

Dipl.-Biol. Desiree Jakobs

**Mikrobieller Abbau eines  
im Holzschutz verwendeten  
metallorganischen Biozids im Boden**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Mikrobieller Abbau eines  
im Holzschutz verwendeten  
metallorganischen Biozids im Boden**

2010

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung  
Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: [info@bam.de](mailto:info@bam.de)

Internet: [www.bam.de](http://www.bam.de)

Copyright © 2010 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Arbeitsgruppe Z.64

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9813346-9-2

# Mikrobieller Abbau eines im Holzschutz verwendeten metallorganischen Biozids im Boden

Vorgelegt von  
Diplom Biologin  
Desiree Jakobs  
aus Bünde (Kreis Herford)

Von der Fakultät III- Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-  
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rotard

Berichter: Prof. Dr. U. Szewzyk

Berichter: Prof. Dr. H. Hertel

Berichter: Dr. M. Noll

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: **09. Dezember 2009**

**Berlin 2010**

D 83



*„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“*

Albert Einstein



## Zusammenfassung

Holz und eine Vielzahl von Holzschutzmitteln (HSM) werden im Bodenkontakt durch Eukaryonten und Prokaryonten bis zum Kohlenstoffdioxid abgebaut und zum Teil in mikrobielle Biomasse umgewandelt. Die Abbauprozesse eines HSMs, auf Basis von metallorganischem Kupfer-HDO, wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die Verknüpfung chemischer und molekularbiologischer Techniken sowie  $^{13}\text{C}$  „Tracer“-Experimenten näher charakterisiert.

Analysen mit sterilisiertem Boden ergaben, dass der Abbau von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{12}\text{C}$ -Kupfer-HDO durch eine mikrobielle Gemeinschaft beschleunigt wurde. Durch Auswaschung aus geschütztem Holz können Teile des Biozids in geringen Konzentrationen in den Boden gelangen. Messungen der Biozidkonzentration mittels HPLC über die Zeit ergaben, dass das Kupfer-HDO innerhalb von wenigen Tagen im Boden abgebaut wurde. Ein Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten zeigte, dass Kupfer-HDO als reines Biozid im Boden schneller abgebaut wird, als ein im Holz eingebetteter Bestandteil einer Holzschutzmittelformulierung. Die Analysen des respiratorisch entstandenen  $\text{CO}_2$ , sowie der Veränderungen der mikrobiellen PLFA-Struktur in den Testansätzen mittels EA-IRMS- bzw. GC-C-IRMS erbrachten, dass das Kupfer-HDO sowohl anabolisch als auch katabolisch von der mikrobiellen Gemeinschaft metabolisiert wurde.

Durch den Einsatz der SIP-PLFA-Technik wurde die mikrobielle Gemeinschaft charakterisiert. Mittels der Analyse des  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts in den PLFAs wurde nachgewiesen, dass der Abbau des Biozids hauptsächlich durch Gram negative Bakterien erfolgte. In den nur in geringem Maße vorhandenen Signaturfettsäuren von Pilzen und anderen Eukaryonten konnte demgegenüber keine Veränderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Eukaryonten nicht am Abbau des Kupfer-HDOs beteiligt waren.

Um die mikrobielle Sukzession in Bezug auf HSM zu charakterisieren, wurde die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft auf der Oberfläche von Kupfer-HDO- und Kupfer-Amin-behandelten sowie unbehandelten Holzprüfkörpern im Bodenkontakt bestimmt. Zur Aufklärung der Bedeutung des Co-Biozids HDO für die mikrobielle Lebensgemeinschaft am Holz wurde dies durch ein anderes Amin ersetzt und unter der Bezeichnung Kupfer-Amin-HSM in den Untersuchungen eingesetzt.

Mit Hilfe des Fingerabdruckverfahrens T-RFLP wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaftsstruktur charakterisiert. In einem Ordinatensystem wurden die Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaftsstruktur hinsichtlich der Faktoren Inkubationszeit und HSM visualisiert. Die statistische Auswertung der Datensätze ergab, dass sich die bakterielle Gemeinschaftsstruktur zwischen dem Kupfer-Amin-basierten HSM signifikant von dem Kupfer-HDO-basierten HSM unterschieden. Im Verlauf der Inkubationszeit konnten in den einzelnen Testansätzen keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Die Gemeinschaftsstruktur der Eukaryonten wurde mittels des SSCP-Fingerabdruckverfahrens charakterisiert.

## Zusammenfassung

---

Dazu wurde die DNA von abundanten operativen taxonomischen Einheiten (OTUs), welche sich über die Zeit und im Bezug auf die verschiedenen HSM besonders stark änderten, aus den Banden in den SSCP-Gelen isoliert, kloniert und sequenziert. Entgegen den Erwartungen, unter den Eukaryonten am Holz und im angrenzenden Boden eine große Anzahl an Pilzen detektieren zu können, zeigte sich, dass nur drei Pilze an der Sukzession der eukaryontischen Gemeinschaft von Bedeutung waren. So wurde der Weißfäule erregende Basidiomycet *Sphaerobolus stellatus* vor allem an den H<sub>2</sub>O-behandelten Kontrollprüfkörpern nachgewiesen. Auch der Moderfäule erregende Ascomycet *Lecytophora multabilis* wurde vermehrt in den Kontrollen nachgewiesen.

Die eukaryontische Gemeinschaft wurde von unterschiedlichen Phyla, wie Alveolata, Discicrista, Amoebozoa, Arthropoda oder Nematoda dominiert. Von keinem dieser Organismen war aus der Literatur bekannt, dass er in der Lage ist, Holz, HSM oder einzelne Bestandteile von HSM zu metabolisieren. Diese Organismen ernähren sich in der Mehrzahl bakterivor. Dies deutet darauf hin, dass sie weniger das Kupfer-HDO abbauen, als vielmehr den Bakterienrasen beweidet, der sich auf der Oberfläche des Holzes angesiedelt hat.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine direkte Verbindung zwischen Organismengruppen und dem Abbau des metallorganischen Biozids Kupfer-HDO hergestellt werden. Zusätzlich wurden die zeitlichen Veränderungen der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Abhängigkeit von Kupfer-HDO charakterisiert.



## Abstract

The soil microbial community is able to degrade wood and a variety of chemical wood-preservatives (WP) to generate energy by producing CO<sub>2</sub> and as nutrition source to establish biomass. This work is focused on the characterization of the microbial degradation of a metal-organic WP including Copper-HDO (Cu-HDO) as biocide via <sup>13</sup>C tracer experiments. Investigations with sterilized and non-sterilized soil incubated with Cu-HDO demonstrated that degradation of Cu-HDO was accelerated by the presence of the soil microbial community. Leaching of treated wood into the surrounding soil is characterized by low Cu-HDO concentrations (5 µg – 20 µg). Measurements of such biocide-concentrations by HPLC over time showed that Cu-HDO was degraded within a few days of soil incubation. Cu-HDO solely was degraded faster in soil compared to Cu-HDO as part of a WP. Presence of Cu-HDO significantly decreased the overall soil respiration compared to samples without Cu-HDO. Detailed information of the microbial metabolic pathways was achieved by comparison of <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C enriched Cu-HDO experiments and thereafter SIP-PLFA analysis. Monitoring of the δ<sup>13</sup>C in PLFAs revealed that the carbon derived from the biocide was integrated nearly exclusively into the abundant PLFAs affiliated to gram negative bacteria. PLFAs indicative for fungi and other eukaryotic organisms could be found only in low relative abundances and without δ<sup>13</sup>C enrichment. This result suggests that eukaryotes were not involved in utilization of Copper-HDO based carbon. To characterise the impact of the co-biocide HDO on the microbial community the composition of the microbial community present at the surface of Copper-HDO, Copper-Amine treated specimens as well as of untreated specimens in soil contact was investigated. The bacterial community structure was characterized by the T-RFLP fingerprinting technique whereas the eukaryotic community structure was analyzed by the SSCP-fingerprinting technique. Shifts in the bacterial community structure were analyzed by correspondence analysis to explore the effect of WP and incubation time on the microbial community patterns. Bacterial and eukaryotic community structure differed significant between samples with Cu-Amine treated samples and Cu-HDO treated samples. To identify abundant eukaryotic community members a cloning and sequencing approach was carried out. Only few fungal sequences were obtained of the eukaryotic sequence diversity in the interface of wood and soil, which were affiliated to pronounced shifts in the eukaryotic community structure along the incubation time. One of these was the white-rotter *Sphaerobolus stellatus* (basidiomycota) and the mold-rotter *Lecytophora multabilis* (ascomycota). The dominant eukaryotic community members were affiliated to the phyla Alveolata, Disicicrista, Amoebozoa, Arthropoda or Nematoda. However, the majority of these phyla are known to have a bacteriovorous lifestyle and are not able to degrade or metabolize wood, WP or WP ingredients. This finding suggests that the majority of eukaryotes grazes on the bacterial population and is rarely involved in Cu-HDO degradation. In conclusion, a defined bacterial population is involved in Cu-HDO degradation and both the bacterial and eukaryotic community was significantly directly and indirectly affected by the presence of Cu-HDO.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IX</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Holzschutzmittel im Wandel der Zeit.....	1
1.2 Holzschutzmittel auf der Basis von Kupfer-HDO .....	2
1.3 Mikrobielle Gemeinschaften .....	5
1.3.1 Sukzession der mikrobiellen Gemeinschaft .....	5
1.3.2 Die mikrobielle Gemeinschaft im Boden .....	5
1.4 Die mikrobielle Gemeinschaft am Holz.....	6
1.5 Techniken zur Erfassung der mikrobiellen Diversität .....	11
1.6 Techniken zur Bestimmung von Kupfer-HDO .....	15
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	15
<b>2 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Chemikalien und Gase .....	17
2.2 Bodenproben.....	17
2.3 Holzprüfkörper und Holzmehl.....	17
2.4 Vermikulit.....	18
2.5 Herstellung eines Boden/Vermikulitgemisches.....	18
2.6 Kupfer-HDO und Formulierungen auf der Basis von Kupfer-HDO.....	19
2.7 Modellsysteme.....	19
2.8 Charakterisierung der Boden und Holzproben.....	22
2.8.1 Ermittlung des pH-Wertes in Bodenproben.....	22
2.8.2 Bestimmung des gravimetrischen Wassergehaltes im Boden.....	22
2.8.3 Bestimmung der Wasserhaltekapazität in Bodenproben.....	22
2.9 Bestimmung der Zusammensetzung des Bodens.....	23
2.9.1 Korngrößenanalyse.....	23

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9.2 Bestimmung des Karbonatgehaltes.....	23
2.9.3 Bestimmung des organischen Kohlenstoffes im Boden .....	24
2.9.4 Korndichte.....	24
2.9.5 Glühverlust.....	24
2.10 Modellsysteme.....	24
2.10.1 Modellsystem zur Analyse von HSM-Pr-Bo.....	26
2.10.2 Modellsystem zur Analyse von biozidbelastetem Boden .....	29
2.10.2.1 Inkubation des Bodens mit reinem Kupfer-HDO (Bi-Bo).....	29
2.10.3 Modellsystem zur Analyse von HSM-Ho-Bo.....	31
2.11 Begleitende Kontrolluntersuchungen.....	33
2.12 Chemische Analysen.....	34
2.12.1 Bestimmung der Kupfer HDO Konzentration.....	34
2.12.2 Bestimmung der Kupfer-Konzentration.....	36
2.13 CO <sub>2</sub> -Entwicklungstest zur Analyse des <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> .....	37
2.14 Bestimmung des δ <sup>13</sup> C in Boden und in BaCO <sub>3</sub> .....	39
2.15 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung .....	41
2.15.1 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung durch einen Infrarotgasanalysator.....	41
2.15.2 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung durch Titration.....	43
2.16 Charakterisierung der mikrobiellen Fettsäuren aus dem Boden.....	43
2.16.1 Extraktion von Fettsäuren .....	43
2.16.2 Bestimmung des Isotopenverhältnisses in den mikrobiellen Fettsäuren.....	45
2.16.3 Nomenklatur der PLFAs.....	45
2.17 Mikrobiologische Techniken.....	46
2.17.1 Bakterielle Reinkulturen.....	46
2.17.2 Erzeugung chemisch kompetenter Escherichia coli DH5α Zellen.....	46
2.17.3 Lagerung und Reaktivierung bakterieller Reinkulturen .....	47
2.17.4 Lagerung rekombinanter Zellen .....	48
2.18 Molekularbiologische Methoden.....	48
2.18.1 Verfahren zur Extraktion von Nukleinsäuren.....	48
2.19 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	50
2.20 Amplifikation ribosomaler DNA mittels PCR.....	52
2.21 Fingerabdruck-Techniken .....	53
2.21.1 SSCP und phylogenetischen Charakterisierung.....	54
2.21.2 T-RFLP .....	62

2.22 Statistische Auswertung der generierten Daten.....	64
2.22.1 Der Zweistichproben t-Test .....	64
2.22.2 Korrespondenzanalyse und Monte-Carlo Permutationstest.....	64
2.22.3 Charakterisierung der im SSCP-Gel visualisierten Banden .....	65
2.22.4 Analyse der Terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs).....	65
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
3.1 Bestimmung von chemischen- und physikalischen Bodenparametern.....	67
3.1.1 Stabilität von Kupfer-HDO im Boden.....	69
3.2 Testansätze mit Kupfer-HDO.....	70
3.2.1 Konzentration des Kupfer-HDOs im Boden.....	71
3.2.2 Veränderungen des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Boden.....	75
3.2.3 Auswirkungen von Kupfer-HDO auf die Respirationsaktivität des Bodens.....	75
3.2.4 Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch vom Boden abgegebenen $\text{CO}_2$ .....	77
3.2.5 Identifizierung der mikrobiellen Fettsäuren .....	79
3.3 Testansätze mit Holzschutzmitteln im Holz-Bodengemisch (HSM-Ho-Bo).....	82
3.3.1 Bestimmung der Konzentration des Kupfer-HDOs .....	82
3.3.2 Auswirkungen von HSM auf die Respirationsaktivität des Bodens.....	84
3.3.3 Veränderungen des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Boden.....	86
3.3.4 Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch abgegebenen $\text{CO}_2$ .....	87
3.3.5 Identifizierung der mikrobiellen Fettsäuren .....	88
3.4 Testansätze mit Holzschutzmittel in Prüfkörpern mit Bodenkontakt (HSM-Pr-Bo) .....	92
3.4.1 Räumliche Verteilung von Kupfer und Kupfer-HDO in Holzprüfkörpern .....	92
3.4.2 Bestimmung der Kupfer und Kupfer-HDO Konzentration .....	94
3.4.3 Bestimmung des Masseverlustes der Holzprüfkörper.....	96
3.5 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden mittels Fingerabdruck Techniken.....	97
3.5.1 SSCP zur Bestimmung der eukaryontischen-Gemeinschaft im Boden.....	97
3.5.1.1 Optimierung der SSCP.....	98
3.5.1.2 Untersuchung der eukaryontischen Gemeinschaft in den HSM-Pr-Bo Testansätzen mittels SSCP.....	99
3.5.1.3 Entwicklung einzelner eukaryontischen OTUs über die Zeit und in Bezug auf die HSM-Zusammensetzung.....	103
3.5.2 T-RFLP zur Bestimmung der Sukzession der bakteriellen-Gemeinschaft im Boden.....	106
3.5.2.1 Entwicklung einzelner für die Sukzession relevanter bakterieller OTUs .....	107

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>109</b>
4.1 Welchen Einfluss üben die Textur und die chemischen Eigenschaften des Bodens auf die mikrobielle Gemeinschaft aus? .....	109
4.2 Was passiert mit Kupfer-HDO im Boden?.....	111
4.3 Was passiert mit Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung im Boden-Holzgemisch? .....	119
4.4 Wie wird Kupfer-HDO im HSM im Holzprüfkörper im Bodenkontakt abgebaut?.....	124
4.4.1 Welche Organismengruppen sind abundant? .....	127
4.4.2 Worin liegen die Vor- und Nachteile der Fingerabdruck-Techniken SSCP & T-RFLP?.....	131
4.5 Wer baut Kupfer-HDO ab? Eine zusammenfassende Diskussion.....	134
4.6 Welche Fragestellungen & Zielsetzungen ergeben sich über die vorliegende Arbeit hinaus?.....	134
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>137</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>151</b>
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>154</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Holzschutzmittel im Wandel der Zeit

Die älteste bekannte Art zum Schutz des Holzes vor dem Abbau durch Mikroorganismen ist das Ankohlen des Holzes. Dies ergaben archäologische Funde aus der Zeit um 5000 v. Chr. in der Fayum Wüste (SUTTER, 1992). Auch zu Zeiten des Vasco da Gama (1469-1524) schützten die Portugiesen ihre Schiffsflotte durch diese Technik (SUTTER, 1992). Zum Schutz von Holz in gefährdeten Bereichen, wie dem Kontakt zum Boden, wurde bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts der Einsatz chemischer Holzschutzmittel (HSM) vorangetrieben (HUGHES, 2004). Das Wissen um den Einsatz von Chemikalien im Holzschutz war zu diesem Zeitpunkt nicht neu. So berichten Quellen, dass schon die Völker des Altertums, wie Ägypter, Phönizier und Griechen ein breites Wissen über die Verwendung von Salzen wie Alaun, Natron, Peche, Öle und Kochsalz zum Schutz von Holz vor dem Abbau durch Mikroorganismen besaßen (SUTTER, 1992). Im 19. Jahrhundert wurden verbreitet Produkte aus Kohle- und Erdöldestillaten im Holzschutz eingesetzt.

In der Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde eine Reihe hoch human-toxischer HSM, wie z.B. das Chrom-Kupfer-Arsen (CCA), Pentachlorphenol (PCP) oder  $\gamma$ -Hexachlorcyclohexan (Lindan) eingesetzt, die zusätzlich auch negative Einflüsse auf die Umwelt besaßen. CCA kann aus dem behandelten Holz austreten (MA ET AL., 2006, WILLEITNER ET AL., 1991) und akkumuliert im Boden, in Pflanzen und Tieren, z.B. in Fischen. Auch 40 Jahre nach dem Einsatz dieses Biozids wurde noch Arsen und Chrom im Boden sowie in Pflanzen in der Umgebung des behandelten Holzes nachgewiesen (MA ET AL., 2006). In vielen Studien wurden die Gesundheitsgefahren oder Problematiken der Entsorgung, die von diesem HSM oder seinen Bestandteilen ausgingen beschrieben (u.a. KWON ET AL., 2004; HAMULA ET AL., 2006; WILLEITNER 1973; HARTFORD, 1993 ODER HELSEN & VAN DEN BULCK, 2005). CCA dominierte den HSM-Markt für viele Jahrzehnte (HUGHES, 2004) und ist wahrscheinlich das am besten beschriebene HSM überhaupt. In den meisten europäischen Ländern wurde CCA aufgrund des Gehaltes an Schwermetallen, besonders des Arsens, verboten und ist derzeit nur noch als Referenz zur Analyse der Wirksamkeit von HSM oder im Außenbereich, z.B. an Lärmschutzwänden (COMMISSION DIEKTIVE 2003/2/EC 2003; HABICHT ET AL, 2003; EDLUND & NILSSON, 1999) zulässig. Die Verwendung anderer hoch humantoxischer HSM wie PCP oder Lindan wurde in Europa und den U.S.A. gänzlich verboten. Studien zur Bioremediation von Steinkohleteerölen, Lindan und PCP unter Verwendung von Pilzen und Bakterien sind von MAJCHERCZYK & HÜTTERMANN (1998) zusammengefasst.

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe HSM mit geringerer Toxizität für Mensch und Umwelt entwickelt. Eines dieser Präparate ist (Bis-(N cyclohexyl-diazeniumdioxy-)Kupfer), das Kupfer-HDO.

### 1.2 Holzschutzmittel auf der Basis von Kupfer-HDO

Die Wahl eines geeigneten HSM wird primär vom Einsatzort und der Art des Holzes bestimmt. Besonders am Weichholz, wie *Pinus sylvestris*, welches der Gebrauchsklasse 4 (GK 4) ausgesetzt ist, wird häufig chemischer Holzschutz eingesetzt. Der GK 4 unterliegt Holz für den Außenbereich mit direkter Wetterbeanspruchung und mit ständigem Erd- und/oder Süßwasserkontakt [DIN EN 335-1, 2006]. Damit ist das Holz dem ständigen Angriff durch holzerstörende Mikroorganismen ausgesetzt. Im Bauwesen ist chemischer Holzschutz für bestimmte tragende und aussteifende Holzbauteile, die z.B. im Kontakt mit dem Boden stehen (GK 4), sogar bauaufsichtlich vorgeschrieben (MARUTZKY, 1990). Häufig basieren HSM für Holz der GK 4 auf dem Biozid Kupfer-HDO.

Das Kupfer-HDO besteht aus dem anorganischen Kupfer und der organischen HDO-Komponente (Abb. 1). Übergangsmetalle, wie das Kupfer, sind wichtige Komponenten in vielen HSM der GK 4 (HUGHES, 2004; TEMITZ ET AL., 2004; DIBT, 2009). Neben dem Kupfer ist das Chrom ein häufig verwendetes Übergangsmetall in HSM. Die Kupfer- bzw. Chromkomponente bewirkt die Fixierung des Biozids am Holz. In der Literatur werden die Übergangsmetalle aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Eigenschaften (DICKERSON & GEIS, 1999) und der Dichte von  $> 5 \text{ g/cm}^3$  (FORSTNER & WITTMANN, 1979) oft den Schwermetallen zugeordnet (vergl. FROSTEGÅRD ET AL., 1993 B; EDLUND & NILSSON, 1999).

Eine weitere wichtige Funktion des Kupfers im HSM ist der Schutz des Holzes vor dem Abbau durch saprophytische Mikroorganismen im Boden. Neben den guten fungiziden Eigenschaften von Kupfer ist bekannt, dass es im Holz auch einen effektiven Schutz vor dem Abbau durch holzerstörende Bakterien bietet (TEMITZ ET AL, 2004, EDLUND & NILSSON, 1999, SCHMIDT, 2006).

Über den Effekt, den zu hohe Kupfer-Konzentrationen auf die Mikroorganismen im Boden ausüben, ist bislang wenig bekannt. FLEMMING & TREVORS (1989) sowie NIES (1999) wiesen nach, dass bei einer zu hohen intrazellulären Kupfer-Konzentration unspezifische Bindungen zwischen Kupfer und der Zellmembran entstehen können. Die Folge ist oft die Zerstörung der Integrität der Zellmembran und damit der Tod des Organismus (LEITA ET AL., 1995). Es können sich zusätzlich auch unspezifische Komplexe von Kupfer mit Komponenten der Zelle, wie Proteinen, bilden (FLEMMING & TREVORS, 1989; NIES, 1999, LEITA ET AL., 1995). Dies kann auch zum Tod des Organismus oder zumindest zur Inhibierung von Wachstum und Zellteilung führen. Einige Mikroorganismen haben gegen Schwermetalle Resistenzmechanismen entwickelt. Die notwendigen Gene sind hierfür häufig auf Plasmiden lokalisiert



(DONG, ET AL., 1998). Weitere Resistenzmechanismen können das Ausschleusen des Kupfers aus der Zelle oder die Komplexierung zu weniger toxischen Substanzen sein (NIES, 1999).

Im Boden können hohe Kupfer-Konzentrationen durch die oben genannten Effekte zu einer signifikanten Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft führen (BÄÄTH, 1992; BÄÄTH ET AL., 1998; FROSTEGÅRD ET AL., 1993 B; PENNANEN ET AL., 1996), indem sich einzelne an das Kupfer angepasste Organismengruppen durchsetzen können. Eine Kupferkontamination des Bodens wirkt sich häufig besonders auf die Abundanz aerober Bakterien aus. Von hoher Relevanz ist zusätzlich die Dauer der Kontamination (WILKE ET AL., 2005), sowie die Form, in der die Schwermetalle bioverfügbar sind. Kupfer in organischer Form gebunden übt auf das Wachstum, die Morphologie und den Metabolismus von Mikroorganismen im Boden einen erheblichen Einfluss aus (LEITA ET AL., 1995). Die Bioverfügbarkeit von Kupfer im Boden korreliert auch mit der Feuchtigkeit des Substrats (TOM-PETERSEN ET AL., 2004). So ist Kupfer in einem trockenen Boden häufig weniger toxisch für die Mikroorganismen, wie die gleiche Kupfer-Konzentration in einem feuchteren Boden (FLEMMING & TREVORS, 1989; TOM-PETERSEN ET AL., 2004).

In vielen Laborstudien wurde belegt, dass Chrom- und Kupfersalze eine inhibierende Wirkung gegenüber Mikroorganismen besitzen (u.a. SCHMIDT & LIESE, 1974; SCHMIDT & LIESE, 1976). Freilandexperimente zeigten hingegen, dass Holz, welches durch CCA, Kupfer-HDO oder metallorganische HSM geschützt war, trotzdem von Mikroorganismen abgebaut wurde (EDLUND & NILSSON, 1999; BRISCOE ET AL., 1990). Es existiert demnach ein deutlicher Unterschied im Abbauverhalten zwischen Laboranwendungen und Freilandexperimenten (SCHMIDT & LIESE, 1994; EDLUND & NILSSON, 1999).

Kupfer hat nicht nur eine schädliche Wirkung auf die Organismen, z.B. im Boden, sondern es ist auch ein essentielles Spurenelement. Aufgrund seiner Redoxchemie ist Kupfer für viele metabolische Prozesse, sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten, notwendig (FLEMMING & TREVORS, 1989). Als essentieller Bestandteil in der Atmungskette fungiert das Kupfer als redoxaktives Zentrum verschiedener Cytochrom Oxidasen (SPENO ET AL., 1995; ROBINSON ET AL., 1999). Von holzerstörenden Krustaceen ist bekannt, dass sie Kupfer an die aktiven Zentren ihrer holzabbauende Enzyme anlagern und so die Degradierung des Holzes vorantreiben (CRAGG ET AL., 1999).

HDO wird als Co-Biozid neben der Verwendung mit Kupfer im Kupfer-HDO auch im Komplex mit Kalium ((N-cyclohexyl-diazoniumdioxy-)Kalium) und Aluminium (Tris-(N-cyclohexyl-diazoniumdioxy-) Aluminium) eingesetzt (GÖTTSCHE & MARX, 1989). Das Kalium-HDO wird unter dem Markennamen Xylogen® 25 oder Xylogen® 30 vermarktet (JÜNGEL, 2002; DIBT, 2009) und findet als Sonderpräparat in Holzspanplatten oder Bau-Furniersperrholzplatten Verwendung. Das Aluminium-

HDO ist unter dem Marktnamen Xyligen® Al erhältlich und besitzt sehr gute fungizide Eigenschaften (PETROWITZ & WAGNER, 1981). Dieses Präparat wird heute zum Schutz von Holz außerhalb des Bodens (GK3) eingesetzt (DIBt, 2009).

Das HDO ist ein Amin und fungiert als Co-Biozid. Das Amin stabilisiert und fixiert das Biozid im Holz (ZHANG & KADMEM, 1999). Zusätzlich bietet das HDO einen wirksamen Schutz vor dem Abbau des Biozids durch kupfertolerante Mikroorganismen (LEBOW, 2004). EDLUND & NILSSON (1999) berichteten in ihrer Studie, dass die Co-Biozide, wie HDO, eine wichtige Funktion beim Schutz des Holzes vor dem Abbau durch holzerstörende Mikroorganismen besitzen. Die Wirkweise von Kupfer-HDO ist jedoch weitestgehend unbekannt. Es wird vom OFFICE OF PREVENTION, PESTICIDES ENVIRONMENTAL PROTECTION AND TOXIC SUBSTANCES AGENCY (EPA) 2005 berichtet, dass das Kupfer-HDO einen Effekt auf die Funktion der Sulfhydrylgruppen von essentiellen Aminosäuren in Pilzen besitzt.

Kupfer-HDO wird durch das Kessel-Vakuum-Druckverfahren in das Holz eingebracht und findet vielfältigen Einsatz unter GK 4-Beanspruchung u.a. in Fassaden, Zäunen, Terrassendecks, Pfählen und Masten, im Ständerwerk von Brücken, im Lawinenschutz, sowie in Bootsstegen von Süßwasserseen (WWW.WOLMAN DE.).

Derzeit sind in Deutschland im Bereich GK 4 von den 22 bauaufsichtlich zugelassenen Formulierungen 8 chromhaltig und 14 chromfrei. Im Jahr 2008 waren unter anderem noch 3 Formulierungen auf der Basis von Steinkohleteerölen bauaufsichtlich zugelassen (DIBt, 2008). Zu den chromfreien Formulierungen wird auch das Kupfer-HDO gezählt (DIBt, 2009), dass z.B. als Wolmanit® CX erhältlich ist.

Alternativen zum chemischen Holzschutz sind seit Jahrzehnten bekannt. Unter anderem kommen Hölzer mit einer natürlichen Dauerhaftigkeit zum Einsatz (LIESE, 1961; BECKER, 1961; CRAGG ET AL., 1999; VENÄLÄINEN, ET AL., 2001) oder die Resistenz des Holzes wird durch Erhitzen verbessert (KAMDENET AL., 2002). Eine neuere Technik, bei der mit Temperaturen von 180 - 260 °C gearbeitet wird, ist das Thermowood-Verfahren (KOCAEFE ET AL., 2007). Mit mäßigem Erfolg werden auch antagonistische Bakterien und Pilze und deren Exkrete eingesetzt (WÄCHLI & TSCHOLL, 1975; SCHMIDT, 2006). Ein neuerer Ansatz ist die Verwendung von Wood-Plastic-Composites (WPC). WPC ist ein Verbundwerkstoff aus Holz mit häufig synthetischen Kunststoffen und Additiven (z.B. UV-Schutzzusätze, Farbpigmente oder Klebstoffe) und findet unter anderem Anwendung in Bodenbelägen.

## 1.3 Mikrobielle Gemeinschaften

### 1.3.1 Sukzession der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Sukzession (lat. *succedere*: nachfolgen) wird definiert als nicht jahreszeitlich bedingtes, gerichtetes und kontinuierliches Muster der Besiedelung eines Gebietes durch aufeinander folgende Populationen an einem bestimmten Ort (BEGON ET AL., 1996) nach einer nicht weiter definierten Störung der Biozönose (FISHER, 1990). Die ersten Beschreibungen dieses Phänomens stammen aus dem späten 19. Jahrhundert und sind von NOLL (2004) zusammengefasst.

Wichtige sukzessive Ereignisse sind die Primärsukzession, die erste Erschließung eines neuen Gebietes, z.B. nach einem Vulkanausbruch, und die Sekundärsukzession. Als Sekundärsukzession wird eine Wiederbesiedelung eines Gebietes nach einer Störung, z.B. durch abiotische Faktoren wie Flutung des Habitats mit Wasser (NOLL ET AL., 2005), durch Temperaturveränderungen (HORI ET AL., 2006) oder durch den Eintrag von Huminstoffen (MANUCHAROVA ET AL., 2005) bezeichnet. PONGE (1991) beschrieb, dass eine Veränderung der Zusammensetzung der organischen Bestandteile im Boden zu einer Sukzession der mikrobiellen Gemeinschaft führen kann. Dieser Grundsatz gilt im Speziellen auch für die mikrobielle Gemeinschaft am Holz, im Boden oder in anderen Medien, wo durch den Eintrag von Bioziden eine Sukzession ausgelöst werden kann (WALLACE & DICKINSON, 2004; POWELL ET AL., 2001; SHIRAKAWA ET AL., 2001). Nach längerer störungsfreier Zeit bildet sich eine durch die abiotischen Faktoren bestimmte stabile Schlussgesellschaft.

### 1.3.2 Die mikrobielle Gemeinschaft im Boden

Ein Teilaspekt der mikrobiellen Ökologie beschäftigt sich seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts mit der Identifizierung von mikrobiellen Gemeinschaften in nahezu allen Bodenhabitaten der Erde. Abhängig vom Ökosystem befinden sich pro Gramm Boden ca.  $10^4$ -  $10^9$  Bakterien (BLAINE METTING JR, 1992) und ca.  $10^6$  Pilze (ANDERSON ET AL., 2003). Die mikrobielle Diversität ist in jedem Habitat von vielen biotischen und abiotischen Faktoren abhängig (GISI ET AL., 1997). Unter den abiotischen Faktoren haben sich unter anderem der pH-Wert und die Feuchtigkeit als relevant für die Struktur des Bodens sowie für die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft herausgestellt (ULRICH & BECKER, 2006). Die bakterielle Diversität ist in pH-neutralen Böden am höchsten (FRIERER & JACKSON, 2006). Aufgrund des geringen Nährstoffgehaltes ist in einem Sandboden die mikrobielle Diversität signifikant geringer als in einem Lehmboden (SESSITSCH ET AL., 2001). Bakterien besiedeln bevorzugt die

Lehmfraction im Boden, während die Pilze und Protozoen auch in der Sandfraction leben (GISI ET AL., 1997).

Mikroorganismen sind verantwortlich für den biogeochemischen Kreislauf auf der Erde (RADAJEWSKI ET AL., 2000; MÜLLER ET AL., 2002, ULRICH & BECKER, 2006). Bakterien und Pilze sind essentiell für die biochemischen Prozesse im Boden. Sie sind sie z.B. in den Kohlenstoff- oder Energiestoffwechsel direkt involviert (RANJARD ET AL., 2000). Die mikrobielle Gemeinschaft im Boden produziert auch eine große Anzahl an extrazellulären Enzymen, die im Boden den Abbau von Makromolekülen wie Stärke, Lignin und Zellulose vermitteln (GISI ET AL., 1997, VAN DER WAL, 2007).

Im Fokus der Umweltmikrobiologie standen in den letzten Jahren oft angewandte Fragestellungen, wie der Einsatz von Mikroorganismen zur Sanierung des Bodens (KLEINSTEUBER ET AL., 2006) oder die Auswirkung von Zivilisationseinflüssen auf die mikrobielle Gemeinschaft im Boden (BÖCKL, ET AL., 1998; RANJARD ET AL., 2000; BOYLE, 2006) und im Wasser (SCHREIBER & SZEZYK, 2008).

### 1.4 Die mikrobielle Gemeinschaft am Holz

Pilze besitzen in terrestrischen Ökosystemen eine Schlüsselfunktion beim Abbau von organischem Material wie Holz (ANDERSON ET AL., 2003; HÖGBERG ET AL., 1999 B; SCHMIDT, 2006; GISI ET AL., 1997). Ein Angriffspunkt der Mehrheit dieser saprophytischen Pilze ist die Zellwand des Holzes. Die Holzzellwand ist eine polymere Struktur und besteht hauptsächlich aus Zellulose, Hemizellulose und Lignin. Zum Abbau des Lignins sind spezielle Enzyme notwendig, die nicht von allen saprophytischen Pilzen gebildet werden können (SCHMIDT, 2006). Aus diesem Grund bleibt das Lignin bei vielen Befallstypen häufig lange intakt.

Es werden 3 Befallstypen des pilzlichen Holzabbaus unterschieden (POWELL ET AL., 2001): (a) Braunfäule, (b) Weißfäule und (c) Moderfäule. Die unterschiedlichen Befallstypen werden dabei durch das Schadbild charakterisiert und geben zunächst nur bedingt Aufschluss über den involvierten Pilz. Hauptsächlich handelt es sich bei den holzabbauenden Pilzen um Basidiomyceten, Ascomyceten und Deuteromyceten (POWELL ET AL., 2001).

- (a) Die Braunfäule wird vor allem durch holzerstörende Basidiomyceten hervorgerufen, welche die Zellulose des Holzes metabolisieren. Da Braunfäule erregende Pilze nur wenige Lignin abbauende Enzyme exkretieren (SCHMIDT, 2006), verbleibt das Lignin im Holz und verleiht dem Schadbild die typische braune Färbung. Das Holz verliert durch den Abbau der Zellulose an Masse und Festigkeit. Es können die für Braunfäule typischen, querrissigen Strukturschäden, der sogenannten „Würfelbruch“, entstehen (Abb. 1A blauer Pfeil).



**Abbildung 1:** A Von einem Braunfäulepilz befallener Holzprüfkörper (Nadelholz). Der **blaue Pfeil** zeigt die für diesen Befallstyp charakteristischen „Würfelbruch“. B Ein mit einem Weißfäule erregenden Pilz befallenes Laubholzstück. **Roter Pfeil:** Demarkationslinie. **Grüner Pfeil:** weiße Zellulosefasern. ein typisches Schadbild das durch Weißfäule erregende Pilze hervorgerufen wird.

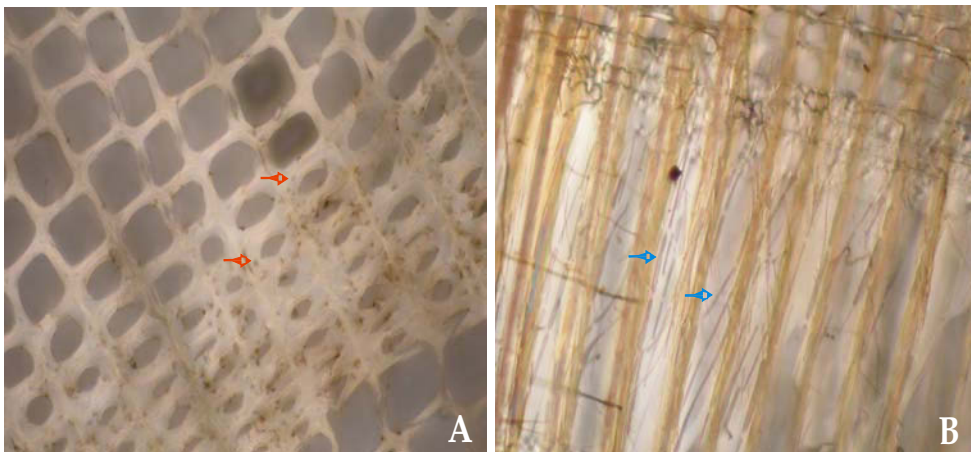
Prominente Braunfäule erregende Pilze sind u. a. *Lentius lepideus*, *Antrodia spp.* und *Serpula lacrymans*. Letzterer, der echte Hausschwamm, ist einer der bekanntesten holzerstörenden Pilze und zeichnet sich besonders durch sein hohe Toleranz gegenüber hohen Kupfer-Konzentrationen aus (HASTRUP ET AL., 2006).

An Holz, das mit einem HSM auf Kupfer-HDO-Basis behandelt wurde, konnte bereits ein Holzabbau durch Braunfäule erregende Pilze nachgewiesen werden. Es ist jedoch unbekannt, ob diese Pilze aktiv das Biozid abbauen können (EDLUND & NIELSON, 1999).

- (b) Bei Weißfäule erregenden Pilzen handelt es sich in der Regel um Basidiomyceten und einige wenige Ascomyceten. Diese Pilze degradieren die Zellulose, die Hemizellulose und Lignin des Holzes (Leise, 1970). Charakteristisch für diesen Befallstyp können dunkle Linien im Holz sein (Demarkationslinien) (Abb. 1A roter Pfeil), die gesunde Holzteile von befallenen abgrenzen und der Feuchtigkeitsregulation im Holz dienen (SCHMIDT, 2006). Das erzeugte Schadbild einer Weißfäule kann sich durch weißliche Zellulosefasern auszeichnen (Abb. 1A grüner Pfeil). Bekannte Weißfäule erregende Pilze sind neben *Trametes versicolor* und *Ganoderma adspersum* auch Mitglieder

der Gattung *Sordariales*. Es ist bekannt, dass z.B. der Weißfäule erregende Pilz *Trametes hirsuta* in der Lage ist, HSM wie PCP vollständig zu mineralisieren (BOYLE, 2006). In Freilandversuchen konnte von EDLUND & NIELSON (1999) gezeigt werden, dass Holz, das durch ein Kupfer-HDO haltiges Präparat geschützt war von Weißfäule befallen war. Für Kupfer-HDO wurde unter Berücksichtigung eines Auswaschprozesses im Holz eine Toxizitätsgrenze für *Coriolus versicolor* von  $1 \text{ kg / m}^3$  festgelegt (ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES, EVALUATION ON CU-HDO, 2005). Ob Weißfäule erregende Pilze jedoch auch Kupfer-HDO abbauen können ist unbekannt.

- (c) Der Begriff „Moderfäule“ wurde 1954 von FINDLAY & SAVORY eingeführt. Bei Moderfäule erregenden Pilzen handelt es sich um Ascomyceten und Deuteromyceten, die Holz unter extremen Bedingungen, wie hohen Temperaturen, hoher Feuchtigkeit oder niedrigem pH-Wert abbauen können, die für Basidiomyceten ungünstig sind (LIESE & AMMER, 1964; BJORDAL ET AL, 1999). Der Befallstyp der Moderfäule unterscheidet sich von den Befallstypen Braun- und Weißfäule durch das Wachstum des Pilzes in den Zellwänden des Holzes. Es entstehen die für die Moderfäule typischen Hohlräume in den Sekundär-Wänden von Hart- und Weichhölzern. Diese Hohlräume weisen im Längsschnitt eine kavernenartige (Rhomben) Struktur auf (Abb. 2 A und Abb. 2 B) (LIESE, 1964; SCHMIDT, 2006).



**Abbildung 2.:** A Radialschnitt und B Tangentialschnitt durch einen von einem Moderfäule erregenden Pilz befallenen Holzprüfkörper. Die roten Pfeile zeigen die Löcher in den Sekundärwänden, die blauen Pfeile die rhombenartige Struktur dieser Hohlräume.

Häufig kann bei Moderfäule erregenden Pilzen, wie *Lecytophora multabilis*, auch das Auftreten von Speichergranulae festgestellt werden, in denen hohe Konzentrationen des HSM CCA gefunden wurden (DANIEL, 2003). Diese Granulae könnten der Detoxifizierung des HSMs dienen. Moderfäule erregende Pilze bauen zunächst die Zellulose und Hemizellulose ab. In späteren Stadien kann auch

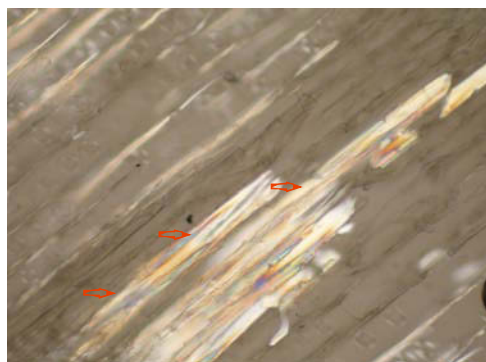
ein Abbau des Lignins vollzogen werden. Viele Moderfäule erregende Pilze sind jedoch nicht tolerant gegenüber hohen Kupferkonzentrationen, so dass die Verwendung dieses Metalls in einem HSM einen guten Schutz gegenüber einem Befall durch diese Pilze bietet (SCHMIDT, 2006).

Neben den Pilzen sind auch Bakterien am Abbau des Holzes und der Degradierung von HSM beteiligt (BRISCOE, ET AL., 1990; WALLACE & DICKINSON, 2004; WALLACE & DICKINSON, 2006). Da sie jedoch weniger prominente Schadbilder erzeugen und der Abbau langsamer verläuft, ist dieser Befall in der Literatur weniger beschrieben als der Holzbefall durch saprophytische Pilze.

Während der mikrobiellen Sukzession scheinen die Bakterien die ersten Organismen zu sein, die das Holz besiedeln. Bakterien können jedoch auch in späteren Stadien des Holzbefalls auftreten (SCHMIDT & LIESE, 1994). Bei den holzerstörenden Bakterien handelt es sich um Stäbchen der Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Flavobacterium* und *Pseudomonas*. Auch einige Kokken, wie *Micrococcus* und *Staphylococcus*, sind in den Abbau des Holzes involviert (SCHMIDT & LIESE, 1994). Zu den holzabbauenden Bakterien zählen sowohl aerobe, fakultative anaerobe und auch strikte anaerob lebende Bakterien. Die Letztgenannten bewohnen z.B. Holz im Wasserkontakt, das durch die Bildung von anaeroben Bereichen für viele Pilze, mit Ausnahme von Hefen und Moderfäule erregenden Pilzen, nicht besiedelbar ist (POWELL ET AL, 2001).

Bakterien gelangen häufig durch das Parenchym, das als Quelle von einfach abzubauenen Nährstoffen dient, in verschiedene Bereiche des Holzes. Es sind drei Arten des Holzabbauprozesses durch Bakterien bekannt (a) Erosion, (b) Clavitation und (c) Tunnelbildung (SCHMIDT & LIESE, 1994; SINGHT ET AL., 1990; POWELL ET AL., 2001).

Das Schadbild, das von Clavitation- oder Tunnelbakterien erzeugt wird, unterscheidet sich vom Schadbild der Erosion durch die Bildung von Kavernen in den Zellwänden. Mikroskopisch ist dieses Schadbild ähnlich dem der Moderfäule (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Tangentialschnitt durch einen von Bakterien befallenen Holzprüfkörper. Der Bakterienbefall des Holzes

verursacht den Abbau der zellulose- und hemizellulosehaltigen Zellwände; als hellere Bereiche zu erkennen (rote Pfeile).

Ein von Mikroorganismen befallenes Holz wird in vielen Fällen von unterschiedlichen Bakterien und Pilzen gleichzeitig befallen. Bakterien und Pilze können dabei sowohl synergetische als auch antagonistische Gemeinschaften bilden. Bakterien können Pilze in ihrem Wachstum durch die Abgabe von toxischen Degradationsprodukten, Antibiotika oder die Entfernung von Nährstoffen in ihrem Wachstum inhibieren (SCHMIDT & LIESE, 1994; DE BOER & VAN DER WAL, 2008). Auf der anderen Seite können sie durch die Abgabe von stickstoffhaltigen Verbindungen das Pilzwachstum beschleunigen (LEVY, 1975; DE BOER & VAN DER WAL, 2008).

Bezogen auf den Holzschutz konnte von DANIEL UND NILSSON (1985) am Beispiel des CCAs nachgewiesen werden, dass Bakterien durch die Solubilisierung von Biozidkomponenten die Toxizität soweit herabsetzen können, dass ein Pilzwachstum möglich ist. Unter Verwendung des gleichen Biozids konnten GREAVES (1970) und WILLEITNER ET AL., (1977) zeigen, dass der Abbau des Holzes durch Pilze beschleunigt wird, wenn zuvor eine bakterielle Reinkultur (*Conophora puteana*) am Holz eingesetzt wurde. Es wurde spekuliert, dass dieser Effekt durch spezielle von Bakterien produzierten Säuren ausgelöst wird. Diese Säuren können zum Auswaschen der fixierten Bestandteile des CCAs führen (SCHMIDT, 1986). Der gleiche Effekt kann auch durch Säuren hervorgerufen werden, die von Pilzen gebildet und abgegeben werden.



## 1.5 Techniken zur Erfassung der mikrobiellen Diversität

Zur Beantwortung von mikrobiell-ökologischen Fragestellungen und zur Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft z.B. im Boden sind zwei unterschiedliche Herangehensweisen bekannt. Die klassische Herangehensweise stützt sich auf die Kultivierung der zu analysierenden Organismen. Bei der anderen, der molekularbiologischen Herangehensweise, werden die Nukleinsäuren zur Identifizierung der Organismen verwendet.

Der klassische Ansatz zur Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft hat den großen Nachteil, dass bisher nur 1 - 15 % der Bakterien (AMANN ET AL., 1995; KIRK ET AL., 2004; SCHLEIFER, 2004) und etwa 5 % -10 % der Pilze im Boden (HAWSWORTH, 1991; HAWSWORTH & ROSSMAN, 1997) kultiviert werden konnten. Der kultivierbare Anteil der Gemeinschaft ist aus diesem Grund weder qualitativ noch quantitativ repräsentativ für das untersuchte Ökosystem. Es eignen sich somit die traditionellen Kultivierungsmethoden nur eingeschränkt zur Bestimmung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft. Die Kultivierungsmethoden sind bei der Isolierung der abundanten Mitglieder mikrobieller Gemeinschaften in vielen Fällen nicht erfolgreich und sind aus diesem Grund für die Quantifizierung nur eingeschränkt anwendbar (CHANDELER ET AL., 1997).

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden, besonders der Verwendung des Markergens der 16S rRNA zur phylogenetischen Klassifizierung, wurde es möglich, die Diversität komplexer bakterieller Gemeinschaften aufzulösen (WOESE, 1987; AMMAN ET AL., 1995; HUGENHOLZ, 2002; RANJARD ET AL., 2000). Die Verwendung des 16S rRNA-Markergens zur phylogenetischen Klassifizierung hat sich gegenüber anderen kultivierungsunabhängigen Methoden, wie unter anderem die Verwendung von ATPase Untereinheiten (AMANN ET AL., 1988) oder RNA-Polymerasen (PÜHLER ET AL., 1989), durchgesetzt, da die 16S rRNA-Gene wichtige strukturelle Komponenten der prokaryontischen Ribosomen sind und somit ubiquitär in Prokaryonten vorkommen. Durch die Größe von etwa 1500 bp besitzt die 16S rRNA gegenüber z.B. der 23S rRNA (2900 Basen) einen ausreichend großen Informationsgehalt, um phylogenetische Charakterisierungen von Prokaryonten vornehmen zu können (WOESE, 1987). Mittels einer Zusammenstellung von Sequenzdaten konnte nachgewiesen werden (NEEFS, ET AL., 1993), dass die 16S rRNA-Gene aller Organismen neben stark konservierten Abschnitten, insgesamt 9 variable Regionen beinhalten (V1 - V9). Die stark konservierten Bereiche fungieren bei den phylogenetischen Untersuchungen als Bindestellen für die Oligonukleotidprimer, während die variablen Sequenzen zur Unterscheidung der Organismen verwendet werden.

Auf Ebene der Eukaryonten stützt sich die phylogenetische Charakterisierung auf dem 18S rRNA-Gen (DIEZ ET AL., 2001 A; DIEZ ET AL., 2001 B; VAN HANNEN, ET AL., 1999; HE ET AL., 2005). Zur tieferen Auflösung,

z.B. zur Identifizierung holzerstörender Pilze (RÅBERG ET AL., 2005) oder zur Charakterisierung von Nematoden (POWERS ET AL., 1997), werden die ITS-Regionen des 18S rRNA-Gens (internal transcribed spacers) verwendet.

Die Aufklärung der Zusammensetzung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften wurde durch verschiedene molekularbiologische Fingerabdruck-Techniken, basierend auf dem 16S-rRNA- bzw. 18S rRNA-Gen, realisiert. Der Vorteil gegenüber den klassischen kultivierungsabhängigen Methoden ist neben der Möglichkeit einen größeren Anteil der Gemeinschaft überhaupt erfassen zu können auch ein hoher Durchsatz vieler Proben. Zusätzlich kann die Dynamik der Gemeinschaft über die Zeit visualisiert werden. Fingerabdruck-Techniken bieten zusätzlich gegenüber den häufig zeitaufwendigen Verfahren von Klonierung und Sequenzierung eine schnellere und eindeutigere Abschätzung der mikrobiellen Diversität. Zusätzlich können Informationen zur Abundanz einzelner Organismengruppen getroffen werden.

Häufig verwendete Fingerabdruck-Techniken sind z.B. (a) denaturierende/thermische Gradientengelelektrophorese DGGE/TGGE (MUYZER, 1999; KOWALCHUK ET AL., 1997), (b) Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP; LEE, ET AL., 1996) und (c) Terminaler-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP; LIU, 1997). Diese Methoden ermöglichen gemischte PCR-Produkte auf Grund von verschiedenen Charakteristika der DNA, wie Schmelzverhalten, Mobilität in einem elektrophoretischen Gel oder Sequenzabschnittmuster voneinander zu trennen.

In dieser Arbeit wurden die SSCP-Methode (b) und die T-RFLP-Methode (c) eingesetzt.

(b) Die SSCP-Methode wurde bereits häufig zur Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften eingesetzt (KLEINSTEUBER ET AL., 2006; DOHRMANN & TEBBE, 2004; SCHMALENBERGER ET AL., 2001). Ursprünglich wurde diese Methode zur Detektion von Mutationen entwickelt (MYERS, ET AL., 1987; ORITA, 1989). Zunächst wurde doppelsträngige DNA in der SSCP eingesetzt, was zur Bildung von mindestens drei Banden (zwei DNA-Einzelstränge und der DNA-Doppelstrang) führte (LEE ET AL., 1996, NAKAO & POPOVIC, 1998). Um den Einsatz dieser Methode zur Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften im Boden zu vereinfachen, wird der durch die vorangegangene PCR erzeugte DNA-Doppelstrang mit Hilfe des Enzyms  $\lambda$ -Exonuklease in einen Einzelstrang überführt. Die Anzahl der DNA-Banden, die eine „Operative taxonomische Einheit“ (OTU) erzeugt, werden auf diese Weise im Idealfall auf einen Strang minimiert. Die Sensitivität der SSCP-Methode ist hoch genug, um OTUs zu detektieren, die nur 1,5 % der gesamten Gemeinschaft ausmachen (LEE ET AL., 1996). Zusätzlich gibt die Intensität der Bande im Gel einen Hinweis auf die Abundanz des OTUs (FROMIN ET AL., 2002).

Im Vergleich mit der DGGE-Methode bietet die SSCP-Methode den entscheidenden Vorteil, dass die

---

Bildung von Heteroduplexsträngen (DNA-Doppelstrang, generiert von zwei verschiedenen Organismen) unterbunden wird (SCHWIEGER & TEBBE, 1998; LEE ET AL, 1996).

- (c) Die T-RFLP-Methode ist eine weitere Methode zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im komplexen Ökosystem Boden. Auch diese Methode basiert, wie die SSCP-Methode, auf einer Amplifizierung eines Abschnittes, z.B. der prokaryontischen 16S rRNA (in dieser Arbeit) mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidprimer. Durch eine Hydrolyse dieser PCR-Produkte mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen werden DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen erzeugt. Während der Längenbestimmung mittels einer Kapillarelektrophorese werden nur die terminalen DNA-Fragmente (T-RFs), bedingt durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff, detektiert. Die Anzahl und Länge dieser T-RFs korreliert mit der Anzahl bzw. den unterschiedlichen OTUs im analysierten Habitat. Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der sofortigen Verfügbarkeit der Daten in digitaler Form und einer damit vereinfachten und schnellen Auswertung.

Mit Hilfe der Fingerabdruck-Techniken ist es in den letzten Jahren vermehrt gelungen, einen tiefen Einblick in die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Habitat Boden zu erlangen. Die Funktion der Organismen in diesem Habitat kann jedoch mit diesen Methoden nicht bestimmt werden. Um eine Verknüpfung zwischen einem Substrat und dessen Konsumenten herzustellen, wurden Methoden eingesetzt die es erlauben, Bestandteile des Substrats in den Organismen zu detektieren. Der Einsatz stabiler Isotope, vor allem das stabile Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  als „Tracer“, ermöglichte diesen Nachweis in den Zellen sowie die Analyse von biologischen Prozessen, wie Respiration oder Metabolisierung.

Das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  ist mit einem Anteil von 1,1 % in der Atmosphäre, zumeist im  $\text{CO}_2$  enthalten (CARLE, 1991). Die verbleibenden 98,9 % entfallen auf das Kohlenstoffisotop  $^{12}\text{C}$ . Andere Isotope, wie das  $^{14}\text{C}$ , sind extrem selten. Infolge der Massenunterschiede der beiden Isotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  zeichnen sie sich durch unterschiedliche Bindungsenergien und Reaktionseigenschaften aus (CARLE, 1991; MOOK & DE VRIES, 2005). Das schwerere  $^{13}\text{C}$ -Isotop wird in biologischen Reaktionen diskriminiert. Daraus resultiert die Akkumulation des  $^{12}\text{C}$ -Isotops in den gebildeten Substanzen. Durch die Analyse dieser Substanzen mittels eines Gaschromatographen (GC) mit angeschlossenem Massenspektrometer (MS) erfolgt die Bestimmung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis (dargestellt im  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert) in einer Substanz oder in einem Gemisch (z.B. Boden). Diese Analyse ermöglicht die Messung der Isotopenfraktionierung bei unterschiedlichen Anwendungen wie Respiration oder Assimilation.

