA wiedergefunden werden. Die silbergefärbten und mit Durchlicht eingescannten Gele (vgl. Abschnitt 4.2.5) sind im Folgenden dargestellt und

erläutert Die Gelelektrophorese erfolgte in den gezeigten Gelen bei einem denaturierenden Gradienten von 40-60 % und einer Spannung von 60 V für 16 h. Die eingesetzten Isolate sind in Anhang C beschrieben. Im eingescannten Bild schlecht erkennbare oder zweifelhafte Banden sind durch einen Pfeil ✓ kenntlich gemacht.

In den Spuren der mikrobiellen Gemeinschaften in **Ansatz 1** nach 6 Wochen sind 4 Banden zu erkennen (bei 72,5 mm, 78,5 mm, 89,5 mm und 95,5 mm Laufstrecke, Abbildung 5-15). Dazu kommt in der Spur mit der 1 Wochen alten Gemeinschaft eine sehr dünne Bande bei 75 mm. Diesen Banden lassen sich 3 Isolate eindeutig zuordnen: *BEA k₆K* (72,5 mm), *R2A III A* (78,5 mm) und *BEA I C₂* (89,5 mm). Die Bande bei 95,5 mm Laufstrecke repräsentiert möglicherweise das Isolat *BEA VI B*. Dieses zeichnet sich in der Einzelauftragung durch 3 dicht aufeinanderfolgende Banden aus (94 mm, 95,5 mm und 98 mm), wobei die deutlichste bei 94 mm liegt. Die Bande bei 75 mm (1 Woche alte mikrobielle Gemeinschaft) fällt zusammen mit dem PCR-Produkt zweier eingesetzter Isolate: *R2A IV G* und *BEA I B* und kann somit nicht eindeutig bestimmt werden. Die übrigen in Ansatz 1 eingesetzten Reinkulturen kommen offensichtlich nach 1 und nach 6 Wochen in den Bodenproben nicht mehr in einer mit dieser Methode detektierbaren Anzahl vor.

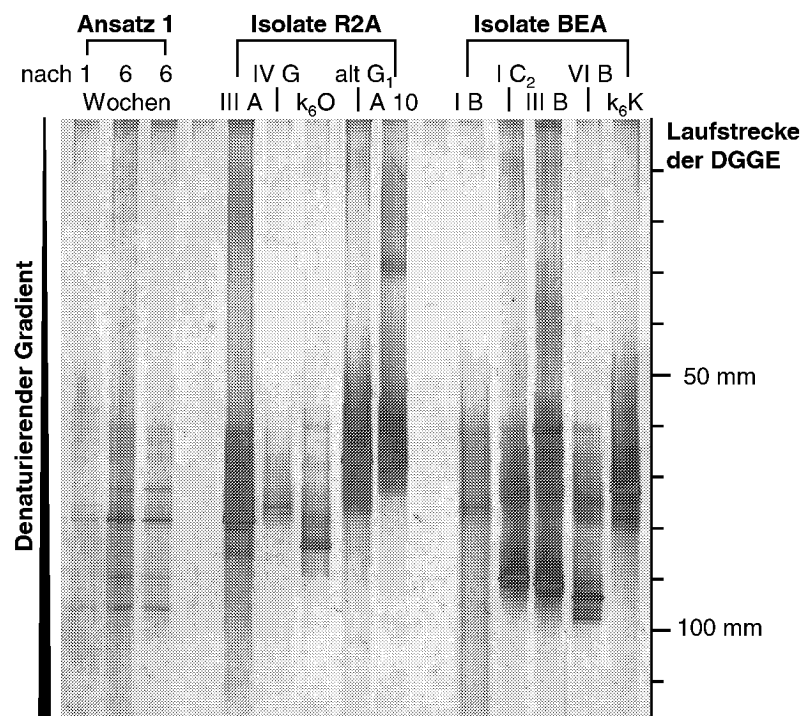


Abbildung 5-15 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 1 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Im DGGE-Gel der PCR-Produkte der 16S rDNA der 6 Wochen alten mikrobiellen Gemeinschaften aus **Ansatz 2** zeigten sich bis zu 6 Banden: eine bei 74 mm, zwei direkt aufeinanderfolgende bei 79 und 80 mm, jeweils eine bei 91 mm und 95,5 mm und eine schwächere in einer der beiden 6 Wochen alten Gemeinschaften bei 97 mm Laufstrecke (Abbildung 5-16). Diese Banden entsprechen im Laufverhalten den Isolaten *R2A V D* (79/80 mm), *BEA III B* (95,5 mm) und *R2A I G₂* (97 mm), wobei letztere Bande nur in einer der mikrobiellen Gemeinschaften nach 6 Wochen vorkam. Die übrigen zwei Banden zeigen ein übereinstimmendes Laufverhalten mit jeweils drei verschiedenen Isolaten. Lediglich *BEA IV E* mit einer Bande bei 116 mm ist nach 1 und nach 6 Wochen mit Sicherheit nicht mehr in den mikrobiellen Gemeinschaften vertreten. *BEA VI B* zeigte darüber hinaus in diesem Gel ein abweichendes Laufverhalten im Vergleich zu Ansatz 1 (vgl. Abbildung 5-15).

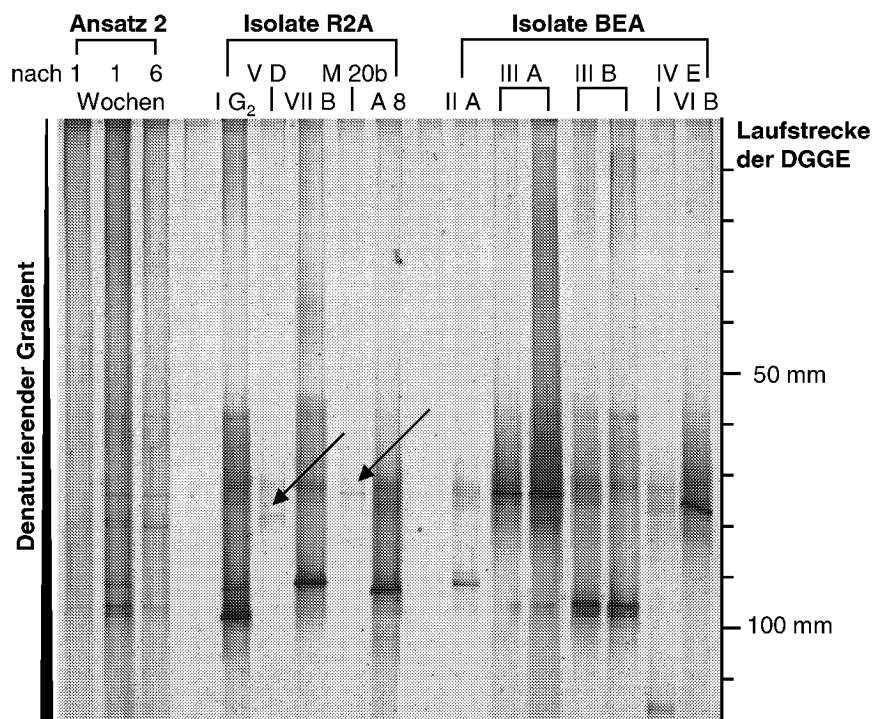


Abbildung 5-16 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 2** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

In dem Gel aus **Ansatz 3** lassen sich keine direkte Rückschlüsse auf das Vorkommen einzelner Isolate in den mikrobiellen Gemeinschaften ziehen. Das Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften zeichnet sich durch bis zu 4 Banden aus (82 mm, 86 mm, 99 mm und 103 mm Laufstrecken, Abbildung 5-17), wobei die erst- und die letztgenannten relativ schwach sind. Beim Vergleich mit den Bandenmustern der Reinkulturen finden sich immer mehrere Übereinstimmungen, so dass fast alle der eingesetzten Isolate an der Gemeinschaft beteiligt sein könnten. Nur die Isolate *R2A k₅F* und *BEA IV J₂* scheinen nicht vorzukommen.

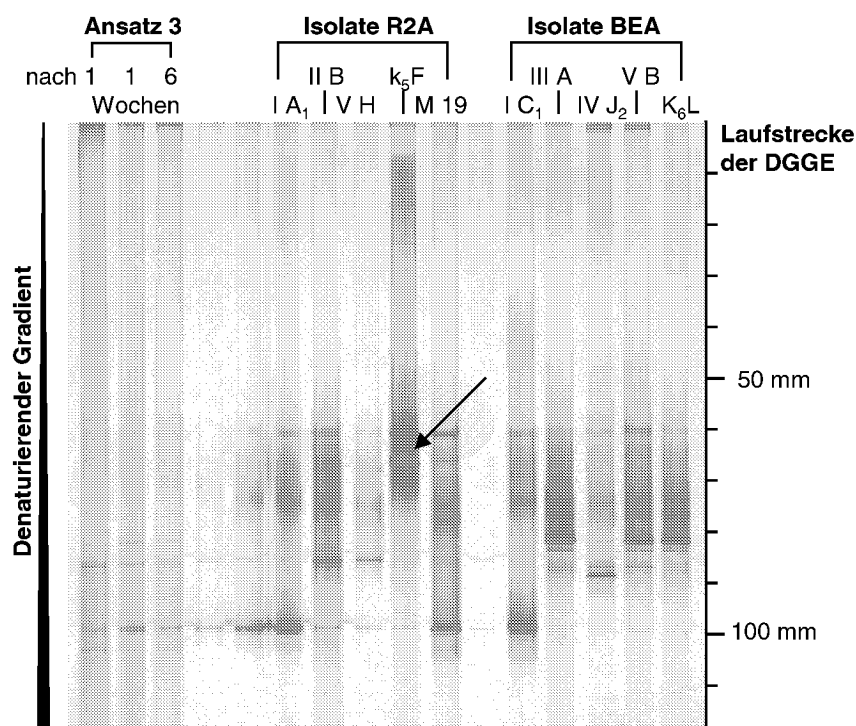


Abbildung 5-17 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 3** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Die mikrobielle Gemeinschaft in **Ansatz 4** ist durch eine einzelne Bande bei 80 mm Laufweite charakterisiert. Demgegenüber stehen Banden verschiedener Reinkulturen, die das gleiche Laufverhalten aufweisen: *R2A III B*, *R2A VII D*, *BEA V C*, *BEA V D* und *BEA VI C*. Die übrigen Isolate scheinen in dieser mikrobiellen Gemeinschaft keine Rolle zu spielen.

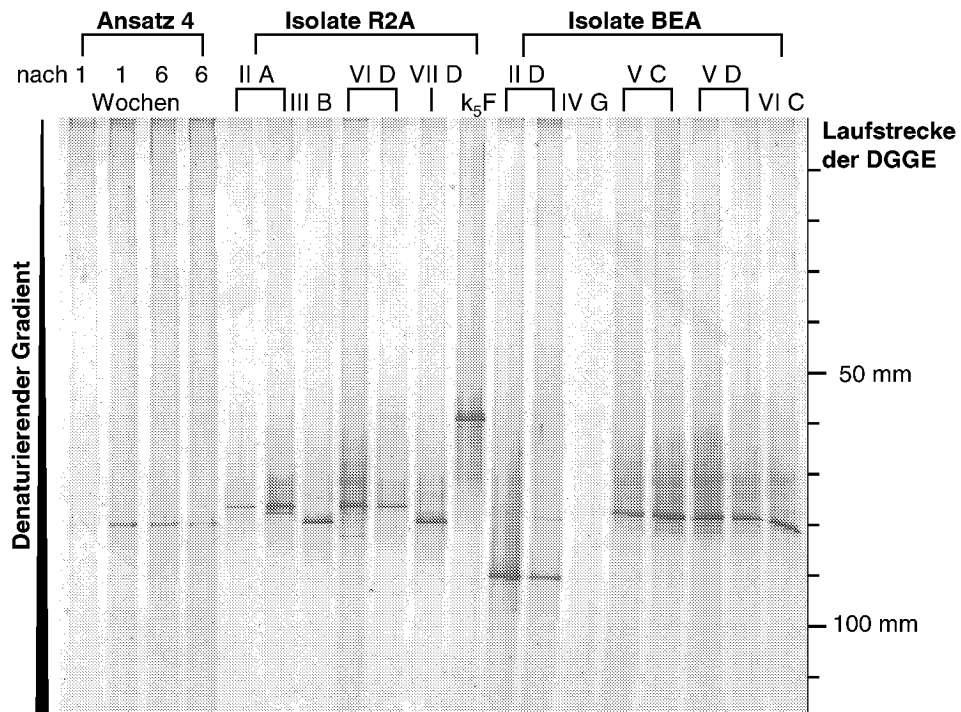


Abbildung 5-18 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 4** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Das Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften aus **Ansatz 5** zeichnet sich durch 3 besonders deutlich sichtbare Banden aus, die jeweils einem Isolat zugeordnet werden können (Abbildung 5-19): *R2A k₆L* (62 mm), *BEA IV B* (70 mm) und *BEA I A* (73 mm). Die Bande bei 73 mm Laufweite im Bandenmuster der Boden-DNA könnte zwar auch durch das Isolat *BEA III B* hervorgerufen sein, dessen Bande nur wenig weiter gelaufen ist (74 mm). Allerdings treten bei diesem Isolat – wie schon im Gel zu Ansatz 1 (vgl. Abbildung 5-15) – mehrere Banden auf, die in der mikrobiellen Gemeinschaft nicht nachvollzogen werden können. Eine weitere eindeutige Zuordnung zu einer Reinkultur (*BEA II E*) könnte bei 81,5 mm gezogen werden. Allerdings ist das Signal im Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaft vergleichsweise schwach. Weitere Zuordnungen sind nicht möglich, obwohl noch weitere relativ schwache Banden sichtbar sind.

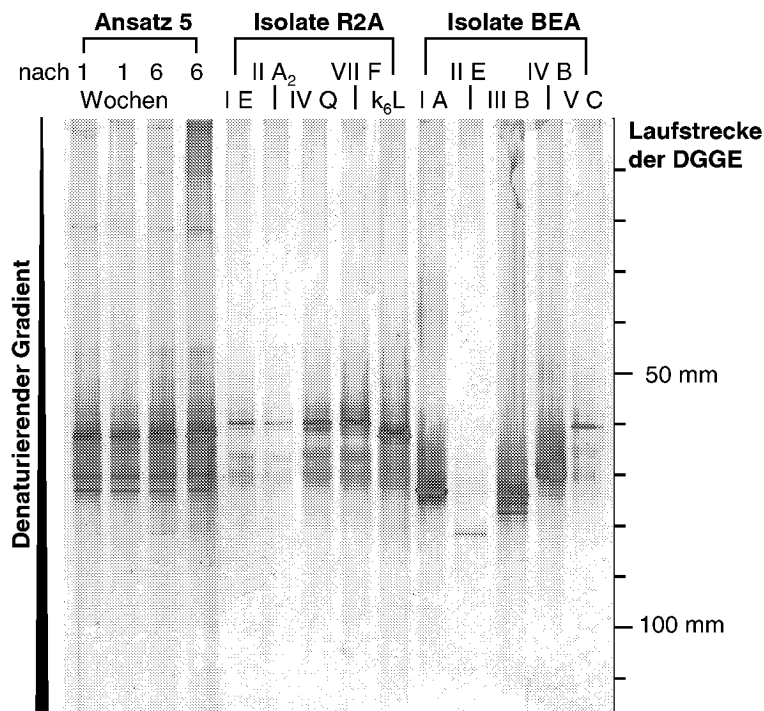


Abbildung 5-19 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 5 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Im Bandenmuster des PCR-Produktes der Boden-DNA aus **Ansatz 6** sind fünf Banden in der mikrobiellen Gemeinschaft zu erkennen (Abbildung 5-20). Die nach einer Woche Inkubation gewonnene Probe zeichnet sich durch eine besonders deutliche Bande nach 82,5 mm aus, die keinem der eingesetzten Isolate zugeordnet werden kann. Bei 76 mm Laufstrecke finden sich übereinstimmende Banden von *R2A k₆N*, *BEA III A* und *BEA V B*. Besser zuordnen läßt sich die Bande bei 81 mm (*BEA VI D*), die sehr schwache Bande bei 97 mm (*BEA II C*) und die Bande bei 102,5 mm (*BEA IV F*). Die Signale der übrigen Reinkulturen sind im Bandenmuster der PCR-Produkte der Boden-DNA nicht oder nur sehr undeutlich zu erkennen.

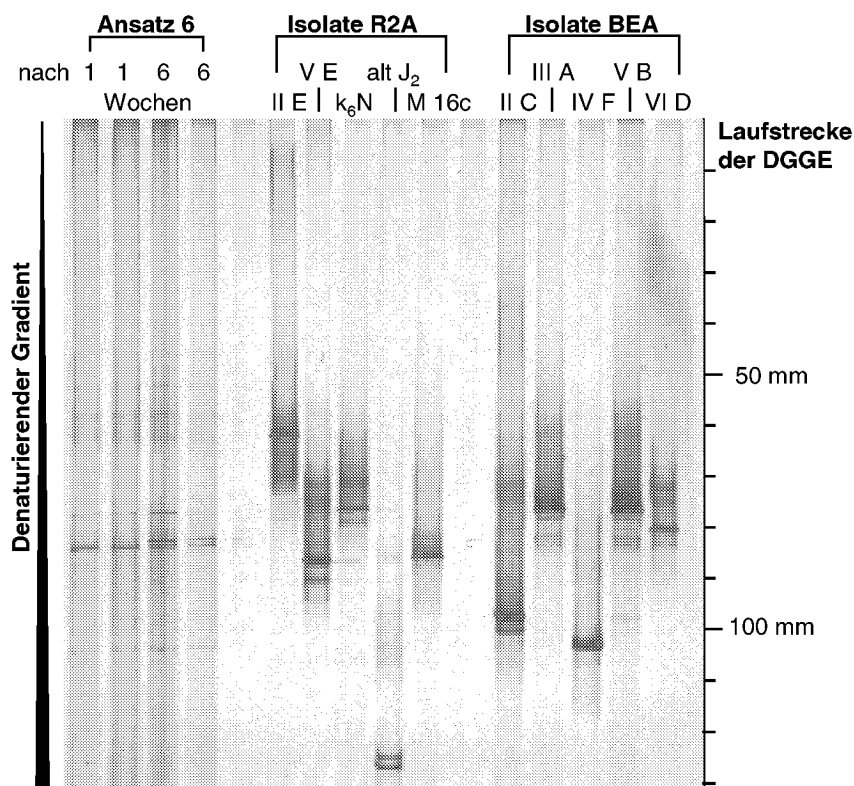


Abbildung 5-20 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 6** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Im Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften aus **Ansatz 7** treten Banden bei einer Laufstrecke von 67 mm, 78 mm, 91 mm, 93 mm, 97 mm und 124 mm auf (Abbildung 5-21). Bei 3 dieser Banden können direkte und eindeutige Zuordnungen gemacht werden: *R2A A 11* (67 mm), *R2A k₆N* (78 mm) und *R2A alt T* (124 mm). Dagegen ist die Zuordnung der Banden bei 91 mm (*R2A I C* oder *BEA k₄B*) und 97 mm (*BEA I F* oder *BEA II D*) schwierig. Die Bande bei 93 mm Laufstrecke kann keiner Reinkultur zugeordnet werden.

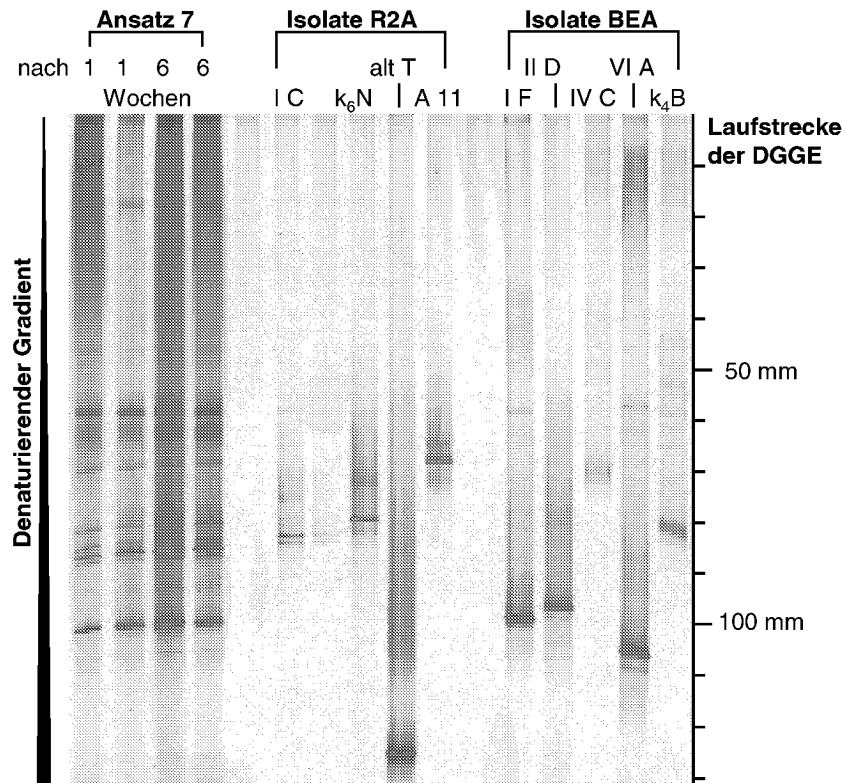


Abbildung 5-21 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 7** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Die mikrobiellen Gemeinschaften aus **Ansatz 8** haben im DGGE-Gel eine dominante Bande bei einer Laufstrecke von 90 mm (Abbildung 5-22). Ein gleiches Laufverhalten zeigt auch das PCR-Produkt von *R2A IV M*. Darüber hinaus gibt es noch mehrere schwächere Banden, die einzelnen Isolaten zugeordnet werden können: bei 71 mm (*R2A II D*), 83,5 mm (*R2A VI D*), 86 mm (*R2A VI D* oder *BEA V C*) und 89 mm (*BEA IV D*) 113 mm.

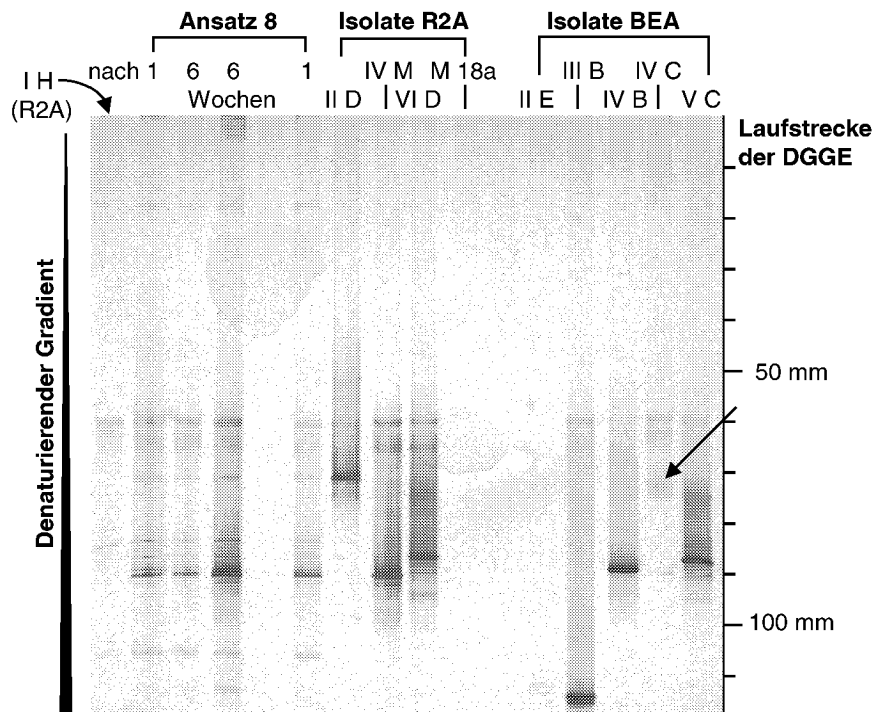


Abbildung 5-22 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 8 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

In den Bandenmustern zu **Ansatz 9** sind bis zu 5 deutliche Banden zu erkennen (Abbildung 5-23). Bei einer Laufstrecke von 73 mm findet sich eine Übereinstimmung mit dem Isolat *BEA III A*. Bei 76 mm ist eine Unterscheidung zwischen *R2A II F* und *R2A VII G* nicht möglich. Bei 75,5 und 77 mm sind zwei Banden zu erkennen, die durch die Isolate *R2A III C* und *BEA IV C* hervorgerufen sein könnten. Allerdings unterscheiden sich die Laufweiten der Reinkulturen um ca. 1 mm, so dass diese Zuordnung unsicher ist. Ebenfalls unsicher ist die Zuordnung der Bande der mikrobiellen Gemeinschaften bei 92 mm zu Isolat *BEA I G*.

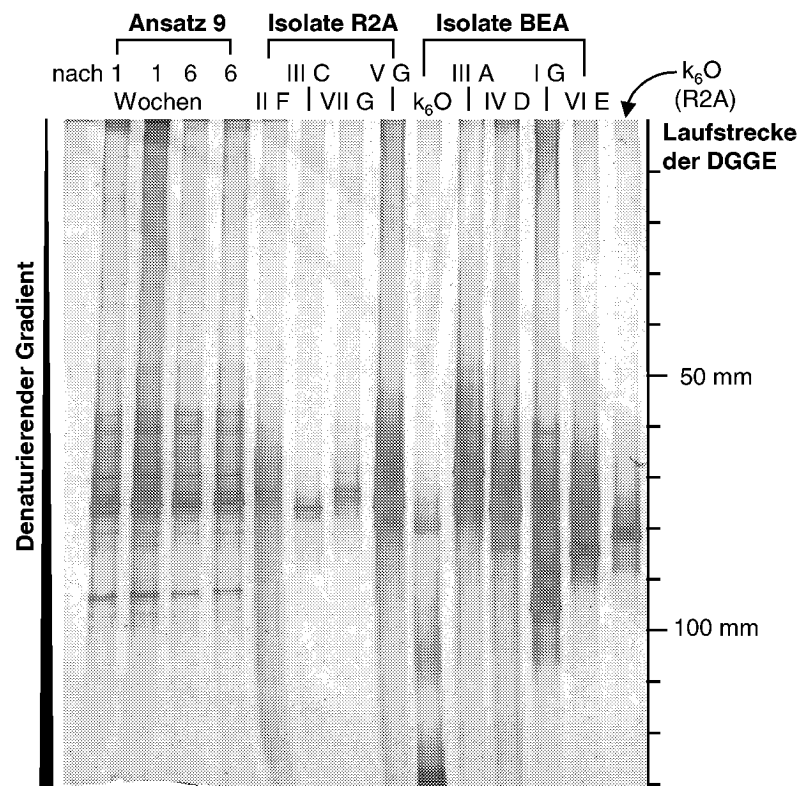


Abbildung 5-23 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in **Ansatz 9** eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

Eine gute Zuordnung von PCR-Produkten der in **Ansatz 10** eingesetzten Isolate zum Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften ist in 4 Fällen gegeben. Bei einer Laufstrecke von 77 mm ist eine eindeutige Übereinstimmung mit *BEA VI B* gegeben. Bei 79 mm liegen die PCR-Produkte von *R2A IV O* und *BEA V D*, welches auch schon in Ansatz 4 möglicherweise an der mikrobiellen Gemeinschaft beteiligt war (vgl. Abbildung 5-18). Bei 82 mm, wo die stärkste Bande aus Ansatz 10 liegt, findet sich eine Übereinstimmung mit *R2A k₆L* und bei 96 mm mit *BEA II C*. Eine sehr schwache Bande ist dann noch bei einer Laufstrecke von 129 mm zu finden, die mit dem PCR-Produkt von *BEA k₆O* zusammenfällt.

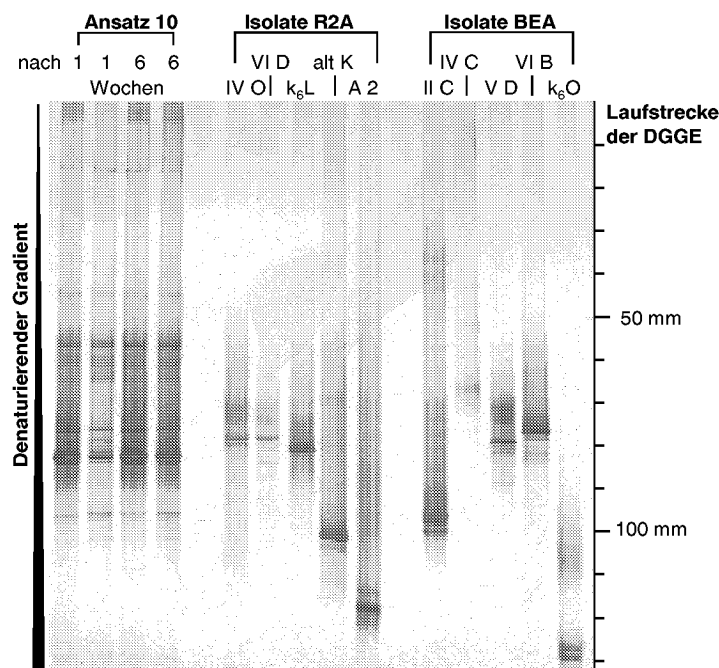


Abbildung 5-24 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der in Ansatz 10 eingesetzten mikrobiellen Gemeinschaft nach 1 und 6 Wochen Inkubation, sowie der entsprechenden Reinkulturen (eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die eingesetzten Isolate ist in Kapitel 3.5 und Anhang C gegeben).

5.5.4 Analyse von Huminsäuren mittels ^{13}C -flüssig-NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie

5.5.4.1 Vergleich von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh und aus einer nativen Parabraunerde

Die in Abbildung 5-25 gezeigten ^{13}C -Flüssig-NMR-Spektren (vgl. Abschnitt 4.4.2) sind stellvertretend für das Ausgangs- und Endprodukt der beschriebenen Humifizierungsprozesse. Spektrum A zeigt einen Huminsäuren-Extrakt (vgl. Abschnitt 4.4.1) von Maisstroh, welches in geglühten Boden eingebracht und - wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben - befeuchtet und inokuliert wurde. Die Signale sind also nicht beeinflusst durch die Kohlenstoff-Matrix eines nativen Bodens. Dagegen zeigt Spektrum B einen Huminsäuren-Extrakt einer nativen Parabraunerde aus Merzenhausen (PB-MER). Beim Vergleich der Spektren sollte beachtet werden, dass Spektrum A mit 200 000 Scans, während Spektrum B lediglich mit 70 000 Scans gemessen wurde. Diese Unterschiede sind Folge der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Messzeit am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrum Jülich und hatte bei der geringeren Anzahl an Scans eine stärkere Hintergrundschwankung zur Folge.

Das Spektrum des Extraktes aus Maisstroh zeichnet sich vor allem durch dominante Peaks bei einer chemischen Verschiebung von 50 – 110 ppm aus. Dagegen verliert dieser Bereich bei dem Huminsäuren-Extrakt aus einer nativen Parabraunerde an Bedeutung. Die Signale im Bereich der Kohlenhydrate und Polyalkohole sind zwar weiterhin vorhanden, allerdings nimmt ihre Zahl und Intensität ab und spielt nicht mehr die dominante Rolle wie im Spektrum des Maisstroh-Extraktes. Dafür sind zusätzliche hohe Peaks bei einer chemischen Verschiebung von 20 – 45 ppm und bei 175 ppm zu beobachten. Darüber hinaus gewinnt ein im Maisstroh sehr viel schwächerer Peak bei $\delta = 130$ ppm an Bedeutung.

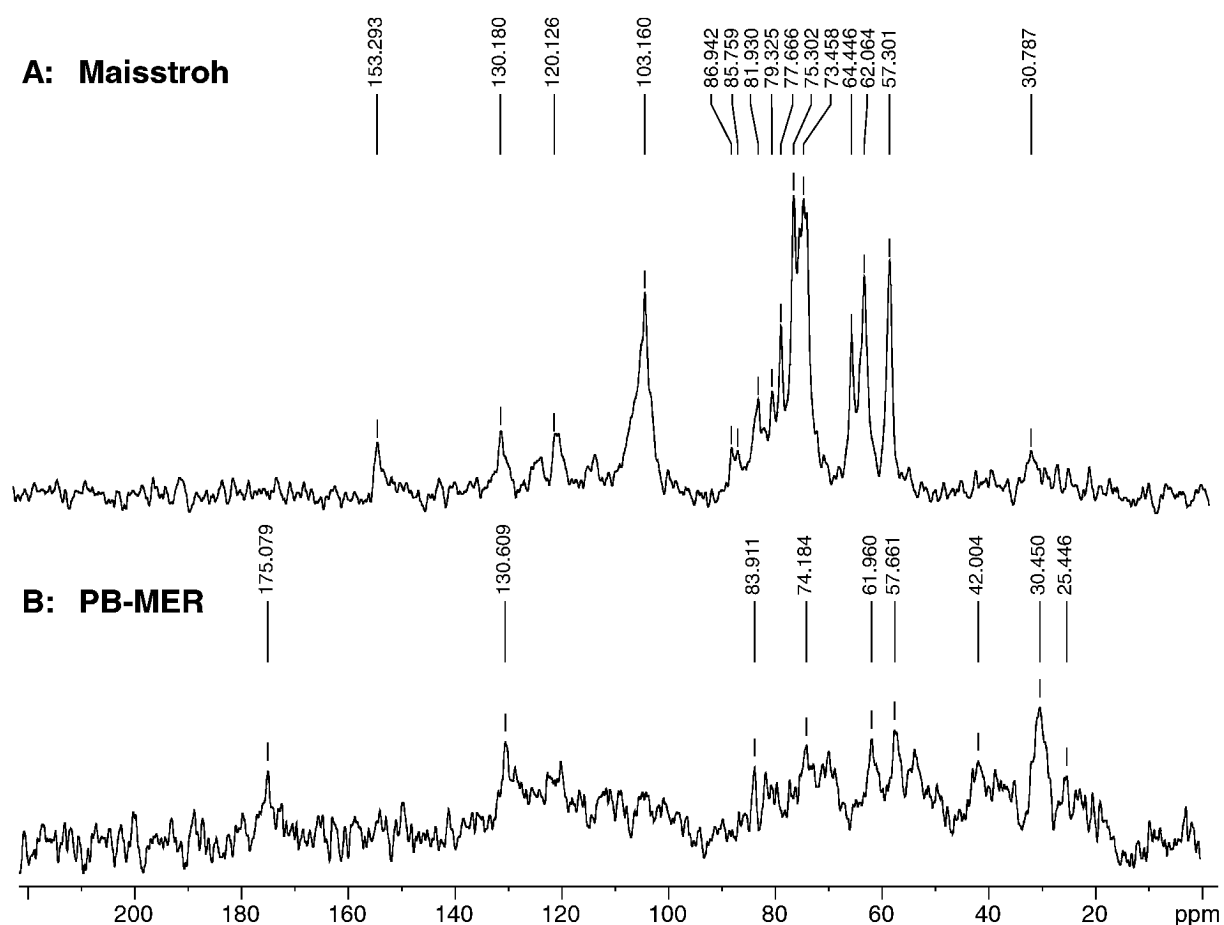


Abbildung 5-25 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh in geglühtem Boden vor der Inkubation (A, 200 000 Scans) und aus einer Typischen Parabraunerde (B, 70 000 Scans).

Die gelpermeationschromatographische Auftrennung ergab Retentionszeiten der Peakmittelpunkte nach 14,02 min für den Huminsäuren-Extrakt aus Maisstroh und nach 13,75 min für die nativen Huminsäuren aus einer Typischen Parabraunerde. Diese Retentionszeiten lassen sich durch Einsatz in die Kalibrationsgleichung in Abbildung 4-3 umwandeln in die am häufigsten vertretene Molekülmasse dieser Extrakte. Diese betrug demnach im Maisstroh-extrakt 2200 Dalton und in dem nativen Huminsäurenextrakt 3300 Dalton. In den Chromatogrammen in Abbildung 5-26 zeigt sich, dass die Extrakte beider Proben zwischen 11,5 min und 17 min eluierten, wobei aufgrund der Unregelmäßigkeiten in den Randbereichen der Peaks ein reiner Konzentrationseffekt ausgeschlossen werden kann. Daraus ist ersichtlich, dass das Spektrum der Molekülgrößen nicht nur auf einen Bereich von 2-4 kD beschränkt ist, sondern Makromoleküle mit mehr als 45 kD genauso enthält wie kleinere Fragmente von weniger als 200 Dalton Größe.

