

Dipl.-Mineralogin Heike Hoffmann

**Untersuchungen zur Biozidaus-  
wirkung auf Bodenbakterien mit Hilfe  
von mikrobiologischen und  
molekularbiologischen Methoden**

Diese Arbeit entstand an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in der Fachgruppe IV.1 „Biologie im Umwelt- und Materialschutz“. Es handelt sich hierbei um eine überarbeitete Ausgabe der vom Fachbereich Geowissenschaften der Universität Hamburg genehmigten Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Dipl.-Mineralogin Heike Hoffmann geb. am 15. 10. 1972 in Hamburg.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Bismayer  
Dr. rer. nat. Horst Hertel

Promotionskolloquium: 15. Juli 2004

Impressum

**Untersuchungen zur Biozidauswirkung auf  
Bodenbakterien mit Hilfe von mikrobiologischen  
und molekularbiologischen Methoden**

2004

Herausgeber:  
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)  
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 © 2004 by Bundesanstalt für  
Materialforschung und -prüfung (BAM)

Herstellung und Verlag:  
Wirtschaftsverlag NW  
Verlag für neue Wissenschaft GmbH  
27568 Bremerhaven  
Telefon: +49 471 94544-0  
Telefax: +49 471 94544-77/-88

Layout: BAM-Referat G.1

ISSN 1613-4249

ISBN ISBN 3-86509-201-2

## Zusammenfassung

Angemessene Methoden zur Überprüfung von Bakterienpopulationen im Boden sind für die toxikologische Bewertung von Chemikalien, Bioziden und schadstoffbelasteten Böden besonders wichtig, da sie Auskünfte über die biologische Wirksamkeit eines Stoffes auf Organismen geben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand einerseits darin, molekularbiologische Methoden (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) zur Analyse mikrobieller Populationen für den Lebensraum Boden zu etablieren. Andererseits sollte die Charakterisierung und funktionelle Beschreibung der mikrobiellen Bodenpopulation unter Biozideinfluss in zwei unterschiedlichen Modellsystemen (in Flüssigkulturen und Bodensystem) erfolgen.

Seit einiger Zeit erfolgt eine Wandlung in der Holzschutzmittelanwendung von metallhaltigen zu organisch basierten Wirkstoffen. Der Austrag und die Auswirkung von zwei organischen Holzschutzmittelkomponenten (Tebuconazol und Benzalkoniumchlorid) aus dem Holz in den Boden wurde zunächst mit Hilfe von Kultivierungstechniken und chemischen Analysen untersucht. Durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) konnte eine Abschätzung über die Auswirkung der Biozide auf die Bodenbakterien gemacht werden. Die methodischen Einschränkungen und die Arbeitsintensität machte die Notwendigkeit für molekularbiologischer Methoden deutlich. Als zentrale molekularbiologische Methode wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) angewendet.

Das Potential dieser Methode wurde zum einen an einem Modellsystem in Flüssigkulturen („*in vitro*“) getestet und zum anderen durch Etablierung einer Extraktionsmethode als Vorschritt der FISH-Technik für Bodensysteme anwendbar gemacht. Um zu verifizieren, inwieweit Biozide (besonders Tebuconazol und Benzalkoniumchlorid) auf unterschiedliche Bakteriengruppen wirken, wurde ein Modellsystem „*in vitro*“ entwickelt. Anhand von ausgewählten Bakterienarten konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von FISH und einer „Färbe“- Methode (Live/Dead- Test) die Wirksamkeit der Biozide abgeschätzt werden kann. Es zeigte sich zum Beispiel, dass die Gram<sup>+</sup> Bakterien i.d.R. empfindlicher gegenüber Benzalkoniumchlorid waren als Gram<sup>-</sup> Bakterien. Die Untersuchungen an ausgewählten Reinkulturen und Mischkulturen erlaubten eine quantitative Abschätzung der Biozidauswirkungen und bieten ein Potential, Biozide vor ihrer Anwendung zu testen.