Stable-isotope-probing (SIP) ist eine ca. 15 Jahre alte Methode, die zur Aufdeckung und Charakterisierung der Funktion aktiver mikrobieller Gemeinschaften verwendet wird. Durch den Einsatz, z.B. eines  $^{13}\text{C}$ -markierten Substrats, kann der Nachweis erbracht werden, welche Organismen aktiv an der Assimilierung dieses Substrats beteiligt sind. Die isotopische Anreicherung selbst hat keinen Einfluss auf die assimilierenden Organismen (RADAJEWSKI ET AL., 2000). Bislang beschränkte sich die Analyse oft auf leicht abbaubare Substanzen wie Glukose. Ein  $^{13}\text{C}$ -markiertes Biozid wurde in SIP-Untersuchungen bislang noch nicht eingesetzt.

Der Nachweis des  $^{13}\text{C}$ -Isotops kann in verschiedenen Zellbestandteilen erfolgen. In vielen Studien wird das  $^{13}\text{C}$ -Isotop in den Nukleinsäuren, speziell im 16S rRNA-Gen (SIP-DNA), nachgewiesen (RADAJEWSKI ET AL., 2000; MANEFIELD ET AL., 2002 A; MANEFIELD ET AL., 2002 B). Diese Methode bietet den Vorteil einer sehr hohen phylogenetischen Auflösung (RADAJEWSKI ET AL., 2000). Bei der SIP-RNA-Methode wird das 16S rRNA Molekül selbst verwendet, welches mit einer höheren Kopienzahl an RNA-Molekülen in der Zelle vorliegt, als das 16S rRNA-Gen. Das 16S rRNA-Molekül wird unabhängig von der Teilung der Zelle gebildet. Die Verwendung des 16S rRNA-Moleküls bietet zusätzlich den Vorteil, dass die gebildete Menge mit der Aktivität der Zelle, z.B. mit der Proteinbiosynthese korreliert (ROSSET ET AL., 1966; DUMONT ET AL., 2005; DUMONT ET AL., 2006; NOMURA ET AL., 1984; KEMP ET AL., 1993). MANEFIELD ET AL. (2007) beschrieben, dass das  $^{13}\text{C}$ -Isotop ca. 6,5 fach schneller in die RNA integriert wird als in die DNA. Um eine Anreicherung der RNA mit dem  $^{13}\text{C}$ -Isotop nachweisen zu können, müssen etwa 20 % der RNA-Moleküle markiert worden sein (RADAJEWSKI ET AL., 2003).

Neben Kohlenstoffisotopen werden anwendungsbezogen auch Isotope des Stickstoffs ( $^{15}\text{N}$ ) eingesetzt, z.B. zur Analyse der Funktion saprophytischer Pilze im Stickstoffkreislauf (HOBBIE, 1999; HÖGBERG ET AL., 1999 A).

Eine weitere häufig verwendete Methode zum Nachweis einer erfolgten Substratassimilation ist der Nachweis von  $^{13}\text{C}$ -Isotopen in den mikrobiellen Phospholipidfettsäuren (SIP-PLFA) (BORSCHKER ET AL., 1998; ABRAHAM ET AL., 1998; KNIEF ET AL., 2003; MAUCLAIRE ET AL., 2003; SHRESTHA ET AL., 2008). Die sehr hohe Sensitivität von SIP-PLFA gegenüber den oben beschriebenen Nukleinsäure basierten Methoden ist der große Vorteil dieser Methode. Durch eine Analyse der PLFAs mittels GC-C-IRMS können isotopische Anreicherungen im  $\mu\text{g}$ -Bereich detektiert werden (DUMONT ET AL., 2006). Durch den schnellen Einbau der  $^{13}\text{C}$ -Isotope in die PLFAs können strukturelle Veränderungen der Gemeinschaft nach kurzer Inkubationszeit detektiert werden (ZELLES, 1999). Ein essentieller Unterschied zu den Nukleinsäure basierten Methoden ist auch, dass die PLFAs nur in lebenden Zellen vorhanden sind, da nach dem Tod der Zelle die Phosphatgruppe schnell abgebaut wird (TUNLID ET AL., 1985; ZELLES, 1999; EVERSHED ET AL., 2006). Phospholipide sind Hauptkomponenten der Zellmembran aller lebender Zellen mit einem

konstanter Anteil der Biomasse (LECHEVALIER, 1989). Darüber hinaus sind die Phospholipide strukturell sehr divers, wodurch sie sich gut als mikrobielle Biomarker eignen (GREEN & SCOW, 2000).

SIP-PLFA wurde bereits erfolgreich zur Charakterisierung vieler mikrobieller Lebensgemeinschaften eingesetzt, sowie zur Untersuchung der Nahrungskette bei Bakterien und Prokaryonten (MAUCLAIRE ET AL., 2003, KNIEF ET AL., 2003) und weiteren Gliedern der Nahrungskette.

## 1.6 Techniken zur Bestimmung von Kupfer-HDO

Viele HSM der neuen Generation sind aus organischen und anorganischen Bestandteilen (Metallen) aufgebaut. Der Nachweis anorganischer Komponenten, wie z.B. Kupfer, kann durch das Veraschen der Proben realisiert werden (PETROWITZ, 1971). Durch diesen Prozess können störende Begleitstoffe aus der Probe entfernt werden und mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) kann das Kupfer nahezu vollständig nachgewiesen werden. Dieses Verfahren wird wegen der hohen Genauigkeit in vielen Studien eingesetzt (z.B. HABICHT ET AL., 2003; TEMITZ ET AL., 2004). Aufgrund der Komplexität des Holzes gestaltet sich jedoch die Bestimmung vieler HSM, besonders organischer Bestandteile, in der Holzmatrix schwierig (JÜNGEL, 2002). WITTENZELLNER ET AL., (1999) entwickelten ein Verfahren, zur Bestimmung von HDO mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), mit dem HDO in geringeren Konzentrationen (ca. 1 - 2 µg/ml) nachgewiesen werden kann. Diese hohe Sensitivität ist in vielen Fällen notwendig, wenn die Konzentration des HDOs durch Auswaschung oder Abbau reduziert wurde.

Organische Holzschutzmittel können mittels GC-MS im Holz nachgewiesen werden (FERLAZZO, 1999, JÜNGEL ET AL. 2000). Durch den Einsatz der GC-MS war es zusätzlich möglich, neben der Quantifizierung des HDO, auch einen Einblick über dessen Verteilung im Holz zu erlangen und dessen chemisch entstandene Umbauprodukte zu bestimmen (JÜNGEL, 2002).

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Der Einsatz von Bioziden zum Schutz des Holzes vor dem Abbau durch saprophytische Mikroorganismen ist in den letzten Jahrzehnten geprägt durch die Verwendung von Formulierungen, die sich im Vergleich zu den HSM der letzten Generationen durch eine bessere Umweltverträglichkeit auszeichnen. Eines dieser Biozide ist das Kupfer-HDO. Die bessere Umweltverträglichkeit äußert sich unter anderem in der Tatsache, dass das Kupfer-HDO im Laufe der Inkubationszeit im Boden abgebaut

wird (EDLUND & NILSSON, 1999) und es somit nicht wie bei anderen Bioziden zu einer Akkumulation im Boden, Pflanzen und Tieren kommt. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Zielsetzung, den Abbauprozess des Kupfer-HDOs im Boden und im Holz, sowie die darin involvierten Organismen zu charakterisieren. Die zur Bearbeitung dieser Zielsetzung eingesetzten Versuchsansätze sind in Abb. 7 schematisch dargestellt.

### **Fragestellungen, die mit der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollten:**

#### **A. Wird Kupfer-HDO abgebaut, wenn es in geringen Konzentrationen in den Boden gelangt?**

Es sollte nachgewiesen werden, ob das durch natürliche Auswaschung aus behandeltem Holz in den Boden gelangte Kupfer-HDO abgebaut wird oder persistiert. Diese Testansätze werden in Folge als „Biozid im Boden“, **Bi-Bo**, bezeichnet und sind im Kapitel 2.7 Abschnitt A ausführlich beschrieben.

#### **B. Wird das Kupfer-HDO auch als Teil einer HSM-Formulierung degradiert, wenn es im Holz fixiert ist?**

Durch den Einsatz eines HSM mit Kupfer-HDO als Biozid und unter Verwendung von Holzspänen im Boden sollte diese Fragestellung beantwortet werden. Diese Testansätze werden in Folge als „Holzschutzmittel in Holzspänen im Boden“, **HSM-Ho-Bo**, bezeichnet und sind im Kapitel 2.7 Abschnitt B ausführlich beschrieben.

#### **C. Löst das Einbringen eines HSMs auf der Basis von Kupfer-HDO eine mikrobielle Sukzession aus?**

Dies sollte in einem möglichst praxisnahen Ansatz, unter Verwendung von Holzprüfkörpern im Boden analysiert werden. Der Effekt, den die organische HDO-Komponente auf die mikrobielle Gemeinschaft ausübt, sollte durch den Einsatz eines HSMs gleicher Formulierung mit gleichem Kupfer-Gehalt, jedoch in Abwesenheit des HDO Anteils, bestimmt werden. Zusätzlich zur Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaft sollten mögliche Veränderungen der Konzentrationen der Biozide berücksichtigt werden. Die Testansätze dieses konzeptionellen Designs werden in Folge als „Holzschutzmittel in Prüfkörper im Boden“, **HSM-Pr-Bo**, bezeichnet und sind im Kapitel 2.7 Abschnitt C ausführlich beschrieben.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien und Gase

Soweit im Text nicht gesondert angegeben, wurden Chemikalien mit einem Reinheitsgrad „zur Analyse“ eingesetzt und von den Firmen Merck (VWR International, Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die in der Molekularbiologie eingesetzten Reagenzien stammen von Applied Biosystems (Darmstadt), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (VWR International, Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (bzw. Fluka) (Taufkirchen). Alle Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert. Die eingesetzten technischen Gase wurden über Air Liquide, Berlin, angefordert.

### 2.2 Bodenproben

Für alle durchgeführten Projekte wurde ein Boden aus einem Testfeld der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, in Horstwalde (Brandenburg, Koordinaten: 52°05' 44,72"N; 13°24' 34,98" E) verwendet. Dieser Boden wird für mikrobielle Abbauversuche in der BAM schon seit Jahren erfolgreich eingesetzt. Eine Bewirtschaftung dieses Bodens in den letzten 10 Jahren war nicht gegeben. Nach der Entnahme wurde der Boden in einem trockenen Raum bei Außentemperatur (die Temperatur lag jedoch nie unter 0 °C) in großen Steinbecken über einen Zeitraum von maximal 8 Wochen gelagert.

### 2.3 Holzprüfkörper und Holzmehl

In diesem Projekt wurde Kiefernspiltholz (*Pinus sylvestris*, Linnaeus) verwendet. Die Kiefern wurden am 29.09.2004 in Brandenburg gefällt und zur weiteren Verarbeitung in Latten geschnitten. Aus den Latten wurden Holzprüfkörper mit den Abmaßen von 50 mm ( $\pm 0,5$  mm) x 25 mm ( $\pm 0,5$  mm) x 15 mm ( $\pm 0,5$  mm) hergestellt und bis zum Einbringen in den Boden bei 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 65 % ( $\pm 5\%$ ) gelagert. Die Prüfkörper genügen der Norm DIN EN 113, aus der hervorgeht, dass die Holzstruktur frei von Unregelmäßigkeiten, von groben Fehlern, wie Ästen, Harzeinschlüssen, Verfärbungen jeglicher Art zu sein hat, um eine möglichst homogene Aufnahme der Tränklösungen im Holz zu erreichen. Auch das Verhältnis von Früh- zu Spätholz (gemessen an den Jahrringen) hat signifikante Auswirkungen auf die Aufnahme von Lösungen in das Holz. Die

Gewichtstoleranz der einzelnen Prüfkörper lag bei max. 10 % des arithmetischen Mittels aller verwendeten Prüfkörper.

Das verwendete Holzmehl wurde auch aus Kiefernspaltholz gewonnen und auf eine Größe von 2 mm ( $\pm 0,5$  mm) gesiebt (Analysensieb, Retsch, Hahn).

### 2.4 Vermikulit

Vermikulit ist ein natürlich vorkommendes Tonmineral aus der Mineralklasse der Silikate, das schuppige, blättrige oder massige Aggregate ausbildet. Durch seine strukturellen Eigenschaften kann Vermikulit große Mengen an Wasser speichern (Tab. 17). Da Vermikulit nur geringen pH-Wert-Schwankungen unterliegt (ALLISON & PROSSER, 1993) und biologisch nahezu inert ist, ist es als Beimischung zum Boden (CURLING ET AL., 2002) gut geeignet. Vermikulit wird auch häufig als Trägermaterial für Versuche zum Abbau von HSM mit pilzlichen Reinkulturen eingesetzt, um Effekte durch die Bodenmatrix und ein zusätzliches Nährstoffangebot auszuschalten (BAONZA & FRANCO, 1989); [DIN EN 807].

### 2.5 Herstellung eines Boden/Vermikulitgemisches

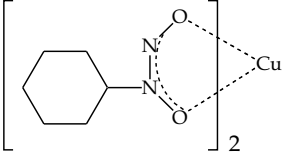
Der Boden wurde in feuchtem Zustand auf eine Korngröße von  $\leq 2$  mm gesiebt und bei 28 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % eine Woche konditioniert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von sterilisiertem Vermikulit im Verhältnis 5 : 1 (w/w). Die Sterilisierung erfolgte durch das Erhitzen des Tonminerals auf 160 °C für 3 Stunden im Trockenschrank (Thermo, Heraeus, Hanau). Nachdem die Komponenten gründlich durchmischt wurden, wurde eine Wasserhaltekapazität (WHK) von 100% mit sterilem Wasser aus der Leitung eingestellt. Dies entspricht einem gravimetrischen Wassergehalt ( $W_g$ ) von ca. 51 %. Der Bodenansatz wurde erneut eine Woche bei gleichen Bedingungen konditioniert. Zu Beginn jedes Versuchsansatzes, wurde der gravimetrische Wassergehalt bestimmt. Der Bodenansatz wurde einmal zu Beginn dieser Arbeit hergestellt und ausschließlich verwendet. Über längere Zeiträume wurde der Bodenansatz, das fortan als „Boden“ bezeichnet wird, bei 15 °C in Dunkelheit gelagert. Um den Verlust von Feuchtigkeit zu verringern, wurde der Boden luftdurchlässig abgedeckt. Vor allen Anwendungen wurde der Boden gründlich gemischt und im Bedarfsfall durch die Zugabe von sterilem dd H<sub>2</sub>O auf den ursprünglich eingestellten gravimetrischen Wassergehalt gebracht.



## 2.6 Kupfer-HDO und Formulierungen auf der Basis von Kupfer-HDO

In dieser Arbeit wurde der Holzschutz-Wirkstoff Kupfer-HDO als Bestandteil verschiedener flüssiger Modellholzschutzmittelformulierungen (Modell-HSM) und in reiner Form (Feststoff) eingesetzt (bereitgestellt von Fa. Dr. Wolman GmbH, Sinzheim). Die für diese Arbeit relevanten chemikalischen und physikalischen Eigenschaften des Kupfer-HDOs sind in Tabelle 1 aufgeführt (GÖTTSCHE & MARX, 1989)

**Tabelle 1:** Chemische und physikalische Daten des Kupfer-HDOs (GÖTTSCHE UND MARX, 1989)

Kurzbezeichnung	Kupfer-HDO
Chemische Bezeichnung	Bis-(N-cyclohexyl-diazeniumdioxy)-Kupfer
Summenformel	$C_{12}H_{22}N_4O_4Cu$
Molekulargewicht	350 g/mol
Strukturformel	
Beschaffenheit	blau, kristallin
Schmelzpunkt	157 °C
Dampfdruck	$< 10^{-7}$ hPa/20 °C
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	10 mg/l bei 20 °C

Die Löslichkeit von Kupfer-HDO liegt bei 10 mg/l und kann durch die Zugabe von Komplexbildnern erhöht werden (JÜNGEL, 2002). Kupfer-HDO haltige, wässrige Formulierungen können mit Wasser (GÖTTSCHE & MARX, 1989) oder Ethanol in beliebig niedrige Konzentrationen verdünnt werden.

## 2.7 Modellsysteme

Der mikrobielle Abbau von Kupfer-HDO und von Holzschutzmitteln (HSM) auf der Basis von Kupfer-HDO im Boden wurde anhand **drei** verschiedener Modellsysteme untersucht (Abb.7).

### A. Kupfer-HDO als reines Biozid im Boden

(Bi-Bo) über einen Zeitraum von 85 Tagen.

Es wurden folgende Kupfer-HDO-Konzentrationen und Kohlenstoffisotope im HDO eingesetzt (Tab.2).

Experimente an Boden, ohne Holzmehl oder Holzprüfkörpern, wurden mit reinem Kupfer-HDO, als Feststoff durchgeführt. Es wurde Kupfer-HDO mit den Kohlenstoffisotopen  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  eingesetzt. Die Biozide wurden in einer Stammlösung von 2 mg/ml Ethanol (absolut), kurz vor dem Einbringen in den Boden frisch angesetzt.

**Tabelle 2:** Kupfer-HDO als reines Biozid im Boden (Bi-Bo)

Biozid	Konzentration im Boden	Isotop	Bezeichnung
Kupfer-HDO	5 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 12	B-l-12
Kupfer-HDO	20 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 12	B-h-12
Kupfer-HDO	5 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 13	B-l-13
Kupfer-HDO	20 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 13	B-h-13

\* pro Gramm feuchten Boden

Durch einen vollständigen Austausch der  $^{12}\text{C}$ -Isotope im HDO-Molekül durch  $^{13}\text{C}$ -Isotope wurde ein angereichertes, schwereres, HDO erzeugt (BASF). Über einen Nachweis dieses  $^{13}\text{C}$ -Isotops im Boden und Holz können Aussagen zum Verbleib einzelner Bestandteile des HDO-Moleküls getroffen werden (sofern diese Kohlenstoff enthalten). Zum einfacheren Verständnis werden die unterschiedlichen Biozide im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den in Tabelle 2 unter Bezeichnung aufgeführten Abkürzungen benannt.

## B. Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung

(HSM-Ho-Bo). Inkubationszeitraum 105 Tage.

In den Markierungsexperimenten mit Boden mit Zusatz von Holzmehl wurden Modell-HSM mit Kupfer-HDO gleicher Konzentration und unterschiedlichen Kohlenstoffisotopen (Tab. 3) verwendet. Als Referenz wurde ein Modell-HSM ohne Kupfer-HDO verwendet. Die Konzentration der Modell-HSM betrug in allen Fällen 1% HSM in wässriger Lösung.

**Tabelle 3:** Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung, dotiert in Holzspänen, im Boden. (HSM-Ho-Bo)

Biozid im HSM	Kupfer-HDO- Konzentration Boden/Holz	Isotop	Bezeichnung
HSM mit Kupfer-HDO (25 %)	200 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 12	HSM-12
HSM mit Kupfer-HDO (25 %)	200 $\mu\text{g}/\text{g}^*$	Kohlenstoffisotop 13	HSM-13
HSM ohne Kupfer-HDO	ohne	Kohlenstoffisotop 12	HSM-0

\* pro Gramm feuchtes Boden/Holzgemisch;

Auch in diesem Modellsystem wurde ein HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung verwendet, welches im Kohlenstoff Gerüst des HDO Moleküls das Kohlenstoffisotop 13 enthält. Zum einfacheren Verständnis werden die unterschiedlichen Formulierungen im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den in Tabelle 3 unter Bezeichnung aufgeführten Abkürzungen benannt.

### C. Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung

(HSM-Pr-Bo) Inkubationszeitraum 448 Tage.

Für die Experimente an Holzprüfkörpern wurde Kupfer-HDO (Kap. 2.10.1 ) in einer geringen und einer hohen Konzentration als Bestandteil eines HSM auf Wasserbasis eingesetzt (siehe Tab. 4). Als Referenz für Kupfer-HDO freie Formulierungen wurden HSM mit Kupfer-Aminen in gleicher Konzentration verwendet (Tab. 4). Bei all diesen Formulierungen handelt es sich um Modell-HSM, die nicht im Hinblick auf praxisrelevante Eigenschaften wie Stabilität, Fixierung und Eindringvermögen optimiert wurden. Bei den gering, wie auch bei den hoch konzentrierten Formulierungen ist jeweils die gleiche Konzentration an Kupferionen in der Lösung vorhanden. Zur Simulation einer HSM freien Formulierung wurde dd H<sub>2</sub>O eingesetzt und als Kontrolle bezeichnet. Alle Formulierungen dieses Versuchsansatzes enthielten das natürliche Kohlenstoffisotopverhältnis von 98,9 % <sup>12</sup>C zu 1,1 % <sup>13</sup>C.

**Tabelle 4:** Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung, in Holzprüfkörpern im Boden. HSM-Pr-Bo

Biozid	Konzentration	Kupfer <sup>2+</sup> [m/m] %	HDO [m/m] %	Kupfer (HDO) <sub>2</sub> [m/m] %	Bezeichnung
HSM mit Kupfer-HDO*	1,10%*	0,033	0,154	0,185	HSM-K-l
HSM mit Kupfer-HDO*	2,20%*	0,069	0,303	0,375	HSM-K-h
HSM mit Kupfer-Amin	1,10%*	0,032	n.d	n.d	HSM-A-l
HSM mit Kupfer-Amin	2,20%*	0,065	n.d	n.d	HSM-A-h
dd H <sub>2</sub> O					Kontrolle

\* Konzentration des HSM in der Formulierung; n.d. : nicht detektierbar

Zum einfacheren Verständnis werden die unterschiedlichen Formulierungen im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den in Tabelle 4 unter Bezeichnung aufgeführten Abkürzungen benannt.

## 2.8 Charakterisierung der Boden und Holzproben

### 2.8.1 Ermittlung des pH-Wertes in Bodenproben

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Bodenproben wurden 6 g Boden eingewogen und mit 14 g dd H<sub>2</sub>O 15 min mit einem Magnetrührer (RETbasic, IKA-Labortechnik, Staufen) verrührt. Nachdem die Bodenpartikel sedimentiert waren, wurde der pH-Wert im Überstand mit einem pH-Meter (Microprocessor, pH 537, WTW Weilheim) bestimmt. Der pH-Wert wurde aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchsansätzen generiert.

### 2.8.2 Bestimmung des gravimetrischen Wassergehaltes im Boden

Der gravimetrische Wassergehalt der Bodenproben wurde mit dem Moisture Analyser MA30 der Firma Sartorius, Göttingen bestimmt. Dazu wurde eine Probe von 10 g eingewogen (Feuchtgewicht) und bei 105 °C bis zur Gewichtskonstante gedarrt (Trockengewicht). Aus der Gewichtsdiﬀerenz zwischen Trocken- und Feuchtgewicht wurde der gravimetrische Wassergehalt mit der Formel [1] ermittelt.

$$W_g = 100 - \frac{WG_{TM} * 100(\%)}{WG_{FM}} \quad [1]$$

$W_g$ : gravimetrischer Wassergehalt;  $WG_{FM}$  Feuchtmasse des Bodens;  $WG_{TM}$  Trockenmasse des Bodens

### 2.8.3 Bestimmung der Wasserhaltekapazität in Bodenproben

Die Wasserhaltekapazität (WHK) gibt die maximal im Boden zurückgehaltene Wassermenge an, nachdem das durch Schwerkraft bewegbare Wasser entfernt worden ist. Die WHK ist von der Struktur und Zusammensetzung des Bodens abhängig.

Zur Bestimmung der WHK wurde der Boden in einen Trichter eingewogen, über Nacht mit Wasser gesättigt und durch Anlegen eines Vakuums das nicht gebundene Wasser entfernt. Die Bodenproben wurden gewogen, bei 105 °C für 12 h bis zur Gewichtskonstante getrocknet und erneut gewogen. Die WHK konnte über folgende Formel [2] berechnet werden

$$WHK = \frac{(Bf - Bt)}{(Bt \times 100)} \quad [2]$$

*Bf*: Masse des feuchten Bodens; *Bt*: Masse des trockenen Bodens

Unter Berücksichtigung der Heterogenität der Bodenmatrix wurden die WHK in drei unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt. Die verschiedenen Wägungen wurden (PG4 002-5, Mettler Toledo, Gießen) mit einer Genauigkeit von 0,01 g vorgenommen.

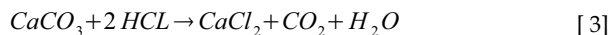
## 2.9 Bestimmung der Zusammensetzung des Bodens

### 2.9.1 Korngrößenanalyse

Die Bodenart wird durch die Korngrößenzusammensetzung des mineralischen Bodenmaterials gekennzeichnet (Bodenkundliche Kartieranleitung, 1994). Die Zusammensetzung der Korngrößen wird in Feinboden < 2 mm und Grobboden > 2mm unterschieden und nach DIN 18123 bestimmt. Da der Boden zuvor einer Siebung durch ein 2 mm Sieb unterzogen wurde, erfolgte die Entfernung des Grobbodens. Der Feinboden wurde durch die relativen Anteile an Ton, Schluff und Sand charakterisiert, die durch Trockensiebung des zuvor bei 105 °C getrockneten Bodens ermittelt wurden.

### 2.9.2 Bestimmung des Karbonatgehaltes

Ein weiterer Aspekt der Bodencharakterisierung ist die Bestimmung des Karbonats. In Karbonat gepufferten Böden liegt gebundenes Karbonat vornehmlich als Kalziumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) vor und wurde durch Formel 3 bestimmt.



CaCO : Calciumkarbonat; HCL: Salzsäure; CO<sub>2</sub> : Kohlenstoffdioxid; H<sub>2</sub>O: Wasser

Das Volumen des freigesetzten Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) wurde mit einem Scheibler-Gerät gemessen und mit dem Volumen an CO<sub>2</sub> verglichen, welches in gleicher Reaktion durch reines CaCO<sub>3</sub> freigesetzt wird. Dieser Versuch wurde nach der DIN ISO 10693 durchgeführt.

### 2.9.3 Bestimmung des organischen Kohlenstoffes im Boden

Der Boden wurde auf 900 °C im sauerstoffhaltigen und CO<sub>2</sub> freiem Gasstrom (trockene Verbrennung) erhitzt, dadurch wurde der Kohlenstoff zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Dieses wurde gaschromatographisch gemessen. Zur Bestimmung des Gehaltes an organischem Kohlenstoff wurden sämtliche Karbonate im Boden zuvor durch Salzsäure (siehe Karbonatbestimmung) entfernt. Die Elemente Schwefel und Stickstoff wurden nach der gleichen Verfahrensweise extrahiert, wie sie auch zum Nachweis des organischen Kohlenstoffes zum Einsatz kam. Dieser Versuch wurde nach der DIN ISO 10694 durchgeführt.

### 2.9.4 Korndichte

Die Korndichte ( $\rho_k$ ) wird als die mittlere Dichte der einzelnen, festen Bestandteile des Bodens definiert. Sie wurde durch ein Gasverdrängungspyknometer (AccuPyc 1330, Micromeritics GmbH, Mönchengladbach) ermittelt. Das Gerät bestimmt das Volumen einer Probe aus der Veränderung des Druckes eines zugeleiteten Analysengases (Helium), durch die Expansion vom Proben- in den Expansionsraum des Gerätes.

### 2.9.5 Glühverlust

Der Glühverlust (%) beschreibt den Anteil an organischer Substanz einer Bodenprobe, da der enthaltene Kohlenstoff zum CO<sub>2</sub> oxidiert und aus der Probe entfernt wird. Zur Bestimmung des Glühverlustes wurde die Probe über Nacht bei 105 °C getrocknet und bei 550 °C für zwei Stunden im Muffelofen geglüht. Die Proben wurden in einem Exsikkator abgekühlt und anschließend ausgewogen. Der Glühverlust definierte sich durch die Differenz aus dem Ausgangsgewicht der Probe und dem Glührückstand der getrockneten Probe. Der Glühverlust zeigte den Anteil an organischen Bestandteilen des Bodens an. Als Glührückstand verblieb der mineralische Teil der Probe. Dieser Versuch wurde nach der DIN ISO 18128 durchgeführt.

## 2.10 Modellsysteme

Der Holzschutzmittelabbau und die mikrobielle Sukzession in Holz und Boden wurde in Modellsystemen im Labor analysiert. Diese Modellsysteme ermöglichten die Abbauprozesse von Holz

und Holzschutzmittel durch die Wahl konstanter Rahmenbedingungen (Temperatur, pH Wert und Feuchtigkeit des Bodens) nachzuvollziehen. Anders als in einem Freilandversuch können diese Parameter konstant gehalten werden, so dass deren Einfluss konstant blieb und keine zusätzlichen Effekte auf die Versuche ausübten. Es wurden Modellsysteme entwickelt, um den Abbau von Kupfer-HDO unter verschiedenen Rahmenbedingungen zu analysieren. Folgende Systeme wurden unterschieden:

**2.10.1 Modellsystem zur Analyse von biozidbehandelten Holzprüfkörpern im Boden**

(HSM-Pr-Bo)

**2.10.2 Kupfer-HDO als reines Biozid im Boden**

(Bi-Bo)

**2.10.3 Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung, dotiert in Holzspänen, im Boden**

(HSM-Ho-Bo)

### 2.10.1 Modellsystem zur Analyse von HSM-Pr-Bo

#### Vollholztränkung der Holzprüfkörper

In Anlehnung an die europäische Norm zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit von HSM gegen holzzerstörende Basidiomyceten, [DIN EN 113; 1996] wurden Kiefernspiltholz Prüfkörper (*Pinus sylvestris*, Linnaeus) verwendet.

Die Prüfkörper (Abmaße: 25 mm; 15 mm; 50 mm, siehe Abb. 4), deren Hirnflächen nicht versiegelt waren, wurden mit den Holzschutzmitteln (Tab. 4), und dd H<sub>2</sub>O für die Kontrollen, durch eine Vollholztränkung behandelt. Die Prüfkörper wurden in einem Exsikkator platziert. Durch das Anlegen eines Vakuums von 7 hPa wurde die Luft in den Hohlräumen des Holzes entfernt. Nach 15 min wurden die Modell-HSM (Tab. 4) zugeleitet und durch den Druckanstieg beim Belüften des Systems drangen die HSM in das Holz ein. Für alle Prüfkörper wurde die Masse vor und nach der Tränkung erfasst. Für die Fixierung des Kupfers, bzw. Kupfer-HDOs im Holz, wurden die Prüfkörper vier Wochen in einem klimatisierten Raum (Normklima 22 °C ± 2 °C und 65 % ± 5 % Luftfeuchtigkeit) konditioniert. Zur gleichmäßigen Trocknung und Konditionierung über die Zeit wurden die frisch getränkten Hölzer auf Metallgitter in den Aquarien (300 mm x 220 mm x 150 mm) platziert und zunächst mit einer Glasscheibe abgedeckt. Um zu vermeiden, dass sich auf der Holzoberfläche während der Konditionierungszeit Mikroorganismen ansiedeln konnten, wurden in Aquarien mehrere mit Xylol (ca. 10 ml pro Aquarium) gefüllte Gefäße aufgestellt. Nach einer Woche erfolgte die schrittweise Öffnung der Aquarien. Die Prüfkörper wurden vor dem Einbringen in den Boden erneut gewogen. Alle Prüfkörper, deren Gewicht um mehr als ± 10 % vom arithmetischen Mittelwertes aller Prüfkörper abwichen, wurden von den weiteren Prüfungen ausgeschlossen. Die Prüfkörper besaßen vor der Einbettung in den Boden eine Holzfeuchte von etwa 12 %:

#### Einbettung der Prüfkörper in den Boden

Die Holzprüfkörper wurden in etwa 200 g Boden eingebettet, sodass sie vollständig bedeckt waren (Abb. 4). Als Prüfgefäße wurden biologisch inerte Kunststoffgefäße mit den Abmaßen (7,2 cm x 5,6 cm x 5,6 cm) eingesetzt.



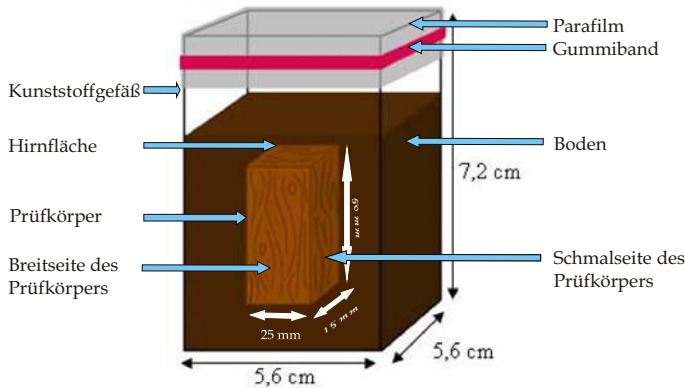


Abbildung 4: Modellsystem mit im Boden eingebrachtem Holzprüfkörper

## Inkubation der Prüfkörper

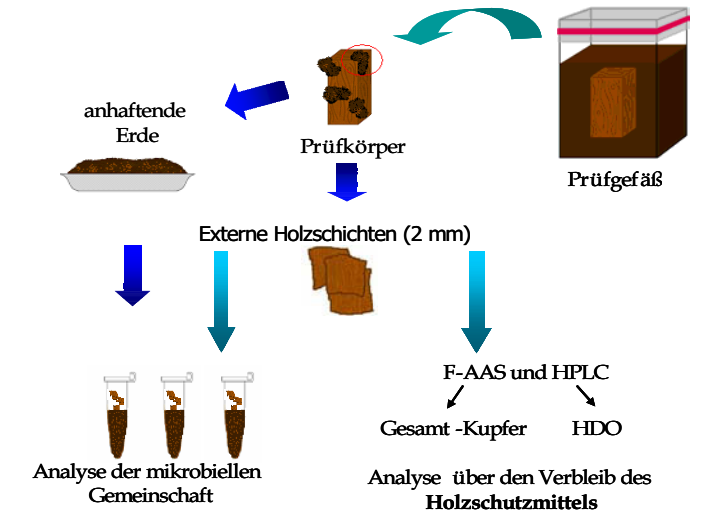
Um einen Feuchtigkeitsverlust und die damit einhergehende Austrocknung der Proben zu vermeiden, wurden die Prüfgefäße mit zwei Schichten Parafilm® abgedeckt. Dies ermöglichte darüber hinaus einen Gasaustausch mit der umgebenden Raumluft. Das Gewicht der Prüfgefäße wurde im Abstand von vier Wochen kontrolliert und die Gewichtsänderung durch die Zugabe von sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  gegebenenfalls ausgeglichen. Die Proben wurden bei  $28\text{ °C}$  ( $\pm 2\text{ °C}$ ) und 60 % Luftfeuchtigkeit ohne Lichteinwirkung inkubiert.

## Probennahme und Mikrotomschnitte

Für jede der fünf Behandlungsweisen (Tab. 4) wurden fünf unabhängige Versuchsansätze angefertigt und sofort, nach 1, 3, 7, 14, 56, 112, 224 und 448 Tag(en) Inkubationszeit ausgewertet. Die Probennahme erfolgte durch die Entnahme des Prüfkörpers aus dem Boden mit einer abgeflamten Pinzette (Abb.5). Die dem Prüfkörper anhaftende Erde wurde mit einem sterilen Spatel von der Holzoberfläche entfernt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70\text{ °C}$  gelagert. Zur Bestimmung der sich gegebenenfalls verändernden Holzfeuchte, wurden die Prüfkörper nach Entfernung der anhaftenden Erde gewogen und das Gewicht mit dem Einbaugewicht verglichen. Zur Gewinnung der Holzproben für die mikrobiologischen und chemischen Versuche wurden die Prüfkörper in einem Schlittenmikrotom (HM 440E, MICROM, Neuss) eingespannt. Im Folgenden

wurden von jeder der vier Seitenflächen 10 µm dicke Scheiben, insgesamt 2 mm Holz pro Seite, abgenommen (Abb. 5).

Die Hirnflächen wurden nicht verwendet, da sie zum Einspannen des Prüfkörpers im Mikrotom genutzt wurden. Es ist darüber hinaus mit diesem Gerät nicht möglich, Holz quer zur Faser zu schneiden.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Probenahme und Bearbeitung der Proben der Testansätze mit HSM-Pr-Bo.

Eine schmale Seite des Prüfkörpers wurde unter sterilen Bedingungen abgenommen und für die mikrobiologischen Versuche verwendet. Die verbleibenden drei Holzseiten wurden zur Kupfer- und zur HDO-Bestimmung verwendet (Abb. 5).

### Ermittlung des Massenverlustes in den Holzprüfkörpern

Zur Bestimmung des Masseverlustes wurden pro Behandlungsweise drei Testansätze verwendet, die analog zu den in Abb. 4 dargestellten Prüfkörpern 448 Tage inkubiert wurden. Die Prüfkörper wurden aus der Erde entnommen und mit einem feuchten Tuch von allen anhaftenden Erdpartikeln befreit. Bei einer Temperatur von 105 °C wurden die Prüfkörper für mindestens 15 Stunden bis zur Gewichtskonstante im Trockenschrank (Termo, Heraeus, Hanau) getrocknet. Nach dem Abkühlen der Proben im Exsikkator mit Silikagel (2-5 mm, VWR International, Darmstadt) wurde das Trockengewicht bestimmt (PG4 002-5, Mettler Toledo, Giessen). Die Differenz zwischen dem Trockengewicht (Darrgewicht) bei Einbau und dem Darrgewicht beim Ausbau ergab den Masseverlust

des Prüfkörpers. Es wurde das arithmetische Mittel von zwei unabhängigen Versuchsansätzen angegeben.

## 2.10.2 Modellsystem zur Analyse von biozidbelastetem Boden

Holzschutzmittel können durch Auswaschung aus dem zu schützenden Holz in den angrenzende Boden gelangen. Es wurde unter Laborbedingungen analysiert, welchen Einfluss das Biozid bzw. dessen Abbauprodukte und Bestandteile im Boden auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ausüben.

### 2.10.2.1 Inkubation des Bodens mit reinem Kupfer-HDO (Bi-Bo)

Der Boden (Kap. 2.5 ) wurde auf eine relative Feuchte von 48 % (v/v) eingestellt (Kap. 2.8.2 ). Zur Steigerung der mikrobiellen Aktivität im angefeuchteten Boden, wurde dieser eine Woche bei 22 °C in Dunkelheit konditioniert. Um sterile Bodenproben herzustellen, wurde ein Teil des Bodens in PE-Kunststoffbeutel gefüllt und bei 70 kGy mit einer Cobaltquelle (Gammaservice, Radeberg) bestrahlt. Das Kupfer-HDO wurde in einer Stammlösung (2 mg/ml) in Ethanol (absolut) angesetzt und in den sterilen Boden gegeben, so dass die Konzentration des Biozids für die B-l-13 und B-h-13 bei 20 µg/g und 80 µg/g respektive bei 80 µg/g feuchten Boden für die B-h-12 Proben lag. In einem Mischbeutel („Blender Bag“, Curved 400, Grade, Gehrden) wurde der sterile Boden durch Kneten des Beutels mit dem Biozid gründlich vermischt. Als Referenz diente steriler Boden, der nur mit Ethanol gleichen Volumens behandelt wurde. Durch einen Stickstoffstrom wurde das Ethanol aus den Proben vollständig entfernt. Im Anschluss erfolgte die Vermischung mit dem Boden, der zuvor bei 22 °C inkubiert wurde, im Verhältnis 1 : 4 (w/w), so dass eine Kupfer-HDO-Konzentration für die B-l-13 und B-h-13 bei 5 µg/g und 20 µg/g und für die B-h-12 bei 20 µg/g Boden (Feuchtgewicht) lag. Ausgehend von diesen Ansätzen wurden Portionen zu je 20 g hergestellt, bei 22 °C in Dunkelheit inkubiert und wie folgt in drei unabhängige Versuchsansätze eingesetzt:

#### Versuchsansatz I

Dieser Versuchsansatz wurde verwendet:

- Zur Analyse der Kupfer-HDO-Konzentration (Kap. 2.12.1 ).
- Zur Bestimmung des  $\delta^{13}\text{C}$  im Boden (Kap. 2.14 ).
- Zur Charakterisierung der mikrobiellen Phospholipidfettsäuren (PLFAs) (Kap. 2.16 ).

Die Inkubation des Bodens erfolgte in Glasflaschen (100 ml, Schott, Mainz). Die Flaschen wurden gasdicht verschlossen (RADAJEWSKI ET AL., 2002). Es wurde durch eine gaschromatographische Messung bestimmt, wie lange dieser gasdichte Zustand gegeben ist (Kap. 2.11 ). Um anaerobe Zustände im System zu vermeiden, wurde im Abstand von 14 Tagen durch eine Spritze 50 ml der Luft im System entfernt und durch einen Sterilfilter (Rotrand 0,2  $\mu\text{m}$  Celluloseacetat, Whatman, Dassel) 50 ml Umgebungsluft aus dem Prüfraum (20,97 %  $\text{O}_2$ ) ersetzt. Zunächst wurde gaschromatographisch nachgewiesen, dass in dieser Periode nicht mit einem relevanten Verlust an Sauerstoff zu rechnen war. Die Proben wurden sofort nach Einbau, nach 2, 4, 8, 16, 24, 50, 64 und 85 Tagen entnommen und analysiert.

Zu jedem der acht Beprobungszeitpunkte wurden drei unabhängige Versuchsansätze ausgewertet.

### **Versuchsansatz II**

Dieser Versuchsansatz diente der Analyse des respiratorisch entstandenen  $\text{CO}_2$  auf dessen Gehalt an  $^{13}\text{CO}_2$  (Kap. 2.14 ). Die Proben wurden in die Reaktoren des modifizierten Tests nach STURM (1973) eingebracht. Die Proben wurden sofort nach Einbau, nach 2, 4, 8, 16, 24, 50, 64 und 85 Tagen entnommen und auf ihr Kohlenstoffisotopen-Verhältnis ( $\delta^{13}\text{C}$ ) untersucht. Zu jedem Beprobungszeitpunkt wurden 4 unabhängige Versuchsansätze ausgewertet.

### **Versuchsansatz III**

In diesem Versuchsansatz wurden die Proben in die Säulen eines Infrarotgasanalysators (ADC, Hoddesdon, UK) eingebaut. Dieses diente der Bestimmung (im Turnus von 2 h) der Respiationsaktivität der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden, gemessen anhand der  $\text{CO}_2$ -Emission über den gesamten Inkubationszeitraum von 85 Tagen. Täglich wurden 4 unabhängige Versuchsansätze und 17 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes ausgewertet.

Zur Überprüfung, dass es sich bei dem Abbau des Biozids um einen durch die mikrobielle Gemeinschaft im Boden ausgelösten Prozess und nicht um einen spontanen Zerfall des Biozids im Boden handelt, wurde das beschriebene Experiment unter gleichen Bedingungen auch an sterilem Boden durchgeführt. Das Biozid mit dem Kohlenstoffisotop  $^{12}\text{C}$  wurde in den sterilen Boden gegeben (5  $\mu\text{g/g}$  und 20  $\mu\text{g/g}$ ), gründlich gemischt und in den verschlossenen Glasflaschen inkubiert. Die Analysen erfolgten sofort, nach 2, 4, 8 und 16 Tagen. Es wurden pro Inkubationszeitraum und Konzentration des Biozids drei unabhängige Versuchsansätze ausgewertet.

Die Versuchsansätze des Modellsystems zur Analyse von biozidbelastetem Boden (Bi-Bo) sind in Abbildung 6 schematisch zusammengefasst:

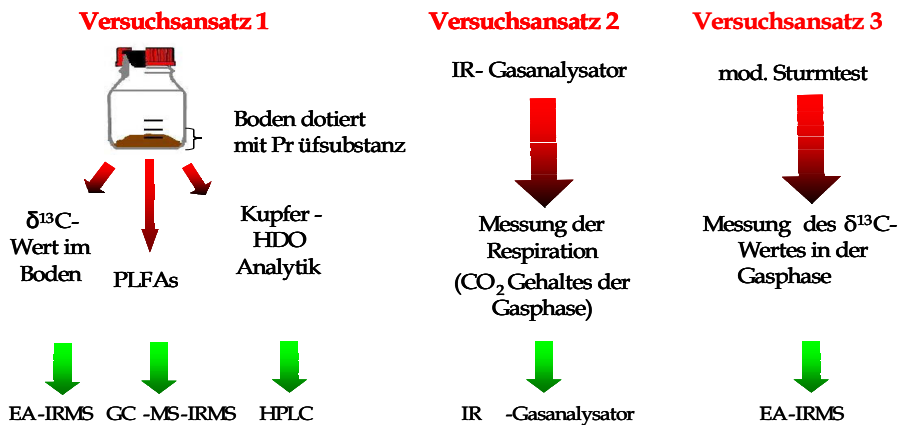


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsansätze des Modellsystems Bi-Bo und HSM-Ho-Bo

### 2.10.3 Modellsystem zur Analyse von HSM-Ho-Bo

#### Inkubation von Holzspänen mit HSM im Boden

Die auf ca. 2 mm ( $\pm 0,5$  mm) gesiebten Holzspäne aus Kiefernspiltholz (9 % Holzfeuchte) wurden zu Portionen von 10 g in sterilen 100 ml Bechergläsern eingewogen und mit den Modell-HSM (Tab. 3) versetzt und gründlich gemischt. Das Volumen des HSM wurde so berechnet, dass eine Endkonzentration von 200  $\mu\text{g/g}$  Kupfer-HDO pro Probe erzielt wurde. Durch Konditionierung des Holzes für eine Woche im Normklima (22 °C/ 65  $\pm$  5 °C relative Feuchte), konnte das Lösungsmittel des HSMs ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entfernt werden. Das Biozid aus dem HSM konnte sich im Holz stabilisieren. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Bodens (Kap. 2.5 ) und durch Zugabe von sterilem dd  $\text{H}_2\text{O}$  wurde eine relative Feuchte der Proben von 65 % und ein Probengewicht von 20 g eingestellt. Der verwendete Boden wurde in einem vorangegangenen Projekt über 448 Tage in Kontakt mit HSM ( 2.10.1 ) inkubiert. Dieser Boden wurde gewählt, um die Aktivität der Mikroorganismen zu erhöhen und gegebenenfalls wurden in diesem Boden bereite Mikroorganismen angereichert, die Kupfer-HDO abbauen können. Die Proben wurden analog des in Kapitel 2.10.2 beschriebenen Versuchsaufbaus eingebracht und auf gleiche Weise inkubiert. Die Versuchsansätze sind denen des Modellsystem zur Analyse von biozidbelastetem Boden identisch und aus Abbildung 6 zu entnehmen. Es wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

**Versuchsansatz I und II**



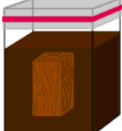
Die Proben wurden sofort nach Einbau sowie nach 2, 4, 8, 16, 24, 32, 64 und 105 Tagen entnommen und analysiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden drei unabhängige Versuchsansätze ausgewertet.

**Versuchsansatz III**

Die Proben in den Reaktoren wurden 105 Tage kontinuierlich gemessen. Täglich wurden fünf unabhängige Versuchsansätze und 17 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes ausgewertet.

Die Versuchsansätze des Modellsystem HSM-Ho-Bo sind in Abbildung 6 schematisch zusammengefasst:

Alle im Kapitel 2.10 beschriebenen Modellsysteme sind in Abbildung 7 noch einmal im Bezug auf die hergestellten Testansätze, Abkürzungen, die erbrachten Nachweise, sowie die eingesetzten Techniken zusammengefasst.

	Testansätze	Abkürzung	Nachweis	Technik
<b>A. Bi-Bo</b> 	Kontrolle(H <sub>2</sub> O)	Kontrolle	Respiration (CO <sub>2</sub> )	IR -Gasanalysator
	5 µg/g Kupfer -HDO <sup>13</sup> C	(B-l-13)	δ <sup>13</sup> C-Wert im CO <sub>2</sub>	EA-IRMS
	20 µg/g Kupfer -HDO <sup>12</sup> C	(B-h-12)	δ <sup>13</sup> C-Wert im Boden	EA -IRMS
	20 µg/g Kupfer -HDO <sup>13</sup> C	(B-h-13)	δ <sup>13</sup> C-Wert in den PLFAs HDO-Konzentration	GC-C-MS HPLC
<b>B. HSM-Ho-Bo</b> 	Kontroll HSM ohne HDO	(HSM-0)	Respiration (CO <sub>2</sub> )	IR -Gasanalysator
	200 µg/g Kupfer -HDO <sup>12</sup> C	(HSM -12)	δ <sup>13</sup> C-Wert im CO <sub>2</sub>	EA-IRMS
	200 µg/g Kupfer -HDO <sup>13</sup> C	(HSM -13)	δ <sup>13</sup> C-Wert im Boden	EA -IRMS
			δ <sup>13</sup> C-Wert in den PLFAs	GC-C-MS
			HDO-Konzentration	HPLC
		Metabolite des HDOs	GC-MS	
<b>C. HSM-Pr-Bo</b> 	Kontrolle mit H <sub>2</sub> O	Kontrolle	Sukzession mikro. Gem.	PCR, T -RFLP; SSCP;Klonierung ; Sequenzierung
	HSM mit 1,1 % Kupfer -HDO	(HSM -K-l)		
	HSM mit 2,2 % Kupfer -HDO	(HSM -K-h)	Kupfer-Konzentration	AAS
	HSM mit 1,1 % Kupfer -Amin	(HSM -A-l)	HDO-Konzentration	HPLC
	HSM mit 2,2 % Kupfer -Amin	(HSM -A-h)		

**Abbildung 7:** Übersicht über die eingesetzten Modellsysteme aus Kapitel 2.10 im Bezug auf die hergestellten Testansätze, Abkürzungen, die erbrachten Nachweise, sowie die eingesetzten Techniken.

## 2.11 Begleitende Kontrolluntersuchungen

Es wurden für die drei Versuchsansätze der Modellsysteme 2.10.2 und 2.10.3 folgende Untersuchungen begleitend durchgeführt:

### Überprüfung des Deckelsystems der Glasflaschen auf Gaspermeabilität

Vor der Inkubation der Bodenproben in 100 ml Glasflaschen war eine Prüfung des Deckelsystems, bestehend aus einem Septum (GL 45 Butylstopfen für Laborflaschen, Ochs, Bovenden) und einer Lochkappe (GL 45, Ochs) auf ihre Undurchlässigkeit gegenüber Gasen notwendig, um einen gegebenenfalls auftretenden Gasaustausch mit der Umgebung ausschließen zu können. Zu jedem Inkubationstag wurde eine Glasflasche mit einem Septum und einer Lochkappe in einen Kunststoffbeutel (Vernichtungsbeutel, 300 x 500 mm, Th. Geyer, Berlin) gelegt. An diesen Beutel wurde ein Dreiwegehahn angeschlossen, der zum einen mit einer Pumpe und zum anderen mit einer Stickstoffflasche verbunden war. Zunächst wurde die im Beutel befindliche Luft mit dem Vakuumpumpensystem (Turbomolekularpumpe mit Membranpumpe als Vorvakuumpumpe, TMH 071P DN40 ISO KF, 3P, Pfeiffer Vacuum, Asslar) entfernt und der Beutel vollständig evakuiert. Das Vakuum von ca. 2 hPa wurde für 15 sec. aufrecht erhalten. Im Anschluss wurde der Beutel mit Stickstoff (99,9999% Reinheit, 6.0) vollständig gefüllt. Der Beutel wurde noch drei Mal evakuiert und neu mit Stickstoff befüllt. Bei Atmosphärendruck (1000 hPa) wurde das Septum in die Flasche gedrückt und diese mit der Lochkappe verschlossen. Es wurden vier Flaschen (jeweils eine Flasche pro Inkubationstag) in beschriebener Weise vorbereitet. Sofort, nach 8, 24 und 65 Tagen wurde mit Hilfe einer gasdichten Spritze (Modell: Syringe Pressure Lok, capacity 10 ml, Precision sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana/USA) das Septum durchstoßen und eine Gasprobe von 10 ml entnommen. Diese Gasprobe wurde mittels der oben angegebenen Spritze über die Gasprobendosierschleife (0,5 ml) eines Gaschromatographen in das GC-Analysensystem injiziert. Eingesetzt wurde ein Gaschromatograph (HP 6890, Hewlett Packard) mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor und einer gepackten Mol-Sieb 5A Trennsäule (60/80 mesh), Länge = 4 m,  $\varnothing = 1/8''$ . Die Temperatur des GC-Ofens betrug 60 °C, und als Kalibriergas wurde Raumluft mit einem Sauerstoffgehalt von 20,93 % [v] verwendet. Als Referenz für eine Permeabilität des Deckelsystems gegenüber Gasen wurde der Sauerstoffgehalt in der Gasphase, der Flasche, bestimmt.

## Überprüfung der Verfügbarkeit von Sauerstoff

In einer mit Boden befüllten und gasdicht verschlossenen Flasche bildet sich durch den Verbrauch des Sauerstoffs durch Bodenmikroorganismen nach unbekannter Zeit eine anoxische Atmosphäre. Zusätzlich akkumuliert sich in der Gasphase oberhalb des Bodens das von den Mikroorganismen abgegebene CO<sub>2</sub>. Um dies zu vermeiden, musste von außen Luft in das System eingebracht werden und die Gasphase in der Probe musste in regelmäßigen Abständen gemischt werden. Um zu ermitteln in welchen Zeitabständen dies notwendig war, wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen täglich eine Flasche mit 20 g Boden (Kap. 2.10.2 ) befüllt, gasdicht verschlossen und bei 20 °C Dunkelheit inkubiert. Nach 25 Tagen wurden die Proben kurz geschwenkt, um die Gasphase zu mischen. Das Septum wurde durchstoßen und aus der Gasphase der Proben wurden 10 ml mit einer gasdichten Spritze (Syringe Pressure Lok, capacity 10 ml, Precision sampling Corp., Baton Rouge) entnommen. Die Proben wurden gaschromatographisch (siehe Seite 33) auf den Gehalt an Sauerstoff analysiert.

## 2.12 Chemische Analysen

### 2.12.1 Bestimmung der Kupfer HDO Konzentration

Die Bestimmung der Kupfer-HDO-Konzentration untergliedert sich in zwei Abschnitte:

- Optimierung des Extraktionsverfahrens für Kupfer-HDO aus Boden
- Quantitative Bestimmung von Kupfer-HDO mittels HPLC

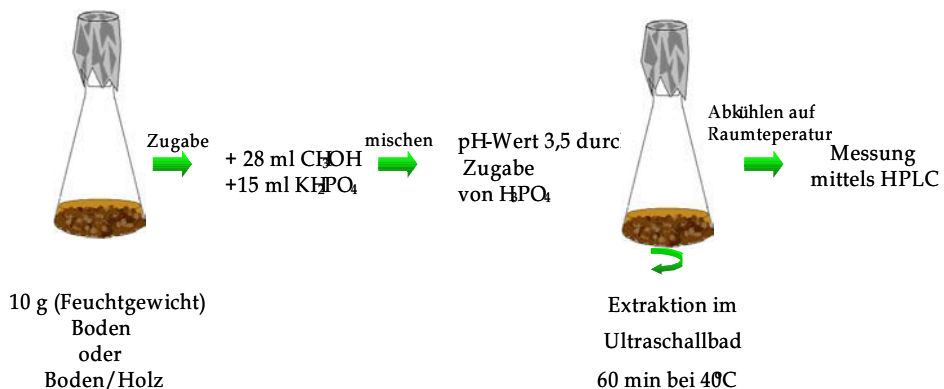
### Optimierung des Extraktionsverfahrens für Kupfer-HDO aus Boden

Die Extraktion von Kupfer-HDO aus Boden wird durch die Erdmatrix stark behindert, weil ein Teil des Kupfer-HDOs an die Bodenbestandteile gebunden wird und somit nicht mehr extrahiert werden kann. Ein Teil des Biozids wird auch an der Holzmatrix fixiert. Eine Quantifizierung des Kupfer-HDOs aus dem Boden wird so beeinträchtigt. Es ist notwendig, die Extraktionsmethode auf die Bedingungen des Systems anzupassen, um eine höchstmögliche Ausbeute zu erzielen und um die exakte Wiederfindungsrate zu bestimmen. Zur Analyse wurde Kupfer-HDO Standard (Firma Dr. Wolman GmbH, Sinzheim) für verschiedene Analyse-Ausgangskonzentrationen (20 µg/g; 10 µg/g; 5 µg/g; 2 µg/g; 1 µg/g) in 1,8 ml dd H<sub>2</sub>O gelöst und in 10 g des Bodens (55 % relative Feuchte)



eingbracht. Die Proben wurden über Nacht bei 60 rpm geschüttelt, (Schüttelaparat 3005, GFL, Burgwedel) um eine gründliche Durchmischung zu erzielen. Durch die Zugabe von eines Lösungsmittelgemisches aus 28 ml Methanol (Merck) und 15 ml 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Merck), in einem Gesamtvolumen von 50 ml, wurde das Kupfer-HDO extrahiert. Nach dem Vermischen von Boden mit dem Lösungsmittel lag der pH-Wert der Proben durchschnittlich bei pH 7. Durch Zugabe von Phosphorsäure (85 %, Merck) wurde der pH Wert auf pH 3,5 oder auf pH 2 gesenkt. In den Vergleichsproben wurde der pH-Wert bei pH 7 belassen. Im Ultraschallbad (Sonorex Super 10P, Bandelin) bei einer Leistung von 100 % und einer Temperatur von 40 °C für 60 min erfolgte die Freisetzung des Kupfer-HDOs aus der Bodenmatrix. In parallel ablaufenden Experimenten wurden noch weitere Extraktionsschritte mit zusätzlichem Rühren der Proben für eine weitere Stunde oder eine erneute Inkubation im Ultraschallbad vorgenommen (bei gleich bleibenden Bedingungen). Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde im Bedarfsfall ein auftretender Gewichtsverlust der Probe durch Zugabe der äquivalenten Menge Methanol ausgeglichen. Im Anschluss wurden die Extrakte eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt (Electronicrührer Multipoint HP6, VARIOMAG®).