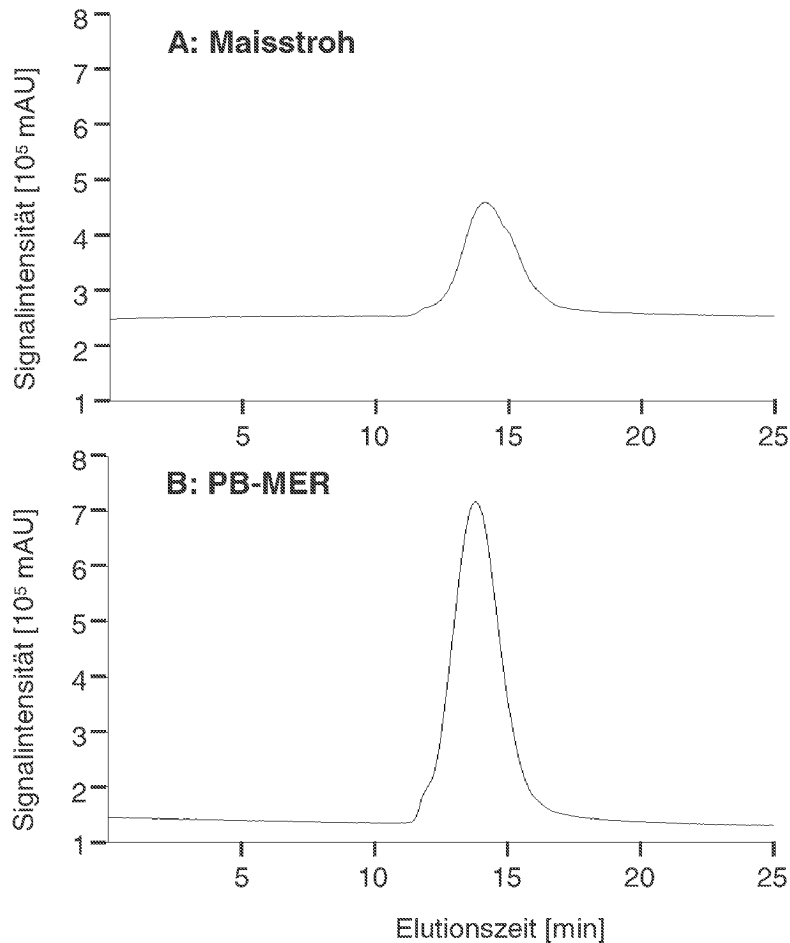


Abbildung 5-26 Chromatogramme der Gelpermeationschromatographie von Huminsäuren-Extrakten aus Maisstroh in geblühtem Boden vor der Inkubation (A) und aus einer Typischen Parabraunerde (B).

5.5.4.2 Huminsäuren-Extrakte nach 6-wöchiger Inkubation von Maisstrohrotten mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften

Zur Analyse der Humifizierung des eingesetzten Strohmaterials wurden von einigen Varianten (k, 1, 2, und 6, vgl. Kapitel 3.5) Huminsäuren extrahiert und mit einem ^{13}C -Flüssigkeits-NMR-Spektrometer vermessen. Dabei zeigten alle Spektren dieses Experimentes bereits nach 6 Wochen typische Charakteristika von nativen Huminsäuren, wobei keine substantiellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten zu erkennen waren (vgl. Abbildung 5-27). In den Huminsäuren-Extrakten war mit Hilfe der Kernmagnetischen-Resonanz-Spektroskopie nach 6 Wochen eine Zunahme von Carboxyl- und Carbonyl-Funktionen zu beobachten (chemische Verschiebung von 160-180 ppm). Gleichzeitig wurde auch der Anteil von Aliphaten in den Extrakten gesteigert (chemische Verschiebung von 25-45 ppm). Dagegen nahmen die für Kohlehydrate typischen C-O -Verbindungen ab (chemische Verschiebung von 60-110 ppm).

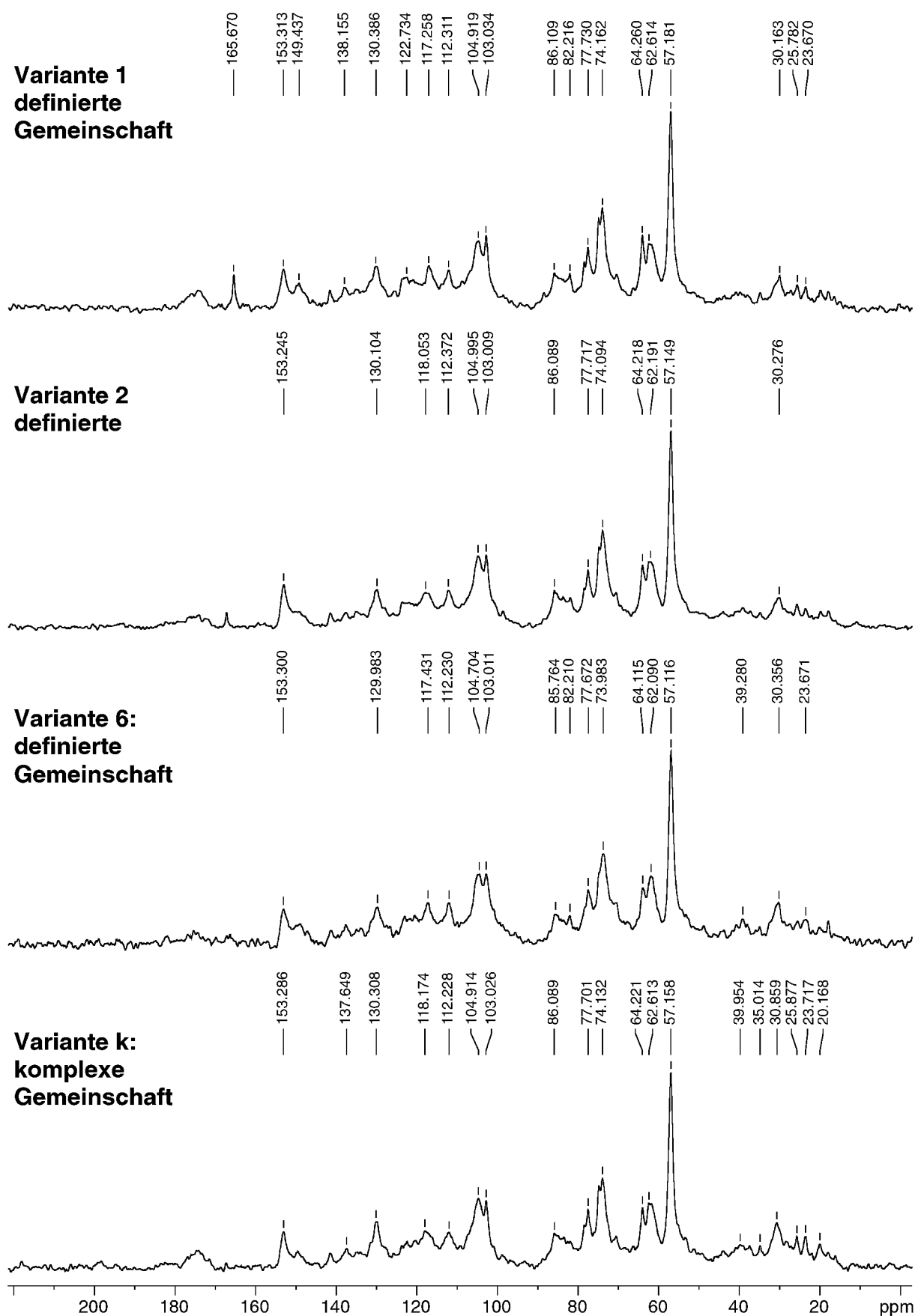


Abbildung 5-27 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrötte in
geglühtem Boden nach 6-wöchiger Inkubation (200 000 Scans).

Während sich also die ^{13}C -NMR-Spektren kaum in Abhängigkeit von der Inokulation (definierte oder komplexe mikrobielle Gemeinschaft) unterschied, führte die Auftrennung der Huminsäurenextrakte mittels Gelpermeationschromatographie zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Elutionszeit der gemessenen Extrakte reichte von 11,5 min bis 17 min und deutete somit auf eine große Bandbreite der Molekülgrößen hin (vgl. Abschnitt 5.5.4.1). Die Huminsäurenextrakte aus den 6 Wochen alten Mikrokosmen, die mit der Bodensuspension beimpft wurden, zeichneten sich durch einen Peakmittelpunkt bei 13,80 min aus. Diese Retentionszeit entsprach nach der Eichgerade in Abbildung 4-3 einer Molekülmasse von 3000 Dalton. Dagegen lagen die Peakmittelpunkte der Huminsäurenextrakte aus den Mikrokosmen nach Inokulation mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften (Varianten 1, 2, 6 und 7) zwischen 13,96 und 14,00 min. Diese Retentionszeiten entsprachen Molekülmassen zwischen 2200 und 2400 Dalton. Eine Veränderung gegenüber dem Ausgangsmaterial konnte also in den Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften nach sechswöchiger Inkubation nicht festgestellt werden. Allerdings sollte beachtet werden, dass der absolute Unterschied in den Retentionszeiten der Varianten mit einer komplexen Gemeinschaft und der mit definierten Gemeinschaften sehr gering war (13,80 min und 13,96-14,00 min). Da die GPC-Untersuchungen jedoch an einem Versuchstag durchgeführt wurden und reproduzierbar waren, sollten diese geringen Unterschiede ausreichen, um einige Hinweise auf die Molekülgrößen liefern zu können.

5.6 Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften

In diesem Experiment wurden Mikrokosmen (geglühter, autoklavierter und nativer Boden) mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften, welche in Form einer Bodensuspension in die sterilisierten Mikrokosmen eingebracht wurden, über 26 Wochen beobachtet (vgl. Kapitel 3.6). Während dieser Zeit wurde die Bodenfeuchte kontrolliert und reguliert (vgl. Abbildung 5-28). Der zeitliche Verlauf der Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh, der DMSO-Reduktase-Raten, der mikrobiellen Biomasse (Bakterien: koloniebildende Einheiten, Pilze: Ergosterolgehalt) und die strukturelle Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaften (über DGGE-Muster) wurden zueinander in Beziehung gesetzt. Gleichzeitig wurden die Humifizierungsprodukte mittels ^{13}C -Flüssig-NMR und Gelpermeationschromatographie charakterisiert.

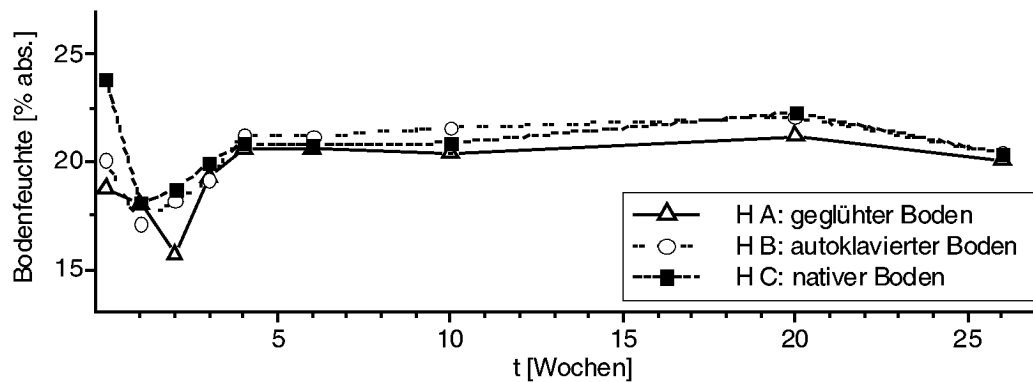


Abbildung 5-28 Verlauf der Bodenfeuchte in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen.

5.6.1 Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften über 26 Wochen

Der stärkste Abbau von ^{14}C -markierten Maisstroh in Bodenmikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (vgl. Kapitel 3.6) erfolgte zu Beginn der Inkubation, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Varianten zu beobachten waren (Abbildung 5-29). Bereits nach einer Woche ist in den Mikrokosmen mit nativem Boden (Variante H C) durchschnittlich 38 % des eingesetzten Radiokohlenstoffes mineralisiert worden. Dagegen lagen die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungen im autoklavierten (Variante H B) und im geglühtem Boden (Variante H A) – beide inokuliert durch eine Bodensuspension – bei jeweils 19 %. Weiterhin hohe Mineralisierungsraten wurden auch in der 2. Inkubationswoche festgestellt. Dieses ändert sich dann ab der 3. Woche, von der an die wöchentlichen Mineralisierungsraten nicht mehr über 3 % des vorhandenen radioaktiv markierten Materials lagen (Tabelle 5-5). Lediglich in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden (H A) wird noch bis zum Ende der 4. Woche ein großer Teil des ^{14}C -Maisstrohs abgebaut. Bis zu diesem Zeitpunkt lag der mineralisierte Anteil dieser Variante bei durchschnittlich 41 % (H A) und der mit autoklaviertem Boden (H B) bei 39 %. Dagegen wurde im nativen Boden (H C) bereits 50 % des ^{14}C -Maisstrohs mineralisiert. Dieser stärkere Abbau in den Mikrokosmen mit nativem Boden von etwa 10 % der applizierten Radioaktivität bleibt bis zum Ende der Versuchsdauer in etwa erhalten. Nach 26 Wochen wurde in dieser Variante (H C) durchschnittlich 62 % des eingesetzten ^{14}C -markierten Maisstrohs durch die komplexen mikrobiellen Gemeinschaften mineralisiert. Wurde der Boden jedoch zunächst autoklaviert und dann mit einer Bodenlösung reinokuliert (H B), oder bestand die Bodenmatrix aus geglühtem Boden, der mit derselben Bodenlösung beimpft wurde (H A), dann wurde in derselben Zeit nur 52 % bzw. 49 % des eingesetzten radioaktiven Materials in $^{14}\text{CO}_2$ umgewandelt.

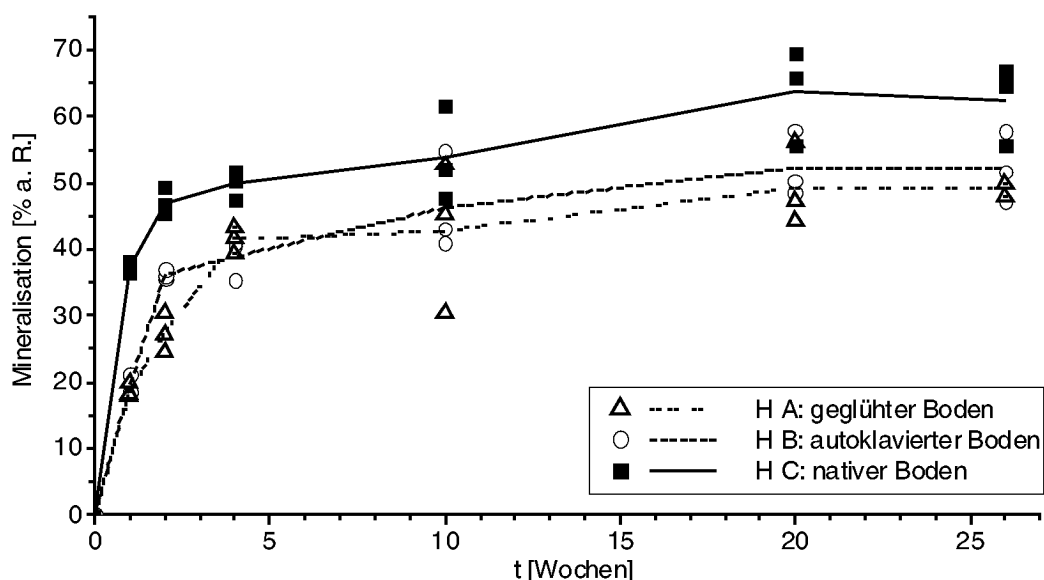


Abbildung 5-29 Mineralisierung des ^{14}C -markierten Maisstroh nach 1, 2, 4, 10, 20 und 26 Wochen (Linien sind verbundene Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelen (Punkte); a. R. = applizierte Radioaktivität = 100 %).

Tabelle 5-5 Zeitlicher Verlauf der Mineralisierung von ^{14}C -Maisstroh in Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (a. R. = applizierte Radioaktivität = 100 %; v. R. = aktuell im Boden vorhandene Radioaktivität).

Mineralisierung von ^{14}C -Maisstroh	Inkubationsdauer (Wochen)							
	1	2	3	4	6	10	20	26
H A: geglühter Boden								
$^{14}\text{CO}_2$, gesamt (% a. R.)	19	27	37	41	41	43	49	49
σ (% a. R.)	1,1	3,0	0,4	2,0	3,4	11,3	6,3	1,1
$^{14}\text{CO}_2$ /Woche (% v. R.)**	19	21	*	2	*	3	1	0
H B: autoklavierter Boden								
$^{14}\text{CO}_2$ (% a. R.)	19	36	42	39	39	46	52	52
σ (% a. R.)	1,5	0,8	1,0	3,1	2,3	7,4	5,0	5,4
$^{14}\text{CO}_2$ /Woche (% v. R.)**	19	11	*	10	*	1	1	0
H C: nativer Boden								
$^{14}\text{CO}_2$ (% a. R.)	38	47	46	50	45	54	64	62
σ (% a. R.)	0,9	2,1	8,0	2,1	2,5	7,1	7,3	5,9
$^{14}\text{CO}_2$ /Woche (% v. R.)**	38	15	*	3	*	2	2	0

* Mineralisierungsraten ($^{14}\text{CO}_2$ /Woche) wurden nicht für die 3. Woche und die 5.-6. Woche dargestellt, da sich aufgrund des experimentellen Designs teilweise negative Werte ergeben hätten.

** Die Angaben zu den Mineralisierungsraten beziehen sich auf die im Boden verbliebene Radioaktivität zu Beginn eines Zeitraumes und summieren sich daher nicht auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamt-Werte.

5.6.2 Mikrobielle Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen

Der Abbau des zugegebenen Strohmaterials wird maßgeblich durch die mikrobielle Aktivität im Boden bestimmt. Diese wurde über die Bestimmung von DMSO-Reduktase-Raten (vgl. Abschnitt 4.1.2) über den gesamten Inkubationszeitraum von 26 Wochen kontrolliert. Sie stieg in allen Varianten direkt nach der Inokulation an. Während direkt nach der Inokulation in den Varianten H A und H B mit geglühtem bzw. autoklaviertem Boden die mikrobielle Aktivität nicht messbar war, wurden in nativem Boden bereits durchschnittlich $320 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ (Trockenmasse) h}^{-1}$ produziert (Abbildung 5-30 und Tabelle 5-6). Die DMSO-Bildung steigerte sich nach einer Woche auf durchschnittlich $450 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Zu diesem Zeitpunkt konnte erstmalig auch in geglühtem Boden ($70 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und in autoklaviertem Boden ($220 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) mikrobielle Aktivität festgestellt werden.

Innerhalb der ersten 4 Wochen blieben die DMSO-Reduktase-Raten in den Mikrokosmen mit nativem Boden (Variante H C) mit durchschnittlich $450\text{-}500 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ am höchsten. Allerdings fiel der 2-Wochen-Wert mit durchschnittlich $380 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ etwas niedriger aus. In der folgenden Zeit sank die mikrobielle Aktivität auf $290\text{-}330 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und lag somit im Bereich der anfänglichen DMSO-Reduktase-Rate am Tag 0 ($320 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Bei der letzten Beprobung nach 26 Wochen wurde wiederum ein vergleichsweise hoher Wert mit $460 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ festgestellt.

In den Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden (Variante H B) stieg die mikrobielle Aktivität in den ersten 3 Wochen auf durchschnittlich $220\text{-}290 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an. Darauf sanken die DMSO-Reduktase-Raten auf durchschnittlich $220 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab und erreichten somit wieder das Niveau der ersten Woche. Von der 10. Woche bis zum Ende des Versuchszeitraumes zeigten die Werte für die mikrobielle Aktivität ein uneinheitliches Bild mit absoluten Werten zwischen $170 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $370 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, wobei der Höchstwert wie in den Mikrokosmen mit nativem Boden in der letzten Woche gemessen wurde.

In den Mikrokosmen mit geglühtem Boden (Variante H A) war bis zur 20. Woche ein kontinuierlicher Anstieg der mikrobiellen Aktivität mit einem Maximum von $400 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu verzeichnen. Abweichend von diesem stetigen Anstieg wurden in der 3. Woche $260 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ produziert, was in etwa dem Wert in den Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden entspricht. In der 26. Woche wurde mit $300 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine etwa gleich hohe mikrobielle Aktivität wie im autoklavierten Boden (H B) gemessen.

Beim Vergleich der verschiedenen Varianten zeigt sich bis zur 10. Woche, in der die mikrobielle Aktivität in allen Fällen vergleichbar war, eine eindeutige Rangfolge zunehmender DMSO-Reduktase-Raten von den Mikrokosmen mit geglühtem Boden (H A) über die mit autoklaviertem Boden (H B) zu denen mit nativem Boden (H C). Lediglich nach 3 Wochen ist

kein signifikanter Unterschied auf der 0,05 Ebene zwischen geglühtem und autoklaviertem Boden gemessen worden.

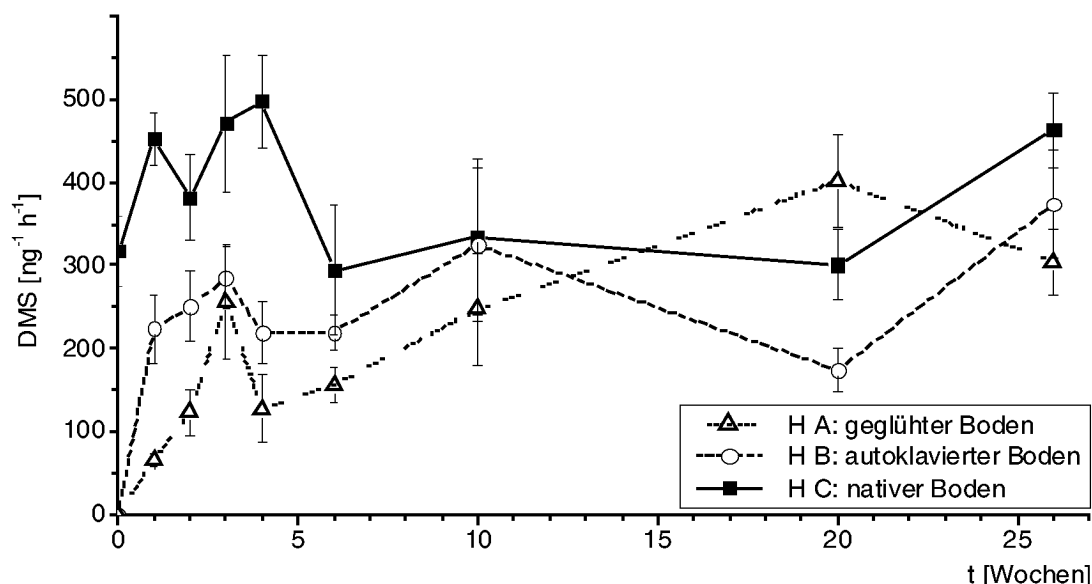


Abbildung 5-30 Mikrobielle Aktivität in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen).

Tabelle 5-6 DMSO-Reduktase-Raten als Indikator für die mikrobielle Aktivität in Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.

DMSO-Reduktase-Raten	Inkubationsdauer (Wochen)								
	0	1	2	3	4	6	10	20	26
H A: geglühter Boden									
Mittelwerte (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	0	66,0	122,7	255,4	127,8	156,2	247,5	401,8	303,7
Anzahl Messungen	6	6	6	6	6	6	6	6	6
σ (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	0	9,1	29,0	68,7	41,9	20,5	66,6	56,1	40,5
Variationskoeffizient	0,0	13,8	23,6	26,9	32,8	13,1	26,9	14,0	13,3
H B: autoklavierter Boden									
Mittelwerte (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	0	223,9	250,4	285,0	219,4	219,7	324,8	174,1	373,5
Anzahl Messungen	6	6	4	4	6	6	7	6	5
σ (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	0	40,7	41,8	37,4	37,9	20,5	92,1	26,6	64,3
Variationskoeffizient	0,0	18,2	16,7	13,1	17,3	9,3	28,3	15,3	17,2
H C: nativer Boden									
Mittelwerte (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	317,2	452,0	381,3	471,3	496,9	294,5	334,9	301,1	462,6
Anzahl Messungen	6	6	6	6	6	6	7	6	6
σ (ng DMS g ⁻¹ h ⁻¹)	43,1	32,8	51,2	81,8	54,6	78,9	93,5	43,4	45,0
Variationskoeffizient	13,6	7,3	13,4	17,3	11,0	26,8	27,9	14,4	9,7

5.6.3 Keimzahlen (Koloniebildende Einheiten)

Neben der mikrobiellen Aktivität des Bodens wurde in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften als weiterer bodenmikrobiologischer Parameter die Anzahl koloniebildender Einheiten bestimmt (in cfu g⁻¹ Boden (Trockensubstanz), vgl. Abschnitt 4.1.3). Die Anzahl koloniebildender Einheiten (cfu) stieg in den drei Varianten nach Beginn der Inkubation an. Während zu Beginn des Versuches in den Varianten H A und H B mit geblühtem bzw. autoklaviertem Boden die Anzahl koloniebildender Einheiten unter 10⁶ cfu g⁻¹ Boden lag, wurden im nativen Boden durchschnittlich 37 · 10⁶ cfu g⁻¹ Boden gefunden (Abbildung 5-31 und Tabelle 5-7). Nach einer Woche wurden mit 1,3 · 10⁹ cfu g⁻¹ für Mikrokosmen mit geblühtem Boden (H A), 1,6 · 10⁹ cfu g⁻¹ (autoklavierter Boden, H B) bzw. 0,54 · 10⁹ cfu g⁻¹ (nativer Boden, H C) maximale Keimzahlen festgestellt. Dabei wichen die Werte für den geblühten Boden und den autoklavierten Boden nicht signifikant (auf der 0,05 Ebene) voneinander ab. Dieses blieb im Verlauf des Experimentes mit Ausnahme der Beprobung nach 10 Wochen erhalten. In diesen zwei Varianten nimmt die Keimzahl bis zur 20. Woche ab (auf 26 · 10⁶ cfu g⁻¹ im geblühten Boden und 31 · 10⁶ cfu g⁻¹ im autoklavierten Boden), obwohl die mikrobielle Aktivität im gleichen Zeitraum stabil blieb oder – teilweise sogar – anstieg (vgl. Abbildung 5-30). Am Versuchsende wurden im autoklavierten Boden – wie auch bei den DMSO-Reduktase-Raten – wieder etwas höhere Werte gefunden (0,16 · 10⁶ cfu g⁻¹ Boden).

Ein ähnlicher Verlauf war auch bei den Mikrokosmen mit nativem Boden zu beobachten. Hier sank die Zahl koloniebildender Einheiten bis zur 6. Woche auf 1,3 · 10⁹ cfu g⁻¹ Boden. Ebenso wie im geblühten Boden wurde bei der Probenahme nach 10 Wochen ein weiteres Maximum mit 1,1 · 10⁹ cfu g⁻¹ festgestellt. Bei der darauffolgenden Zählung (nach 20 Wochen) lag die Anzahl koloniebildender Einheiten mit 74 · 10⁶ cfu g⁻¹ Boden wieder im Bereich der Werte nach 3 und 4 Wochen. Nach 26 Wochen nahm – wie auch in den anderen beiden Varianten und vergleichbar mit den DMSO-Reduktase-Raten – die Keimzahl zu (0,26 · 10⁹ cfu g⁻¹).

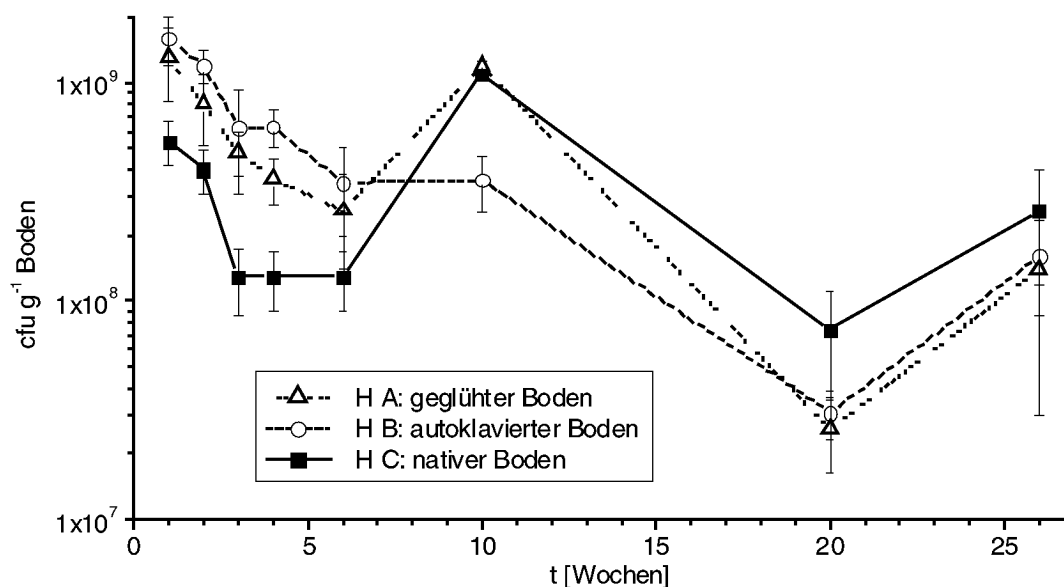


Abbildung 5-31 Anzahl koloniebildender Einheiten als cfu g⁻¹ Boden (Trockenmasse) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Mittelwerte aus 4 – 6 Auszählungen, vgl. Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7 Anzahl koloniebildender Einheiten als cfu g⁻¹ Boden (Trockenmasse) in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.

Keimzahlen	Inkubationsdauer (Wochen)								
	0	1	2	3	4	6	10	20	26
H A: geprüfter Boden									
Mittelwerte (10 ⁶ cfu g ⁻¹)	< 1	1300	800	480	360	260	1200	26	140
Anzahl Zählungen	4	6	6	6	5	6	6	4	6
σ (10 ⁶ cfu)		500	280	110	90	120	100	10	110
Variationskoeffizient		38	35	23	24	47	5	38	80
H B: autoklavierter Boden									
Mittelwerte (10 ⁶ cfu g ⁻¹)	< 1	1600	1200	620	630	350	360	31	160
Anzahl Zählungen	4	6	6	4	4	4	6	4	6
σ (10 ⁶ cfu)		400	200	310	120	150	100	8	70
Variationskoeffizient		24	17	50	20	4	28	24	46
H C: nativer Boden									
Mittelwerte (10 ⁶ cfu g ⁻¹)	37	540	400	130	130	130	1100	74	260
Anzahl Zählungen	6	6	6	6	6	6	6	4	6
σ (10 ⁶ cfu)	25	120	90	50	40	40	40	38	140
Variationskoeffizient	68	23	23	35	31	29	4	51	56

5.6.4 Ergosterolgehalte im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften über 26 Wochen

Der Ergosterolgehalt im Boden diente in diesem Versuch als Indikator für die Pilzbiomasse (vgl. Abschnitt 4.1.4). Er stieg direkt nach Beginn der Inkubation in allen drei Varianten an. Dabei wurde in allen Fällen nach 2 Wochen ein Maximum erreicht (Abbildung 5-32 und Tabelle 5-8). Dieses lag bei den Varianten H A mit geglühtem Boden und H C mit nativem Boden bei 3,4 bzw. 4,1 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden (Trockensubstanz) und bei der Variante H B mit autoklaviertem Boden bei 5,8 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden. Bis dahin waren die Werte im nativen Boden (3,1 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden) deutlich höher als in den mit Bodensuspensionen reinokulierten Mikrokosmen (H A und H B, jeweils $< 0,5 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden). Bei Versuchsbeginn wurde im Boden dieser Varianten lediglich Ergosterolgehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,2 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden ermittelt, während im nativen Boden 0,5 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden extrahiert und gemessen wurden. Nach 3 Wochen nahmen die Ergosterolgehalte in den Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden und nativem Boden allmählich ab und glichen sich ab der 10. Woche zunehmend aneinander an (vgl. Abbildung 5-32). Ab der 20. Woche wurden auch in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden vergleichbare Ergosterol-Mengen im Boden festgestellt. In allen Varianten wurden zu diesem Zeitpunkt und bei der letzten Probenahme nach 26 Wochen durchschnittlich zwischen 0,9 und 1,0 $\mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden gefunden.

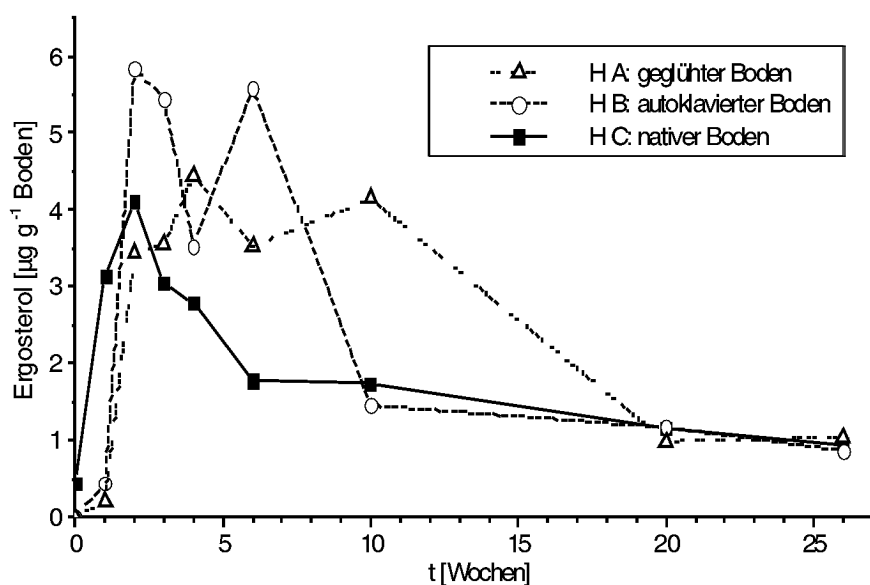


Abbildung 5-32 Ergosterolgehalt im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in $\mu\text{g g}^{-1}$ Boden (Trockenmasse; Linien sind verbundene Mittelwerte aus 3 Parallelen (Punkte) mit jeweils 3 unabhängigen Aufarbeitungen).

Tabelle 5-8 Ergosterolgehalt im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (bezogen auf die Trockenmasse).

Ergosterolgehalt	Inkubationsdauer (Wochen)								
	0	1	2	3	4	6	10	20	26
H A: geglähter Boden									
Mittelwerte ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)		0,2	3,4	3,5	4,5	3,5	4,1	1,0	1,0
Anzahl Messungen		9	9	9	9	9	9	9	9
σ ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)		0,10	1,65	1,38	0,59	0,77	1,60	0,07	0,20
Variationskoeffizient		48	48	39	13	22	39	7	19
H B: autoklavierter Boden									
Mittelwerte ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)		0,4	5,8	5,4	3,5	5,6	1,5	1,2	0,9
Anzahl Messungen		9	7	9	9	9	9	9	9
σ ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)		0,21	0,53	2,54	1,06	1,36	0,14	0,42	0,09
Variationskoeffizient		47	9	47	30	24	10	36	10
H C: nativer Boden									
Mittelwerte ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)	0,5	3,1	4,1	3,1	2,8	1,8	1,7	1,2	0,9
Anzahl Messungen	2	9	9	9	9	9	9	9	9
σ ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)	0,0	0,28	0,29	1,20	0,20	0,53	0,41	0,13	0,20
Variationskoeffizient	0	9	7	39	7	30	24	11	21

5.6.5 Molekularbiologische Analyse der komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in den Mikrokosmen mittels DGGE

Während die Mineralisation von organischem Material und die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität geeignet sind, die Funktion mikrobieller Gemeinschaften im Boden zu bestimmen, und die Keimzahlbestimmung und der Ergosterolgehalt die Biomasse beschreiben, kann mit Hilfe der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden charakterisiert werden (vgl. Kapitel 4.2). In den DGGE-Gelen mit den PCR-Produkten der Boden-DNA zeigte sich bereits nach 2 Wochen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Varianten (vgl. Kapitel 3.6 und Abbildung 5-33). So fanden sich vor allem bei einer Laufstrecke zwischen 70 mm und 100 mm jeweils 6 Banden mit dem gleichen Laufverhalten. Ähnliches lässt sich auch für eine Laufstrecke bis 20 mm sagen. Allerdings waren hier die Banden deutlich schwächer und zeugen von einer geringen DNA-Menge. Diesen Banden kommt – im Vergleich zu den zuerst beschriebenen – eine geringere Bedeutung im gesamten Bandenmuster zu.

Diese Beobachtung lässt sich zum Teil auch auf die 10 Wochen alten Proben übertragen. Allerdings traten hier in den verschiedenen Varianten auch Banden auf, die in den anderen Varianten schwächer oder gar nicht vorhanden sind. Die insgesamt schwächeren Bandenmuster der Variante H A (geglühter Boden) waren vermutlich durch eine geringere DNA-Menge verursacht. Dafür spricht auch, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten (als Biomasse-Indikator) in dieser Variante nach 10 Tagen Inkubation geringer war als in den beiden anderen Varianten (vgl. Abschnitt 5.6.3).

Insgesamt gesehen nahm in allen Varianten die Anzahl der Banden von der ersten zur 10. Woche zu (Abbildung 5-34). Zu Beginn scheinen also einige wenige Bakterien zu dominieren. Durch zunehmende Konkurrenz steigt die Diversität dann im Zeitverlauf an.