Im Boden stören bzw. verhindern die Huminstoffe die Anwendung von FISH. Durch Etablierung einer Extraktionsmethode, bei der mit Hilfe von Polyvinylpyrrolidon (PVP) die Bakterienextrakte aufgereinigt werden, gelang es, die FISH-Technik auch für Bodensysteme anzuwenden. Es wurde ein zweites Modellsystem untersucht, bei dem die Populationsänderung im Boden direkt durch FISH überprüft und gleichzeitig die Auswirkung der Biozide auf die Bodenfunktion anhand der Messung der Bodenatmung bestimmt wurde. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakteriengruppen bei toxischer Auswirkung von Tebuconazol und Benzalkoniumchlorid auf die Bodenatmung entweder prozentual im Boden zurückgingen (Gram<sup>+</sup> Bakterien mit niedrigen G+C-Gehalt durch Tebuconazolkontamination), oder andere Gruppen einen gesteigerten Anteil in der Population zeigten (Proteobakterien der Subklasse Alpha und Gamma durch Benzalkoniumchlorid). Es war so möglich, durch FISH die Verteilung verschiedener phylogenetischer Gruppen mittels Einsatz spezifischer Oligonukleotidsonden im Boden zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind geeignet, Bakterienarten mit möglichen hohen Abbaupotentialen zu finden. Anhand von verschiedenen Fallbeispielen von Verunreinigungen in

Böden und Flüssigkulturen wurden die Möglichkeiten des Einsatzes von molekularbiologischen Methoden (besonders FISH) aufgezeigt.

## Abstract

Suitable analysis techniques to detect bacterial communities are essential to assess the toxicity of chemical, biocides and polluted soil, because they can provide direct information about the biological efficacy of a specific compound on the organisms.

The goal of the present thesis was firstly, to develop molecularbiological methods to investigate microbial population in soil ecosystems, and secondly to apply these methods for the characterization of microbial communities under biocide pollution.

In recent times metal-based substances normally employed in wood preservation are being more commonly replaced by substances with an organic basis. The effluence and effect of two wood preserver compounds (tebuconazole, benzalconiumchloride) discharged from the wood into the soil was investigated using culture depending techniques and chemical analysis. By determination of colony forming units (cfu) one can estimate the effects of biocides on the soil bacteria. Due to methodical limitations and the level of work involved for such analysis, the necessity to develop molecular biological methods is evident. The fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) was used as the basis for molecular biological investigations.

On the one hand it was possible to test the potential of this method in a modellsystem („in vitro“), and on the other to apply it on soilsystems after establishing an extraction method as a first step before the FISH-technique. To verify how biocides (especially tebuconazole and benzalconiumchloride) effect different bacteria groups, the mode of action was tested in the model „in vitro“ system. By employing the FISH-technique and a „staining“- method (Live/Dead- test, moleculare probes, NL), the efficacy of the biocides could be estimated. It was shown that gram positive bacteria were more sensitive against benzalconiumchloride than gram negative bacteria. Investigations on these type of modellsystems with pure and mix cultures enable a quantitative evaluation of the biocides effectiveness, and provide a possibility for checking new biocides before application.

In soil humic acid inhibit the application of FISH. An extraction method was established which functions by cleaning the bacterial extract with polyvinylpyrrolidone (PVP) and so it was possible to detect bacteria in soil with the FISH-technique.

In a second modellsystem the changes of the population in the soil were investigated directly by FISH, while the soil function was controlled separately by measuring the soil respiration. In this examination it was shown, that under toxic influence to the soil respiration some bacteria groups decreased (gram positive bacteria with low G+C- Content under tebuconazole influence) in the soil, whereas other groups increased (Proteobacteria of the subclasses alpha and gamma under benzalconiumchloride influence). By using different case examples in this thesis, it was possible to demonstrate the detection of the different physiological groups with rRNA-targeting oligonucleotides in the soil. In this manner the potential of molecular biological techniques (in-particular FISH) for the analysis of impurities in soil was demonstrated.

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGEN

### 1 EINLEITUNG

---

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 1.1 ANLASS .....                     | 9  |
| 1.2 FRAGEN UND ZIEL DER ARBEIT ..... | 10 |

### 2 THEORETISCHER HINTERGRUND

---

|   |    |
|---|----|
| 2.1 DIVERSITÄT VON MIKROBIELLEN LEBENSGEMEINSCHAFTEN IM BODEN .....         | 11 |
| 2.2 BODENBELASTUNG DURCH SCHADSTOFFE IM BODEN .....                         | 13 |
| 2.3 GRUNDLAGEN ZU BAKTERIEN IN BÖDEN. ....                                  | 17 |
| 2.4 METHODEN ZUR BEURTEILUNG VON MIKROBIELLEN LEBENSGEMEINSCHAFTEN .....    | 22 |
| 2.4.1 Bodenatmung. ....   | 23 |
| 2.4.2 Nachweis von Bakterien durch kultivierungsunabhängigen Methoden ..... | 24 |