In allen weiteren Projekten wurde dieses Verfahren angewandt und mit einem pH Wert des Extraktes von pH 3,5 gearbeitet, da sich dieser als optimal herausgestellt hatte. Die einzelnen Schritte der optimierten Extraktion sind in Abb. 8 zusammengefasst.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des optimierten Extraktionsverfahrens von Kupfer-HDO aus einer Boden bzw. Boden/Holzmatrix.

Zur Analytik von Kupfer-HDO aus Boden ist derzeit noch keine veröffentlichte Studie verfügbar. Von der Firma Dr. Wolman GmbH sind hinsichtlich der Kupfer-HDO-Analytik schon Studien durchgeführt worden (WITTENZELLNER, 2006).

## Quantitative Bestimmung von HDO mittels HPLC

Durch HPLC wurde der HDO-Gehalt der Proben quantifiziert. Mit einer Spritze wurden etwa 2 ml der Probe (2 ml, Norm-Ject, Henke Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen) entnommen und über einen 0,45 µm PTFE-Filter (Minisart SRP 15, Sartorius) filtriert. Die ersten 0,5 ml der Probe wurden verworfen, da nicht auszuschließen war, dass Bestandteile der Probe an dem unkonditionierten Filter adsorbieren. Die geringe Wirkstoffkonzentration in den Proben erforderte keine weiteren Verdünnungsschritte vor der Messung. Die Proben wurden im direkten Anschluss an die Extraktion gemessen. Die Trennung wurde an einer Luna C18(2)-Säule (Länge 75 mm, ID 4,6 mm Partikel 3 µm) bei 40°C durchgeführt. Zur Elution wurde ein Gemisch (45 % Methanol und 55 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit einem pH Wert von 2,5 und einer Flussrate von 1,0 ml/min eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 229 nm. Der HDO Anteil im Kupfer-HDO wird durch das UV-Licht erfasst und kann über das Integral der Fläche, die am Maximum entsteht, quantifiziert werden. Das verwendete Injektionsvolumen lag bei 10 µl. Grundlage zur Berechnung der Messwerte mit dem PC-Programm (Chrom Gate, Knauer, Berlin) war ein Abgleich der Retentionszeit und der Signalfäche (-höhe) eines externen Standards mit den Messwerten. Um die Extrakte aus dem Boden zu isolieren, wurde die Messzeit von 5 min auf 10 min verlängert. So konnte sichergestellt werden, dass alle Bestandteile der Probe die Säule verlassen hatten. Nach einer Messreihe wurde die HPLC-Anlage zunächst mit 10 ml Methanol und im Anschluss mit 30 ml 10 % Methanol (in reinst H<sub>2</sub>O) gespült.

### 2.12.2 Bestimmung der Kupfer-Konzentration

Um die Kupferkonzentration zu bestimmen, wurden die Proben verascht und mit Säure aufgeschlossen. Die mit dem Mikrotom (Kap. 2.10.1 ) hergestellten Holzsnitte wurden getrocknet und in feuerfeste Quarztiegel (1 g Holz pro Probe) eingewogen. Über einem Gasbrenner erfolgte im Anschluss die vollständige Verbrennung der Proben, wobei darauf zu achten war, dass während des Verbrennungsprozesses keine Ascheflocken aus der Probe entweichen konnten. Sämtliche organische Komponenten in der Probe wurden im Muffelofen (Nabertherm, L9/S, Lilienthal) durch Hitze entfernt. Hier wurden die Proben über einen Zeitraum von 30 min auf eine Temperatur von 500 °C erhitzt; diese wurde dann noch 2 h beibehalten.

Nach dem Abkühlen der Proben im Muffelofen auf Raumtemperatur wurde jede Probe in 2 ml dd H<sub>2</sub>O gelöst, um einem Entweichen von Ascheflocken aus der Probe vorzubeugen. Für die Kupferanalyse wurden die Proben in einem Sandbad langsam auf eine Temperatur von etwa 40 °C erwärmt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2 ml Schwefelsäure (Merck) und die Proben

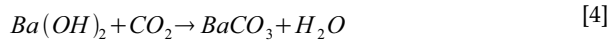
wurden weiter bis auf 180 °C erhitzt. Durch eine stetige und tropfenweise Zugabe von insgesamt 5 ml Salpetersäure (Merck) zu den Proben wurden diese aufgeschlossen. Als Indikator für eine aktive Umsetzung war eine intensive Rauchgasentwicklung zu sehen. Die Umsetzung der Proben war dann abgeschlossen, wenn die vormals getrüben Proben klar erschienen. Durch den hohen Gehalt an Mineralien, in den Proben, die aus dem Boden stammten, konnten jedoch nicht alle Schwebestoffe vollständig aus den Proben entfernt werden. Daher wurde der Versuch nach einer Stunde der Salpetersäure Zugabe generell beendet. In den Proben mit einer zu erwartend hohen Kupferkonzentration (HSM-h-A und HSM-h-K) wurden die Proben 1 : 10 (v/v) in dd H<sub>2</sub>O verdünnt. Bei gering konzentrierten Proben (HSM-l-K und HSM-l-A) erwies sich eine Verdünnung von 1 : 5 (v/v) in dd H<sub>2</sub>O als optimal, da ein Abgleich zur Standarteichreihe ermöglicht wurde (siehe unten).

Die Kupferkonzentration wurde durch Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Die Hohlkathodenlampe des AAS emittierte Licht einer Wellenlängen von 324,8 nm (Wellenlänge spezifisch zur Kupferbestimmung) mit einer Intensität von 10 mA. Durch die Zuschaltung einer Deuteriumlampe wurde das lichtabhängige Untergrundrauschen, welches im UV-Bereich entstand, minimiert. Im Strahlengang des Atomabsorptionsspektrometers (UNICAM 969, Thermo Scientific, Hamburg) befand sich eine Atomisierungseinheit, in der die Bestandteile der Probe durch eine Ethin/Luft-Flamme atomisiert wurden, so dass eine Atomwolke entstand. Der Lichtstrahl wurde durch die atomisierten Kupferatome absorbiert. Hinter der Atomisierungseinheit wurde die Intensität des geschwächten Lichts gemessen und mit der Intensität des ungeschwächten Lichtstrahls korreliert. Mit ansteigender Konzentration des Kupfers (0,5 mg/l und 5 mg/l) in der Probe stieg die Extinktion des Lichtes proportional an. Die Proben wurden gegen externe Standards mit Kupferkonzentrationen von 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 und 5 mg/l Kupfer abgeglichen. Jede der Proben wurde zweifach gemessen und aus dem arithmetischen Mittel von drei Wiederholungen wurde die Kupferkonzentration bestimmt. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Leitungen mit dd H<sub>2</sub>O gespült, um Verfälschungen der Messwerte durch unvollständig entfernte Bestandteile der vorangegangenen Probe zu minimieren. Der Toleranzbereich, dem die Messwerte genügen mussten, betrug  $\pm 5\%$  des arithmetischen Mittels.

### 2.13 CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest zur Analyse des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>

Der CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest diente ursprünglich dem Nachweis „...der biologischen Endabbaubarkeit nicht flüchtiger Chemikalien in wässrigen Medien.“ (STURM, 1973). Dieser CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest wurde bereits zur Analyse des Abbaus von Kunststoffen im Boden eingesetzt (MÜLLER ET AL., 1992). In diesem Versuch wurde das durch den biologischen Abbau des Biozids respiratorisch

erzeugte CO<sub>2</sub> in einer Bariumhydroxidlösung Ba(OH)<sub>2</sub> gebunden und als Bariumkarbonat (BaCO<sub>3</sub>) ausgefällt. Es konnte mit folgender Formel (4) quantifiziert werden:



Es wurde mit einer 0,01 molaren Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung gearbeitet, die zunächst durch Filtration (595 ½ Faltenfilter, Ø 240 mm, Schleicher und Schuell, Dassel) von nicht gelöstem Ba(OH)<sub>2</sub> befreit wurde. Das Verfahren basierte auf einer Kette von Waschflaschen, durch die Luft aus dem Raum mit einer Geschwindigkeit von 100 ml/min gepumpt wurde (Wisa Pumpe mit 6 Watt Leistung, Abb. 9). Zunächst wurde die Luft durch Aktivkohle von organischen Substanzen und durch 5 M KOH vom CO<sub>2</sub> befreit. Zur Kontrolle wurde eine nachgeschaltete Flasche mit einer 0,01 molaren Ba(OH)<sub>2</sub> gefüllt. Trübungen der Flüssigkeit deuteten auf eine ineffiziente Entfernung des CO<sub>2</sub> aus der Gasphase hin. Im weiteren Verlauf durchfloss die Luft einen Sterilfilter (Midisart, Sartorius) und wurde durch steriles dd H<sub>2</sub>O abgesättigt, um ein Austrocknen der Proben zu verringern. Die Reaktoren wurden zu Beginn und in regelmäßigen Abständen gewogen. Der Gewichtsverlust, bedingt durch einen Verlust an Feuchtigkeit der Proben durch den stetigen Luftstrom, wurde durch steriles dd H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Nach anschließender Passage des Reaktors, in dem sich 20 g der Bodenproben befanden, wurde das hier gebildete CO<sub>2</sub> mit dem Luftstrom durch 200 ml Ba(OH)<sub>2</sub> geleitet und präzipitierte als BaCO<sub>3</sub> (Abb. 9). Das BaCO<sub>3</sub> konnte mit einer Glaspipette vom Grund der Waschflasche gewonnen werden. Da bei der gering gewählten Probenmenge sehr wenig CO<sub>2</sub> gebildet wurde und demzufolge nur eine geringe Ausbeute an BaCO<sub>3</sub> erzielt werden konnte, wurde zu jedem Prüftag die produzierte BaCO<sub>3</sub>-Menge von 48 h verwendet.

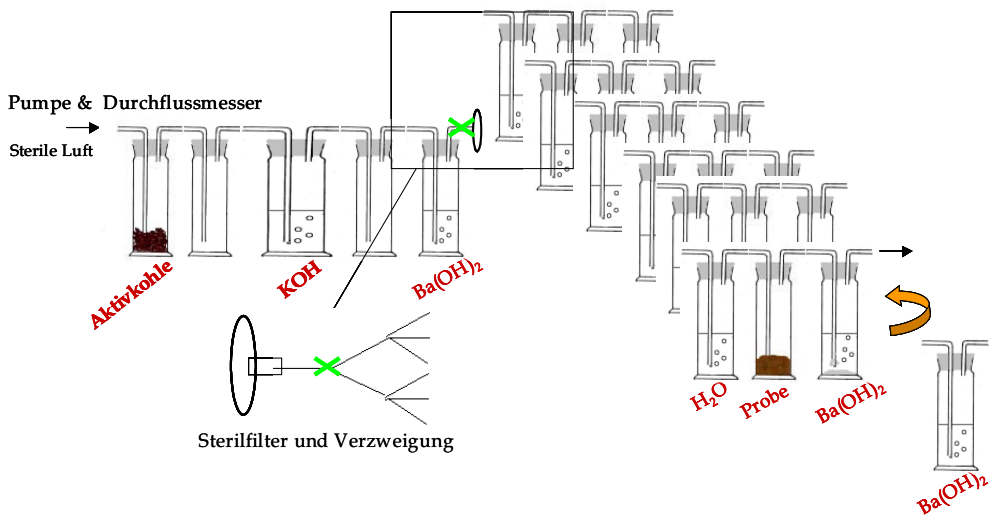


Abbildung 9: Schematische Darstellung des CO<sub>2</sub>-Entwicklungstests

## 2.14 Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ in Boden und in BaCO<sub>3</sub>

Die Isotopenvariation vom Kohlenstoff in den Bodenproben und im BaCO<sub>3</sub> wurde mit der Gerätekombination EA-IRMS (EA - Elementaranalysator, Vario EL III, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau; IRMS - Isotop Ratio Mass Spectrometer, IsoPrime, GV Instruments, Manchester) bestimmt. Von den Bodenproben wurden 10 bis 20 mg und für die BaCO<sub>3</sub> Proben, 1 bis 3 mg Probenmaterial in Zinnkapseln bzw. Zinnschiffchen eingewogen. Der Elementaranalysator (Abb. 10) arbeitet nach dem Prinzip der katalytischen Rohrverbrennung. Zunächst wurde die Probe über den Probenträger in das Verbrennungsrohr eingeleitet. Unter Sauerstoffzufuhr (35 ml/min für 90 sec.) und einer Temperatur von 1150 °C wurde die Probe verbrannt. Die durch die Verbrennung entstandenen Gase wurden von störenden Fremdgasen befreit. Die Analysengase (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>) wurden dazu auf den drei Adsorptionssäulen des EA adsorbiert. Nacheinander wurden dann die Gase von den Säulen desorbiert. CO<sub>2</sub> wurde bei einer Temperatur von 100 °C desorbiert. Als Spül- und Trägergas wurde Helium mit einem Fluss von 200 ml/min verwendet. Die Quantifizierung der Analysengase wurde am Ausgang des EA durch den Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt. Die in das IRMS geleiteten Analysengase (Gasmoleküle) wurden ionisiert und der Ionenstrom wurde mit einem Multikollektorsystem, das aus drei Faraday-Cups bestand, gemessen. Aus den Intensitäten der Ionenströme der Massen 45 und 44 wird das Isotopenverhältnis  $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$  für die Probe und des

Referenzgases (CO<sub>2</sub>) bestimmt.

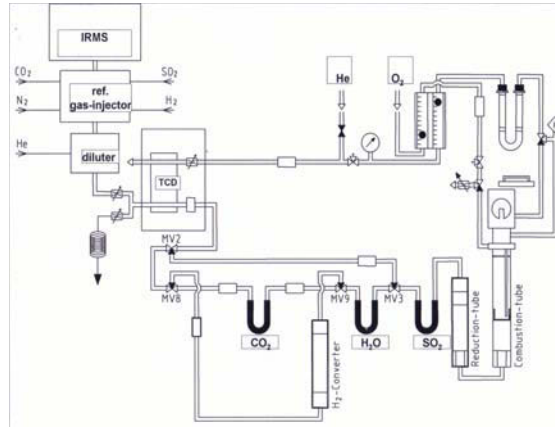


Abbildung 10: Funktionelles Diagramm EA-IRMS Analysators (nach Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau).

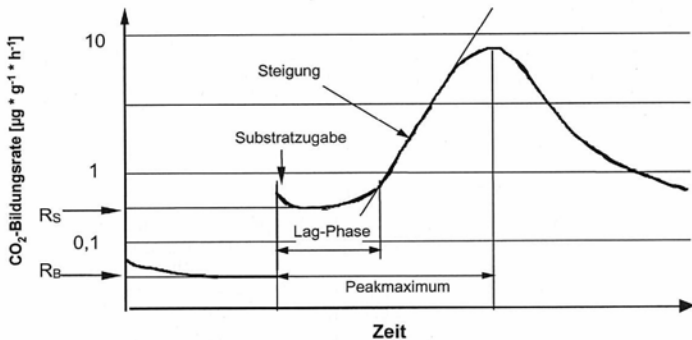
Der Ionenstrom der Masse 46 wurde für die Sauerstoffkorrektur verwendet. Das Isotopenverhältnis des R(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) Referenzgases wurde vor jeder Probenmessung bestimmt. Der Ionenstrom, der von den Probeneinwagen abhängt, lag bei den BaCO<sub>3</sub>-Messungen zwischen 4 und 10 nA (Masse 44) und bei den Bodenproben zwischen 3 und 6 nA (Masse 44). Der δ<sup>13</sup>C-Wert des Referenzgases wurde mit einem internationalen Standard bestimmt, der auf einem internationalen Standard (δ-Skala für CO<sub>2</sub>, VPDB - Skala) bezogen wurde. Der δ<sup>13</sup>C-Wert der Probe wurde nach der folgenden Formel [5] berechnet:

$$\delta^{13}C = \left( \left( \frac{R \left( \frac{^{13}C}{^{12}C} \right)_{\text{Probe}}}{R \left( \frac{^{13}C}{^{12}C} \right)_{\text{Standard}}} \right) - 1 \right) \cdot 10^3 \quad [5]$$

In Formel 5 ist der R(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)<sub>Probe</sub> - Wert das Isotopenverhältnis der Probe und R(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)<sub>Standard</sub> - Wert das Isotopenverhältnis des Referenzgases. Die δ<sup>13</sup>C-Werte wurden in Promill (‰) angegeben. Die Messungen am EA-IRMS wurden von Herrn Dr. W. Pritzkow V.1 der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung vorgenommen.

## 2.15 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung

Die mikrobielle Bodenatmung wird in Form von Atmungsraten ( $\text{CO}_2$ -Produktion pro Zeit) ermittelt. Die Atmungsraten korrelieren mit der Aktivität und Vitalität einer mikrobiellen Gemeinschaft im Boden und ermöglichen eine direkte Analyse der Auswirkung von Substraten auf die Gemeinschaft der Organismen (NÖRDGREN ET AL. 1988). Die Atmungsraten wurden in Anlehnung an die DIN ISO 17155 erzeugt. Folgende Parameter wurden ausgewertet (Abb. 11 und Tab. 5):



**Abbildung 11:** Relevante Phasen zur Auswertung von Bodenatmungskurven (WILKE & WINKEL, 1999) Erläuterungen befinden sich in Tab. 5.

**Tabelle 5:** Erläuterungen relevanten Fachbegriffe der Abb. 11

Phase	Bedeutung
Lag-Phase	Zeit zwischen Substratzugabe und Beginn des exponentiellen Wachstums
Peakmaximum	Zeit zwischen Substratzugabe und maximaler $\text{CO}_2$ Abgabe
Steigung	Beschreibt die Wachstumsrate [ $\mu$ ] in halblogarithmischer Darstellung (WILKE & WINKEL, 1999)

### 2.15.1 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung durch einen Infrarotgasanalysator

Die Bodenatmung wurde anhand der  $\text{CO}_2$ -Produktion mittels eines Infrarot Gasanalysators (ADC, Hoddesdon, UK) quantifiziert (Abb. 12). Die Bodenproben wurden in 20 g Portionen in Glasrohre (200 mm Länge,  $\varnothing$  40 mm Innendurchmesser) gefüllt, die am unteren Ende durch 7 g sterile, auf 5 cm verdichtete, Glaswolle (Roth) und einem Stück Gaze luftdurchlässig verschlossen wurden. Diese Rohre wurden in die Messsäulen eingesetzt und über Schläuche ( $\varnothing$  4 mm Innendurchmesser, Portex) mit dem Gasanalysator verbunden. Insgesamt wurden 16 Säulen abwechselnd mit den

unterschiedlich behandelten Bodenproben der Modellsysteme aus Kap. 2.10.2 bzw. Kap. 2.10.3 ) befüllt. Als Nullprobe wurde in die erste Säule nur Glaswolle gefüllt. Zum Belüften und zum Transport des respiratorisch erzeugten  $\text{CO}_2$  zur Messzelle wurde Luft aus der Umgebung angesaugt und über eine Säule mit Silikagel (2 -5 mm, VWR) zunächst von Feuchtigkeit und im Anschluss durch eine Säule mit Natronkalk (Roth) von  $\text{CO}_2$  befreit. Ein Teil dieses Gases wurde zur Referenz-Infrarotzelle des Gerätes gepumpt und zum Abgleich mit den Proben verwendet. Der restliche Teil der Luft wurde durch einen Sterilfilter (Midisart, Sartorius) geleitet und in einer Flasche gebündelt.



**Abbildung 12:** Aufbau des Systems zur Bestimmung der Bodenatmung mit einem Infrarotgasanalysator (ADC, Hoddesdon, UK) und den verwendeten Messsäulen.

Von hier wurde das Gas zunächst durch steriles  $\text{dd H}_2\text{O}$  geleitet, um ein Austrocknen der Bodenproben zu verringern und gelangte im Anschluss in die einzelnen Messsäulen. Die Proben wurden im Abstand von ca. vier Wochen gewogen. Ein gegebenenfalls auftretender Gewichtsverlust wurde durch eine äquivalenten Menge sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  ausgeglichen. Die Messung der Proben erfolgte kontinuierlich, wobei die zu messende Säule zunächst 4 min 45 sec. mit der durchgeleiteten Luft gespült wurde. Dann erfolgte die 5 sekundige Messung des  $\text{CO}_2$ -Gehaltes. Alle anderen Säulen wurden in dieser Zeit mit der gleichen Menge Luft gespült, die mit etwa 100 ml/min durch die Säulen gepumpt wurde. Jede Probe wurde 17 x am Tag gemessen und aus diesen Daten wurde das Tagesmittel berechnet. Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt wurde durch die Änderung der Absorption der Infrarotstrahlung bei unterschiedlichen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen in der Infrarotzelle bestimmt. Die Kalibrierung des Gerätes wurde über einen separaten Kreislauf mit zusätzlicher Silikasäule, Natronkalk Säule und einem Molekularfilter vorgenommen. Dieses System zur Messung von  $\text{CO}_2$  aus Bodenproben wurde in ähnlicher Weise von HEINEMEYER ET AL. (1989) beschrieben.



## 2.15.2 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung durch Titration

Eine weitere Methode um die Konzentration des respiratorisch abgegebenen CO<sub>2</sub> einer mikrobiellen Gemeinschaft im Boden zu bestimmen, ist die Titration. Dazu wurde der im Kapitel 2.13 beschriebene CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest eingesetzt. Das präzipitierte BaCO<sub>3</sub> wurde durch Filtration mit einem Faltenfilter (595 ½ Faltenfilter, Ø 240 mm, Schleicher und Schuell, Dassel) aus der Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung (0,025 molar) entfernt. Die entstandene Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung wurde gegen eine 0,05 molare HCL-Lösung bis zum Neutralisationspunkt von pH-7 (Microprocessor pH 537, WHT und Digitalbürette, 25 ml, Brand) titriert. Die verbrauchte Menge an Salzsäure diente der Berechnung des entstandenen CO<sub>2</sub>.

Die CO<sub>2</sub> Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet (6):

$$\xi = \left( \frac{N_B * V_B}{N_A} - \frac{x * V_t}{V_a} \right) * N_A * f \quad [6]$$

ξ [mmol] : Kohlenstoff, der in das System als CO<sub>2</sub> eingebracht wurde

N<sub>B</sub> [ml] : Titer der eingesetzten Bariumhydroxidlösung vor dem Versuch (vor Filtration)

V<sub>B</sub> [ml] : Volumen der Proben

N<sub>A</sub> [ml] : Titer der HCL-Lösung

x [ml] : Titrationsvolumen an HCL-Lösung, das verwendet wurde, um eine Probe (nach Entfernung des gebildeten Bariumkarbonat) von 25 ml bis pH-7 zu neutralisieren

V<sub>t</sub> [ml] : Volumen der eingesetzten Bariumhydroxidlösung

V<sub>a</sub> [ml] : Probenvolumen

f [mmol] : Molarität der HCL-Lösung

## 2.16 Charakterisierung der mikrobiellen Fettsäuren aus dem Boden

### 2.16.1 Extraktion von Fettsäuren

Die Fettsäuren aus Boden wurden in drei aufeinander folgenden Schritten isoliert:

1. Die Lipide wurden nach einer modifizierten Methode nach Bligh und Dyer (1959) extrahiert.
2. Durch eine Festphasenchromatographie der hergestellten Lipidextrakte wurden die Phospholipide gewonnen (ZELLES & BAI 1993).
3. Anschließend erfolgte eine alkalische Methanolyse zur Überführung der Phospholipide in FAMES (Fettsäure-Methyl-Ester), um eine gaschromatographische Messung zu ermöglichen (mod. nach WHITE ET AL. 1979).

Die Lipide wurden aus dem feuchten Boden mit Chloroform extrahiert. Es wurden 6,5 g des Bodens in einem 100 ml Erlenmeierkolben mit Schliff eingewogen und mit je 40 ml Chloroform und Methanol (beides Merck) versetzt. Der Kolben wurde wie alle Glasgefäße, die zur Fettsäureextraktion eingesetzt wurden, zuvor mit Chloroform gründlich gereinigt, um eventuell vorhandene organische Rückstände von der Glaswand zu entfernen. Nach einstündiger Extraktion bei Raumtemperatur durch Rühren der Proben mit 400 rpm (Electronicrührer Multripont HP6, VARIOMAG® FL, USA) wurden die festen Bestandteile der Probe durch Zentrifugation mit 3000 rpm für 3 Minuten (Micro 200, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) entfernt. Um noch vorhandene Lipide aus dem Boden zu lösen, wurde durch erneute Zugabe von je 40 ml Chloroform und Methanol zu den festen Bestandteilen die gesamte Extraktion wiederholt. Beide Extrakte einer Probe wurden in einem 250 ml Rundkolben vereinigt. Durch einen Unterdruck von 0,95 hPa bei 50 °C im Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchli, Essen) wurden die Lösungsmittel vollständig entfernt. Die Lipide verblieben an der Wand des Kolbens und konnten in 3 ml Chloroform aufgenommen und in einen zuvor ausgewogenen 25 ml Spitzkolben überführt werden. Zur Bestimmung des Gesamtgewichtes der gewonnenen Lipide wurde das Lösungsmittel erneut durch rotieren unter gleichbleibenden Bedingungen entfernt und das Gewicht des Kolbens wurde erneut ermittelt (LE 225D-OCE, Sartorius, Göttingen). Die Probe wurde in 300 µl Chloroform aufgenommen.

Die chromatographische Trennung der gewonnenen Gesamtlipide in neutrale Lipide, Glyko- sowie Phospholipide erfolgte über eine Silikasäule (DSC-Si, 6 ml Reservoir, 500 mg Sorbent, Sigma Aldrich). Die Säule wurde mit 2 ml Chloroform equilibriert, und im Anschluss wurde die Probe aufgetragen. Durch einen Unterdruck von 650 hPa (Kammer: SPE12 Anschluss Station, Phenomenex, Aschaffenburg; Pumpe: DA7C, Charles austen pumps, surrey, UK) wurde die Probe langsam durch die Phase durchgezogen. Die einzelnen Lipidfraktionen wurden schrittweise mit 7 ml Chloroform (neutral Lipide), 7 ml Aceton (Glykolipide) entfernt. Die Phospholipide wurden in 15 ml Methanol (getrocknet, Merck) eluiert und durch rotieren vollständig getrocknet. Die Wiederaufnahme erfolgte in 1 ml wasserfreiem Methanol/Toluol (1 : 1) (v/v).

Die Phospholipide wurden durch Zugabe von 1 ml frischer 0,2 M NaOH, für 15 min bei 37 °C im Wasserbad (ecoline 011, Lauda, Shropshire, UK), in FAMES (Fettsäuremethylester) umgesetzt. Zusätzlich wurde der Probe noch 20 µl eines 0,1 mg/ml des Standards Methyl nonadecanoate (FAME 19:0, Fluka) zugefügt. Die Neutralisation und Gewinnung der FAMES erfolgte durch die Zugabe von 2 ml Hexan, 0,3 ml 1 M Essigsäure sowie 2 ml dd H<sub>2</sub>O. Die Proben wurden gründlich gemischt und so lange inkubiert, bis eine Phasentrennung ausgelöst wurde. Die Hexanphase mit den enthaltenen FAMES wurde abgenommen. Um die Ausbeute an FAMES zu maximieren, wurde die verbliebene wässrige Phase noch zweimal mit Hexan geschüttelt. Die Hexanphasen einer Probe wurden in einem

10 ml Spitzkolben vereinigt und mit 20  $\mu$ l eines 0,1 mg/ml des Standards Methyl laurate (FAME 12:0, Fluka) vermischt. Durch einen milden Stickstoffstrom wurden die Proben vollständig eingengt und in 200  $\mu$ l Hexan rehydriert. Die Proben wurden in GC-Vials (Agilent) in Rollrandflaschen bei - 21 °C bis zur gaschromatographischen Messung gelagert.

### 2.16.2 Bestimmung des Isotopenverhältnisses in den mikrobiellen Fettsäuren

Die Isotopenverhältnisse und die Fettsäurekomposition der in Kapitel 2.16.1 hergestellten FAME wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung bestimmt. Die Analysen wurden modifiziert, wie in ABRAHAM ET AL. (1998) beschrieben, durchgeführt. Die Ausnahmen waren, dass die Proben nicht derivatisiert wurden. Das Dimethyl-sulfid-Addukt wurde vorher hergestellt um die Standards zu identifizieren. Die Nachweisgrenze für die einzelnen PLFAs ist abhängig von der Gesamtkomposition der PLFAs. Es können PLFAs mit einem Anteil von etwa 1 % an der relativen Gesamt-PLFA-Zusammensetzung detektiert werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist, wie gut sich die einzelnen PLFAs im Gemisch voneinander trennen lassen.

### 2.16.3 Nomenklatur der PLFAs

In dieser Arbeit wurden die PLFAs nach der Fettsäure-Nomenklatur des Prinzips A:B $\omega$ C beschrieben. Der Buchstabe A steht dabei für die Anzahl der Kohlenstoff-Atome und B für die Anzahl der enthaltenen Doppelbindungen. Bezogen auf das aliphatische ( $\omega$ ) Molekülende steht C für die Position dieser Doppelbindungen. Durch ein vorangestelltes „t“ (trans) oder „c“ (cis) wird die Konfiguration der Doppelbindung angegeben. Zur Beschreibung von Methylgruppen-Verzweigungen wird eine vorangestellte „i“ für eine iso- und „a“ für eine antiso- Verzweigung verwendet (z.B. hier befindet sich die Verzweigung ein bis zwei Kohlenstoffatome vom  $\omega$ -Terminus entfernt). Weitere Positionen der Methylgruppen werden vom Carboxyl-Ende aus beschrieben (z.B. 10Me18:0). War die Position der Methylgruppe unbekannt, so wurde des PLFA die Buchstaben „br“ (branched) vorangestellt. Das „d“ z.B. in 19:0d8,9 steht für die Position des Cyclopropan in der Kette. Manchmal wird noch ein „c“ angefügt, um zu zeigen, dass die Alkylreste beide auf derselben Seite des Cyclopropanringes stehen. Ein Cyclopropylring wurde durch „cy“ vor dem PLFA angezeigt (Zelles, 1997).

## 2.17 Mikrobiologische Techniken

### 2.17.1 Bakterielle Reinkulturen

Eine Einzelkolonie der verschiedenen bakteriellen Reinkulturen (Tab.6) wurden auf einer Platte mit LB-Nährmedium (1 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, mit NaOH, pH 7 mit 5 % Agar) in Abhängigkeit der optimalen Kultivierungseigenschaften der einzelnen Arten angezogen. Nach 15 -24 h, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme, wurde eine Einzelkolonie in 100 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD<sub>540</sub> nm (Visible Spectrometer, Amersham Pharmacia Biotech Invitrogen, Karlsruhe) von ca. 1.

**Tabelle 6:** Verwendete bakterielle Reinkulturen

Organismus	DSMZ Stamm	Temperaturoptimum
<i>Artrobacter globiformis</i>	20124	30 °C
<i>Bacillus licheniformis</i>	13	30 °C
<i>Corynebacterium Glutamicum</i>	20300	30 °C
<i>Escherichia coli</i> K12	498	37 °C
<i>Halomonas elongata</i> *	2581 <sup>T</sup>	30 °C
<i>Marinococcus halophilus</i> *	20408 <sup>T</sup>	30 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50090 <sup>T</sup>	30 °C

\*Zugabe von 5 % NaCl zum Medium; <sup>T</sup>- Typenstamm

### 2.17.2 Erzeugung chemisch kompetenter *Escherichia coli* DH5α Zellen

Diese Methode zur Erzeugung chemisch kompetenter Zellen wurde von INOUE ET AL. (1990) entwickelt. Dafür wurde eine *Escherichia coli* DH5α Einzelkolonie (F<sup>+</sup>Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, oR, recA1; end A1; phA, hsdR17(rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>) supE44 Δ; thi-1, gyrA96, relA1) (Invitrogen, Karlsruhe) von einer LB-Platte (LB-Flüssigmedium mit 5 % Agar) in 20 ml AB-Flüssigmedium (Antibiotic Broth Fertigprodukt, Fluka) überführt und bei 37 °C im Inkubationsschüttler (Innova<sup>®</sup> 44, Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 160 rpm angezogen. Nach acht Stunden wurde diese Vorkultur in 100 ml SOB-Medium (HANAHAN, 1983) 1 : 50 verdünnt (Tab. 7) überimpft.

**Tabelle 7:** SOB-Komplexmedium

Bestandteil	Konzentration	
Trypton	2 % (w/v)	20,00 (g/l)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	5,00 (g/l)
NaCl	10 mM	0,58 (g/l)
KCL	2,5 mM	0,20 (g/l)
MgCl <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	10 mM	2,03 (g/l)
MgSO <sub>4</sub> (6 H <sub>2</sub> O)*	10 mM	0,49 (g/l)

\* Sterilfiltriert durch einen 0,2 µm Filter (Rotrand, Whatman, Dassel) und nach dem autoklavieren (20 min 121 °C bei 2 bar) zu den restlichen Komponenten zugegeben

Die Zellen wurden über Nacht bei 20 °C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde bei einer OD<sub>540 nm</sub> (Visible Spectrometer, Amersham Pharmacia Biotech, Invitrogen, Karlsruhe) zwischen 0,6 und 0,8 durch inkubieren der Zellen in nassem Eis für 10 min gestoppt. Durch die Zentrifugation bei 5000 g für 10 min bei 4 °C (Avanti™ J-20 XP, Rotor JA 25.50 M, Beckmann COULTIER) wurden die Zellen pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 80 ml eisgekühltem Transformationspuffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 250 mM KCL), resuspendiert und ein pH-Wert von 6,7 mit KOH eingestellt. Zusätzlich wurden 55 mM MnCl<sub>2</sub> (steril filtriert) zugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss 10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation 10 min bei 5000 rpm (4°C) erneut pelletiert. Die Zellen wurden in 20 ml Transformationspuffer und 1,4 ml DMSO gelöst und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Zur Lagerung wurden Portionen von je 200 µl Zellsuspension hergestellt. Diese chemisch kompetenten Zellen sind bei -70 °C max. drei Monate lagerbar.

### 2.17.3 Lagerung und Reaktivierung bakterieller Reinkulturen

Um bakterielle Reinkulturen zu lagern, wurde das Cryobank™ - System des Herstellers Mast Diagnostica (Reinfeld) verwendet. Das Cryobank™-Röhrchen wurde mit ca. 3 - 4 Bakterienkolonien von einer frischen Stammpatte (LB-Medium) beimpft. Durch mehrmaliges Invertieren und kurzes Mischen auf dem Vortex (Reax 2000, Heidolph, Kehlheim) wurden die Zellen in Cryomedium suspendiert. Das Cryomedium wurde restlos entfernt, wobei einige Zellen an der Matrix der Cryokugeln verblieben. Die Röhrchen wurden bei -70 °C gelagert. Zur Reaktivierung der Mikroorganismen aus der Cryokultur™ wurden 2 - 3 der Cryokugeln entnommen, auf der Oberfläche eines geeigneten Festmediums mit einer sterilen Impföse abgerollt und unter geeigneten Kultivierungsbedingungen (Tab. 6) im Inkubationsschüttler (Innova® 44, Incubator Shaker Series, New

Brunswick Scientific, Nürtingen) angezogen. Um mit den Organismen zu arbeiten war es notwendig, diese durch fraktionierten Ausstrich zu vereinzeln, erneut auf Festmedium anzuziehen und Kolonien bilden zu lassen.

### 2.17.4 Lagerung rekombinanter Zellen

Zur dauerhaften Lagerung der rekombinanten Klone wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Aliquots einer Übernachtskultur mit Glycerinpuffer (56 % [v/v] Glycerin; 100 mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM Tris-HCl, [pH 8,0]) in gleichen Volumenanteilen in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Für ein erneutes Wachstum wurde mit einer sterilen Impföse ein Teil der gefrorenen Kultur entnommen und auf einer Agarplatte durch fraktionierten Ausstrich vereinzelt. Die Glycerinkulturen sind maximal 1 Jahr lang lagerbar (Angaben des Herstellers).

## 2.18 Molekularbiologische Methoden

### 2.18.1 Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren

Es wurden verschiedene Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus den unterschiedlichen Matrices angewandt, um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen. Folgende Extraktionsverfahren wurden eingesetzt:

- Extraktion der Gesamt-Nucleinsäuren aus Boden- und Holzproben
- Extraktion von Nucleinsäuren aus bakteriellen Reinkulturen
- Extraktion von Nucleinsäuren aus Gram negativen Bakterien
- Extraktion von Nucleinsäuren aus Gram positiven Bakterien

### Extraktion der Gesamt-Nucleinsäuren aus Boden- und Holzproben

Zur Extraktion der Gesamt-Nucleinsäuren aus den Bodenproben wurde das PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, U.S.A) verwendet. Die Nucleinsäureextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Folgende Änderungen wurden durchgeführt:

Die DNA der Mikroorganismen aus den Boden- und Holzproben wurde durch Einwiegen (PG4 002-5, Mettler Toledo, Gießen) von 200 µg Erdprobe und 50 µg Holzprobe in die Reaktionsgefäße des Kits eingeleitet. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Zell-Homogenisator (FastPrep<sup>®</sup>-24, MP-Biomedicals, Solon, OH, USA) bei 4,5 m s<sup>-1</sup> für 30 sec. Die Zelltrümmer und Bodenpartikel wurden durch einminütige Zentrifugation (Laborfuge M, Heraeus, Hanau) bei Raumtemperatur mit 13.000 rpm entfernt und der Überstand wurde zur DNA-Isolierung eingesetzt. Die DNA wurde in 100 µl sterilem dd H<sub>2</sub>O von den Trennsäulen des Kits eluiert. Da gemeinsam mit der DNA auch noch andere Substanzen, wie Huminstoffe, von der Säule eluiert werden und die enzymatischen Reaktionen im weiteren Verlauf des Versuches beeinträchtigen können (TSAI & OLSON, 1992), wurde die DNA in anschließenden Versuchen 1 : 10 verdünnt eingesetzt.

### **Extraktion von Nukleinsäuren aus bakteriellen Reinkulturen**

Die in den SSCP-Gelen detektierte DNA aus den Bodenproben wurde gegen die DNA bakterieller Reinkulturen abgeglichen, deren Laufeigenschaften im Gel bekannt waren. Alle eingesetzten Reinkulturen (Tab. 6) wurden von der DSMZ bezogen und im Cryo-System (Kap. 2.17.3) gelagert. Für Gram positive und Gram negative Bakterien wurden unterschiedliche, unten aufgeführte Extraktionsverfahren verwendet (KUNTE ET AL., interne Laborvorschrift, nicht veröffentlicht), die ursprünglich auf eine Methode von MARMUR (1961) zurückzuführen waren.

### **Extraktion von Nukleinsäuren aus Gram negativen Bakterien**

Ausgehend von einer Einzelkolonie auf einer Platte mit LB-Medium (Kap. 2.17.2) wurden die Zellen in 10 ml LB-Flüssigmedium inkubiert. Die Zellen aus 3 ml Kultur wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 5.000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau) gewonnen und in 1 ml TES Puffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris-Base, 50 mM NaCl, pH 8) resuspendiert. In einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau) für 3 min wurden die Zellen sedimentiert. Zur Lyse der Zellmembranen wurden die Zellen in 800 µl TES-Puffer aufgenommen und in Anwesenheit von 20 µl 20% Natriumdoecylsulfat (SDS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA aus der entstandenen proteinhaltigen Lösung wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion abgetrennt. Dazu wurde Proben-Lösung in gleichen Volumenanteilen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) (v/v) versetzt und gründlich gemischt. Die organischen und wässrigen Phasen wurden durch 10-minütiges zentrifugieren bei 13.000 rpm getrennt. Die DNA verblieb aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase. Diese Phase wurde so lange vorsichtig abgenommen und

durch Zugabe von Phenol-Chloroform ausgeschüttelt, bis keine Interphase mehr auftrat. Zur Fällung der DNA wurde 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und ein Volumenanteil Isopropanol zugegeben (beides eisgekühlt) und durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau) sedimentiert. Die pelletierte DNA wurde mit 500 µl Ethanol (70 %) mehrfach gewaschen und in einem Thermoblock bei 60 °C (ThermoStat plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) 5 - 10 min getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl EB Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, Qiagen) aufgenommen. Bei gegebenenfalls auftretender hoher Viskosität der entstandenen Lösung, wurde die DNA in EB Puffer soweit verdünnt, bis sie nicht mehr viskos war.

### **Extraktion von Nukleinsäuren aus Gram positiven Zellen**

Um die DNA aus Gram positiven Zellen zu isolieren, wurde das Protokoll für Gram negative Bakterien wie folgt verändert:

Nach der Resuspendierung der Bakterienzellen in 800 µl TES-Puffer wurden 4 mg Lysozym zugegeben und die Probe wurde für 30 min bei 37 °C im Thermoblock (ThermoStat plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl 20 % SDS und 120 µg Proteinase K (Fermentas) zugegeben und die Probe 1 Stunde bei 65 °C im Thermoblock inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch zentrifugieren bei 13.000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau) für 3 min entfernt und die im wässrigen Überstand befindliche DNA wurde durch Zugabe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) (v/v) gereinigt. Alle weiteren Schritte entsprechen dem Protokoll für Gram negative Bakterien.

### **2.19 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die in Kap. 2.18.1 isolierte DNA wurde mit verschiedenen Methoden quantifiziert:

- Quantifizierung durch Photometrie
- Quantifizierung durch Agarose-Gelelektrophorese

### **Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Zur Quantifizierung der DNA, die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus den bakteriellen Reinkulturen isoliert werden konnte (Kap. 2.18.1), wurde eine photometrische Bestimmung mit einem DyNA Quant™ 200 und dem dazu erhältlichen Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) vorgenommen.



Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde mit einem Standard (100 ng/  $\mu$ l  $\lambda$ -DNA) verglichen. Die Ausbeute lag zwischen 20 und 50 ng DNA in 1  $\mu$ l EB-Puffer.

## Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Bestimmung der Menge und Molekülgröße von Nukleinsäuren. Durch die negative Ladung der Phosphatreste wandern Nukleinsäuremoleküle in einem elektrischen Feld zur Anode. Eine Größenauftrennung wird hierbei durch das unterschiedlich schnelle Durchwandern der Proben durch ein Agarosegel (hier 1%) erzielt. Die Nukleinsäuren werden im Verhältnis von 6:1 mit 6 x Ladepuffer (Fermentas) vermischt und für ca. 60 min einem 80 V starken Gleichstromfeld (Biometra Standard Power Pack P 25, Invitrogen, Karlsruhe) in einer Elektrophoresekammer (HORIZON<sup>®</sup> 58, HORIZON<sup>®</sup> 20-25; Invitrogen, Karlsruhe) unterworfen, wobei TB-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA (Titriplex III), pH 8,3) als Laufpuffer verwendet wurde. Um die Molekülgröße- bzw. Molekülkonzentration zu bestimmen, wurden je nach Fragestellung und der Größe der zu untersuchenden Fragmente unterschiedliche DNA-Längenstandards verwendet, die alle von Fermentas bezogen wurden (Tab. 8).

**Tabelle 8:** DNA-Längenstandard

Längenstandards	Messbereich (bp)
GeneRuler™ 100bpDNA Ladder Plus	3000 - 100 bp
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	10000 - 250 bp
Quantifizierungsstandards	
MassRuler™ DNA Ladder, Mix ready to use	10000 - 80 bp
GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range	700 -25 bp
GeneRuler™ DNA Ladder, High Range	48502 - 10171. bp
NoLimits 500bp DNA Fragment	500 bp

Das Gel wurde nach der Trennungphase für 10 min in einer ethidiumbromidhaltigen Lösung (10 mg/L) inkubiert und 10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die DNA konnte durch Anregung des in der DNA interkalierten Etidiumbromids mit UV-Licht (Transilluminator, UVT-Serie, Herolab, Wiesloch) visualisiert werden. Im angeregten Zustand konnte die DNA mit einer DC290 ZOOM (Aufsatz EDAS 290, Kodak, Stuttgart) Fotokamera fotografiert und anschließend mit der Kodak 1D Image Analysis Software am PC ausgewertet werden.

Diese Methode wurde ebenfalls in bei der Aufreinigung von DNA-Molekülen in einem Agarosegel eingesetzt.

## 2.20 Amplifikation ribosomaler DNA mittels PCR

Zur Identifizierung der Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft wurden ribosomale-DNA-Genabschnitte (16S rRNA und 18S rRNA) der aus Erde und Holz isolierten DNA mit der *in vitro* Technik Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert (MULLIS & FALOONA, 1987). Als Oligonuklotidprimer-Bindestellen wurden DNA-Bereiche gewählt, die in den Zielorganismen hochkonserviert vorliegen (Tab. 9). Diese DNA-Sequenzen flankieren variable Sequenzen, die zur phylogenetischen Bestimmung der Organismen herangezogen werden können.

**Tabelle 9:** Verwendete Oligonukleotidprimer (Primer) zur Analyse der Bodenproben und Reinkulturen.

Zielgen	Primerpaar	Sequenz (5'→ 3')	Hybrid. Position in <i>E. coli</i> <sup>1</sup> oder <i>S.cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Referenz
16S rRNA	Com1f	CAGCAGCCGCGGTAATAC	519 →536 <sup>1</sup>	SCHWIEGER & TEBBE, 1998
	Com2-Ph	CCGTCAATTCTTTGAGTTT	907 →926 <sup>1</sup>	SCHWIEGER & TEBBE, 1998
	fD1-FAM <sup>b</sup>	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	9 →27 <sup>1</sup>	WEISBURG ET AL. 1991
	907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	907 →921 <sup>1</sup>	MUYZER ET AL. 1993
18S rRNA	Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 → 20 <sup>1</sup>	DIEZ, ET AL.2001 B
	Euk 516r-Ph <sup>a</sup>	ACCAGACTTGCCCTCC	563 → 548 <sup>1</sup>	DIEZ, ET AL.2001 B

R=A/G; M= A/C

<sup>a</sup> Primer wurden durch eine Phosphatgruppe am 5' Ende modifiziert; <sup>b</sup>Primer wurde durch Fluorescein (FAM) am 5' Ende modifiziert

Die Reaktionsmischung enthielt 2 - 5 ng der jeweiligen Matrizen-DNA, 1 x PCR-Reaktionspuffer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), 50 mM jedes Desoxynukleosid-triphosphates (Fermentas), 0,3 mM jedes Primers (Tab. 10) (MWG-Biotech, Ebersberg) und 2,5 U *Taq*-Polymerase (5-Prime, VWR, Darmstadt). Die Verwendung des Primerpaars EukA1/Euk516rPh erforderte zusätzlich den Einsatz von 5x PCR-Enhancer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) im Reaktionsansatz. Um das Endvolumen von 50 µl zu erreichen, wurde die entsprechende Menge sterilem dd H<sub>2</sub>O zugegeben.

Als Negativkontrolle wurde in einem zusätzlichen Reaktionsansatz 1 µl dd H<sub>2</sub>O anstelle der Matrizen-DNA eingesetzt. Da Inhibitionseffekte durch extrahierte Substanzen, unbekannter Art aus dem Erd-Holzgemisch, auftreten konnten, wurden die Nukleinsäureextrakte 10-fach verdünnt. Für die

Amplifikation des 16S rRNA-Gens aus den bakteriellen Reinkulturen wurden 20 - 40 ng DNA eingesetzt und erfolgte nach folgenden Temperaturprofilen:

**Tabelle 10:** Temperaturprofile der PCR zur Amplifikation der rDNA aus Bodenproben

Zielgen	Primer	PCR/Temperaturprogramm	Zyklusanzahl
Initialdenaturierung		94 °C 120 sec.	Einmalig
16S rRNA	Com1f/Com2-Ph	94 °C 60 sec. 50 °C 45 sec. 68 °C 30 sec.	25
	9f-FAM/907r	94 °C 30 sec. 48 °C 30 sec. 68 °C 45 sec.	28
18 s rRNA	Euk1A/Euk516r-Ph	94 °C 30 sec. 56 °C 45 sec. 68 °C 60 sec.	35
		Finale Elongation	68 °C 300 sec.

Die PCR wurde im Thermocycler (Mastercycler ep gradients, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) durchgeführt. Der Deckel des Thermocyclers hatte während des gesamten Versuchsablaufes eine Temperatur von 105 °C. Um ein vorzeitige Anlagerung der Polymerase an die DNA zu vermeiden, wurde das Enzym erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur, von 94 °C, zugegeben (Hot start). Zusätzlich zu den in Tabelle 10 aufgeführten Schritten, ging jedem PCR-Programm eine Initialdenaturierung voran, abschließend wurde eine Finale Elongation vorgenommen, bevor die Ansätze auf 22 °C abgekühlt wurden. Für eine längere Lagerung wurden die Proben bei -21 °C aufbewahrt und vor jeder weiteren Verwendung im Thermoblock (ThermoStat plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) auf 60 °C für 5 min erwärmt, um die DNA optimal in Lösung zu bringen.

Die PCR-Produkte wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.19) qualitativ und quantitativ überprüft.

## 2.21 Fingerabdruck-Techniken

Die mikrobielle Gemeinschaft im Boden wurde durch kultivierungsunabhängige Verfahren charakterisiert. Die eukaryontische Gemeinschaft im Boden wurde durch die Methode des Einzelstrang Konformation Polymorphismus (SSCP) analysiert, die bakterielle Gemeinschaft durch die Methode des Terminalen Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus (T-RFLP). Beide Methoden werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 2.21.1 SSCP und phylogenetischen Charakterisierung

Die Charakterisierung und phylogenetische Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaft mittels der SSCP-Methode bis hin zur Sequenzierung erfolgte über folgende Schritte:

- SSCP-Gelelektrophoretische Trennung der DNA
- Silbernitratfärbung und Digitalisierung der SSCP-Gele
- Elution und Reamplifizierung der DNA aus dem SSCP-Gel
- Modifikation der PCR zur Reamplifikation von PCR-Produkten aus SSCP-Gelen
- Reinigung der PCR-Produkte nach Reamplifikation durch Gelelektrophorese
- Ligation
- Transformation
- Plasmidisolierung
- Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte und phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten

#### SSCP-Gelelektrophoretische Trennung der DNA

Basierend auf der Diversität der eukaryontischen Gemeinschaft in den Boden-Holzproben resultiert die Amplifikation eines rDNA Genabschnittes (Tab. 11) in einem Gemisch verschiedenster PCR-Produkte. Durch die Methode SSCP konnten diese verschiedenen PCR-Produkte voneinander separiert werden. Ursprünglich wurde diese Methodik zur Detektion von Mutationen verwendet (MYERS ET AL., 1987, ORITA ET AL., 1989) und fand später Einsatz in der mikrobiellen Ökologie (SCHWIEGER & TEBBE, 1998; KLEINSTEUBER, ET AL., 2006). Die SSCP-Technik ermöglicht die elektrophoretische Trennung kurzer (~ 700 bp) DNA-Einzelstränge gleicher Länge in einer MDE (Mutation Detektion Enhancement)-Matrix. Diese Trennung erfolgt aufgrund von Sequenzunterschieden, ausgehend von einem Phosphatrest am 5' Ende des anticodons Stranges. Der Phosphatrest wurde durch die vorangegangene PCR eingeführt. Ein DNA Einzelstrang wurde durch partielle Hydrolyse mit der  $\lambda$  Exonuklease erzeugt (LITTLE, 1967). Die partielle Hydrolyse erfolgte wie in Tabelle 11 beschrieben bei 37°C für 2 h.

**Tabelle 11:** Partielle Hydrolyse der DNA

Reagenzien	Konzentration	Volumen
Gereinigtes PCR-Produkt	250 ng	6 µl
λ- Exonuklease-Puffer	10 x	0,8 µl
λ- Exonuklease	8 U	0,8 µl
Gesamtvolumen		30 µl

Die DNA-Einzelstränge wurden mit dem gleichen Volumen danaturierendem Ladepuffer (Formamid 95%, EDTA 4% und Xylencyanol-Bromphenolblaulösung 1%) für 2 min bei 94 °C inkubiert und anschließend sofort im Eis auf 0 °C abgekühlt. Durch das schnelle Abkühlen bildeten die DNA-Stränge Sekundärstrukturen aus. Durch die Sekundärstrukturen besaßen die DNA-Stränge eine unterschiedlich hohe Mobilität im elektrophoretischen Feld, was der Grund für die Bildung distinkter Banden war. Die Auftrennung der 18S rDNA -Fragmente mittels SSCP wurde in Anlehnung an DOHRMANN & TEBBE (2005) vorgenommen. Die Trennung erfolgte in 0,45 mm starken MDE-Gelen (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) im DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad, Hercules, CA). Die Gele wurden in der Vertikalen zwischen zwei Glasplatten (200 mm x 200 mm 4 mm und 240 mm x 200 mm x 4 mm) gegossen. Durch die Plattengröße wurde eine Trennstrecke von etwa 190 mm erzeugt. Da die Gelmatrix beim Gießen nicht gleichmäßig an der Glasplatte abglitt, was zur Bildung von Lufteinschlüssen im Gel führen kann, wurde die größere der beiden Platten mit einer Schicht Gel Slick® Solution (Cambrex Bio Science Rockland, Inc. ME, USA) überzogen. Dies erleichterte auch das Entfernen des Gels aus der Apparatur nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung. Um die Gel-Matrix zu erzeugen, wurden MDE -Lösung, Wasser und Puffer gründlich gemischt (Tab. 12). Die Gellösung wurde für 1 min im Ultraschallbad (Sonorex Super 10P, Bandelin) bei 100 % Leistung entgast. Die Polymerisationsreaktion erfolgte durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, Roth) als Initiator und Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma) als Katalysator. Das flüssige Gel wurde langsam zwischen die beiden Glasscheiben gespritzt. In die noch flüssige Matrix wurde der Kamm, dessen Taschen nach Polymerisation (2 Stunden bei Raumtemperatur) etwa 18 µl Probenvolumen fassten, positioniert. In Tabelle 12 ist die Zusammensetzung der Gel-Matrix aufgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,7 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer 1x, 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (Titriplex III), Roth, pH 8) verwendet.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der SSCP-Gele

Reagenzien	Volumen
dd H <sub>2</sub> O	13,28 ml
MDE- Lösung*	7,88 ml
TBE- Puffer 10x (pH 8)	1,35 ml
APS	300 µl
TEMED	30 µl

\*Die MDE-Matrix enthält Polyacrylamid und kann als fertiges Produkt bezogen werden.

Vor der elektrophoretischen Trennung der Proben wurde ein Vorlauf wie folgt vorgenommen:

Für den Vorlauf wurden die Taschen wurden mit Ladepuffer gefüllt und bei 200 V, 20 mA und 3 W für 30 min bei 20 °C wurde der Ladepuffer in das Gel einlaufen gelassen. Dieser Ladepuffer behindert den weiteren Ablauf der Gelelektrophorese nicht. Der Vorlauf ermöglichte, die Taschen hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit für Proben zu überprüfen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wurde die elektrische Leitfähigkeit des Puffers auf ein konstantes Maß herabgesetzt.