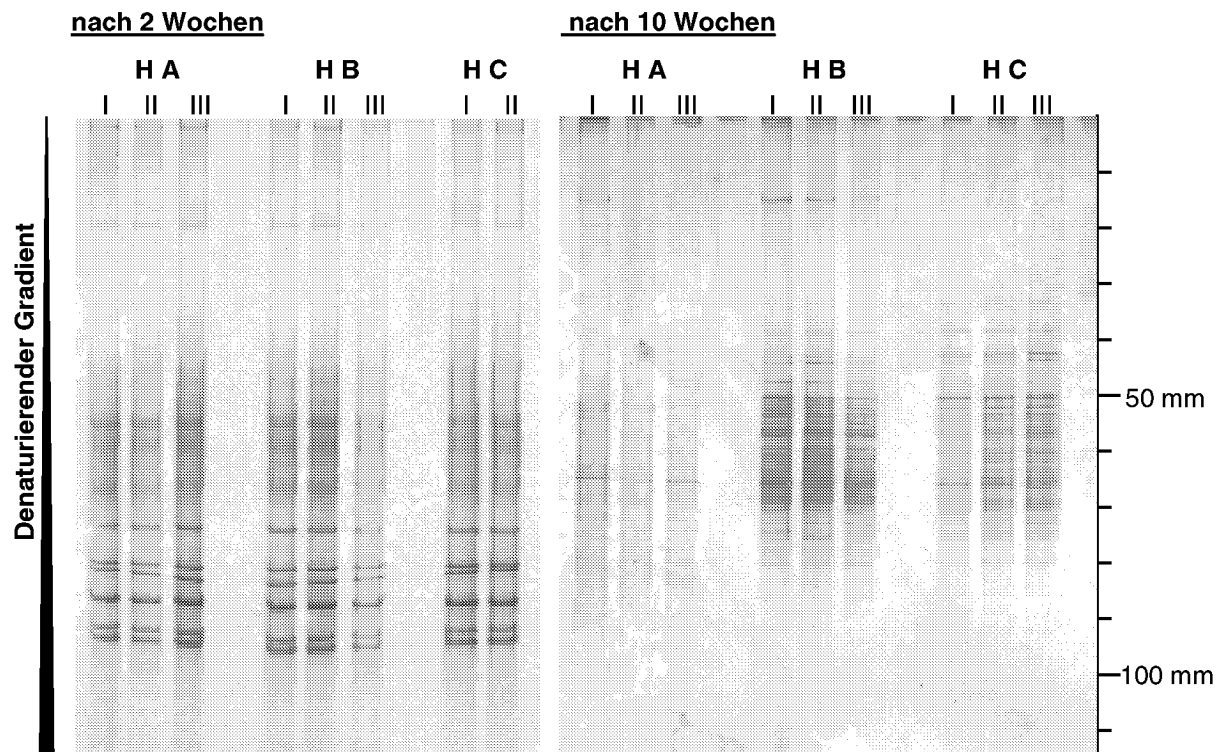


Abbildung 5-33 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der mikrobiellen Gemeinschaften nach 2-wöchiger und nach 10-wöchiger Inkubation. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 50 V, 16 h.

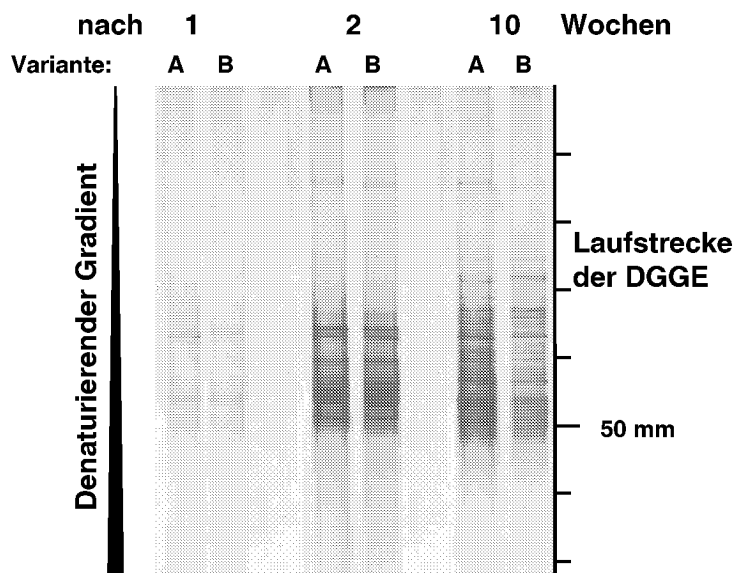


Abbildung 5-34 Gelelektrophoretische Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA der mikrobiellen Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit geglühtem (A) und autoklaviertem Boden (B) nach 1-, 2- und 10-wöchiger Inkubation. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 50 V, 16 h.

5.6.6 C/N-Verhältnisse im Boden

Da sich das Ausgangsmaterial (geglühter Boden, Parabraunerde und Maisstroh) in ihrem C/N-Verhältnis unterscheidet (vgl. Abschnitt 4.4 und Tabelle 5-4), ist dieser Parameter geeignet, die Umsetzung des organischen Materials in den Mikrokosmen zu beschreiben. Am höchsten war das C/N-Verhältnis in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden (Variante H A, vgl. Kapitel 3.6) direkt nach Beginn des Versuches. Hier wurden Werte von durchschnittlich 19,3:1 gefunden. Diese Werte wurden vor allem durch den hohen Kohlenstoffanteil im eingebrachten inaktiven Strohmaterial hervorgerufen (vgl. Tabelle 5-4). Das C/N-Verhältnis in den Mikrokosmen mit autoklaviertem oder nativem Boden lag zu Beginn bei durchschnittlich 11,5:1 bzw. 9,7:1. Allerdings unterschieden sich die Daten nicht signifikant in einem t-Test (0,05-Ebene, $t = -2,29344$, $p = 0,10562$). Im Verlauf der Inkubation nahm das C/N-Verhältnis allmählich ab und von der 10. Woche an lag es in allen Varianten auf dem Niveau einer nativen Parabraunerde aus Merzenhausen (vgl. Tabelle 5-4).

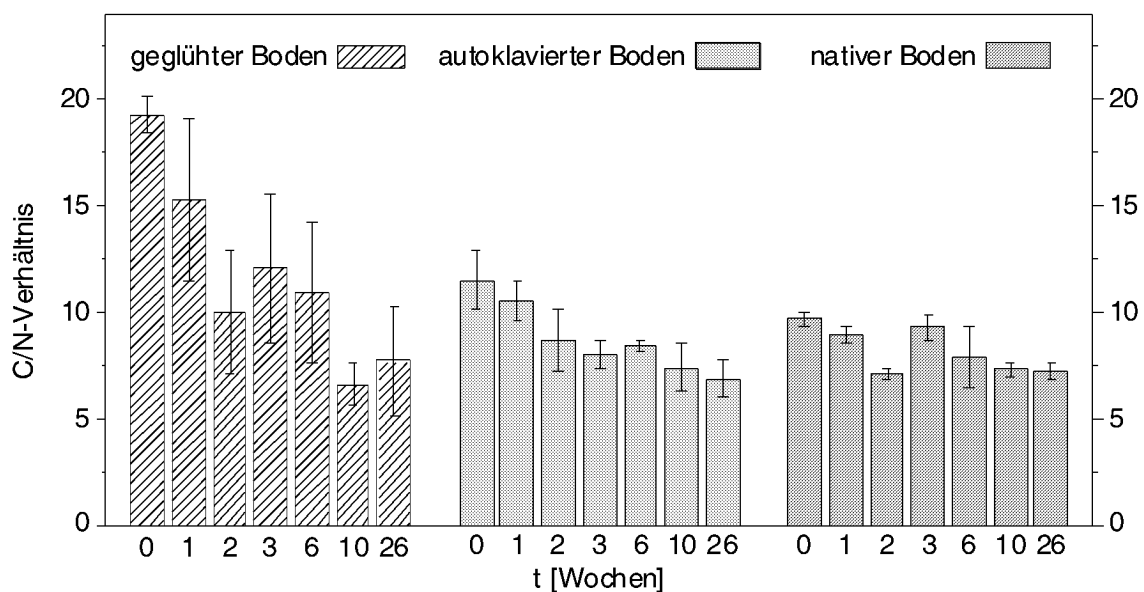


Abbildung 5-35 C/N-Verhältnisse über 26 Wochen im Boden der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.

5.6.7 Analyse von Huminsäuren-Extrakten des Maisstrohs vor, nach 10-wöchiger und nach 26-wöchiger Inkubation mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften

Zur jeweiligen Probenahme wurden aus vereinigten Bodenproben der Parallelansätze Huminsäuren extrahiert (vgl. Abschnitt 4.4.1) und mit einem ^{13}C -Flüssigkeits-NMR-Spektrometer vermessen (vgl. Abschnitt 4.4.2). Im Spektrum der Huminsäuren aus Variante H A (Mikrokosmen mit geglühtem Boden, Abbildung 5-36) wird der Verlauf der Huminsäure-Entstehung besonders deutlich, da in dieser Variante keine bodenbürtige Kohlenstoff-Matrix vorhanden war. Das bedeutet, dass das vor der Inkubation aufgenommene Spektrum einem reinen Maisstroh-Extrakt entspricht, der sich durch eine starke Strukturierung bei einer chemischen Verschiebung zwischen 50 und 110 ppm auszeichnet. In diesem Bereich sind typischerweise Signale von Kohlenhydraten und anderen Polyalkoholen zu finden. Im Verlauf der Maisstrohverrottung verliert dieser Bereich im Spektrum an Bedeutung, während im Gegenzug die Anzahl und Intensität der Peaks im aliphatischen Bereich ($\delta = 25\text{-}45$ ppm) zunahm. Diese Zunahme ist auch im Bereich einer chemischen Verschiebung von 120-180 ppm zu sehen, in dem Kohlenstoffverbindungen mit Carboxyl- und Carbonyl-Funktionen zu finden sind. Allerdings unterscheidet sich auch noch nach einer Inkubationszeit von 26 Wochen das Spektrum des humifizierten Maisstrohs im geglühten Boden in diesem Bereich der chemischen Verschiebung von dem einer nativen Parabraunerde (vgl. Abbildung 5-25 B). Beispielsweise sind beim Spektrum der Parabraunerde keine Peaks bei einer chemischen Verschiebung von 120 oder auch von 153 ppm vorhanden. Nach 26-wöchiger Inkubation von Variante H A ist deren Intensität zwar bereits vermindert, aber noch deutlich erkennbar.

In den Spektren der Huminsäuren aus Varianten H B (autoklavierter Boden + Maisstroh) und H C (nativer Boden + Maisstroh) überlagern sich die Signale aus dem Maisstroh und aus der Bodenmatrix. So sind von Anfang an die typischen Merkmale des Maisstroh-Extraktes ($\delta = 50\text{-}110$ ppm) und die Peaks, welche auch im Spektrum der Huminsäuren aus einer Parabraunerde vorhanden waren (vgl. Abbildung 5-25 B), zu erkennen. Im Verlauf der Inkubation verminderte sich die Intensität der für Maisstroh typischen Signale und die Spektren glichen sich an das in Abbildung 5-25 B gezeigte Spektrum der Parabraunerde an, wobei die Spektren der Varianten H B und H C eine gute Übereinstimmung zeigten. Lediglich der auch in allen Spektren der Variante H A vorhandene Peak bei einer chemischen Verschiebung von ca. 153 ppm war ebenfalls in Variante H C zu erkennen.

Variante H A: geglühter Boden

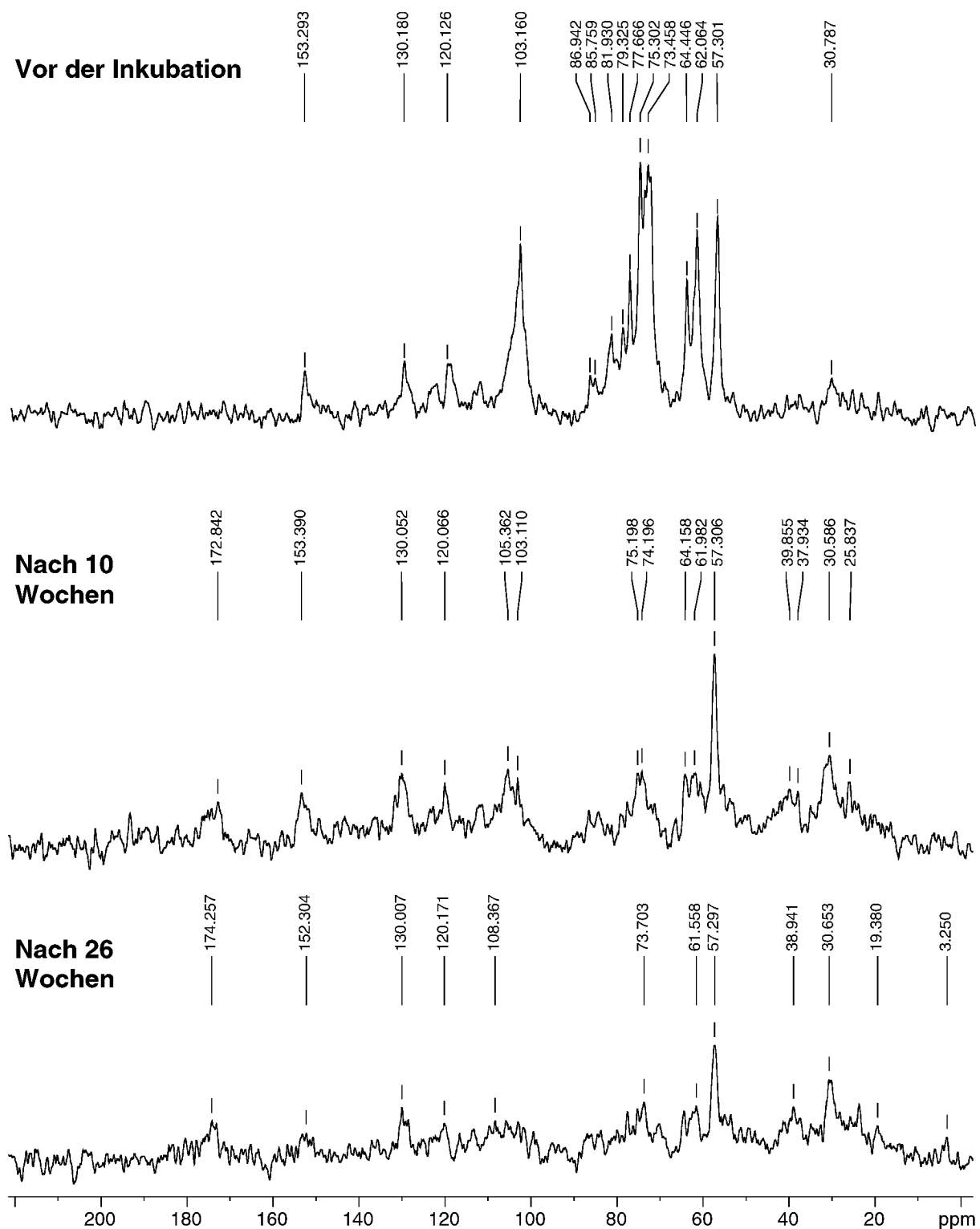


Abbildung 5-36 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit geglühtem Boden vor, 10 und 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (jeweils 200 000 Scans).

Variante H B: autoklavierter Boden

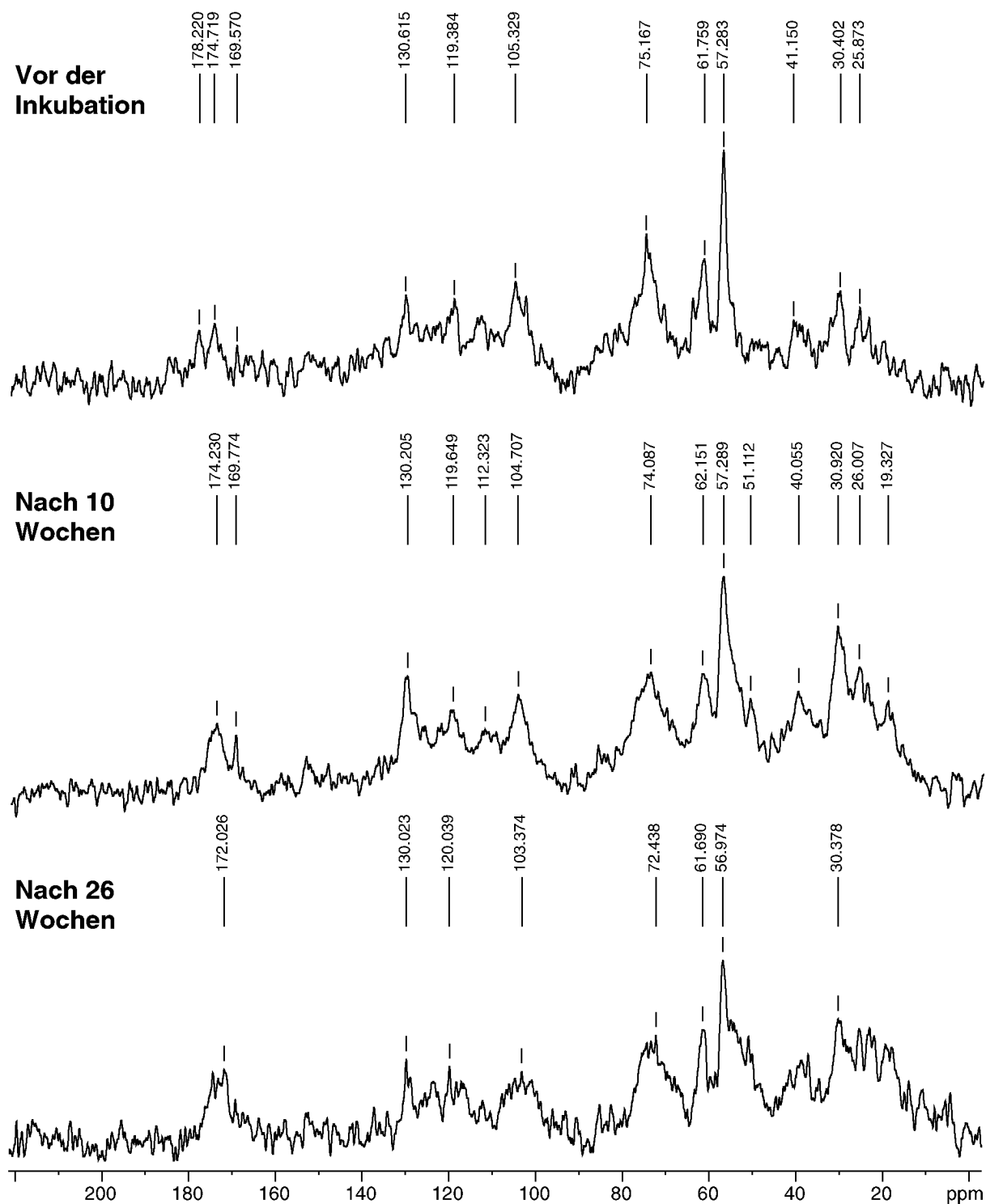


Abbildung 5-37 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit autoklaviertem Boden vor (62 000 Scans), 10 und 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).

Variante H C: nativer Boden

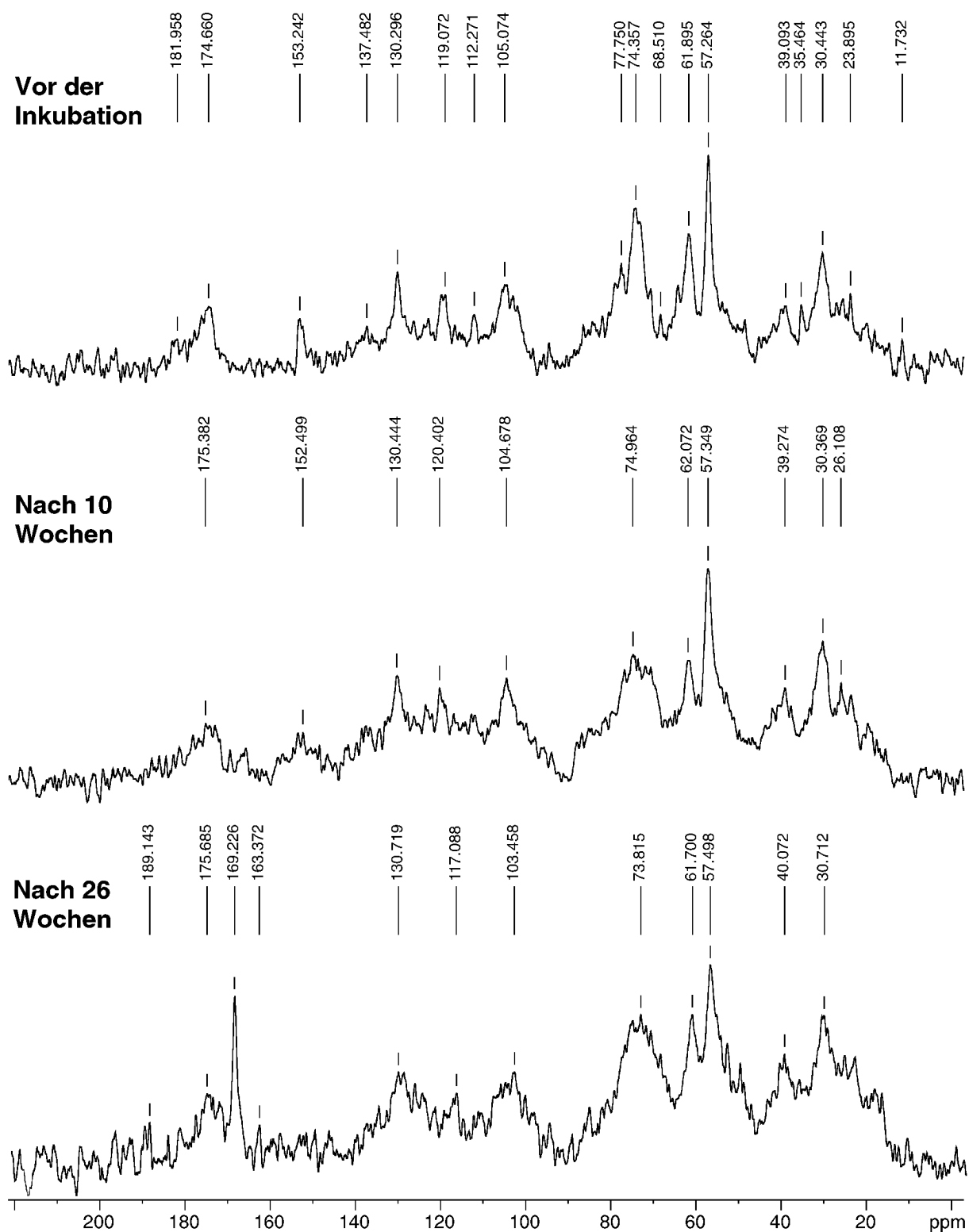


Abbildung 5-38 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohrotte mit nativem Boden vor, 10 und 26 Wochen nach Beginn der Inkubation (200 000 Scans).

Während mittels ^{13}C -NMR die Entstehung huminstofftypischer Gruppen aus dem zugegebenen Maisstroh dokumentiert wurde, diente die Analyse der Huminsäuren mittels Gel-permeationschromatographie der Beschreibung der mittleren Molekülgrößen in den Extrakten (vgl. Abschnitt 4.4.3). Die Elutionszeit der gemessenen Extrakte reichte von 11,5 min bis 17 min und deutete somit auf eine große Bandbreite der Molekülgrößen hin (vgl. Abschnitt 5.5.4.1). Im geglühten Boden und im nativen Boden waren abnehmende Retentionszeiten der Peak-Maxima zu beobachten. Die damit verbundene Zunahme der mittleren Molekülgrößen in den Extrakten war bereits nach 10 Wochen deutlich – die weitere Verkürzung der Retentionszeit fiel dagegen gering aus. Beim Vergleich der Varianten mit geglühtem Boden (H A) und mit der nativen Bodenmatrix (H C) traten die Peakmittelpunkte in den Chromatogrammen jeweils etwas früher hervor. Die Huminsäuren aus den Mikrokosmen mit autoklavierter Boden (H B) zeigten dagegen eine andere Entwicklung. Während hier bereits zu Beginn vergleichsweise hohe Molekülmassen mit einem leichten Anstieg bis zur 10. Woche gefunden wurden, lagen diese nach 26 Wochen mit ca. 3000 Dalton unterhalb der Ausgangsgröße.

Tabelle 5-9 Retentionszeiten und daraus errechnete Molekülgrößen (vgl. Kalibrationskurve in Abbildung 4-3) von Huminsäuren, vermessen mittels Gel-permeationschromatographie.

GPC	Inkubationsdauer (Wochen)		
	0	10	26
H A: geglühter Boden			
Retentionszeiten der Peakmitten (min)	14,11	13,80	13,77
Errechnete Molekülgrößen	1900	3100	3200
H B: autoklavierter Boden			
Retentionszeiten der Peakmitten (min)	13,73	13,69	13,82
Errechnete Molekülgrößen	3400	3600	3000
H C: nativer Boden			
Retentionszeiten der Peakmitten (min)	13,88	13,73	13,69
Errechnete Molekülgrößen	2700	3400	3600

5.7 Einfluss von Dithianon auf die Mineralisierung des Maisstrohs und auf die daran beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften

Bei diesem Versuchsteil stand die Reaktion der Maisstrohrotte-Mikrokosmen auf äußere Einflüsse im Vordergrund (vgl. Kapitel 3.7). Dazu wurde der Fungizidwirkstoff Dithianon in einer Konzentration von 50 mg kg^{-1} in den Boden eingearbeitet. Die Applikation unterschied sich sowohl in der Aufwandmenge als auch in der Art der Anwendung (direktes Aufbringen auf den Boden) von einer realen landwirtschaftlichen Situation. Der Einfluss der Dithianon-Applikation wurde im Zeitverlauf der Inkubation anhand der Mineralisation des ^{14}C -markierten Maisstrohs, der mikrobiellen Aktivität (DMSO-Reduktase-Raten), der Pilzbiomasse (Ergosterolgehalte), von DNA-Fingerprints (DGGE-Muster) und von ^{13}C -NMR-Spektren der aufgebauten Huminsäuren charakterisiert.

5.7.1 Abbau von uniform ^{14}C -markiertem Maisstroh

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zum Maisstrohabbau in Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften unter Dithianon-Einfluss wurden keine deutlichen Effekte durch die Modellsubstanz festgestellt (Abbildung 5-39). In allen Mikrokosmen stieg die Mineralisierung ab dem 2. Tag relativ gleichmäßig an, wobei gegen Ende des Versuchszeitraumes von 3 Wochen die Abbauraten leicht sanken. Nach 18 Tagen waren 30 % des applizierten Radiokohlenstoffes in den unbehandelten Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden (Variante B I), der durch eine Bodensuspension inokuliert wurde, mineralisiert und 28 % der applizierten Radioaktivität in den mit 50 mg kg^{-1} Dithianon dotierten Ansätzen (B II). Allerdings unterscheiden sich diese Werte nicht signifikant voneinander.

In den Mikrokosmen mit geglühtem Boden verlief die Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs durch die komplexen mikrobiellen Gemeinschaften ähnlich wie in denen mit nativem Boden. Nach 3 Wochen waren 31 % des applizierten Radiokohlenstoffes in den unbehandelten Mikrokosmen (A I) in $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert und 29 % der applizierten Radioaktivität in den mit Dithianon behandelten (A II).

In beiden Bodenansätzen war nur ein sehr geringer Effekt auf die Mineralisation des ^{14}C -Maisstrohs durch den Fungizidwirkstoff Dithianon zu beobachten. Dabei war die Verminderung des Abbaus lediglich in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden vom 5. bis zum 14. Tag signifikant (0,05 Ebene).

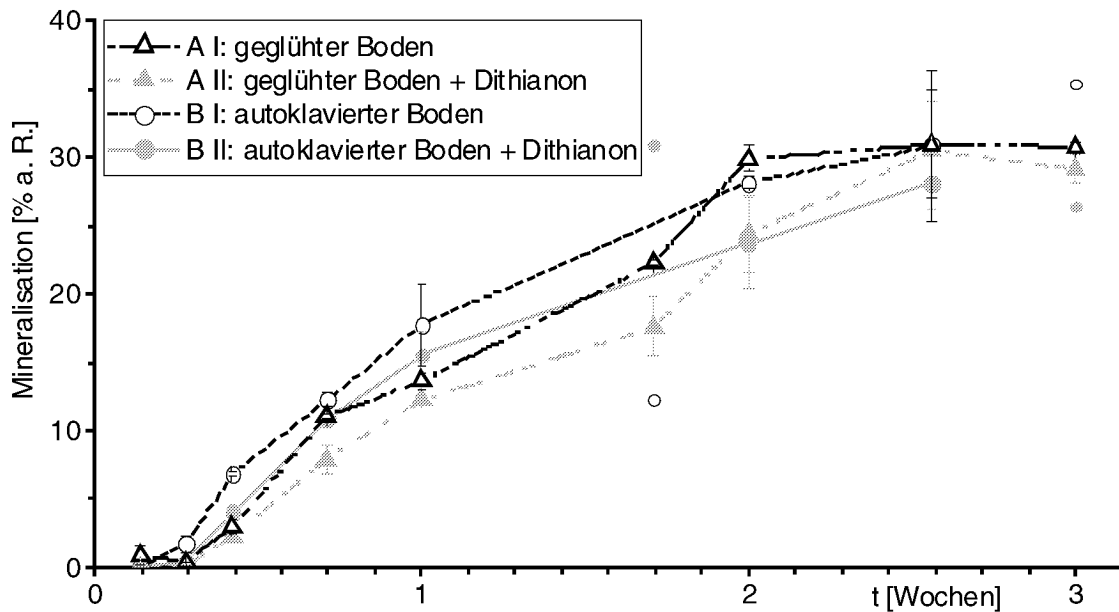


Abbildung 5-39 Akkumulierte Mineralisation von ^{14}C -markiertem Maisstroh in den Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften mit und ohne Dithionon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen, kleine Symbole sind Einzelwerte; a. R. = applizierte Radioaktivität = 100 %).

5.7.2 Einfluss von Dithionon auf die mikrobielle Aktivität in Maisstroh-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften

Die mikrobielle Aktivität – gemessen als DMSO-Reduktase-Raten – stieg in allen Varianten nach Beginn der Inkubation an, wobei nach etwa 2 Wochen jeweils ein Maximum erreicht wurde. Die absoluten Werte lagen im autoklavierten Boden (mit einer Bodensuspension inokuliert, vgl. Kapitel 3.7) immer etwas oberhalb der Werte des geprüften Bodens, was bereits in dem in Kapitel 5.6 beschriebenen Experiment festgestellt wurde. Beim Vergleich der jeweiligen Varianten ohne und mit Dithionon-Behandlung (geprüfter Boden: A I bzw. A II und autoklavierter Boden: B I bzw. B II) war eine Hemmung der mikrobiellen Aktivität durch den Fungizid-Einsatz zu beobachten. Dieser führte dazu, dass die DMSO-Reduktase-Raten im geprüften Boden nach Versuchsbeginn in der ersten Woche auf sehr niedrigem Niveau verblieben (durchschnittlich $30 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach einer Woche) und sich erst danach an die Werte in den unbehandelten Mikrokosmen mit geprüfem Boden anglichen (180 bis $280 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

In den Varianten mit autoklaviertem Boden wurde fast über den gesamten Versuchszeitraum ein Dithionon-Effekt festgestellt. Bereits 2 Tage nach Versuchsbeginn wurden in den unbehandelten Mikrokosmen DMSO-Reduktase-Raten von durchschnittlich $170 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen, die bis zum 19. Tag auf durchschnittlich $370 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ anstiegen. Die mikrobielle Aktivität in den mit Dithionon behandelten Mikrokosmen stieg dagegen sehr viel langsamer an und erreichte vom 12. bis 21. Tag 170 bis $200 \text{ ng DMS g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

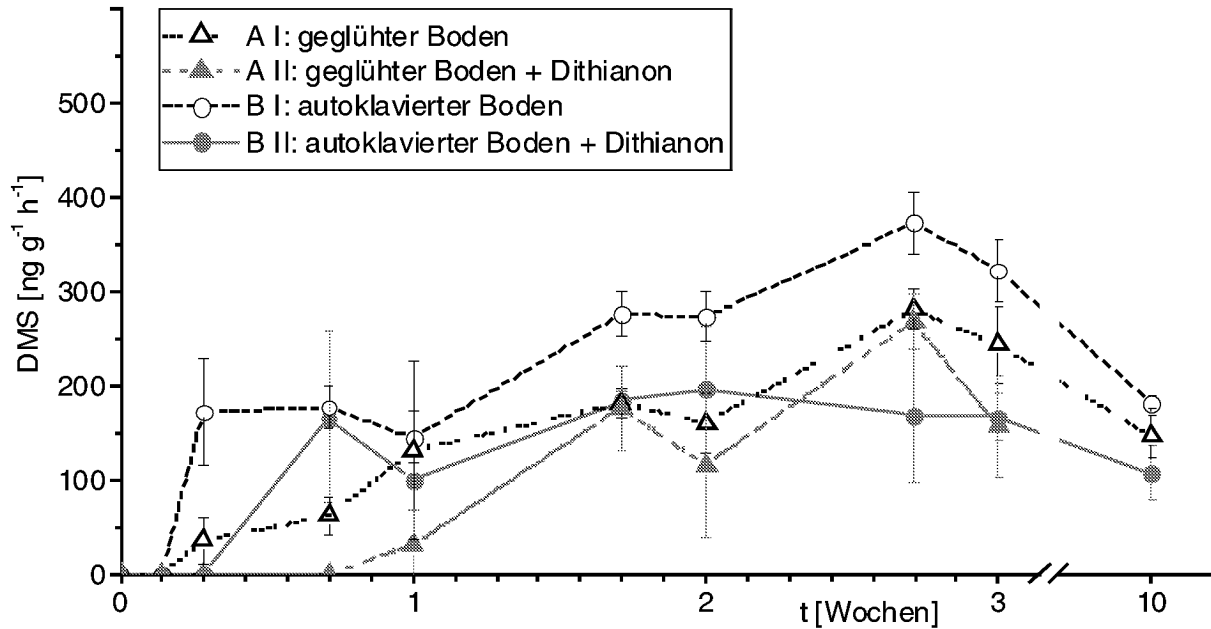


Abbildung 5-40 Mikrobielle Aktivität in den Maisstroh-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und Dithianon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen).

5.7.3 Einfluss von Dithianon auf die Ergosterolgehalte im Boden

Die aus dem Boden extrahierbare Menge an Ergosterol (vgl. Abschnitt 4.1.4) wurde – wie erwartet – noch stärker als die mikrobielle Aktivität durch den Fungizid-Wirkstoff Dithianon beeinflusst. Nennenswerte Mengen an Ergosterol wurden erst 2 Wochen nach der Inokulation durch eine Bodensuspension in den unbehandelten Mikrokosmen gefunden ($7,1 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden in Mikrokosmen mit geprüfem Boden = Variante A I und $9,6 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden in Mikrokosmen mit autoklavierem Boden = Variante B I, vgl. Kapitel 3.7). Dabei erfolgte das Pilzwachstum in den Mikrokosmen mit geprüfem Boden – wie auch schon in dem unter Kapitel 5.6 beschriebenen Versuch – etwas langsamer. Nach 3 Wochen wurden jedoch annähernd gleiche Mengen an Ergosterol aus den Böden der Mikrokosmen mit geprüfem bzw. autoklavierem Boden extrahiert (A I: $9,3 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden ; B I: $9,1 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden).

In den Mikrokosmen, die mit Dithianon behandelt wurden, wurde die Entstehung pilzlicher Biomasse weitgehend gehemmt. So wurde in den ersten 2 Wochen sowohl in den Mikrokosmen mit geprüfem (A II) als auch in denen mit autoklavierem Boden (B II) maximal $1,1 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden gemessen. Lediglich in den Proben nach 3-wöchiger Inkubation wurden höhere Mengen aus den Böden extrahiert (A II: $1,7 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden und B II: $3,2 \mu\text{g Ergosterol g}^{-1}$ Boden). Die gefundenen Messwerte der Parallelansätze variierten allerdings mit relativen Standardabweichungen von mehr als 75 %. Diese starken Abwei-

chungen sprechen für eine teilweise bereits einsetzende Erholung der pilzlichen Gemeinschaften in einzelnen Parallel-Ansätzen nach der Dithianon-Behandlung, während in den anderen Parallel-Ansätzen weiterhin eine starke Hemmung gegeben ist.

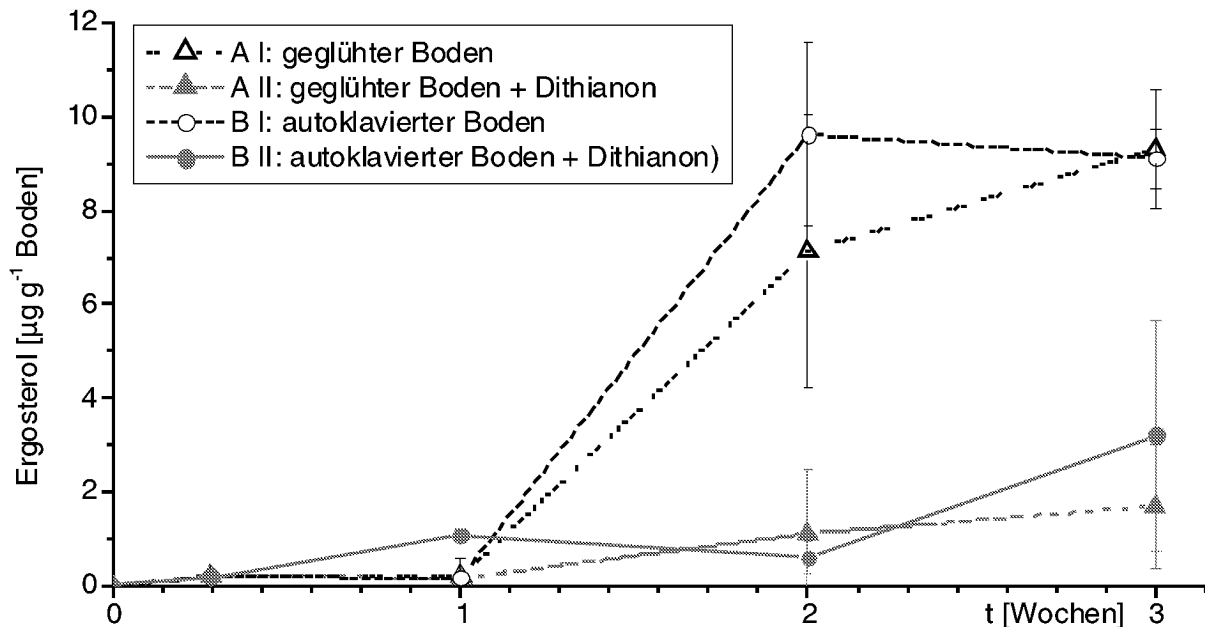


Abbildung 5-41 Ergosterolgehalt im Boden der Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und Dithianon-Behandlung (Mittelwerte aus 3 Parallelen).

5.7.4 Einfluss von Dithianon auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften

Mit Hilfe der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese von PCR-Produkten der Bodenproben wurde der Einfluss des Dithianon auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften untersucht. Die Gele in den Abbildungen 5-42 und 5-43 zeigen jeweils dieselben PCR-Produkte, wobei das Gel in Abbildung 5-42 die zeitliche Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaften in den verschiedenen Varianten (vgl. Kapitel 3.7) verdeutlicht, während das Gel in Abbildung 5-43 geeignet ist, Unterschiede zwischen den Varianten hervorzuheben.

Die Bandenmuster der PCR-Produkte von Boden-DNA zeigen eine Zunahme der Diversität mit der Zeit. So wurde in den Bandenmustern der 2 Tage alten Bodenproben die geringste Anzahl an Banden gefunden. Das Maximum an Diversität war in allen Proben nach 2 Wochen erreicht.

Beim Vergleich der verschiedenen Varianten miteinander zeigte sich eine weitgehende Ähnlichkeit in den Bandenmustern der PCR-Produkte von Boden-DNA aus autoklaviertem Boden mit (B II) und ohne Dithianon-Behandlung (B I). Dagegen unterschieden sich die Bandenmuster in den PCR-Produkten der Boden-DNA aus geglühtem Boden mit (A II) und ohne Dithianon-Behandlung (A I) voneinander. Insbesondere die Banden zwischen 30 und 40 mm Laufstrecke, die bei den Varianten B I, B II und A II vorkommen, sind zu keinem Zeitpunkt im Bandenmuster der PCR-Produkte der Boden-DNA aus nicht mit Dithianon behandelten Mikrokosmen mit geglühtem Boden (A I) vorhanden.

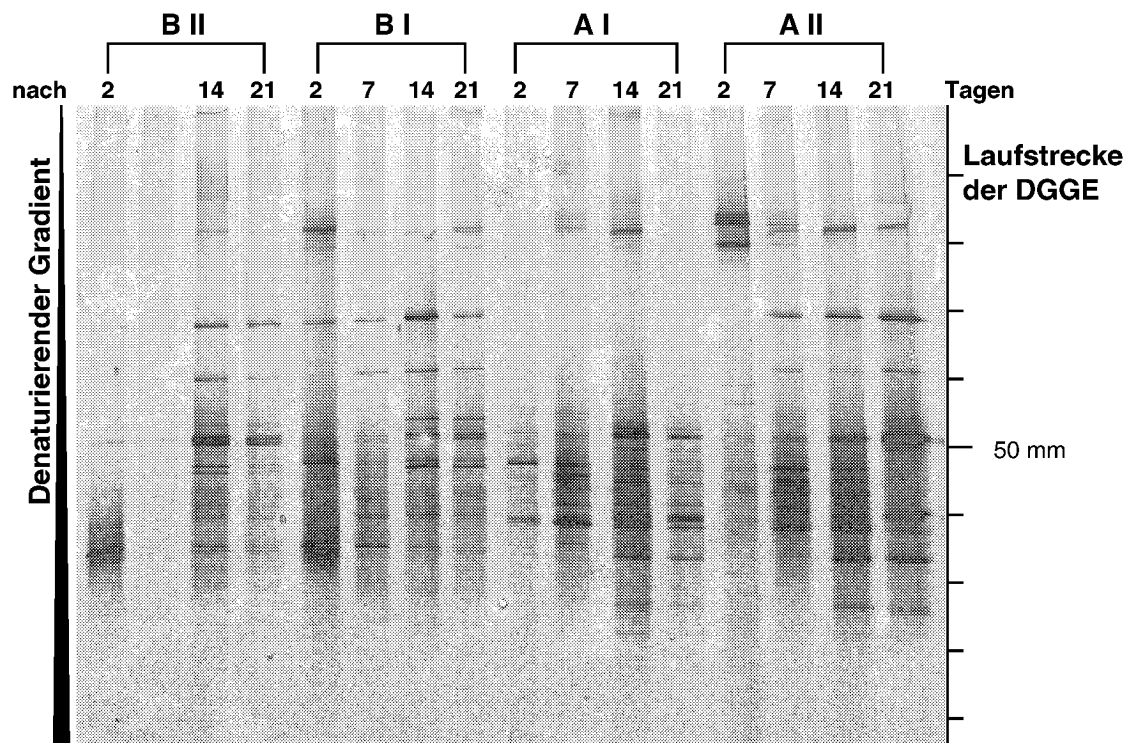


Abbildung 5-42 Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 2, 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. A: geglühter Boden, B: autoklavierter Boden. DGGE: Gradient 40 – 60 %, 55 V, 16 h.

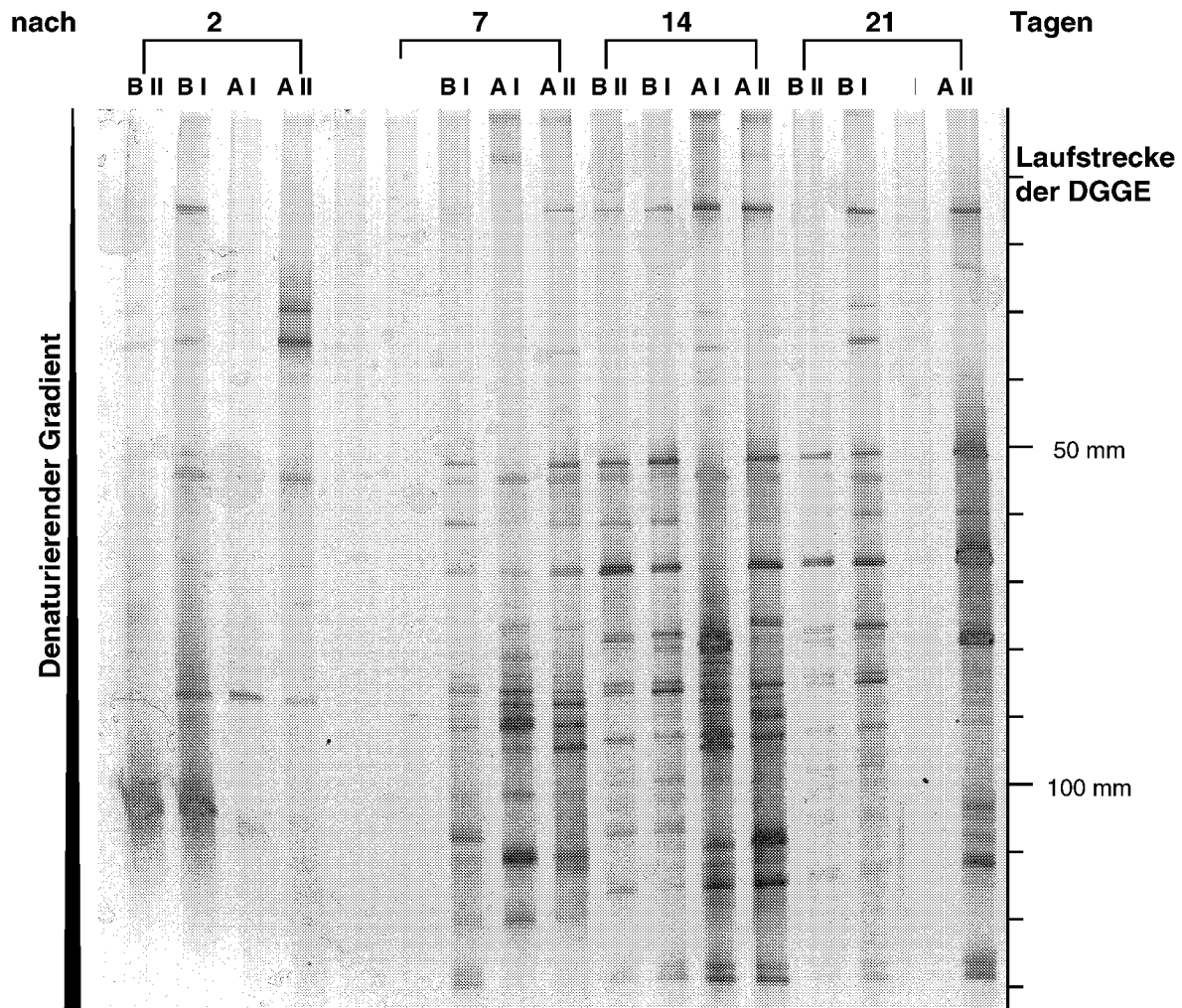


Abbildung 5-43 Vergleich mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen in geglühtem (A) bzw. autoklaviertem Boden (B) ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 2, 7, 14 oder 21 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. DGGE: Gradient 40 – 55 %, 55 V, 16 h.

5.7.5 Aufnahme von ^{13}C -Flüssig-NMR-Spektren und Gelpermeationschromatogrammen neugebildeter Huminsäuren unter Dithianon-Einfluss

Nach 26-wöchiger Inkubation wurden aus vereinten Bodenproben der Parallelansätze Huminsäuren extrahiert und mit einem ^{13}C -NMR-Flüssigkeits-Spektrometer vermessen. In den Spektren der Huminsäuren aus geglühtem Boden (A I und A II, Abbildung 5-44) wird der Vergleich zwischen unbehandelten und mit Dithianon behandelten Mikrokosmen besonders deutlich, da bei Versuchsbeginn keine Kohlenstoff-Matrix im Boden vorhanden ist. Das bedeutet, dass die gezeigten Spektren der Huminsäuren allein auf Umsatzprodukte des Maisstrohs zurückzuführen sind. Die Spektren der Huminsäuren aus den 26 Wochen alten Mikrokosmen mit geglühtem Boden unterscheiden sich nicht substantiell. In beiden Fällen (mit bzw. ohne Dithianon-Applikation) wurden die bei einer chemischen Verschiebung zwischen 50 und 110 ppm sichtbaren Kohlenhydrate und Polyalkohole reduziert. Gleichzeitig traten im Bereich 25-45 ppm und 120-180 ppm neue Peaks auf, die typischerweise auch in ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren aus nativem Boden gefunden wurden (vgl. Abbildung 5-25). Allerdings trat in der mit Dithianon behandelten Variante – wie auch in 26 Wochen alten Mikrokosmen mit nativem Boden (vgl. Abbildung 5-38) – ein zusätzlicher Peak bei $\delta = 169$ ppm auf. Insgesamt betrachtet ist das Spektrum der unbehandelten Variante in den genannten Randbereichen etwas stärker strukturiert.

In den Spektren der Huminsäuren aus den 26 Wochen alten Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden ist ein Unterschied zwischen den beiden Varianten (mit bzw. ohne Dithianon) nur sehr schwer auszumachen (Abbildung 5-45) und kann auf unterschiedlich hohen Kohlenstoff-Konzentrationen in den gemessenen Extrakten beruhen. Dieses wird dadurch verursacht, dass die im geglühten Boden beschriebenen geringen Unterschiede aufgrund der Dithianon-Applikation durch die von Beginn an vorhandene Kohlenstoff-Matrix im autoklavierten Boden überlagert und damit unkenntlich gemacht wird.

Geglühter Boden

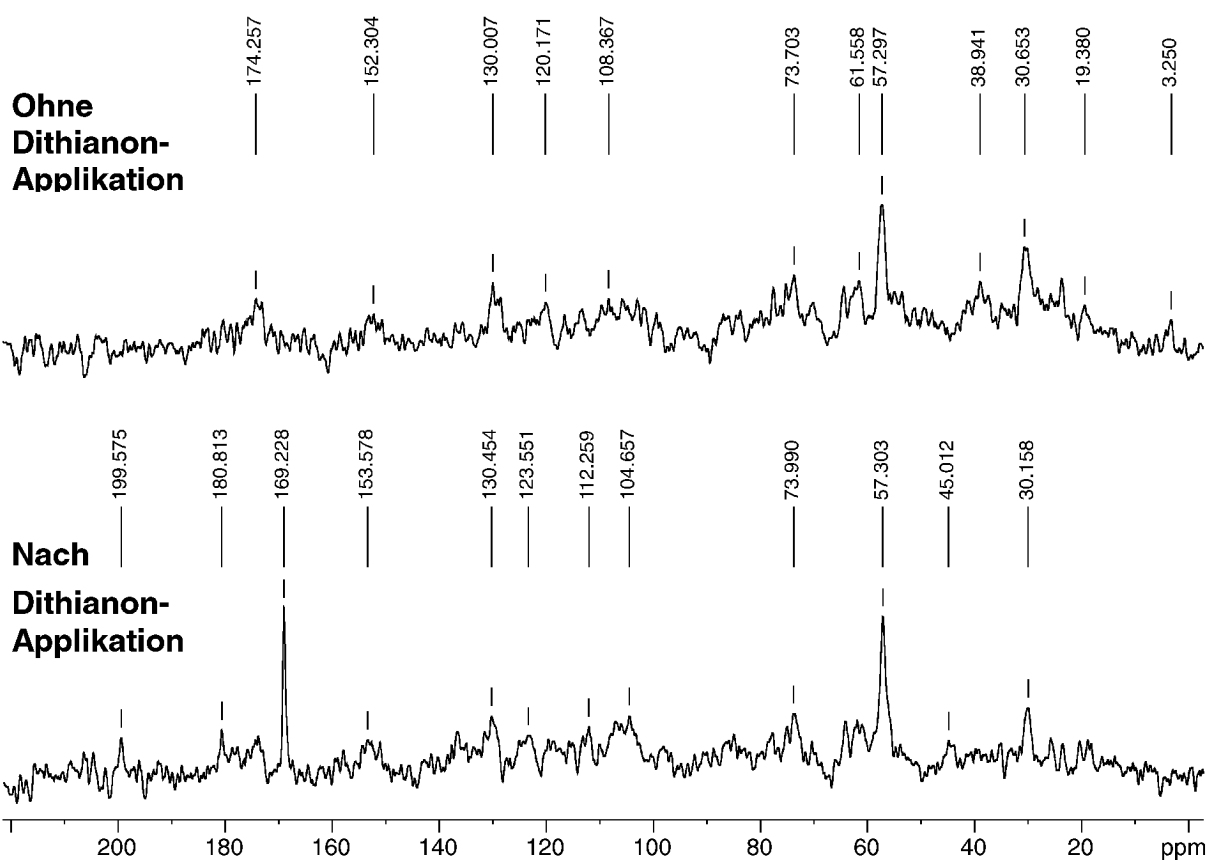


Abbildung 5-44 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohhrotte mit geblühtem Boden ohne und mit Dithianon-Behandlung 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).

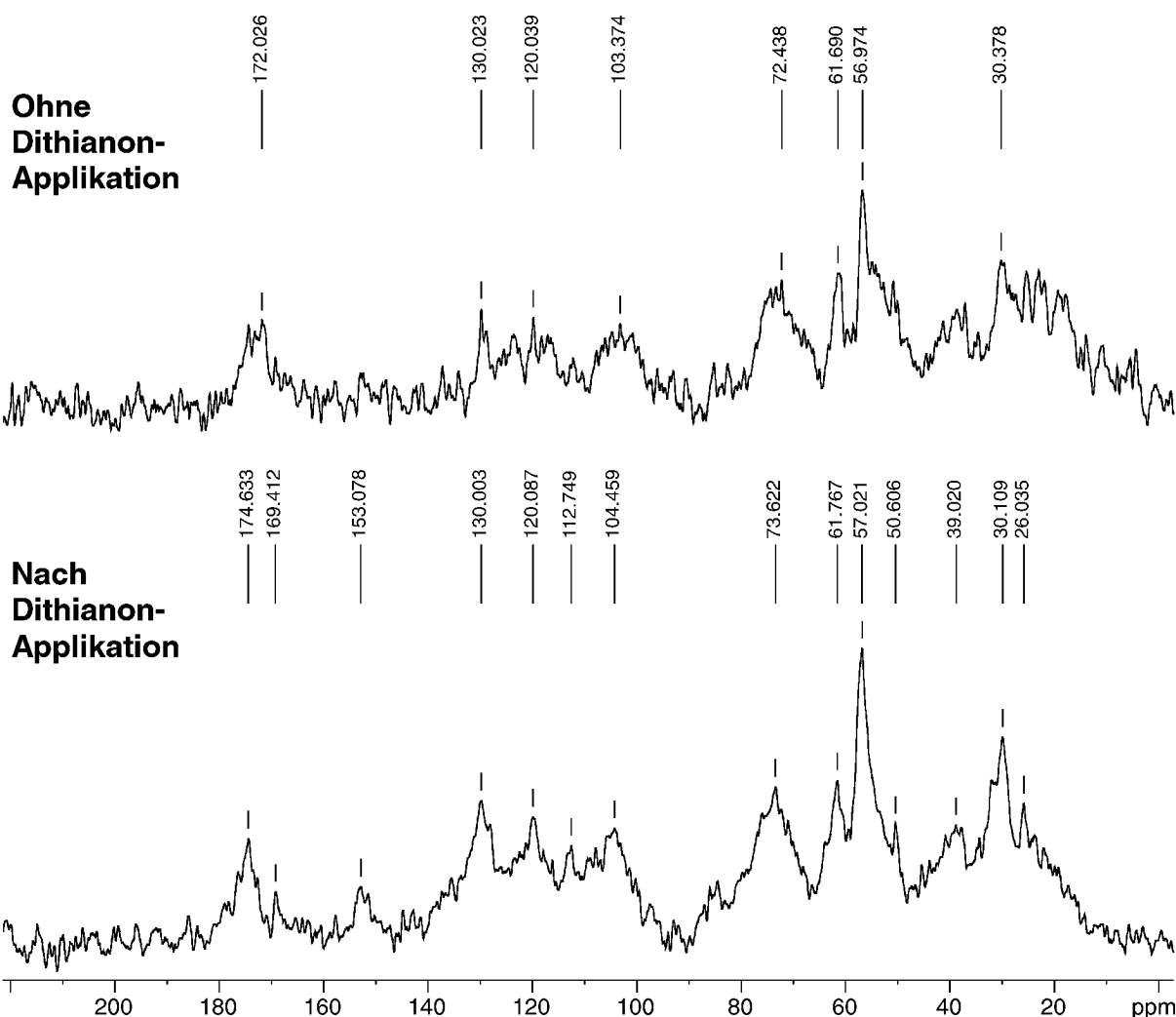
Autoklavierter Boden

Abbildung 5-45 ^{13}C -NMR-Spektren von Huminsäuren-Extrakten aus einer Maisstrohhrotte mit autoklaviertem Boden ohne bzw. mit Dithianon-Behandlung 26 Wochen nach Inokulation durch eine Bodensuspension (200 000 Scans).

Die Molekülgrößen von Huminsäuren, die in Mikrokosmen aus dem eingesetzten Maisstroh entstanden sind, wurden mittels Gelpermeationschromatographie ermittelt. Die Elutionszeit der gemessenen Extrakte reichte von 11,5 min bis 17 min und deutete somit auf eine große Bandbreite der Molekülgrößen hin (vgl. Abschnitt 5.5.4.1). Dabei konnte nach 26 Wochen Inkubation der häufigsten Molekülgröße in den Huminsäurenextrakten der Proben mit autoklaviertem Boden ein Wert von 3400 Dalton zugewiesen werden im Vergleich zu 2900 Dalton in Huminsäuren der Proben mit geblühtem Boden. Dieser Wert ergab sich aus den Retentionszeiten der Peak-Maxima in den Chromatogrammen von 13,72 min bzw. 13,83 min. Ein Einfluss durch die Applikation von Dithianon konnte nicht festgestellt werden.

6 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung eines Krumenbodens. Dazu wurde die Streuzersetzung in einem Boden untersucht, dessen Humusbestandteile thermisch zerstört wurden. Zur Erfassung der mikrobiellen Strukturen dienten sowohl Summenparameter, wie die DMSO-Reduktase-Raten, die Quantifizierung extrahierbaren Ergosterols und die Anzahl koloniebildender Einheiten, als auch eine molekularbiologische Beschreibung der Organismen-Zusammensetzung. Um nicht nur die strukturelle Dynamik zu beschreiben, sondern gleichzeitig funktionale Aspekte der mikrobiellen Gemeinschaft zu erfassen, wurden die gewonnenen mikrobiologischen Daten mit ^{13}C -NMR-Spektren und GPC-Chromatogrammen der in den Mikrokosmen gebildeten Huminsäuren verknüpft. Als zusätzlicher Aspekt wurde in einer Fallstudie mit dem Fungizidwirkstoff Dithianon die Sensibilität von Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften gegenüber Pflanzenschutzmitteln überprüft.

6.1 Diskussion der einzelnen Versuchsabschnitte

6.1.1 Isolate

Die Kultivierung von Mikroorganismen zur Isolierung von Bakterien und Pilzen, die am Umsatz toter organischer Substanz beteiligt sind, erfolgte in einer Maisstrohhrotte mit geglühtem Boden als Matrix (vgl. Kapitel 3.1). Dieser wurde mit einem geringen Anteil Frischboden inokuliert (2 g/150 g geglühter Boden). Den so in die Mikrokosmen eingebrachten Mikroorganismen stand als einzige Kohlenstoffquelle Maisstroh zur Verfügung (9 g auf 150 g geglühter Boden). Die isolierten heterotrophen Organismen waren also an die Verwertung von Maisstroh als Kohlenstoff- und Energiequelle gebunden. Damit lag der Fokus dieser Anreicherung auf Mikroorganismen, die am Umsatz von Maisstroh als einem typischen Ernterückstand landwirtschaftlich genutzter Böden beteiligt sind.

Beim Abbau toter pflanzlicher Biomasse werden zu verschiedenen Stadien unterschiedliche Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen einbezogen. Daran sind zu den verschiedenen Zeitpunkten auch jeweils unterschiedliche Organismen beteiligt. Stärke, Proteine und freie Zucker aus Nadeln von *Picea abies* (Gemeine Fichte) und *Populus tremula* (Espe) werden beispielsweise sehr schnell abgebaut, während Lipide später, und Cellulose und Lignin zuletzt in die Mineralisierung einbezogen werden (HAIDER et al., 1985; LÄHDESMÄKI UND PIISPANEN, 1988; ATLAS und BARTHA, 1993; HAIDER, 1996). Der Abbau dieser verschiedenen Komponenten ist an bestimmte enzymatische Eigenschaften gebunden, die nicht in allen Organismen vorhanden sind. So fanden INSAM et al. (1996) im Verlauf der Kompostierung von mit Stroh vermischtem Rinderdung neben der Abnahme von mikrobieller Biomasse und Abbauleistung auch Veränderungen der funktionalen Eigenschaften der mikrobiellen Gemeinschaften, die sie

mit Hilfe von Substrat-Nutzungs-Profilen verfolgten (vgl. Kapitel 2.3). Gerade die Fähigkeiten zum Abbau vergleichsweise schwer zugänglicher Substanzen wie Cellulose und Lignin sind auf einige Spezialisten beschränkt und vor allem bei Pilzen verbreitet (SUTHERLAND und CRAWFORD, 1981; EVANS und PALMER, 1983; FANG et al., 1997). Aus diesem Grunde spielen Pilze beim Abbau von Pflanzenmaterial eine besondere Rolle (KJØLLER und STRUWE, 1994). Dagegen werden leichter abbaubare Materialien, wie Polysaccharide und Lipide, auch durch Bakterien, beispielsweise Vertretern der Gattung *Bacillus*, mit Hilfe extrazellulärer hydrolytischer Enzyme angegriffen und als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt (BROCK, et al., 1994).

Von den in der vorliegenden Arbeit mittels BIOLOG untersuchten Isolaten konnten nur zu einem Drittel sicher bis auf Art- oder Gattungsebene identifiziert werden, wobei 3 dieser Isolate *Stenotrophomonas maltophilia* zugeordnet wurden (vgl. Kapitel 5.1). Dieser Befund ist zunächst erstaunlich, wenn man die große Anzahl verschiedener Mikroorganismen im Boden berücksichtigt (TORSVIK et al., 1990a). So wurden bei einer Studie von BORNEMANN et al. (1996) mit kultivierungs-unabhängigen Methoden von 124 rDNA-Klonen aus einem landwirtschaftlich genutzten Boden lediglich 5 Duplikate gefunden. Dieser Unterschied verdeutlicht die selektiven Bedingungen in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen, die die Diversität im Boden einschränken und gleichzeitig für eine Anreicherung von Mikroorganismen sorgen, die an dem Prozess des Maisstrohumsatzes beteiligt sind. Aber auch durch die Beschränkung auf Kultivierungstechniken wird die Erfassbarkeit der insgesamt im Boden vorhandenen mikrobiellen Vielfalt auf einen Bruchteil reduziert.

Stenotrophomonas maltophilia wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der Anreicherung in den Maisstrohrotten isoliert (nach 3, 4 und 26 Wochen). Diese Art wurde früher der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet (als *Xanthomonas maltophilia*), unterscheidet sich von den Vertretern dieser Gattung jedoch dadurch, dass sie keine phythopathogene Wirkung hat (DEBETTE und BLONDEAU, 1980; PALLERONI und BRADBURY, 1993; MOORE et al., 1997). LAMBERT et al. (1990) untersuchten schnell-wachsende aerobe und heterotrophe Bakterien von der Wurzeloberfläche junger Zuckerrüben. *Stenotrophomonas maltophilia* konnte von allen untersuchten Feldern isoliert werden und zählte auch zahlenmäßig zu den häufigsten Bakterien, was die Bedeutung dieses Bodenbakteriums in landwirtschaftlich genutzten Böden unterstreicht.

Ein weiteres Isolat, welches nach der BIOLOG-Methode der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet werden konnte, wurde aus der 2 Wochen alten Maisstroh-Rotte gewonnen. Ob es sich dabei jedoch tatsächlich um einen pflanzenpathogenen Vertreter handelt, oder ob dieses Isolat der Gattung *Stenotrophomonas* zuzuordnen ist, konnte – aufgrund der Datenbank, welche nicht zwischen diesen beiden Gattungen unterscheidet – nicht entschieden werden. Einige Vertreter der Gattung *Xanthomonas* treten häufig auch außerhalb ihrer Wirtspflanzen im Boden auf (ATLAS und BARTHA, 1993) und werden daher auch leicht aus Böden isoliert. In

einer Studie von ODIER und MONTIES (1977) wurde bei einem Vertreter der Gattung *Xanthomonas* ligninolytische Aktivität bei zusätzlicher Verfügbarkeit von Glucose festgestellt, wobei in Flüssigkultur 70 % des aus Weizenstroh isolierten Lignins innerhalb von 7 Tagen verwertet wurden. Gleichzeitig wurde eine sehr starke Peroxidase-Aktivität der eingesetzten Isolate festgestellt. In der gleichen Arbeit wurde ein ähnliches ligninolytisches Verhalten von *Bacillus*-Isolaten beschrieben, welche in der Lage waren, unter den beschriebenen Bedingungen 23 – 40 % des eingesetzten Lignins zu veratmen. Einige Isolate aus den Maisstrohrotten konnten auch in der vorliegenden Arbeit aufgrund der auffälligen Kolonieform *Bacillus cereus* var. *mycoides* zugeordnet werden (SCHLEGEL, 1992).

Bei *Agrobacterium tumefaciens* und *Pseudomonas* spec., welche ebenfalls unter den Isolaten zu finden waren, handelt es sich um typische Rhizosphären-Bakterien (GISI, 1990). Die Bedingungen in einer Rhizospäre sind – ebenso wie bei Beginn der Inkubation in den Mikrokosmen – durch eine vergleichsweise gute Kohlenstoffversorgung gekennzeichnet, die hohe Umsatz- und Wachstumsraten, teilweise mit Generationszeiten von nur 5 h, zur Folge haben. Pseudomonaden heften sich häufig an organische Partikel an, wo sie für einen begrenzten Zeitraum diskrete Kolonien bilden können. Nach Verbrauch der leicht verfügbaren Komponenten werden sie wieder von langsamer wachsenden Organismen verdrängt, so dass ihr verstärktes Auftreten im Boden nur zeitweilig ist (ROVIRA und SANDS, 1971; SANDS und ROVIRA, 1971).

Eine phylogenetische und funktionale Einordnung der Pilz-Isolate war nur eingeschränkt möglich. Da die Charakterisierung der Pilze nur mit Hilfe von partieller Sequenzierung der 18S rDNA erfolgte, war eine direkte Identifizierung nicht möglich. UEDA et al. (1995) und BORNEMANN et al. (1996) nutzten die Informationen aus Sequenzierungen partieller Abschnitte bakterieller 16S rDNA zur phylogenetischen Einordnung von Bodenbakterien, ohne diese zu kultivieren und bis auf Gattungs- oder Artebene zu identifizieren. Dieses ist aufgrund der limitierten Information auch nicht möglich, bietet jedoch einen Überblick über die Diversität im Boden. Übereinstimmung dieser Abschnitte mit bekannten Sequenzen sind im Anhang E angegeben.

6.1.2 Kritische Betrachtung der Mikrokosmos Experimente zum Maisstroh-Umsatz im Boden

In der Arbeit sollte der Umsatz von Maisstroh als ein typischer Ernterückstand in landwirtschaftlich genutzten Böden charakterisiert werden. Da für einige Ansätze nicht im Freiland gearbeitet werden konnte (definierte mikrobielle Gemeinschaften, ¹⁴C-markiertes Maisstroh, geglühter Boden), erfolgten die Untersuchungen in Mikrokosmen unter definierten Bedingungen nach Wanner (1999) in Anlehnung an die Richtlinien der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln. Mikrokosmen

gelten als Bindeglied zwischen rein mathematischen Modellen und komplexen Freilanduntersuchungen und können als wertvolles Instrument zur Analyse der Dynamik von Populationen und Ökosystemen genutzt werden (LAWTON, 1995). Die Nachteile von Mikrokosmen liegen neben ihrer beschränkten Größe vor allem in ihrer Einfachheit und ihren häufig künstlichen Bedingungen (CARPENTER ET AL, 1995). Darüber hinaus fehlte in den definierten Gemeinschaften die Gruppe der Protozoen, die sich vor allem von den jeweils häufigsten Bakterien- und Pilzpopulationen ernähren, wodurch sie einen positiven Einfluss auf die mikrobielle Diversität haben (WILD, 1995). Dadurch werden insgesamt die mikrobielle Aktivität (SETÄLÄ et al., 1988) und der Kohlenstoffumsatz im Boden gefördert (FOISSNER, 1999). Lassen sich Ergebnisse aus Mikrokosmos-Untersuchungen im Labor jedoch nicht direkt auf die Vorgänge im Freiland übertragen, sind sie durchaus geeignet, spezielle Prozesse und Effekte im Boden detailliert zu untersuchen (CARPENTER ET AL, 1995; MOORE et al., 1996).

In den durchgeführten Experimenten wurde unter anderem geglühter Boden eingesetzt. Durch den Glühvorgang wurden neben der Verfügbarkeit von Kohlenstoff und Stickstoff auch die Partikelgrößenverteilung verändert, wobei der Tongehalt von 16,1 % auf 3,8 % reduziert wurde. In ähnlicher Weise muss auch das eingesetzte Maisstroh betrachtet werden. Das ^{14}C -markierte Strohmaterial zeichnete sich durch einen wesentlich höheren Stickstoffgehalt aus, was sich auch in den C/N-Verhältnissen ausdrückt (33,9 : 1 im inaktiven Maisstroh und 19,2 : 1 im ^{14}C -markierten, vgl. Tabelle 5-4). Dies wurde durch das unterschiedliche Alter der Maispflanzen bei der Ernte verursacht. Während der Mais mit dem natürlichen Isotopenverhältnis nach der Reife der Pflanzen geerntet wurde, geschah dieses bei dem unter $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre im Phytotron aufgezogenen Mais bereits vor der Milchreife. Die chemische Zusammensetzung in dem radioaktiven Strohmaterial wird sich also von dem gereiften Material leicht unterscheiden. Dies wird beispielsweise daran deutlich, dass lediglich das C/N-Verhältnis des Maisstrohes mit dem natürlichen Isotopenverhältnis aus Literaturwerten (41,6 : 1, VANLAUWE et al., 1994) annähernd vergleichbar ist. Dagegen zeichnet sich das ^{14}C -markierte Strohmaterial sogar durch ein noch engeres C/N-Verhältnis aus als die leicht verwertbare „aktive“ Fraktion (27,0 : 1, VANLAUWE et al., 1994).

In den Versuchen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Kapitel 3.6 und 3.7) waren die Versuchsergebnisse von hohen Schwankungen begleitet. Beispielsweise lagen die relativen Standardabweichungen aus der Bestimmung der Keimzahlen in dem 26-Wochen-Experiment mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften meist zwischen 20 und 50 % (vgl. Tabelle 5-7). Allerdings ist die Bestimmung von Lebendkeimzahlen in Form koloniebildender Einheiten häufig mit hohen Schwankungen verbunden. Dagegen erscheinen relative Standardabweichungen zwischen 20 und 30 % bei der Bestimmung der DMSO-Reduktase-Raten zunächst ungewöhnlich hoch (vgl. Abschnitte 5.6.2 und 5.7.2). Diese wurden dadurch verursacht, dass bei jeder Probenahme jeweils drei unabhängig voneinander angesetzte Kolben aus

dem Versuch genommen und beprobt wurden. Die Schwankungsbreite der Messergebnisse wurde also durch den Versuchsaufbau hervorgerufen und spiegelt die natürliche Variabilität besser wider als die mehrfache Beprobung eines einzelnen Mikrokosmos. Dadurch lassen sich auch die teilweise negativen Mineralisierungsraten erklären (vgl. Tabelle 5-5, Variante H C: nativer Boden). Möglicherweise lassen sich die Unterschiede aber teilweise auch auf Inhomogenitäten im Ausgangsmaterial und die natürliche Variabilität zurückführen. In der vorliegenden Arbeit wurde zerkleinertes Strohmaterial (Fläche bis zu 1 x 5 mm Größe) in gesiebten Boden eingebracht und verteilt. Durch die Art der Einarbeitung ließen sich einzelne „Hot-Spots“ nicht vermeiden, die zu einer heterogenen Verteilung mikrobieller Biomasse und Aktivitäten geführt haben kann. Vermutlich aus diesem Grund wurde in Einzelfällen auch innerhalb eines Kolbens eine hohe Variabilität festgestellt.

Die in den Abschnitten 5.6.4 und 5.7.3 beschriebenen Ergebnisse zum Ergosterolgehalt in den Mikrokosmen zeichnen sich neben einer hohen Schwankungsbreite dadurch aus, dass vergleichbare Ansätze der beiden Experimente zum gleichen Zeitpunkt unterschiedliche Gehalte an Ergosterol im Boden aufwiesen (vgl. Tabelle 6-1). Obwohl sich die anfänglichen Ergosterolgehalte (nach 1 Woche) in den Varianten nicht unterschieden, waren nach 2 Wochen bereits deutlich höhere Werte in den Mikrokosmen der Versuchsreihe zur Beschreibung von Pflanzenschutzmittel-Effekten (vgl. Kapitel 3.7) zu sehen. Gleichzeitig unterscheiden sich jedoch die Werte für die mikrobielle Aktivität nur unerheblich (vgl. Abbildungen 5-30 und 5-40). Dabei gelten gerade die geringe Subjektivität und Variabilität als Vorteile der Bestimmung des Ergosterolgehaltes im Boden gegenüber einer direkten mikroskopischen Beobachtung (STAHL et al., 1995). Ähnlich hohe Variationskoeffizienten, wie in Tabelle 5-8 angegeben, sind von NEWELL et al. (2000) bei Bezug des Ergosterolgehaltes auf die organische Masse verrottenden Schlickgrases (*Spartina alterniflora*) bestimmt worden.

Tabelle 6-1 Vergleich von Ergosterolgehalten in Mikrokosmen mit gleichen Anfangsbedingungen in verschiedenen Versuchsabschnitten (H A und H B: Abbau von Maisstroh in Mikrokosmen über 26 Wochen; A I und B I: Mikrokosmen zur Beschreibung von Pflanzenschutzmittel-Effekten; angegeben sind Mittelwerte aus 3 Parallelen mit jeweils 3 unabhängigen Aufarbeitungen).

Inkubationsdauer (Wochen)	Ergosterolgehalte im Boden ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden)			
	geglühter Boden + Maisstroh		autoklavierter Boden + Maisstroh	
	H A	A I	H B	B I
1	0,16 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,15	0,17 $\pm$ 0,42
2	3,82 $\pm$ 2,05	7,13 $\pm$ 2,90	5,56 $\pm$ 0,21	9,62 $\pm$ 1,96
3	3,08 $\pm$ 1,28	9,30 $\pm$ 1,28	4,35 $\pm$ 1,64	9,11 $\pm$ 0,64

Neben den versuchsbedingten Gründen für die Variabilität könnte auch ein verändertes Extraktionsprotokoll zu geringeren Abweichungen führen. Eine Optimierung könnte darin bestehen, einzelne Schritte zu verkürzen. Sinnvoll wäre ein Arbeiten mit Aliquoten in den Schritten 8-10 des in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Protokolls. Bislang wurde nach der Extraktion mit n-Hexan die gesamte Hexan-Phase weiter genutzt. Werden im weiteren Verlauf dagegen Aliquote mit einem geringen Volumen verwendet, reduzieren sich die Aufarbeitungszeiten, und somit auch die Kontaktzeiten des extrahierten Ergosterols mit Sauerstoff und Licht, welche zu einer Degeneration führen können. Darüber hinaus wurde das Abdampfen unter Stickstoffstrom (Schritt 12) bislang in zylindrischen Glasgefäßen mit einem Volumen von 22 mL durchgeführt. Der Einsatz konischer Gefäße läßt eine Volumenreduzierung (in Schritt 13) und damit eine bessere Konzentrierung zu. Dadurch kann der Aufarbeitungsschritt 14 komplett entfallen. Durch diese Modifikationen wird eine Verkürzung und Standardisierung der Aufarbeitung möglich.