Für den Hauptlauf wurden in jede Tasche 250 ng DNA gefüllt. Als Längenstandard wurde ein Gemisch aus PCR-Produkten (Com Primer, siehe Tabelle 10) bakterieller Reinkulturen verwendet, dessen Laufverhalten- und Länge im Gel bekannt waren (SCHWIEGER UND TEBBE, 2000). Ein weiterer Marker, der in jedem Gel zur Abschätzung der DNA-Quantität verwendet wurde, stammte aus einer Umweltprobe (Inkubationstag 112, HSM-I-A). Das Muster dieser Umweltprobe war bekannt und reproduzierbar. Die DNA-Einzelstränge im Gel konnten bei einer Laufzeit von 24 Stunden mit konstanten 500 V, 40 mA und 13 W bei 20 °C optimal voneinander getrennt werden.

### Silbernitratfärbung und Digitalisierung der SSCP-Gele

Die DNA im SSCP Gel wurde durch eine Silbernitratfärbung mit dem Roti®-Black N (Roth) Kit, welches nach Herstellerangaben eingesetzt wurde, detektiert. Das Prinzip dieses Kits beruhte auf der Methode von BASSAM ET AL. (1991). Dabei wurde die DNA im Gel durch 10 % Eisessig (Roth) denaturiert, und die DNA konnte so im Gel fixiert werden. Das Gel wurde mehrfach durch einminütiges Schwenken in dd H<sub>2</sub>O gewaschen und im Anschluss in einer Silbernitratlösung inkubiert. Es lagerten sich Ag<sup>+</sup>-Ionen an die DNA an. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd wurden die Ag<sup>+</sup>-Ionen zu elementarem Ag reduziert. Dieses färbte die Stellen im Gel schwarz, an denen DNA vorhanden war. Auf das Trocknen des Gels in einer Lösung bestehend aus Glycerin und Ethanol wurde verzichtet, da der enthaltene Alkohol die im weiteren Verlauf des Versuches vorgesehenen PCR-Reaktionen

inhibierte. Das Gel wurde zwischen den zwei Seiten einer aufgeschnittenen transparenten Klarsichtfolie an der Luft getrocknet und mit einem Scanner (CanonScan D66OU) mit 300 dpi eingescannt. Die SSCP-Bilder wurden mit dem PC-Programm 1D Image Analysis Software von Kodak ausgewertet.

### **Elution und Reamplifizierung der DNA aus dem SSCP-Gel**

Bei der SSCP-Methode besteht die Möglichkeit, die DNA aus dem Gel zurück gewinnen und analysieren zu können (FROST UND GUGGENHEIM, 1999). Einzelne Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus der Matrix herausgeschnitten und für 10 min bei Raumtemperatur in 100 µl Reamplifikationsspuffer (Tris-HCl 20 mM pH 9 (25 °C), KCL 100 mM, Triton X-100 0,2 %) rehydriert. Der Puffer wurde durch 100 µl frischer Puffer ersetzt und die Probe wurde für 90 min bei 94°C inkubiert. Dies führte zu einem Herauslösen der DNA aus dem Gel in den Puffer. Mit dieser Methode wurde die DNA nicht vollständig aus dem Gel heraus gelöst, auch ist die Ausbeute nicht in allen Proben gleich hoch. Daher war es notwendig, die eluierte DNA-Menge durch eine Reamplifikation zu erhöhen.

### **Modifikation der PCR zur Reamplifikation von PCR-Produkten aus SSCP-Gelen**

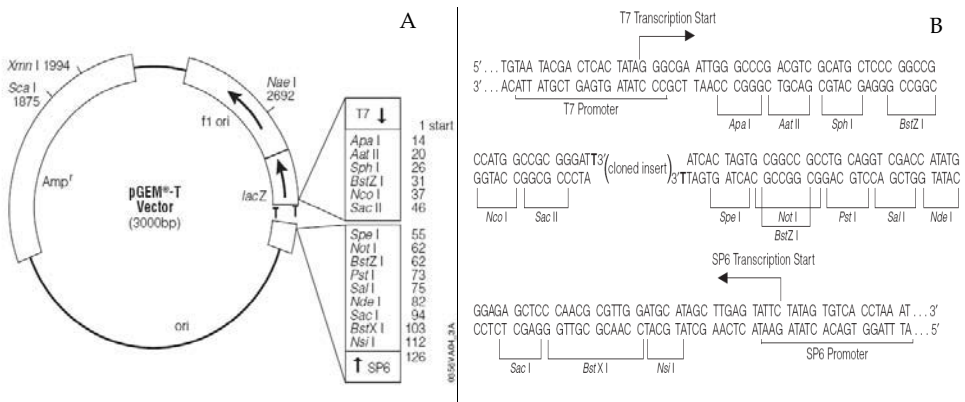
Die Reamplifikation der PCR-Produkte aus SSCP-Gelen erfolgte mit den EukA1 und Euk516r Primern und dem gleichen PCR-Temperaturprofil, mit der auch schon die in der SSCP zu analysierenden Proben erzeugt wurde (Tab. 10). Jedoch wurde die Anzahl der Zyklen von 30 auf 35 erhöht. Um anschließende Klonierungsexperimente zu ermöglichen, wurde der Oligonukleotidprimer Euk516r ohne Phosphorylierung verwendet. Für diese PCR-Reaktionen wurde die aus dem SSCP- Gel gewonnene DNA in sterilem dd H<sub>2</sub>O 1 : 10 (v/v) verdünnt und 5 µl dieser Lösung wurden in die PCR eingesetzt.

## Reinigung der PCR-Produkte nach Reamplifikation durch Gelelektrophorese

Eine Agarosegelelektrophorese wurde durchgeführt, um die Zielfragmente von PCR-Reaktionssubstanzen aufzureinigen. Dazu wird der PCR-Reaktionsansatz vollständig mit dem Speed Vac-concentrator (Savant DNA 120, Thermo Electron corporation) getrocknet und in 15 µl sterilem dd H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der gesamte Ansatz wurde in die Tasche eines 1 % Agarosegels überführt und die Trennung der DNA von den übrigen Substanzen erfolgte wie schon in Kapitel 2.19 beschrieben. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel jedoch nur sehr kurz (max. 5 min) in Ethidiumbromid inkubiert und nur mit 70 % der üblichen Dosis UV - Licht bestrahlt. Diese kurze Bestrahlung ist notwendig, da durch Bestrahlung der DNA mit UV - Licht immer die Möglichkeit besteht, dass Mutationen ausgelöst werden können. Das durch das UV - Licht angeregte Ethidiumbromid ermöglichte die im Gel befindliche DNA der gewünschten Molekülgröße herauszuschneiden. Zur Reinigung und Konzentrierung der DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in 30 µl des im Kit enthaltenen EB-Puffers von den Anionenaustauschersäulen des Kits eluiert.

## Ligation

Die Ligation bezeichnet die Verknüpfung von DNA-Fragmenten über die Ausbildung von Phosphodiester-Brücken. Dieser Vorgang wird durch eine Ligase katalysiert und dient der Verbindung der in Kap. 2.20 erzeugten DNA-Fragmente mit dem DNA-Vektor pGemT (Promega, Mannheim) (Abb. 13A). Die Schnittstelle des Vektors, in den die DNA-Fragmente hinein kloniert worden sind, sind in Abbildung 13 gezeigt.



**Abbildung 13:** A pGemT Vektor Karte mit multipler Schnittstelle für Klonierungsexperimente B Schnittstelle des Vektors für Klonierungsexperimentestellen für Restriktionsenzyme. (Promega)



Zur Ligation der zwei DNA-Fragmente (Vektor-DNA und Insert-DNA) wurden diese wie in Formel 7 aufgeführt eingesetzt. In einem Reaktionsansatz von 10 µl wurden typischerweise 75 - 100 ng Proben-DNA und 25 ng Vektor DNA eingesetzt.

$$Insert [ng] = \frac{Insert [kb] * Vektor [ng]}{Vektor [kb]} * 3 \quad [7]$$

Insert [ng]: Konzentration des mittels PCR (Euk.-Primer Tab. 10) erzeugten DNA-Abschnitts

Insert [kb]: Länge des mittels PCR (Euk.-Primer Tab .10) erzeugten DNA-Abschnitts

Vektor [ng]: Konzentration des pGEM<sup>®</sup>-T Vektors

Vektor [kb]: Länge des pGEM<sup>®</sup>-T Vektors

Der Ligationsansatz bestand aus 1 U DNA-Ligase (aus dem Rapid Ligations-Kit, Promega, Mannheim), 1 x Ligasepuffer sowie der DNA (Vektor und Insert) in einem 10 µl Reaktionsansatz der bei 4 °C für ≥ 12 h inkubiert wurde. Für längere Lagerzeiten wurden die Ligationsansätze bei -21 °C eingefroren.

## Transformation

Durch Transformation kann freie DNA in kompetente Bakterienzellen eingebracht werden (Erzeugung kompetenter Bakterienzellen siehe Kap. 2.17.2 ). Dazu wurden 5 µl des Ligationsansatzes, ca. 50 - 75 ng DNA (siehe vorherigen Abschnitt) und 200 µl kompetente Zellen gemischt und 30 min lang im Eis inkubiert. Als Kontrollen wurde 25 ng Vektor DNA ohne Insert eingesetzt. Nach einem kurzen Hitzeschock für 30 sec. bei 43 °C wurden die Zellen anschließend für 2 min im Eis inkubiert. Zur Regeneration der Zellen nach dem Hitzeschock wurden 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium (Kap. 2.17.2 ) mit 20 mM Glukose), auf 37 °C temperiert, zugegeben. Die Proben wurden maximal eine Stunde horizontal bei 37 °C inkubiert (180 rpm, Innova<sup>®</sup>4230, Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen). Im Anschluss wurden die Zellen auf Selektionsplatten (AB-Medium mit 5% Agar, 10 µl 100 mM IPTG und 50 µl 2 % X-Gal in DMSO (v/v) mit 100 µg/ml Ampicillin (Natriumsalz, Serva) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Sensitivität der kompetenten Zellen gegenüber dem verwendeten Antibiotikum wurde mit nicht transformierten Zellen überprüft. Im Rahmen der Versuche waren auf diesen Platten zu keinem Zeitpunkt Kolonien gewachsen. Auf den Platten, auf denen Zellen mit dem Vektor ohne Insert ausgebracht wurden, wuchsen in der Regel 3 - 5 blaue Kolonien.

Bedingt durch die Verwendung von IPTG und X-Gal im Medium konnte eine Blau/Weiß Selektion (α-Komplementation) der entstandenen Klone erfolgen. Die Methode der α-Komplementation wurde zur

Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung und Transformation eingesetzt. Sie beruht auf dem qualitativen Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Generell sollte die Verwendung des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T diesen Test unnötig machen, da der Vektor desphosphoryliert vorliegt. Die Religation des Vektors ohne Insert sollte daher unmöglich sein. In der Praxis jedoch traten transformierte Zellen auf, die nur den religierten Vektor enthielten.

Der Klonierungsvektor pGem<sup>®</sup> T besitzt eine „Multiple-cloning-site“ (Abb. 13) vor dem  $\beta$ -gal- $\alpha$ -Fragment, während der Rezipientenstamm *E.coli* DH5 $\alpha$  im *lacZ* teildeletiert ist und lediglich über das  $\beta$ -gal- $\omega$ -Fragment verfügt. Nach der Transformation des pGemT wird das LacZ von *E.coli*DH5 $\alpha$  durch die  $\alpha$ -Kette des pGemT komplementiert. Dies führte zu einer blauen Färbung der Kolonien auf einer IPTG/X-Gal-Platte. Nach erfolgter Insertion von Fremd-DNA in die „Multiple-cloning-site“ und damit verbundener Zerstörung des *lacZ* des Vektors, zeigte sich eine weiße Färbung der Kolonien, die diesen Vektor enthalten. Im weiteren Verlauf wurden nur die weißen Kolonien verwendet.

### Plasmidisolierung

Die Zellen aus einer weißen Kolonie wurden in 10 ml AB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Serva) bei 37 °C und 180 rpm über Nacht angezogen (Innova<sup>®</sup>4230, Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen). Die Isolierung des Vektors erfolgte nach Vorschrift des verwendeten Kits QIAprep<sup>®</sup>spinMiniprep Kit (Qiagen, Hilden). Die DNA wurde im Anschluss in einem 1 % Agarosegel gereinigt und quantifiziert. Der Abgleich erfolgte gegen den MassRuler Ladder Mix (Tab. 8). Die DNA wurde ohne weitere Schritte in die anschließende Cycling-Reaktion eingesetzt.

### Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte und phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf einer linearen Amplifikation der DNA (SANGER ET AL. 1977), dem Kettenabbruch-Verfahren. Durch den unidirektionalen Einbau von vier unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotid-Triphosphaten in einer PCR-Reaktion (Cycling-Reaktion) wurden statistisch verteilte Strangbrüche im neu synthetisierten Strang erzeugt. Hierfür wurde das BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit<sup>™</sup> (3.1) (Applied Biosystems) verwendet. Die Cycling-Reaktion enthielt neben 150 - 300 ng Vector-DNA (max. 6  $\mu$ l), 5 pmol des M13f (Tab. 13) Primers, 1  $\mu$ l des dem Kit beiliegenden 5-fach konzentrierten Puffers, sowie 2  $\mu$ l des Ready Reaction Mixes. Das Endvolumen von 10  $\mu$ l wurde durch die Zugabe von sterilem dd H<sub>2</sub>O erreicht. Die Cycling-Reaktion erfolgte mit dem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen), wie in Tabelle 13 beschrieben.

**Tabelle 13:** Parameter der Cycling-Reaktion

Zielgen	Primer	Sequenz 5'→ 3'	PCR/Temperaturprogramm	Zyklenanzahl
pGem-Vektor	M13f	GTA AAA CGA CCG CCA G	96 °C 60 sec.	1
			96 °C 10 sec.	25
			52 °C 5 sec.	
			60 °C 240 sec.	
			4 °C	bis zum Einsatz

Mit dem Ampure CleanSeq Kit (Agencourt, Beckmann Coulter) wurden die Cycling-Produkte von überschüssigen Oligonukleotiden und Dye-Terminatoren nach Angaben des Herstellers befreit. Die DNA wurde unter Vakuum (Savant DNA 120, Thermo Electron corporation, Hamburg) vollständig dehydriert und in 10 µl sterilem dd H<sub>2</sub>O und 10 µl Formamide (Applied Biosystems) aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente sowie deren Zuordnung zu den DNA-Basen erfolgte im Genetic-Analyzer 3130 (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen (Tab. 14).

**Tabelle 14:** Sequenzierungsbedingungen

Parameter	Regelkenngroße
Ofentemperatur	60 °C
Volumen des Polymers	4840 Schritte
Stabilität	5,0 uAmps
Vorlaufspannung	15 kV
Vorlaufzeit	180 sek
Injektionsspannung	1,2 kV
Injektionszeit	12 sek
Spannungsschritte	30 nK
Spannungsschritt Intervall	15 sek
Beginn Datensammlung	120 sek
Laufspannung	8,5 kV
Lauflänge	2780 sek

Die DNA-Sequenzdaten wurden mit dem PC-Programm Chromas, Version 2.3 (Technelysium, Eden Prairie, MN, U.S.A) ausgewertet. Hiermit konnten Abschnitte aus der Sequenz entfernt werden, die durch den Primer generiert wurden und es konnten Fehler in der Sequenz manuell behoben werden. Zur Identifizierung der Mikroorganismen wurden die DNA-Sequenzen durch einen Abgleich mit der

NCBI (= National Center for Biotechnology Information) Datenbank BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Stand November 2008) mit den DNA-Sequenzen bekannter Organismen verglichen (ALTSCHUL ET AL., 1990).

### 2.21.2 T-RFLP

Diese kultivierungsunabhängige Methode erlaubt die Untersuchung komplexer mikrobieller Gemeinschaften aus verschiedensten Habitaten (LIU ET AL., 1997). Es wurde eine PCR durchgeführt, durch die DNA-Fragmente erzeugt wurden, an deren 5'-Enden durch einen speziellen 6-carboxyfluorescein (FAM) markierten Vorwärts-Primer 9f\* eine Fluoreszenzmarkierung eingeführt worden ist (Tab. 10). Als Reverse-Primer wurde der unmarkierte 907r verwendet. Durch die Hydrolyse dieser PCR-Produkte mit dem Enzym *MspI* (Fermentas) konnten Sequenz spezifisch unterschiedlich lange terminale Restriktionsfragmente erzeugt werden. Das Enzym *MspI* hydrolysiert die DNA bei der Erkennungssequenz C↑CGG. Jeder Restriktionsansatz enthielt ca. 100 ng gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Puffer 10x (Puffer 2, New England Biolabs, Frankfurt am Main) und 10 U des Restriktionsenzym. Das Endvolumen von 10 µl wurde durch steriles dd H<sub>2</sub>O eingestellt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C im Thermoblock (ThermoStat plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) inkubiert. Von den Restriktionsansätzen wurden 3 µl mit 10 µl Formamide, 0,15 µl des Längenstandards MapMarker und 0,15 µl des Farbstoffes Tracking Dye (Bioventures, Murfreesboro, U.S.A) gemischt und 2 min bei 95 °C im Thermocycler (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) denaturiert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Die T-RFLP Laufbedingungen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 15:** T-RFLP Bedingungen für die Kapillarelektrophorese

Parameter	Regelkennggröße
Ofentemperatur	50 °C
Volumen des Polymers	6500 Schritte
Stabilität	5,0 uAmps
Vorlaufspannung	15 kV
Vorlaufzeit	180 sek
Injektionsspannung	3,0 kV
Injektionszeit	23 sek
Spannungsschritte	20 nk
Spannungsschritt Intervall	20 sek
Beginn Datensammlung	60 sek
Laufspannung	7,5 kV
Lauflänge	4800 sek

Die entstandenen T-RFs wurden durch eine Kapillarelektrophorese (Sequenzierer, 3130 Genetic-Analyzer, Applied Biosystems) in Abhängigkeit zu ihrer Länge getrennt und die Fluoreszenzsignale wurden von einem Laser detektiert und quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der Gene Mapper® Software, Version 4.0 (Applied Biosystems). Der eingesetzte Längenstandard (Map Marker) ermöglichte durch eine lineare Regression innerhalb der Genmapper 4.0 Software, die Berechnung der T-RF Längen. Die Fragmente wurden durch die Integrierung des Fluoreszenzsignals eines Fragmentes (ausgedrückt durch die Fläche der jeweiligen T-RFs) quantifiziert. Kurze T-RFs mit einer Länge von weniger als 50 bp wurden von weiteren Analysen grundsätzlich ausgeschlossen, da es in diesem Bereich zu Überlagerungen mit unspezifischen, doppelsträngigen Nebenprodukten, wie z.B. den Oligonukleotidprimerdimeren, kommen kann. Es wurden alle T-RFs zu einem T-RF zusammengefasst, die sich  $\pm 0,5$  bp voneinander unterschieden. Da die Bestimmung der T-RFs ab einer Länge von ca. 800 bp messtechnisch nicht mehr mit hinreichender Genauigkeit erfolgen konnte, wurden ab dieser T-RF-Länge alle T-RFs zusammengefasst, die sich durch  $\pm 1$  bp voneinander unterschieden.

## 2.22 Statistische Auswertung der generierten Daten

### 2.22.1 Der Zweistichproben t-Test

Dieser Test wurde eingesetzt um zu überprüfen, ob sich zwei Stichprobenmengen signifikant voneinander unterscheiden. Anhand der Mittelwerte zweier Stichproben prüft der Zweistichproben t-Test, ob die Erwartungswerte zweier Grundgesamtheiten kleiner oder größer sind. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Stichproben normalverteilt (Verteilung nach Gauß) sind. Es wurde ein Signifikanzniveau von ( $p < 0,05$ ) festgelegt. Es kann daher mit einer Konfidenz von 95% festgestellt werden, dass die Mittelwerte zweier Stichproben signifikant unterschiedlich sind. Zur Darstellung der Signifikanzniveaus werden diese in Form von Großbuchstaben dargestellt. Testansätze mit gleichen Großbuchstaben werden demnach als signifikant gleich definiert.

### 2.22.2 Korrespondenzanalyse und Monte-Carlo Permutationstest

Die generierten Daten über die mikrobiellen Gemeinschaften aus den SSCP und T-RFLP Experimenten wurden durch Korrespondenz-Analysen (KA) analysiert. Die KA ermöglicht einen Vergleich der relativen Bandenintensitäten im SSCP-Gel (Kap. 2.22.3 ) miteinander. Für T-RFLP-Analysen wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen T-RFs (Kap. 2.22.4 ) miteinander verglichen. Eine statistische Auswertung der Daten mittels KA lässt Aussagen zur Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft im Bezug zur Behandlung mit unterschiedlichen HSMs im Laufe der Inkubationszeit zu. Die Varianz eines multivariaten Datensatzes wurde durch die KA in einem zweidimensionalen Raum abstrahiert. Je kürzer die Distanz zweier Punkte zueinander in diesem System, desto ähnlicher sind die analysierten Fingerabdruckmuster in ihrer relativen Abundanz und Zusammensetzung. Die Ordination wurde durch das Programm CANOCO (Version 4, Microcomputer Power Inc., Ithaca, USA) bestimmt (TER BRAAK & ŠMILAUER, 1998). Die Ergebnisse der KA wurden mit Hilfe des PC-Programms Origin (Version 8 Pro, OriginLap. Corp., Northampton U.S.A.) visualisiert.

Zusätzlich wurden bei dem T-RFLP Datensatz die Signifikanz der Faktoren Inkubationszeit und Einfluss des HSMs auf die Struktur der T-RFLP-Muster mittels eines Monte-Carlo-Permutationstest mit 9999 Permutationen bestimmt. Zur unabhängigen Analyse voneinander fungierte der jeweils andere Faktor als Co-Variable. Für die Berechnung des Faktors Inkubationszeit wurde der Faktor HSM als Co-Variable eingesetzt und für die Berechnung des Faktors HSM entsprechend der Faktor Inkubationszeit.

Bei diesem statistischen Verfahren wird ein Faktor, konstant behalten während der andere Faktor

zufällig permutiert wird. Die Auswertung erfolgt über den Vergleich der errechneten mit den realen Unterschieden der Mittelwerte. Die Frage nach der Signifikanz dieses Unterschieds entspricht der Frage, ob der reale Wert innerhalb des Bereichs liegt, in den 95 % aller berechneten Werte fallen (LEYER & WELSCH, 2007). Wenn die Mehrzahl (95 %) der zufällig errechneten Wertepaare geringere Unterschiede als die realen Wertepaare zeigen, so sind die realen Wertepaare signifikant unterschiedlich. Diese Art der Teststatistik eignet sich zur Berechnung von komplexen Datensätzen in der multivariaten Statistik (LEYER & WELSCH, 2007) und wurde bereits von NOLL, 2004 zur Berechnung von T-RFLP-Datensätzen verwendet.

### 2.22.3 Charakterisierung der im SSCP-Gel visualisierten Banden

Die im SSCP-Gel visualisierten Banden wurden aufgrund ihrer Lage, bezogen auf den Längenstandard (aus bakteriellen Reinkulturen) und ihrer Intensität, bezogen auf die bekannte Umweltprobe charakterisiert. Zur Analyse wurde die Intensität der OTUs aus der Bodenprobe von „0“ bis „3“ bewertet. Wobei die „0“ vergeben wurde, wenn das OTU abwesend war, die „1“ bei nicht dominanten OTUs mit einer Intensität der Bande im SSCP-Gel zwischen 0,5 und 11. Die „2“ wurde bei dominanten OTUs mit einer Bandenintensität zwischen 11,1 und 30 vergeben. Die „3“ wurde bei sehr dominanten OTUs mit einer Intensität zwischen 31 und 60 vergeben. Ein Datenpunkt im Ordinatensystem wurde durch alle Versuchsansätze der Probenreihe generiert. In die Auswertung gingen die Daten der Gele von Tag 0, 7, 14, 112 und 448 ein. Insgesamt wurden zu diesen 5 Zeitpunkten aus den 5 verschiedenen Behandlungsweisen (Tab. 4) und 5 unabhängigen Versuchsansätzen (5\*5) 125 Profile analysiert.

### 2.22.4 Analyse der Terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs)

Die Charakterisierung der T-RFs erfolgte aufgrund der Prä- und Absenz der einzelnen Peaks bzw. der Abundanz (Peakhöhe). Vor der statistischen Analyse der Daten wurde die vorläufige relative Abundanz der TR-Fs (rA) in Prozent mit folgender Formel [8] berechnet:

$$rA = \frac{n_i}{N} * 100 \quad [8]$$

rA: relative Abundanz; n: Peakhöhe des i-ten TR-Fs; N: Summe aller T-RF Peakhöhen

Alle TR-Fs unter 1 % (Dauerrauschen) der relativen Abundanz wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Für die verbliebenen T-RFs wurde die relative Abundanz durch Formel [8] neu generiert. In die Auswertung der TR-Fs gingen die Tage 0, 1, 3, 14, 224 und Tag 448 mit ein. Insgesamt wurden zu diesen 6 Zeitpunkten, 5 Behandlungsweisen (Tab. 4) und 5 unabhängigen Versuchsansätzen ( $6 \cdot 5 \cdot 5$ ) 150 Profile analysiert.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung von chemischen- und physikalischen Bodenparametern

Die chemischen und physikalischen Beschaffenheiten eines Bodens haben maßgeblichen Einfluss auf die im Boden lebenden Organismen (SCHEFFER & SCHACHTENSCHNABEL, 2002). Die Mikroorganismen wiederum sind durch ihre Ab- und Umbauprozesse maßgeblich an der Bildung des Bodens beteiligt (GISI ET AL., 1997). Zur Charakterisierung der Bodeneigenschaften (Kap. 2.5), wurden chemische und physikalische Parameter ermittelt. Die Textur des Bodens wurde unter Verwendung der in der bodenkundlichen Kartieranleitung (1994) angegebenen Referenzkorngrößen vorgenommen (Tab. 16).

**Tabelle 16:** Textur des Bodens

Fraktion	Korngrößen	Anteil am Boden
Kies	2,00 – 6,30 mm	0,07 [%]
Grobsand	0,63 – 2,00 mm	5,05 [%]
Mittelsand	0,20 – 0,63 mm	40,90 [%]
Feinsand	0,06 – 0,20 mm	34,51 [%]
Schluff, Ton	< 0,06 mm	19,47 [%]
Korndichte	2,62 g/cm <sup>3</sup>	

Der größte Anteil des Bodens hatte eine Korngröße unterhalb von 0,2 mm. Die Fraktionen Schluff und Ton wurden nicht getrennt betrachtet und waren insgesamt mit 19,47 % im Boden zu finden. Der Boden ließ sich als schwach grobsandiger (gS), schluffiger (u), stark feinsandiger (fS), Mittelsand (mS) einstufen. Die Fähigkeit des Bodens, Wasser zu speichern, ist abhängig von dem Volumen der Poren und wird durch die Wasserhaltekapazität (WHK) angegeben (Tab. 17).

**Tabelle 17:** Wasserhaltekapazität (WHK)

Boden	WHK [%]
Boden aus dem Hostwalde Testgelände	13 [%]
Vermikulit	414 [%]
Gemisch: Natürlicher Boden* mit Vermikulit (6:1) (v/v)	178 [%]
Gemisch: Natürlicher Boden* mit Vermikulit (5:1) (v/v)	185 [%]
Gemisch: Natürlicher Boden* mit Vermikulit (4:1) (v/v)	194 [%]

\* Bezogen auf die Trockenmasse des Bodens, Boden aus dem Hostwalde Testgelände

Der verwendete Boden des Horstwalde Testfeldes besaß durch seinen hohen Gehalt an Sand und der damit verbundenen Korndichte (Tab. 16) eine geringe Wasserhaltekapazität von 13 % des Gewichtes der Trockenmasse (Tab. 17). Durch die Beimischung von Vermikulit das eine WHK von 414 % besitzt, wurde die WHK des hergestellten Bodens auf 185 % (5 : 1) (v/v) eingestellt.

Um die Textur des Boden so natürlich wie möglich zu erhalten, wurde die minimale Menge an Vermikulit zugegeben (5 : 1). Ein Mischverhältnis von 6 : 1 erlaubte es nicht, einen gravimetrischen Wassergehalt von 50 % einzustellen. Zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung des Bodens wurden einige organische und anorganische Parameter sowie der pH-Wert ermittelt (Tab. 18).

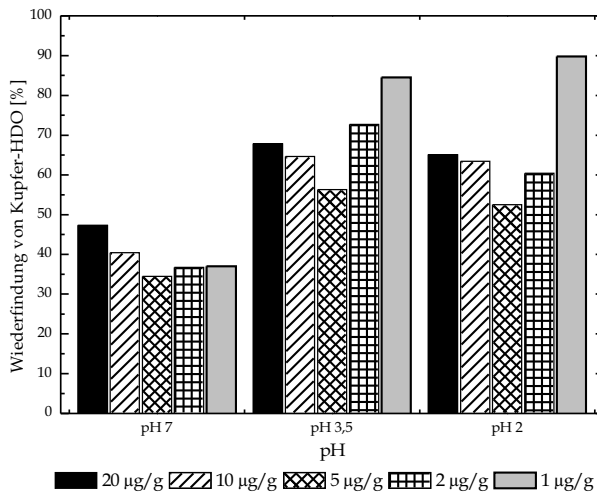
**Tabelle 18:** Organische und anorganische Bodenparameter und pH-Wert

Parameter	Anteil im Boden
pH	7,34
Organische Bestandteile#	1,230 [%]
TC	0,667 [%]
N	0,059 [%]
TC/N (Verhältnis)	11,3
S	0,022 [%]
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0,300 [%]*

\* Gewichtsprozent; # Glühverlust; TC= Organischer Kohlenstoff;  
N= Stickstoff S= Schwefel, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> = Karbonat

Der pH-Wert im Boden beeinflusst die chemischen, physikalischen und biologischen Parameter des Bodens (SCHEFFER & SCHACHTENSCHNABEL, 2002; GISI ET AL., 1997). Für den Boden wurde ein pH-Wert im neutralen Bereich von ca. 7,3 ermittelt. Der eingesetzte Boden wies ein TC/N-Verhältnis von 11,3 auf und besaß mit 0,667 (%) nur sehr geringe Mengen an organischem Kohlenstoff. Der Anteil an Huminstoffen, gemessen am Verhältnis von C zu N, beeinflusst die Extrahierbarkeit von Nukleinsäuren aus dem Boden (TSAI & OLSON, 1992) und eventuell auch von anderen organischen Substanzen, wie z.B. HDO und dessen Abbauprodukte.

Es war daher notwendig, die Extraktionsmethode zur Gewinnung von HDO aus dem Boden anzupassen, um eine höchstmögliche Extraktionsrate des Biozids aus dem Boden zu erzielen. Die exakte Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde mit Kupfer-HDO-Standard (Firma Dr. Wolman GmbH, Sinzheim) verschiedener Konzentrationen (20 µg/g; 10 µg/g; 5 µg/g; 2 µg/g; 1 µg/g) im Boden (Feuchtgewicht) durchgeführt. Zu Beginn wurde die Bodensuspension (in der Extraktions-Lösung) von einem ursprünglichen pH-Wert von pH 7 auf pH 3,5 respektive pH 2 eingestellt, mit dem in Kapitel 2.12.1 beschriebenen Extraktionsverfahren extrahiert und mittels HPLC gemessen (Abb. 14).



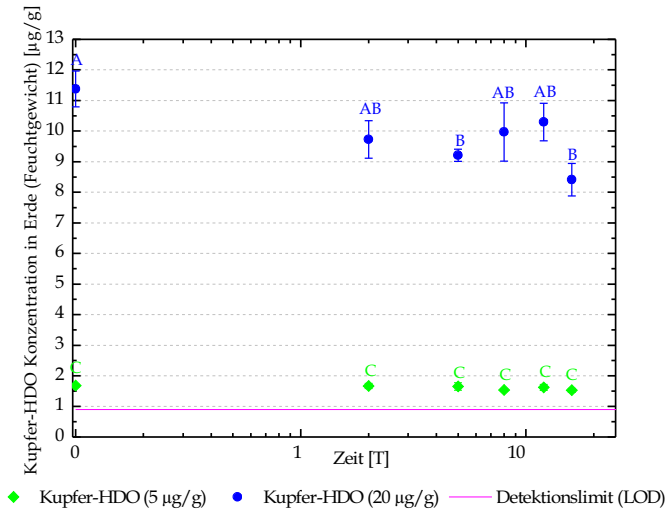
**Abbildung 14:** Wiederfindungsrate des Kupfer-HDOs im Boden mit verschiedenen pH-Werten der Extrakte. Die Konzentration des Kupfer-HDOs bezieht sich auf Gramm Feuchtgewicht. Es wurden pro Biozid-Konzentration 2 unabhängige Versuchsansätze analysiert. Die Messung erfolgte mittels HPLC (Kap. 2.12.1 ).

Unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Kupfer-HDOs konnte durch Absenken des pH-Wertes von pH 7 auf pH 3,5 die Wiederfindungsrate von durchschnittlich ca. 40 % auf 70 % im Mittel aller Proben erhöht werden (Abb. 14). Die weitere Absenkung des pH-Wertes auf pH 2 zeigte hingegen keine signifikante Verbesserung, mit Ausnahme der Proben mit 1 µg/g Kupfer-HDO, der Biozid-Wiederfindung. Es konnten in diesen Proben im Mittel insgesamt 66 % des eingebrachten Biozids detektiert werden. Für alle Versuchsansätze zur Extraktion von Kupfer-HDO aus Boden wurde ein pH-Wert von 3,5 in den Extraktions-Lösungen verwendet.

### 3.1.1 Stabilität von Kupfer-HDO im Boden

Um beim Zerfallsprozess des Kupfer-HDOs im Boden zwischen chemischen und mikrobiellen Prozessen unterscheiden zu können, wurden sterile Bodenansätze (Kap. 2.5 ) mit einem pH-Wert von 3,5 in den Extraktionansätzen verwendet. Es war bekannt, dass das Kupfer-HDO unter sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 5$ ) nicht stabil ist und chemisch, ohne die Einwirkung von Organismen, zerfällt (Studie Dr. Wolman GmbH, nicht veröffentlicht). Das Biozid wurde in den Konzentrationen 5 µg/g und 20 µg/g über einen Zeitraum von 16 Tagen in sterilem Boden (Feuchtgewicht) unter denen in Kapitel

2.10.2 angegebenen Bedingungen inkubiert. In den Testansätzen mit 5 µg/g konnte über die Zeit keine signifikante Reduktion der Kupfer-HDO-Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Kupfer-HDO-Konzentration nach Inkubation des Biozids in sterilem Boden über die Inkubationszeit von 16 Tagen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze. Statistische Auswertung durch einen t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %, dargestellt als Großbuchstaben.

In den Testansätzen 20 µg/g streuten die Messwerte in einem breiten Bereich. Jedoch war auch nach 16 Tagen keine Tendenz zu erkennen, dass die Kupfer-HDO-Konzentration abgenommen hatte.

Als Ergebnis wurde festgestellt, dass das Kupfer-HDO-Molekül, gemessen an der HDO-Konzentration, in sterilem Boden stabil ist. Zur Untersuchung des biologischen Abbaus von Kupfer-HDO wurde der Abbau dieses Biozids in 3 verschiedenen Testansätzen verfolgt (Kap. 3.2).

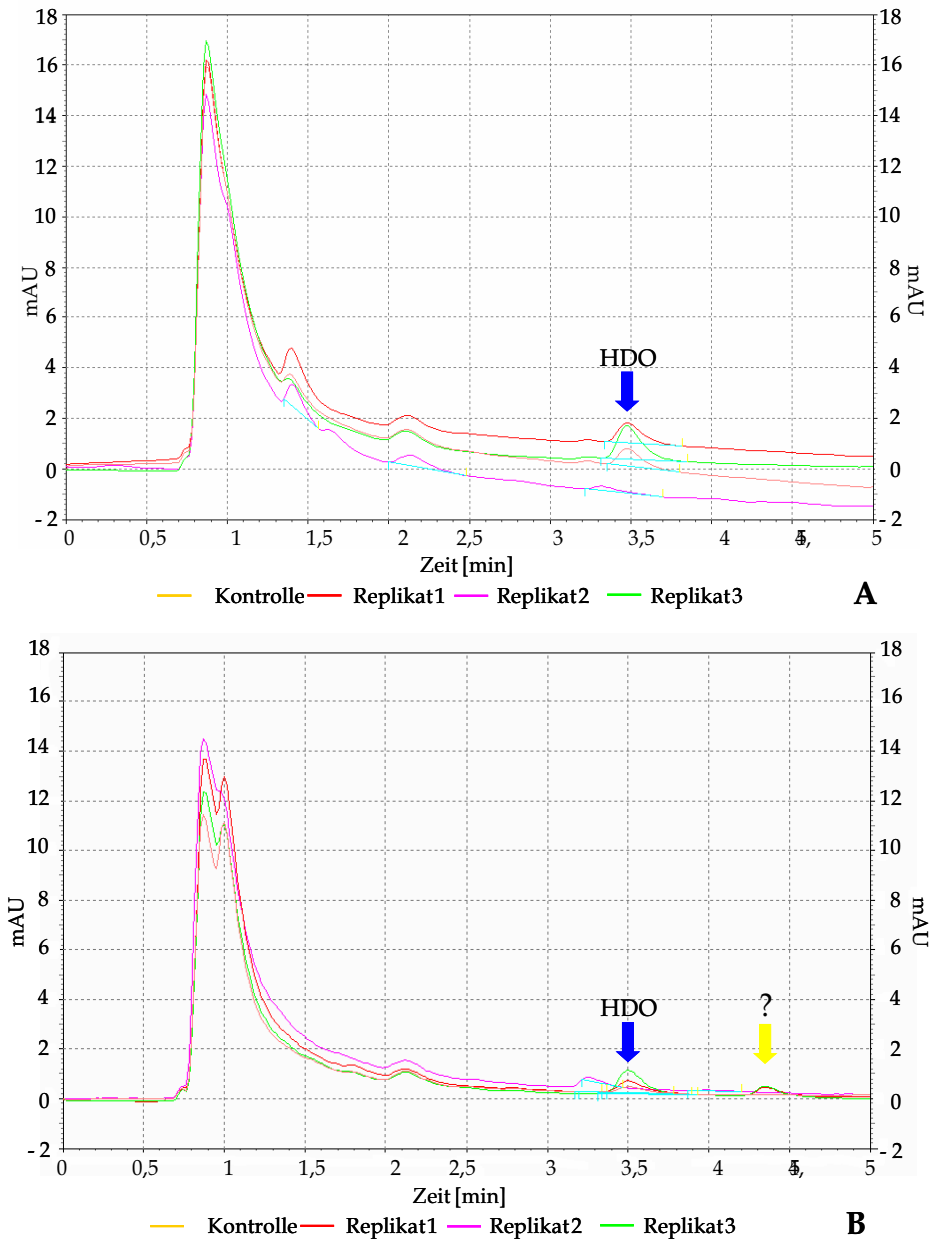
### 3.2 Testansätze mit Kupfer-HDO

Ein geringer Teil jedes Biozids, das den Witterungen ausgesetzt ist, gelangt durch Auswaschung aus dem behandelten Holz in die Umwelt, z.B. in den Boden. Die Größenordnung, in der dies erfolgen kann, ist von diversen Faktoren abhängig, u. a. dem Löslichkeitsprodukt des Biozides in Wasser. Kupfer-HDO besitzt eine Löslichkeit von 10 µg/ml Wasser (GÖTTSCHE & MARX, 1989). In diesen Testansätzen wurde mit reinem Kupfer-HDO (99,99 % Reinheit) der Konzentrationen 5 µg/g (B-I-13) mit <sup>13</sup>C, 20 µg/g (B-h-13) mit <sup>13</sup>C, 20 µg/g (B-I-12) mit <sup>12</sup>C gearbeitet. Als Kontrolle wurde

unbehandelter Boden verwendet (Tab. 2). Es wurde mit 5 µg/g eine Biozid-Konzentration gewählt, die durch den natürlichen Ausschwemmprozess in den Boden gelangen kann (ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES, EVALUATION ON Cu-HDO, 2005), und eine mit 20 µg/g eine 4-fach erhöhte Konzentration, um eine Akkumulation des Biozids im Boden zu simulieren. Um zu klären, ob die Isotopie der Kohlenstoffatome im Biozidmolekül einen Effekt auf den Abbau des Biozids hatte, wurde <sup>12</sup>C-Kupfer-HDO und <sup>13</sup>C-Kupfer-HDO verwendet.

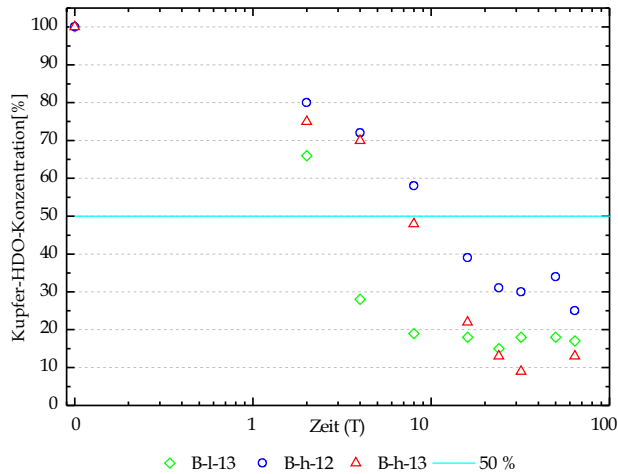
### 3.2.1 Konzentration des Kupfer-HDOs im Boden

Die Analyse der Kupfer-HDO-Konzentration über die Zeit in einem mit Mikroorganismen besiedelten Boden sollte zeigen, ob Kupfer-HDO im Boden persistiert, oder ob die Konzentration über die Zeit reduziert wird. Der HDO Anteil des Kupfer-HDOs wurde extrahiert (Kap . 3.1 ) und mittels HPLC quantifiziert. Dies ist exemplarisch in Abbildung 16 A und 16 B dargestellt. In allen Testansätzen, in denen Kupfer-HDO eingesetzt wurde, konnte nach 3,5 min in den Chromatogrammen ein Maximum nachgewiesen werden (blaue Pfeile), welches durch den Abgleich mit einem Standard als HDO identifiziert werden konnte. Die Fläche dieses Maximums nahm in allen Testansätzen über die Zeit ab (Abb. 16). Zusätzlich war die Prä- und Absenz von Maxima zu anderen Retentionszeiten in den Chromatogrammen auszumachen (Abb. 16B, gelber Pfeil). Dies Maxima waren von der Isotopie der Kohlenstoffatome im Biozidmolekül unabhängig und trat in allen Testansätzen mit Kupfer-HDO ab dem 32. Inkubationstag auf. Welche Substanz dieses zusätzliche Maxima erzeugte, war nicht bekannt. Im Laufe der Inkubationszeiten traten noch weitere Maxima auf. Da diese auch in Chromatogrammen der Kontrollen auftraten, waren sie somit Wirkstoffunspezifisch und wurden in der Auswertung nicht näher charakterisiert. Ein Abgleich mit den Substanzen Cyclohexanon, Cyclohexanon-oxim und Cyclohexanol als Standards, die als potentielle Abbauprodukte des HDOs möglich wären, da sie strukturelle Ähnlichkeiten zum HDO besaßen, zeigten keine Übereinstimmungen der Retentionszeiten.



**Abbildung 16:** Chromatogramme der Bodenextrakte aus den Testansätzen mit B-h-12, in mAU (milli absorption units) pro Minute, generiert durch HPLC-Messung **A** Inkubationstag 16 **B** Inkubationstag 64. Die grüne-, rote- und magentafarbende Kurve zeigen die drei unabhängigen Versuchsansätze, die Kontrolle wird durch die orange Kurve dargestellt. Die **blauen Pfeile** zeigen den Peak, der durch Kupfer-HDO erzeugt wurde, dies konnte durch den Abgleich gegen Kupfer-HDO-Standard bestätigt werden. Der **gelbe Pfeil** zeigt eine unbekannte Substanz, die in Testansätzen mit Kupfer-HDO ab dem Inkubationstag 32 detektiert werden konnte.





**Abbildung 18:** Prozentuale Kupfer-HDO-Konzentration nach Inkubation in aktivem Boden über 85 Tage. Die Kupfer-HDO-Konzentration des jeweiligen Testansatzes wurde prozentual in Abhängigkeit zur Ausgangskonzentration von 100 % gesetzt.

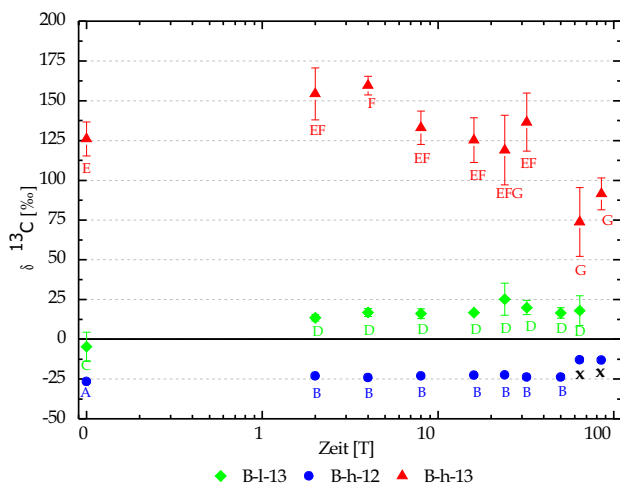
Beide Testansätze zeigten dennoch einen zeitlich ähnlichen Abbau des Biozids. Die Konzentration des Kupfer-HDOs in den Testansätzen mit B-h-12 war nach 85 Tagen  $> 0,9 \mu\text{g/g}$ , in den Testansätzen mit B-h-13 war die Kupfer-HDO-Konzentration nach 24 Tagen unter das Detektionslimit (LOD) von  $0,9 \mu\text{g/g}$  reduziert. Das LOD wurde definiert als dreifach erhöhter Wert des Grundrauschens. In den Kontrollen konnte kein Kupfer-HDO nachgewiesen werden, demnach war im Boden kein Kupfer-HDO vorhanden.

Zur Berechnung der Halbwertszeit des Kupfer-HDOs im Boden wurden die Abbauraten als prozentuale Funktion zur jeweiligen Ausgangskonzentration gesetzt (Abb. 18). Die Kupfer-HDO-Konzentration in den Testansätzen mit B-l-13 hatte eine Halbwertszeit zwischen 4 - 8 Tagen, die der Testansätze mit B-h-12 zwischen ca. 8 - 16 Tagen, und in den Testansätzen mit B-h-13 lag die Halbwertszeit bei ca. 8 Tagen.



### 3.2.2 Veränderungen des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Boden

Analysen zum Verbleib des Biozids im Boden mittels HPLC zeigten eine signifikante Reduktion des HDO-Moleküls nach 48 Stunden der Inkubation im Boden (Kap. 3.2.1). Der Verbleib von Bestandteilen des HDOs wurde durch den  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Boden bestimmt (Abb. 19)



**Abbildung 19:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Boden über die Inkubationszeit von 85 Tagen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze und 2 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 % dargestellt in Großbuchstaben. Probenreihen die mit einem X gekennzeichnet sind, wurden aus Mangel an ausreichendem Strichprobenumfang nicht zur statistischen Auswertung herangezogen.

Die Testansätze mit B-h-12 besaßen im Boden einen über die Zeit signifikant konstanten  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Bereich zwischen -26 ‰ und -10 ‰. Einen ähnlichen Trend zeigten auch die Testansätze mit B-l-13, bei denen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert signifikant erhöht war und zwischen +5 ‰ und +25 ‰ betrug. Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in Testansätzen mit B-h-13 nahm nach etwa 64 Tagen der Inkubation im Boden signifikant ab.

### 3.2.3 Auswirkungen von Kupfer-HDO auf die Respirationsaktivität des Bodens

Die mikrobielle Respirationsaktivität von allen Testansätzen mit Kupfer-HDO im Boden wurde durch  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsbestimmungen über die Inkubationszeit ermittelt. Zur Darstellung und zur Berechnung der charakteristischen Phasen (Lag-Phasen, Maxima und Steigungen der Atmungskurven)

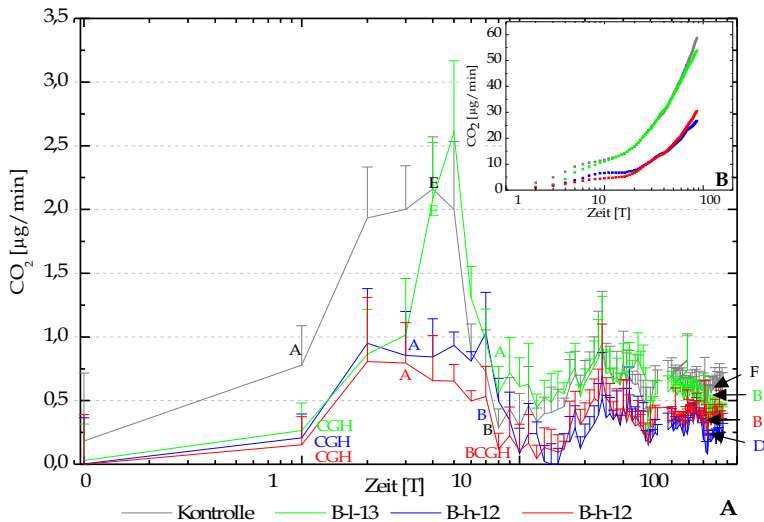
wurde das arithmetische Tagesmittel der CO<sub>2</sub>-Konzentrationen verwendet (Tab. 19).

**Tabelle 19:** Charakteristische Phasen der Bodenatmung

	Kupfer-HDO			
	Kontrolle	B-h-12	B-l-13	B-h-13
Lag-Phase (Tage)	1	1	1	1
Maximum (Tage)	3	2	4	2
Steigung * (Wachstumsrate)	1,15	0,74	2,34	0,65

\*Die Steigung wurde aus einer Grafik ermittelt, in der die Daten in einem Koordinatensystem mit logarithmischer Ordinate und linearer Abszisse aufgetragen und berechnet wurden (Grafik nicht gezeigt).

Die Lag-Phase war in den unterschiedlichen Testansätze signifikant gleich lang, während das Maximum der CO<sub>2</sub>-Abgabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte (Tab.19). Zusätzlich war anhand der Steigung während der exponentiellen Phase der CO<sub>2</sub> Abgabe zu erkennen, dass die Organismen in den unterschiedlichen Testansätzen mit verschiedenen Wachstumsraten, (WILKE & WINKEL, 1999), auf die Zugabe des Biozids reagierten.



**Abbildung 20:** A Quantitative CO<sub>2</sub> Abgabe eines mit Kupfer-HDO respektive mit H<sub>2</sub>O dotierten Bodens in 4 unabhängige Versuchsansätzen und mit 17 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes. Statistische Auswertung der CO<sub>2</sub>-Abgabe der Böden der 4 repräsentativen Inkubationstage, Tag 0, 4, 9 & 85 erfolgte mittels eines t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 % dargestellt in Großbuchstaben. B Kumulative CO<sub>2</sub>-Abgabe über die Zeit in µg/Tag.

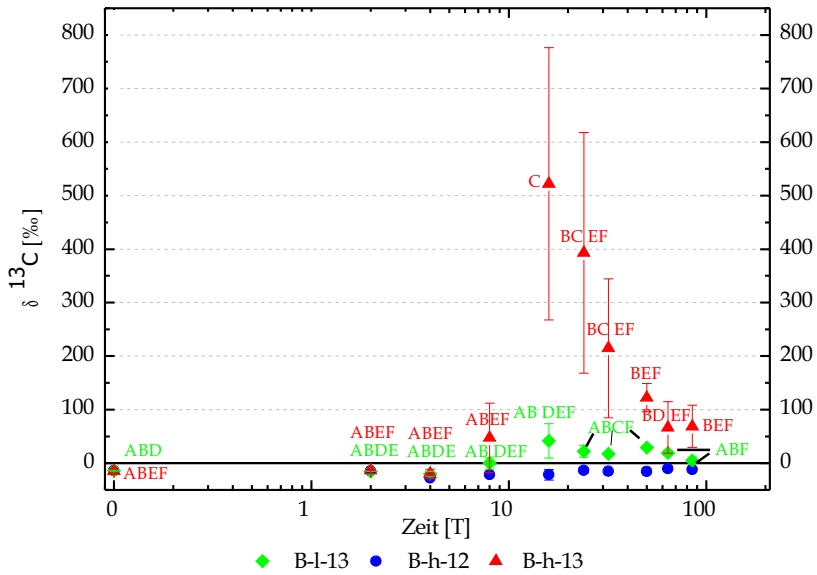
Stellvertretend für die Veränderung der CO<sub>2</sub>-Abgabe über die Zeit, in den verschiedenen Testansätzen, wurden die Proben am Tag 1, 4, 9 und 85 durch einen t-Test statistisch miteinander verglichen (Großbuchstaben in Abb. 20).

Die Testansätze B-h-12 und B-h-13 waren in den ersten 4 Tagen der Inkubation in ihrer Atmungsaktivität nicht signifikant unterschiedlich. Nach 85 Tagen der Inkubation konnten signifikante Unterschiede in diesen 2 Testansätzen ermittelt werden. Die Atmungsaktivität in den Kontrollen und in Testansätzen mit B-l-13 zeigen eine signifikant höhere Atmungsaktivität, die zueinander ähnlicher war, als zu den B-h-12 und B-h-13 Testansätzen (Abb. 20). Über die Zeit veränderte sich die Atmungsaktivität in diesen beiden Testansätzen signifikant (Abb. 20). Nach 9 Tagen der Inkubation stellte sich in allen Testansätzen ein stabiler Zustand der CO<sub>2</sub>-Abgabe ein.

Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass die Testansätze der Kontrolle und des B-l-13 neben der Atmungsaktivität auch in der Summe der CO<sub>2</sub> Abgabe zueinander ähnlicher waren als zu den B-h-12 und B-h-13 Testansätzen (Abb. 20B). In den B-h-12 und B-h-13 Testansätzen wurde annähernd über die Zeit die gleiche Menge an CO<sub>2</sub> abgegeben (Abb. 20B).

### 3.2.4 Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch vom Boden abgegebenen CO<sub>2</sub>

Die Bestimmung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im respiratorisch abgegebenen CO<sub>2</sub> in einem mit Kupfer-HDO dotierten Boden erfolgte durch Präzipitation des CO<sub>2</sub> als BaCO<sub>3</sub> (Kap. 2.13 ). In den ersten 8 Tagen der Inkubation war in allen Testansätzen kein signifikanter Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> Abgabe detektierbar (Abb. 21). In den Testansätzen mit B-h-12 zeigte sich über die gesamte Inkubationszeit ein konstanter  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts im Bereich von - 15‰ (Abb. 21). In den B-h-13 Testansätzen konnte ein signifikanter Anstieg des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im CO<sub>2</sub> nach 16 Tagen nachgewiesen werden (Abb. 21). Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in den Testansätzen B-l-13 stieg über die Inkubationszeit nicht signifikant an (Abb. 21). Der höchste  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ist bei B-l-13 und B-h-13 Testansätzen nach 16 Tagen der Inkubation detektiert worden. Ab diesem Zeitpunkt war der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im CO<sub>2</sub> über die Zeit in den B-h-13 und B-l-13 Testansätzen geringer. Bezogen auf das Verhältnis von <sup>12</sup>C zu <sup>13</sup>C (Ratio) konnte ermittelt werden, dass zum Inkubationstag 16 in den Testansätzen mit B-h-13 ca. 1,75 % <sup>13</sup>C enthalten waren. Der natürliche Gehalt an <sup>13</sup>C ermittelt aus den B-h-12 Testansätzen lag konstant bei etwa 1,17 %.