6.1.3 Vorversuch mit definierten und mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften

In diesem Vorversuch wurde der Abbau von ^{14}C -markiertem Maisstroh durch definierte und komplexe mikrobielle Gemeinschaften in Boden-Mikrokosmen untersucht. Dabei wurde durch die verschiedenen mikrobiellen Gemeinschaften in den Mikrokosmen innerhalb von 6 Wochen zwischen 21 und 31 % des eingesetzten ^{14}C -markierten Maisstrohs mineralisiert (vgl. Abschnitt 5.3.1). Dieser Wert lag deutlich unter den in den nachfolgenden Experimenten festgestellten Raten (vgl. Abschnitte 5.4.1 und 5.6.1). Dieses liegt vermutlich an der höheren Menge an Maisstroh, die in dem Vorversuch eingesetzt wurde (7,5 %, w/w, im Vorversuch

verglichen mit 5 %, w/w, bzw. 2 %, w/w, in den folgenden Experimenten). Möglicherweise ist in den Mikrokosmen mit der höchsten Maisstroh-Menge eine Substratsättigung erreicht. Dadurch verlängert sich – bei gleichbleibenden absoluten Mineralisierungsraten – die Abbauphase des organischen Materials, so dass die relativen Mineralisierungsraten niedriger ausfallen (je größer die Menge an organischem Material, desto länger benötigen die beteiligten Mikroorganismen für dessen Abbau, SCHLEGEL, 1992).

Die geringste Mineralisierung fand nach Inokulation durch eine Bodensuspension statt, während die stärkste in den Mikrokosmen beobachtet wurde, die nur durch unsteriles Maisstroh beimpft wurden (V 6, vgl. Kapitel 3.3). Allerdings kann dadurch nicht generell der Rückschluss auf eine besondere Bedeutung der Organismen auf dem Maisstroh gezogen werden, da diese auch in den Anreicherungskulturen vorhanden gewesen sein sollten (V 3 und V 4). Letztere jedoch zeichneten sich nur durch eine minimal höhere Mineralisierung des Maisstrohs nach 6 Wochen verglichen mit der Inokulation durch eine Bodensuspension (V 5) aus. Dagegen wurde auch in den Ansätzen mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften noch ein höherer Anteil des eingesetzten ¹⁴C-Maisstrohs mineralisiert. Insgesamt betrachtet hatte das jeweils eingesetzte Inokulum keinen sehr großen Einfluss auf die umgesetzte Menge organischen Materials.

In den Bandenmustern der denaturierenden Gradienten-Gele mit den PCR-Produkten der DNA aus den 6 Wochen inkubierten Mikrokosmen wurde eine hohe Ähnlichkeit der Varianten mit Inokulation durch eine Anreicherungskultur festgestellt (vgl. Abbildung 5-6). Allerdings kann nur von einer teilweisen Übereinstimmung im Laufverhalten der DNA-Banden mit den Varianten, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden (V 5 und V 7), gesprochen werden. Möglicherweise wurden in den Flüssigkulturen bevorzugt Organismen angereichert, die unter diesen besonderen Kultivierungsbedingungen (z.B. Sauerstoffeintrag durch ständiges Schütteln) das zugegebene Maisstroh optimal verwerten konnten, die im Boden aber einen geringeren Selektionsvorteil haben und somit weniger effektiv das Maisstroh umsetzen konnten (vgl. Abbildung 5-5). Ein Hinweis darauf geben die Unterschiede in den Bandenmustern im Vergleich zu den Varianten V 5 und V 7, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden. Dagegen unterschieden sich die Versuchsbedingungen in den Boden-Mikrokosmen vor allem durch ihren hohen Anteil an Grenzflächen (Boden-Bodenwasser-Bodenluft) von den Flüssigkulturen. Letztere sind für den Abbau von organischem Material insbesondere dann von Vorteil, wenn extrazelluläre Enzyme für den Abbau von Makromolekülen benötigt werden (HENDRICKS, 1974; FLETCHER, 1991; GRIFFITH und FLETCHER, 1991).

6.1.4 Einfluss der Nährstoffversorgung komplexer mikrobieller Gemeinschaften auf die Mineralisierung des Maisstrohs

Die stärkste mikrobielle Aktivität und Mineralisierung von Maisstroh in Mikrokosmen mit geglühtem Boden, vergleichbar mit nativem Boden, wurden nach Düngung mit Kalkammonsalpeter beobachtet (vgl. Kapitel 5.4). Dieses liegt vermutlich an der Reduktion des Stickstoffgehaltes in der Bodenmatrix durch den Glühvorgang. Waren im Boden mit der intakten Kohlenstoffstruktur noch 0,081 % Stickstoff vorhanden, war dieser im geglühten Boden nicht mehr nachweisbar (vgl. Tabelle 3-3) oder nur in einer sehr geringen Konzentration (0,015 % bei der Untersuchung durch das Zentrallabor für Chemische Analyse der Forschungszentrum Jülich GmbH, vgl. Tabelle 5-4). Dieser Verlust ist möglicherweise auf eine Verflüchtigung organischer Stickstoffverbindungen aus dem Boden zurückzuführen. So fanden SCHULTEN et al. (1995) mehr als 40 verschiedene Komponenten, die sie mittels Pyrolyse-GC/MS auftrennten, wobei ähnlich wie beim Glühvorgang Temperaturen von 500 bis 700 °C erreicht werden (LEINWEBER und SCHULTEN, 1998). Möglicherweise wurde neben dem Stickstoffgehalt auch die Bioverfügbarkeit anderer Nährstoffe verringert.

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden der Mikrokosmen wurde nach 6-wöchiger Inkubation mittels DGGE untersucht (Abbildung 5-11), wobei nur geringe Abweichungen in den Varianten mit unterschiedlicher Nährstoffversorgung festgestellt wurden. Beim Vergleich der Varianten mit den stärksten Unterschieden (Abbildung 6-1) wird eine besonders hohe Ähnlichkeit zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften in den Mikrokosmen mit luftgetrocknetem Boden (A) und mit geglühtem Boden, der eine Stickstoffdüngung in Form von Kalkammonsalpeter erhalten hatte (E), deutlich.

Ein Hinweis auf die Bedeutung einer großen Diversität ergibt sich beim Vergleich der Varianten E und G (beide geglühter Boden + KAS-Düngung), die sich nur durch ihr Inokulum unterscheiden. Die Mikrokosmen der Variante G wurden nicht wie bei Variante E durch eine Bodensuspension, sondern lediglich durch unsteriles Maisstroh angeimpft und enthielten somit nicht die gesamte Bodenmikroflora. Nach 6 Wochen konnte sowohl im Abbau des ^{14}C -Maisstrohs, als auch in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und den C/N-Verhältnissen kein Einfluss des Inokulums gefunden werden. Dieses bedeutet, dass die Organismen, die nach 6 Wochen in den Mikrokosmen dominant waren, sowohl in der Bodenlösung als auch auf dem Maisstroh vorhanden waren, und dass sich diese auch bei dem unterschiedlichen Gesamtinokulum durchsetzen konnten.

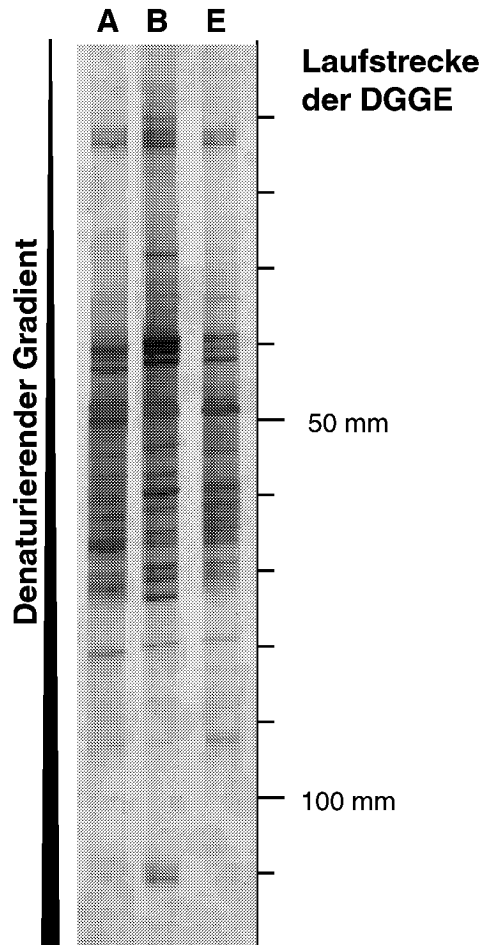


Abbildung 6-1

Ausschnitt der gelelektrophoretischen Auftrennung (DGGE) von PCR-Produkten der 16S rDNA komplexer mikrobieller Gemeinschaften in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit luftgetrocknetem Boden (A), mit geglühtem Boden ohne Nährstoff-Zugabe (B) bzw. mit KAS-Düngung (E) 6 Wochen nach Versuchsbeginn (Spuren aus Abbildung 5-11 neu geordnet; zur genauen Beschreibung der Varianten siehe Kapitel 3.4). DGGE: Gradient 40 - 55 %, 130 V, 6 h.

Anhaltspunkte für die Humifizierung des eingesetzten Pflanzenmaterials waren in allen Varianten vorhanden, auch wenn innerhalb dieser Versuchsreihe keine Untersuchung von Huminsäuren mittels Kernmagnetischer-Resonanzspektroskopie durchgeführt wurden. Hinweise auf die Humifizierung sind jedoch durch die Veränderung der C/N-Verhältnisse gegeben. Das Verhältnis lag im Boden der Mikrokosmen mit geglühtem Boden vor der Inkubation annähernd bei 20 : 1 und mit nativem Boden bei 10 : 1. Nach der 6-wöchigen Inkubation erreichte das C/N-Verhältnis in allen untersuchten Varianten Werte zwischen 9 : 1 und 12 : 1. Dieses Verhältnis ist zwar immer noch etwas weiter als in einer nativen Parabraunerde (vgl. Abbildung 5-12), allerdings kann ein Umsatz von Pflanzenmaterial innerhalb von 6 Wochen auch nur einen ersten Schritt im Humifizierungsprozess darstellen. In dieser Zeit werden zunächst die leicht zugänglichen Kohlenstofffraktionen durch die mikrobiellen Gemeinschaften genutzt. Bei diesen kann es sich um Kohlenhydrate handeln, die sich durch ein sehr weites C/N-Verhältnis auszeichnen. Der Abbau dieser Stoffe erfolgt – neben dem Abbau von Proteinen – häufig als erster Schritt bei der Humifizierung von Pflanzenmaterial (KONONOVA, 1966; BAYLEY et al., 1985; TIETEMA et al., 1985; WILSON et al., 1985; LÄHDESMÄKI und PIISPANEN, 1988; NUSBAUMER et al., 1996). Interessanterweise unterschieden sich die C/N-Verhältnisse im Boden der verschiedenen Mikrokosmen nicht, obwohl der Anteil des mineralisierten Maisstrohs bei Stickstoffdüngung höher war. Allerdings war der relative Unterschied in der mineralisierten Menge an Maisstroh zwischen den Varianten

mit und ohne KAS-Düngung niedriger als der Variationskoeffizient der C/N-Verhältnisse in den Böden. Der Unterschied in der mikrobiellen Aktivität zwischen den vergleichbaren Varianten ohne (Varianten B und C) und mit Stickstoff-Zugabe (E und F) fiel dagegen nach vierwöchiger Inkubation wesentlich deutlicher aus. So lag die mikrobielle Aktivität in den stickstoffarmen Mikrokosmen nur bei etwa 50 % der gedüngten Varianten. Es kann daher angenommen werden, dass die Mineralisierungsraten und die mikrobielle Aktivität zu Beginn der Versuche (bis zu Tag 13) in allen Varianten ähnlich war und dass die mikrobiellen Umsätze in dieser Zeit für die Veränderung des weiten C/N-Verhältnisses bei Versuchsbeginn verantwortlich waren. In dieser Zeit wurde auch der größte Anteil des $^{14}\text{CO}_2$ produziert. Gleichzeitig wurden vermutlich vor allem die leicht abbaubaren Komponenten des Maisstrohs angegriffen. Dazu werden neben den Kohlenhydraten auch Proteine gezählt (DELL'AGNOLA und FERRARI, 1979; LÄHDESMÄKI und PIISPANEN, 1988), die möglicherweise als Stickstoffquelle dienen konnten. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass nach zwei Wochen noch kein Unterschied in der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung zwischen den verschiedenen Varianten sichtbar war.

Insgesamt betrachtet waren die mikrobiellen Prozesse bei der Humifizierung von Maisstroh in Variante D (Zugabe einer künstlichen Bodenlösung in die Mikrokosmen mit geglühtem Boden) denen in Variante A mit nativer Bodenstruktur am ähnlichsten. Lediglich bei Betrachtung der DMSO-Reduktase-Raten nach 4-wöchiger Inkubation (vgl. Abbildung 5-10) wurden niedrigere Werte ermittelt. Gleichzeitig unterschied sich jedoch der Anteil an mineralisiertem Radiokohlenstoff nicht von dem in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden und KAS-Düngung (Varianten E, F und G) und von denen mit einer intakten Kohlenstoffmatrix (Variante A). Nach 28 Wochen ist die Variante mit SSE-Zugabe die einzige, die bezüglich der Mineralisierung des ^{14}C -markierten Maisstrohs noch mit der Variante mit nativem Boden vergleichbar ist. Da durch den Glühvorgang die Bodenstruktur zerstört und neben dem organischen Kohlenstoff auch Stickstoff entfernt wurde (vgl. Tabelle 3-3), kann auch ein Verlust anderer Elemente nicht ausgeschlossen werden. Diese könnten dann in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden ins Minimum geraten und es würde trotz Stickstoff-Düngung kein weiterer mikrobieller Umsatz stattfinden. SSE scheint also aufgrund seiner an eine natürliche Bodenlösung angepassten Mineralstoffzusammensetzung für den Einsatz in Mikroskosmos-Experimenten mit einer zerstörten Bodenstruktur sehr gut geeignet. Allerdings sollte für die Humifizierung von Strohmaterial ein höherer Zusatz an Stickstoff erwogen werden als bei ANGLE et al. (1991) beschrieben, da sich dieses Material durch ein besonders weites C/N-Verhältnis auszeichnet. Gleichzeitig kann der Zusatz von Calcium in Verbindung mit anorganischem Stickstoff und den zumindest zu Beginn leicht verfügbaren Kohlenhydraten die Humifizierung stärker fördern (DELL'AGNOLA und FERRARI, 1979), so dass sich der Einsatz von Kalkammonsalpeter in praxisüblicher Menge in Kombination mit der SSE-Lösung positiv für diesen Prozess auswirken könnte.

6.1.5 Umsatz von Maisstroh durch definierte und komplexe mikrobielle Gemeinschaften

Die innerhalb von 6 Wochen durch definierte mikrobielle Gemeinschaften mineralisierte Menge an ^{14}C -markiertem Maisstroh erreichte in keiner der 10 Ansätze die Höhe wie in den Mikrokosmen mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft. Allerdings konnten durch drei verschiedene definierte Gemeinschaften (Varianten 4, 7 und 9) nach einwöchiger Inkubation ebenso wie durch die komplexe Gemeinschaft 21 – 23 % des applizierten Radiokohlenstoffes mineralisiert werden. Insofern scheint zu Beginn der Einfluss einer hohen mikrobiellen Diversität nur gering zu sein. Von größerer Bedeutung als die Species-Vielfalt scheint die Species-Zusammensetzung zu sein. Dieses wird dadurch deutlich, dass nur in 3 von 10 Ansätzen eine vergleichbare Menge $^{14}\text{CO}_2$ wie durch die komplexe Gemeinschaft produziert wurde, während 4 andere (Varianten 1, 2, 5 und 8) nur 60 % dieses Wertes erreichten. Nach 6-wöchiger Inkubation lag die Mineralisierung zwar in allen Varianten unter der mit der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft, allerdings wurden wiederum große Unterschiede zwischen den Varianten festgestellt. Während 2 Varianten (Varianten 6 und 7) mehr als 80 % der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion durch die komplexe Gemeinschaft erreichten, blieben 2 andere Varianten (Varianten 1 und 2) unter 50 % dieses Wertes.

Dieser Befund lässt sich in Einklang bringen mit der „Redundante-Species“-Hypothese, die besagt, dass vor allem die Organismen-Zusammensetzung für die Funktion von Ökosystemen notwendig ist, wobei eine minimale Anzahl von Arten benötigt werden (LAWTON et al., 1996). Die Zugabe oder das Entfernen weiterer Arten ist dagegen redundant und führt nicht zu messbaren Effekten. Allerdings bleibt anzumerken, dass in dem beschriebenen Experiment nur wenige Funktionen (Mineralisierung von $^{14}\text{CO}_2$ und die Entstehung von Huminsäuren) untersucht wurden, so dass diese Aussage auch nur für diese speziellen Funktionen getroffen werden kann. Darüber hinaus sind weitere Theorien zur Bedeutung der Species-Vielfalt für Ökosystemprozesse nicht auszuschließen. Dazu gehören die Rivet-Hypothese, nach der das Fehlen einer Art auch eine Beeinträchtigung der Funktionen eines Ökosystems zur Folge hat, und die „Idiosynkratische-Antwort“-Hypothese, die davon ausgeht, dass die Aufgaben der einzelnen Arten zu komplex sind, um Vorhersagen treffen zu können (LAWTON, 1994).

Die Deutung der Mineralisierungsraten wird durch die ^{13}C -NMR-Spektren extrahierter Huminsäuren (nach 6-wöchiger Inkubation) gestützt. Obwohl sich die Spektren (vgl. Abbildung 5-27) leicht voneinander unterscheiden, ist in den Huminsäurenextrakten aller mittels NMR analysierter Varianten die Entstehung funktioneller Gruppen erkennbar, die typisch für Huminstoffe sind (v.a. Aliphate, Aromaten und Carbonyl-Funktionen, FLAIG, 1964; SCHULTEN und SCHNITZER, 1997; NARDI et al., 2000). Unterschiede zwischen den Spektren sind vor allem bei einer chemischen Verschiebungen (δ) zwischen 170 und 175 ppm zu erkennen, wo die Signale von Carboxylfunktionen zu finden sind (PICCOLO et al., 1990; WAIS, 1997). In diesem Bereich der chemischen Verschiebung traten in den Spektren der

Variante 1 (definierte Gemeinschaft) und der Variante k (komplexe Gemeinschaft, Abbildung 5-27) Signale auf, die auch in dem Spektrum der Merzenhausener Parabraunerde (Abbildung 5-25 B), nicht aber in dem von Maisstroh (Abbildung 5-25 A) zu sehen waren. Interessanterweise trat dieses Signal nicht im Spektrum der Variante 6 (definierte Gemeinschaft) auf, obwohl dieses sich durch eine wesentlich höhere Mineralisierungsrate des ^{14}C -Maisstrohs auszeichnete (vgl. Abbildung 5-13). Auch scheint die Pilzbiomasse für die Entstehung der Carboxylgruppen keinen nennenswerten Einfluss zu haben, da der Ergosterolgehalt in allen mittels ^{13}C -NMR untersuchten Varianten mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften sehr niedrig war (Varianten 1, 2 und 6, Abbildung 5-14), in der Variante mit der komplexen Gemeinschaft (Variante k) jedoch vergleichsweise hoch.

Gleichzeitig ist eine Abnahme der Intensität in den ^{13}C -NMR-Spektren bei $\delta = 60 - 105$ ppm zu erkennen. In diesem Bereich liegen die Signale von Peptiden und Kohlenhydraten (HIMMELSBACH und BARTON, 1980; PRESTON und SCHNITZER, 1984; MALCOLM, 1989; HESSE et al. 1991; PICCOLO et al., 1990; KÖGEL-KNABNER, 1997; NARDI et al., 2000). Der Abbau dieser leicht verfügbaren Substanzen erfolgt sehr schnell und ist wohl auch verantwortlich für die anfänglich hohen Mineralisierungsraten. Ähnliches fanden auch WEBSTER et al. (2000) für den Abbau von Blättern des Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne*) heraus, wobei die höchste Mineralisierungsrate innerhalb der ersten Woche nach Zugabe des Pflanzenmaterials festgestellt wurde. MARSTORP (1996a und b) ordnete ebenfalls eine starke CO_2 -Produktion 20 h nach Zugabe von Weidelgras zu Boden dem Abbau wasserlöslicher Aminosäuren und Kohlenhydrate zu. WEBSTER et al. (2000) erklärten die Zunahme von Signalen im Bereich von Alkyl-Kohlenstoff in ^{13}C -NMR-Spektren von Pflanzenmaterial bereits nach eintägiger Inkubation im Boden durch die Anreicherung schwerer abbaubarer Rückstände und nicht durch deren Neubildung. Ähnliches wurde durch CONDRON und NEWMAN (1998) vermutet, die die Zunahme stabiler Rückstände im Boden durch einen verringerten Anteil an frischem organischen Material erklärten.

Sowohl nach Inokulation durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften (mit einer hohen Diversität) als auch durchdefinierte mikrobielle Gemeinschaften (mit geringer Diversität) kam es zu strukturellen Veränderungen an frischem organischen Material, die zur Bildung huminstofftypischer funktioneller Gruppen führten. Dagegen zeigten die Untersuchungen der Huminsäuren mittels GPC keine deutliche Veränderung der Retentionszeiten nach 6-wöchiger Inkubation in den Mikrokosmen mit den definierten Gemeinschaften gegenüber dem Ausgangsmaterial (vgl. Abschnitt 5.5.4.1), während die Huminsäuren aus den Mikrokosmen mit der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft an Länge zunahm (vgl. Abschnitt 5.5.4.2). Es ist daher davon auszugehen, dass der Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Neubildung von Huminstoffen differenziert betrachtet werden muss.

Möglicherweise ist – wie auch von WEBSTER et al. (2000) angenommen – der mikrobielle Abbau der Kohlenhydrate dafür verantwortlich, dass sich die huminstofftypischen Kohlen-

stoffstrukturen anreichern können, während jedoch keine Neusynthese und Verknüpfung der Bruchstücke hin zu längeren Huminstoff-Molekülen stattfindet. Dieses wiederum bedeutet, dass das von BALDOCK et al. (1990) und BALDOCK und PRESTON (1995) als Indikator für die Abbaubarkeit von organischem Kohlenstoff im Boden vorgeschlagene Alkyl-C-zu-O-Alkyl-C-Verhältnis geeignet ist, den Grad der Verrottung von Pflanzenmaterial zu charakterisieren. Jedoch kann dieser Indikator nicht herangezogen werden, um die Neubildung von Huminstoffen aufgrund mikrobieller Aktivität zu beschreiben. So lassen sich auch die vergleichsweise hohen Mineralisierungsraten mit der Entstehung von Signalen im Bereich von Alkylen, Aromaten und Carbonyl-Funktionen in den ^{13}C -NMR-Spektren in Einklang bringen. Da es sich bei den Molekülgruppen, deren Signale als erste aus den ^{13}C -NMR-Spektren verschwinden, um leicht abbaubare Strukturen handelt (v.a. Kohlenhydrate), ist deren Mineralisierung auch in den Mikrokosmen mit einer geringen Diversität leicht nachvollziehbar, da die Fähigkeit zum Abbau solcher Verbindungen generell weit verbreitet ist. Da sich jedoch die mineralisierten Mengen an ^{14}C -Maisstroh in den verschiedenen Mikrokosmen mit unterschiedlicher Organismen-Zusammensetzung unterschied, kann davon ausgegangen werden, dass neben der Verwertung von einfachen Zuckern auch komplexere Stoffe durch einzelne Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaften angegriffen wurden. Es zeigte sich also, dass die gewählte Artenvielfalt (jeweils 10 Bakterien- und 3 Pilzisolat), abhängig von der Zusammensetzung, zwar geeignet sein kann, Ernterückstände im Boden zu mineralisieren, jedoch nicht unbedingt neue Huminstoffe zu bilden. Es ließ sich keine direkte Abhängigkeit der Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs von der Organismen-Zusammensetzung ableiten. So ergab auch der Vergleich der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit der Pilzbiomasse (Ergosterolgehalt) nach 6-wöchiger Inkubation keine Korrelation.

6.1.6 Mikrokosmen Umsatz von Maisstroh durch komplexe mikrobielle Gemeinsschaften

Die Unterschiede im Abbau des ^{14}C -markierten Maisstroh zwischen den Varianten mit nativen Boden (H C) und den reinokulierten Böden (geglühter Boden: H A, und autoklavierter Boden: H B, vgl. Kapitel 3.6) waren bereits in den ersten Versuchswochen sichtbar. Vor allem in der ersten Woche wurde im nativen Boden eine doppelt so hohe $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion wie in den reinokulierten Böden gemessen (vgl. Tabelle 5-5). Dieser Unterschied läßt sich dadurch erklären, dass die mikrobielle Aktivität im nativen Boden bei Versuchsbeginn bereits deutlich messbar war, wogegen diese im geprühten wie im autoklavierten Boden direkt nach der Inokulation wesentlich geringer war und eine Bestimmung der DMSO-Reduktase-Raten mit der in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Methode daher nicht möglich war. Der stärkste Anstieg der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion war in den Mikrokosmen mit nativem Boden bereits nach zwei Wochen beendet, während dieser in den reinokulierten Mikrokosmen noch eine Woche länger anhielt. In der folgenden Zeit sanken die Mineralisierungsraten aufgrund des Verbrauches der

leicht verwertbaren Bestandteile des Maisstrohs. Die insgesamt etwas größere mineralisierte Menge an Maisstroh in den Mikrokosmen mit nativem Boden war in den ersten 4 bis 6 Wochen von einer gegenüber den reinokulierten Varianten H A und H B erhöhten mikrobiellen Aktivität begleitet, wodurch schwerer abbaubare Komponenten möglicherweise zu einem größeren Anteil in die Mineralisierung einbezogen wurden. Die Nutzung dieser stabileren Substanzen ist jedoch an bestimmte Enzyme geknüpft und erfolgt somit nur durch wenige spezialisierte Mikroorganismen. Andere Organismen, die diese Komponenten nicht nutzen können, werden verdrängt. So kommt es nach 6 Wochen auch hier zu einer Abnahme der DMSO-Reduktase-Raten auf vergleichbare Werte wie in den Mikrokosmen mit geglühtem oder autoklaviertem Boden.

Neben der mikrobiellen Aktivität wurden als Biomasse-Parameter die Keimzahlen als koloniebildende Einheiten bestimmt (vgl. Abschnitt 5.6.3). Im Gegensatz zu den DMSO-Reduktase-Raten wurden hierbei nur bei Versuchsbeginn im nativen Boden (H C) höhere Werte als in den reinokulierten Varianten H A (mit geglühtem Boden) und H B (mit autoklaviertem Boden) ermittelt. Danach (bis zur 6. Woche) lagen die Keimzahlen in den reinokulierten Mikrokosmen vergleichsweise hoch, wobei die Werte im autoklavierten Boden noch etwas über denen im geglühten Boden lagen. Dieser Befund steht im Einklang mit den DMSO-Reduktase-Raten. Hierbei zeigt sich der Einfluss der unterschiedlichen Versuchsbedingungen in den Mikrokosmen mit der im nativen Boden vorhandenen Mikroflora und den mit einer Bodensuspension inokulierten Mikrokosmen. In letzteren waren die sogenannten *r*-Strategen (ANDREWS, 1984) im Vorteil, die in der Lage waren, die leicht verfügbaren Komponenten zu verwerten. Gleichzeitig zeichneten sie sich durch hohe Wachstumsraten aus. Diese Wachstumsraten sind auch typisch für Organismen, die sich unter Kultivierungsbedingungen mit einfachen Kohlenstoffquellen (z.B. Glucose, Stärke oder Aminosäuren) leicht anreichern lassen und bei den guten Wachstumsbedingungen auf Agarplatten deutliche Kolonien ausbilden. Die Versuchsbedingungen in den reinokulierten Böden waren demnach vergleichbar mit „klassischen Kultivierungsbedingungen“, die zur Anreicherung, Isolierung und Anzucht in der Mikrobiologie verwendet werden, wodurch sich die in den ersten Versuchswochen ermittelten hohen Keimzahlen in den reinokulierten Böden erklären lassen. Dagegen bestand die mikrobielle Gemeinschaft in den Mikrokosmen mit nativem Boden aus der autochthonen Mikroflora mit einer vergleichsweise hohen Biomasse (vgl. Abschnitte 5.6.2 und 5.6.1). Daher waren die *r*-Strategen, die auch als allochthon oder zymogen (SCHLEGEL, 1992) bezeichnet werden, einem höheren Konkurrenzdruck ausgesetzt als in den reinokulierten Böden, die bei Versuchsbeginn nur eine geringe mikrobielle Biomasse enthielten.

Es war – zumindest in den ersten 4 Wochen – in den verschiedenen Varianten in Abhängigkeit von der Inokulation zu erwarten, dass sich unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften entwickelten. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Beim Vergleich der Bandenmuster der

PCR-Produkte von DNA aus geglühtem und autoklaviertem Boden, 1, 2 und 10 Wochen nach der Inokulation durch eine Bodensuspension, konnten keine Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 5-34). Gleiches gilt auch für den Vergleich von Proben aller Varianten nach 2- und nach 10-wöchiger Inkubation. Auffällig ist dabei die hohe Übereinstimmung der Bandenmuster nach 2 Wochen, die jeweils durch 6 Banden mit hoher Intensität charakterisiert sind. Dagegen sind die Bandenmuster der PCR-Produkte von DNA aus 10 Wochen alten Bodenproben deutlich diverser und zeichnen sich untereinander durch einzelne Abweichungen aus. Die in den Proben nach 2 Wochen Inkubation niedrigere Bandenzahl, verglichen mit denen nach 10 Wochen, lässt sich durch stärker selektive Bedingungen erklären (REBER und WENDEROTH, 1997). Diese wurden zu Beginn der Inkubation durch Stress verursacht, der aus einer Veränderung der physikalischen und chemischen Bedingungen eines Lebensraumes, wie dem Einarbeiten von Ernterückständen in Boden, resultieren kann.

Interessanterweise widersprechen diese Zusammenhänge den Ergebnissen von SHARMA et al. (1998b). Diese Autoren fanden nach Einarbeitung von Maisstroh in Boden eine Zunahme der funktionellen mikrobiellen Diversität. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe von BIOLOG-Platten vorgenommen, deren Prinzip auf der Veratmung verschiedener Kohlenstoffquellen – ursprünglich zur Identifizierung unbekannter Isolate – beruht (BOCHNER, 1989). Während der Inkubation von Bodensuspensionen in den Vertiefungen der BIOLOG-Platten tritt jedoch bakterielles Wachstum auf (GARLAND und MILLS, 1991; GARLAND und MILLS, 1994; HAACK et al., 1995; WÜNSCHE et al., 1995), wobei speziell Mikroorganismen angereichert werden, die an „klassische“ Kultivierungsbedingungen angepasst sind. Die sich so entwickelnden Populationen können sich also erheblich von dem Inokulum unterscheiden, so dass die gewonnenen Substrat-Nutzungs-Profile nicht unbedingt das funktionale Potential der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft widerspiegeln (SMALLA et al., 1998). Der Anstieg der Diversitätsindices nach Einarbeitung von Maisstroh in Boden gegenüber einer Kontrollvariante ohne Zugabe organischen Materials (SHARMA et al., 1998b) beruht also möglicherweise auch auf der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen anfänglichen Zunahme an kultivierbaren Organismen, die maßgeblich an der Entstehung der Substrat-Nutzungs-Profile in den BIOLOG-Platten beteiligt sind, während gleichzeitig die Diversität der gesamten Gemeinschaft gering bleibt (vgl. Abschnitt 5.6.5).

Insgesamt betrachtet scheinen sich die mikrobiellen Gemeinschaften in den verschiedenen Mikrokosmen nicht sehr voneinander zu unterscheiden. Dieser Widerspruch zu den mikrobiologischen Summenparametern lässt sich dadurch entkräften, dass mittels DGGE von PCR-Produkten nur die häufigsten Organismen erfasst werden können (MUYZER et al., 1993). Da jedoch in allen Varianten die allochthonen Mikroorganismen aufgrund ihrer hohen Wachstumsraten zu Beginn der Versuche vermutlich die zahlenmäßig stärksten Populationen bilden konnten, werden diese auch bevorzugt mittels DGGE erfasst. Es ist also möglich, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften der verschiedenen Varianten in den ersten 4 Wochen

voneinander unterschieden, diese Unterschiede jedoch mittels DGGE nicht erfasst werden konnten.

Die Ergosterolgehalte in den Mikrokosmen (vgl. Abbildung 5-32) stiegen besonders in den reinokulierten Böden (Varianten H A und H B) langsamer an als die Keimzahlen und die mikrobielle Aktivität. Beim Abbau leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen haben Bakterien gegenüber Pilzen einen Wachstumsvorteil (STAMATIADIS et al., 1990). Letztere besitzen jedoch die Fähigkeit, refraktäre Verbindungen zu nutzen, was ihnen zu einer späteren Phase des Abbaus von Vorteil sein könnte (GUGGENBERGER und FREY, 1999). Neben den längeren Generationszeiten von Eukaryoten – verglichen mit Prokaryoten – ist der relativ späte Anstieg der pilzlichen Biomasse in den Mikrokosmen möglicherweise auf diesen Zusammenhang zurückzuführen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse von BRODER und WAGNER (1988), die einige Pilze (z.B. *Penicillium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*) verstärkt aus späteren Stadien der Humifizierung von Ernterückständen (Mais, Weizen und Soja) isolierten.

In den ^{13}C -Flüssig-NMR-Spektren der Huminsäureextrakte war in allen Varianten mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften die Entwicklung von huminsäurentypischen funktionellen Gruppen sichtbar (vgl. Abschnitt 5.6.7 und 5.5.4.1). Die in den Spektren dokumentierte Humifizierung unterschied sich in den verschiedenen Ansätzen lediglich durch die Ausgangssituation, da die Kohlenstoffmatrix in den Mikrokosmen mit autoklaviertem bzw. nativem Boden die Veränderung der NMR-Signale verdeckt. Insbesondere die schnelle Abnahme der Signalintensität bei $\delta = 60\text{-}90$ ppm und bei $\delta = 103$ ppm im geglühten Boden (vgl. Abbildung 5-36) spricht für den raschen Verbrauch von Kohlenhydraten. Dagegen nahm die Intensität des Peaks bei $\delta = 55\text{-}60$ ppm erst später und nur unvollständig ab. In diesem Bereich liegen Signale von Aminosäuren (SCHNITZER et al., 1993) und Ligninen (HIMMELSBACH und BARTON, 1980), die sich zu überlagern scheinen. Die Aminosäuren werden nach Verbrauch der Kohlenhydrate in den mikrobiellen Metabolismus einbezogen und können als leicht verfügbare Stickstoffquelle genutzt werden. Allerdings stand den Mikroorganismen durch die Stickstoffdüngung mit Kalkammonsalpeter eine direkt verwertbare Stickstoffquelle zur Verfügung, so dass – zumindest zu Beginn der Inkubation – ohnehin kein Stickstoff-Mangel auftreten dürfte. Die Abnahme der Signalintensität in den beschriebenen Bereichen fiel in den Spektren der Huminsäuren aus autoklaviertem bzw. nativem Boden aufgrund der hohen Hintergrundsignale der intakten Kohlenstoff-Matrix entsprechend geringer aus.

Im aromatischen Bereich fällt die Abnahme des Signales bei $\delta = 153$ ppm auf. In diesem Bereich könnten sauerstoffs substituierte aromatische Ligninkohlenstoffatome vorliegen (z.B. Methoxy-Gruppen, HIMMELSBACH und BARTON, 1980), die mit der Zeit in den Umsatz des Maisstrohs einbezogen werden. Dieses Signal könnte zwar auch durch sauerstoff- oder stickstoffs substituierte Aromaten hervorgerufen werden (HESSE et al., 1991). Da es jedoch

nicht in dem ^{13}C -NMR-Spektrum der Huminsäuren aus der Merzenhausener Parabraunerde vorkommt (vgl. Abbildung 5-25 B), ist von einer Überlagerung der Signale nicht auszugehen.

In allen Spektren – insbesondere im geglühten Boden – war die deutliche Zunahme der Signalintensitäten im Bereich der Carbonyl- und Carboxyl-C-Atome ($\delta = 170\text{-}175$ ppm, PICCOLO et al., 1990; WAIS, 1997, Abbildungen 5-36 bis 5-38) zu beobachten. Diese Signale waren nicht im Spektrum des Maisstroh-Extraktes, jedoch in dem der Merzenhausener Parabraunerde zu sehen (vgl. Abbildung 5-25 A und B). Sie können daher als Indikator für die Humifizierung gelten. Darüber hinaus war in einigen der Spektren ein Signal bei einer chemischen Verschiebung von 169 ppm zu beobachten (z.B. in den Huminsäurenextrakten der Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden vor und 10 Wochen nach Beginn der Versuche und – besonders markant – mit nativem Boden nach 26 Wochen, vgl. Abbildungen 5-37 A, 5-37 B und 5-38 C). Allerdings war das Auftreten der Signale nicht konsistent und daher vermutlich auf Carbonat-Kohlenstoff, der durch Sorption von atmosphärischem CO_2 in der 0,14 M NaOD (deuterierte Natronlauge) fixiert ist, zurückzuführen (vgl. WAIS, 1997).

Die Ergebnisse der GPC-Untersuchungen waren weniger eindeutig. So lag zu Beginn der Inkubation die mittlere Molekülgröße in den Huminsäurenextrakten des autoklavierten Bodens schon vergleichsweise hoch (vgl. Tabelle 5-9). Dagegen wurde die mittlere Molekülgröße in den Huminsäurenextrakten des nativen Bodens durch das zugegebene Strohmaterial gegenüber der reinen Parabraunerde (vgl. Abschnitt 5.5.4.1) reduziert. Offensichtlich führte das Tyndallisieren des Bodens der Variante H B zu einer Vergrößerung von Huminstoff-Aggregaten. Diese Beobachtung lässt sich mit der von JENNEMANN et al. (1986) in Einklang bringen, die mittels Elektronenmikroskopie ein Verklumpen von Tonpartikeln durch Autoklavieren zeigen konnten. Während in den anderen Mikrokosmen die Länge der Huminstoffe bis zur 26. Woche zunahm, reduzierte sie sich in den Huminsäurenextrakten des autoklavierten Bodens nach der 10. Inkubationswoche auf den entsprechenden Wert der nativen Parabraunerde.

6.1.7 Einfluss von Dithianon auf den Umsatz von Maisstroh und die daran beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften

Dieses Experiment sollte zeigen, ob die Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden durch ein Pflanzenschutzmittel beeinflusst werden kann. Durch die Applikation von Dithianon in die Mikrokosmen mit einer Konzentration im Boden von 50 mg kg^{-1} wurde die Mineralisierung des zugegebenen Maisstrohs nicht wesentlich beeinflusst und erreichte in allen Varianten nach 3-wöchiger Inkubation 30 % der eingesetzten Radioaktivität. Allerdings war zwischenzeitlich (3. Tag bis 14. Tag nach Applikation des Dithianon) die Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden reduziert. Diese konnte sich in der Folgezeit jedoch wieder erholen. Während der Einfluss des Fungizids

auf den Maisstrohabbau also insgesamt als gering bezeichnet werden kann, war der Einfluss auf die mikrobielle Aktivität deutlicher. Dabei wurde nach Dithianon-Einsatz eine kurzzeitige Hemmung der DMSO-Reduktase-Raten in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden beobachtet (nur in der 1. Woche) und eine langfristige Verringerung der mikrobiellen Aktivität in den Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden (bis zur 10. Woche nach der Inokulation). Die Hemmung in den Mikrokosmen mit geglühtem Boden fiel besonders stark aus (fast komplette Hemmung der mikrobiellen Aktivität), wodurch sich die anfänglichen geringen Mineralisierungsraten erklären lassen. Dagegen war die Verringerung der mikrobiellen Aktivität in den Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden nur bis zum 2. Tag in gleicher Weise deutlich. Im weiteren Verlauf stieg diese jedoch auf Werte an, die mit denen der unbehandelten Mikrokosmen mit geglühtem Boden vergleichbar waren. Aus diesem Grund war auch keine Beeinträchtigung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zu erwarten, da die stärkste Mineralisierung des ^{14}C -Maisstrohs nach dem 2. Tag bis zum 14. Tag erzielt wurde. Dagegen wirkte sich die erhöhte mikrobielle Aktivität in den unbehandelten Mikrokosmen mit autoklaviertem Boden – wie auch schon in dem zuvor diskutierten Experiment (vgl. Kapitel 6.1.6) – nicht auf die Mineralisierung aus.

Der deutlichste Einfluss durch Dithianon war bei den Ergosterolgehalten im Boden zu beobachten. Hierbei zeigte sich noch nach 3 Wochen eine Verringerung der pilzlichen Biomasse in den behandelten Mikrokosmen: Während sich in den unbehandelten Mikrokosmen nach 2-wöchiger Inkubation eine pilzliche Population aufgebaut hatte, waren erste Anzeichen dafür in den behandelten Mikrokosmen erst nach 3 Wochen zu beobachten, wobei die Ergosterolgehalte zu diesem Zeitpunkt noch deutlich unter denen der unbehandelten Mikrokosmen lagen. Interessanterweise scheint die Hemmung der pilzlichen Biomasse nicht mit der Entwicklung der mikrobiellen Aktivität zu Beginn der Inkubation verknüpft zu sein, da auch in den unbehandelten Varianten erst nach 2 Wochen pilzliche Biomasse gefunden wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Dithianon-Applikation nicht nur eine Hemmung der pilzlichen Entwicklung bewirkt hat, sondern auch eine temporäre Hemmung der gesamten mikrobiellen Aktivität und damit auch der Mineralisierung von Maisstroh.

Dieser Einfluss auf die bakteriellen Gemeinschaften ist auch bei der Analyse von 16S rDNA-Fragmenten mittels DGGE belegt. Während in autoklaviertem Boden nach 2-wöchiger Inkubation keine Unterschiede im Bandenmuster der unbehandelten (B I, Abbildung 6-2) und der behandelten Variante (B II) erkennbar waren, unterschieden sich die entsprechenden Bandenmuster der Mikrokosmen mit geglühtem Boden. Dabei zeichnete sich das DNA-Muster der behandelten Variante (A II) durch eine hohe Übereinstimmung mit den beiden zuvor genannten Varianten aus. Dagegen fehlten in dem Bandenmuster der DNA aus den Mikrokosmen ohne Dithianon-Einsatz einige Banden, die in den übrigen Proben deutlich waren. Eine Sequenzanalyse der mittels DGGE aufgetrennten Abschnitte der 16S rDNA, wie bei ENGELN et al. (1998) beschrieben, könnte weitere Informationen über den Dithianon-

Einfluss auf die mikrobielle Bodenzönose geben. Allerdings konnten die Autoren keine kausalen Zusammenhänge der Effekte durch die eingesetzten Herbizide auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften herleiten. Voraussetzung dafür wäre ein tieferes Verständnis der mikrobiellen Prozesse im Boden, welches sich auf Organismenebene von Populationsdynamik über funktionelle Diversität hin zu den molekularen Steuerung von Schlüsselprozessen erstreckt, und deren Erforschung zur Zeit eine der Hauptaufgaben der Biologie ist (TIEDJE et al., 1999).

Dennoch lässt auch der Vergleich der Bandenmuster auf einen Einfluss des Dithianon-Einsatzes auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften schließen. Diese strukturellen Veränderungen wirkten sich jedoch nicht auf die mikrobielle Aktivität oder auf die Funktion des Maisstrohabbaus aus, so dass der Einfluss des Dithianon vermutlich auf einzelne Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft beschränkt war. Diese wurden durch das vermehrte Auftreten anderer Mitglieder ersetzt, so dass mikrobielle Aktivität und Mineralisierung als Summenparameter nicht beeinflusst wurden. Dieses wird auch dadurch belegt, dass die Anzahl der Banden in den beiden betroffenen Spuren (A I und A II) nicht wesentlich beeinflusst wurde: Die geringere Bandenzahl bei einer Laufweite von 50-70 mm in A I im Vergleich zu A II wurde durch eine große Bandenzahl zwischen 70 und 90 mm ausgeglichen.

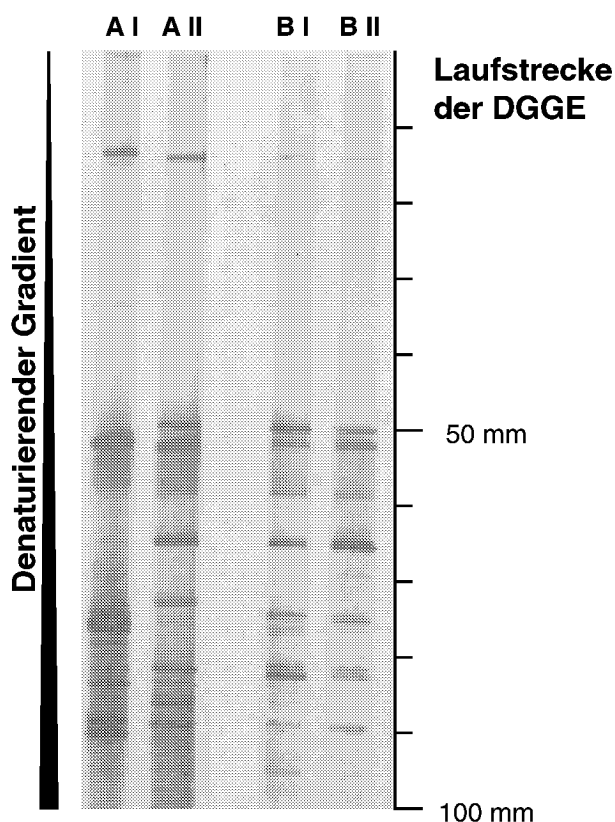


Abbildung 6-2

Vergleich mikrobieller Gemeinschaften in Maisstrohrotte-Mikrokosmen in geglühtem (A) bzw. autoklaviertem Boden (B) ohne (I) und mit (II) Dithianon-Behandlung 14 Tage nach der Inokulation mit einer Bodensuspension. DGGE: Gradient 40 – 55 %, 55 V, 16 h.

Ebenso wie bei der Mineralisierung von Maisstroh ist auch bei der Entstehung von Huminsäuren kein deutlicher Einfluss durch die Dithianon-Applikation zu erkennen. Die in Abbildung 5-44 und 5-45 gezeigten Spektren unterscheiden sich, abgesehen von den Signalen durch die Kohlenstoffmatrix im autoklavierten Boden, nur geringfügig voneinander. Lediglich bei einer chemischen Verschiebung von 169 ppm tritt in beiden Varianten mit Dithianon-Applikation ein zusätzlicher Peak auf. In diesem Bereich sind Signale von Carbonsäuren und ähnlichen funktionellen Gruppen zu finden (PICCOLO et al., 1990; HESSE et al., 1991; WAIS, 1997). Darüber hinaus ist kein Einfluss auf die Bildung von Huminsäuren durch Dithianon vorhanden. Gleiches gilt auch für typische ^{13}C -NMR-Signale des Dithianon: Keines der bei WANNER (1999) beschriebenen Signale taucht in den Huminsäuren der Bodenproben aus den Mikrokosmen auf, die mit Dithianon behandelt wurden. Dieses konnte auch nicht erwartet werden, da kein ^{13}C -markiertes Dithianon eingesetzt wurde und darüber hinaus ein großer Teil des eingesetzten Dithianon vermutlich innerhalb der 26-wöchigen Inkubation abgebaut wurde. So fanden WANNER et al. (2000) in einer typischen Parabraunerde innerhalb von 64 Tagen eine Mineralisierung von Dithianon von etwa 33 %. Ebenso wie die ^{13}C -NMR-Spektren, die eine Beschreibung funktioneller Gruppen in den Huminsäuren erlaubten, ergaben auch die GPC-Chromatogramme keine sichtbare Beeinflussung der entstandenen Huminsäuren.

Die Vermutung, dass die Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden durch ein Pflanzenschutzmittel auch einen Effekt auf die Bildung von Huminsäuren hat, ließ sich für Dithianon nicht bestätigen. Obwohl die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaften, insbesondere der Bodenpilze, durch die Zugabe von Dithianon gestört wurde, wurde die Mineralisierung des eingesetzten ^{14}C -markierten Maisstrohs nur temporär und auch nur in geringem Ausmaß gehemmt. Die Charakterisierung der aus Maisstroh entstandenen Huminsäuren mit den beschriebenen Methoden ergab jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf einen Effekt durch das Pflanzenschutzmittel.

6.2 Zusammenfassende Bewertung

6.2.1 Bedeutung einer hohen mikrobiellen Diversität für die Humifizierung von Ernterückständen

Der Zusammenhang zwischen struktureller Diversität und Vielfalt der Abbauleistungen von Mikroorganismen, die für den Kohlenstoffumsatz im Boden von Bedeutung sind, ist noch weitgehend unbekannt (MEYER et al., 1993; GARLAND und MILLS, 1994); BEARE et al., 1995). In jüngerer Zeit wird in diesem Zusammenhang vermehrt versucht, die funktionale Diversität mit der strukturellen Diversität mikrobieller Gemeinschaften zu verknüpfen, wobei vor allem mit Hilfe von Mikrotiterplatten der Firma BIOLOG „physiologische Community-Fingerprints“ (CLPP = community-level physiological profiling) erstellt werden (BOSSIO und SCOW, 1995; LEHMAN et al., 1995; INSAM und RANGGER, 1997; SHARMA et al., 1998a und b). Einen Überblick über den Einsatz dieser Substrat-Nutzungs-Profile in der Bodenmikrobiologie und den damit verbundenen Problemen bei der Auswertung gibt GARLAND (1997).

Einen quantitativen Zusammenhang zwischen Diversität und Abbauleistung von Mikroorganismengemeinschaften im Boden versuchte SALONIUS (1981) herzustellen. Er beimpfte trockene, durch Gammastrahlen sterilisierte Bodenproben mit Bodensuspensionen, die unterschiedlich artenreich waren, aber annähernd gleiche Biomasse aufwiesen, und inkubierte diese Ansätze in geschlossenen Gefäßen. Die gemessene Atmungsaktivität war umso höher, je artenreicher das Inokulum war. In ähnlicher Weise argumentierten auch SETÄLÄ et al. (1998), die einen veränderten Kohlenstoffabbau in heterotrophen Systemen mit verringerter Artenvielfalt auf veränderte Interaktionen zwischen den verschiedenen trophischen Ebenen zurückführten. Gegen die Vermutung, dass eine veränderte Diversität notwendigerweise die Mineralisierung von organischem Material im Boden beeinflusst, spricht jedoch, dass die Abbauleistung in den Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften, deren Diversität jeweils aus 10 Bakterien- und 3 Pilzisolaten bestand, teilweise an die Abbauleistung durch eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft heranreichte (vgl. Abschnitt 5.5.1).

Sicherlich ist jedoch nicht allein die Diversität, sondern vielmehr die Organismenzusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft entscheidend. Maisstroh, welches in der vorliegenden Arbeit als typischer Ernterückstand eingesetzt wurde, besteht zu 48,0 % der Trockensubstanz (37,8 % des Kohlenstoffgehaltes) aus „aktiven“, mikrobiell leicht verwertbaren Komponenten, die ein C/N-Verhältnis von 27 : 1 aufweisen (VANLAUWE et al., 1994). Durch die Zugabe dieses leicht verwertbaren Materials werden selektive Bedingungen geschaffen, die zur Anreicherung schnellwüchsiger *r*-Strategen (ANDREWS, 1984) und zu einer Erniedrigung der Gleichmäßigkeit in der Artenverteilung führen (*evenness*, PIELOU, 1966). Dieses ist sichtbar an der geringen Anzahl der Banden im denaturierenden Gel der PCR-Produkte von DNA aus 2 Wochen alten Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften (Abbildung 5-33).

Da es sich bei kultivierbaren Bakterien häufig um die erwähnten *r*-Strategen handelt, werden sowohl in den Mikrokosmen mit komplexen Gemeinschaften als auch in denen mit den Bodenisolaten die gleichen Organismen kultiviert, so dass in den Mikrokosmen mit den definierten Gemeinschaften die Mineralisierung des Maisstrohs in den ersten Wochen vergleichbar war mit der Mineralisierung durch die komplexe mikrobielle Gemeinschaft.

Dieser Befund dürfte sich jedoch nicht bei längerer Inkubation der Mikrokosmen wiederholen lassen. Nach 6-wöchiger Inkubation war bereits mehr als 40 % des ^{14}C -Kohlenstoffes mineralisiert. Die leicht verfügbaren Bestandteile des Maisstrohs waren somit verbraucht und die selektiven Bedingungen, die zunächst die schnellwachsenden Arten förderten, veränderten sich zugunsten der langsam wachsenden *K*-Strategen (GISI, 1990). Diese Umkehrung entspricht den theoretischen Analysen von MACARTHUR und WILSON (1963 und 1967), wonach erstbesiedelnde Organismen in einem schwach oder gar nicht besiedeltem Umweltkompartimenten mit ausreichender Nährstoffversorgung *r*-selektiert sind. In dem Moment, wo diese sich etablieren, wird sich der Selektionsdruck hin zur *K*-Selektion wandeln. Eine vergleichbare Abfolge im Auftreten physiologisch verschiedener Gruppen von Mikroorganismen wurde auch von HU et al. (1999) beschrieben: Sehr schnell nach dem Einarbeiten einer Mischung aus Hafer- und Platterbsenmaterial stieg die Anzahl der Organismen an, die – ähnlich wie die erwähnten *r*-Strategen – an eine gute Nährstoffversorgung angepasst sind (copiotroph). Die oligotrophen Bakterien, die durch hohe Substrataffinitäten an geringe Kohlenstoff-Konzentrationen in ihrer Umwelt angepasst sind (BUTTON, 1991), erreichten erst nach etwa 4 Wochen ihre maximale Populationsdichte. HU et al. (1999) konnten dabei sogar eine hemmende Wirkung durch hohe Kohlenstoffverfügbarkeit zeigen.

Dieser funktionelle und strukturelle Wechsel der mikrobiellen Gemeinschaft hat vermutlich Einfluss auf das Schicksal der Ernterückstände im Boden nach Verbrauch der leicht verfügbaren Bestandteile. BÅÅTH (1994) erkannte den oligotrophen Bakterien im Boden nur eine geringe Bedeutung für die direkten Kohlenstoffumsätze zu, obwohl WHANG und HATTORI (1988) gerade bei Isolaten dieser Gruppe die Fähigkeit zur Nutzung aromatischer Komponenten von Lignin feststellen konnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass die Aussage von BÅÅTH (1994) nur auf die Mineralisierung der leicht verfügbaren Komponenten der in den Boden eingearbeiteten Pflanzenrückstände zutrifft. Dagegen scheint diese Gruppe der oligotrophen Bakterien oder *K*-Strategen auf die weitere Humifizierung der Abbauprodukte durchaus einen großen Einfluss zu haben, indem durch diese Organismen verstärkt komplexe Kohlenstoffquellen genutzt werden (SEMENOV, 1991; HU und VAN BRUGGEN, 1997). Dieses deutete sich in den Ergebnissen der GPC-Untersuchungen an, die eine Vergrößerung der mittleren Molekülmasse in den Huminsäureextrakten innerhalb der 6-wöchigen Inkubation nur nach Inokulation mit der komplexen Bodensuspension ergab (vgl. Abschnitt 5.5.4.2 und Kapitel 6.1.5). Dagegen waren sowohl die Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh als auch die ^{13}C -NMR-Spektren der nach 6

Wochen Inkubation extrahierten Huminsäuren in den Ansätzen mit komplexen und definierten Gemeinschaften vergleichbar.

6.2.2 Untersuchung von Xenobiotika in prozessorientierten Mikrokosmen

Biologische Prozesse haben eine zentrale Bedeutung für die ökologischen Funktionen im Boden. Aus diesem Grund beinhalten heute die Zulassungsbedingungen für Pflanzenschutzmittel auch eine Bewertung neuangemeldeter Substanzen in Bezug auf Nebeneffekte auf Bodenmikroorganismen und ihre Umsatzleistungen (MALKOMES und EHLE, 1997; HAIDER und SCHÄFFER, 2000), wobei Biomasse und Enzymaktivitäten als Indikatoren für die Wirkung auf die sogenannten „Nicht-Zielorganismen“ dienen (WARDLE und PARKINSON, 1990; SCHÄFFER, 1993; LIN und BROOKES, 1999). Da der Umsatz von organischem Material im Boden dessen Bodenqualität erheblich beeinflusst, gelangen auch die damit verbundenen Prozesse in das Blickfeld dieser Untersuchungen. Nebeneffekte auf den Kohlenstoffumsatz im Boden wurden vor allem nach Fungizideinsatz beschrieben (WAINWRIGHT, 1978). Der Umsatz von organischem Material wurde dabei entweder anhand von Modellsubstanzen (ATLAS et al., 1978; KATAYAMA et al., 1992; SUYAMA et al., 1993 a und b) oder nach Einarbeitung von Pflanzenmaterial in Boden untersucht (MALKOMES, 1980; HARDEN et al., 1993; HUUSELA-VEISTOLA et al., 1994; HART und BROOKES, 1996). Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen liegt dabei auf der mikrobiellen Biomasse und bestimmten Bodenenzymen, sowie der Mineralisierung von zugegebenem organischen Material. Zu diesem Zweck wurde teilweise auch radioaktiv markiertes Stroh eingesetzt (HARDEN et al., 1993). Erst in jüngster Zeit wurde die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in diesem Zusammenhang beachtet. Die Untersuchungen erstrecken sich dabei von der vergleichsweise groben Unterscheidung zwischen bakterieller und pilzlicher Biomasse (HART und BROOKES, 1996; LIN und BROOKES, 1999) bis zur Erstellung physiologischer und genetischer Fingerprints mittels BIOLOG-Platten bzw. DGGE-Analysen, teilweise begleitet von Sequenz-Analysen (ENGELEN et al., 1998; ØVREÅS et al., 1998; EL FANTROUSSI et al., 1999). Die Verknüpfung funktionaler Untersuchungen anhand der Mineralisierung organischen Materials, Bodenenzymen und CLPP (vgl. Abschnitt 6.2.1) mit strukturellen Analysen von Biomasse und DGGE-Mustern führten zur sensitiven Erfassung potentieller Nebeneffekte durch Pflanzenschutzmittel-Applikationen auf die Bodenbiozönose (ENGELEN et al., 1998; EL FANTROUSSI et al., 1999). Der für die Bodenqualität wichtige Prozess der Humifizierung von Ernterückständen (PERUCCI et al., 1997), der über die reine Mineralisierung hinausgeht, kann so jedoch nicht erfasst werden. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die oben beschriebenen Methoden an prozessorientierten Mikrokosmen angewandt, die aufgrund der kohlenstofffreien Bodenmatrix geeignet sind, den Aufbau von Huminsäuren aus Ernte-

rückständen mit Hilfe von Gelpermeationschromatographie und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zu verfolgen.

Wie in Kapitel 6.5 bereits angesprochen, ist die Methode der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese von PCR-Produkten geeignet, die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden zu beschreiben. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass sich bei Zugabe von leicht verwertbaren Kohlenstoff- und Energiequellen die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften verändert. Es erfolgt ein schnelles und starkes Anwachsen der allochthonen Mikroflora. Eine Veränderung von Bandenmustern im denaturierenden Gradientengel aufgrund anthropogener Einflüsse, wie beispielsweise nach einer Pflanzenschutzmittel-Applikation, sagt also nur etwas über diese allochthone Mikroflora aus. Eine nachhaltige Schädigung oder Veränderung der autochthonen Mikroflora kann mit dieser Methode nicht erfasst werden. Dieses gilt jedoch nicht bei der Untersuchung von Langzeiteffekten, wenn der größte Teil des zugegebenen Materials zum Zeitpunkt der Probennahme bereits mineralisiert bzw. inkorporiert ist. Aus diesem Grund ist für die Bewertung anthropogener Einflüsse auf den Umsatz von eingetragenen Kohlenstoff in Agrarökosysteme nicht der Zeitraum von entscheidender Bedeutung, in der die stärkste Mineralisierung stattfindet, sondern der der später ablaufenden Humifizierung. Dieses wird auch durch die hier dargestellten Experimente mit definierten mikrobiellen Gemeinschaften deutlich, bei denen die Mineralisierung und die Zunahme huminstofftypischer funktioneller Gruppen in den Huminsäurenextrakten kaum beeinflusst wurden, während durch die geringe Diversität die Zunahme der mittleren Molekülgröße in den Huminsäurenextrakten gestört wurde.

Als Fazit aus der Fallstudie mit Dithianon lässt sich die Eignung der beschriebenen Mikrokosmen zur Untersuchung anthropogener Effekte auf die Humifizierung von Ernterückständen ableiten. Allerdings bedarf es weiterer und längerer Versuche, bevor eine Übertragbarkeit gefundener Effekte auf landwirtschaftliche Böden möglich wird. Der Einsatz definierter Gemeinschaften zur Beurteilung von Nebeneffekten aufgrund des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln in diesem System erscheint dagegen wenig sinnvoll, da die dadurch verursachte geringe Diversität das System zusätzlich destabilisiert. Allerdings können definierte Gemeinschaften in Detailstudien zur Beschreibung einzelner Prozesse und Effekte eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

6.2.3 Schlussfolgerungen

In den beschriebenen prozessorientierten Mikrokosmen wurde der Umsatz von Maisstroh untersucht. Dabei zeigte es sich, dass geglühter Boden – ebenso wie Boden mit einer nativen Kohlenstoffmatrix – geeignet ist, mikrobielle Prozesse zu studieren. Insbesondere die Mineralisierung des zugegebenen Pflanzenmaterials, die DMSO-Reduktase-Raten und die Entwicklung der pilzlichen Biomasse in einem reinokulierten, sterilen Boden entsprachen annähernd den Parametern in nativem Boden. Gleiches galt auch für die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaften, wie anhand der DGGE-Analysen aus Boden extrahierter und partiell amplifizierter 16S rDNA (vgl. Kapitel 6.1.6) gezeigt wurde.

Durch das Glühen bei 600 °C wurde jedoch die Kohlenstoff-Matrix des Bodens zerstört und gleichzeitig der Stickstoffgehalt erheblich reduziert, so dass die Zugabe einer Stickstoffquelle nötig war. Diese erfolgte in Form von anorganischen Stickstoff mittels Kalkammonsalpeter in landwirtschaftlich üblicher Menge. Während der ersten 6 Wochen verlief nach dieser Stickstoff-Behandlung der Abbau des ¹⁴C-markierten Maisstrohs in geglühtem Boden parallel zum Abbau in nativem Boden. Allerdings zeigte sich nach weiteren 22 Wochen, dass nur die Zugaben weiterer Nährstoffe, wie sie in der natürlichen Bodenlösung vorliegen, auf Dauer geeignet ist, die Verhältnisse im Boden zu simulieren (vgl. Kapitel 6.1.4). Diese Zugabe erfolgte nicht mit einem Bodenextrakt, wie bei JAMES (1958) beschrieben, sondern in definierten Mengen nach ANGLE et al. (1994), wodurch eine bessere Standardisierung der Mikrokosmen erreicht wurde.

Der Einsatz definierter Gemeinschaften sollte die Rolle der kultivierbaren Organismen und die Bedeutung einer hohen mikrobiellen Diversität aufzeigen. Mineralisierung und Zunahme huminstofftypischer Strukturen in Huminsäurenextrakten waren nach Einsatz definierter Gemeinschaften innerhalb von 6 Wochen vergleichbar mit den Vorgängen in Mikrokosmen, die durch eine Bodensuspension inokuliert wurden. Dieses kann auf die selektiven Bedingungen in den Mikrokosmen zurückgeführt werden, die zu Beginn der Inkubation schnellwachsende Mikroorganismen bevorzugen. Da es sich bei kultivierbaren Mikroorganismen häufig um *r*-Strategen handelt, haben die definierten Gemeinschaften bei anfänglich guter Versorgung mit leicht verfügbaren Kohlenstoff- und Energiequellen optimale Bedingungen für schnelles Wachstum und Kohlenstoffumsatz (vgl. Kapitel 6.1.6). Allerdings deuteten die GPC-Ergebnisse an, dass nicht alle Funktionen, die für die Humifizierung wichtig sind, durch die Gemeinschaften mit der verringerten Diversität erbracht werden können. So zeigte sich, dass zwar der Anteil huminstofftypischer Komponenten im Verlauf der Inkubation mit den definierten Gemeinschaften zunahm (ersichtlich aus den ¹³C-NMR-Spektren), gleichzeitig jedoch eine Zunahme der mittleren Molekülgröße in den Huminsäurenextrakten wie bei Inkubation mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften nicht stattgefunden hat.

Vor allem die erwähnten *r*-Strategen scheinen in den ersten Wochen der Inkubation für den Umsatz des Maisstrohs verantwortlich gewesen zu sein. Dieses war am hohen Anteil kultivierbarer Organismen ersichtlich, die zudem sehr einfache, in allen Varianten gleiche Bandenmuster in den denaturierenden Gelen hervorriefen. Die selektiven Bedingungen waren in allen Varianten vorhanden, obwohl in Mikrokosmen mit nativem Boden von Beginn an höhere mikrobielle Aktivität und Biomasse festgestellt wurden. Gleichzeitig waren die kultivierbaren Organismen einem höheren Konkurrenzdruck ausgesetzt, so dass hier geringere Keimzahlen im Vergleich zu den reinokulierten Varianten mit geglühtem oder autoklaviertem Boden festgestellt wurden. Dennoch waren die Bandenmuster im denaturierenden Gel 2 Wochen nach Beginn der Inkubation nicht voneinander verschieden, was die Bedeutung der schnellwachsenden *r*-Strategen für den Umsatz leicht verfügbarer Kohlenstoffquellen im Boden unterstreicht. Deren Einfluss nahm jedoch im weiteren Verlauf ab, was ersichtlich war an der Diversifizierung der DNA-Bandenmuster, aber auch an der Abnahme der Keimzahlen und der gleichzeitigen Zunahme der Pilzbiomasse. Gleichzeitig wurde der Aufbau von Huminsäuren aus dem zugegebenen Maisstroh mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften geeignet sind, die Humifizierung von Ernterückständen im Boden zu verfolgen.

In der Fallstudie mit Dithianon in einer Konzentration von 50 mg kg^{-1} Boden wurden die Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh und die mikrobielle Aktivität nur geringfügig beeinflusst. Die Bestimmung von Ergosterol zeigte, dass diese Methode geeignet ist, Einflüsse von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenpilze zu erfassen. Weiterhin wurde die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaften und die Entstehung von Huminsäuren untersucht. Die gefundenen Abweichungen zu unbehandelten Mikrokosmen waren jedoch gering und ein direkter Rückschluss auf die Wirkung des Fungizidwirkstoffes kann ohne weiterführende Untersuchungen nur vermutet werden.

Der Einsatz definierter Gemeinschaften zur Beschreibung von Pestizideinflüssen auf die mikrobiellen Prozesse bei der Humifizierung von Maisstroh scheint aus den genannten Gründen nur zur Untersuchung von Detailfragestellungen geeignet (vgl. Abschnitt 6.2.2). Dagegen können die beschriebenen Mikrokosmen mit geglühten Boden und einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft dazu dienen, die mikrobielle und chemische Dynamik bei der Humifizierung von Ernterückständen und deren Beeinflussung durch Xenobiotika zu erfassen. Allerdings sollte in zukünftigen Untersuchungen dazu auch die Frage der Übertragbarkeit auf die Freilandsituation berücksichtigt werden.

Die vorgelegte Arbeit stellt einen ersten Beitrag dar, Struktur und Funktion von mikrobiellen Gemeinschaften im Boden anhand eines Schlüsselprozesses aufzuklären. Dabei dienten die eingesetzten Methoden, insbesondere die Ergosterol-Bestimmung als Indikator für die Pilzbiomasse und der Einsatz der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden, als wertvolle Techniken für die Bearbeitung der Fragestellung. In Verbindung mit den ^{13}C -NMR-Analysen und der Gelpermeationschromatographie von Huminsäurenextrakten wurde gezeigt, dass einzelne Prozesse, wie beispielsweise die Mineralisierung von Maisstroh und die Zunahme an huminstofftypischen Strukturen im umgesetzten organischen Material, unter geeigneten Bedingungen auch durch definierte mikrobielle Gemeinschaften mit Bodenisolaten erfolgen. Der Aufbau größerer Huminstoffmoleküle wurde dagegen nur nach Inokulation durch eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft beobachtet, wobei in den ersten Wochen wenige dominante, schnellwachsende Bakterien für den Abbau von Maisstroh verantwortlich waren, die im weiteren Verlauf von einer diverseren mikrobiellen Gemeinschaft abgelöst wurden, in der neben Bakterien auch Pilze von großer Bedeutung waren. Beobachtete Effekte auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden durch den Einsatz von Dithianon als Testsubstanz führten dagegen nicht zu einer Beeinträchtigung der Huminstoffbildung innerhalb der Versuchszeit von 26 Wochen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die mikrobiellen Gemeinschaften des Bodens sind verantwortlich für die Stoffkreisläufe und damit auch den Erhalt der Fruchtbarkeit landwirtschaftlich genutzter Böden. Um den Einfluss anthropogener Aktivität, z.B. durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, auf den Boden, seine Mikroflora und die damit verbundenen Stoffkreisläufe beurteilen zu können, ist ein detailliertes Wissen über die Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften in Böden notwendig. In dieser Arbeit wurden die am Umsatz von Ernterückständen beteiligten Mikroorganismen in prozessorientierten Mikrokosmen unter anderem mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) amplifizierter 16S rDNA-Abschnitte untersucht. Die in den Mikrokosmen aufgebauten Huminsäuren dienten als Indikator für die Qualität des Humifizierungsprozesses und wurden mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert.

Boden (Parabraunerde) wurde durch Glühen bei 600 °C von organischem Kohlenstoff befreit. In diesem Boden wurde der Abbau und die Humifizierung ^{14}C -markiertem Maisstrohs durch definierte und durch die natürlich vorkommenden komplexen mikrobiellen Gemeinschaften untersucht. Die definierten Gemeinschaften bestanden aus Bodenisolaten, die am Umsatz von Maisstroh beteiligt sind. Sie wurden in Bodenmikrokosmen mit Maisstroh als einziger Kohlenstoffquelle angereichert. Nach verschieden langer Inkubationszeit wurden die Mikroorganismen aus den Mikrokosmen extrahiert und auf R2A (Standardmedium für Umweltbakterien), Bodenextraktagar (mit geringer Menge leicht verfügbaren Kohlenstoffs) und Malzextraktagar (zur Kultivierung von Pilzen) kultiviert.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsabschnitte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Zugabe einer anorganischen Stickstoffquelle förderte den Abbau von ^{14}C -markiertem Maisstroh im geglühten Boden nach Inokulation mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft. Nach 42 Tagen erreichte die Mineralisierung dort mit 40 % (± 2 %) der applizierten Radioaktivität vergleichbare Mengen wie in Boden mit nativer Kohlenstoffmatrix (42 % der applizierten Radioaktivität). Bei längerer Inkubation stieg die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nur noch geringfügig an und es zeigte sich, dass die Zugabe einer künstlichen Bodenlösung mit geringem Stickstoffgehalt einen weitergehenden Abbau zur Folge hat. In dieser Variante wurden die größten Mengen an $^{14}\text{CO}_2$ in geglühtem Boden produziert, vergleichbar mit der Mineralisation im nativen Boden (jeweils 53 % der applizierten Radioaktivität). Insgesamt betrachtet lag die Mineralisation von Maisstroh durch die komplexen Gemeinschaften in geglühtem sowie nativem Boden in einer ähnlichen Größenordnung.

- Die untersuchten mikrobiellen Prozesse und die Humifizierung von Maisstroh waren in den Mikrokosmen mit geglühtem, autoklaviertem bzw. nativem Boden nach Inokulation durch eine Bodensuspension mit komplexer mikrobieller Gemeinschaft vergleichbar. Keimzahlbestimmung und DGGE-Analysen zeigten, dass in den ersten Wochen der Inkubation vor allem einige schnellwachsende *r*-Strategen am Abbau des toten Pflanzenmaterials beteiligt waren, während im weiteren Verlauf die Pilzbiomasse ebenso wie die mikrobielle Diversität zunahm. Gleichzeitig wurde die Humifizierung des Strohs mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie verfolgt, wobei innerhalb von 26 Wochen in den Huminsäureextrakten der Anteil huminstofftypischer Strukturen und die mittlere Molekülgröße zunahmen.
- In den Mikrokosmen wurden verschiedene Mischkulturen mit Bodenisolaten (jeweils 10 Bakterien und 3 Pilze) eingesetzt, um die Bedeutung der mikrobiellen Diversität für die Humifizierungsprozesse festzustellen. Durch die komplexen Gemeinschaften wurden 41 % (± 4 %) des applizierten Radiokohlenstoffes mineralisiert. Dagegen kamen die effektivsten definierten Gemeinschaften lediglich auf 35 % (± 2 %). Die Untersuchung von Huminsäuren mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie ergab keinen Unterschied in der Entstehung huminstofftypischer funktioneller Gruppen während einer 6-wöchigen Inkubation in Mikrokosmen mit definierten und komplexen Gemeinschaften. Allerdings ergaben die GPC-Analysen, dass nach Inkubation mit den definierten Gemeinschaften keine Längenzunahme der Huminsäuren im Gegensatz zu den komplexen Gemeinschaften stattgefunden hat. Es können also nicht alle Prozesse der Humifizierung durch die hier ausgewählten definierten Gemeinschaften abgebildet werden.
- In einer Fallstudie wurde der Fungizidwirkstoff Dithianon in einer Konzentration von 50 mg kg^{-1} Boden eingesetzt, um die Sensibilität der Mikrokosmen mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften am Beispiel des Einflusses durch ein Pflanzenschutzmittel zu testen. Die Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Maisstroh und die mikrobielle Aktivität wurden durch die Pflanzenschutzmittel-Applikation geringfügig verringert. Dagegen wurde der Aufbau pilzlicher Biomasse in den ersten 2 Wochen unterdrückt. Auch 3 Wochen nach der Dithianon-Applikation lagen die Ergosterolgehalte im Boden noch unterhalb der in den Kontrollvarianten. Allerdings wurde trotz dieser Effekte auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden keine Veränderung der Humifizierungsprodukte festgestellt.