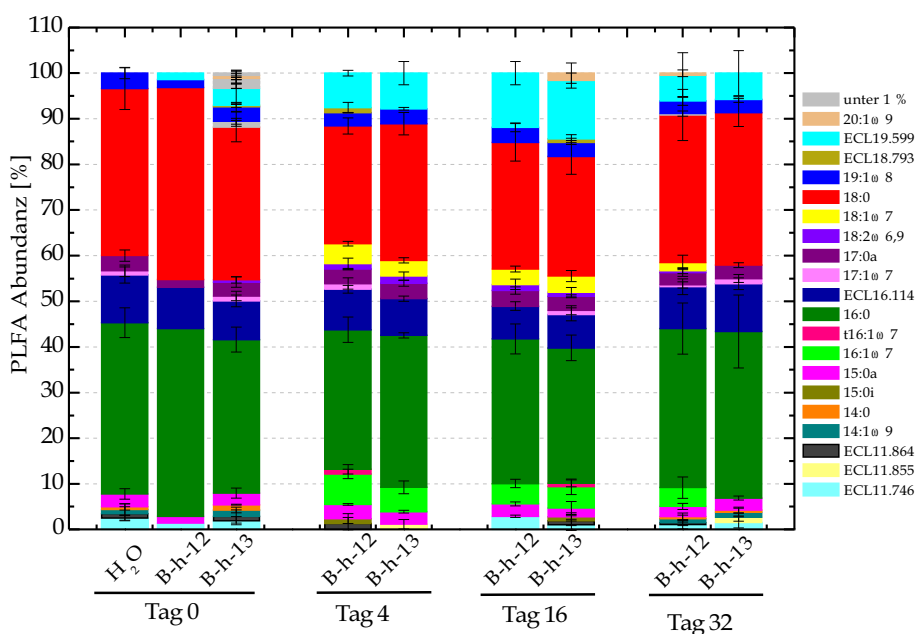


**Abbildung 21:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch vom Boden abgegebenen  $\text{CO}_2$  über einen Zeitraum von 85 Tagen. Der Zeitraum von 48 h, in dem das gebildete  $\text{BaCO}_3$  gesammelt wurde, wurde als ein Inkubationszeitraum definiert. Dies wurde notwendig, da Aufgrund der geringen  $\text{CO}_2$  Menge ( $< 1 \mu\text{g}/\text{min}$ ) die in 24 h gebildet wurde, die Mindestmenge für eine EA-IRMS Messung von  $1 \text{ mg BaCO}_3$  nicht erreicht wurde. Für die Kontrollen wurden 2 unabhängige Versuchsansätze zur Auswertung herangezogen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze, berechnet durch einen t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 %, dargestellt in Großbuchstaben.

Die Veränderungen des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes über die Zeit in den B-l-13 Testansätzen und im Vergleich zu den Testansätzen mit B-h-13 wurden statistisch durch einen t-Test ausgewertet (Abb. 21).

### 3.2.5 Identifizierung der mikrobiellen Fettsäuren

Um einen Einblick in die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden zu erhalten, wurde die Gesamt-Zusammensetzung der PLFAs bestimmt. Der Nachweis, in welchen mikrobiellen PLFAs eine Anreicherung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes erzielt wurde, sollte Aussagen zu Organismengruppen zulassen, die im Stande sind, die Kohlenstoffatome des Kupfer-HDO zu assimilieren. An den Inkubationstagen 0, 4, 16, 32 wurden die PLFAs aus dem Boden isoliert und detektiert (Abb. 22).



**Abbildung 22:** Abundanz der PLFAs in Prozent der einzelnen Testansätze und Inkubationstage. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze (Tag 0 B-H-12, wurde in nur mit 2 unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt). Alle PLFAs die unter 1 % der gesamten PLFA-Zusammensetzung ausmachen (ECL 18.063; 20:1 $\omega$  9; 20:0; ECL 20.147; 21:0 und 22:0) wurden zusammengefasst und in hellgrau dargestellt. Mit ECL. beschriebene PLFAs konnten zu keiner bekannte PLFA zugeordnet werden. Es wurde nach der Vorsilbe ECL die Retentionszeit angegeben, nach der die PLFA die Säule des Gaschromatographen verlief.

Insgesamt wurden 27 verschiedene PLFAs detektiert, von denen folgend die betrachtet wurden, die einen Anteil von mindestens 1 % an der PLFA-Gesamtzusammensetzung ausmachten (Abb. 22). In ihrer PLFA-Zusammensetzung, verglichen an den einzelnen Inkubationstagen, waren die beiden Testansätze B-h-12 und B-h-13 signifikant gleich (Ausnahme 16:1 $\omega$ 7 an Tag 32). Dies wurde durch

einen t-Test bestimmt. Zur Darstellung der prozentualen Veränderungen der einzelnen PLFAs wurde daher das arithmetische Mittel aus den Testansätzen B-h-12 und B-h-13 verwendet (Tab. 20).

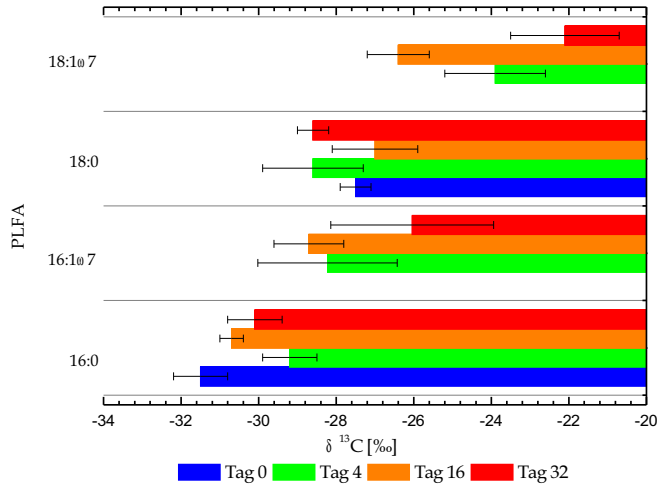
Die PLFA-Zusammensetzung in allen Probenreihen wurde dominiert von den Fettsäuren mit den Kohlenstoffketten 16:0 und 18:0. Über die Zeit konnte jedoch ein signifikanter Rückgang dieser beiden PLFAs beobachtet werden (Tab. 20). Der Anteil der PLFAs mit den Kohlenstoffketten 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 und ECL 19.599 stieg mit der Zeit signifikant an.

**Tabelle 20:** Prozentualer Anteil einzelner PLFAs in der PLFA-Zusammensetzung über die Zeit. Mit Plus bzw. Minus wurde der prozentuale Verlust bzw. Gewinn beschrieben. Es wurden nur PLFAs berücksichtigt, die mindestens 1 % Anteil an der gesamt PLFA-Zusammensetzung ausmachten. Die Großbuchstaben beschreiben die einzelnen Signifikanzniveaus der einzelnen PLFAs über die Zeit mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Es wurde das arithmetische Mittel aus den Testansätzen B-h-12 und B-h-13 verwendet (Ausnahme 16:1 $\omega$ 7, hier wurden die arithmetischen Mittel der beiden Testansätze einzeln berechnet).

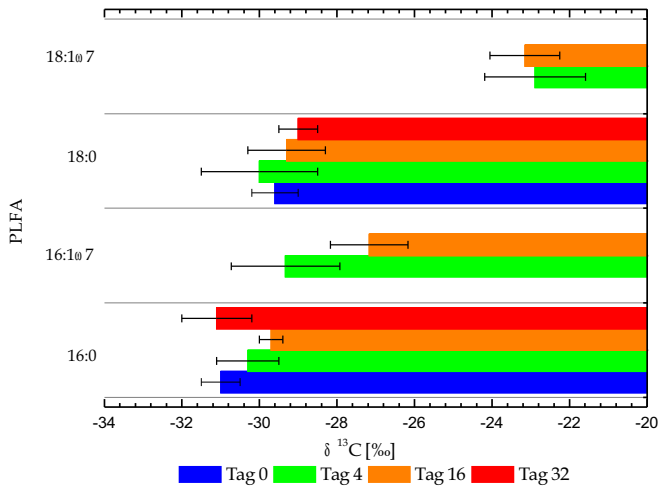
PLFA	Ausgangs Anteil (%)		Zu- und Abnahme (%) im Vergleich zu Tag 0		
	Tag 0		Tag 4	Tag 16	Tag 32
ECL11.746	1,6 <sup>A</sup> %		+2,3 <sup>B</sup> %	-0,4 <sup>C</sup> %	-0,4 <sup>C</sup> %
16:1 $\omega$ 7	n.d* %		+5,6 <sup>A</sup> %	+4,8 <sup>A</sup> %	+4,1 <sup>A</sup> %
		B-h 13			n.d*
16:0	37,3 <sup>A</sup> %		-5,9 <sup>AB</sup> %	-9,0 <sup>B</sup> %	-1,7 <sup>AB</sup> %
ECL16.114	8,8 <sup>A</sup> %		-2,3 <sup>AB</sup> %	-2,9 <sup>B</sup> %	+1,0 <sup>A</sup> %
18:1 $\omega$ 7	n.d*		+3,4 <sup>A</sup> %	+3,0 <sup>A</sup> %	+0,9 <sup>B</sup> %
18:0	37,8 <sup>A</sup> %		-9,0 <sup>B</sup> %	-12,8 <sup>B</sup> %	-5,0 <sup>A</sup> %
ECL19.599	2,5 <sup>A</sup> %		+7,2 <sup>B</sup> %	+11,1 <sup>C</sup> %	+3,1 <sup>AB</sup> %

n.d\* = nicht detektierbar (diese PLFAs wurden keinen Signifikanzniveaus zugeordnet.)

Zwischen den Inkubationstagen 0 und 32 zeigten sich signifikante Veränderungen in der Gesamt-PLFA-Zusammensetzung (Tab. 28). Die PLFAs mit den Kohlenstoffketten 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 waren zu Tag 0 nicht detektierbar. Ihr Anteil erhöhte sich über die Zeit signifikant.



**Abbildung 23:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von vier repräsentativen PLFAs, der B-h-12 Testansätze (Abb. 22). Die Proben wurden an den Inkubationstagen 0, 4, 16 und 32 entnommen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchsansätzen und 3 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes.



**Abbildung 24:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von vier repräsentativen PLFAs, der B-h-13 Testansätze (Abb. 22). Die Proben wurden an den Inkubationstagen 0, 4, 16 und 32 entnommen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchsansätzen und 3 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes

Im Zuge der Bestimmung der Gesamt-PLFAs-Zusammensetzung wurden die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in den PLFAs analysiert (Abb. 23 und Abb. 24). Die statistische Auswertung, mittels eines t-Tests zwischen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der Testansätze B-h-12 bzw. den B-h-13 eines Inkubationstages ergab, dass die beiden Testansätze signifikant gleich waren. Ausnahmen bildeten PLFAs, die an einigen Inkubationstagen nicht nachgewiesen werden konnten (z.B. 18:1 $\omega$ 7 an Tag 0 und 16). Es konnte kein signifikant erhöhter  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in den PLFAs detektiert werden.

### 3.3 Testansätze mit Holzschutzmitteln im Holz-Bodengemisch (HSM-Ho-Bo)

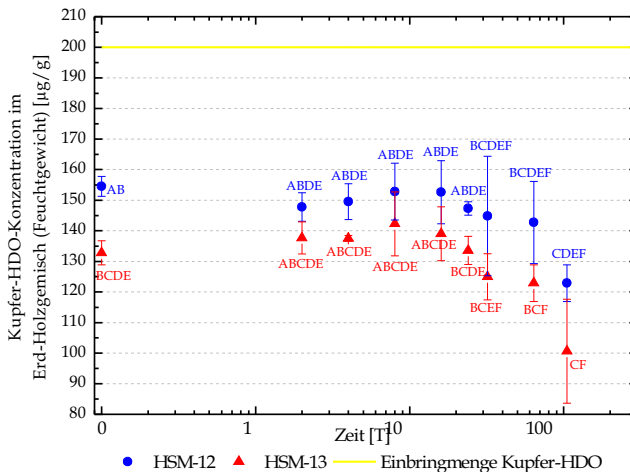
Das Biozid Kupfer-HDO wird als Bestandteil von HSM im Holz eingesetzt (Dr. Wolman GmbH). Neben dem Biozid sind in einem HSM noch weitere Zusatzstoffe enthalten, die u. a. das Biozid in Lösung bringen und die Haltbarkeit erhöhen. In diesem Experiment wurde nachgewiesen, ob dieses mit HSM in das Holz eingebrachte Biozid auch stabil ist, wenn dies im Kontakt zum Boden steht. Das Biozid wurde in einem Modell-HSM in Holzspäne eingebracht. Holzspäne wurden gewählt, da sie eine sehr große Oberfläche, im Verhältnis zum Volumen, besitzen und damit das HSM für Abbauprozesse durch Bodenmikroorganismen gut zugänglich ist. Das Modell-HSM besaß eine abweichende Formulierung als die vermarkteten HSMs mit dem gleichen Biozid als Wirkstoff. Es wurden die Modell-HSM HSM-12 und HSM-13 mit jeweils einer Biozidkonzentration von 200  $\mu\text{g/g}$  Endkonzentration im feuchten Boden-Holzgemisch analysiert (Tab. 13). Zur Kontrolle wurde eine Kupfer-HDO freie Formulierung gleicher HSM-Zusammensetzung verwendet (HSM-0). Die Holzspäne wurden nach einer Konditionierungsphase von einer Woche, die zur Fixierung des Biozides im Holz notwendig waren [DIN EN 113], in einen Boden eingebracht, der zuvor schon im Versuch mit HSM-K-I und HSM-K-h über 448 Tage in Kontakt stand (Kap. 3.4 ). Dieser Boden wurde gewählt, da sich darin eventuell schon Kupfer-HDO abbauende Organismen befanden und so mögliche Abbauprozesse beschleunigt sein könnten.

#### 3.3.1 Bestimmung der Konzentration des Kupfer-HDOs

Die Bestimmung der Kupfer-HDO-Konzentration erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Konzentration des Kupfer-HDO in den beiden Testansätzen mit HSM-12 und HSM-13 zeigte in den ersten 85 Tagen der Inkubation keine signifikante Veränderung (Abb. 25). In den Testansätzen mit HSM-0 konnte kein Kupfer-HDO detektiert werden.

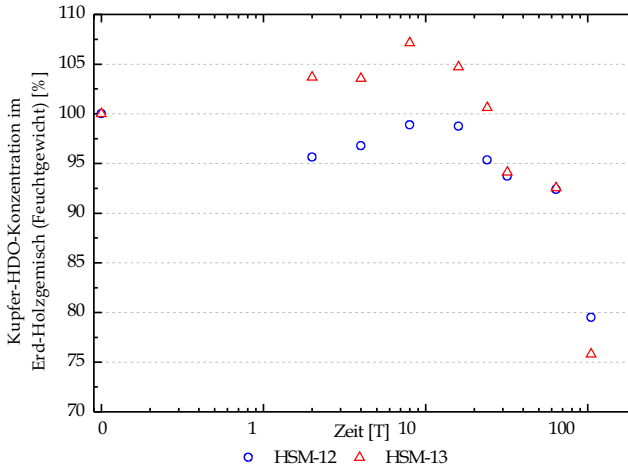


Unabhängig vom enthaltenden Kohlenstoffisotop im Molekül ( $^{12}\text{C}$  im HSM-12 oder  $^{13}\text{C}$  im HSM-13), konnte zwischen 85 und 105 Tagen der Inkubation ein signifikanter Rückgang der Kupfer-HDO-Konzentration in beiden Testansätzen nachgewiesen werden.



**Abbildung 25:** Kupfer-HDO-Konzentration in den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 über 105 Tage. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen Standard t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % dargestellt durch Großbuchstaben.

Die Halbwertszeit der Kupfer-HDO-Konzentration wurde an den einzelnen Inkubationstagen und Testansätzen als prozentuale Funktion zur jeweiligen Ausgangskonzentration gesetzt (Abb. 26). Nach Ablauf von 105 Inkubationstagen war in beiden Testansätzen noch mehr als 75 % des ursprünglich eingesetzten Kupfer-HDOs enthalten. Die Halbwertszeiten des Kupfer-HDOs im HSM beider Testansätze waren demnach in der Inkubationszeit von 105 Tagen nicht erreicht.



**Abbildung 26:** Prozentuale Kupfer-HDO-Konzentration in den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 nach 105-tägiger Inkubation. Die Kupfer-HDO-Konzentration des jeweiligen Testansatzes wurde prozentual in Abhängigkeit zur Ausgangskonzentration von 100 % gesetzt.

### 3.3.2 Auswirkungen von HSM auf die Respirationsaktivität des Bodens

Die Auswirkungen eines Testansatzes mit HSM-12 oder HSM-13 im Bodenkontakt auf die Respirationsaktivität des Bodens wurde analog zu Kapitel 3.2.2 bestimmt. Die charakteristischen Phasen (Lag-Phasen, Maxima und Steigungen) wurden aus dem arithmetischen Tagesmittel der CO<sub>2</sub>-Konzentrationen abgeleitet (Tab. 21). In Abbildung 27 sind die Atmungsraten der Mikroorganismen im Boden in den 3 verschiedenen Testansätzen graphisch dargestellt.

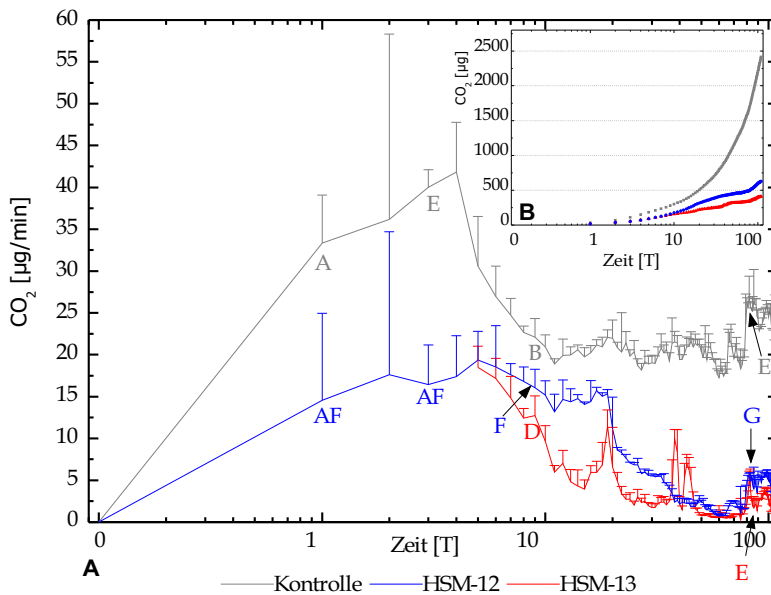
**Tabelle 21:** Charakteristische Phasen der Bodenatmung

	HSM-0	HSM-12
Lag-Phase (Tage)	keine	keine
Maximum (Tage)	4	5
Steigung * (Wachstumsrate)	41,7	19,28

\*Die Steigung wurde aus einer Grafik ermittelt, in der die Daten in einem Koordinatensystem mit logarithmischer Ordinate und linearer Abszisse aufgetragen und berechnet wurden. (Grafik nicht gezeigt).

Die exponentielle Phase der CO<sub>2</sub>-Abgabe begann in allen Testansätzen direkt nach dem Inkubationsbeginn. Eine Lag-Phase war demnach nicht gegeben. Zusätzlich war an der Steigung

abzuleiten, dass die Mikroorganismen in den Proben, die mit HSM-0 behandelt, wurden eine deutlich höhere Wachstumsrate (gemessen an der Steigung bis zum Peakmaximum) aufwiesen, als die Mikroorganismen in den Proben in denen HSM-12 oder HSM-13 verwendet wurden. Nach Erreichen des Maximums reduzierte sich die Respirationsrate in den Testansätzen mit HSM-12 und HSM-13, während in den mit HSM-0 behandelten Proben die  $\text{CO}_2$ -Abgabe auf einem konstanten Level von 20  $\mu\text{g}/\text{min}$  lag.



**Abbildung 27:** **A** Quantitative  $\text{CO}_2$ -Abgabe in den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 über einen Inkubationszeitraum von 105 Tagen in 5 unabhängigen Versuchsansätzen und 17 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes. (Ermittelt durch Messungen an einem Infrarot-Gasanalysator und durch Titration\*). **B** Kumulative  $\text{CO}_2$ -Abgabe über die Zeit in  $\mu\text{g}$ , berechnet durch Summierung der Tagesmittel der  $\text{CO}_2$  Produktion. Statistische Auswertung an den 4 repräsentativen Inkubationstagen Tag 0, 4, 9 & 84 mittels eines t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 %, dargestellt in Großbuchstaben.

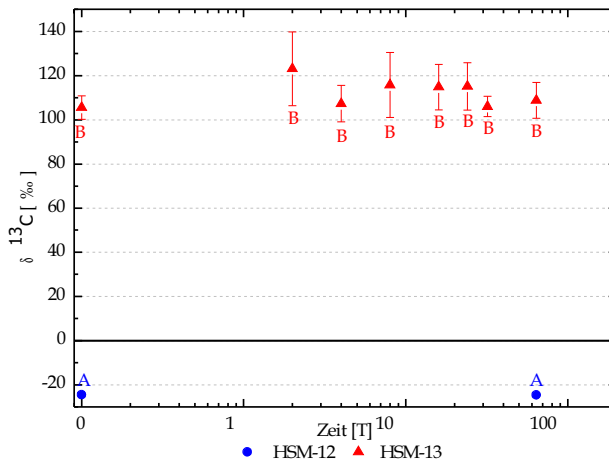
Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 in Bezug auf die abgegebene  $\text{CO}_2$  Menge. Die HSM-12 und HSM-13 Testansätze waren jedoch in Bezug auf die Menge des abgegebenen  $\text{CO}_2$  und der Atmungsaktivität zueinander über die Zeit ähnlicher als im Vergleich zu HSM-0, in der höhere Mengen an  $\text{CO}_2$  abgegeben wurden (Abb. 27 B).

Die Beschreibung der Veränderungen der  $\text{CO}_2$ -Abgabe über die Zeit und zwischen den Böden mit den

unterschiedlichen Testansätzen HSM-12 und HSM-13, erfolgte durch einen statistischen Vergleich der abgegebenen CO<sub>2</sub>-Mengen am Tag 1, 4, 9 und 85 durch einen t-Test (Abb. 27). Dieser ergab, dass die 3 unterschiedlichen Testansätze über den gesamten Zeitablauf in ihrer CO<sub>2</sub>-Abgabe signifikant unterschiedlich waren. Dies konnte sowohl in Vergleichen zwischen den Testansätzen HSM-0 mit HSM-12 bzw. HSM-13, als auch zwischen HSM-12 und HSM-13 Testansätzen nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Veränderungen des δ<sup>13</sup>C-Wertes im Boden

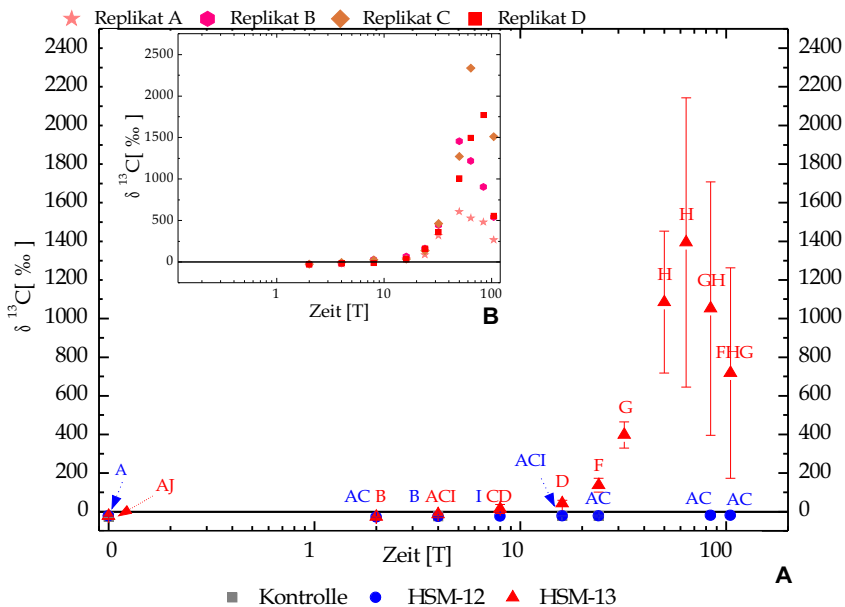
Die Messung des δ<sup>13</sup>C-Wertes in den Testansätzen mit HSM-12 und HSM-13 erfolgte analog zu Kapitel 3.2.2. Die statistische Überprüfung des δ<sup>13</sup>C-Wertes zwischen den einzelnen Inkubationstagen und unterschiedlichen Testansätzen zeigte, dass sowohl in den Testansätzen mit HSM-12, als auch in den Testansätzen mit HSM-13, keine signifikante Abnahme des δ<sup>13</sup>C-Wertes detektierbar war (Abb. 28)..



**Abbildung 28:** δ<sup>13</sup>C-Wert im Boden über die Inkubationszeit von 64 Tagen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze und 2 Mehrfachmessungen eines Versuchsansatzes. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

### 3.3.4 Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch abgegebenen $\text{CO}_2$

Die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im  $\text{CO}_2$  erfolgte analog zu Kapitel 3.2.4. In den HSM-0 Testansätzen lag der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert über den gesamten Inkubationszeitraum zwischen  $-27,4\text{‰}$  und  $-22,8\text{‰}$  (Abb. 29). Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges wurden die Daten dieses Testansatzes nicht zur statistischen Auswertung herangezogen. In den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 zeigten sich signifikante Veränderungen des  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts über die Zeit (Abb. 29).



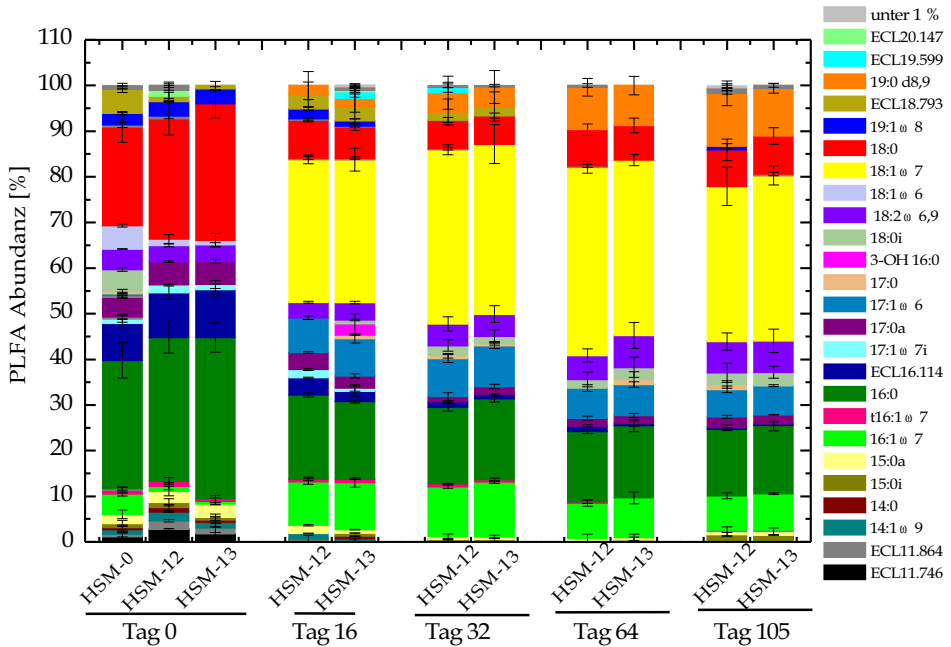
**Abbildung 29:** A  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im respiratorisch vom Boden abgegebenen  $\text{CO}_2$  (gebunden im  $\text{BaCO}_3$ ) über einen Zeitraum von 105 Tagen. Der Zeitraum von 48 h, in dem das gebildete  $\text{BaCO}_3$  gesammelt wurde, wurde als ein Inkubationszeitraum definiert, da Aufgrund der geringen gebildeten  $\text{CO}_2$  Menge ( $< 1\ \mu\text{g}/\text{min}$ ) das besonders zu späteren Inkubationstagen (ab Tag 15) gebildet wurden, die Mindestmenge für eine EA-IRMS Messung von  $1\ \text{mg}\ \text{BaCO}_3$  nicht in 24 h erreicht wurde. In jedem Inkubationszeitraum wurden in den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 3 unabhängige Versuchsansätze ausgewertet und zur statistischen Auswertung herangezogen. Die statistische Auswertung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des respiratorisch freigesetzten  $\text{CO}_2$  der Testansätze erfolgte mittels eines t-Tests mit einem Konfidenzintervall 95 % dargestellt in Großbuchstaben. B Unabhängige Versuchsansätze (Rohdaten) der HSM-13 Testansätze über die Zeit, zur Visualisierung der Streuung der Daten der einzelnen Versuchsansätze.

Die einzelnen Versuchsansätze der HSM-13 Testansätze streuten zu den einzelnen Inkubationstagen nicht signifikant (Abb. 29B).

Nach 2 Inkubationstagen stieg der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im  $\text{CO}_2$  in den Testansätzen mit HSM-13 signifikant an und erreichte nach 32 Inkubationstagen mit 1400 ‰ (1,4 %) das Maximum. Ab diesem Zeitpunkt war der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in beiden Testansätzen geringer. In den Testansätzen die mit HSM-12 behandelt wurden, konnte über die gesamte Inkubationszeit ein  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert detektiert werden, der vergleichbar mit den Testansätzen HSM-0 war.

### 3.3.5 Identifizierung der mikrobiellen Fettsäuren

Um die PLFA-Zusammensetzung in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo zu bestimmen, wurde analog zu der Beschreibung in Kapitel 3.2.5 an den Inkubationstagen 0, 16, 32, 64 und 105 die mikrobiellen Fettsäuren aus dem Boden isoliert und analysiert (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Abundanz der PLFAs in Prozent an den einzelnen Testansätzen und unterschiedlichen Inkubationstagen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze. Alle PLFAs die unter 1 % der gesamt PLFAs ausmachen (24:0; 22:0; ECL 21.609; 20:1 ω 9; 11Me18:1 ω 5; t18:1 ω 7; t18.1 ω 12, 17:1 ω 8; 17:0i; 16:1 ω 5; 16:0i) wurden zusammengefasst und in hellgrau dargestellt. Bei PLFAs die mit ECL. beschrieben sind, konnte keine Zuweisung zu einem bekannten PLFA erfolgen. Hier wurde nach dem ECL als Vorsilbe die Retentionszeit angegeben.

Insgesamt wurden 36 verschiedene PLFAs detektiert, von denen folgend nur noch die betrachtet

wurden, die einen Anteil von mindestens 1 % an der PLFA-Zusammensetzung ausmachten (Abb. 30). Um zu überprüfen, ob die Testansätze HSM-12 und HSM-13 in Bezug auf ihre PLFA-Zusammensetzung am jeweiligen Inkubationstag signifikant gleich waren, wurden die Daten der beiden Testansätze an allen Inkubationstagen mittels t-Test miteinander verglichen (Tab. 22). Diese t-Tests zeigten, dass die beiden Testansätze HSM-12 und HSM-13 in ihrer PLFA-Zusammensetzung mit 4 Ausnahmen am Tag 24 (15:0a; 16:0; 17:0a und 18:0i) signifikant gleich waren. Aus diesem Grund wurde zu Analyse der Veränderungen der PLFA-Zusammensetzung über die Zeit, das Mittel aus HSM-12 und HSM-13 betrachtet. Am Inkubationstag 0 wurde die PLFA-Zusammensetzung in allen Testansätzen von den Fettsäuren 16:0 und 18:0 dominiert. Über die Zeit waren diese PLFAs prozentual mit einem signifikant geringeren Anteil vertreten (Tab. 22).

Die PLFAs 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 konnten am Inkubationstag 0 nicht detektiert werden. Ihr Anteil an der gesamten PLFA-Zusammensetzung erhöhte sich über die Zeit signifikant.

Es konnte ein signifikanter, prozentualer Anstieg der PLFAs 18:1 $\omega$ 7, 16:1 $\omega$ 7, 17:1 $\omega$ 6 und 19:0d8,9 detektiert werden. Im Gegensatz dazu sank bei den PLFAs 19:1 $\omega$ 8 und 17:0a der prozentuale Anteil (Tab. 22). Zwischen der sofortigen Proben-Entnahme nach Einbau (Tag 0) und 24 Tagen der Inkubation veränderte sich die PLFA-Zusammensetzung signifikant und konnte zwischen 24 und 32 Tagen ebenfalls aufgelöst werden. In den folgenden Inkubationstagen jedoch konnte keine signifikante Änderung der PLFA-Zusammensetzung nachgewiesen werden (mit Ausnahme der PLFA 18:1 $\omega$ 7).

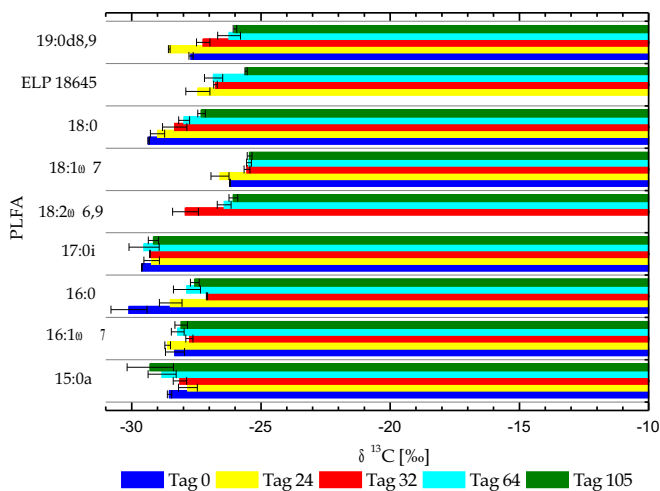
Für die detektierten PLFAs erfolgte die Bestimmung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes (Abb. 31). Es konnte in allen Testansätzen mit HSM-12 über die Zeit ein  $\delta^{13}\text{C}$ - Wert zwischen -30 ‰ und -25 ‰ festgestellt werden. In allen PLFAs, die aus den Testansätzen HSM-13 isoliert wurden, lag der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert am Inkubationstag 0 im Bereich der vergleichbaren PLFAs der HSM-12 Testansätze. Über die Zeit zeigten sich in den PLFAs mit den Kohlenstoffketten 15:0a, 16:1 $\omega$ 7, 16:0, 18:1 $\omega$ 7, 18:0, ELP18645 und 19:0d8,9 aus den Testansätzen mit HSM-13 signifikante Veränderungen im  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert (Abb. 32). Der höchste  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert wurde in allen Proben nach 105 Tagen der Inkubation erreicht.

**Tabelle 22:** Prozentualer Anteil einzelner PLFAs in der PLFA-Zusammensetzung über die Zeit. Mit Plus bzw. Minus wurde der prozentuale Verlust bzw. Gewinn beschrieben. Es wurden nur PLFAs berücksichtigt, die mindestens 1 % Anteil an der gesamt PLFA-Zusammensetzung hatten. Die Großbuchstaben beschreiben die einzelnen Signifikanzniveaus der einzelnen PLFAs über die Zeit mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Für die PLFAs 15:0a; 16:0; 17:0a und 18:0i PLFAs erfolgte eine zwischen den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 eine getrennte Berechnung der Signifikanzniveaus am Tag 24. Für die restlichen Inkubationstage wurde folgend zur Darstellung der prozentualen Veränderungen der einzelnen PLFAs das arithmetische Mittel aus den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 verwendet.

PLFA	Ausgangs Anteil (%)		Zu- und Abnahme (%) im Vergleich zu Tag 0			
	Tag 0		Tag 24	Tag 32	Tag 64	Tag 105
ECL11.746	2,3 <sup>A</sup> %		- 2,1 <sup>B</sup> %	- 2,3 <sup>BC</sup> %	- 2,3 <sup>C</sup> %	- 2,3 <sup>C</sup> %
ECL11.864	1,6 <sup>A</sup> %		- 1,3 <sup>B</sup> %	- 1,6 <sup>BC</sup> %	- 1,6 <sup>C</sup> %	- 1,6 <sup>C</sup> %
14:1ω9	1,6 <sup>A</sup> %		-0,7 <sup>AB</sup> %	-1,6 <sup>C</sup> %	-1,6 <sup>C</sup> %	-1,6 <sup>C</sup> %
15:0a	2,7 <sup>A</sup> %		- 1,0 <sup>B</sup> %	- 2,1 <sup>A</sup> %	- 2,0 <sup>A</sup> %	- 1,9 <sup>A</sup> %
HSM- 12						
HSM- 13			- 2,0 <sup>A</sup> %			
16:1ω7	0,8 <sup>A</sup> %		+ 9,1 <sup>B</sup> %	+ 10,7 <sup>C</sup> %	+ 7,3 <sup>D</sup> %	+ 6,8 <sup>D</sup> %
16:0	33,4 <sup>A</sup> %		- 15,2 <sup>B</sup> %	-16,2 <sup>CD</sup> %	-17,8 <sup>C</sup> %	-18,6 <sup>CD</sup> %
HSM- 12						
HSM- 13			-16,4 <sup>C</sup> %			
ECL16.114	10,1 <sup>A</sup> %		- 7,1 <sup>B</sup> %	- 9,0 <sup>C</sup> %	- 9,3 <sup>CD</sup> %	- 9,7 <sup>D</sup> %
17:1ω7i	1,5 <sup>A</sup> %		- 0,2 <sup>B</sup> %	- 1,5 <sup>C</sup> %	- 1,5 <sup>C</sup> %	-1,5 <sup>C</sup> %
17:0a	5,0 <sup>A</sup> %		- 1,4 <sup>B</sup> %	- 3,6 <sup>D</sup> %	- 3,3 <sup>DE</sup> %	- 2,9 <sup>E</sup> %
HSM- 12						
HSM- 13			- 2,5 <sup>C</sup> %			
17:1ω6	n.d.* %		+ 7,9 <sup>A</sup> %	+ 8,6 <sup>AB</sup> %	+ 6,7 <sup>BC</sup> %	+ 6,2 <sup>C</sup> %
16:0 3-OH	n.d.* %		+ 1,2 <sup>A</sup> %	n.d.* %	n.d.* %	n.d.* %
18:0i	n.d.* %		n.d.* %	+ 1,9 <sup>B</sup> %	+ 2,3 <sup>B</sup> %	+ 2,7 <sup>B</sup> %
HSM- 12						
HSM- 13			+ 0,8 <sup>A</sup> %			
18:2ω6,9	3,6 <sup>A</sup> %		± 0 <sup>A</sup> %	+ 1,2 <sup>B</sup> %	+ 2,5 <sup>BC</sup> %	+ 3,2 <sup>C</sup> %
18:1ω6	1,2 <sup>A</sup> %		-1,2 <sup>B</sup> %	-1,2 <sup>B</sup> %	-1,2 <sup>B</sup> %	-1,2 <sup>B</sup> %
18:1ω7	n.d.* %		+ 31,3 <sup>A</sup> %	+ 37,7 <sup>C</sup> %	+ 39,8 <sup>C</sup> %	+ 35,1 <sup>CD</sup> %
18:0	28,2 <sup>A</sup> %		- 20,6 <sup>A</sup> %	-21,9 <sup>B</sup> %	- 20,4 <sup>C</sup> %	- 20,0 <sup>C</sup> %
19:1ω8	3,2 <sup>A</sup> %		-1,6 <sup>B</sup> %	- 3,2 <sup>C</sup> %	-3,2 <sup>C</sup> %	- 2,8 <sup>C</sup> %
ECL18.793	1,0 <sup>A</sup> %		+ 2,2 <sup>B</sup> %	+ 0,9 <sup>BC</sup> %	- 1,0 <sup>C</sup> %	- 1,0 <sup>C</sup> %
19:0 d8,9	n.d.* %		+ 1,9 <sup>A</sup> %	+ 4,3 <sup>A</sup> %	+ 9,0 <sup>C</sup> %	+ 11,0 <sup>C</sup> %

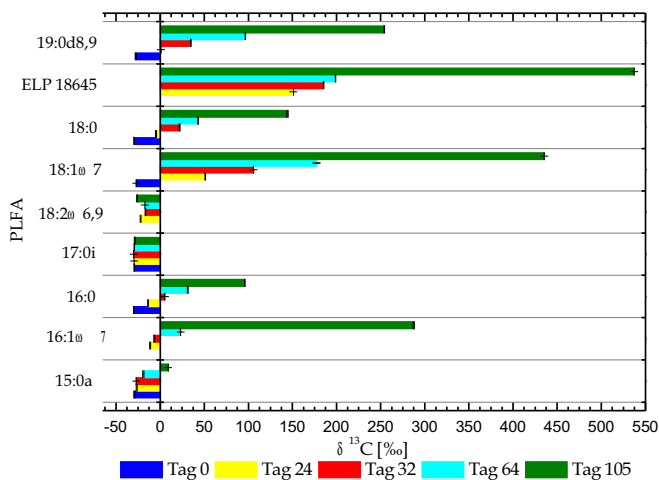
\*n.d. : nicht detektierbar (diese PLFAs wurden keinen Signifikanzniveaus zugeordnet.)





**Abbildung 31:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der PLFAs der HSM-12 Testansätze. Die Proben wurden an den Inkubationstagen 0, 24, 32, 64 und 105 entnommen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze.

Exemplarisch für PLFAs ohne Veränderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sind die PLFAs mit den Kohlenstoffketten 17:0i und 18:2 $\omega$ 6,9 anzuführen (Abb. 32).



**Abbildung 32:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der PLFAs in den HSM-13 Testansätzen. Die Proben wurden an den Inkubationstagen 0, 24, 32, 64 und 105 entnommen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 3 unabhängigen Versuchsansätze.

### **3.4 Testansätze mit Holzschutzmittel in Prüfkörpern mit Bodenkontakt (HSM-Pr-Bo)**

Die Funktion eines HSM ist der Schutz eines Holzkörpers vor dem Abbau durch holzerstörende Mikroorganismen. Die Prüfung von HSM auf ihre Wirksamkeit gegenüber diesen Mikroorganismen erfolgt häufig nach einer europäischen Norm [DIN EN 113] mit Hilfe standardisierter Holzprüfkörper im Labor. Um den Abbau von Kupfer-HDO in einer HSM-Formulierung zu analysieren, wurden zwei unterschiedlich konzentrierte HSM auf Kupfer-HDO-basis eingesetzt (HSM-K-l und HSM-K-h). Zur Analyse der Funktion der organischen Komponente HDO wurde ein gleich formuliertes HSM verwendet, in dem jedoch das HDO fehlte (HSM-A-l und HSM-A-h). Dieses HDO-freie HSM wurde in den gleichen Konzentrationen eingesetzt, die auch beim HSM auf Kupfer-HDO Basis eingesetzt wurden. Zur Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O anstelle eines HSM verwendet. Alle Formulierungen finden sich zusammengefasst in Tab. 4.

#### **3.4.1 Räumliche Verteilung von Kupfer und Kupfer-HDO in Holzprüfkörpern**

Ein HSM kann auf verschiedenen Wegen in das Holz eingebracht werden. Eine häufig verwendete Methode ist dabei die Vollholztränkung, wie sie in Kapitel 2.10.1 beschrieben wurde. Über die Gewichtsänderung des Holzprüfkörpers vor und nach der Tränkung konnte bestimmt werden, wie viel des HSM aufgenommen wurde. Eine Aussage über die räumliche Verteilung im Holz konnte aus diesen Daten jedoch nicht gewonnen werden. Der Angriffspunkt der Mikroorganismen am Holzprüfkörper ist zunächst seine äußere Oberfläche, da diese im direkten Kontakt zum Boden steht. Eine möglichst hohe HSM-Konzentration an der Oberfläche ist aus diesem Grunde günstig. Andererseits entsteht in der Praxis, bei Hölzern die der Witterung ausgesetzt sind, durch Feuchtigkeitsänderungen im Holz Trocknungsrisse, die das Eindringen von Mikroorganismen in das Innere des Holzes erlauben. Daher muss auch hier eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration enthalten sein. Somit ist ein nicht zu steiler Konzentrationsgradient von der Oberfläche bis tief in das Innere für einen optimalen Langzeitschutz erforderlich. Aussagen zu Veränderungen der Kupfer-HDO-Konzentration in dieser äußeren Holzschicht können jedoch nur getroffen werden, wenn die Verteilung des Biozids bekannt ist. Dazu wurde die räumliche Verteilung des Kupfers und des HDOs in den unterschiedlichen Schichten der Holzprüfkörper bestimmt (Abb. 33 und Abb. 34).

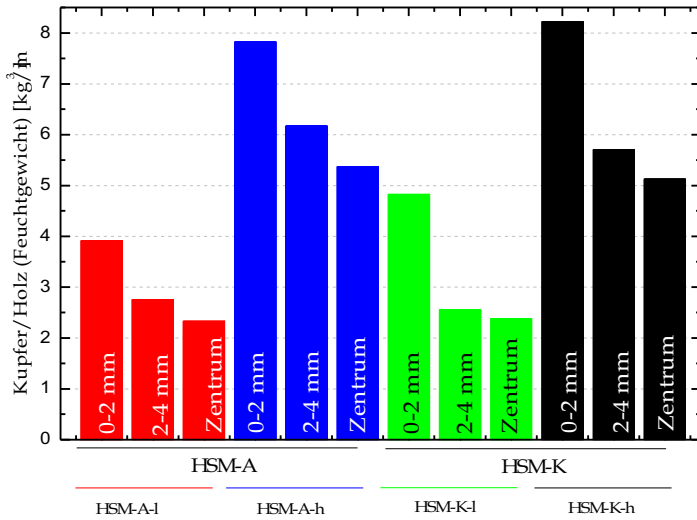


Abbildung 33: Tiefenabhängige Verteilung des Kupfers im Holzprüfkörper, bestimmt durch AAS. Stichprobenumfang 1

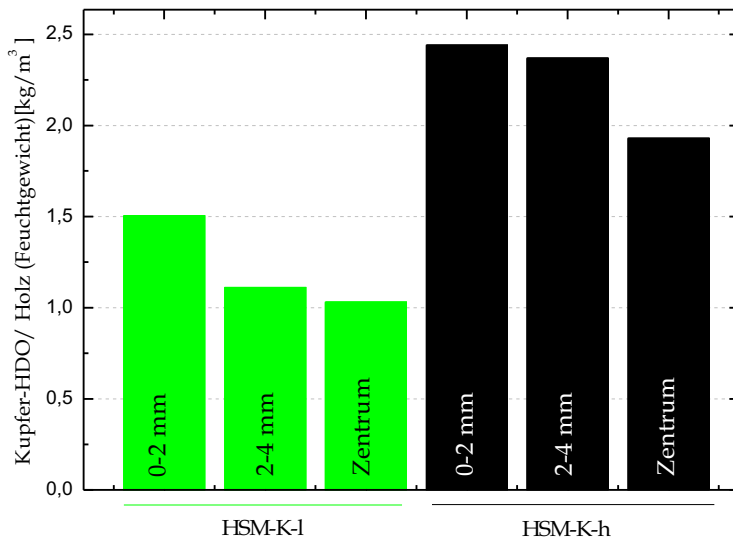


Abbildung 34: Tiefenabhängige Verteilung des Kupfer-HDOs im Holzprüfkörper, bestimmt durch HPLC. Stichprobenumfang 1.

Die höchste Kupferkonzentration wurde unabhängig von der Art des HSMs immer in den äußeren Schichten (0 - 2 mm) der Holzprüfkörper nachgewiesen und damit in direktem Kontakt zur Umgebung. Zum Zentrum der Holzprüfkörper war die Kupferkonzentration in allen Proben abnehmend.

In einem weiteren Experiment mit Proben der selben Holzprüfkörper wurde auch die Kupfer-HDO-Konzentration in den unterschiedlichen Holztiefen bestimmt. In allen Testansätzen mit HSM-A konnte kein Kupfer-HDO nachgewiesen werden.

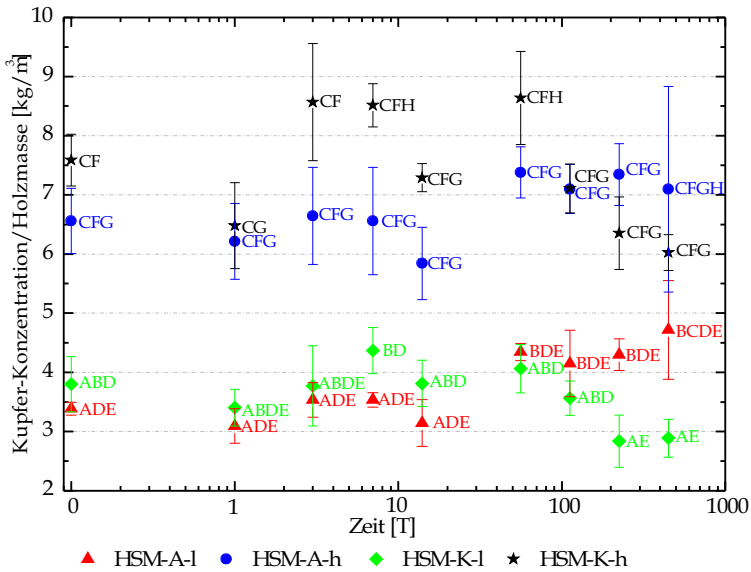
Dass in den HSM mit HSM-A-l und HSM-A-h kein Kupfer-HDO enthalten war, bestätigte die HDO-Bestimmung in diesen Proben. Wie in Abbildung 34 dargestellt wird, nahm die Kupfer-HDO-Konzentration analog zur Kupferkonzentration Abbildung 33 in den Holzprüfkörpern zum Zentrum hin ab. Dieser Trend war unabhängig von der Konzentration des eingebrachten Kupfer-HDOs im HSM.

### 3.4.2 Bestimmung der Kupfer und Kupfer-HDO Konzentration

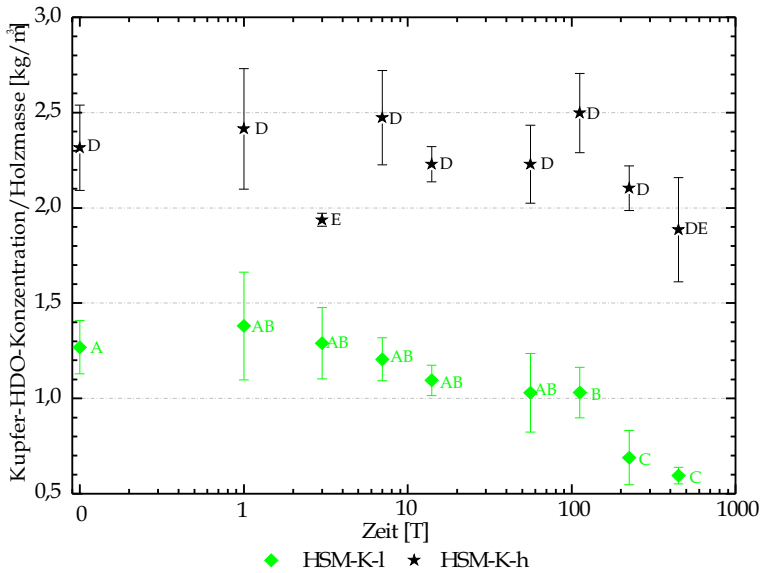
Aus den Experimenten in Kapitel 3.4.1 ging hervor, dass die höchsten Konzentrationen an Kupfer und an Kupfer-HDO in der äußeren Schicht (0 -2 mm) der Holzprüfkörper zu finden waren. Diese Schicht wurde für die Experimente zur Bestimmung der Konzentrationen von Kupfer und von Kupfer-HDO über die Zeit verwendet. Zu den unterschiedlichen Inkubationstagen zwischen 0, 1, 3, 7, 14, 56, 112, 224 und 448 Tagen wurde die Kupfer- bzw. die HDO-Konzentration bestimmt (Abb. 35 und Abb. 36).

In allen Testansätzen konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration des Kupfers über die Zeit unabhängig von der Konzentration der Kupferverbindung im HSM signifikant konstant war, jedoch konnten Schwankungen bei der Kupfer-Konzentration festgestellt werden. In den Kontrollen, in denen H<sub>2</sub>O anstelle eines HSMs eingesetzt wurde, konnte erwartungsgemäß kein Kupfer detektiert werden.

Die Kupfer-HDO-Konzentration (Abb. 36) wurde mit fortschreitender Zeit in den Testansätzen HSM-K-l signifikant reduziert. In den HSM-K-h war eine Abnahme der Kupfer-HDO-Konzentration messbar. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant (bedingt durch den niedrigen Wert am Inkubationstag 3).



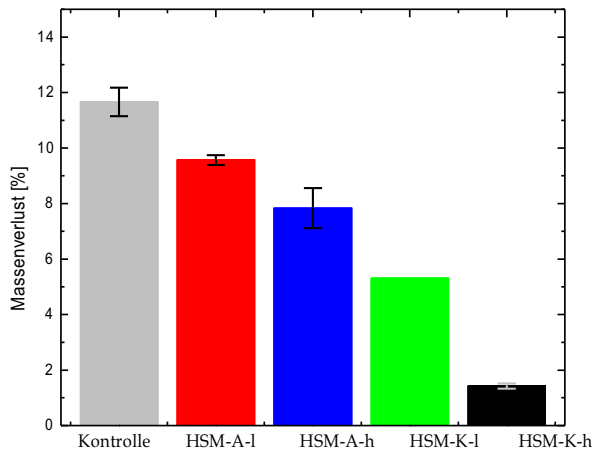
**Abbildung 35:** Kupfer-Konzentration bestimmt durch AAS in der äußeren Holzschicht (0-2 mm) der Holzprüfkörper über die Zeit. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Stichprobenumfang 5 unabhängige Versuchsansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 %, dargestellt in Großbuchstaben.



**Abbildung 36:** Kupfer-HDO-Konzentration bestimmt durch HPLC in der äußeren Holzschicht (0-2 mm) der Holzprüfkörper über die Zeit. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Stichprobenumfang 5 unabhängige Versuchsansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 %, dargestellt in Großbuchstaben.

### 3.4.3 Bestimmung des Masseverlustes der Holzprüfkörper

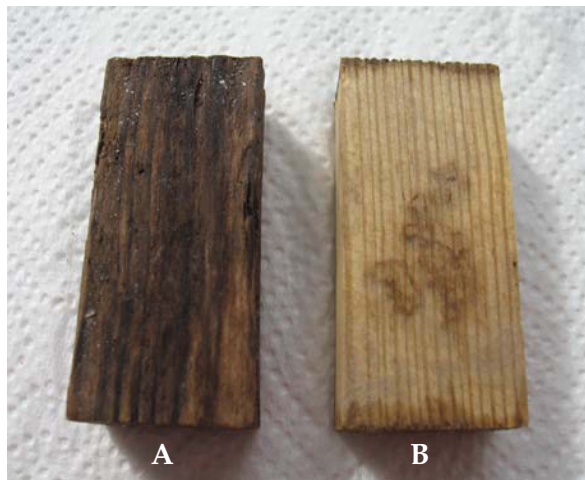
Der Masseverlust eines Holzprüfkörpers nach dessen Inkubation im Boden ist ein Maß für die Aktivität der holzabbauenden Bodenmikroorganismen und für die Wirksamkeit eines HSMs gegenüber diesen Organismen. Die mit  $H_2O$  behandelten Kontroll-Holzprüfkörper zeigten nach der Inkubationszeit von 448 Tagen im Vergleich zu Holzprüfkörpern, die mit einem HSM behandelt wurden, einen größeren Masseverlust (Abb. 37). Holzprüfkörper, die mit einem HSM auf der Basis von Kupfer-Aminen behandelt wurden (HSM-A) verloren über die Zeit einen größeren Masseanteil, als Holzprüfkörper mit einem HSM auf Kupfer-HDO-Basis (HSM-K), insbesondere bei der jeweils höheren Konzentration.



**Abbildung 37:** Prozentualer Masseverlust der Holzprüfkörper nach 448 Tagen der Inkubation im Boden. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung von 2 unabhängigen Versuchsansätzen. Bei HSM-K-l wurde nur ein Versuchsansatz zur Auswertung herangezogen.