8 LITERATUR

- Alef, K. (1990):** Bestimmung mikrobieller Aktivität und Biomasse in Boden und Kompost mit der Dimethylsulfoxid-Reduktion. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **2**, 76-78.
- Alef, K. (1991):** Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktion. Methodenbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten-Biomasse-Differenzierung, Ecomed, Landsberg/Lech, 101-106.
- Alef, K. (1994):** Biologische Bodensanierung - ein Methodenbuch, VCH, Weinheim, pp. 1-269.
- Alef, K. und D. Kleiner (1989):** Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxide reduction. *Biol. Fertil. Soils* **8**, 349-355.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Anderson, J. P. E. (1975):** Einfluß von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh. PflSchutz*, **SH 7**, 141-146.
- Anderson, T.-H. (1991):** Bedeutung der Mikroorganismen für die Bildung von Aggregaten im Boden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **154**, 409-416.
- Anderson, T.-H. (1994):** Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. In: Ritz, K., Dighton, J. und Giller, K. E. (Eds.): *Beyond the Biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 67-76.
- Andrews, J. H. (1984):** Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: M. J. Klug und C. A. Reddy (Eds.): *Current Perspectives in Microbial Ecology*. Am. Soc. Microbiol. Washington D.C., pp. 1-7.
- Angle, J. S., S. P. McGrath und R. L. Chaney (1991):** New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3674-3676.
- Atlas, R. M. und R. Bartha (1993):** *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. (3rd ed.) Benjamin/Cummings Publishing Company Redwood City, CA, pp. 1-563.
- Atlas, R. M., A. Horowitz, M. Krichevsky und A. K. Bej (1991):** Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.* **22**, 249-256.
- Atlas, R. M., D. Pramer und R. Bartha (1978):** Assessment of pesticide effects on non-target soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 231-239.
- Axelsson, B.-O., A. Saraf und L. Larsson (1995):** Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatogr. B* **666**, 77-84.

- Bååth, E. (1994):** Thymidine and leucine incorporation in soil bacteria with different cell size. *Microb. Ecol.* **27**, 267-278.
- Baldock, J. A., Oades, J. M., Vassallo, A. M. und Wilson, M. A. (1990):** Solid-state CP/MAS ^{13}C NMR analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil and incubated with glucose. *Austr. J. Soil Sci.* **28**, 213-225.
- Baldock, J. A. und Preston, C. M. (1995):** Chemistry of carbon decomposition processes in forests as revealed by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. In: McFee, W. W. und Kelly, J. M. (Eds.): Carbon Forms and Functions in Forest Soils. Soil Society of America, Madison, WI, pp. 89-117.
- Bayley, S. E., J. Zoltek Jr., A. J. Hermann, T. J. Dolan und L. Tortova (1985):** Experimental manipulation of nutrients and water in a freshwater marsh: effects on biomass decomposition and nutrient accumulation. *Limnol. Oceanogr.* **30**, 500-512.
- Beare, M. H., D. C. Coleman, D. A. Crossley Jr., P. F. Hendrix und E. P. Odum (1995):** A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant Soil* **170**, 5-22.
- Beese, F., A. Hartmann, T. Beck, R. Rackwitz und L. Zelles (1994):** Microbial community structure and activity in agricultural soils under different management. *Z. Pflanzen-ernähr. Bodenk.* **157**, 187-195.
- Bintrim, S. B., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts und R. M. Goodman (1997):** Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 277-282.
- Bochner, B. (1989):** Sleuthing out bacterial identities. *Nature* **339**, 157-158.
- Borneman, J., P.W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis und E. W. Triplett (1996):** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1935-1943.
- Borneman, J. und E. W. Triplett (1997):** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2647-2653.
- Bossio, D. A. und K. M. Scow (1995):** Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4043-4050.
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko und J. Parker (1994):** Biology of Microorganisms. (7th ed.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1-909.
- Broder, M. W. und G. H. Wagner (1988):** Microbial colonization and decomposition of corn, wheat, and soybean residue. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 112-117.

- Buckley, D.H., J.R. Graber und T.M. Schmidt (1998):** Phylogentic analysis of nonthermophilic members of the kingdom crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4333-4339.
- Burauel, P., J. O. Ka und J. Tiedje (1991):** Eine Möglichkeit der Nutzung von Gensonden zur qualitativen Charakterisierung einer Bakterienpopulation in Böden - Methodik und Anwendungsbeispiel. *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* **66**, 471-474.
- Burauel, P., A. Wais und F. Führ (1998):** Soil-bound residues. In: F. Führ, R. J. Hance, J. R. Plimmer und J. O. Nelson (Eds.): *The Lysimeter Concept*. ACS Symposium Series 699, American Chemical Society, Washington D. C., pp. 177-188.
- Button, D. K. (1991):** Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics – specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2033-2038.
- Candler, R., W. Zech und H. G. Alt (1988):** Characterization of water-soluble organic substances from a typic dystrochrept under spruce using GPC, IR, ¹H NMR, and ¹³C NMR spectroscopy. *Soil Sci.* **146**, 445-451.
- Carpenter, S. R., S. W. Chisholm, C. J. Krebs, D. W. Schidler und R. F. Wright (1995):** Ecosystem experiments. *Science* **269**, 324-327.
- Chanitgny, M. H., D. Prévost, D. A. Angers, L. P. Vézina und F. P. Chalifour (1996):** Microbial biomass and N transformations in two soils cropped with annual and perennial species. *Biol. Fert. Soils.* **21**, 239-244.
- Condon, L. M. und R. H. Newman (1998):** Chemical nature of soil organic matter under grassland and recently established forest. *Eur. J. Soil Sci.* **49**, 597-603
- D'Aquila, R. T., L. J. Bechtel, J. A. Videler, J. J. Eron, P. Gorczyca und J. C. Kaplan (1991):** Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3749.
- De Nobili, M., E. Gjessing und P. Sequi (1989):** Sizes and shapes of humic substances by gel chromatography. In: M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcolm und R. S. Swift (Eds.): *Humic Substances II*. John Wiley & Sons, New York, pp. 561-591.
- Debette, J. und R. Blodeau (1980):** Présence de *Pseudomonas maltophila* dans la rhizosphère de quelques plantes cultivées. *Can. J. Microbiol.* **26**, 460-463.
- Dell'Agnola, G. und G. Ferrari (1979):** Characteristics of laboratory-prepared humified organic matter as affected by the composition of starting materials. *Soil Sci.* **128**, 105-109.
- DeLong, E., G. S. Wickham und N. R. Pace (1989):** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1363.

- Domsch, K. H. (1992):** Pestizide im Boden: Mikrobieller Abbau und Nebenwirkungen auf Mikroorganismen. VCH Weinheim, pp. 1-575
- Drobnica, L., V. Majtan, E. Šturdik und M. Miko (1980):** Effect of 2,3-dinitro-1,4-dithia-9,10-anthraquinone on *Mycobacterium smegmatis*. *Folia Microbiol.* **25**, 403-411.
- Eash, N. S., P. D. Stahl, T. B. Parkin und D. L. Karlen (1996):** A simplified method for extraction of ergosterol from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**, 468-471.
- El Fantroussi, E., L. Verschuere, W. Verstraete und E.M. Top (1999):** Effect of phenyl-urea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 982-988.
- Engelen, B., K. Meinken, F. von Wintzingerode, H. Heuer, H.-P. Malkomes und H. Backhaus (1998):** Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2814-2821.
- Evans, C. S. und J. M. Palmer (1983):** Lignolytic activity of *Coriolus versicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2103-2108.
- Evans, H. J., B. Koch und R. Klugas (1972):** Preparation of nitrogenase form nodules and separation into components. In: San Pietro, A. S. (Ed.): *Methods in Enzymology*, Volume XXIV: Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Academic Press, New York, pp.470-476.
- Fang, J., Y. Qu und P. Gao (1997):** Wide distribution of cellulose-oxidizing enzymes in wood-rot fungus indicates a physiological importance in lignocellulose degradation. *Biotechnol. Biochem.* **11**, 195-197.
- Felske, A., B. Engelen, U. Nübel und H. Backhaus (1996):** Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4162-4167.
- Felske, A., A. Wolterink, R. van Lis und A. D. L. Akkermans (1998):** Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 871-879.
- Fernández, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, Criddle, C. und J. Tiedje (1999):** How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3697-3704.
- Ferris, M. J., G. Muyzer und D. M. Ward (1996):** Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 340-346.

- Flaig, W. (1964):** Chemische Untersuchungen an Huminstoffen. *Zeitschr. Chemie* **4**, 253-265.
- Fletcher, M. (1991):** The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv. Microb. Physiol.* **32**, 53-85.
- Foissner, W. (1999):** Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agr. Ecosyst. Environ.* **74**, 95-112.
- Führ, A. (1996):** Untersuchungen zu der Biodiversität natürlicher Bakterienpopulationen im Boden mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA-Sequenzen. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Führ, F. (1986):** Non-extractable pesticide residues in soil. *In: Greenhalgh, R. und T.R. Roberts (Eds.): Pesticide Science and Biotechnology. 6th IUPAC Congress of Pesticide Chemistry. Proc. Ottawa, Ont., Blackwell Scientific Publications, London, 381-389.*
- Führ, F. (2000):** Persönliche Mitteilung.
- Fujie, K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saitou und A. Katayama (1998):** Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**, 393-404.
- Garland, J. L. (1997):** Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbio. Ecol.* **24**, 289-300.
- Garland, J. L. und A. L. Mills (1991):** Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351-2359.
- Garland, J. L. und A. L. Mills (1994):** A community-level physiological approach for studying microbial communities. *In: Ritz, K., Dighton, J. und Giller, K. E. (Eds.): Beyond the Biomass. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 77-83.*
- Gelsomino, A., A. C. Keijzer-Wolters, G. Cacco und J. D. van Elsas (1999):** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.* **38**, 1-15.
- Gisi, U. (1990):** Bodenökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 1-304.
- Gram, C. (1884):** Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **2**, 185-189.
- Griffith, P. C. und M. Fletcher (1991):** Hydrolysis of protein and model dipeptide substrates by attached and nonattached marine *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2186-2191.

- Guggenberger, G und Frey S. (1999):** Der Beitrag von Pilzen und Bakterien beim Aufbau organischer Bodensubstanz in verschiedenen Agrarökosystemen. *Mitteilungen Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* **91**, 617-620.
- Gupta, V. V. S. R. und J. J. Germida (1988):** Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregates size classes as affected by cultivation. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 777-786.
- Haack, S. K., H. Garchow, M. J. Klug und L. J. Forney (1995):** Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1458-1468.
- Haider, K. (1996):** Biochemie des Bodens. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 1-174.
- Haider, K. (1999):** Von der toten organischen Substanz zum Humus. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **162**, 363-371.
- Haider, K., H. W. Kern und L. Ernst (1985):** Intermediate steps of microbial lignin degradation as elucidated by ^{13}C NMR spectroscopy specifically ^{13}C -enriched DHP-lignins. *Holzforschung* **39**, 23-32.
- Haider, K. und A. Schäffer (2000):** Umwandlungen und Abbau von Pflanzenschutzmitteln in Böden: Auswirkungen auf die Umwelt. Enke im Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 1-224.
- Harden, T., R. G. Joergensen, B. Meyer und V. Wolters (1993):** Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1273-1276.
- Hart, M. R. und P. C. Brookes (1996):** Effects of two ergosterol-inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 885-892.
- Hendricks, C. W. (1974):** Sorption of heterotrophic and enteric bacteria to glass surfaces in the continuous culture of river water. *Appl. Microbiol.* **28**, 572-578.
- Hendryckx, M., L. Vauterin, P. Vandamme, K. Kersters und P. De Vos (1996):** Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Meth.* **26**, 247-259.
- Hesse, M., H. Meier und B. Zeeh (1991):** Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (4. Aufl.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 1-336.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla und E. M. H. Wellington (1997):** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.

- Heuer, H. und K. Smalla (1997):** Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. *In: J. D. van Elsas, J. T. Trevors und E. M. H. Wellington (eds.): Modern Soil Microbiology.* Marcel Dekker, New York, pp. 353-373.
- Himmelsbach, D. S. und F. E. Barton (1980):** ^{13}C nuclear magnetic resonance of grass lignins. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1203-1208.
- Hine, P. T. und D. B. Bursill (1984):** Gel permeation chromatography of humic acid. Problems associated with sephadex gel. *Water Res.* **18**, 1461-1465.
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm und J. M. Tiedje (1988):** DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 703-711.
- Hu, S. und A. H. C. van Bruggen (1997):** Microbial dynamics associated with multiphase decomposition of ^{14}C -labeled cellulose. *Microb. Ecol.* **33**, 134-143.
- Hu, S. J., A. H. C. van Bruggen und N. J. Grünwald (1999):** Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 21-30.
- Huang, P. M. und J.-M. Bollag (1998):** Minerals – organics - microorganisms. Interactions in the soil environment. *In: Huang, P. M. und Senesi, N. (Eds.): Structure and Surface Reactions of soil Particles.* John Wiley & Sons Ltd., pp. 3-39.
- Huber, S. A. und F. H. Frimmel (1994):** Direct gel chromatographic characterization and quantification of marine dissolved organic carbon using high-sensitivity DOC detection. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1194-1197.
- Hugenholtz, P. und N. R. Pace (1996):** Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**, 190-197.
- Huusela-Veistola, E., S. Kurppa und J.-M. Pihlava (1994):** Effects of fenvalerate and permethrin on soil arthropods and on residues in and decomposition of barley straw. *Agric. Sci. Finl.* **3**, 213-222.
- Insam, H. und A. Rangger (1997):** Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-263.
- Insam, H., K. Amor, M. Renner und C. Crepaz (1996):** Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microb. Ecol.* **31**, 77-87.
- James, N. (1958):** Soil extract in soil microbiology. *Can. J. Microbiol.* **4**, 363-370.
- Jennemann, G. E., M. J. McInerney, M. E. Crocker und R. M. Knapp (1986):** Effect of sterilization by dry heat or autoclaving on bacterial penetration through Bera sandstone. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 39-43.

- Ka, J. O., P. Buraue, J. A. Bronson, W.E. Holben und J. M. Tiedje (1995):** DNA probe analysis of microbial community selected in field by long-term 2,4-D application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**, 1581-1587.
- Ka, J. O., W. E. Holben und J. M. Tiedje (1994):** Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1106-1115.
- Kandeler, E. und E. Murer (1993):** Aggregate stability in soil microbial processes in a soil with different cultivation. *Geoderma* **56**, 503-513.
- Kappler, A., R. Ji und A. Brune (2000):** Synthesis and characterization of specifically ^{14}C -labeled humic model compounds for feeding trials with soil-feeding termites. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1271-1280.
- Katayama, A., E. Kaneda, K. Mihara und S. Kuwatsuka (1992):** Effect of pesticides on interaction among cellulose decomposition, microflora and soil conditions: insertion of cellulose sheets in flooded soil samples. *Soil Sci. Plant Nutr.* **38**, 169-177.
- Kennedy, A. C. (1999):** Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* **74**, 65-76.
- Kennedy, A. C. und V. L. Gewin (1997):** Soil microbial diversity: Present and future considerations. *Soil Sci.* **162**, 607-617.
- Kjøller, S. und S. Struwe (1994):** Analysis of fungal communities on decomposing beech litter. In: K. Ritz, J. Dighton und K. E. Giller (Hrsg.): *Beyond the Biomass*. Wiley-Sayce, Chichester, pp. 191-199
- Kögel-Knabner, I. (1997):** ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma* **80**, 243-270.
- Kononova, M. M. (1966):** Soil Organic Matter. (2nd ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 1-544.
- Lähdesmäki, P. und R. Piispanen (1988):** Degradation products and the hydrolytic enzyme activities in the soil humification processes. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 287-292.
- Lambert, B., P. Meire, H. Joos, P. Lens und J. Swings (1990):** Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3375-3381.
- Lavahun, M. F. E., R. G. Joergensen und B. Meyer (1996):** Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biol. Fert. Soils* **23**, 38-42.
- Lawton, J. H. (1994):** What do species do to ecosystems?. *Oikos* **71**, 367-374.
- Lawton, J. H. (1995):** Ecological experiments with model systems. *Science* **269**, 328-331.

- Lawton, J. H., D. E. Bignell, g. F. Bloemers, P. Eggleton und M. E. Hodda (1996):** Carbon flux and diverstiy of nematodes and termites in Cameroon forest soils. *Biodiv. Conserv.* **5**, 261-273.
- Lee, S.-Y. und C. E. Pankhurst (1992):** Soil organisms and sustainable productivity. *Austr. J. Soil Res.* **30**, 855-892.
- Lehman, R. M., F. S. Colwell, D. B. Ringelberg und D. C. White (1995):** Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *J. Microbiol. Methods* **22**, 263-281.
- Leinweber, P. und H.-R. Schulten (1998):** Nonhydrolyzable organic nitrogen in soil size separates from long-term agricultural experiments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **62**, 383-393.
- Lerman, L. S. und C. Beldjord (1998):** Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In: R. G. Cotton; E. Edkins; S. Forrest (Eds.): Mutation Detection: A Practical Approach. The Practical Approach Series 188. IRL Press, Oxford, UK, pp. 35-61
- Lin, Q. und P. C. Brookes (1999):** Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of mcicrobial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1999-2014.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng und L. J. Forney (1997):** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516-4522.
- Ludwig, W. und K. Schleifer (1994):** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 155-173.
- MacArthur, R. H. und E. O. Wilson (1963):** An equilibrium theory of island zoogeography. *Evolution* **17**, 373-387.
- MacArthur, R. H. und E. O. Wilson (1967):** The Theory of Island Biogeography. Monographs in Population Biology, No. 1. Princeton University Press, Princeton N. J., pp. 1-203.
- Mahieu N., D. S. Powlson und E. W. Randall (1999):** Statistical analysis of published carbon-13 CPMAS NMR spectra of soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**, 307-319.
- Malcolm, R. L. (1989):** Application of solid-state ¹³C NMR spectroscopy to geochemical studies of humic substances. In: M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcolm und R. S. Swift (Eds.): Humic Substances II. John Wiley & Sons, New York, pp. 339-372.

- Malkomes H.-P. (1980):** Strohrotteversuche zur Erfassung von Herbizid-Nebenwirkungen auf den Strohumsatz im Boden. *Pedobiologia* **20**, 417-427.
- Malkomes, H.-P. und H. Ehle (1997):** Erfahrungen bei der Prüfung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenmikroorganismen im deutschen Zulassungsverfahren. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **49**, 171-177.
- Marstorp, H. (1996a):** Influence of soluble carbohydrates, free amino acids, and protein content on the decomposition of *Lolium multiflorum* shoots. *Biol. Fert. Soils* **21**, 257-263.
- Marstorp, H. (1996b):** Interactions in microbial use of soluble plant components. *Biol. Fert. Soils* **22**, 45-52.
- Martin, J. K. und D. W. Puckridge (1982):** Carbon flow through the rhizosphere of wheat crops in South Australia. In: Freney, J. R. und I. E. Galbally (eds): *Cycling of Carbon, Nitrogen, Sulfur and Phosphorus in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 77-82.
- Martin, Y. P. und M. A. Bianci (1980):** Structure, diversity and catabolic potentialities of aerobic heterotrophic bacterial populations associated with continuous cultures of natural marine phytoplankton. *Microb. Ecol.* **5**, 265-279.
- Masspö-Deya, A. A., D. A. Odelson, R. F. Hickey und J. M. Tiedje (1995):** Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L., J. D. van Elsas und F. J. de Bruijn (Eds.): *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.2**, Kluwer Academic Publishers, 1-8.
- McLaughlin, A. und P. Mineau (1995):** The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agr. Ecosyst. Environ.* **39**, 23-53.
- Meyer, O. (1993):** Functional groups of microorganisms. In : Schultz, E.-D. und Mooney, H. A. (Eds.): *Biodiversity and Ecosystem Function*. Springer-Verlag London, pp. 67-96.
- Mills, A. L. und R. A. Wassel (1980):** Aspects of diversity measurement for microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 578-586.
- Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, Winter, C. und G. J. Herndl (1999):** Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3518-3525.

- Moore, E. R. B., A. S. Krüger, L. Hauben, S. E. Seal, R. De Baere, R. De Wachter, K. N. Timmis und J. Swings (1997):** 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 145-153.
- Moore, J. C. und P.C. de Ruiter (1991) :** Temporal and spatial heterogeneity of trophic interactions within below-ground food webs. *Agr. Ecosyst. Environ.* **34**, 371-397.
- Moore, J. C., P. C. de Ruiter, H. W. Hunt, D. C. Coleman und D. W. Freckman (1996):** Microcosms and soil ecology: Critical linkages between field studies and modelling food webs. *Ecology* **77**, 694-705.
- Mückenhausen, E. (1975):** Die Bodenkunde und ihre geologische, geomorphologische, mineralogische und petrologische Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main, pp. 1-579.
- Muyzer, G., E. C. De Waal und A. G. Uitterlinden (1993):** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman und T. Maniatis (1985):** Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**, 3131-3145.
- Nardi, S., D. Pizzeghello, F. Reniero und N. Rascio (2000):** Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**, 639-645.
- Newell, S. Y., L. K. Blum, R. E. Crawford, T. Dai und M. Dionne (2000):** Autumnal biomass and potential productivity of salt marsh fungi from 29° to 43° north latitude along the United States atlantic coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 180-185.
- Nusbaumer, C., D. Job und M. Aragno (1996):** Etude de l'alteration par les champignons de l'état physico-chimique des composés lignocellulosiques dans un processus naturel de compostage. *Mycol. Helv.* **8**, 43-50.
- Nüsslein, K. und J. M. Tiedje (1999):** Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3622-3626.
- Odier, E. und B. Monties (1977):** Activité ligninolytique in vitro de bactéries isolées de paille de blé en décomposition. *C. R. Acad. Sci. Paris* **284**, 2175-2178.
- Ogram, A. (2000):** Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1499-1504.
- Øvreås, L. und V. Torsvik (1998):** Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* **36**, 303-315.

- Palleroni, N. J. und Bradbury, J. F. (1993):** *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Sings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 606-609.
- Pankhurst, C. E., K. Ophell-Keller, B. M. Doube und V. V. S. R. Gupta (1996):** Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodivers. Conserv.* **5**, 197-209.
- Pasanen, A.-L., K. Yli-Pietilä, P. Pasanen, P. Kalliokoski und J. Tarhanen (1999):** Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 138-142.
- Perucci, P., U. Boniciarelli, R. Santilocchi und A. A. Bianchi (1997):** Effect of rotation, nitrogen fertilization and management of crop residues on some chemical, microbiological and biochemical properties of soil. *Biol. Fert. Soils* **24**, 311-316.
- Piccolo A., L. Campanella und B. M. Petronio (1990):** Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 750-756.
- Pielou, E. C. (1966):** The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theoret. Biol.* **13**, 131-144.
- Preston, C. M. (1996):** Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* **161**, 144-166.
- Preston, C. M. und M. Schnitzer (1984):** Effects of chemical modifications and extractants on the carbon-13 NMR spectra of humic material. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **48**, 305-311.
- Printz, H. (1995):** Lysimeter- und begleitende Detailuntersuchungen zum Einfluß einer Maisstrohdüngung auf Abbau und Verlagerung des Herbizidwirkstoffs Methabenzthiazuron im Boden sowie zur Bedeutung des Co-Transports unter Freilandbedingungen. Dissertation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, pp. 1-179.
- Reasoner, D. J. und E. E. Geldreich (1985):** A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1-7.
- Rheims, H., C. Spröer, F. A. Rainey und E. Stackebrandt (1996):** Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology* **142**, 2863-2870.
- Rölleke, S., G. Muyzer, C. Wawer, G. Wanner und W. Lubitz (1996):** Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.

- Rosado, A. S., G. F. Duarte, L. Seldin und J. D. van Elsas (1998):** Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2770-2779.
- Rosenbaum, V. und D. Riesner (1987):** Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.* **26**, 235-246.
- Rovira, A. D. und D. C. Sands (1971):** Fluorescent pseudomonads – a residual component in the soil microflora? *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 253-259.
- Ryu, E. (1938):** On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Jap. Soc. Vet. Sci.* **17**, 31.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988):** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim (1985):** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saitou, K., K.-I. Nagasaki, H. Yamakawa, H.-Y. Hu, K. Fujie und A. Katayama (1999):** Linear relation between the amount of respiratory quinones and the microbial biomass in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 775-778.
- Salonius, P. O. (1981):** Metabolic capabilities of forest soil microbial populations with reduced species diversity. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 1-13.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989):** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 1-1659.
- Sands, D. C. und A. D. Rovira (1971):** *Pseudomonas fluorescens* Biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in south Australian soils and wheat rhizospheres. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 261-275.
- Sauerbeck, D. R. und B. G. Johnen (1977):** Root formation and decomposition during plant growth. In: Soil Organic Matter Studies, I.A.E.A. Wien Proc. Symp. 1976 Vol. 1, 141-148.
- Schachtschabel, P., H. P. Blume, G. Brümer, K. N. Hartge und U. Schwertmann (1989):** Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde. (12. Aufl.) Enke Verlag, Stuttgart, pp. 1-491.

- Schäffer, A. (1993):** Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. *In: Bollag, J.-M. und G. Stotzky (Eds.): Soil Biochemistry, Vol. 8. Marcel Dekker, New York, pp. 273-340.*
- Schinner, F. und R. Sonnentor (1996):** Bodenökologie. Springer Verlag, Berlin, pp. 1-359.
- Schlegel, H. G. (1992):** Allgemeine Mikrobiologie. (7. Aufl.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 1-634.
- Schlöter, M., L. Zelles, A. Hartmann und J. C. Munch (1998):** New quality of assessment of microbial diversity in arable soils using molecular and biochemical methods. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* **161**, 425-431.
- Schnitzer, M., H. Dinel, S. P. Mathur, H. R. Schulten und G. Owen (1993):** Determination of compost biomaturity. III. Evaluation of a colorimetric test by ^{13}C -NMR-spectroscopy and pyrolysis-field ionization mass spectroscopy. *Biol. Agric. Hort.* **10**, 109-123.
- Schnürer, J. (1993):** Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 552-555.
- Schulten, H.-R. und M. Schnitzer (1997):** Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.* **162**, 115-130.
- Schulten, H.-R., C. Sorge und M. Schnitzer (1995):** Structural studies on soil nitrogen by Curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectroscopy of whole soils. *Biol. Fertil. Soils* **20**, 174-184.
- Seitz, L. M., D. B. Sauer, R. Burroughs, H. E. Mohr und J. D. Hubbard (1979):** Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* **69**, 1202-1203.
- Semenov, A. M. (1991):** Physiological bases of oligotrophy of microorganisms and the concept of microbial community. *Microb. Ecol.* **22**, 239-247.
- Setälä, H., J. Laakso, J. Mikola und V. Huhta (1998):** Functional diversity of decomposer organisms in relation to primary production. *Appl. Soil Ecol.* **9**, 25-31.
- Sharma, S., A. Rangger und H. Insam (1998a):** Effects of decomposing maize litter on community level physiological profiles of soil bacteria. *Microb. Ecol.* **35**, 301-310.
- Sharma, S., A. Rangger, M. von Lützow und H. Insam (1998b):** Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. *Eur. J. Soil Biol.* **34**, 53-60.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman und R. M. Myers (1989):** Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 232-236.

- Smalla, K., U. Wachtendonk, H. Heuer, W.-T. Liu und L. Forney (1998):** Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1220-1225.
- Stahl, P. D., T. B. Parkin und N. S. Eash (1995):** Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 1091-1097.
- Stamatiadis, S., J. W. Doran und E. R. Ingham (1990):** Use of staining and inhibitors to separate fungal and bacterial activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 81-88
- Steffan, R. J., J. Goksøyr, A. K. Bej und R. M. Atlas (1988):** Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2908-2915.
- Stephen, J. R., G. A. Kowalchuk, M.-A. V. Bruns, A. E. McCaig, C. J. Phillips, T. M. Embley und J. I. Prosser (1998):** Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2958-2965.
- Stevenson, F. J. und M. A. Cole (1999):** Cycles of Soil. (2nd ed.) John Wiley & Sons, New York, pp. 1-427.
- Stotzky, G. (1986):** Influences of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses. In: P. M. Huang und M. Schnitzer (Eds.): Interaction of Soil Minerals with Organics and Microbes. SSSA Spec. Publ. No. 17, Am. Soc. Agron., Madison, WI, 305-428
- Šturdik, E. und L. Drobnica (1980):** Effect of 2,3-dinitro-1,4-dithia-9,10-anthraquinone on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. *Chem.-Biol. Interactions* **30**, 105-114.
- Sutherland, J. B. und D. L. Crawford (1981):** Lignin and glucan degradation by species of the Xylariaceae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **72**, 335-337.
- Suyama, K., H. Yamamoto, J. Kurokawa und H. Komada (1993a):** Effect of a fungicide, chlorothalonil, on cellulose decomposing process in soil. *J. Pestic. Sci.* **18**, 285-292.
- Suyama, K., H. Yamamoto, K. Tatsuyama und H. Komada (1993b):** Effect of long-term application of a fungicide, chlorothalonil, on cellulose decomposition and microflora in soil under upland conditions. *J. Pestic. Sci.* **18**, 225-230.
- Swift, M. J. (1979):** Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1-273.
- Tate III, R. L. (1997):** Soil microbial diversity research: Whither to now?. *Soil Sci.* **162**, 605-606.

- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N. B. Ramsing (1996):** Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1405-1415.
- Tessier, L., E. G. Gregorich und E. Topp (1998):** Spatial variability of soil microbial biomass measured by the fumigation extraction method, and k_{EC} as affected by depth and manure application. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1369-1377.
- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nüsslein, T. L. Marsh und S. J. Flynn (1999):** Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109-122.
- Tietema, A., P. Kuikman und F. Berendse (1985):** Mass loss, nutrient dynamics and influence of Diptera larvae in decomposing litter of *Erica tetralix* and *Molinia caerulea*. *Pedobiologia* **28**, 389-397.
- Tisdall, J. M. und J. M. Oades (1982):** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* **33**, 141-163.
- Torsvik, T., J. Goksøyr und F. Daae (1990a):** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787.
- Torsvik, V., K. Salte, R. Sørheim und J. Goksøyr (1990b):** Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 776-781.
- Trevors, J. T. (1998):** Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* **101**, 45-67.
- Tuomi, P., T. Torsvik, M. Hildal und G. Bratbak (1997):** Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2181-2188.
- Ueda, T., Y. Suga und T. Matsuguchi (1995):** Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Eur. J. Soil Sci.* **46**, 415-421.
- Ueoka, M., G. Allison, Y. Kelsall, M. Graymore und F. Stagnitti (1997):** Environmental fate of pesticides used in Australian viticulture: behaviour of dithianon and vinclozolin in the soils of the South Australian Riverland. *Chemosphere* **35**, 2915-2924.
- van Verseveld, H. W., W. F. M. Röling, D. van Rossum, A. M. Laverman, S. van Dijck, M. Braster und F. C. Boogerd (1997):** Phenetic and genetic analyses of bacterial populations in fermented food and environmental samples. *In: Insam, H. und A. Ranger (Eds.): Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches.* Springer-Verlag, Berlin, 19-36.

- Vaneechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck und G. Claeys (1995):** Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res. Microbiol.* **146**, 633-641.
- Vanlauwe, B., L. Dendooven und R. Merckx (1994):** Residue fractionation and decomposition: The significance of the active fraction. *Plant Soil* **158**, 263-274.
- Wagner, M., B. Aßmus, P. Hutzler und R. I. Amann (1994):** *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J. Microsc.* **176**, 181-187.
- Wainwright, M. (1978):** A review of the effects of pesticides on microbial activity in soils. *J. Soil Sci.* **29**, 287-298.
- Wais, A., P. Burauel, A. A. de Graaf, K. Haider und F. Führ (1996):** Using ^{13}C -NMR spectroscopy to evaluate the binding mechanism of bound pesticide residues in soils. 2. Investigations of model humic acids. *J. Environ. Sci. Health* **B31**, 1-24.
- Wais, A. (1997):** Nicht extrahierbare Pflanzenschutzmittelrückstände im Boden: Analyse von Huminstoffen und mögliche Bindungsformen von Wirkstoffen und Metaboliten an Huminstoffe. Dissertation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, pp. 1-179.
- Wallhäußer, K. H. (1988):** Praxis der Sterilisation: Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene. (4. Aufl.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 1-675.
- Wanner, U., P. Burauel und F. Führ (2000):** Characterisation of soil-bound residue fractions of the fungicide dithianon by gel permeation chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *Environ. Poll.* **108**, 53-59.
- Wanner, U. (1999):** Untersuchungen zur Charakterisierung nicht extrahierbarer Rückstände des Fungizidwirkstoffes Dithianon in einer Typischen Parabraunerde unter besonderer Berücksichtigung der Wechselwirkungen mit der organischen Bodensubstanz. Dissertation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, pp. 1-251.
- Wardle, D. A. (1998):** Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1627-1637.
- Wardle, D. A. und D. Parkinson (1990):** Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil* **122**, 21-28.
- Webster, W. A., J. A. Chudek und D. W. Hopkins (2000):** Carbon transformations during decomposition of different components of plant leaves in soil. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 301-314.

- Whang, K. und T. Hattori (1988):** Oligotrophic bacteria from rendzina forest soil. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **54**, 19-36.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor (1990):** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White (Eds.): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wild, A. (1989):** Umweltorientierte Bodenkunde: eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 1-328.
- Wilson, J. E. (1985):** Decomposition of [^{14}C]lignocelluloses of *Spartina alterniflora* and a comparison with field experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 478-484.
- Wilson, M. A. (1987):** NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Woese, C. R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis (1990):** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
- Wünsche, L. und W. Babel (1996):** The suitability of the biolog automated microbial identification system for assessing the taxonomical composition of terrestrial bacterial communities. *Microbiol. Res.* **151**, 133-143.
- Wünsche, L., L. Brüggemann und W. Babel (1995):** Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbio. Ecol.* **17**, 295-306.
- Young, C. C., R. L. Burghoff, L. G. Keim, V. Minak-Bernero, J. R. Lute und S. M. Hinton (1993):** Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1972 – 1974.
- Zak, J. C., M. R. Willig, D. L. Moorhead und H. G. Wildman (1994):** Functional diversity of communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 1101-1108.
- Zelles, L. (1999):** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharids in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* **29**, 111-129.
- Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans und W. M. de Vos (1998):** Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859.

9 ANHANG

Anhang A Abkürzungsverzeichnis (teilweise mit Bemerkungen).

Chemikalien		
APS	Ammoniumpersulfat	Katalysator bei der Polyacrylamid-Polymerisation
Bromphenolblau		Marker-Farbstoff in der Gelelektrophorese
DMS	Dimethylsulfid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
dNTP	Desoxy-Nukleinsäuren	
Fe-EDDHA	Eisen-Ethylendiamin-di(<i>o</i> -hydroxyphenylsäure)-Komplex	Bestandteil der SSE-Mediums nach Angle et al., 1991
Ficoll 400	Polysucrose 400	Nichtionisches synthetisches Sucrose-Polymer, Molekulargewicht ca. 400 000
KAS	Kalkammonsalpeter	Calcium- und Stickstoff-Dünger
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)-ethansulfonsäure	Bestandteil der SSE-Mediums nach Angle et al., 1991
MilliQ	Reinstwasser nach Aufreinigung mit Millipore-System	
PAA	Polyacrylamid	Matrix für Nukleinsäure-Gele
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon	Reinigung von DNA aus Boden; bindet Huminstoffe
SybrGreen		Farbstoff zum Färben von Nukleinsäuren
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	
TE	Tris-EDTA-Puffer	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Vernetzer bei der Polyacrylamid-Polymerisation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Biochemischer Puffer
Tween	Polyoxyethylensorbitan	
Xylencyanol		Marker-Farbstoff in der Gelelektrophorese

Anhang A (Fortsetzung)

Medien		
BEA	<u>B</u> oden <u>e</u> xtrakt- <u>A</u> gar	Festnährmedium zur Kultivierung von oligotrophen Bodenbakterien
ME	<u>M</u> alz <u>e</u> xtrakt	Medium zur Kultivierung von Pilzen
R2A		Festnährmedium zur Kultivierung von Umweltbakterien
SSE	<u>S</u> oil <u>S</u> olution <u>E</u> quivalent Medium	Mineralsalz-Lösung, die an Konzentrationen in der Bodenlösung angelehnt ist
Sonstiges		
δ		Chemische Verschiebung von Signalen in den ¹³ C-NMR-Spektren
a. R.	applizierte <u>R</u> adioaktivität	
BIOLOG		Verfahren zur Identifizierung von Bakterien mit Hilfe von ca. 90 verschiedenen C-Quellen
DGGE	<u>D</u> enaturierende <u>G</u> radienten <u>G</u> elelektrophorese	
n.n.	<u>n</u> icht <u>n</u> achweisbar	
kd	1000 Dalton	Molekülmassen-Einheit
PB-MER	Tyische <u>P</u> arab <u>r</u> aunderde aus <u>M</u> erzenhausen, Jülich (Rheinland)	
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction	Enzymatisches Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäure-Sequenzen
ppm	parts per <u>m</u> illion	mg kg ⁻¹
QIAex II		Reinigungs-Kit zum Trennen von Nukleinsäuren und einer Gelmatrix
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur	
ssp.	<u>S</u> ub <u>s</u> pecies	
U min ⁻¹	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute	
ÜN	<u>Ü</u> ber <u>N</u> acht	
v. R.	aktuell im Boden <u>v</u> orhandene <u>R</u> adioaktivität	

Anhang B Übersicht über die in den Varianten V 1 und V 2 eingesetzten Isolate (mit internen Bezeichnungen).

Name	Medium	Woche der Isolierung	Gram-Verhalten	Bemerkungen
Variante V 1				
I A1	R2A	1	-	Stäbchen
II D		2	-	Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Xanthomonas</i> spp.
III J		3	-	Stäbchen
IV A		4	+	Stäbchen, groß, in Ketten
V C		7	-	Stäbchen, lang und schmal
VI E		10	+	Stäbchen, groß, in Ketten
alt A		60	+	Stäbchen, pilzähnliches Wachstum (ähnlich <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> , SCHLEGEL, 1992)
II C	BEA	2	-	Kokken, klein; BIOLOG-Zuordnung: <i>Salmonella</i> spp.
IV A		4	n.a.	
I γ	ME	1		Schimmelpilz
II B		2		Hefe
alt F		60		Hefe
Variante V 2				
I B1	R2A	1	-	Kokken, klein
II B		2	+	Stäbchen
III A		3	+	Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Stenotrophomonas maltophila</i>
IV K		4	-	Kokken, klein
V C		7	+	Stäbchen
VI F		10	+	Stäbchen
alt D		60	+	Stäbchen
II C	BEA	2	-	Kokken, klein; BIOLOG-Zuordnung: <i>Salmonella</i> spp.
IV B		4	-	Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Burkholderia gladioli</i>
II B	ME	2		Hefe
IV γ		4		Schimmelpilz, Ascomycet
alt π		60		Schimmelpilz

Anhang C Übersicht und Beschreibung der in den Maisstrohrotte-Mikrokosmen mit definierten Gemeinschaften (vgl. Kapitel 3.5) eingesetzten Bakterien (Medium R2A und BEA) und Pilze (ME).

Name	Medium	Woche der Isolierung	Bemerkungen
Variante 1			
III A	R2A	3	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
IV G		4	
K ₆ O		26	
alt G ₁		60	
A 10		-	
I B	BEA	1	
I C ₂		1	Gram -
III B		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Pseudomonas</i> spp.
VI B		10	Gram -
k ₆ K		26	Gram +; mycelartiges Wachstum
III γ	ME	3	Schimmelpilz
VI Ω		10	Schimmelpilz
alt π		60	Schimmelpilz
Variante 2			
I G ₂	R2A	1	Gram +; mycelartiges Wachstum BIOLOG-Zuordnung: <i>Clavibacter michiganense</i> ssp. <i>sepedonicum</i>
V D		7	Gram +
VII B		13	
M 20b		-	
A 8		-	
II A	BEA	2	
III A		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
III B		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Pseudomonas</i> spp.
IV E		4	
VI B		10	Gram -
III B	ME	3	Hefe
alt J		60	Hefe
A 2		-	Hefe

Anhang C (Fortsetzung)

Name	Medium	Woche der Isolierung	Bemerkungen
Variante 3			
I A ₁	R2A	1	Gram -; Stäbchen
II B		2	Gram +; Stäbchen
V H		77	
k ₅ F		26	
M 19		-	
I C ₁	BEA	1	
III A		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
IV J ₂		4	
V B		7	
k ₆ L		26	
III C	ME	3	Hefe
IV δ		4	Schimmelpilz
k ₆ π		26	Schimmelpilz
Variante 4			
II A	R2A	2	
III B		3	
VI D		10	
VII D		13	
k ₅ F		26	
II D	BEA	2	
IV G		4	
V C		7	
V D		7	
VI C		13	
II α	ME	2	Schimmelpilz
VI α		13	Schimmelpilz, 100 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz (410 Bp) mit <i>Acremonium murorum</i>
A 1-2		-	Hefe, 99 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz mit <i>Acremonium kiliense</i> (471 Bp) und mit <i>Acremonium strictum</i> (457 Bp)

Anhang C (Fortsetzung)

Name	Medium	Woche der Isolierung	Bemerkungen
Variante 5			
I E	R2A	1	
II A ₂		2	
IV O		4	
VII F		13	
k ₆ L		26	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
I A	BEA	1	
II E		2	Gram +; mycelartiges Wachstum
III B		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Pseudomonas</i> spp.
IV B		4	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Burkholderia gladioli</i>
V C		7	
I A	ME	1	Hefe
V A		7	Hefe
alt H		60	Hefe
Variante 6			
II E	R2A	2	Gram +
V E		7	
k ₆ N		26	Gram +
alt J ₂		60	
M 16c		-	
II C	BEA	2	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Salmonella</i> spp.
III A		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
IV F		4	Gram +
V B		7	
VI D		10	
III J	ME	3	Hefe
IV π		4	Schimmelpilz
k ₄ β		26	Schimmelpilz, Zygomycet, 100 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18 S rDNA (490 Bp) mit <i>Rhizopus oryzae</i>

Anhang C (Fortsetzung)

Name	Medium	Woche der Isolierung	Bemerkungen
Variante 7			
I C	R2A	1	Gram +
V F		7	
k ₆ N		26	Gram +
alt T		60	
A 11		-	Gram -
I F	BEA	1	
II D		2	
IV C		4	Gram -
VI A		10	Gram +
k ₄ B		26	Gram -
IV ε	ME	4	Schimmelpilz, Ascomycet, 99 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18S rDNA mit <i>Aporothielavia leptoderma</i> (510 Bp)
k ₄ μ		26	Schimmelpilz
alt δ		60	Schimmelpilz, 100 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18S rDNA mit <i>Neocosmospora vasinfecta</i> (483 Bp)
Variante 8			
I H	R2A	1	Gram +; mycelartiges Wachstum
II D		2	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Xanthomonas</i> spp.
IV M		4	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Stenotrophomonas malthophila</i>
VI D		10	
M 18°		-	
II E	BEA	2	Gram +; mycelartiges Wachstum
III B		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Pseudomonas</i> spp.
IV B		4	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Burkholderia gladioli</i>
IV C		4	Gram -
V C		7	
III β	ME	3	Schimmelpilz
VI η		10	Schimmelpilz
alt π		26	Schimmelpilz

Anhang C (Fortsetzung)

Name	Medium	Woche der Isolierung	Bemerkungen
Variante 9			
II F	R2A	2	
III C		3	
V G		7	
VII G		13	
k ₆ O		26	
I G	BEA	1	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Pseudomonas</i> spp.
III A		3	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
IV D		4	
VI E		10	Gram +
k ₆ O		26	Gram -
III δ	ME	3	Schimmelpilz, Ascomycet, 99 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz (495Bp) mit <i>Gibberella pulicaris</i>
VI β		10	Schimmelpilz
alt δ		60	Schimmelpilz, Ascomycet, 100 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18S rDNA (483 Bp) mit <i>Neocosmospora vasinfecta</i>
Variante 10			
IV O	R2A	4	
VI D		10	
k ₆ L		26	Gram -; Stäbchen; BIOLOG-Zuordnung: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
alt K		60	
A		-	
2			
II C	BEA	2	Gram -; BIOLOG-Zuordnung: <i>Salmonella</i> spp.
IV C		4	Gram -
V D		7	
VI B		10	Gram -
k ₆ O		26	Gram -
III A		3	Hefe
V ε	ME	7	Schimmelpilz , Ascomycet, 99 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18s rDNA (498 Bp) mit <i>Aporothielavia leptoderma</i>
k ₄ α		26	Schimmelpilz, Ascomycet, 100 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz der 18s rDNA (495 Bp) mit <i>Penicillium namyslowskii</i>

Anhang D BIOLOG-Profil und Identifizierung der Maisstrohrotte-Isolate (gute Verwertung der angegebenen Kohlenstoffquelle = „1“, schwache Verwertung = „?“ und keine Verwertung = „0“; weitere Erläuterungen in Abschnitt 3.1.3).

Anmerkung:

Folgende Isolate konnten mit BIOLOG nicht identifiziert werden, da zu wenige eindeutig positive Reaktionen festgestellt wurden:

R2A I C (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 1 Woche alter Maisstrohrotte)

R2A k₆N (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 26 Wochen alter Maisstrohrotte)

BEA k₄B (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 26 Wochen alter Maisstrohrotte)

R2A alt T (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 60 Wochen alter Maisstrohrotte)

Isolat R2A I G₂ (Gram-postiv, isoliert auf R2A aus 1 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α-cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonititol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α-D-glucose	m-inositol	α-D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-melibiose	β-methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α-hydroxy-butyric acid	β-hydroxy-butyric acid	γ-hydroxy-butyric acid
0	0	0	0	0	?	0	?	0	0	0	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α-keto butyric acid	α-keto glutaric acid	α-keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
0	0	0	0	0	1	0	0	?	?	0	0
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ-amino-butyric acid
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L-α-glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	0	1	0	0	0	0	0	?	0	0	1

Gute Identifizierung als *Clavibacter michiganense* ssp. *sepedonicum* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,569.

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat BEA I C₂ (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 1 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	?	1	0	1	1	0	1	1	0	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
?	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminc acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Serratia rubidea* (Ähnlichkeitsindex = 0,287) und *Cedecea lapagei* (Ähnlichkeitsindex = 0,243).

Isolat BEA I G (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 1 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	?	1	1	1	0	1	0	1	1	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	?	1	1	1	0	0	0	?	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	0	1	?	1	1	1	1	1	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminc acid
1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	1	1	1	?	1	1	0	1	1	1	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
1	1	1	0	0	1	?	0	1	0	0	0

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Pseudomonas corrugata* (Ähnlichkeitsindex = 0,327) und *Pseudomonas fragi* (Ähnlichkeitsindex = 0,087).

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat R2A II D (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 2 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonititol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	?
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	0	?	1	1	0	1	?	1	0	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
0	0	0	0	0	0	0	0	?	1	0	0
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Xanthomonas campestris* var. *xanthosoma* (Ähnlichkeitsindex = 0,317) und *Xanthomonas oryzae* (Ähnlichkeitsindex = 0,282).

Isolat R2A II E (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 2 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonititol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	0	1	?	0	?	1	0	1	0	?
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	?	1	1	1	1	0	1	1	?	?	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	0	?	1	1	1	1	1	0	0	1	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	1	?	0	1	0	0	0	0	0	0	0
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
0	0	1	?	1	1	?	0	1	?	1	?
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
?	?	1	?	1	?	?	?	1	1	1	1

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Curtobacterium flaccumfaciens* (Ähnlichkeitsindex = 0,173).

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat BEA II C (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 2 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
?	1	1	?	1	1	1	1	1	?	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	0	?
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
?	1	0	?	?	1	1	?	1	1	?	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	0	?	1	?	1	?	1	1	?	?	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Salmonella* spp
(Ähnlichkeitsindex = 0,407).

Isolat R2A III A (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 3 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	1	0	?	0	0	1	1	1	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	?	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sehr gute Identifizierung als *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,842.

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat BEA III A (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 3 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabhinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	1	?	0	1	?	1	1	1	1	1
I-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	0	1	1	?	1	0	1	0	?	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	?	0	0	1	0	1	1	0	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanyl-glycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	1	?	1	0	1	1	0	1	1	0	?
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
?	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1

Sehr gute Identifizierung als *Agrobacterium tumefaciens* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,860.

Isolat BEA III B (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 3 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabhinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	0	?	1	1	0	?	0	1	?	0
I-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	0	1	0	1	?	0	0	0	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanyl-glycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	0	1	?	0	1	1	0	1	1	?	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Pseudomonas corrugata* (Ähnlichkeitsindex = 0,261) und *Pseudomonas fluorescens* (Ähnlichkeitsindex = 0,187).

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat R2A IV M (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 4 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	1	?	1	?	1	1	0	0	0	1
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	1	1	?	1	?	1	0	0	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	?	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sehr gute Identifizierung als *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,860.

Isolat BEA IV B (Gram-negativ, isoliert auf Bodenextrakt-Agar aus 4 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	?
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	1	1	1	1	?	?	?	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	?	1	?	?	?	1	1	?	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	?	0	1	1	1	1	1	1	1	?	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
1	1	1	?	0	1	1	0	1	1	?	?

Sehr gute Identifizierung als *Burkholderia gladioli* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,776.

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat BEA IV C (Gram-negativ, isoliert auf BEA aus 4 Wochen alter Maisstrohrötte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	?	1	1	1	?	1	1	1	?	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
?	1	0	0	0	0	?	1	1	0	0	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
0	0	0	?	0	0	1	0	0	0	0	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
0	0	?	1	1	?	0	?	?	?	?	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	0	?
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethylamine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
?	?	?	?	?	0	?	0	1	?	1	?

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Erwinia amylovora* (Ähnlichkeitsindex = 0,257) und *Pasteurella caballi* (Ähnlichkeitsindex = 0,039).

Isolat BEA VI E (Gram-positiv, isoliert auf BEA aus 13 Wochen alter Maisstrohrötte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
0	0	?	1	1	1	1	1	0	0	?	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
0	0	?	0	1	?	?	0	?	1	?	?
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
0	0	0	0	1	?	0	0	0	0	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethylamine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	0	?	0	0	0	0	0	1	1	1	1

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Curtobacterium flaccumfaciens* (Ähnlichkeitsindex = 0,255).

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat R2A k₆L (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 26 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	?	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	?	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	?	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
1	?	0	1	1	1	1	1	1	?	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
?	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sehr gute Identifizierung als *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,824.

Isolat R2A k₆O (Gram-negativ, isoliert auf R2A aus 26 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactos-amine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	0	1	1	1	1	?	1	1	1	1	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
?	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	1	1	?	1	1	1	1	0	?	1	1
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
1	?	1	1	0	1	1	?	1	1	1	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuron-amide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	0	1	0	1	1	1	?	1	1	?	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethyl-amine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
?	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Salmonella spec* (Ähnlichkeitsindex = 0,297) und *Burkholderia cepacia* (Ähnlichkeitsindex = 0,198).

Anhang D (Fortsetzung)

Isolat R2A alt K (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 60 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	?	?	1	?	0	1	1	1	1	?	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	0	0	0	1	1	?	0	0	1	1	0
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	0	0	0	1	1	?	0	0	0	0
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
?	0	0	1	0	?	?	?	0	0	0	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
0	1	?	0	0	0	?	?	0	0	?	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
0	1	?	?	1	1	1	?	1	?	1	1
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
?	0	0	0	0	0	0	0	0	1	?	1
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethylamine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	?	?	0	?	?	?	?	1	?	1	1

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Clavibacter michiganense* (Ähnlichkeitsindex = 0,130) und *Curtobacterium flaccumfaciens* (Ähnlichkeitsindex = 0,028).

Isolat R2A alt T (Gram-positiv, isoliert auf R2A aus 60 Wochen alter Maisstrohrotte)

water	α -cyclo-dextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
0	?	1	1	?	?	1	1	1	?	?	0
i-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucose	m-inositol	α -D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
0	1	?	?	1	?	?	?	1	1	1	1
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	D-psicose	D-rafinose	rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl-pyruvate	mono-methyl-succinate
0	0	1	?	0	1	?	0	?	?	?	?
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxy-butyric acid	β -hydroxy-butyric acid	γ -hydroxy-butyric acid
?	0	1	1	?	?	1	1	?	1	0	1
p-hydroxy-phenyl-acetic acid	itaconic acid	α -keto butyric acid	α -keto glutaric acid	α -keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
?	1	1	?	?	1	1	1	?	0	?	1
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-alanylglycine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutaminic acid
0	?	0	?	1	1	1	1	1	0	?	?
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenyl-alanine	L-proline	L-pyro-glutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -amino-butyric acid
1	?	?	?	0	?	0	?	?	?	0	0
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethylamine	putrescine	2-amino-ethanol	2,3-butane-diol	glycerol	D,L- α -glycerol-phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keine sichere Identifizierung möglich; beste Übereinstimmung mit *Curtobacterium flaccumfaciens* (Ähnlichkeitsindex = 0,165).

Anhang E Basensequenzen der partiell amplifizierten 18S rDNA von Pilzisolaten

Anmerkung:

Innerhalb der Sequenzen steht das Zeichen „-“ für eine nicht besetzte Basenposition. Die Basensequenzen der entsprechenden Bereiche in der 18S rDNA von *Penicillium chrysogenum* (für Ascomyceten) und *Rhizopus oryzae* (für den Zygomycet $k_4 \beta$) sind zusätzlich zum Vergleich mit angegeben und entstammen der Datenbank BLASTN 2.0.14 (ALTSCHUL et al., 1997).

Zygomycet ($k_4 \beta$)

<i>Rhizopus_oryzae</i>	AAATTGTACTCATTCCAATTGCAAGACCTTAAAGGCCCTGCATTGTTATGTATTGTCACT	60
$k_4 \beta$	AAATTGTACTCATTCCAATTGCAAGACCTTAAAGGCCCTGCATTGTTATGTATTGTCACT	60
<i>Rhizopus_oryzae</i>	ACCTCCCCGTGTCGGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTAGC	120
$k_4 \beta$	ACCTCCCCGTGTCGGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTAGC	120
<i>Rhizopus_oryzae</i>	CGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTAATTCCTCGTTACCCGTTGTAGGCAT	180
$k_4 \beta$	CGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTAATTCCTCGTTACCCGTTGTAGGCAT	180
<i>Rhizopus_oryzae</i>	TGTAAGCCTCTATCTTACAATCTCAACCATGATAGGGCAGAAAATCGAGTGGACCGTCGC	240
$k_4 \beta$	TGTAAGCCTCTATCTTACAATCTCAACCATGATAGGGCAGAAAATCGAGTGGACCGTCGC	240
<i>Rhizopus_oryzae</i>	CGGCACAAGGCCATGCGATCCGCTTAATTATTATGATTACCAAGAAACAGGTTTTACCC	300
$k_4 \beta$	CGGCACAAGGCCATGCGATCCGCTTAATTATTATGATTACCAAGAAACAGGTTTTACCC	300
<i>Rhizopus_oryzae</i>	CGCGTTGGTTTTATCTAATAAGTGCACCCCTTCGTAAGTCAGGGCTTTTTTGCATGTATT	360
$k_4 \beta$	CGCGTTGGTTTTATCTAATAAGTGCACCCCTTCGTAAGTCAGGGCTTTTTTGCATGTATT	360
<i>Rhizopus_oryzae</i>	AGCTCTAGAATTACCACGGTTATCCAAGTAGTAAAGAATTTGTCACGTAGATCATAACTG	420
$k_4 \beta$	AGCTCTAGAATTACCACGGTTATCCAAGTAGTAAAGAATTTGTCACGTAGATCATAACTG	420
<i>Rhizopus_oryzae</i>	ATTTAATGAGCCATTCGAGTTTCACAATATAAAGTTATTTATACTTAGACATGCATGGC	480
$k_4 \beta$	ATTTAATGAGCCATTCGAGTTTCACAATATAAAGTTATTTATACTTAGACATGCATGGC	480
<i>Rhizopus_oryzae</i>	TTAATCTTTG	490
$k_4 \beta$	TTAATCTTTG	490

Anhang E (Fortsetzung)

Ascomyceten

Penicillium_chrysogenum	-----	
II α	NTTNATNGGCCGNAATTTTGAATGACCCATCCCCGGCGCCNAAGCCATG	50
III δ	-----	
III γ	-----	
IV δ	-----	
IV γ	-----	
IV ϵ	-----	
V ϵ	-----	
VI α	-----	
VI β	-----	
k ₄ α	-----	
k ₄ μ	-----	
alt δ	-----	
A 1-2	-----	
Penicillium_chrysogenum	-----	
II α	CCAATTCNTTNAGTAATTATGATTCCACCCNANGGCNCCCCGAANNGCCN	100
III δ	-----	
III γ	-----	
IV δ	-----	
IV ϵ	-----	
IV γ	-----	
V ϵ	-----	
VI α	-----	
VI β	-----	
k ₄ α	-----	
k ₄ μ	-----	
alt δ	-----	
A 1-2	-----	
Penicillium_chrysogenum	-----	
II α	TTNTTTTTTTATNTTAATAAATAACNACCCCTTCCGTGCGTCCNNGTTTT	150
III δ	-----	
III γ	-----	
IV δ	-----	
IV ϵ	-----	
IV γ	-----	
V ϵ	-----	
VI α	-----	
VI β	-----	
k ₄ α	-----	
k ₄ μ	-----	
alt δ	-----	
A 1-2	-----	

Anhang E (Fortsetzung)

Penicillium_chrysogenum	-----AACCTGGTTGATCTGCCAGTA	22
II α	TTTANCATTATTNGCCTCTAGNAATTNCCNCCCNTTACCCCNATTN	200
III δ	-----	
III γ	-----	
IV δ	-----	
IV ε	-----	
IV γ	-----	
V ε	-----A	1
VI α	-----	
VI β	-----	
k ₄ α	-----	
k ₄ μ	-----	
alt δ	-----	
A 1-2	-----	
Penicillium_chrysogenum	GTCATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	68
II α	ANATNATGCTTGTCTCCAAAGATTAAAGCCAATGCAATGTCTAAGTATAA	250
III δ	-AAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	45
III γ	----TATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	42
IV δ	--AATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	44
IV ε	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	46
IV γ	-AAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	45
V ε	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	47
VI α	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	46
VI β	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	46
k ₄ α	-AAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	45
k ₄ μ	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	46
alt δ	----ATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	41
A 1-2	AAAATATGCTTGTCTC-AAAGATTAAGCC--ATGCA-TGTCTAAGTATAA	46
Penicillium_chrysogenum	GCAAC-TTGTACTGTGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	116
II α	GCAACTTTGTACTGTGAACTTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	300
III δ	GCAA--TTATACCGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	92
III γ	GCAA--TTATACCGCGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	89
IV δ	GCAA--TTACAAAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	91
IV ε	GCAA--TTATACCGCGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	93
IV γ	GCAA--TTATACAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	92
V ε	GCAA--TTATACCGCGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	94
VI α	GCAA--TTATACAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	93
VI β	GCAA--TTATACAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	93
k ₄ α	GCA-CTTTACTGTGAACT-GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGT	93
k ₄ μ	GCAA--TTATACAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	93
alt δ	GCAA--TTACAAAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	88
A 1-2	GCAA--TTATACAGCGAACT-GCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGT	93
	*** *	

Anhang E (Fortsetzung)

Penicillium_chrysogenum	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCT	165
II α	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCT	349
III δ	TTATTTGATAG-TACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	141
III γ	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	138
IV δ	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	140
IV γ	TTACTTGATAG-TGCCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	141
IV ε	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	142
V ε	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	143
VI α	TTACTTGATAG-TGCCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	142
VI β	TTATTTGATAG-TACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	142
k_4 α	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCT	142
k_4 μ	TTATTTGATAG-TGCCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	142
alt δ	TTATTTGATAG-TACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	137
A 1-2	TTATTTGATAG-TGCCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT	142
	** *** * * ***** ***** * *****	
Penicillium_chrysogenum	AATACATGCTAAAAA-CCCC--GACTTCAGGAAGGGGTGTATTTATTAGA	212
II α	AATACATGCTAAAAAACCCTCGAAGGATCCACGAAGGGGTGTATTTATTAGA	399
III δ	AATACATGCT-AAAAATCCC--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	187
III γ	AATACATGCTAAAAA-TCCC--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	184
IV δ	AATACATGCTAAAAA-TCCC--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	186
IV ε	AATACATGCTAAAAA-TCCC--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	188
IV γ	AATACATGCTGAAAAGCCCC--AACTTC-GGAAGGGGTGTATTTATTAGA	188
V ε	AATACATGCTAAAAA-TCCC--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	189
VI α	AATACATGCTGAAAAGCCCC--AACTTC-GGAAGGGGTGTATTTATTAGA	189
VI β	AATACATGCTAAAAA-CCCC--GACTTC-GGAAGGGGTGTATTTATTAGA	188
k_4 α	AATACATGCTAAAAAACCCT--GACTTCAGGAAGGGGTGTATTTATTAGA	189
k_4 μ	AATACATGCT-ACAAGCCCT--GACTTC-GGAAGGGCGTATTTATTAGA	188
alt δ	AATACATGCTGAAA-TCCT--GACTTC-GGAAGGGATGTATTTATTAGA	183
A 1-2	AATACATGCT-AAAAACCCT--GACTTC-GGAAGGGGTGTATTTATTAGA	188
	***** * * * *** ***** * * *****	
Penicillium_chrysogenum	TAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGC--TCC-TTGGTGAATCATAATAACT	258
II α	TAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGC--TCC-TTGGTGAATCATAATAACT	445
III δ	TTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCA-CTGGTGATTCATGATAACT	233
III γ	TTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-CTGGTGATTCATAATAACT	230
IV δ	TACAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCTCTTGGTGATTCATGATAACT	233
IV ε	TTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-CTGGTGATTCATAATAACT	234
IV γ	TACAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-TTGGTGATTCATGATAACT	234
V ε	TTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-CTGGTGATTCATAATAACT	235
VI α	TACAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-TTGGTGATTCATGATAACT	235
VI β	TTAAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCT-CTGGTGATTCATAATAACT	234
k_4 α	TAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGC--TCC-TTGGTGAATCATAATAACT	235
k_4 μ	TTAAAAACCAATGCCCTCTGGG-C--TCC-TTGGTGAATCATGATAACT	233
alt δ	TACAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TCTCTTGGTGATTCATGATAACT	230
A 1-2	TACAAAACCAATGCCCTTCGGGGC--TTC-TTGGTGATTCATGATAACT	234
	* ***** * * * ***** ***** ***** *	

Anhang E (Fortsetzung)

Penicillium_chrysogenum	TAACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	308
II α	TAACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	495
III δ	CCTCGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	283
III γ	TCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	280
IV δ	TCTCGAATCGCACGGCCCCGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	283
IV ε	TCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	284
IV γ	AAACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	284
V ε	TCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	285
VI α	AAACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	285
VI β	TCTCGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC	284
k_4 α	TAACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTC-TTCAAATTTCTGCC	284
k_4 μ	TCACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGCTCATTCAAATTTCTTCC	283
alt δ	TCTCGAATCGCACGGCCCCGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	280
A 1-2	ATACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCC	284
	** ***** * ***** ** * * ** * ***** **	
Penicillium_chrysogenum	CTATCA-ACCTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGGCAACGGGT	357
II α	CTATCA-ACCTTCGATGGTAGGATAGTGGCNTACCATGGTGGCAACGGGT	544
III δ	CTATCA-ACCTTCGATGTTTGGGTATTGGCCAAACATGGTTGCAACGGGT	332
III γ	CTATCA-ACCTTCGACGGCTGGGTCTTGGCCAGCCGTGGTGACAACGGGT	329
IV δ	CTATCA-ACCTTCGATGCTACGGTATTGTCCTAGCATGGTTGCAACGGGT	332
IV ε	CTATCA-ACCTTCGACGGCTGGGTCTTGGCCAACCGTGGTGACAACGGGT	333
IV γ	CTATCA-ACCTTCGATGGTTGGGTATTGGCCAACCATGGTTGCAACGGGT	333
V ε	CTATCA-ACCTTCGACGGCTGGGTCTTGGCCAACCGTGGTGACAACGGGT	334
VI α	CTATCA-ACCTTCGATGGTTGGGTATTGGCCAACCATGGTTGCAACGGGT	334
VI β	CTATCA-ACCTTCGATGGCAGGGTCTTGGCCTGCCATGGTTACAACGGGT	333
k_4 α	CTATCA-ACCTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGGCAACGGGT	333
k_4 μ	CTATCA-ACCTTCGATGTTTGGGTAGTGGCCAAACATGGTTGCAACGGGT	332
alt δ	CTATCA-ACCTTCGATGCTACGGTATTGTCCTAGCATGGTTGCAACGGGT	329
A 1-2	CTATCA-ACCTTCGATGTTTGGGTATTGGCCAAACATGGTTGCAACGGGT	333
	***** ** * * * * * * *****	
Penicillium_chrysogenum	AACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	407
II α	AACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACNGNTAC	594
III δ	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTG-GAAACGGCTAC	381
III γ	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	379
IV δ	GACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	382
IV ε	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	383
IV γ	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	383
V ε	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	384
VI α	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	384
VI β	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	383
k_4 α	AACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	383
k_4 μ	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	382
alt δ	GACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	379
A 1-2	AACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	383
	**** * ***** * ***** * ***** * *****	

Anhang E (Fortsetzung)

Penicillium_chrysogenum	CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGG	457
II α	CACANCCAAGGAAGNCAGCAGGCGCNCNAATTANCCNATCCCGATNCGGG	644
III δ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG	431
III γ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG	429
IV δ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACTCGGG	432
IV ε	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG	433
IV γ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATTTCGGG	433
V ε	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG	434
VI α	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATTTCGGG	434
VI β	TACA-----	387
k ₄ α	CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGG	433
k ₄ μ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATTTCGGG	432
alt δ	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACTCGGG	429
A 1-2	TACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACTCGGG	433

Penicillium_chrysogenum	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACGGGGCTCTTTTGGGTC-TCGTAAT	506
II α	GAGGTAGTGACAATAAATAATGATACGGGGNTCTTTTGGGTC-TNGTAAT	693
III δ	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCATTGTAAT	481
III γ	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-TTGTAAT	478
IV δ	GAGGTAGTGACGATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-CTGTAAT	481
IV ε	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-TTGTAAT	482
IV γ	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTAGGGCC-TTGTAAT	481
V ε	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-TTGTAAT	483
VI α	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTAGGGCC-TTGTAAT	483
VI β	-----	
k ₄ α	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACGGGGCTCTTTTGGGTC-TCGTAAT	482
k ₄ μ	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-TTGTAAT	481
alt δ	GAGGTAGTGACGATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTC-C-----	472
A 1-2	GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCCCTTTTGGGCC-TTGTAAT	482
Penicillium_chrysogenum	TGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCWAG	556
II α	TGGNATGAGNACAATTTAAATNCTTTANCGANCCCANAGTNCNNGGNAG-	742
III δ	TGGAATGAG-----	490
III γ	TGGAATGAGTACAA-----	492
IV δ	TGGAATGAGAACAATTCAAATCCCTC-----	507
IV ε	TGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGA-----	513
IV γ	-----	
V ε	TGGAATGAGTACAATTTAA-ATCCCT-----	508
VI α	TGGAATGAGTACAATTT-----	500
VI β	-----	
k ₄ α	TGGAATGAGAACAA-----	496
k ₄ μ	CGGAATGAGTACAATTTAAA-----	501
alt δ	-----	
A 1-2	TGGAATGAGTACAATTT-----	499

Anhang E (Fortsetzung)

Beste Übereinstimmungen der Basensequenzen mit Abschnitten der 18S rDNA bekannter Pilz-Stämme nach BLASTN-Auswertung

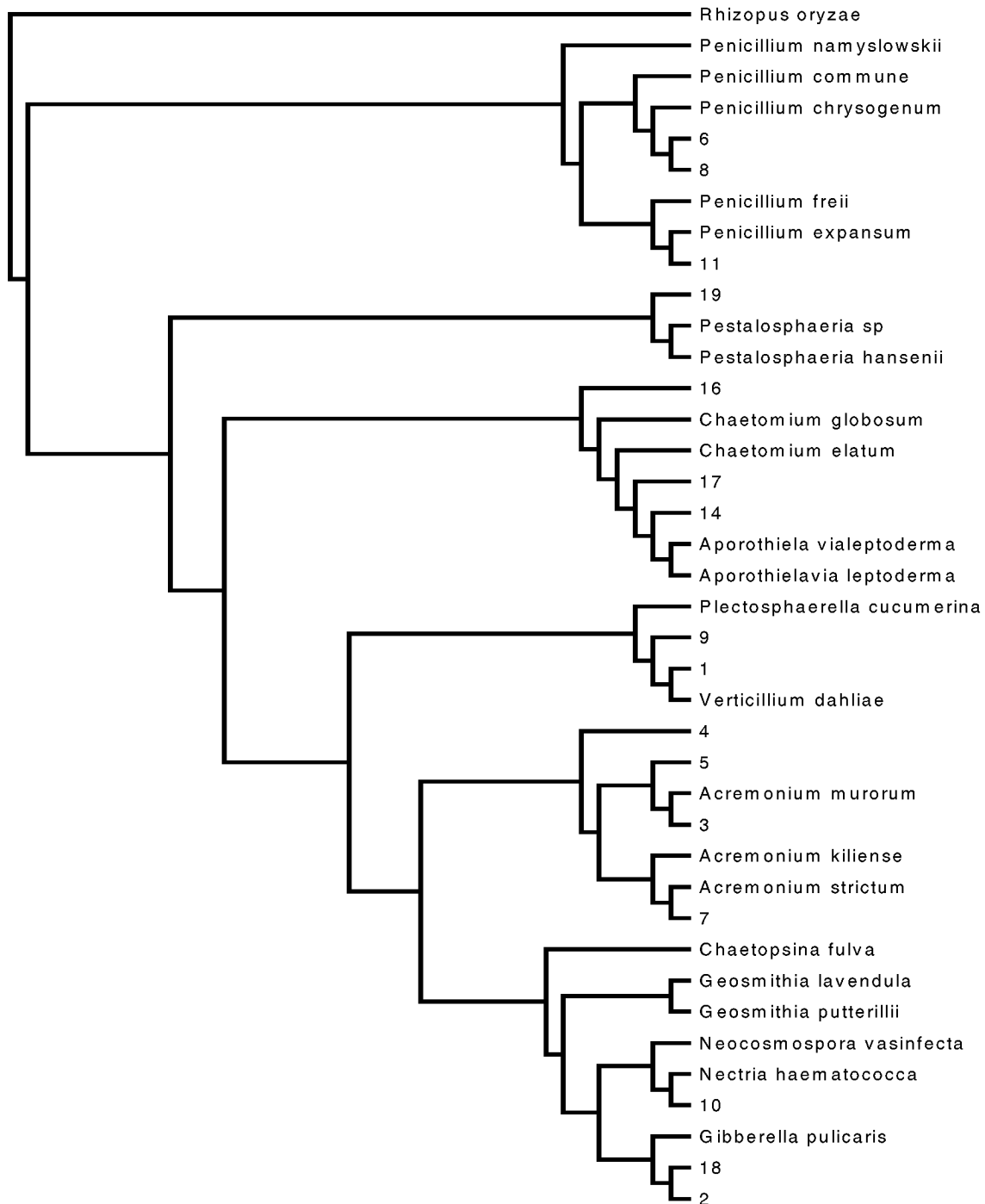
(Nummern in Klammern hinter der internen Bezeichnung = Nummern im phylogenetischen Baum der Ascomyceten-Sequenzen)

- II α (11) keine BLASTN-Auswertung
- III δ (2, 18) 99 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz (495Bp) mit *Gibberella pulicaris*
- III γ (14) keine BLASTN-Auswertung
- IV δ (9) keine BLASTN-Auswertung
- IV ε (16) 99 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18S rDNA (510 Bp) mit *Aporothielavia leptoderma*
- IV γ (3) keine BLASTN-Auswertung
- V ε (17) 99 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18s rDNA (498 Bp) mit *Aporothielavia leptoderma*
- VI α (5) 100 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz (410 Bp) mit *Acremonium murorum*
- VI β (19) keine BLASTN-Auswertung
- k₄ α (6) 100 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz der 18s rDNA (495 Bp) mit *Penicillium namyslowskii*
- k₄ β (15) 100 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz der 18S rDNA (490 Bp) mit *Rhizopus oryzae*
- k₄ μ (4) keine BLASTN-Auswertung
- alt δ (10) 100 % Übereinstimmung der partiellen Sequenz der 18S rDNA (483 Bp) mit *Neocosmospora vasinfecta*
- A 1-2 (7) 99 % Übereinstimmung der partiellen Basensequenz mit *Acremonium kiliense* (471 Bp) und mit *Acremonium strictum* (457 Bp)

Anhang E (Fortsetzung)

Phylogenetischer Baum der Ascomyceten-Sequenzen

Der phylogenetische Baum wurde erstellt mit dem Programm TreeView 1.6.1 und 18S rDNA-Sequenzen aus der Datenbank BLASTN 2.0.14.



Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre 5: Radioagronomie des Forschungszentrum Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Andreas Schäffer (RWTH Aachen) danke für die Betreuung der Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat.

Herrn Prof. Fritz Führ danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an seinem Institut und für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Burauel für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung, sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Michael Schlöter (GSF Neuherberg) danke ich für die Einweisung in die molekularbiologischen Techniken zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften im Boden und für die Mithilfe bei der Auswertung der BIOLOG-Analysen und DNA-Sequenzierungen.

Bei Herrn Dr. Uwe Wanner und Herrn Dipl.-Chem. Norbert Drewes bedanke ich mich für den intensiven Erfahrungsaustausch insbesondere in Fragen der Huminstoffcharakterisierung mittels GPC und NMR. Herrn Stephan Köppchen und Dr. Albert de Graaf danke ich für die Durchführung von HPLC- und GPC-Messungen bzw. der ^{13}C -NMR-Spektroskopie.

Frau Dipl.-Biol. Stefanie Reiffert bin ich dankbar für die Untersuchungen mit dem Fungizidwirkstoff Dithianon im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dipl.-Ing. Andrea Kreutzer und Frau Dipl.-Chem. Beate Bulawa, die mir eine wertvolle Hilfe, insbesondere bei der Isolierung von Mikroorganismen bzw. bei den biochemischen und molekularbiologischen Analysen waren. Darüber hinaus bin ich dankbar für die tatkräftige Unterstützung von Anita Steffen, Joseph Noël, Carmen Araus, den Praktikanten Rebecca Dursinsky und Kilian Witzel, sowie den Auszubildenden Eric Dreßen und Barbara Jantsch.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Chemie und Dynamik der Geosphäre 5: Radioagronomie danke ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Frau Katja Liebich für die wertvollen Anregungen bei der Durchsicht des Manuskriptes und für ihre große Geduld und Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