Der Masseverlust zeigte sich auch an der unterschiedlichen Beschaffenheit der Oberfläche der Holzprüfkörper (Abb. 38). Dunkel verfärbte Holzprüfkörper waren signifikant leichter als Holzprüfkörper ohne Verfärbungen. Zusätzlich war die Holzoberfläche der Kontrollen etwas weicher als bei den HSM-K-Prüfkörpern. Die Kontroll-Holzprüfkörper (Abb. 38 A) zeigten eine dunkel verfärbte, unebene Oberfläche, während die mit HSM-K behandelten Holzprüfkörper hell und glatt erschienen (Abb. 38 B). Prüfkörper, die mit HSM-A behandelt wurden, ähnelten in dem Grad ihrer Verfärbung und ihrer Oberflächenstruktur denen der Kontrollen. Bei den Kontrollen konnte ein leichter

Abbau des Frühholzes festgestellt werden. Mikroskopisch war die Art des Befalls nicht zu charakterisieren.



**Abbildung 38** Holzprüfkörper nach 448 Tagen der Inkubation im Boden. **A** Kontroll-Holzprüfkörper, mit  $H_2O$  behandelt. **B** Holzprüfkörper der mit HSM-K behandelt wurde.

### 3.5 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden mittels Fingerabdruck-Techniken

Um den Einfluss von HSM auf die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden in den Testansätzen mit HSM-Pr-Bo (Tab. 4) aufzulösen, wurden die Fingerabdruck-Techniken SSCP und T-RFLP verwendet. Beide Fingerabdruck-Techniken basieren auf der Verwendung von isolierter Gesamt-DNA aus dem Boden-Holzgemisch. Eine Kultivierung der enthaltenen Organismen ist daher nicht notwendig. In dieser Arbeit wurde die SSCP-Technik zur Untersuchung der eukaryontischen-Gemeinschaft im Boden eingesetzt (Kap. 3.5.1), während die bakterielle Gemeinschaft mit der T-RFLP-Technik (Kap. 3.5.2) analysiert wurde.

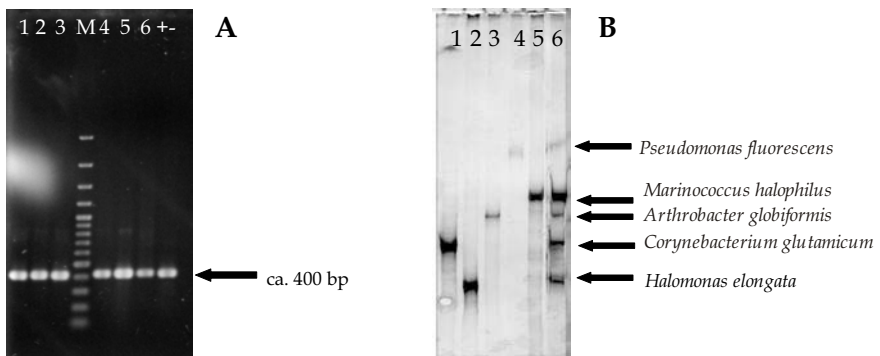
#### 3.5.1 SSCP zur Bestimmung der eukaryontischen-Gemeinschaft im Boden

Zur Bestimmung der eukaryontischen Gemeinschaft im Boden-Holzgemisch mussten zunächst die Bedingungen für die PCR, zur Herstellung der DNA-Fragmente von Proben- und Marker-DNA, die mittels SSCP charakterisiert werden sollten, optimiert werden. Im Anschluss erfolgte die Optimierung der Bedingungen für die SSCP-Gelelektrophorese.

### 3.5.1.1 Optimierung der SSCP

Zur Bestimmung der Lauflänge der DNA-Fragmente aus dem Boden-Holzgemisch der Testansätze in einem SSCP-Gel wurde ein DNA-Längenstandard aus der DNA bakterieller Reinkulturen (Tab. 6) hergestellt. Dazu wurde ein ca. 400 bp großer Abschnitt der bakteriellen 16S rRNA der Reinkulturen (*Artrobacter globiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium Glutamicum*, *Halomonas elongata*, *Marinococcus halophilus* und *Pseudomonas fluorescens*) mit den Primern Com1A/Com516r-PH (Tab. 10) amplifiziert und gelelektrophoretisch visualisiert (Abb. 39 A). Pro PCR-Reaktion, bestehend aus 25 Zyklen, wurden etwa 250 - 300 ng PCR-Produkt gewonnen.

Mit den PCR-Produkten der bakteriellen Reinkulten wurde die SSCP-Methode etabliert, indem die Elektrophoresebedingungen wie Temperatur des Laufpuffer, die Dauer der Trennung und die Stärke der Matrix optimiert wurden.



**Abbildung 39:** A Exemplarisches Agarose-Kontrollgel der Amplifikation der V4 und V5 Region (400 bp) der 16S rRNA der bakteriellen Reinkulturen amplifiziert mit dem Com-Primerpaar. (Com1A/Com516r-PH) visualisiert in einem 1% Agarosegel. **1** = *Bacillus licheniformis* **2** = *Pseudomonas fluorescens*, **3** = *Marinococcus halophilus* **M**= Längenstandard GeneRuler™ 100bpDNA Ladder Plus (Fermentas), **4** = *Corynebacterium Glutamicum*, **5** = *Artrobacter globiformis*, **6** = *Halomonas elongata*, + = Positiv Kontrolle *Escherichia Coli*, - = Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle eines DNA-Template, es wurden jeweils 1,5 µl PCR-Reaktionsansatz aufgetragen. **B** SSCP-Gel mit einzelsträngigen PCR-Produkten der 16S rRNA bakterieller Reinkulturen. **1** = *Corynebacterium glutamicum*, **2** = *Halomonas elongata*, **3** = *Artrobacter globiformis*, **4** = *Pseudomonas fluorescens*, **5** = *Marinococcus halophilus*, **6** = PCR-Produkt des Gemisches der DNA aller Reinkulturen. Pro Spur wurden ca. 50-100 ng DNA eingesetzt. Dauer der elektrophoretischen Trennung bei 20 °C des Laufpuffers ca. 24 h. Visualisierung der DNA im Gel durch eine Silberfärbung.

Damit wurde die optimale Trennung der Banden im Gel erreicht. Zunächst wurde die DNA mittels einer Hydrolyse durch die λ-Exonuklease in Einzelstränge überführt (Kap. 11) und in die SSCP eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die DNA der einzelnen Reinkulturen auch in einer Mischung voneinander separiert werden kann, wurde die Gesamt-DNA gemischt und in die PCR mit dem Com-Primerpaar (Com1A/Com516r-PH) eingesetzt (Abb. 39 B Spur 6).

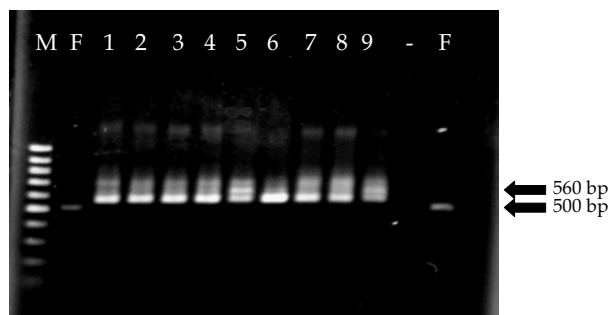


Die DNA der verschiedenen Reinkulturen konnte mittels einer elektrophoretischen Trennung in der SSCP-Matrix voneinander getrennt (Abb. 39 B Spur 6) und der parallel aufgetragenen bandierten DNA der Reinkulturen zugewiesen werden.

Das DNA-Gemisch der Reinkulturen wurde im weiteren Verlauf der Experimente als Längenstandard eingesetzt. Anhand dieses Längenstandards war es möglich, alle SSCP-Gele miteinander zu vergleichen und die optimale Trennung der DNA-Banden im SSCP-Gel zu erreichen.

### 3.5.1.2 Untersuchung der eukaryontischen Gemeinschaft in den HSM-Pr-Bo Testansätzen mittels SSCP

Um die eukaryontische Gemeinschaft im Boden-Holzgemisch zu charakterisieren wurde die extrahierte Gesamt-DNA aus den Testansätzen (Tab. 4) als Template in die PCR mit den EukA1/Euk516r-Ph Primern (Tab. 9) eingesetzt. Dieses Primerpaar wurde bislang erfolgreich zur Analyse der eukaryontischen Gemeinschaft mittels DGGE (DIEZ ET AL, 2001 B) verwendet und wurde in dieser Arbeit erstmals in die SSCP eingesetzt. Dabei erfolgte die Amplifikation der V1 und V3 Region der eukaryontischen 18S rRNA (560 bp) und die Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel (Abb. 40).



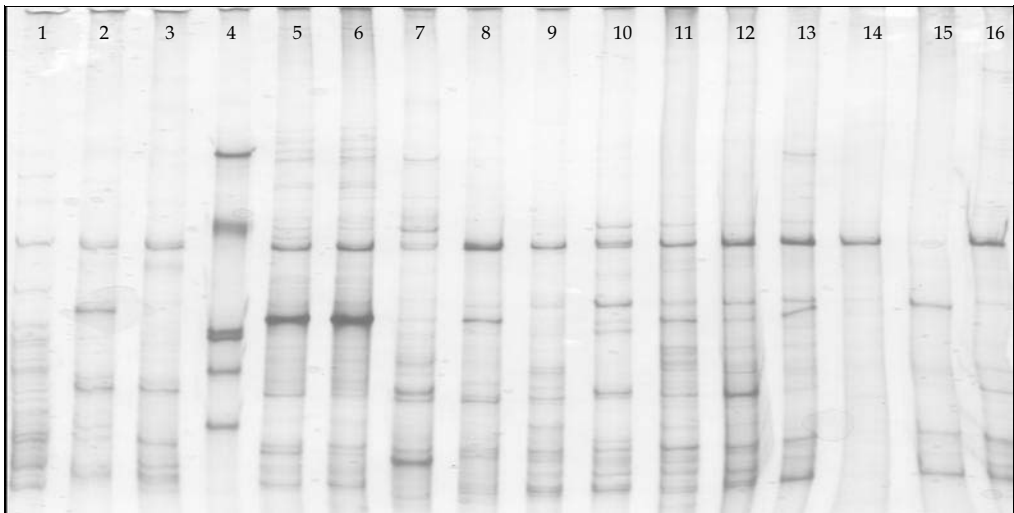
**Abbildung 40:** Exemplarisches Agarose-Kontrollgel (1 %) der Amplifikation der V 1 und V3 Region (560 bp) der 18S rRNA der eukaryontischen Gemeinschaft im Boden mit den Primern Euk1A/Euk (Tab.9) am Inkubationstag 448. **M** = Längenstandard Massruler Low Range (Fermentas), **F** = NoLimits® DNA-Fragment 500 bp (Fermentas) <sup>A</sup> 10 ng, <sup>B</sup>20 ng **1+2** = PCR-Produkt der Kontrollen, **3+4** = PCR-Produkt aus den Testansätzen HSM-A-l, **5+6** = PCRprodukt aus den Testansätzen HSM-A-h, **7+8** = PCR-Produkt aus den Testansätzen HSM-K-l, **9** = PCR-Produkt aus dem Testansatz HSM-K-h, **-** = Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle eines DNA-Templates. Es wurden jeweils 1,5 µl PCR-Reaktionsansatz auf das Agarosegel aufgetragen.

In allen Testansätzen war es möglich, den Zielabschnitt auf der 18S rRNA mit dem Euk-Primerpaar zu amplifizieren. Das amplifizierte Produkt wies eine Größe von ca. 560 bp auf. Trotz der Optimierung der

## Ergebnisse

PCR-Reaktionsbedingungen war ein leichter „Hintergrundschmier“, sowie das Auftreten von Doppelbanden nicht zu verhindern (Abb. 40). Dies hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die weitere Verwendung der Proben in der SSCP. Für die Analyse der PCR-Proben mittels SSCP wurden 250 ng DNA benötigt. Da diese Menge häufig nicht durch eine einzelne PCR-Reaktion generiert werden konnte, wurde die PCR wiederholt und die Reaktionsansätze wurden vereinigt.

Mit Hilfe der etablierten SSCP-Methode erfolgte die Bestimmung der Sukzession der eukaryontischen Gemeinschaft im Boden-Holzgemisch. Die generierten DNA-Einzelstränge wurden in die SSCP eingesetzt und elektrophoretisch voneinander separiert (Abb. 41). Durch Analysen von verschiedenen PCR-Produkten mit der gleichen DNA-Matrize konnte nachgewiesen werden, dass das SSCP-



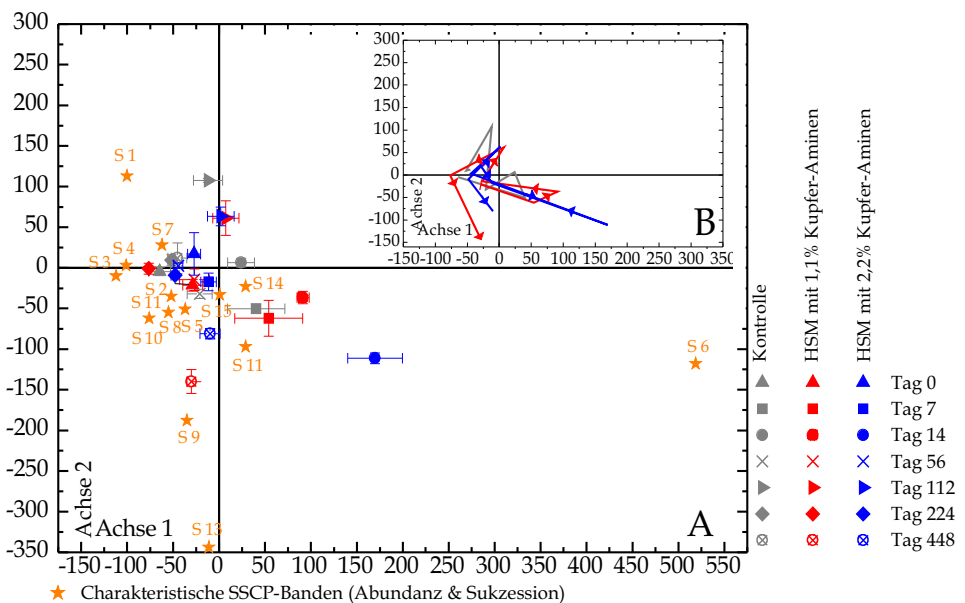
**Abbildung 41:** Exemplarisches SSCP-Gel mit einzelsträngigen PCR-Produkten der 18S rRNA der Testansätze HSM-K-1 1 = Inkubationstag 0, 2+3 = Inkubationstag 7, 4 = Längenstandard generiert aus bakteriellen Reinkulturen, 5+6 = Inkubationstag 14 (gleiche DNA-Matrix unterschiedliche PCR-Ansätze), 7 = Intensitätsstandard (HSM-A-I, Inkubationstag 112 Probennr. 6721) 8+9 = Inkubationstag 56, 10+11 = Inkubationstag 112, 12+13 = Inkubationstag 224, 14-16 = Inkubationstag 448. Pro Probe wurden 250 ng DNA eingesetzt Dauer der elektrophoretischen Trennung 24 h bei 20 °C des Laufpuffers. Visualisierung der DNA im Gel durch eine Silberfärbung.

Bandenmuster bei gleicher Ausgangs-DNA-Matrize identisch waren. Demnach wird das SSCP-Muster nicht durch verschiedene PCR-Reaktionen des gleichen Templates verändert (siehe Abb. 41 Spur 5 und 6). Neben der Übereinstimmung der Muster, waren auch die Intensitäten der Banden annähernd gleich. Es war demnach möglich, im SSCP-Gel Banden aufgrund ihrer Abundanz, dargestellt durch die Intensität der Bande im Gel, reproduzierbar miteinander zu vergleichen. Mittels SSCP konnten die

eukaryontischen Gemeinschaften im Boden-Holzgemisch zu allen Inkubationszeitpunkten und Testansätzen aufgelöst und mittels des verwendeten Längen- sowie des Intensitätsstandards miteinander verglichen werden. Die Auswertung der generierten Bandenmuster erfolgte durch eine Korrespondenzanalyse (KA).

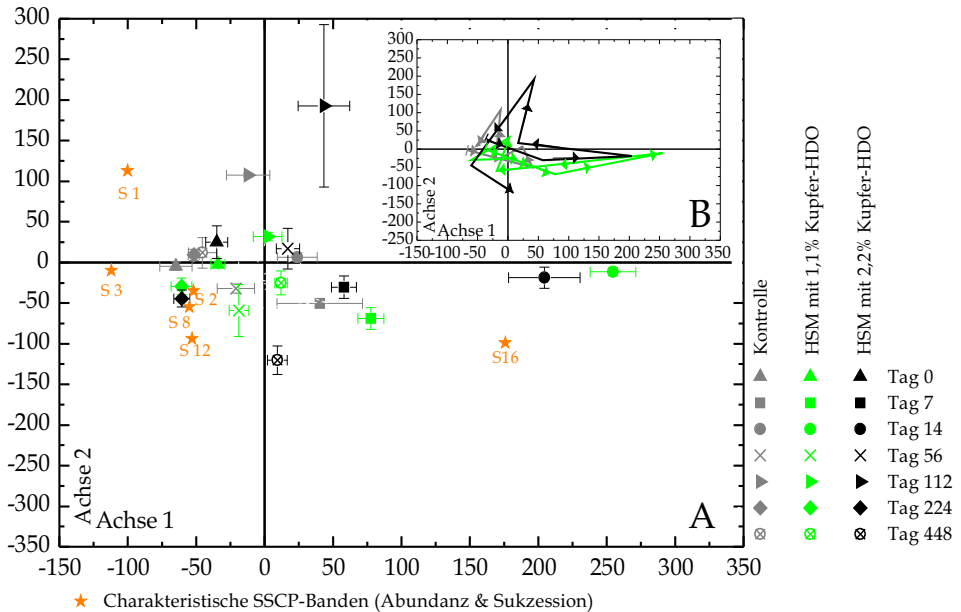
In einer KA wurden die Fingerabdruck-Muster in Form von SSCP-Banden anhand ihrer Ähnlichkeiten als Koordinaten in einem zweidimensionalen Ordinatendiagramm angeordnet. Die Achsen dieses Diagramms besitzen dabei keine Einheiten, da ausschließlich der Bezug der Punkte zueinander relevant war. Der Abstand zweier Punkte im Ordinatendiagramm steht stellvertretend für zwei eukaryontische Gemeinschaften und korreliert dabei mit der Ähnlichkeit dieser beiden Gemeinschaften. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden die Testansätze mit HSM-A (Abb. 42) und HSM-K (Abb. 43) in zwei verschiedenen Diagrammen dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Testansätze zu ermöglichen, wurden die Daten der Kontrollen in beiden Diagrammen gezeigt. Die Auswertung, in der KA, erfolgte mit allen generierten Daten der fünf Testansätze.

Die Fingerabdruck-Muster aller Testansätze die zum Inkubationstag 0 generiert wurden, gruppierten



**Abbildung 42:** A Korrespondenzanalyse (KA) der eukaryontischen Fingerabdruck-Muster der Testansätze HSM-A und der Kontrolle auf der 18S rRNA Ebene. Das Ordinatendiagramm basiert auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten  $\lambda_1 = 0,32$  und  $\lambda_2 = 0,30$ . Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der 5 unabhängigen Versuchsansätze. Zeitliche Veränderungen (in Pfeilrichtung) der Fingerabdruck-Muster. Sterne in orange beschreiben die Relevanten S-Banden (Veränderungen bezogen auf die Abundanz und Inkubationszeit).

in der KA in der Nähe zueinander (Abb. 42 und 43). Dies wies auf Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung der Gemeinschaften zu Beginn der Untersuchung hin. Von besonderem Interesse waren die Effekte des HDOs (HSM-K-l und HM-K-h) auf die mikrobielle Gemeinschaft.

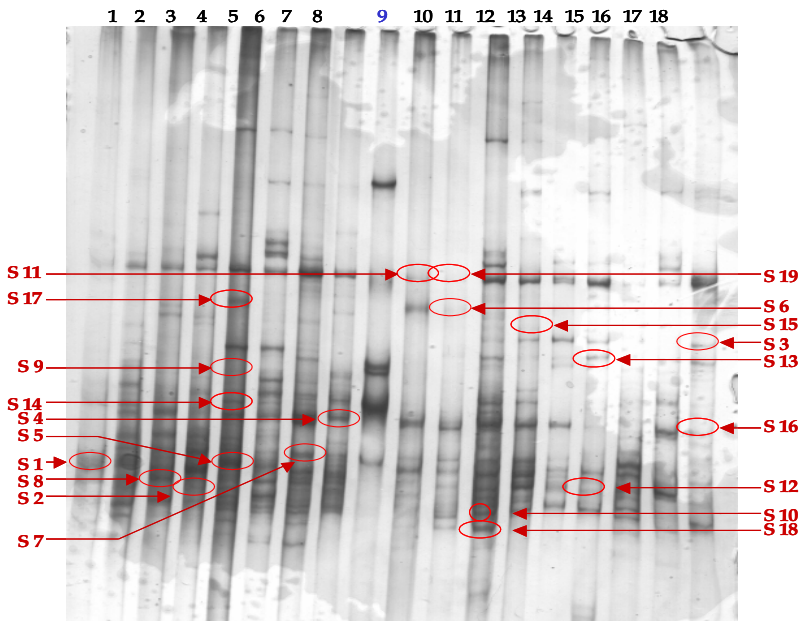


**Abbildung 43:** **A** Korrespondenzanalyse (KA) der eukaryontischen Fingerabdruck-Muster der Testansätze HSM-K und der Kontrolle auf der 18S rRNA Ebene. Das Ordinatendiagramm basiert auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten  $\lambda_1 = 0,32$  und  $\lambda_2 = 0,30$ . Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der 5 unabhängigen Versuchsansätze. **B** Zeitliche Veränderungen (in Pfeilrichtung) der Fingerabdruck-Muster. Sterne in orange beschreiben die Relevanten S-Banden (Veränderungen bezogen auf die Abundanz und Inkubationszeit)

Es konnte festgestellt werden, dass die Testansätze mit HSM-K-l und HM-K-h zueinander über die Zeit ähnlicher waren, als zur Kontrolle bzw. zu den Testansätzen mit HSM-A (vergl. Tage 14 und 112 in Abb. 42 und Abb. 43). Am Inkubationstag 448 waren die Fingerabdruck-Muster wieder den Fingerabdruck-Mustern die zu Tag 0 generiert wurden ähnlich (vergl. Abb. 42 B mit Abb. 43 B).

### 3.5.1.3 Entwicklung einzelner eukaryontischen OTUs über die Zeit und in Bezug auf die HSM-Zusammensetzung

Mittels des statistischen Verfahrens der Korrespondenzanalyse (KA) wurde die mögliche Veränderung der eukaryontischen Gemeinschaft über die Zeit und in Bezug auf die Verwendung diverser HSMs (Tab. 4) ausgewertet (Kap. 3.5.1.2). Aus dem Datensatz der Fingerabdruck-Muster erfolgte die Identifizierung der Banden im SSCP-Gel, die charakteristisch für die Veränderungen über die Inkubationszeit und HSM waren. Die S-Banden wurden nach folgenden Kriterien sortiert: (a) die Veränderungen der Abundanz und (b) die zeitlichen Veränderungen waren größer als 60 % zusätzlich (c) musste die S-Bande in allen Versuchsansätzen eines Inkubationszeitpunktes und einer HSM-Zusammensetzung vorhanden sein. Zur Gewinnung der insgesamt 17 S-Banden wurden die Proben, in deren Fingerabdruck-Muster die S-Banden auftraten, erneut in einem SSCP-Gel elektrophoretisch getrennt (Abb. 44).

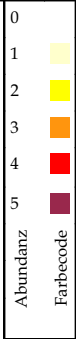


**Abbildung 44:** SSCP-Gel mit einzelsträngigen PCR-Produkten der 18S rRNA verschiedener Testansätze zur Isolierung der S-Banden. 1= Kontrolle Tag 0, 2 = Kontrolle Tag 14, 3= Kontrolle Tag 56, 4 = Kontrolle Tag 224, 5= HSM-A-I Tag 14, 6 = HSM-A-I Tag 56, 7 = HSM-A-I Tag 112, 8 = HSM-A-I Tag 224, 9 = Längenstandard (vergl. Abb. 21), 10 = HSM-A-h Tag 7, 11 = HSM-A-h Tag 14, 12= HSM-A-h Tag 56, 13 = HSM-A-h Tag 224, 14 = HSM-K-I Tag 112; 15 = HSM-K-I Tag 224, 16 = Standard Umweltprobe HSM-A-I Tag 112, 17 = HSM-K-h Tag 0, 18 = HSM-K-h Tag 224. Die roten Pfeile und mit Kreisen zeigen die S-Banden.

Die Veränderungen der S-Banden bezogen auf Abundanz und über die Inkubationszeit sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Durch die Isolierung der DNA der S-Banden aus der Gelmatrix mit anschließender Klonierung in einen Vektor und Sequenzierung der gewonnenen DNA, konnten die S-Banden phylogenetisch identifiziert werden (Tab. 23). Die zusätzliche Klonierung der DNA aus dem SSCP Gel war erforderlich, da in einer SSCP-Bande zum Teil auch mehrere unterschiedliche Banden enthalten sein konnten (vergl. Tab. 23). Diese wurden getrennt voneinander ausgewertet. Durch einen Datenbankvergleich mit der NCBI (=National Center for Biotechnology Information) konnten die ermittelten Sequenzen der einzelnen S-Banden taxonomischen Gruppen zugeordnet werden (Tab. 23). Zu jeder generierten Sequenz wurde die an nächsten verwandte Sequenz ermittelt (ATLSCHUL ET AL., 1997). Zuordnungen erfolgten nur bei Übereinstimmungen von über 95 % mit der Datenbank.

**Tabelle 23:** Zuordnung der S-Banden zu taxonomischen Gruppen. Verteilung der gemittelten Abundanz der 5 unabhängigen Versuchsansätze bezogen auf die **A** Testansätze-. **B** Inkubationszeit- der S-Banden.

Taxonomische Zuordnung	Phylum	A					S-	B										
							Bande <sup>1</sup>											
		Kontrolle	HSM-A-l	HSM-A-h	HSM-K-l	HSM-K-h		Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 56	Tag 112	Tag 224	Tag 448				
<i>Sphaerobolus stellatus</i>	Basidiomycota	■	■	■	■	■	S 1	■			■	■	■					
<i>Lecytophora multabilis</i>	Ascomycota	■	■	■	■	■	S 2	■	■	■	■	■	■	■				
<i>Pristionchus lheritieri</i>	Nematoda	■	■	■	■	■	S 3	■	■	■	■	■	■	■				
Eimeriidae	Alveolata	■	■	■	■	■	S 4	■	■	■	■	■	■	■				
Eimeriidae	Alveolata	■	■	■	■	■	S 5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■				
<i>Dimastigella trypaniformis</i>	Disicicrista	■	■	■	■	■	S 6	■	■	■	■	■	■	■				
<i>Korotnevela stella</i>	Amoebozoa	■	■	■	■	■	S 7	■	■	■	■	■	■	■				
Parlamyctes	Arthropoda	■	■	■	■	■	S 8	■	■	■	■	■	■	■				
<i>Diplogaster lethieri</i>	Nematoda	■	■	■	■	■	S 9 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■				
unc.* Euc		■	■	■	■	■	S 10	■	■	■	■	■	■	■				
unc.* Sordariales	Ascomycota	■	■	■	■	■	S 11 <sup>c</sup>	■	■	■	■	■	■	■				
unc.* Euc		■	■	■	■	■	S 12 <sup>d</sup>	■	■	■	■	■	■	■				
Eimeriidae	Alveolata	■	■	■	■	■	S 13	■	■	■	■	■	■	■				
Oxytrichidae	Ciliophora	■	■	■	■	■	S 14	■	■	■	■	■	■	■				
unc.* Euc		■	■	■	■	■	S 15 <sup>e</sup>	■	■	■	■	■	■	■				
Eimeriidae	Alveolata	■	■	■	■	■	S 16	■	■	■	■	■	■	■				
Oxytrichidae	Ciliophora	■	■	■	■	■	S 17	■	■	■	■	■	■	■				



<sup>1</sup>Die S-Banden wurden in absteigender Abundanz-Reihenfolge von 1 bis 17 angeordnet. \*unc. = unkultiviert Die hochgestellten Buchstaben (a-e) zeigen zusätzlich zu den oben genannten Sequenzen einer S-Bande an . a = *Allium thunbergii*, b = *Dimastigella trypaniformis*, c = *Pseudoplatyophyra nava*, d = *Andalucia godoi*, e = unc\*. Apicomplexan Clone MLBA29.65. Bei einer Übereinstimmung mit der Datenbank von 97 % wurde die Gattung und die Art angegeben, war die Übereinstimmung geringer und lag zwischen 95 - 97 % wurde nur die Gattung angegeben.

In den Kontrollen und zu den Inkubationstagen 0 und 7 waren die Gattungen *Sphaerobolus* (S 1) und *Lecytophora* (S 2) abundant. Beide Gattungen waren neben den unc. *Sordariales* (S 11) die einzigen pilzlichen OTUs.

Die Sequenzierung und ein anschließendes Alingmen (NCBI Nucleotide Blast: bl2seq) der DNA der Banden S 4, S 5, S 13, S 16 zeigte, dass die 4 Sequenzen dieser S-Banden identisch waren. Die höchste Homologie dieser Sequenz konnte zu den *Eimeriidae* des Phylums Apicomplexa ermittelt werden (Tab.

38). Die S-Banden S 14 und S 17 konnten der Gattung Oxytrichidae zugeordnet werden und waren in ihrer Sequenz identisch. Für die S-Banden S 5 (Eimeriidae), S 6 (*Dimastigella trypaniformis*), S 9 (*Diplogaster lethieri*), S 12 (unc. Euc ), sowie S 15 (unc. Euc ), konnte neben der in Tabelle 23 angegeben Sequenz, die durch das Sequenzieren von mindestens 3 unterschiedlichen Klonen bestätigt werden konnte, auch eine weitere Sequenz nachgewiesen werden. Ein Alignmen dieser „Zusatzsequenz“ mit der jeweiligen in der Tabelle 23 angegebenen Sequenz zeigte in keinem der Fälle eine Übereinstimmung von über 65 %.

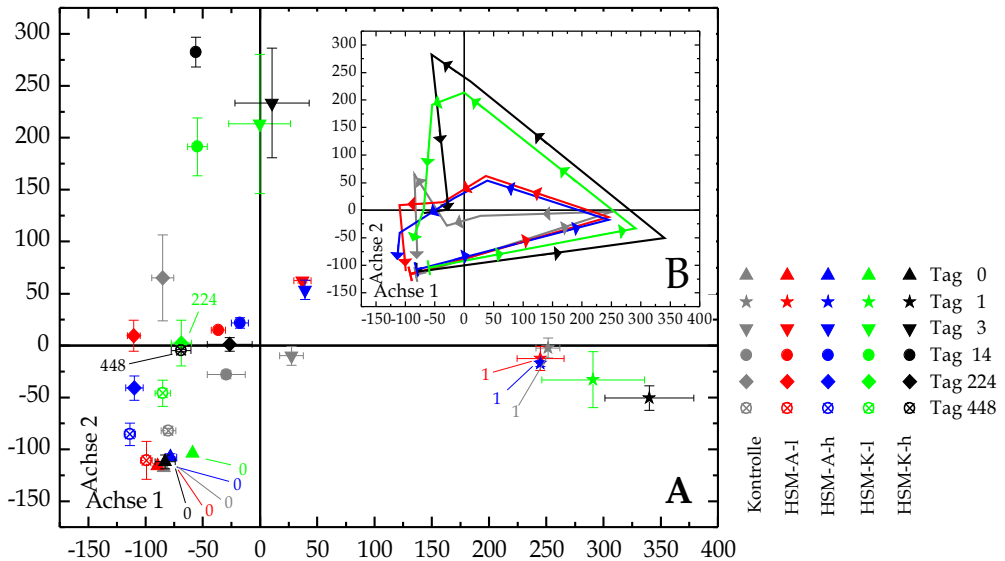
### 3.5.2 T-RFLP zur Bestimmung der Sukzession der bakteriellen-Gemeinschaft im Boden

Die bakterielle Sukzession wurde mit Hilfe der Fingerabdruck-Technik T-RFLP (Terminale-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus) untersucht. Für diese Untersuchung wurde die gleiche Gesamt-DNA aus dem Boden-Holzgemisch verwendet die zur Bestimmung der Sukzession der eukaryontischen Gemeinschaft isoliert und eingesetzt wurde. Die Sukzession der bakteriellen Gemeinschaft wurde an den Inkubationstagen 0, 3, 14, 224 und 448 mittels T-RFLP auf der 16S rRNA Ebene (mit den Primern fD1-FAM/907r, Tab. 9) untersucht. Insgesamt wurden zu diesen 5 Zeitpunkten, aus den 5 verschiedenen Testansätzen, mit jeweils 5 unabhängigen Versuchsansätzen. Insgesamt wurden 125 Profile analysiert und mittels einer KA (vergl. Kap. 3.5.1 ) ausgewertet (Abb. 45).

Mittels eines Monte-Carlo Permutationstests wurde die Signifikanz der Faktoren Inkubationszeit und HSM getestet. Die beiden Variablen (Zeit und HSM) wurden als erklärende Faktoren verwendet.

Die Fingerabdruck-Muster aller Testansätze die zum Inkubationstag 0 generiert wurden, gruppieren in der KA zueinander (Abb. 45A). Dies lässt auf eine sehr ähnliche bakterielle Ausgangsgemeinschaft schließen. An den Inkubationstagen 224 bis 448 befanden sich die Fingerabdruck-Muster aller Testansätze in der KA in der Nähe der Fingerabdruck-Muster die zum Inkubationstag 0 generiert wurden.



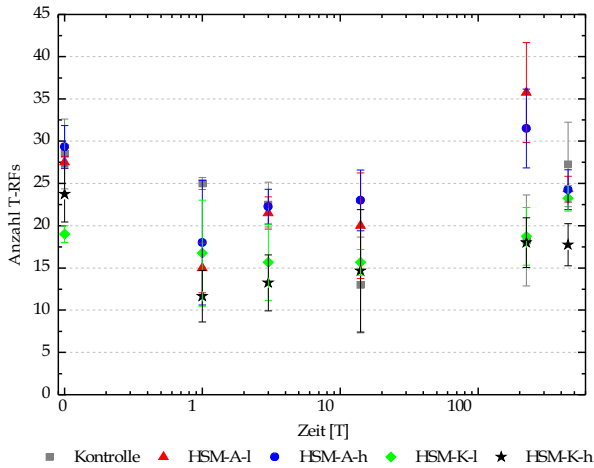


**Abbildung 45:** A Korrespondenzanalyse (KA) der bakteriellen Fingerabdruck-Muster der Testansätze mit HSM-Pr-Bo auf der 16S rRNA Ebene. Das Ordinatendiagramm basiert auf der ersten und zweiten Achse der KA mit den Eigenwerten  $\lambda_1 = 0.647$  und  $\lambda_2 = 0.52$ . B Übersichtsgrafik der zeitlichen Veränderungen, in Pfeilrichtung, der Fingerabdruck-Muster. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 5 unabhängigen Versuchsansätze.

### 3.5.2.1 Entwicklung einzelner für die Sukzession relevanter bakterieller OTUs

Die Sukzession der bakteriellen Gemeinschaft im Holz-Bodengemisch wurde mittels des statistischen Verfahrens der KA analysiert (Abb. 45). Es konnten insgesamt 194 unterschiedliche T-RFs mit einer Länge zwischen 58 - 927 bp ermittelt werden. Aus diesen T-RFs wurden unter Berücksichtigung folgender Kriterien die T-RFs bestimmt, die relevant für den Verlauf der Sukzession waren: (a) die relative Abundanz war im Mittel an den einzelnen Inkubationstagen größer als 1 % (b) über die Zeit, verglichen mit den gleichen Testansatz, wurden Änderungen von mindestens 5 % detektiert (c) das T-RF konnte in mindestens 75 % der Versuchsansätze nachgewiesen werden. Durch die Wahl dieser Kriterien wurden die für die bakterielle Sukzession nicht relevanten T-RFs entfernt. Insgesamt erfüllten 63 der detektierten T-RFs die Kriterien und wurden zur weiteren Berechnung der bakteriellen Diversität berücksichtigt (Abb. 46). Die Anzahl der unterschiedlichen T-RFs korreliert mit der Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaft (LIU, ET AL., 1997), hier analysiert im Boden-Holzgemisch. In den einzelnen Testansätzen konnten über die Zeit signifikante Unterschiede bei der Anzahl der T-RFs ermittelt werden (Statistische Auswertung mittels t-Test). Vergleiche der T-RF-

Anzahl der einzelnen Testansätze zueinander zeigte, dass die Gemeinschaften eines Inkubationstags mit Ausnahmen, signifikant gleich waren. Die Ausnahmen waren die Testansätze HSM-K-l und HSM-K-h am Inkubationstag 224, die signifikant zueinander, aber nicht zu den anderen Testansätzen waren und am Inkubationstag 448 war HSM-K-h signifikant unterschiedlich zu allen anderen Testansätzen.



**Abbildung 46:** Anzahl der T-RFs über die Inkubationszeit. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der 4 unabhängigen Versuchsansätze.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft in drei verschiedenen Modellsystemen als Folge des Eintrags von Holzschutzmitteln auf Basis von Kupfer-HDO über die Zeit verfolgt.

### 4.1 Welchen Einfluss üben die Textur und die chemischen Eigenschaften des Bodens auf die mikrobielle Gemeinschaft aus?

Die mikrobielle Gemeinschaft im Boden wird von den abiotischen Faktoren Bodenfeuchte, pH-Wert, Temperatur und Bodentextur beeinflusst. Zusätzlich wirken diverse biotische Faktoren (GISI ET AL., 1997). Es bestehen Wechselwirkungen zwischen den im Boden lebenden Organismen und den physikalisch-chemischen Zuständen im Boden (GISI ET AL., 1997). Um die Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft nachweisen zu können, die durch den Einfluss des Biozids entstanden sind, wurden die abiotischen Faktoren pH, Temperatur und Feuchtigkeit des Bodens über die gesamte Versuchsdauer durch den Einsatz von Vermikulit konstant gehalten. Die Organismen im Boden sind in die wichtigen Prozesse der Bodenbildung involviert, zusätzlich wird die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft vom Boden maßgeblich beeinflusst (GISI ET AL., 1997).

Der in dieser Arbeit verwendete Boden wurde nach der bodenkundlichen Kartieranleitung (1994) als schwach grobsandiger (gS), schluffiger (u), stark feinsandiger (fS), Mittelsand (mS) eingestuft (Kap. 3.1 und Tab. 16). Bedingt durch die geringe Korndichte des Sandes besaß der verwendete Boden eine geringe Wasserhaltekapazität (13 %) (Tab. 17). Die Korngröße der Bodenpartikel korreliert negativ mit der bakteriellen Gemeinschaft und hat so einen großen Einfluss auf die bakterielle Diversität im Boden (SESSITSCH, 2001). Durch eine hohe Korngröße, wie im Sandboden, wird ein größerer Anteil der Bodenbakterien durch Protozoen eliminiert und der Konkurrenzdruck durch Pilze ist im Sandboden höher als im Tonboden (SESSITSCH, 2001). Für das Wachstum vieler holzerstörender Pilze ist ein gravimetrischer Wassergehalt ( $W_g$ ) von mindestens 26 - 30 % notwendig (SCHMIDT, 2006). Besonders die materialzerstörenden Pilze wachsen jedoch optimal mit einer  $W_g$  von 65 % (KARTAL ET AL., 2004; SCHMIDT, 2006). Durch die zusätzliche Verwendung des Tonminerals Vermikulit, das keine Interaktion mit den Mikroorganismen im Boden eingeht, war es möglich, einen  $W_g$  von 50 % im Boden einzustellen und den pH-Wert konstant bei ca. pH 7 zu halten. Zusätzlich sind im Boden eine Reihe unterschiedlicher

Puffersysteme wirksam. Im vorliegenden Boden wurde ein Anteil von 0,3 % Karbonat nachgewiesen (Tab. 18), das zur Stabilisierung des pH-Wertes durch die Bindung freier Protonen beiträgt (SCHEFFER & SCHACHTENSCHNABEL, 2002).

Ein geringer pH-Wert im Boden beeinflusst neben den chemischen und physikalischen Bodeneigenschaften auch die biologische Diversität. Diese wird direkt oder indirekt durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen, das Bodengefüge und das Auftreten toxischer Schwermetallionen beeinflusst (SCHEFFER & SCHACHTENSCHNABEL, 2002). Für diese Arbeit war es essentiell, einen konstanten pH-Wert im Boden über die Zeit zu erhalten, da das verwendete Biozid Kupfer-HDO bei einem saurem pH-Wert ( $> \text{pH } 4$ ) nicht stabil ist und ausfällt (ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES, EVALUATION ON CU-HDO, 2005).

Die Verschiebung des pH-Wertes im Boden hat einen großen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft (FRIERER & JACKSON, 2006). Im sauren Milieu ist das Wachstum vieler holzzerstörender Pilze begünstigt (GISI ET AL., 1997; SCHMIDT, 2006; KARTAL, ET AL., 2004). Eine große Anzahl an Mikroorganismen, unter anderem auch viele holzzerstörende Pilze, verändern aktiv durch die Abgabe von Substanzen, wie z.B. Oxalsäuren, den pH-Wert im Boden (KARTAL ET AL. 2004). Durch die Wahl des Bodens, mit dem natürlichen Anteil an Karbonaten in Kombination mit der Beimischung von Vermikulit, wurden definierte Bedingungen geschaffen, die einen pH-Shift verringern.

Das C/N-Verhältnis im Boden ist ein Hinweis für die Abbaubarkeit von organischem Material im Boden (GISI ET AL., 1997). Im verwendeten Bodens lag das C/N Verhältnis mit ca. 11% zwischen 10 % und 15 % im Bereich des Mulls (Tab. 18) (GISI ET AL., 1997). Huminsäuren im Boden können Kupferionen im Boden binden. Die Stabilität des gebildeten Kupfer-Huminsäurekomplexes ist jedoch vom pH-Wert abhängig (GISI ET AL., 1997). Der Huminsäuregehalt des verwendeten Bodens wurde nicht bestimmt.

Holzzerstörenden Pilze und Bakterien können in jedem Boden gefunden werden. Jedoch ist es von den biotischen und abiotischen Faktoren abhängig, welche holzzerstörenden Organismen aktiv und prozessrelevant sind (NILSSON & EDLUND, 1995). Die Aktivität dieser Organismen ist aber in großem Maße von den Bedingungen im Boden abhängig (NILSSON & EDLUND, 1995). Allgemein gilt, dass die Bedingungen, denen diese Organismen z.B. in einem Freilandversuch ausgesetzt sind, von denen im Labor stark abweichen. Dennoch sind die dominierenden Gattungen im Laborversuch die selben (NILSSON & EDLUND, 1995).

Die Textur- und der pH-Wert des Bodens sowie die aktiven Mikroorganismen beeinflussen maßgeblich die Geschwindigkeit des Biozid-Abbaus (EDLUND & NILSSON, 1999).

## 4.2 Was passiert mit Kupfer-HDO im Boden?

Mit der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, wie weit und in welchem Zeitraum das Biozid Kupfer-HDO durch die mikrobielle Gemeinschaft in einem aktiven Sandboden degradiert wird. Die Konzentration des Kupfer-HDOs wurde mit  $5 \mu\text{g/g}$  in einer Größenordnung gewählt, mit der das Biozid aus einem behandelten Prüfkörper ausgewaschen werden könnte (ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES, EVALUATION ON CU-HDO, 2005). Generell ist die Auswaschung vom Kupfer-HDO, gemessen an der Kupfer-Konzentration, von der Konzentration des Biozids, vom Fixierungsmechanismus und vom Typ und dem Volumen-Oberflächenverhältniss des Prüfkörpers abhängig (HABICHT ET AL., 2003, MORSING & LINDEGAARD, 2003). In den ersten Wochen ist bei allen HSM der höchste Biozidverlust durch Auswaschung nachweisbar (MORSING & LINDEGAARD, 2004). Die Löslichkeit des Biozids in  $\text{H}_2\text{O}$  hat einen sehr großen Einfluss auf die Konzentration des ausgewaschenen Biozids (ORSLER & HOLLAND, 1993). Kupfer-HDO ist mit einer Löslichkeit von  $10 \mu\text{g/g H}_2\text{O}$  sehr schlecht wasserlöslich (GÖTTSCHE & MARX, 1989). Substanzen, die nur in geringen Konzentrationen in  $\text{H}_2\text{O}$  löslich sind, sind für Mikroorganismen nur begrenzt bioverfügbar und enzymatisch aufwendig zu assimilieren (RÖNNPAGEL ET AL, 1998). Zur Simulierung einer Akkumulation im Boden wurde in den Testansätzen mit Bi-Bo eine Biozidkonzentration von  $20 \mu\text{g/g}$  verwendet.

Zunächst wurde der Nachweis erbracht, dass HDO in Abwesenheit von lebenden Mikroorganismen im Boden stabil als Molekül überdauert und nicht durch chemische und physikalische Prozesse, durch Wechselwirkung mit der Bodenmatrix, zerfällt. Durch die Analyse der HDO-Konzentration der Testansätze mit  $5 \mu\text{g/g}$  und  $20 \mu\text{g/g}$  Kupfer-HDO über die Zeit in sterilisiertem Boden konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration des HDO-Moleküls konstant war (Kap. 3.1.1 und Abb. 15). Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass HDO im Boden nicht durch chemische oder physikalische Prozesse verändert wird und in gleichem Anteil aus der Bodenmatrix extrahierbar war. Da nur etwa 70 % des HDOs in Analysen mit Kupfer-HDO-Standard detektiert werden konnten, kann vermutet werden, dass ca. 30 % des Biozids unspezifisch im Boden gebunden werden und somit nicht extrahierbar waren. Dass Pestizide, die z.T. auch Kupfer enthielten, an die Bodenmatrix gebunden werden können, wurde bereits in einer Studie von VAN BEELEN UND DOELMAN (1997) bewiesen. Durch die Bindung des Kupfers an die Bodenmatrix wird auch dessen Toxizität z.B. gegenüber Mikroorganismen reduziert (VAN BEELEN & DOELMAN, 1997). Zusätzlich ist bekannt, dass verschiedene Böden Schwermetallionen, z.B. Kupfer, unterschiedlich stark binden können und somit die Metall Speziation unterschiedlich sein kann (BÄÄTH, 1992).

Zum Nachweis, ob Kupfer-HDO auch in einem aktiven Sandboden stabil ist oder abgebaut wird, wurden die HDO-Konzentrationen in den Testansätzen mit Bi-Bo (Kap. 3.2.1 und Abb. 17) über die Zeit quantifiziert. Es war bekannt, dass eine Reihe von organisch basierten Fungiziden sowohl von Bakterien, als auch von Pilzen im Boden abgebaut werden können (BRISCOE, ET AL., 1990, STEPHAN ET AL., 2001; WALLACE & DICKINSON, 2006). In der Studie von EDLUND & NILSSON (1999) wurde nachgewiesen, dass HSM auf der Basis von Kupfer-HDO degradiert wurden. Jedoch wurde auf die Quantifizierung der HDO-Konzentration aus messtechnischen Gründen verzichtet. In der gleichen Studie wurde zusätzlich bestimmt, dass Kupfer von großer Relevanz für einen generellen Schutz vor dem mikrobiellen Abbau ist. Zusätzlich besitzen Co-Fungizide (wie z.B. das HDO) einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit des Biozids (EDLUND & NILSON, 1999).

Die HDO-Konzentration in Testansätzen mit B-I-13 wurde innerhalb von 4 Tagen und in den Testansätzen mit B-H-13 innerhalb von 16 Tagen der Inkubation unter 1 µg pro Gramm feuchten Boden reduziert und konnte demnach nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 17 und Abb. 18). Es konnte daher nachgewiesen werden, dass das Biozid in den Testansätzen mit geringer Konzentration schneller abgebaut wurde als in Testansätzen mit hoher Konzentration. Folglich war die Geschwindigkeit des Abbaus des HDOs von der Biozidkonzentration abhängig. Diese Korrelation zwischen Biozidkonzentration und Abbaugeschwindigkeit konnte auch bei anderen HSM, wie z.B. CCA (Chrom Kupfer Arsen) oder BAC (benzalkonium chloride) beobachtet werden (EDLUND & NILSSON, 1999). Um einem schnellen Abbau vorzubeugen, wird Kupfer-HDO je nach Höhe der Gebrauchsklasse (GK 1 - GK 4), in die das HSM eingesetzt wird, mit Konzentrationen gearbeitet, die mit einem Faktor von 3 weit über den Schwellenwerten liegen (7 - 7,5 kg/m<sup>3</sup> in der GK 4 bei Formulierungen mit Kupfer-HDO, DIBt, 2009). Dieser Wert wird mit Hilfe pilzlicher Reinkulturen (Weißfäulepilze: *Coriolus versicolor* 2 kg/m<sup>3</sup> Kupfer-HDO und Moderfäulepilze: *Chaetomium globosum* 2,0 - 3,8 kg/m<sup>3</sup> Kupfer-HDO) bestimmt (GÖTTSCHE UND MARX, 1989).

Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit des HDOs zwischen den B-h-12 und B-h-13 Testansätzen, da das HDO in den B-h-13 Testansätzen trotz gleicher Biozidkonzentration schneller abgebaut worden ist (Abb. 17). Dies steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass alle angereicherten Verbindungen wie z.B. <sup>13</sup>C-Verbindungen bedingt durch das größere Molekulargewicht und damit langsameren Bindungsreaktionen und höherer Bindungsenergie gegenüber <sup>12</sup>C-Verbindungen diskriminiert werden (CARLE, 1991, MOOK & DE VRIES, 2005). Die genaue Ursache für den schnelleren Abbau des HDOs im B-h-13 ist nicht bekannt. Ein möglicher Grund könnte in den unterschiedlichen Wegen der Herstellung der beiden Modell-Biozide liegen.

Der Nachweis, dass es sich beim Abbau des HDOs um einen mikrobiellen Abbau handelte, wurde direkt und indirekt mit folgenden Ansätzen erbracht: (a) indirekt durch die Abnahme des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Boden (b) direkt durch die Identifizierung von  $^{13}\text{C}$ -angereichertem  $\text{CO}_2$  der Bodenemission und (c) indirekt anhand der Messung der Gesamtrespiration (d) direkt in den mikrobiellen PLFAs.

- (a) Das HDO als Anteil des Kupfer-HDOs wurde nur zum Teil vollständig bis zum  $\text{CO}_2$  abgebaut. Der größte Teil des HDOs wurde wahrscheinlich in der chemischen Zusammensetzung modifiziert und konnte anhand des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Boden nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr als HDO-Molekül (Kap. 3.2.2 und Abb. 19). Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert war bis zum Inkubationstag 64 für die Testansätze mit B-h-13 signifikant konstant. In den B-h-12 Testansätzen konnte ein natürlicher  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Bereich von -29 ‰ nachgewiesen werden (ZHANG ET AL., 2005). Dies lässt darauf schließen, dass die C-Atome des HDO-Moleküls im Boden in eine andere Molekülstruktur umgewandelt worden sind. Auch in den DAD-Chromatogrammen, die zur Bestimmung der HDO-Konzentration hergestellt wurden, wurden unbekannte Substanzen ab dem 16. Inkubationstag detektiert (Abb. 16A und Abb. 16B). Welche Molekülstruktur diese Substanzen besaßen konnte mit diesen Testansätzen nicht ermittelt werden.
- (b) Der mikrobielle Abbau des HDOs konnte durch die Analyse des respiratorisch vom Boden abgegebenen  $\text{CO}_2$  verfolgt werden. Nach 16 Inkubationstagen stieg der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im  $\text{CO}_2$  in den Testansätzen mit B-h-13 signifikant an, während der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in den Testansätzen mit B-h-12 konstant im natürlichen Bereich der Kontrollen blieb (Kap. 3.2.4 und Abb. 21). Da der im Boden enthaltenen  $^{13}\text{C}$ -Anteil zu 98,9 % von dem eingesetzten HDO stammt und die relative Häufigkeit des stabilen Isotops natürlicher Kohlenstoffverbindungen einen  $^{13}\text{C}$ -Anteil von ca. 1,11 ‰ (Atomprozent) besitzt (HARRIS & MANN, 1987), konnte somit ein Beweis erbracht werden, dass im Boden ein mikrobieller Abbau des HDOs erfolgt war.
- Im Respirationsprodukt  $\text{CO}_2$  konnte nach 16 Tagen ein signifikant erhöhter  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert gemessen werden. Wie bereits beschrieben, stammt der  $^{13}\text{C}$ -Anteil aus dem HDO. Der zeitliche Verlauf vom Beginn der Inkubation bis zum Nachweis signifikant erhöhter  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert lässt die Schlussfolgerung zu, dass zunächst ein Umbau des HDO-Moleküls vollzogen wurde und erst zu einem späteren Zeitpunkt die vollständige Abbau zum  $\text{CO}_2$  erfolgte. Mit der Detektion des  $^{13}\text{C}$ -Anteils im  $\text{CO}_2$  wurde auch der Nachweis erbracht, dass der 6er Kohlenstoffring des HDO-Moleküls bioverfügbar wurde und zum Teil zu  $\text{CO}_2$  degradiert und abgegeben wurde.

- (c) Über den gesamten Zeitraum wurde die gesamte CO<sub>2</sub>-Emission in Form von Respirationen gemessen (Abb. 20). Die Respiationsaktivität eines Bodens gibt Aufschluss über die Aktivität der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft (ANDERSON & DOMSCH, 1978) z.B. in mit Kupfer (MITTERER ET AL., 1981, NORDGREN ET AL., 1988) oder HSM belasteten Böden (HOFFMANN, 2002, WILKE & WINKEL, 1999). In den Testansätzen mit Bi-Bo wurde mittels eines IR-Gasanalytators die CO<sub>2</sub> Abgabe des mit Kupfer-HDO dotierten Bodens nach DIN ISO 17155:2003-06 gemessen (Kap. 3.2.3). Es wurde auf die Zugabe von zusätzlichen Substraten, wie Glukose, verzichtet um keine weiteren Kohlenstoffquellen in das System einzubringen und die Menge an gebildetem <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> berechnen zu können.

Zwischen den einzelnen Testansätzen konnten über die Zeit signifikante Unterschiede der CO<sub>2</sub>-Emission nachgewiesen werden. So gaben Böden mit einer hohen Biozidkonzentration in der Summe signifikant weniger CO<sub>2</sub> ab. Die Steigung bis zum Maximum und die Maxima selbst waren signifikant geringer als in den Testansätzen mit geringer Biozidkonzentration bzw. in der Kontrolle (Abb. 20). An der Steigung bis zum Maximum kann laut WILKE & WINKEL (1999) und NORDGREN ET AL. (1988) das mikrobielle Wachstum abgeleitet werden. Diese Steigung könnte jedoch auch durch eine gesteigerte CO<sub>2</sub>-Abgabe durch z.B. eine erhöhte Aktivität der Organismen ausgelöst werden und nicht zwingend ein Wachstum der Organismen bedeuten. Es spricht jedoch dafür, dass die Steigung bis zum Peakmaximum einen Hinweis auf ein Wachstum der Organismen gibt, da von LEITA ET AL. (1995) bekannt war, dass Kupfer einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum von Mikroorganismen hat. Dieser Effekt könnte in den Testansätzen mit Bi-Bo zu erkennen sein, wo die Steigung bis zum Maximum Aufgrund des Biozids, das Kupfer enthält, gehemmt war (Abb. 20). Da ein Wachstum der Organismen jedoch nicht nachgewiesen wurde, wurde der Anstieg bis zum Peakmaximum als Erhöhung der Aktivität der Organismen bezeichnet, was ein Wachstum der Zellen nicht ausschließt.

Die geringe Steigung am Maximum weist dann darauf hin, dass die Mikroorganismen im Boden mit hoher Biozidkonzentration in ihrer Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und zu den gering konzentrierten Testansätzen gehemmt waren. Auch anhand des niedrigeren Peakmaximums und der vergleichsweise geringeren kumulativen CO<sub>2</sub>-Emission wird nachgewiesen, dass das Biozid in Konzentrationen mit 20 µg/g, wie es in den Testansätzen mit B-h-12 und B-h-13 vorlag, einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft ausübte. In den Testansätzen mit B-l-13 wurde nachgewiesen, dass die Mikroorganismen in ihrer Aktivität nicht gehemmt wurden. In Anbetracht der Steigung bis zum Peakmaximum, das höher war als in den Kontrollen,



kann vermutet werden, dass das Kupfer-HDO einen verstärkenden Effekt auf die Aktivität der Mikroorganismen ausübt und eventuell als zusätzliches Substrat assimiliert wird.

Die ökotoxikologischen Auswirkungen von eingebrachten Schadstoffen in einem kohlenstofflimitierenden Boden sind schwerer zu identifizieren als in einem kohlenstoffreichen Boden, da viele Organismen in ihrer Aktivität, bedingt durch einen Nährstoffmangel, reduziert sind (VAN BEELEN & DOELMAN, 1997). Da es sich bei dem eingesetzten Boden um einen kohlenstoffarmen Boden handelte, sind die oben beschriebenen Resultate um so höher zu werten, da eine deutliche Hemmung zwischen den Kontrollen und den Testansätzen mit B-h12 und B-h-13 nachgewiesen werden konnten.

- (d) Die Gruppe der Mikroorganismen, die am Abbau des Biozids beteiligt war, oder durch den Einsatz des Biozids in ihrer Aktivität inhibiert wurde, konnte mit Hilfe der PLFA-Analyse ermittelt werden (Kap. 3.2.5 und Abb. 22). Die PLFA-Analysen lassen Aussagen zur Zusammensetzung dieser Gemeinschaft aufgrund von spezifischen PLFAs (Signaturfettsäuren) zu (TUNLID & WHITE, 1992; ZELLES, 1999; FROSTEGÅRD & BÅÅTH, 1996).

Die Ausgangsgemeinschaft wurde dominiert von Mikroorganismen mit den PLFAs 16:0 und 18:0, die in vielen Organismen nachgewiesen werden konnten (zusammengefasst von z.B. SPRING ET AL., 2000).

Die Fettsäure 16:0 (Palmitinsäure) wurde hauptsächlich in Ammonium-oxidierenden Bakterien detektiert (BLUMER ET AL., 1969), zusätzlich auch in Typ I methanotrophen Bakterien (SHRESTHA ET AL., 2008) und Eukaryonten nachgewiesen (SPRING ET AL., 2000). TREONIS ET AL (2004) beschrieben, dass es sich bei der PLFA 16:0 auch um ein Schlüsselintermediat des metabolischen Stoffwechselwegs der zellulären Fettsäure Biosynthese handeln könnte.

Stearinsäure (18:0) wurde hauptsächlich in Bakterien detektiert. Diese Fettsäure wurde auch in Eukaryonten festgestellt (SPRING ET AL., 2000). SHRESTHA ET AL. (2008) wiesen 18:0 in Typ II methanotrophe Bakterien nach.

Der Anteil dieser beiden PLFAs 16:0 und 18:0 war über die Zeit signifikant rückläufig. Dem gegenüber stieg der Anteil der PLFAs 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 7 und ECL 19.599 mit der Zeit signifikant an (Abb. 22).

Die PLFA 16:1 $\omega$ 7 ist eine Signaturfettsäure für Gram negative Bakterien (FROSTEGÅRD & BÅÅTH, 1996, TREONIS ET AL., 2004, ZHANG ET AL., 2005) und wurde schon als bakterieller Biomarker verwendet (KANDELER ET AL., 2000). Studien beschreiben zusätzlich die Detektierung dieser Fettsäure in

Eukaryonten (CAVIGELLI ET AL., 1995 oder FINDLAY, ET AL., 1983).

Die Fettsäure 18:1 $\omega$ 7 wurde als Signaturfettsäure für Bakterien nachgewiesen (FEDERLE ET AL., 1986, ZHANG, 2005), speziell für Gram negative Bakterien (ZELLES, 1997; TREONIS ET AL., 2004). SHRESTHA ET AL. (2008) UND QIU ET AL., (2008) wiesen 18:1 $\omega$ 7 in Typ II methanotrophen Bakterien nach. Eine Studie CAVIGELLI ET AL. (1995) erbrachte den Nachweis von 18:1 $\omega$ 7 in Eukaryonten.

Einen geringen Teil an der Gesamt-PLFA-Zusammensetzung nahmen die Fettsäuren 14:0, (Typ I methanotrophe Bakterien, WATZINGER, 2008), 15:0a, 15:0i und 17:0a (Gram positive Bakterien, O'LEARY & WILKINSON, 1988, FROSTEGÅRD ET AL. 1993 A, ZOGG ET AL., 1997, QIU, ET AL., 2008) ein.

Eine Signaturfettsäure für Gram negative Bakterien, die auch einen geringen Anteil an der PLFA-Zusammensetzung besaß, ist 16:1 $\omega$ 7t (RATLEDGE & WILKINSON, 1988; ZOGG ET AL., 1997; QIU, ET AL., 2008).

Mit geringem Anteil in den PLFA-Mustern wurden die Fettsäuren 22:1 $\omega$ 9, 19:1 $\omega$ 8, 17:1 $\omega$ 7, 14:1 $\omega$ 9 gefunden, die derzeit für keine Organismengruppe indikativ sind. Da diese Fettsäuren jedoch nur einfach ungesättigt und mit Ausnahme der 22:1 $\omega$ 9 unter 20 Kohlenstoffatome lang sind, kann dies als Hinweis für bakterielle-PLFAs gesehen werden (ZELLES, 1999). Generell stehen die Esterverbundenen einfach ungesättigten Fettsäuren (z.B.  $\omega$ 7  $\omega$ 8  $\omega$ 9) für Bakterien (ZELLES, 1999). CHEN ET AL., (2001) und RUESS ET AL. (2002) berichteten, dass Fettsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen von mehr als 20 Kohlenstoffatomen einen signifikanten Anteil von Lipiden aus Nematoden beinhalten. Es ist möglich, dass die PLFA 22:1 $\omega$ 9 Nematoden spezifisch ist. Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden häufiger in Eukaryonten gefunden als in Bakterien (ZELLES, 1999; SPRING, 2000).

Zusätzlich wurden in den Testansätzen mit Bi-Bo Fettsäuren detektiert, die keiner bekannten Fettsäure und damit auch keiner Organismengruppe zugeordnet werden konnten. Diese Fettsäuren wurden mit der Vorsilbe ECL. bezeichnet. Die nachfolgende Zahl gibt die Retentionszeit an.

Der Anstieg der PLFAs 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 ist ein Hinweis für die Veränderung der Gemeinschaft mit einer Zunahme der relativen Abundanz der Gram negativen Bakterien. Da die eukaryontische Signaturfettsäure 18:2 $\omega$ 6,9 (FEDERLE ET AL., 1986, PENNANEN, ET AL., 1996 BARDGETT ET AL., 1996) über die Zeit in ihrem Anteil an der PLFA-Zusammensetzung abnahm und nur als geringer Gesamtanteil nachgewiesen werden konnte (Abb. 22), ist es unwahrscheinlich, dass es sich um einen bei dem Anstieg der PLFAs 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 auch um einen Anstieg der

eukaryontischen Biomasse handelt. Da zusätzlich keine weiteren eukaryontischen Signaturfettsäuren, wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit über 20-Kohlenstoffatomen oder die eukaryontische Signaturfettsäuren 18:2 $\omega$ 6 (BARDGETT ET AL., 1996) detektiert werden konnten, ist das Ergebnis indikativ für eine Zunahme der Gram negativen Bakterien. Generell gilt, wenn „br“, „iso“ oder „aniso“ PLFAs detektiert werden, so ist dies ein guter Hinweis für Bakterien (ZELLES, 1997).

Die Bestimmung, welche Organismengruppen das HDO abgebaut haben, sollte durch die spezifische Assimilation von  $^{13}\text{C}$  angereichertem HDO in die mikrobiellen PLFAs erfolgen (Kap. 3.2.5, Abb. 23 und Abb. 24). Die PLFAs aus den Testansätzen mit B-h-12 zeigten keine Anreicherung ihres  $^{13}\text{C}$ -Wertes, da der natürliche  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in den PLFAs zwischen -30 % und -22 % über die Zeit konstant blieb, (ZHANG ET AL., 2005) (PLFAs der Kontrolle Tag 0) und sind deshalb als Referenz verwendet worden. Einzig in den PLFAs 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 erfolgte eine nicht signifikante Anreicherung. Ein Grund dafür, dass kein  $^{13}\text{C}$  in den mikrobiellen PLFAs nachgewiesen werden konnte, könnte an der geringen eingebrachten Konzentration an  $^{13}\text{C}$ -Substrat liegen (20  $\mu\text{g/g}$  Biozid im feuchten Boden).

Eine Fehlerquelle der SIP-Methode ist das sogenannte „cross-feeding“. Cross-Feeding kann entstehen, wenn der Konsument des Substrats durch einen höheren Organismus assimiliert wird oder stirbt und seine Biomasse von anderen Organismen assimiliert wird. Die so erfolgte Verschleppung des Signals wurde sowohl bei Nukleinsäure-SIP (DERITO, ET AL., 2005; RADAJEWSKI ET AL., 2003; WATANABE ET AL., 1998) als auch bei SIP-PLFA nachgewiesen (LERCH ET AL., 2009). Die Anreicherung kann in der Biomasse von primär nicht substratkonsumierenden Organismen nachgewiesen werden.

Die Wahrscheinlichkeit dieser Signalverschleppung steigt mit der Inkubationszeit und mit dem Grad der Anreicherung des Substrats (DERITO, ET AL., 2005). So wurde in Studien von MORRIS ET AL., 2002 und RADAJEWSKI ET AL., 2003 ermittelt, dass „cross-feeding“ je nach Inkubationsbedingungen ab einem Inkubationszeitraum von > 40 Tagen auftreten kann. In SIP-PLFA Studien konnte eine Anreicherung der 18:2 $\omega$ 6,9 detektiert werden, die die Autoren auf „cross-feeding“ zurückführten (SHERESTA ET AL., 2008). Eine Signalverschleppung konnte aber auch in Gram positiven Organismen nachgewiesen werden (DERITO, ET AL., 2005).

Die Proben zur Analyse der PLFAs der Testansätze mit Bi-Bo wurden nach max. 32 Tagen entnommen, so dass eine Signalverschleppung nicht wahrscheinlich ist.

In einem weiteren Versuch (Kap. 3.3 ) sollte die Konzentration des Kupfer-HDOs auf 200 µg pro Gramm feuchten Boden erhöht werden, um eine höhere Konzentration an <sup>13</sup>C-Substrat einzubringen und die Wahrscheinlichkeit einer Markierung der mikrobiellen PLFAs zu erhöhen. Zusätzlich wurde der Fokus auf die Untersuchung des mikrobiellen Abbaus des Biozids Kupfer-HDO in einem HSM in Holzspänen im Boden gelegt.

### 4.3 Was passiert mit Kupfer-HDO als Bestandteil einer HSM-Formulierung im Boden-Holzgemisch?

In den Testansätzen, in denen Kupfer-HDO als Bestandteil einer Holzschutzmittelformulierung im Holz in den Boden eingebracht wurde, konnte ein Abbau des Biozids nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1 und Abb. 25). Dieser Abbau war jedoch nicht vollständig, so dass nach Ablauf der Inkubationszeit von 105 Tagen je nach Testansatz 75 - 80 % des eingebrachten Biozids als HDO-Molekül detektierbar waren (Abb. 26).

Es wurde anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zu den verschiedenen Inkubationszeiträumen im Boden gemessen, ob HDO oder eventuell dessen Metabolite noch im Boden vorhanden waren. Es zeigte sich, dass über die gesamte Versuchsdauer keine signifikante Reduktion der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte messbar war. Da jedoch die Konzentration des HDOs mit der Zeit rückläufig war, können im Boden andere Substanzen entstanden sein, wenn die Extrahierbarkeit des HDOs konstant geblieben war. Auch in den DAD-Chromatogrammen, die zur Bestimmung der HDO-Konzentration hergestellt wurden konnten neue unbekannte Substanzen detektiert werden. Ob es sich bei diesen Substanzen um Umbauprodukte oder Metabolite des HDOs handeln könnte, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zwischen den beiden Testansätzen HSM-12 und HSM-13 konnte analog zum Abbau des Biozids im Boden (vergl. Abb. 25 mit Abb. 17) eine Diskrepanz in der Abbaugeschwindigkeit nachgewiesen werden. Erneut wurde das HDO in den Testansätzen mit HSM-13 schneller abgebaut, als in den Testansätzen mit HSM-12. Auch hier ist der Grund unbekannt (siehe Kap. 4.2).

Der Nachweis, dass es sich beim Abbau des HDOs um einen mikrobiellen Abbau handelt, wurde direkt und indirekt mit folgenden Ansätzen bestimmt: (a) direkt durch die Identifizierung von  $^{13}\text{C}$ -angereichertem  $\text{CO}_2$  der Bodenemission (b) indirekt anhand der Messung der Gesamtrespiration und (c) direkt in den mikrobiellen PLFAs.

- (a) Der mikrobielle Abbau des HDOs konnte analog zu Kap. 4.2 durch die Analyse des respiratorisch vom Boden abgegebenen  $\text{CO}_2$  verfolgt werden (Abb. 29). Nach 32 Inkubationstagen stieg der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im  $\text{CO}_2$  in den Testansätzen mit HSM-13 signifikant an, während der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in den Testansätzen mit HSM-12 konstant im Bereich der Kontrollen blieb (Abb. 29). Die Bedeutung dieses Phänomens wurde bereits ausführlich in Kap. 4.2 Abschnitt (b) erläutert. Im Vergleich zu den Testansätzen mit Bi-Bo (Kap. 4.2) konnte in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo ein ca. 3-fach höherer  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im  $\text{CO}_2$  detektiert werden (vergl. Abb. 21 mit Abb. 29). Dies könnte mit der erheblich höheren Gesamt-Respiration, bedingt durch den Holzeintrag, begründet

werden. Die Abbauraten waren in den Testansätzen HSM-12 und HSM-13 verglichen mit den Testansätzen mit Bi-Bo verlangsamt. Der Abbau des Biozids verlief langsamer als in den Testansätzen mit Bi-Bo, in denen keine zusätzliche Formulierungen mit eingeführt wurden (vergl. Abb. 17 mit Abb. 25). Ein Grund für diesen verlangsamteten Abbau könnte in der vergleichsweise höheren Biozid-Konzentration in Kombination mit der Verwendung von Holz als Trägermaterial und zusätzlicher C-Quelle liegen. Eine höhere Biozidkonzentration führt in vielen Fällen zu einem verlangsamteten Abbau und erfordert den Einsatz höherer Konzentrationen an HSM für Holz in potentiell gefährdeten Bereichen (z.B EDLUND & NILSSON, 1999, DIBT, 2009).

Das Kupfer-HDO wurde nach dem Einbringen im Holz in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo konditioniert. Die Fixierung führt zu einer Bindung des Biozids an das Holz und dadurch zu einer Stabilisierung (GÖTTISCHE & MARX, 1989). Es wäre denkbar, dass das Kupfer-HDO im Holz in einer Form vorliegt, die nicht, oder nur in geringem Maße biologisch-verfügbar ist.

- (b) Die Messung der Gesamt-Respiration (bestimmt anhand der CO<sub>2</sub> -Emission) wurde auch in diesen Testansätzen zur Visualisierung der Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Kupfer-HDO, in diesem Fall als Bestandteil eines HSMs im Holz-Bodengemisch, verwendet.

Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen (HSM-0) und den Testansätzen mit HSM-12 und HSM-13 in der Abgabe von CO<sub>2</sub> nachgewiesen. Da sich HSM-12 und HSM-13 im Vergleich zu HSM-0 durch den Zusatz von Kupfer-HDO unterschieden, bedeutet dies, dass auch hier die Respirationsaktivität durch das Biozid gehemmt war. Dies konnte durch Vergleiche des Peakmaximums, der Steigung bis zum Peakmaximum und der Gesamt CO<sub>2</sub>-Produktion bestimmt werden (vergl. Kap. 4.2).

Bedingt durch den Eintrag von Holz als Substrat war die generelle Respirationsaktivität im Vergleich mit den Testansätzen ohne Holz höher (vergl. Kap. 4.2). Die Zugabe von Holz hat allgemein einen Effekt auf die (Erhöhung der) CO<sub>2</sub>-Emission des Bodens (STEPHAN, & MIERKE, 2006). So gaben die Böden mit Holz etwa 20-fach mehr CO<sub>2</sub> ab, als die Böden ohne Zusatz von Holz (vergl. Kontrollen, Abb. 20 mit Abb. 27). Trotz der Erhöhung der Biozidkonzentration war die CO<sub>2</sub>-Abgabe deutlich höher als in den Testansätzen, in denen kein Holz verwendet wurde (vergl. Abb. 20 mit Abb. 27). Dennoch kann geschlossen werden, dass das Biozid Kupfer-HDO die Aktivität der Mikroorganismen im Boden hemmt.

- (c) Die Identifizierung der aktiv am Abbau des Biozids beteiligten bzw. der durch die HSMs in ihrer Aktivität inhibierten mikrobiellen Gruppen erfolgte analog zu Kap. 4.2 mittels der Analyse der PLFAs. Viele der detektierten Fettsäuren wurden bereits in Kap. 4.2 auf der Seite 115 ausführlich erläutert. An dieser Stelle werden nur noch zusätzliche PLFAs oder interessante PLFA Veränderungen eingehender beschrieben.

Die Ausgangsgemeinschaft wurde dominiert von den Fettsäuren 16:0 und 18:0 (Bakterien und Eukaryonten (Abb. 30 und Tab. 22) deren Anteil über die Zeit jedoch signifikant abnahm. Es konnte ein signifikanter Anstieg der PLFAs 18:1 $\omega$ 7 (Bakterien, Seite 115), 16:1 $\omega$ 7 (Bakterien, Seite 115), 17:1 $\omega$ 6 und 19:0d8,9 detektiert werden. Die Fettsäuren 17:1 $\omega$ 6 sowie cy19:0d8,9 wurden bereits in Gram negativen Bakterien detektiert (QIU ET AL., 2008).

Im Gegensatz dazu sank der Anteil bei den PLFAs 19:1 $\omega$ 8 und 17:0a signifikant. Alle in Kapitel 4.2 beschriebenen PLFAs wurden auch in diesen Testansätzen gefunden. In welchen Organismen die Fettsäure 19:1 $\omega$ 8 integriert ist, ist nicht bekannt. Eine Zuordnung zu den bakteriellen PLFAs wäre denkbar, da in diesen oft einfach ungesättigte Fettsäuren mit  $\omega$ 8 gefunden werden konnten (ZELLES, 1999). Die PLFAs 3-OH-16:0, 17:0; 17:1 $\omega$ 7i, 18:0i konnten den Bakterien zugeordnet werden (CAVIGELLI, 1995; ZELLES ET AL., 1993; ZELLES, 1999). Die eukaryontische Signaturfettsäure 18:2 $\omega$ 6,9 (FROSTEGÅRD & BÅÅTH, 1996) wurde nur mit geringem Anteil an der Gesamt-PLFA Zusammensetzung detektiert und war in ihrem Anteil über die Zeit rückläufig. Dies deutet auf eine geringe Präsenz von Eukaryonten in der Gemeinschaft hin.

Der Boden im Experiment war mit 200  $\mu$ g/g Kupfer-HDO, verglichen mit anderen Bodenstandorten, gering mit Kupfer kontaminiert (KANDELER ET AL., 2000; BÅÅTH ET AL., 1998). Dennoch können Bezüge zwischen der Kupfer-Konzentration und der Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit getroffen werden. Der Kupfergehalt liegt in Böden die nicht durch antropogene Faktoren, wie z.B. in Böden im Weinanbau, beeinflusst wurden zwischen 5-35  $\mu$ g Kupfer in einem Gramm feuchten Boden (GISI ET AL., 1997). Von Böden, die mit Kupfer kontaminiert sind ist bekannt, dass sich im Boden vermehrt Gram negative Organismen durchsetzen (Doelman et al., 1985; Doelman & Haanstra, 1979; Duxbury & Bicknell, 1983; Hiroki, 1992). Diese Entwicklung unterstützt die Vermutung, dass die PLFAs 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo bakteriellen Ursprungs sind und sich die Gemeinschaft durch eine Erhöhung der relativen Abundanz der Gram negativen Bakterien verändert.

In einer Studie von TUNLID & WITHE, (1992) wurden in einem mit Kupfer kontaminierten Boden entgegen der Ergebnisse dieser Arbeit und der zitierten Studien (siehe oben), eine Erhöhung der relativen Abundanz der Gram positiven Bakterien festgestellt werden. PENNANEN, ET AL. (1996)

wiesen nach, dass Kupfer stärker inhibierend auf den pilzlichen, als auf den bakteriellen Anteil Biomasse wirkt. Viele Studien zeigten demgegenüber, dass andere Schwermetalle wie Cadmium oder Zink weniger toxisch auf Pilze, als auf Bakterien wirken (Jordan & Lechevalier, 1975; Babich & Strotzki, 1977).

Einige Pilze werden auch zum Abbau von HSM im Boden eingesetzt. Als Beispiel können *Fomitopsis palustris*, *Coniophora puteana* oder *Leatiporus sulphureus* angeführt werden, die unter anderem CCA (Chrom-Kupfer-Arsen, ein HSM) abbauen können (KARTAL ET AL., 2004).

Eine Möglichkeit, warum Gram negative Bakterien toleranter gegenüber Schwermetallen sind als Gram positive, liegt in der Zellwand. Projekte mit isolierten Zellwänden zeigen, dass Gram positive Organismen mehr Schwermetalle binden als Gram negative (URRITA, 1997). Der Grund hierfür könnte in der höheren Komplexationskapazität von Gram positiven Zellen liegen (MULLEN ET AL., 1989).

Anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in den mikrobiellen PLFAs konnte eine direkte Assoziation zwischen Substrat und Konsument hergestellt werden. Wenn in den Signatur-PLFAs eine erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung festgestellt wurde, so wurden Organismen, die diese PLFAs enthielten, als Konsumenten des HDO charakterisiert (Kap. 3.3.5).

Anhand der PLFA-Zusammensetzung konnten Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft von einer durch die Fettsäuren 16:0 und 18:0 (Bakterien und Eukaryonten) zu einer vermehrt durch Bakterien dominierten Gemeinschaft (16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7) festgestellt werden. Die höchsten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte konnten in den PLFAs (ECL.18645) > 18:1 $\omega$ 7 > 16:1 $\omega$ 7 > 19:0d8,9 > 18:0 > 16:0 (Abb. 32) nachgewiesen werden. Da die Fettsäure ECL.18645 mit nur einem Prozent einen geringen Anteil an der PLFA-Gesamtzusammensetzung hatte, wird diese in der weiteren Diskussion nicht betrachtet. Die höchste  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung war demnach in den in Bakterien predominant vorkommenden PLFAs 18:1 $\omega$ 7 und 16:1 $\omega$ 7. Auch die 19:0d8,9 ist in den bakteriellen PLFAs nachgewiesen worden (siehe Seite 115 ff). Dieser Nachweis legt die Schlussfolgerung nahe, dass am mikrobiellen Abbau des HDOs primär Bakterien involviert waren.

Das für die Testansätze mit Bi-Bo beschriebene Phänomen des „cross-feeding“ (vergl. Seite 110) besitzt in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo eine vergleichsweise hohe Relevanz, da die Inkubationszeit mit max. 105 Tagen sehr viel länger gewählt wurde. In Studien von DE RITO, ET AL. (2005) oder RADAJEWSKI ET AL. (2003) war nachgewiesen worden, dass auch in den Sekundärkonsumenten ein  $^{13}\text{C}$ -Signal detektiert werden konnte. Im HSM-Ho-Bo-Testansatz konnte erst nach 32 Tagen der Inkubation  $^{13}\text{C}$  angereichertes  $\text{CO}_2$  detektiert werden. Erst nach 64



Inkubationstagen erfolgte jedoch eine relative Erhöhung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Emission (Abb. 29). Es ist daher wahrscheinlich, dass zuvor noch kein  $^{13}\text{C}$  angereichertes HDO von den Mikroorganismen assimiliert wurde, da mit der Abgabe von Teilen des Substrats als  $\text{CO}_2$  auch eine Integration in die Biomasse verbunden sein kann, wenn das HDO nicht nur katabolisch, sondern auch anabolisch umgesetzt wurde.

Erst nach 32 Tagen konnte eine Erhöhung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im  $\text{CO}_2$  detektiert werden. Dadurch wurde wahrscheinlich auch die Intergration in die PLFAs und somit ein mögliches „cross-feeding“ zeitlich verzögert. Zusätzlich war im Boden ein weit höherer Anteil an  $^{12}\text{C}$ -Molekülen vorhanden ( $7 \text{ mg } ^{12}\text{C}/ 1 \text{ g Boden}$ ), was zu einer Verdünnung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes in den PLFAs führte. Es ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich diese im Boden vorliegenden  $^{12}\text{C}$ -Moleküle zum Teil besser bioverfügbar sind als die  $^{13}\text{C}$ -Moleküle des Biozids. Es ist des weiteren bekannt, dass  $^{13}\text{C}$ -Moleküle gegenüber den  $^{12}\text{C}$ -Molekülen in chemischen Reaktionen diskriminiert werden (CARLE, 1991). All diese Aussagen legen die Wahrscheinlichkeit nahe, dass der „cross feeding“ Effekt nur einen geringen Einfluss auf die Resultate der Analyse besaß.

In Vergleichen zwischen den Experimenten vom Abbau von Kupfer-HDO im Boden (Kap. 3.2 mit Kap. 3.3) mit dem Abbau vom Kupfer-HDO im HSM im Boden konnte festgestellt werden, dass sich über die Zeit ähnliche PLFA-Zusammensetzungen durchgesetzt hatten (vergl. Abb. 22 mit Abb. 30). Die Veränderungen über die Zeit waren jedoch in den Testansätzen mit Holz vergleichsweise deutlicher. So konnte z.B. bezüglich der PLFAs 16:0 und 18:0 ein stärkerer Rückgang nachgewiesen werden. Die Fettsäure 19:0d8,9 hingegen konnte in den Testansätzen mit Kupfer-HDO im Boden nicht nachgewiesen werden. Sie könnte daher in Verbindung zu Bakterien, die durch das Substrat Holz stimuliert worden sind, stehen.

Es ist wahrscheinlich, dass durch die höhere Biozid- bzw. Kupfer-Konzentration in Zusammenhang mit weiteren Substanzen aus dem HSM ein größerer Selektionsdruck auf die Organismen im Boden ausgeübt wurde (BÄÄTH, 1992). Der Selektionsdruck könnte dazu führen, dass sich spezielle Gruppen durchsetzen konnten. Dies lässt sich daran aufzeigen, dass die PLFAs 16:1ω7 und 18:1ω7 zu Beginn beider Versuche nicht nachgewiesen werden konnten.

Anhand der Unterschiede in der gesamten PLFA-Zusammensetzung der beiden Experimente zeigte sich, dass wahrscheinlich durch die Verwendung von Holz als Trägermaterial für das HSM gleich zu Beginn eine sehr viel diversere Gemeinschaft im System vorhanden war. Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ohne den Einfluss eines HSMs über die Inkubationszeit zu charakterisieren, wurden die PLFAs der Testansätze mit HSM-0 analog zu den Testansätzen mit HSM-12 bzw. HSM-13 extrahiert. Durch einen technischen Fehler bei der

Extraktion war es nicht möglich die Fettsäuren zu isolieren und zu charakterisieren. Durch die geringen Probenmengen, die zur Verfügung standen, war eine Wiederholung des Experimentes nicht möglich.

Die detektierten mikrobiellen Gemeinschaften beider Versuche mit Bi-Bo und HSM-Ho-Bo zeigen große Ähnlichkeiten zu Gemeinschaften, die in Studien von TREONIS (2004), SHERESTA, 2008 und CHEN, 2008 nachgewiesen werden konnten. In den beiden letztgenannten Studien setzten sich Organismen mit den Fettsäuren 16:1 $\omega$ 7 und 18:1 $\omega$ 7 durch und in diesen PLFAs konnten auch die höchsten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte detektiert werden. Durch die Verwendung von isotopisch markiertem Kohlenstoff des Methans als einziger markierter C-Quelle konnten diese Organismen als methanotrophe Bakterien eingeordnet werden. Da in den vorliegenden Experimenten jedoch nicht mit Methan als C-Quelle gearbeitet wurde, kann nur spekuliert werden, ob methanotrophe Organismen am Abbau des Kupfer-HDOs beteiligt waren. In allen oben genannten Studien von TREONIS (2004), SHERESTA, 2008 und CHEN, 2008 konnte jedoch ein größerer, eukaryontischer Anteil an der gesamt PLFA Zusammensetzung, vertreten durch die PLFA 18:1 $\omega$ 6,9, detektiert werden.

#### **4.4 Wie wird Kupfer-HDO im HSM im Holzprüfkörper im Bodenkontakt abgebaut?**

Um den Kupfer-HDO-Abbau in den Holzprüfkörpern analysieren zu können, wurde das Biozid mittels Vollholztränkung in die Prüfkörper eingebracht (Kap. 2.10.1 ) [DIN EN 113]. Über die tangentielle Aufspaltung der Prüfkörper in die Schichten 0 - 2 mm, 2 - 4 mm und Zentrum (7 x 17 mm) konnten Aussagen zur räumlichen Verteilung des Kupfers und des HDOs in den Prüfkörpern getroffen werden (Abb. 33 und Abb. 34). So befanden sich in den äußeren 2 mm der Prüfkörper in allen Testansätzen die höchste Kupfer- und auch die höchste HDO-Konzentration. Dieser Trend konnte bereits von JÜNGEL (2002) nachgewiesen werden.

Die geringfügigen Unterschiede im Penetrationsverhalten zwischen den Formulierungen mit Kupfer-Amin und Kupfer-HDO könnten auf die verschiedenartigen Amine (Liganden) in den Bioziden zurückzuführen sein. Das Penetrationsverhalten und die Diffusion von Kupfer-Aminen im Holz wird von der Art des Liganden bestimmt (ZHANG & KAMDEM, 1999). Das Verhältnis von Kupfer zu HDO sollte in einem Kupfer-HDO Komplex ca. 82 % HDO zu 18 % Kupfer sein (Tab. 4). Es konnte jedoch eine mehr als doppelt so hohe Kupfer- wie HDO-Konzentration nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte der Überschuss an Kupfer sein, der in den Tränklösungen enthalten war. Die erhöhte Kupfer-

Konzentration soll garantieren, dass sich Kupfer und HDO im Holz zu einem Komplex zusammenfinden. Zusätzlich ist der Nachweis von Kupfer aus Holz mit annähernd 100 % besser als der von HDO mit 92 % - 95 % (BAM, hausinterne Detektionsrate).

In den Holzprüfkörpern mit Bodenkontakt wurde der Abbau des Biozids zum Einen anhand der HDO-Konzentration und zum Anderen anhand der Kupfer-Konzentration verfolgt. Über die Inkubationszeit konnte in den Proben mit HSM-K-l eine signifikante Abnahme der HDO-Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 36), was auf einen mikrobiellen Abbau des HDOs hinweisen kann. In den höher konzentrierten Proben (HSM-K-h) konnte ein ähnlicher Trend verfolgt werden, die Abnahme der HDO-Konzentration war jedoch, bedingt durch eine geringe Konzentration zum Inkubationstag 3, nicht signifikant (Abb. 36). Ein Grund, warum die HDO-Konzentration am 3. Inkubationstag abgesunken war ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre eine Umstrukturierung, wie sie in Punkt (b) auf Seite 126 beschrieben ist. Die Kupfer-Konzentration war demgegenüber über die Inkubationszeit in allen Testansätzen konstant.

Der Verlust an HDO kann auf (a) Auswaschung aus dem Prüfkörper, (b) Umverteilung des Biozids im Holz oder (c) einen mikrobiellen Abbau zurückgeführt werden.

- (a) Das Auswaschverhalten ist u.a. abhängig von den Faktoren Holzmaß, Feuchtigkeit und der Fixierung im Holz. Maßgeblichen Einfluß besitzt auch die Art des HSMs (EDLUND & NILSSON, 1999; HABICHT ET AL., 2003). Im vorliegenden Fall besitzt der DIN EN 113 Prüfkörper eine große Oberfläche im Vergleich zum Volumen, was die Auswaschung des HSMs begünstigt (HABICHT ET AL., 2003; TEMIZ ET AL., 2004).

In allen analysierten Testansätzen mit HSM-Pr-Bo nahm der Prüfkörper über die Inkubationszeit durch die Aufnahme von H<sub>2</sub>O an Gewicht zu. Dies lässt die Vermutung zu, dass es nicht gegen den Wasserstrom zu einem großen Austritt an HDO gekommen war. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass in keinem der 4 Testansätze mit enthaltenem HSM ein Konzentrationsabfall in der Kupfer-Konzentration nachgewiesen werden konnte (Abb. 35). Nach GÖTTSCHE UND MARX (1989) bilden Kupfer und HDO am Holz durch die Fixierung einen stabilen Komplex. Dementsprechend sollte es bei einem Verlust von Kupfer auch zum HDO Verlust kommen. Gegen einen Verlust des HDOs durch Ausschwemmung spricht auch die Tatsache, dass der größte Teil eines HSMs generell und speziell auf Kupfer-HDO Basis in den ersten Wochen nach Tränkung aus dem Holz entweicht (MORSING & LINDEAARD, 2004). In diesem Versuch war jedoch eine kontinuierliche Abnahme über die Zeit nach längerer konstanter Konzentration auszumachen.

- (b) Die Erklärung des HDO-Verlustes durch Umstrukturierung des Kupfer-HDOs im Holz kann nicht ausgeschlossen werden (EDLUND & NILSSON, 1999), da die Konzentration des Biozids nicht ubiquitär im Holz verteilt vorlag (Abb. 33 und Abb. 34). Wird jedoch wieder die konstante Kupfer-Konzentration als Referenz herangezogen und die Fixierung im Holz berücksichtigt, so ist eine Umstrukturierung unwahrscheinlich.
- (c) Bei einem mikrobiellen Abbau könnte das HDO und das Kupfer von den Organismen assimiliert werden. Bedingt durch den Säureaufschluss wird das Kupfer aus der Biomasse in gleicher Weise wie aus dem Holz extrahiert und detektiert, während die Bestandteile des HDOs wahrscheinlich vollständig oder zum Teil abgebaut wurden.
- Ein mikrobieller Abbau des HDOs wurde bereits in den Testansätzen mit Bi-Bo (Kap. 4.2) und HSM-Pr-Bo (Kap. 4.3) nachgewiesen.

In Freilandversuchen mit HSM auf Kupfer-HDO-Basis zeigte sich, dass die Kupfer-Konzentration im Laufe der Inkubationszeit nicht konstant war und es zu einer Abnahme der Kupfer-Konzentration gekommen war (EDLUND & NILSSON, 1999). Dies konnte unabhängig von den verwendeten Böden mit unterschiedlichen pH-Werten beobachtet werden. Da die Prüfkörper im Freiland jedoch Witterungseinflüssen wie Feuchtigkeit und Temperatur ausgesetzt waren, ist eine Vergleichbarkeit der Studien mit der vorliegenden Arbeit schwierig. Es darf also vermutet werden, dass das Kupfer-HDO von den Mikroorganismen im Boden abgebaut wurde.

In den ersten beiden Versuchen zum Abbau von Bi-Bo (Kap. 4.2) und HSM-Ho-Bo (Kap. 4.3) konnte ein mikrobieller Abbau des HDOs nachgewiesen werden. Daher kann in Verbindung mit den oben aufgeführten Gründen auch im Holzprüfkörper von einem mikrobiellen Abbau des HDOs ausgegangen werden. Vergleiche zur Geschwindigkeit des Abbaus zeigen, dass das im Prüfkörper eingebrachte Biozid über die Inkubationszeit nur mit einer sehr geringen Abbaurate degradiert wurde. Ein Grund hierfür könnte in der geringeren Oberfläche zu Volumenverhältnis im Vergleich mit den Holzspänen liegen. In diesen war das Biozid von vielen Seiten aus angreifbar, während im Holzprüfkörper das Biozid nur von einer Seite angegriffen werden konnte. Zusätzlich war die Konzentration des HSMs in den Prüfkörpern höher, als in den Testansätzen mit HSM-Ho-Bo.

Der Masseverlust von Holzprüfkörpern wird in vielen Studien und Prüfnormen als Referenz für die Wirksamkeit eines HSMs gegenüber dem mikrobiellen Abbau verwendet [DIN EN 113].

Die vorliegenden Ergebnisse erbrachten Unterschiede beim Masseverlust zwischen den Prüfkörpern über die Inkubationszeit. Die mit H<sub>2</sub>O behandelten Prüfkörper verloren mehr Holzmasse, als Prüfkörper, die mit Kupfer-HDO behandelt wurden (Abb. 37). Zusätzlich verloren die Prüfkörper, die

mit der geringeren Konzentration behandelt wurden, mehr Masse als die vergleichbaren Prüfkörper mit hoher Biozidkonzentration. Dieser konzentrationsabhängige Effekt konnte für Kupfer-HDO-Formulierungen bereits von EDLUND & NILSSON (1999) nachgewiesen werden. Es kann geschlussfolgert werden, dass die HSM auf Basis von Kupfer-HDO das Holz wirksamer vor dem Abbau durch holzerstörende Mikroorganismen schützen, als HSM mit anderen Kupfer-Aminen (HSM-A) oder die mit H<sub>2</sub>O behandelten Hölzer.

Die nach 448 Tagen der Inkubation im Boden entnommenen Holzprüfkörper der Kontrollen zeigten im Vergleich zu den mit Kupfer-HDO behandelten Holzprüfkörpern eine unebene und schwarz verfärbte Oberfläche. Da der Befall noch in einem frühen Stadium war, konnte nicht näher bestimmt werden, ob es sich um einen Befall mit einem Moderfäule erregenden Pilz handeln könnte, da ein bakteriellen Abbau des Holzes ein ähnliches Schadbild erzeugen kann (SCHMIDT, 2006).

#### 4.4.1 Welche Organismengruppen sind abundant?

Zu Beginn der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im HSM-Ho-Bo war erwartet worden, dass Pilze einen großen Anteil an dieser Gemeinschaft einnehmen, da sie neben den Bakterien die dominierenden Eukaryonten im Boden sind und viele holzerstörende Organismen den Pilzen zugeordnet werden können (EDLUND & NILSSON, 1999; VAN DER WAL ET AL., 2007; ANDERSON ET AL., 2003). Um so überraschender waren die Resultate, dass nur drei der untersuchten S-Banden aus den SSCP-Gelen den Pilzen zugeordnet werden konnten (Tab. 23). Bedingt durch die hohe Intensität der drei Banden, das häufige Auftreten über die Zeit und in unterschiedlichen Testansätzen, handelte es sich um abundante Organismen. Die Intensität einer Bande im Gel korreliert häufig mit der Abundanz der Organismengruppe, deren DNA sich in der Bande abgebildet wird (FROMIN ET AL., 2002).

Durch die Klonierungs- und Sequenzierungsversuche konnte die S-Bande 1 dem Basidiomyceten *Sphaerobolus stellatus* (Tode, 1790) zugeordnet werden (Abb. 47; Tab. 23). Dieser Pilz zählt zu den Weißfäule erregenden Pilzen, die an Holz zunächst das Lignin degradieren, aber auch in der Lage sind Zellulose und Hemizellulose abzubauen (WINQUIST, 2008). *S. stellatus* lebt auf totem pflanzlichem Material und ist in der Lage, Holz in Böden abzubauen, die mit HSM, Polychlorinated dibenzo-p-dioxins und dibenzofurans (PCDD/F), kontaminiert sind (WINQUIST ET AL., 2009). Ob dieser Organismus aktiv in der Lage ist Kupfer-HDO abzubauen oder nur tolerant gegenüber dem Biozid ist, bleibt unbekannt.



**Abbildung 48:** *Sphaerobolus stellatus* in verschiedenen Reifestadien (Foto zur Verfügung gestellt von Gary Emberger [www.messiah.edu/Oakes/fungi\\_on\\_wood](http://www.messiah.edu/Oakes/fungi_on_wood))

Die S-Bande 2 konnte durch Sequenzierung dem Ascomyceten *Lecytophora multabilis* zugeordnet werden. Auch dieser Organismus lebt saprophytisch auf Holz und wird in Analysen zum HSM-Abbau im Rahmen der ENV 807 eingesetzt, wo er Moderfäule auslöst (SCHMIDT, 2006). Moderfäule verursachende Pilze leben in der Regel intrazellulär und degradieren zunächst die zellulosereichen pflanzlichen S<sub>2</sub>-Wände. Dieser Typ des Befalls kann in frühen Stadien von außen nicht erkannt werden, jedoch können in den Zellen des befallenen Holzes die Pilzhypen in Form von Rhomben mikroskopisch nachgewiesen werden (SCHMIDT, 2006). Die Oberfläche von Holz, dass von einer Moderfäule befallen ist, zeichnet sich oft durch dunkle Verfärbungen und eine weiche Holzstruktur aus (SCHMIDT, 2006). Diese Anzeichen konnten auch bei den Kontroll-Holzprüfkörpern, bei denen am häufigsten *Lecytophora multabilis* nachgewiesen werden konnte, bestätigt werden (Abb. 38 und Tab. 23). Es konnten jedoch nach 448 Tagen der Exposition keine Pilzhypen in den Zellen nachgewiesen werden. Von *L. multabilis* ist bekannt, dass dieser Pilz in Anwesenheit des HSMs CCA, welches Kupfer enthält, leben kann (SCHMIDT, 2004). Dies würde erklären, warum der Pilz auch in Proben mit Kupfer-HDO detektiert werden konnte.

Die dritte S-Bande, die einem Pilz, speziell den *Sordiales* (Schlauchpilze), zugeordnet werden konnte, waren S-Bande 11. Eine genauere Eingruppierung auf das Art- oder Gattungslevel war nicht möglich. Es ist bekannt, dass viele Arten der *Sordiales* sich saprophytisch von Holz ernähren (RĚBLOVÁ, 2003; ZHANG, 2006). Die detektierten *Sordiales* konnte mit Ausnahme von HSM-A-I in allen Testansätzen detektiert werden und traten besonders zum 14. Inkubationstag auf. Dies lässt darauf schließen, dass diese Organismengruppe tolerant oder resistent gegenüber Kupfer-HDO waren. Direkte Bezüge zum Abbau des HSMs konnten nicht getroffen werden.

Die *Eimeriidae* werden dem Subphylum der Apikomplexa zugeordnet und konnten in den S-Banden 4,

5, 13 und 16 detektiert werden. Bei diesen Organismen handelt es sich um obligate, wirtsspezifische Parasiten die mit Kot verbreitet werden (HAUSMANN ET AL., 2003). Die bislang etwa 450 verschiedenen und beschriebenen Arten (HAUSMANN ET AL., 2003) wurden bereits in vielen höheren Organismen, wie z.B. *Barbus anoplus*, einem Süßwasserfisch, (MOLNAR ET AL., 2004) oder *Eliomys quercinus*, dem Gartenschläfer (BERTOLINO & CANESTRI-TROTTI, 2005), nachgewiesen. Bedingt durch ihre parasitische Lebensweise war es unwahrscheinlich, dass diese Organismen am Abbau des Biozids beteiligt sind. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass sie sich in einem bodenbewohnenden Wirt vermehren, allerdings ist dieser Wirt unbekannt. Da die Eimeriidae primär in den Kontrollen und den Testansätzen mit HSM-A-I und HSM-A-h nachgewiesen wurden kann daraus abgeleitet werden, dass der Wirtsorganismus durch Kupfer-HDO inhibiert worden sein könnte.

In den Testansätzen mit HSM-K und auch mit HSM-A-h wurde der Organismus *Dimastigella trypaniformis* am Inkubationstag 14 detektiert (Tab. 23, S-Bande 6). Von diesem Flagellaten ist bekannt, dass er sich von Bakterien oder Pilzen ernährt (EKELUND ET AL., 2000). In einer Studie, die Effekte von Fungiziden, unter anderem Propiconazol, auf Mikroorganismen untersuchte, wurde nachgewiesen, dass diese Organismen sehr sensitiv auf das Fungizid reagierten und nicht nur inhibiert wurden, weil ihre Nahrungsgrundlage durch das Fungizid entfernt wurde (EKELUND ET AL., 2000). Bezogen auf die vorliegende Arbeit kann *D. trypaniformis* zu den Organismen gezählt werden, die sich von den Bakterien im Biofilm auf der Holzoberfläche ernährten und zudem nicht sensitiv gegenüber den getesteten HSM-Formulierungen waren. Es ist nicht ausgeschlossen, dass *D. trypaniformis* besonders in den oben genannten Testansätzen Abundant war, weil in den Kontrollen und HSM-A-I der Frassdruck durch andere Organismen höher war, als in den Testansätzen mit HSM-K-I und HSM-K-h.

Die S-Bande 3 wurde dem Nematoden *Pristionchus lheritieri* zugeordnet. Von den Organismen der Gattung *Pristionchus* ist bekannt, dass sie in und an Coleoptera leben (MAYER ET AL., 2007), wo sie sich von Pilzen und Bakterien ernähren (Kommensalen). Zusätzlich ist bekannt, dass Pilzsporen von *Fusarium oxysporum*, *F. lycopersici* oder *Verticillium dahliae* in *P. lheritieri* hohe, für diese Organismen letale Biozidkonzentrationen überleben können (JENSEN & SIEMER 1971). Dies könnte auch bedeuten, dass *P. lheritieri* resistent oder zumindest tolerant gegenüber Bioziden sein kann. Dieser Organismus wurde in allen Testansätzen, mit Ausnahme der HSM-K-I detektiert, was darauf schließen lässt, dass zwischen dem Auftreten des Organismus und dem HSM kein Zusammenhang bestand. Es wäre denkbar, dass sich im Boden tote oder lebende Coleoptera befanden und sich die Nematoden von den in diesen enthaltenen Mikroorganismen oder dem Wirt ernährt haben.

Auch die S-Bande 9 konnte einem Nematoden, dem *Diplogaster lethieri*, zugeordnet werden. Organismen der Gattung *Diplogaster* sind räuberische Nematoden, die sich von Bakterien, Nematoden

und anderen Mikroorganismen im Boden ernähren und abundant in organischem Material vorkommen (KAHN & KIM, 2007). Es ist wahrscheinlich, dass sich die *Diplogaster* sp. im vorliegenden Boden von den Bakterien und anderen Nematoden z.B. *Pristionchus* ernähren und durch ihren oftmals erheblichen Anteil an der mikrobiellen Biomasse im Boden einen starken Selektionsdruck ausüben (OSMAN, 1989). Es ist wahrscheinlich, dass *Diplogaster* sp. auf den Abbau des HSM keinen direkten Einfluss ausübt. Dies betrifft auch die in der S-Bande 7 detektierte DNA Sequenz der Art *Korotnevella stella*. Diese Art konnte dem Pylum der Amoebozoa und dem Subpylum Lobosa zugeordnet werden. Von diesen Amöben ist bekannt, dass sie im Boden leben und sich als Predatoren von Bakterien und anderen Protisten ernähren (HAUSMANN ET AL., 2003).

Die DNA-Sequenz der S-Bande 14 und 17 war identisch und konnte den *Oxytrichidae* dem Pylum der Ciliophora zugeordnet werden (HAUSMANN, 2003). VON diesen Organismen, wie auch von den Organismen der Gattung *Parlamyctes* (S-Bande 8) wurde noch nie berichtet, dass sie in der Lage sind HSM abzubauen.

Durch die T-RFLP-Methodik wurde die Sukzession der bakteriellen Gemeinschaft im HSM-Pr-Bo analysiert (Kap. 3.5.2 ). Die bakterielle Gemeinschaft in den Testansätzen mit HSM-Pr-Bo veränderte sich über die Inkubationszeit signifikant (Abb. 45).

Es konnte ermittelt werden, dass sich die Fingerabdruck-Muster aller 5 Testansätze über die Inkubationszeit signifikant änderten (vergl. Abb. 45B). Die Fingerabdruck-Muster der Testansätze mit HSM-A-l und HSM-K-l über die Zeit nicht signifikant unterschiedlich (trace: 0,161; p: 0,1133), gleiches galt auch für Vergleiche zwischen HSM-A-h und HSM-K-h (trace: 0,129; p: 0,1272). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Kontrollen und HSM-K-l (trace: 0,193; p: 0,014) und HSM-K-h (trace: 0,204; p: 0,021) nachgewiesen. Für die beiden Fingerabdruck-Muster der Testansätze mit Kupfer-HDO (HSM-K-l und HSM-K-h) konnten keine signifikanten Unterschiede zueinander ermittelt werden (trace: 0,55; p: 0,8247).

Es waren stärkere Veränderungen über die Zeit und die Testansätze bei der bakteriellen Gemeinschaft im Vergleich zur eukaryontischen Gemeinschaft auszumachen (vergl. Abb.42 und Abb.43 mit Abb. 45).



#### 4.4.2 Worin liegen die Vor- und Nachteile der Fingerabdruck-Techniken SSCP & T-RFLP?

Der Einsatz verschiedener Fingerabdruck-Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaft in Umwelt-Bodenproben kann unter Umständen, voneinander abweichende Resultate erzielen. Es ist daher notwendig, eine für die Analysen geeignete und in den Testansätzen verifizierte Methode auszuwählen, sowie diese Methode an die Untersuchungen anzupassen. Voraussetzung für alle Nukleinsäuren-basierten Fingerabdruck-Methoden ist eine vorangegangene Isolierung der Nukleinsäuren aus der sehr komplexen Bodenmatrix. Nicht alle Nukleinsäuren können aus dem Boden extrahiert werden, da nicht alle Zellen gleich effizient lysiert werden können. Durch die Extraktion können somit Fehler bei der Charakterisierung der Gemeinschaft entstehen (AMANN ET AL., 1994; ANDERSON ET AL., 2003). Weitere Probleme können auftreten, wenn die gewonnene DNA durch PCR amplifiziert werden soll, da während der Extraktion aus dem Boden potentiell PCR inhibierende Substanzen wie Huminstoffe, Zellulose oder Schwermetalle co-extrahiert worden sind (TSAI & OLSON, 1992; ZHOU ET AL., 1996; WILSON, 1997). Durch die Verwendung des PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO, Kap. 2.18.1 ) wurde dieses Problem gemindert, so dass es möglich war, die DNA aus dem Boden zu amplifizieren. Andere Extraktionsmethoden wie das Fast-Kit™ (MP-Biomedicals, Solon, OH, USA) oder eine abschließende Reinigung der Nukleinsäureextrakte über eine Sephadexsäule (SAMBROCK & RUSSEL, 2001) erlaubten keine effiziente Reinigung der DNA. Dies verhinderte die Amplifikation der DNA. Eine vorherige Verdünnung der mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit gewonnenen DNA war erforderlich, wie sie bereits von MANGIAPAN ET AL. (1996) beschrieben wurde. Durch eine 1 : 10 Verdünnung der extrahierten Umwelt-DNA wurde die DNA-Konzentration verringert und somit auch die Sensitivität der PCR herabgesetzt (JACKSON ET AL., 1997; CULLEN & HIRSCH, 1998). Eine Verdünnung von bis zu 1 : 10 wurde gewählt, um den Fehler durch eine möglichst hohe DNA-Konzentration so gering wie möglich zu halten und geeignete PCR-Ergebnisse zu erzielen. Auch die Durchführung der PCR birgt vielfältige Fehlerquellen. So können die Wahl der Primer, die Anzahl der Zyklen und der GC-Gehalt der Template-DNA einen Einfluss auf die Amplifikation ausüben (AMANN ET AL., 1995; SUZUKI & GIOVANNONI 1996). Aufgrund von Sekundärstrukturen in der Template-DNA können sequenz-spezifische Templates diskriminiert werden (AMANN ET AL., 1994). Aus diesem Grund kann in der vorliegenden Arbeit nicht von den PCR-Ergebnissen auf die Ausgangskonzentration geschlossen werden (AMANN ET AL., 1994). Mit der Anzahl der Spezies im untersuchten Boden steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Fehlerrate bei der PCR (QIU ET AL., 2001). Es muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass nicht jeder Bodenpartikel mit den gleichen Mikroorganismen besiedelt ist. Auch durch eine gründliche Homogenisierung des Bodens vor dem Einbringen der Holzprüfkörper kann diese

Heterogenität nicht vollständig aufgehoben werden.

Zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft im HSM-Ho-Bo wurde die T-RFLP-Methodik verwendet. Von Egert & Friedich (2003) wurde für diese Methode das Phänomen der so genannten Pseudo-T-RFs beschrieben. Diese Pseudo-T-RFs sind unspezifische, z.B. auf 16S rRNA Gen-Ebene nachgewiesene, PCR-abhängige Artefakte. Pseudo-T-RFs korrelierten positiv mit der Anzahl der PCR-Zyklen und erzeugten falsch-positive Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der PCR für die T-RFLP-Analyse das Primerpaar fd1-FAM/907r gewählt (Tab. 9), von dem bekannt war, dass es bei einer Zyklenzahl von 28 eine vernachlässigbar hohe Anzahl dieser Pseudo-T-RFs generierte (NOLL, 2004). Da zur ausreichenden Amplifikation der DNA nur 25 Zyklen benötigt wurden, wurden keine weiteren Analysen bezüglich des Auftretens von Pseudo-T-RFs durchgeführt. Falsch-positive Ergebnisse sind dennoch nicht vollständig auszuschließen, da Umwelt-DNA-Extrakte aus einem anderen Boden eingesetzt wurden. Bei der T-RFLP-Methode wird vorausgesetzt, dass eine Korrelation zwischen einem T-RF und einer OTU (operativen taxonomischen Einheit) besteht (LIU, ET AL., 1997). Da jedoch nicht auszuschließen ist, dass verschiedene OTUs ein gleich langes T-RF erzeugen, können hier falsch-negative Ergebnisse entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die T-RFLP-Methodik zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft im Boden verwendet. Die T-RFLP-Methodik bot gegenüber der SSCP-Methodik den Vorteil, dass die Sensivitätsschranke niedriger ist. In einem SSCP-Gel können maximal 35 Banden effizient voneinander getrennt werden (LOISEL ET AL., 2006), während in einer anderen Studie hingegen von einem Auflösungsvermögen zwischen 60 und 80 Banden gesprochen wird (DOHRMANN & TEBBE, 2004). Werden zu viele Banden abgebildet, bei einer sehr diversen Gemeinschaft, kann ein dunkler Hintergrund entstehen, was die Differenzierung einzelner Banden erschwert (LOISEL ET AL., 2006). In der vorliegenden Arbeit war es aufgrund der hohen Diversität nicht möglich, die bakterielle Gemeinschaft mittels SSCP zu untersuchen. Eine Charakterisierung der eukaryontischen Gemeinschaft war möglich, da diese Gemeinschaft weniger divers war. Die SSCP-Methodik bot gegenüber der T-RFLP-Methodik den großen Vorteil der Rückgewinnung der DNA aus dem Gel, was eine direkte phylogenetische Identifizierung der Banden erlaubte. Auch bei der SSCP-Methodik wird davon ausgegangen, dass eine Bande in einem SSCP-Gel zumeist für eine OTU steht (SCHWIEGER & TEBBE, 1998). Allerdings wurde in Studien von SCHMALENBERGER ET AL. (2001) UND FOGEL ET AL. (1999) und nicht zuletzt durch die vorliegende Arbeit (Tab. 23) nachgewiesen, dass zum Teil in einer Bande die DNA zweier OTU enthalten war. In einer einzelnen S-Bande wurden zum Teil zwei unterschiedliche Phänotypen charakterisiert, was mit dem gleichen gelelektrophoretischen Laufverhalten unterschiedlicher DNA-Molekülen begründet werden kann (SCHMALENBERGER, ET AL., 2001).

Durch verschiedene Möglichkeiten der Ausbildung der Sekundärstrukturen für die SSCP kann es zusätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass ein DNA-Molekül mehrere Konformationen ausbildet, die im SSCP-Gel Doppelbanden erzeugen (SEIBOLD, 2002). Dass in einer S-Bande die DNA zweier OTUs enthalten sein kann, konnte in der vorliegenden Arbeit, z.B. bei den Eimeriidae, nachgewiesen werden (Tab. 23). Manche Bakterien erzeugen jedoch zusätzliche Banden nicht nur aus den oben genannten Gründen, sondern weil sie mehrere 16S rRNA Gene mit zum Teil unterschiedlichen Sequenzen besitzen (FOGEL ET AL., 1999). Theoretisch könnten auch im größeren 18S rRNA Gen (1,8 -1,9 kB) mehrere Teile mit unterschiedlichen Sequenzen vorkommen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen. Der mittels PCR aus dem Boden amplifizierte 18S rRNA Genabschnitt (Euk1A/Euk 516r-Ph) war im Agarosegel als unscharfe leicht verschmierte Bande um die 560 bp zu erkennen (Abb. 40). Dieser „Schmier“ lässt darauf schließen, dass die amplifizierten 18S rRNA Gen-Fragmente zum Teil eine unterschiedliche Größe besaßen. Demnach kann der amplifizierte 18S rRNA-Genabschnitt nicht nur unterschiedliche Sequenzen besitzen, sondern auch unterschiedlich lang sein.

Die gewählten Fingerabdruck-Methoden bieten trotz der nicht unerheblichen Nachteile derzeit die besten Möglichkeiten z.B. gegenüber kultivierungsabhängigen Methoden. Dies konnte bereits in vielen Studien belegt werden (SSCP: LEE ET AL., 1996; SCHWIEGER ET AL., 2000; T-RFLP: LIU ET AL., 1997; MURASE, 2006).

#### **4.5 Wer baut Kupfer-HDO ab? Eine zusammenfassende Diskussion**

Kupfer-HDO wurde im aktiven Boden in allen Testansätzen von den Mikroorganismen abgebaut (Kap. 3.2.1 und Kap. 3.3.1). Die Geschwindigkeit des Abbaus korreliert dabei mit der Konzentration des Biozids und dessen Bioverfügbarkeit, z.B. fixiert am Holz oder als Biozid im Boden (Abb. 17 und Abb. 25). Durch die Messungen der Respiration konnte nachgewiesen werden, dass Kupfer-HDO je nach Konzentration eine stark inhibierende Wirkung auf die Aktivität der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens ausübte.

Anhand der PLFA-Muster in den Bi-Bo und HSM-Ho-Bo-Testansätzen wurde festgestellt, dass Gram negative Bakterien mit Kupfer-HDO-Kontakt, sowohl am Holz als auch im Boden der dominierende Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft waren und aktiv am Abbau des Biozids involviert waren. Die Arbeitshypothese, dass es sich bei den HSM-abbauenden Organismen hauptsächlich um Pilze handelt, wurde somit widerlegt. Zusätzlich ergab die Sequenzanalyse der DNA in den SSCP-Banden, dass Pilze nur in den mit H<sub>2</sub>O-behandelten Kontrollen angesiedelt waren, während in den Testansätzen mit Kupfer-HDO nur ein geringer pilzlicher Befall nachgewiesen wurde. Die an der Schnittstelle von Kupfer-HDO behandeltem Holz und Boden nachgewiesenen Eukaryonten sind als bakterivore Organismen beschrieben. Die Bakterien waren daher für die bakterivoren Eukaryonten eine ideale Nahrungsquelle und leichter bioverfügbar als das Holz selbst. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit Bakterien das Kupfer-HDO in allen Testansätzen abgebaut haben.

#### **4.6 Welche Fragestellungen & Zielsetzungen ergeben sich über die vorliegende Arbeit hinaus?**

Mit Hilfe der SIP-PLFA-Methode wurde nachgewiesen, dass der Abbau eines HSM auf der Basis von Kupfer-HDO von Gram negativen Bakterien erfolgte (Kap. 3.3.5 und Abb. 32). Durch Verwendung der SIP-RNA-Methode kann eine genauere phylogenetische Charakterisierung der beteiligten Bakterien erfolgen (LÜDERS, ET AL., 2004). Diese Methode erfordert die Isolierung der mit dem <sup>13</sup>C-Isotop angereicherten RNA durch Cäsium Tetrafluor-Acetat-Dichtezentrifugation, so dass nach reverser Transkription die Organismen, die aktiv am Abbau des Biozids beteiligt waren, mittels T-RFLP kloniert und sequenziert werden konnten. Als Vergleich sollen die HSM-0 Proben mit natürlichem <sup>12</sup>C-Gehalt verwendet werden.

Ein neuer Ansatz, mit dem die mikrobielle Lebensgemeinschaft charakterisiert werden kann und mit

dem eine Verbindung zwischen Substrat und Konsument hergestellt werden kann, ist Protein-SIP (JEHLICH ET AL., 2008 A; JEHLICH ET AL., 2008 B; JEHLICH ET AL., 2009). Bei dieser Methode werden die  $^{13}\text{C}$  assimilierenden Organismen anhand ihrer isotopisch angereicherten Proteine identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur etwa 2 % der Proteine isotopisch angereichert sein müssen. Im Vergleich zu der SIP-RNA-Methode oder der SIP-PLFA-Methode ist diese Technik sehr viel sensitiver und weist neben den phylogenetischen Informationen auch weitergehende, prozessrelevante Reaktionen der Organismen auf translativer Ebene auf.

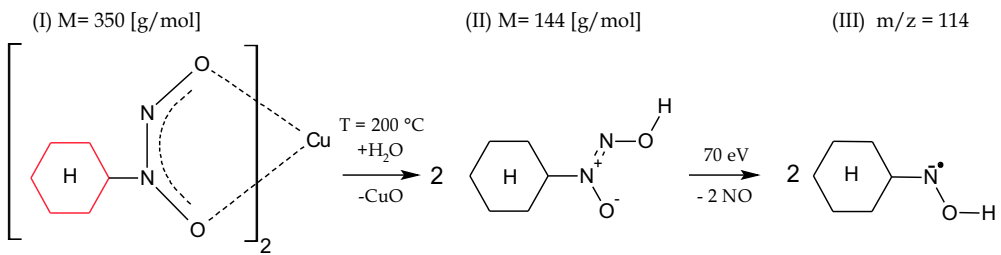
Die mittels SIP-RNA-Technik oder SIP-Protein-Technik bestimmten Organismen könnten in einem abschließenden Experiment auf selektiven Nährmedien kultiviert werden, in dem sich Kupfer-HDO als einzig verfügbare C-Quelle befindet. Dieser Versuch setzt jedoch voraus, dass die identifizierten Organismen kultivierbar sind. In einem ähnlichen Versuchsansatz testeten WALLACE & DICKINSON (2006), ob Isolate der bakteriellen Gattung *Ralstonia* mit unterschiedlichen Bioziden als einziger verfügbarer Kohlenstoffquelle wachsen können. Sie stellten fest, dass Bakterien der Gattung *Ralstonia* die unterschiedlichen Biozide abbauen konnten, diese Biozide jedoch nicht als einzige Kohlenstoff-Quelle ausreichten.

In den DAD-Chromatogrammen die zu Nachweis der HDO-Konzentration in den HSM-Ho-Bo Testansätzen generiert wurden, traten nach einer Inkubationszeit von 16 Tagen unbekannte Peaks auf. Ob diese von Umbauprodukten stammen, die durch chemische Prozesse im Boden entstanden sind, oder von Metaboliten, aus dem Stoffwechsel von Mikroorganismen, konnte mittels der verwendeten HPLC-Methode nicht abschließend geklärt werden. Dies lag vor allem daran, dass keine geeigneten Standards zum Vergleich mit den entstandenen Peaks verfügbar waren.

Eine häufig verwendete Methode, mit der unbekannte, flüchtige Substanzen identifiziert werden ist die gaschromatographische Trennung von Substanzen mit anschließender Bestimmung der Massen (GC-MS). Mit Hilfe eines Abgleiches der gemessenen Daten mit einer Datenbank werden unbekannte Substanzen bereits bekannten Substanzen aus der Datenbank zugeordnet. Mittels GC-MS könnten im vorliegenden Fall die unbekannt Substanzen detektiert werden, wenn diese flüchtig sind und somit kann auch die Frage beantwortet werden, ob es sich bei diesen Substanzen um Metabolite oder Umbauprodukte des HDOs handelt. Auch bei der GC-MS-Methode sind Standards zur genauen Charakterisierung notwendig, jedoch gibt die Datenbank Hinweise, um welche Substanzen es sich handeln könnte. Durch diese Hinweise wird es möglich Standards speziell im Fachhandel zu beziehen oder zu generieren.

Die GC-MS-Technik wurde bereits erfolgreich zur Charakterisierung von HDO, in diesem Fall im Holz vorliegend, eingesetzt (JÜNGEL, 2002). Bei dieser Analyse wurde nachgewiesen, dass durch die

gaschromatographische Messung selbst Umbauprodukte des HDOs entstehen können (Abb. 49). Ausgehend vom Kupfer-HDO-Molekül (I) sollte demnach in Gegenwart von H<sub>2</sub>O und erhöhten Temperaturen das HDO in eine intermediäre Komponente, mit einer N-cyclohexyl-diazeniumdioxid Struktur (II) (HICKMANN ET AL., 1979) überführt werden (JÜNGEL, 2002). Diese Bedingungen sind bei der gaschromatographischen Messung erfüllt. Die Bildung des Massenfragments 114 (III) könnte durch die Abspaltung des NO durch den Beschuss von (II) im Massenspektrometer erfolgen (JÜNGEL, 2002; WENDLANDT ET AL., 1964; TAYLOR ET AL., 1995). Das benötigte H<sub>2</sub>O könnte aus der Umgebungsluft oder aus H<sub>2</sub>O Rückständen der SPE-Festphasenextraktion stammen.



**Abbildung 49:** Bildung des Massenfragments m/z 114 während der GC/MS Analyse (JÜNGEL, 2002). In rot ist exemplarisch der Cyclohexylring markiert.

Es wäre von großem Interesse zu bestimmen, ob diese Substanz unabhängig von der Messmethode auch im Boden durch die Aktivität von Mikroorganismen entstehen kann, oder ob es sich nur um ein Mess-Artefakt handelt.

Über Metabolite des HDOs, die im Boden gebildet werden, ist nichts bekannt. Durch die Verwendung von <sup>13</sup>C-angereichertem HDO wäre es jedoch mit der GC-MS-Methode möglich, Metabolite und Umbauprodukte des HDOs zu bestimmen. Dies wäre durch einen Vergleich mit den Substanzen, die sich im Boden mit <sup>12</sup>C-HDO und <sup>13</sup>C-HDO gebildet haben oder gebildet wurden realisierbar. Ob es sich dabei um Metabolite oder Umbauprodukte handelt, könnte durch eine Inkubation von Kupfer-HDO in sterilisierter Erde untersucht werden. Da in diesem Boden keine aktiven Mikroorganismen vorhanden sind, würde es sich bei allen gebildeten Substanzen folglich um Umbauprodukte handeln. Diesen Ergebnissen wären Resultate mit gleichem Versuchsaufbau, jedoch mit der Verwendung aktiver Erde gegenüber zu stellen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abraham, W.R., Hesse, C. and Pelz, O. (1998)** Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4202-4209.
- Advisory committee on pesticides, Evaluation on Cu-HDO (PSD) (2005)** Evaluation on: Copper-HDO: Use as a wood preservative The health and safety executive biocides & pesticides assessment unit: 1-130.
- Allison, S. M., and Prosser, J. I (1993)** Ammonia Oxidation at Low Ph by Attached Populations of Nitrifying Bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* **25**:935-941.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990)** Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1988)**  $\beta$ -subunit of ATP-synthase: a useful marker for studying the phylogenetic relationship of eubacteria. *J Gen Microbiol* **134**: 2815-2821.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1994)** Identification of Uncultured Bacteria: a Challenging Task for Molecular Taxonomists. *ASM News* **60**: 360-365.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995)** Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D. and Prosser, J.I. (2003)** Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* **5**: 36-47.
- Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H. (1978)** Physiological Method for Quantitative Measurement of Microbial Biomass in Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **10**: 215-221.
- Bääth, E. (1992)** Measurement of Heavy-Metal Tolerance of Soil Bacteria Using Thymidine Incorporation into Bacteria Extracted after Homogenization Centrifugation. *Soil Biology & Biochemistry* **24**:1167-1172.
- Bääth, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A. and Campbell, C.D. (1998)** Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 238-245.
- Babich, H. and Stotzky, G. (1977)** Sensitivity of Various Bacteria, Including Actinomycetes, and Fungi to Cadmium and Influence of Ph on Sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 681-695.
- Baonza, M.V. and Franco, D. (1989)** Use of Vermiculite as substrate in assays on phytotoxicity of treated wood. 20 annual meeting IRG-WP-3547
- Bardgett, R. D., Hobbs, P.J. and Frostegard, A. (1996).** Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils* **22**:261-264.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (1991)** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**: 80-83.
- Becker, G. (1961)** On the Examination and Estimation of the Natural Resistance of Wood to Termites. *Holz als Roh und Werkstoff* **19**: 278-290.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. (1996)** *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. Blackwell Science Ltd., London, England. S. 480-490.
- Bertolino, S. and Canestri-Trotti, G. (2005)** Eimeria species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting *Eliomys quercinus* in an Alpine habitat. *J Wildl Dis* **41**: 442-445.

- Bjoldal, C.G., Nilsson, T. and Daniel, G. (1999)** Microbial decay of waterlogged archaeological wood found in Sweden - Applicable to archaeology and conservation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43: 63-73.
- Blaine Metting Jr, F. (1992)** *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, Inc New York: 3 - 95.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959)** A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Blumer, M., Chase, T. and Watson, S.W. (1969)** Fatty Acids in Lipids of Marine and Terrestrial Nitrifying Bacteria. *Journal of Bacteriology* 99: 366-&.
- Böckl, M., Blay, K., Fischer, K., Mommertz, S. and Filser, J. (1998)** Colonisation of a copper-decontaminated soil by micro- and mesofauna. *Applied Soil Ecology* 9: 489-494.
- Bodenkundliche Kartieranleitung der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe und den Geologischen Landesämtern der Bundesrepublik Deutschland (1994)** 4 Auflage In: Kommission: E: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägerle u. Obermiller), Stuttgart
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W. and Pel, R (1998)** Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by C-13-labelling of biomarkers. *Nature* 392: 801-805.
- Boyle, D. (2006)** Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 80: 380-386.
- Briscoe, P.A., Williams, G.R., Andersson, G.M., and Gadd.G.M. (1990)** Microbial tolerance and biodegradation of organic biocides. The International Research Group on Wood Preservation **IRG\_90-1464[1]**.
- Carle, R. (1991).** Isotopen-Massenspektrometrie. *Pharmazie in unserer Zeit* 2:75-82.
- Cavigelli, M.A., Robertson, G.P., and Klug, M.J. (1995)** Fatty-Acid Methyl-Ester (FAME) Profiles as Measures of Soil Microbial Community Structure. *Plant and Soil* 170: 99-113.
- Chandler, D.P., Li, S.M., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K. and Brockman, F.J. (1997)** A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *Fems Microbiology Ecology* 23: 131-144.
- Chen, J., Ferris, H., Scow, K.M. and Graham, K.J. (2001)** Fatty acid composition and dynamics of selected fungal-feeding nematodes and fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 130: 135-144.
- Commission Directive 2003/2/EC 2003.**
- Cragg, S.M., Pitman, A.J. and Henderson, S.M. (1999)** Developments in the understanding of the biology of marine wood boring crustaceans and in methods of controlling them. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43: 197-205.
- Cullen, D.W. and Hirsch, P.R. (1998)** Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 983-993.
- Curling, S.F., Clausen, C.A. and Winandy, J.R. (2002)** Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 49: 13-19.
- Daniel, G. (2003)** Microreview of wood under degradation by bacteria and fungi. In: Goodell B, Nicholas DB, Schultz TP (eds) *Wood deterioration and preservation ACS Symp Ser 845 Am Chem Soc Washington, DC: 34-72.*
- Daniel, G. and Nilsson, T. (1985)** Ultrastructural and T.E.M.-EDAX Studies on the degradation of CCA treated radiata pine by tunnelling bacteria **IRG/WP1260.**



- de Boer, W. and van der Wal, A. (2008)** Interaction between Saprotrophic Basidiomycetes and Bacteria: British Mycological Society Symposia Series Published by Elsevier Ltd.
- DeRito, C.M., Pumphrey, G.M. and Madsen, E.L. (2005)** Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7858-7865.
- DIBt (2008)** Holzschutzmittelverzeichnis. Schriften des Deutschen Instituts für Bautechnik **56**. Stand Januar 2008
- DIBt (2009)** Holzschutzmittelverzeichnis. Schriften des Deutschen Instituts für Bautechnik **57**. Stand April 2009
- Dickerson, R.E. and Geis, I. (1999)** Chemie - eine lebendige und anschauliche Einführung; Wiley-VCH.
- Diez, B., Pedros-Alio, C. and Massana, R. (2001)** A Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2932-2941.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. and Massana, R. (2001) B** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2942-2951.
- DIN 18128:2002-12** Baugrund- Untersuchung von Bodenproben- Bestimmung des Glühverlustes
- DIN EN 335-1 (2006)** Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten- Definition der Gebrauchsklassen- Teil 1: Allgemeines
- DIN ISO 10693 (1995)** Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Carbonatgehaltes - Volumetrisches Verfahren
- DIN ISO 10694 (1995)** Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse)
- DIN ISO 17155 (2003)** Bestimmung der Abundanz und Aktivität der Bodenmikroflora mit Hilfe von Atmungskurven.
- DIN EN 113 (1996)** Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzzerstörende Basidiomyceten. Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit
- Doelman, P. and Haanstra, L. (1979)** Effects of Lead on the Soil Bacterial Microflora. *Soil Biology & Biochemistry* **11**: 487-491.
- Doelman, P., Haanstra, L., Deruiter, E. and Slange, J. (1985)** Rate of Microbial-Degradation of High-Concentrations of Alpha-Hexachlorocyclohexane in Soil under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Chemosphere* **14**: 565-570.
- Dohrmann, A. B. and Tebbe C. C. (2005)** Effect of elevated tropospheric ozone on the structure of bacterial communities inhabiting the rhizosphere of herbaceous plants native to Germany. *Appl Environ Microbiol* **71**:7750-8.
- Dohrmann, A. B. and Tebbe C.C. (2004)** Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Molecular Microbial Ecology Manual* **2**: 809-838.
- Dong, Q.H., Springeal, D., Schoeters, J., Nuyts, G., Mergeay, M. and Diels, L. (1998)** Horizontal transfer of bacterial heavy metal resistance genes and its applications in activated sludge systems. *Water Science and Technology* **37**: 465-468.
- Dumont, M.G. and Murrell, J.C. (2005)** Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 499-504.
- Dumont, M.G., Neufeld, J.D. and Murrell, J.C. (2006)** Isotopes as tool's for microbial ecologists - Editorial overview. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 57-58.

- Duxbury, T. and Bicknell, B. (1983)** Metal-Tolerant Bacterial-Populations from Natural and Metal-Polluted Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **15**: 243-250.
- Edlund, M.L. and Nilsson, T. (1999)** Performance of copper and non-copper based wood preservatives in terrestrial microcosms. *Holzforschung* **53**: 369-375.
- Egert, M. and Friedrich, M.W. (2003)** Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2555-2562.
- Ekelund, F., Westergaard, K. and Søe, D. (2000)** The toxicity of the fungicide propiconazole to soil flagellates. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 70-77.
- ENV 807:1993.Deutsche Vor-Norm. (1993)**. Prüfverfahren für die Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit gegen Moderfäule und andere erdbewohnenden Mikroorganismen.
- EPA (Office of Prevention Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency )(7510C) (2005)** Pesticide Fact Sheet about : Bis-(N cyclohexyldiazoniumdioxy) -copper
- Evershed, R.P., Crossman, Z.M., Bull, I.D., Mottram, H., Dungait, J.A.J., Maxfield, P.J. and Brennand, E.L. (2006)** C-13- Labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 72-82.
- Federle, T.W., Dobbins, D.C., Thorntonmanning, J.R., and Jones, D.D. (1986)** Microbial Biomass, Activity, and Community Structure in Subsurface Soils. *Ground Water* **24**: 365-374.
- Ferlazzo, D.E. (1999)** Analysis of tebuconazole in wood treated with Tanalith E. *IRG/WP/99-20158*
- Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006)** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 626-631.
- Findlay W.P.K. and Savory, J.G. (1954)** Moderfäule. Die Zersetzung von Holz durch niedere Pilze. *Holz Roh-Werkstoff* **12**: 293-296.
- Findlay, R.H., Moriarty, D.J.W. and White, D.C. (1983)** Improved Method of Determining Muramic Acid from Environmental-Samples. *Geomicrobiology Journal* **3**: 135-150.
- Fisher, S.G. (1990)** Recovery Processes in Lotic Ecosystems - Limits of Successional Theory. *Environmental Management* **14**: 725-736.
- Flemming, C.A. and Trevors, J.T. (1989)** Copper Toxicity and Chemistry in the Environment - a Review. *Water Air and Soil Pollution* **44**: 143-158.
- Fogel, G.B., Collins, C.R., Li, J. and Brunk, C.F. (1999)** Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* **38**: 93-113.
- Forstner, U., and Wittmann, G.T.W. (1979)** Metal pollution in the aquatic environment. Springer Verlag Berlin: 386 pp.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N. et al. (2002)** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**: 634-643.
- Frost, M. R. and J. A. Guggenheim. (1999)** Prevention of depurination during elution facilitates the reamplification of DNA from differential display gels. *Nucleic Acids Res* **27**:6
- Frostegard, A. and Baath, E. (1996)** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 59-65.
- Frostegard, A., Baath, E. and Tunlid, A. (1993)** A Shifts in the Structure of Soil Microbial Communities in Limed Forests as Revealed by Phospholipid Fatty-Acid Analysis. *Soil Biology & Biochemistry* **25**: 723-730.

- Frostegard, A., Tunlid, A. and Baath, E. (1993)** B Phospholipid Fatty-Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from 2 Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy-Metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3605-3617.
- Gisi, U., R. Schenker, R. Schulin, F., Stadelmann X. and H. Sticher. (1997)** . *Bodenökologie*, Vol. 2. Thieme, Stuttgart
- Göttsche, R. and Marx, H.N. (1989)** Copper-Hdo - an Effective Substance Variously Applicable in Wood Preservation. *Holz Als Roh-Und Werkstoff* 47: 509-513.
- Greaves, H. (1970)** The effect of selected bacteria and actinomycetes on the decay capacity of some wood-rooting fungi. *Material und Organismen* 5: 265-279.
- Green, C.T. and Scow, K.M. (2000)** Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal* 8: 126-141.
- Habicht, J., Hänzschel, D. and Wittenzellner, J. (2003)** Influence of different fixation and ageing products on the leaching behaviour of copper from selected wood preservatives in laboratory tests. **IRG/WP 03-20264**.
- Hamula, C., Wang, Z., Zhang, H., Kwon, E., Li, X.F., Gabos, S. and Le, X.C. (2006)** Chromium on the hands of children after playing in playgrounds built from chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. *Environ Health Perspect* 114: 460-465.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harris, R. K. and Mann, B. E. (1978)** *NMR and Periodic Table*. Academic Press, London.
- Hartford, W.H. (1993)** The environmental chemistry of chromium: Science vs. U.S. law. **IRG/WP 93-50014**.
- Hastrup, A.C.S., Jensen, B., Clausen, C. and Green, F. (2006)** The effect of CaCl<sub>2</sub> on growth rate, wood decay and oxalic acid accumulation in *Serpula lacrymans* and related brown-rot fungi. *Holzforschung* 60: 339-345.
- Hausmann, K., Hülsmann, N. and Radeck, R. (2003)** *Protistology*. In: Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagbuchhandlung (Nägele u. Obermiller).
- Hawksworth, D.L. (1991)** The Fungal Dimension of Biodiversity - Magnitude, Significance, and Conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. and Rossman, A.Y. (1997)** Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87: 888-891.
- Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A. and Walenzik, G. (1989)** Soil Microbial Biomass and Respiration Measurements - an Automated Technique Based on Infrared Gas-Analysis. *Plant and Soil* 116: 191-195.
- He, J.Z., Xu, Z.H. and Hughes, J. (2005)** Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *Fems Microbiology Letters* 247: 91-100.
- Helsen, L. and Van den Bulck, E. (2005)** Review of disposal technologies for chromated copper arsenate (CCA) treated wood waste, with detailed analyses of thermochemical conversion processes. *Environmental Pollution* 134: 301-314.
- Hickmann, E., Hadicke, E. and Reuther, W. (1979)** Isonitramines - Nitrosohydroxylamines or Hydroxydiazonium Oxides. *Tetrahedron Letters*: 2457-2460.
- Hiroki, M. (1992)** Effects of Heavy-Metal Contamination on Soil Microbial-Population. *Soil Science and Plant Nutrition* 38: 141-147.
- Hobbie, E.A., Macko, S.A. and Shugart, H.H. (1999)** Insights into nitrogen and carbon dynamics of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi from isotopic evidence. *Oecologia* 118: 353-360.

- Hoffmann, H. (2004)** Untersuchungen zur Biozidauswirkung auf Bodenbakterien mit Hilfe von mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden. Dissertation.
- Högberg, P., Hogberg, M.N., Quist, M.E., Ekblad, A. and Nasholm, T. (1999)** A Nitrogen isotope fractionation during nitrogen uptake by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* **142**: 569-576.
- Högberg, P., Plamboeck, A.H., Taylor, A.F.S. and Fransson, P.M.A. (1999)** B Natural C-13 abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8534-8539.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2006)** Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1623-1630.
- Hugenholtz, P. (2002)** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* **3**: REVIEWS0003.
- Hughes, A.S. (2004)** The tools at our disposal. In Final workshop COST Action E22 "Environmental Optimisation of Wood Protection" Lisboa, Portugal.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990)** High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jackson, C.R., Harper, J.P., Willoughby, D., Roden, E.E. and Churchill, P.F. (1997)** A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4993-4995.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., Hartwich, M., von Bergen, M., Richnow, H.H. and Vogt, C. (2008)** Incorporation of carbon and nitrogen atoms into proteins measured by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**: 2889-2897.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., Taubert, M., Seifert, J., von Bergen, M., Richnow, H.H. and Vogt, C. (2009)** Comparison of methods for simultaneous identification of bacterial species and determination of metabolic activity by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) experiments. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**: 1871-1878.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., von Bergen, M., Richnow, H.H. and Vogt, C. (2008)** Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *International Society for Microbial Ecology*: 1-12.
- Jensen, H.J. and Siemer, S.R. (1971)** Protection of *Fusarium* and *Verticillium* Propagules from Selected Biocides Following Ingestion by *Pristionchus lheritieri*. *J Nematol* **3**: 23-27.
- Jordan, M.J. and Lechevalier, M.P. (1975)** Effects of Zinc-Smelter Emissions on Forest Soil Microflora. *Canadian Journal of Microbiology* **21**: 1855-1865.
- Jüngel, P. (2002)** Zur Analytik der organischen Komponente von Bis-(N-cyclohexyl-diazoniumoxid)-Kupfer in Holz mittels Direkte Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (DTD-GC-MS). Dissertation.
- Jüngel, P., Wittenzellner, J. and Melcher, E. (2000)** Determination of N-cyclohexyl-diazoniumdioxide (HDO) containing compounds in treated wood using GC-MS. **IRG/WP/00-20201**.
- Kahn, Z. and Kim, J.H. (2007)** A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* **35**: 370-379.
- Kandeler, E., D. Tschirko, K. D. Bruce, M. Stemmer, P. J. Hobbs, R. D. Bardgett and Amelung, W. (2000)**. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* **32**:390-400.
- Kartal, S.N., Munir, E., Kakitani, T. and Imamura, Y. (2004)** Bioremediation of CCA-treated wood by brown-rot fungi *Fomitopsis palustris*, *Coniophora puteana*, and *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Wood Science* **50**: 182-188.
- Kemp, P.F., Lee, S. and Laroche, J. (1993)** Estimating the Growth-Rate of Slowly Growing Marine-Bacteria from Rna-

Content. Applied and Environmental Microbiology 59: 2594-2601.

- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and Trevors, J.T. (2004)** Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58: 169-188
- Kleinstaub, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H. and Muller, S. (2006)** Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3531-3542.
- Knief, C., Altendorf, K. and Lipski, A. (2003)** Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of C-13-labelled fatty acids. *Environmental Microbiology* 5: 1155-1167.
- Kocaefe, D., Shi, J.L., Yang, D.Q. and Zhang, J.L. (2007)** Preliminary study of thermal treatment effects on mold growth of selected Quebec wood species. *Forest Products Journal* 57: 30-33.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W. (1997)** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1489-1497.
- Kwon, E., Zhang, H., Wang, Z., Jhangri, G.S., Lu, X., Fok, N. et al. (2004)** Arsenic on the hands of children after playing in playgrounds. *Environ Health Perspect* 112: 1375-1380.
- Lebow, S. (2004)** Alternatives to Chromated Copper Arsenate (CCA) for Residential Construction. Prepared for Proceedings of the Environmental Impacts of Preservative-Treated Wood Conference Orlando, Florida
- Lechevalier, M.P. (1989)** Lipids in bacterial taxonomy In O'Leary WM (ed) Practical handbook of microbiology CRC, Boca Raton, Fla. 455-561
- Lee, D.H., Zo, Y.G., and Kim, S.J. (1996)** Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3112-3120.
- Leise, W. (1970)** Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annual Review of Phytopathology* 8: 231-258.
- Leita, L., Denobili, M., Muhlbachova, G., Mondini, C., Marchiol, L. and Zerbi, G. (1995)** Bioavailability and Effects of Heavy-Metals on Soil Microbial Biomass Survival during Laboratory Incubation. *Biology and Fertility of Soils* 19: 103-108.
- Lerch, T.Z., Dignac, M.F., Nunan, N., Bardoux, G., Barriuso, E. and Mariotti, A. (2009)** Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D biodegradation revealed by FAME-based Stable Isotope Probing. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 77-85.
- Levy, J.F. (1975)** Bacteria associated with wood in ground contact. In: Biological transformation of wood by microorganisms. Ed. W. Liese. Springer, Berlin.
- Leyer, I. & Wesche, K. (2007)** Multivariate Statistik in der Ökologie: Eine Einführung, Springer, Berlin; Auflage: 1 pp. 195-210
- Liese, W. (1961)** Über die natürliche Dauerhaftigkeit einheimischer und tropischer Holzarten gegenüber Moderfäulepilzen *Mitt. DGFH* 48: 18-28.
- Liese, W. (1964)** Über den Abbau verholzter Zellwändewände durch Moderfäulepilze *Holz Als Roh-Und Werkstoff* 22: 289-295.
- Liese, W. and Ammer, U. (1964)** Über den Befall von Buchenholz durch Moderfäulepilze in Abhängigkeit von der Holzfeuchtigkeit. *Holzforschung* 18: 97-102.
- Little, J.W. (1967)** An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *J Biol Chem* 242: 679-686.

- Liu, W. T., Marsh T. L., Cheng, H. and Forney L. J. (1997).** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4516-4522.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrielle, E., Lobry, C., Delgenes, J.P. and Godon, J.J. (2006)** Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8: 720-731.
- Lüders, T., Manefield, M., and Friedrich, M.W. (2004)** Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ Microbiol* 6: 73-78
- Ma, L.Q., Chirenje, T., Santos, J. (2006)** Impacts of CCA-treated wood on arsenic concentrations of soils and plants. *Publikation des Hinkley Center for solid and hazardous waste management*: 1-28.
- Majcherczyk, A., and Hüttermann, A. (1998)** Bioremediation of wood treated with preservatives using white-rot fungi. London: Taylor and Francis
- Manefield, M., Griffiths, R., McNamara, N.P., Sleep, D., Ostle, N., and Whiteley, A. (2007)** Insights into the fate of a C-13 labelled phenol pulse for stable isotope probing (SIP) experiments. *Journal of Microbiological Methods* 69: 340-344.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., and Bailey, M.J. (2002)** A RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5367-5373.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Ostle, N., Ineson, P. and Bailey, M.J. (2002)** B Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 2179-2183.
- Mangiapan, G., Vokurka, M., Shouls, L., Cadranel, J., Lecossier, D., vanEmbden, J. and Hance, A.J. (1996)** Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1209-1215.
- Manucharova, N.A., Belova, E.V., Vorob'ev, A.V., Polyanskaya, L.M. and Stepanov, A.L. (2005)** Succession of Chitinolytic Microorganisms in Chernozem Soil. *Microbiology* 74: 602-607.
- Marmur, J. (1961)** Procedure for Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms. *Journal of Molecular Biology* 3: 208
- Marutzky, R. (1990)** Waste Management of Wood Treated with Preservatives - Possibilities and Problems. *Holz Als Roh-Und Werkstoff* 48: 19-24.
- Mauclaire, L., Pelz, O., Thullner, M., Abraham, W.R. and Zeyer, J. (2003)** Assimilation of toluene carbon along a bacteria-protist food chain determined by C-13-enrichment of biomarker fatty acids. *Journal of Microbiological Methods* 55: 635-649.
- Mayer, W.E., Herrmann, M. and Sommer, R.J. (2007)** Phylogeny of the nematode genus *Pristionchus* and implications for biodiversity, biogeography and the evolution of hermaphroditism. *Bmc Evolutionary Biology* 7
- Mitterer, M., Bayer, H. and Schinner, F. (1981)** The Influence of Fungicides on Microbial Activity in Soil. *Zeitschrift Für Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 144: 463-471.
- Molnar, K., Avenant-Oldewage, A. and Szekely, C. (2004)** A survey of coccidian infection of freshwater fishes in South Africa, with the description of *Goussia anopli* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 59: 75-80.
- Mook W.G. and de Vries J.J. (2005)** Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle Principles and Applications Volume I: Introduction -theory, methods, Review

- Morris, S.A., Radajewski, S., Willison, T.W. and Murrell, J.C. (2002)** Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1446-1453.
- Morsing, N. and Lindegaard, B. (2004)** Leaching of active components from preservative-treated timber. Stage 1: Semi-filed testing *IRG/WP 04-20302*: 1-32.
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Flemming, C.A. and Bailey, G.W. (1989)** Bacterial Sorption of Heavy-Metals. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 3143-3149.
- Müller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S. and Sorensen, S.J. (2002)** The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology* **44**: 49-58.
- Müller, R.-J., Augusta, J., and Pantke, M. (1992)** An interlaboratory investigation into biodegradation of plastics, Part 1: A modified Sturm-test. *Material und Organismen* **27**: 180-189.
- Mullis, K. B. and Faloona F. A. (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Murase, J., Noll, M. and Frenzel, P. (2006)** Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5436-5444.
- Muyzer, G. (1999)** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**: 317-322.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993)** Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16S Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Myers, R.M., Maniatis, T. and Lerman, L.S. (1987)** Detection and Localization of Single Base Changes by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. *Methods in Enzymology* **155**: 501-527.
- Neefs, J.M., Vandeppeer, Y., Derijk, P., Chapelle, S. and Dewachter, R. (1993)** Compilation of Small Ribosomal-Subunit Rna Structures. *Nucleic Acids Research* **21**: 3025-3049.
- Nies, D.H. (1999)** Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 730-750.
- Nilsson, T. and Edlund, M.L. (1995)** Laboratory versus field tests for evaluating wood preservatives: A scientific view. *IRG/WP/95-20076*.
- Noll, M. (2004)** Mikrobielle Sukzession in geflutetem Reisfeldboden. Dissertation.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M. and Liesack, W. (2005)** Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol* **7**: 382-395.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984)** Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 75-117.
- Nordgren, A., Baath, E. and Soderstrom, B. (1988)** Evaluation of Soil Respiration Characteristics to Assess Heavy-Metal Effects on Soil-Microorganisms Using Glutamic-Acid as a Substrate. *Soil Biology & Biochemistry* **20**: 949-954.
- O'Leary W, M. and Wilkinson S, G. (1988)** Gram-positive bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) *Microbial lipids*. London.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989)** Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel-Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 2766-2770.
- Orsler, R. J. and Holland G. E. (1993).** Assesment of Losses of Wood Preservatives from Treated Wood by Leaching

Into the Environment. IRG-93-50001.

- Osman, G.Y. (1989)** Studies on *Diplogaster* Sp (Nematodes) as a Predator of Some Plant Parasitic Nematodes. *Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* **62**: 11-14.
- Pennanen, T., Frostegard, A., Fritze H. and Baath, E. (1996)**. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:420-428.
- Petrowitz, H.J. (1971)** Fortschritte auf dem Gebiet der Analyse öliiger Holzschutzmittel. *Holzforschung und Holzverwertung* **23**: 49-53.
- Petrowitz, H.J. and Wagner, M. (1981)** Dünnschicht-Chromatographie von insektiziden und fungiziden Wirkstoffen in öliigen Holzschutzmitteln. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* **305**: 196-199.
- Ponge, J.F. (1991)** Succession of Fungi and Fauna during Decomposition of Needles in a Small Area of Scots Pine Litter. *Plant and Soil* **138**: 99-113.
- Powell, K.L., Pedley, S., Daniel, G. and Corfield, M. (2001)** Ultrastructural observations of microbial succession and decay of wood buried at a Bronze Age archaeological site. *International Biodeterioration & Biodegradation* **47**: 165-173.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C., Fleming, C.C., Szalanski, A.L. et al. (1997)** The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *J Nematol* **29**: 441-450.
- Pühler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H.P., Lottspeich, F. et al. (1989)** Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4569-4573.
- Qiu, Q.F., Noll, M., Abraham, W.R., Lu, Y.H. and Conrad, R. (2008)** Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities in situ. *Isme Journal* **2**: 602-614.
- Qiu, X.Y., Wu, L.Y., Huang, H.S., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. and Zhou, J.Z. (2001)** Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 880-887.
- Råberg, U., Hogberg, N.O.S. and Land, C.J. (2005)** Detection and species discrimination using rDNA T-RFLP for identification of wood decay fungi. *Holzforschung* **59**: 696-702.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. and Murrell, J.C. (2000)** Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Radajewski, S., McDonald, I.R. and Murrell, J.C. (2003)** Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 296-302.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D.S., Morris, S.A., Ineson, P., Nedwell, D.B. et al. (2002)** Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stableisotope probing. *Microbiology-Sgm* **148**: 2331-2342.
- Ranjard, L., Poly, F. and Nazaret, S. (2000)** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**: 167-177.
- Ratledge, C. and Wilkinson, S., G (1988)** *Microbial Lipids*. London: Academic Press.
- Reblova, M. (2003)** *Utriascus*, a new ascomycetous genus in the Sordariales. *Mycologia* **95**: 128-133.
- Robinson, H., Ang, M.C., Gao, Y.G., Hay, M.T., Lu, Y., and Wang, A.H. (1999)** Structural basis of electron transfer modulation in the purple CuA center. *Biochemistry* **38**: 5677-5683.
- Rönnpapel, K., Janssen E. and Ahlf, W. (1998)**. Asking for the indicator function of bioassays evaluating soil contamination: Are bioassay results reasonable surrogates of effects on soil microflora? *Chemosphere* **36**:1291-1304.



- Rosset, R., Julien, J. and Monier, R. (1966)** Ribonucleic Acid Composition of Bacteria as a Function of Growth Rate. *Journal of Molecular Biology* **18**: 308-
- Ruess, L., Haggblom, M.M., Zapata, E.J.G. and Dighton, J. (2002)** Fatty acids of fungi and nematodes - possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 745-756.
- Sambrook and Russel (2001)** *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3 Edition Cold Spring Harobr Laboratory Press, Cold Spring Harobr; New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Scheffer, F. and Schachtenschnabel, P. (2002)** *Lehrbuch der Bodenkunde Heidelberg*: Spektrum Akademischer Verlag 15 Auflage.
- Schleifer, K.H. (2004)** Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Syst Appl Microbiol* **27**: 3-9.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F. and Tebbe, C.C. (2001)** Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3557-3563.
- Schmidt, O. (1986)** Investigations on the influence of woodinhabiting bacteria on the pH-value in trees. *European Journal of Plant Pathology* **16**: 181-189.
- Schmidt, O. (2006)** *Wood and Tree Fungi - Biologie, Demage, Protection, and Use*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Schmidt, O. and Liese, W. (1974)** Untersuchungen über die Wirksamkeit von Holzschutzmitteln gegenüber Bakterien. *Material und Organismen* **9** 213-224.
- Schmidt, O. and Liese, W. (1976)** Das Verhalten einiger Bakterien gegenüber Giften. *Material und Organismen Beih.* **3**: 197-209.
- Schmidt, O., and Liese, W. (1994)** Occurrence and Significance of Bacteria in Wood. *Holzforschung* **48**: 271-277.
- Schreiber, F. and Szewzyk, U. (2008)** Environmentally relevant concentrations of pharmaceuticals influence the initial adhesion of bacteria. *Aquatic Toxicology* **87** : 227-233
- Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (1998)** A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (12): 4870-4876.
- Schwieger, F. and Tebbe, C.C. (2000)** Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) - Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3556-3565.
- Seibold, A. (2002)** Strukturelle und funktionelle Analysen von Bakterienpopulationen mit Hilfe der PCR-SSCP in sechs unterschiedlichen Modellböden. Dissertation.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H. and Kandeler, E. (2001)** Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4215-4224.
- Shirakawa, M.A., Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., John, V. and Gambale, W. (2002)** Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *Fems Microbiology Ecology* **39**: 165-173.
- Shrestha, M., Abraham, W.R., Shrestha, P.M., Noll, M. and Conrad, R. (2008)** Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environmental Microbiology* **10**: 400-412.

- Singht, A.P., Nilsson, T., and Daniel, G.F. (1990)** Ultrastructure of the Attack of a Naturally Timber by Tunneling Bacteria. *IRG* 90-1462.
- Speno, H., Taheri, M.R., Sieburth, D. and Martin, C.T. (1995)** Identification of essential amino acids within the proposed CuA binding site in subunit II of Cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 270: 25363-25369.
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J. and Schleifer, K.H. (2000)** Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *Fems Microbiology Reviews* 24: 573-590.
- Stephan, I. and Mierke, W. (2006).** Measuring Soil Respiration as a New Approach to Describe the Interaction Between Wood (Treated and Untreated) and Microbiologically Active Soil. *IRG/WP* 06-20344
- Stephan, I., Stegemann, A. and Heidrich, G. (2001)** Isolation of Soil Borne Bacteria and Fungi from Treated Timber. *IRG/WP* 01-50174.
- Sturm, R.N. (1973)** Biodegradability of Nonionic Surfactants - Screening-Test for Predicting Rate and Ultimate Biodegradation. *Journal of the American Oil Chemists Society* 50: 159-167.
- Sutter, H.-P. (1992)** Holzschädlinge an Kulturgütern erkennen und bekämpfen. Haupt-Verlag.
- Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1996)** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 625-630.
- Taylor, D.K., Bytheway, I., Barton, D.H.R., Bayse, C.A. and Hall, M.B. (1995)** Toward the Generation of No in Biological-Systems - Theoretical-Studies of the N2o2 Grouping. *Journal of Organic Chemistry* 60: 435-444.
- Temitz, A., Nilsson, T., Demirtas, I. and Yildiz, U. (2004)** Leachability And Decay Resistance of Copper-Trated wood. *IRG/WP* 04-30337.
- Ter Braak, C.J.F. and Šmilauer, P. (1998)** Canoco Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination In. Ithaca N.Y.
- Tom-Petersen, A., Hansen, H.C.B. and Nybroe, O. (2004)** Time and moisture effects on total and bioavailable copper in soil water extracts. *Journal of Environmental Quality* 33: 505-512.
- Treonis, A.M., Ostle, N.J., Stott, A.W., Primrose, R., Grayston, S.J. and Ineson, P. (2004)** Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 533-537.
- Tsai, Y.L. and Olson, B.H. (1992)** Rapid Method for Separation of Bacterial-DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain-Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2292-2295.
- Tunlid, A. and White, D.C. (1992)** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. . In: Stotzky, G., Bollag, J.-M. (Eds). *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York: 229-262.
- Tunlid, A., Baird, B.H., Trexler, M.B., Olsson, S., Findlay, R.H., Odham, G. and White, D.C. (1985)** Determination of Phospholipid Ester-Linked Fatty-Acids and Poly Beta-Hydroxybutyrate for the Estimation of Bacterial Biomass and Activity in the Rhizosphere of the Rape Plant Brassica-Napus (L). *Canadian Journal of Microbiology* 31: 1113-1119.
- Ulrich, A. and Becker, R. (2006)** Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. *Fems Microbiology Ecology* 56: 430-443.
- Urrutia, M. M. (1997)** General bacterial sorption processes JDA Wase, C. Foster (eds). *Biosorbents for metal ions*:39-66.
- van Beelen, P. and Doelman, P. (1997)** Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34: 455-499.

- van der Wal, A., de Boer, W., Smant, W. and van Veen, J.A. (2007) Initial decay of woody fragments in soil is influenced by size, vertical position, nitrogen availability and soil origin. *Plant and Soil* **301**: 189-201.
- van Hannen, E.J., Zwart, G., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Ebert, J. and Laanbroek, H.J. (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 795-801.
- Venäläinen, M., Harju, A.M., Nikkanen, T., Paajanen, L., Velling, P. and Viitanen, H. (2001) Genetic variation in the decay resistance of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) wood. *Holzforschung* **55**: 1-6.
- Wälchli, O. and Tscholl, H.P. (1975) Möglichkeiten der Bekämpfung holzzerstörender Insekten ohne Giftnutzung Holz als Roh- und Werkstoff **33**: 49-53.
- Wallace, D.F. and Dickinson, D.J. (2004) 16S rRNA Analysis of the Bacteria Associated with Biocide Degradation. 35th Annual meeting IRG/WP 04-10543.
- Wallace, D.F. and Dickinson, D.J. (2006) The bacterial transformation of organic biocides; a common mechanism? IRG/WP 06-10585: 1-7.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H. and Harayama, S. (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4396-4402.
- Watzinger, A., Stemmer, M., Pfeffer, M., Rasche, F. and Reichenauer, T.G. (2008) Methanotrophic communities in a landfill cover soil as revealed by [<sup>13</sup>C] PLFAs and respiratory quinones: Impact of high methane addition and landfill leachate irrigation. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 751-762.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Wendlandt, W.W., Iftikhar, S. and Stembridge, C.H. (1964) Thermal Dissociation of Some Metal Cupferrate Chelates. *Analytica Chimica Acta* **31**: 501-508.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D. and Bobbie, R.J. (1979) Determination of the Sedimentary Microbial Biomass by Extractable Lipid Phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- Wilke, B.-M. and Winkel, B. (1999) Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ In Praxiserprobung biologischer Testverfahren Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes, pp. Kapitel 9.3.1.: 1- 26.
- Wilke, B.M., Mai, M., Gattinger, A., Schloter, M. and Gong, P. (2005) Effects of fresh and aged copper contaminations on soil microorganisms. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **168**: 668-675.
- Willeitner, H. (1973) Evaluating Wood Preservative Methods with Respect to Environmental Pollution. *Holz Als Roh- Und Werkstoff* **31**: 137-140.
- Willeitner, H., Klipp, H., and Brandt, K. (1991) Practical Observations on Leaching of Chromium, Copper and Boron from Half-Round Spruce Sections of a Wall for Noise Abatement. *Holz Als Roh-Und Werkstoff* **49**: 140-140.
- Willeitner, H., Schmidt, O. and Wollenberg, E. (1977) Orientierende Versuche zur bakteriellen Detoxifikation von Holzschutzmitteln. *Material und Organismen* **12**: 279-286.
- Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3741-3751.
- Winquist, E., Valentin, L., Moilanen, U., Leisola, M., Hatakka, A., Tuomela, M. and Steffen, K.T. (2009) Development of a fungal pre-treatment process for reduction of organic matter in contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84**: 845-850.
- Witzenzellner und Mitarbeiter (1999) Interne Vorschrift der Firma Dr. Wolman GmbH

- Wittenzellner, J. (2006)** Interne Studie der Dr. Wolman-GmbH Nr. **06-FEA-002**: „Validation of a HPLC method for the determination of Cu(HDO)<sub>2</sub> in soil“ (Persönliche Mitteilung)
- Woese, C.R. (1987)** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Zelles, L. (1999)** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 111-129.
- Zelles, L. (1997)** Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **35**: 275-294.
- Zelles, L. and Bai, Q.Y. (1993)** Fractionation of Fatty-Acids Derived from Soil Lipids by Solid-Phase Extraction and Their Quantitative-Analysis by Gc-Ms. *Soil Biology & Biochemistry* **25**: 495-507.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T. and Beese, F. (1992)** Signature Fatty-Acids in Phospholipids and Lipopolysaccharides as Indicators of Microbial Biomass and Community Structure in Agricultural Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **24**: 317-323.
- Zhang, C.L., Huang, Z.Y., Cantu, J., Pancost, R.D., Brigmon, R.L., Lyons, T.W. and Sassen, R. (2005)** Lipid biomarkers and carbon isotope signatures of a microbial (Beggiatoa) mat associated with gas hydrates in the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2106-2112.
- Zhang, J. and Kamdem, D.P. (1999)** Interaction of Copper-Amine Komplexes with Wood: Influence of Copper Source, Amine Ligands and Amine to Copper Molar ratio on Copper Retention and Leaching. **IRG-WP 99-30203**.
- Zhang, N., Castlebury, L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S.M., Schoch, C.L., Seifert, K.A. et al. (2006)** An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* **98**: 1076-1087.
- Zhou, J.Z., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M. (1996)** DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 316-322.
- Zogg, G.P., Zak, D.R., Ringelberg, D.B., MacDonald, N.W., Pregitzer, K.S. and White, D.C. (1997)** Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal* **61**: 475-481.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
„a“ in einer PLFA	aniso, Methylgruppen-Verzweigungen werden durch ein vorangestelltes „a“ für eine antiso Verzweigung angezeigt
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bi-Bo	Testansätze mit Biozid im Boden
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
„br“ in einer PLFA	branced - Vorsilbe vor einer PLFA, gibt an wenn die Position einer Methylgruppe unbekannt ist
C	Cytosin
„c“ in einer PLFA	cis, durch ein vorangestelltes „c“ wird die Konfiguration der Doppelbindung angegeben
CCA	Holzschutzmittel, Chrom-Kupfer-Arsen
„cy“ in einer PLFA	Cyclopropylring
„d“ in einer PLFA	z.B. in 19:0d8,9 steht für die Position des Cyclopropans in der Kohlenstoffkette
DAD	Diodenarray-Detektor; DAD Chromatogramme werden mittels HPLC erzeugt
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DGGE	Denaturierende Gradient Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
ET AL.	und andere
f	Vorwärts („forward“)
FAM	Fluorescein am 5' Ende eines Oligonukleotidprimers
FAME	Fettsäuremethylester
G	Guanin
GC-IRMS	Gaschromatograph mit angeschlossenem Isotopen-Massenspektrometer
GC-MS	Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer
GK	Gebrauchsklasse, in der ein Holzschutzmittel eingesetzt wird
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HSM	Holzschutzmittel
HSM-Ho-Bo	Testansätze mit Holzschutzmittel in Holzspänen mit Bodenkontakt
HSM-Pr-Bo	Testansätze mit Holzprüfkörpern im Bodenkontakt
„i“ in einer PLFA	iso, Methylgruppen-Verzweigungen werden durch ein vorangestelltes „i“ für eine iso-Verzweigung angegeben
KA	Korrespondenzanalyse
kb	Kilobasen
l	Liter

## Abkürzungsverzeichnis

---

Lindan	$\gamma$ -Hexachlorcyclohexan
LOD	Detektionslimit
$\mu$	Mikro
MDE	Mutation Detection Enhancement, Matrix für z.B. SSCP-Gele
n	Nano
nA	Nanoampere
NCBI	National Center für Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
OTU	Aktive taxonomische Einheit (Operational Taxonomic Unit)
-PH	Phosphatgruppe am 5' Ende eines Oligonukleotidprimers
PCP	Pentachlorphenol
PCR	Polymeraseketten-Reaktion („polymerase chain reaction“) Pentachlorpheno
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PLFA	Phospholipidfettsäure
r	Rückwärts („reverse“)
rA	relative Abundanz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen (Runde) pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
S-Bande	Bande im SSCP-Gel, die charakteristisch für die Veränderungen über die Inkubationszeit und im Bezug auf die HSM war
SDS	Sodiumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
SSCP	Einzel-Strang-Conformation-Polymorphismus (single Strand Conformation Polymorphism)
T	Thymin
„t“ in einer PLFA	trans, durch ein vorangestelltes „t“ wird die Konfiguration der Doppelbindung angegeben
T-RF	terminals Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler- Restriktion- Längen- Polymorphoismus (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
TBE	Trisborat-EDTA-Puffer
TC	Organischer Kohlenstoff
TC/N	Verhältnis organischer Kohlenstoff zu Stickstoff
TE	Tris/EDTA-Puffer
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIC	Total Ion Chromatogramm
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit („unit“)
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
V4 - V5	Variable Regionen 4 - 5
W	Watt

$\omega$	Aliphatisches Molekülende, die folgende Zahl gibt die Position der Doppelbindung an
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
w/w	Gewicht pro Gewicht („weight per weight“)
$W_g$	Gravimetrischer Wassergehalt
WHK	Wasserhaltekapazität

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt der Bundesanstalt für Materialforschung- und Prüfung in Berlin für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Mitteln und Räumlichkeiten, sowie Prof. Dr. Szewzyk für die externe Betreuung meiner Arbeit. Herrn Dr. Matthias Noll, Frau Dr. Stephan und Prof. Dr. Horst Hertel möchte ich herzlich für die exzellente Betreuung meiner Arbeit und für die vielen hilfreichen fachlichen Gespräche und Diskussionen danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, Herrn Prof. Dr. Horst Hertel und Herrn Dr. Matthias Noll für die Erstellung der Gutachten dieser Arbeit und bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rotard für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Helena Mathies die mich mit Ihrem Fachwissen in der Chemie sowie mit Ihrer Hilfe bei meinen ersten Gehversuchen auf dem Gebiet der Phospholipidextraktion sehr unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank Frau Dr. Ute Schoknecht die mich in allen chemischen Fragestellungen exzellent beraten und betreut hat, sowie Frau Hannelore Bergmann für die Einführung in die AAS.

Der Firma Dr. Wolman GmbH danke für die Bereitstellung der Biozide und Holzschutzmittel. Speziell sei den Mitarbeitern der Firma Dr. Wolman GmbH: Herrn Wendelin Hettler, Herrn Dr. Jörg Habicht, Herrn Dr. Bernd Seidel und Herrn Dr. Joachim Wittenzellner für den sehr guten fachlichen Austausch und die Unterstützung gedankt.

Herrn Dr. Wolfgang Pritzkow und Herrn Dr. Wolf-Rainer Abraham möchte ich für die Analysen meiner Proben mittels EA-GCMS bzw. GC-C-IRMS danken. Herrn Jans-Joachim Heine sei für die Hilfe bei der Bestimmung der Gase in meinen Proben herzlichst gedankt. Frau Dr. Kalbe und Frau Renate Helm einen herzlichen Dank für die Analyse der Zusammensetzung meiner Bodenproben.

Bei Frau Christel Teuber und Frau Kerstin Klutzney bedanke ich mich für die Einführung in die SSCP-Methodik bzw. für die Hilfe bei der Tränkung meiner Hölzer, sowie für den Beistand und die Lösung von vielen kleinen und großen technischen Problemen. Bei Frau Angelika Lau möchte ich mich sehr für die viele Unterstützung bedanken. Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei Frau Jenny Straßner bedanken, die mir fachlich und menschlich immer eine große Stütze war. Vielen



Dank auch bei Frau Gisela Petrowitz, für die praktische Unterstützung und bei Frau Wilma Mierke für so manchen exzellenten Rat zur Bedienung des Gasanalysators.

Ich danke meinen Korrekturlesern Frau Dr. Karin Schwibbert, Frau Dr. Viola Eckey und Frau Dr. Ute Schoknecht.

Janine Hilmes, Sylvia Fassbender, Lydia Bräunlich, Christian Reger, Yvonne de Laval und Thomas Sommerfeld danke ich für viele gute Diskussionen, viele schöne Stunden bei der Arbeit, den tägliche Kaffeeklatsch aber auch für so manche moralische Unterstützung. Ferne danke ich der gesamten Abteilung VI.1, der Bundesanstalt für Materialforschung- und Prüfung, für eine angenehme und abwechslungsreiche Arbeitsatmosphäre und sehr produktive drei Jahre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Olli, der trotz der großen Entfernung meine Launen immer ertragen hat und die letzten Jahre immer an meiner Seite war. Danke auch meiner gesamten Familie, dass sie immer für mich da gewesen ist.