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

|   |    |
|---|----|
| 3.1 CHEMIKALIEN .....   | 29 |
| 3.2 AUFBAU DES MODELLSYSTEMS MIT HOLZ UND ERDE .....                        | 29 |
| 3.3 CHEMISCHE METHODEN .....  | 31 |
| 3.4 BESTIMMUNG ALLGEMEINER BODENPARAMETER .....                             | 36 |
| 3.5 BESTIMMUNG DER MIKROBIELLEN BODENATMUNG (ATMUNGSKURVEN) .....           | 37 |
| 3.6 MIKROBIOLOGISCHE ANALYSEN .....   | 40 |
| 3.6.1 Verwendete Bakterienstämme .....                                      | 40 |
| 3.6.2 Medien .....  | 41 |
| 3.6.3 Bestimmung mikrobiologischer Grundgrößen. ....                        | 44 |
| 3.6.4 Stammhaltung, Kultivierung, Bakteriengewinnung .....                  | 45 |
| 3.7 BIOCHEMISCHE ANALYSEN .....   | 46 |
| 3.7.1 Proteingehaltbestimmung .....   | 46 |
| 3.7.2 Glucosegehaltbestimmung .....   | 47 |
| 3.7.3 Dehydrogenasebestimmung nach Thalmann .....                           | 47 |
| 3.8 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....                                     | 49 |
| 3.8.1 Verwendete Oligonukleotide .....                                      | 49 |
| 3.8.2 Fluoreszenzmikroskopie .....  | 49 |
| 3.8.3 Nachweis der bakteriellen Lebensfähigkeit .....                       | 50 |
| 3.8.4 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisation (FISH) .....                 | 52 |
| 3.8.5 Methoden zur Etablierung einer Bodenextraktionsmethode für FISH ..... | 57 |

## **4 ERGEBNISSE**

---

|   |     |
|---|-----|
| 4.1 EINTRAG UND EINFLUSS VON HOLZSCHUTZMITTELKOMPONENTEN AUF DIE BAKTERIENPOPULATION IM BODEN: MODELLSYSTEM .....   | 59  |
| 4.1.1 Quantitative Charakterisierung .....  | 59  |
| 4.1.2 Lebendzellzahl im Boden .....   | 65  |
| 4.2 AUSWIRKUNG VON BIOZIDEN AUF AUSGEWÄHLTE BODENBAKTERIEN DURCH MESSUNG DER LEBENSFÄHIGKEIT (LIVE/DEAD) .....  | 67  |
| 4.2.1 Modifizierung des Anzuchtmedium .....   | 67  |
| 4.2.2 Toleranztest .....  | 68  |
| 4.2.3 Live/Dead-Test .....  | 70  |
| 4.3 WIRKUNG DER SCHADSTOFFE AUF BAKTERIENGEMEINSCHAFTEN IM MODELLSYSTEM .....   | 78  |
| 4.3.1 Wachstumsraten der ausgewählten Modellorganismen .....  | 78  |
| 4.3.2 Wirkung von Biozide charakterisiert durch FISH .....  | 80  |
| 4.4 WIRKUNG VON UNTERSCHIEDLICHER KONTAMINATION IN NATÜRLICHEN BODEN .....  | 96  |
| 4.4.1 Wirkungsbereich der eingesetzten Biozide mittels Messung von Atmungskurven .....  | 96  |
| 4.4.2 Atmungskurven mit ADC 2250 Gasanalysator .....  | 99  |
| 4.4.3 Methodische Ergebnisse und Ergänzung zur Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von Bodenbakterien .....   | 108 |
| 4.4.4 Quantitative Charaktrisierung von mikrobiellen Populationen nach DAPI-Färbung und <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) mittels Fluoreszenzmikroskopie ..... | 112 |

## **5 DISKUSSION**

---

|  |     |
|--|-----|
| 5.1 METHODISCHER ANSATZ (GRENZEN DER METHODEN) .....   | 119 |
| 5.1.1 Kultivierung der Bakterien ( Erfassung der KBE) .....                                    | 120 |
| 5.1.2 Eignung des Modellsystems zur Beurteilung der Biozidauswirkung.. .....                   | 121 |
| 5.1.3 Lebensfähigkeit der Bakterien nach Biozidzugabe.. .....                                  | 122 |
| 5.1.4 Analyse der bakteriellen Zusammensetzung mit FISH. ....                                  | 122 |
| 5.1.5 Bodenfunktionen: Bodenatmung und Dehydrogenase. ....                                     | 124 |
| 5.2 FLUORESZENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG IN BODENMATERIALEN .....                         | 127 |
| 5.2.1 Etablierung einer Extraktionsmethode .....   | 127 |
| 5.2.2 Probleme bei der Analyse von bakterieller Diversität im Boden (Potential von FISH) ..... | 129 |
| 5.3 REAKTION DER BODENMIKROORGANISMEN AUF UNTERSCHIEDLICHE BELASTUNG .....                     | 130 |
| 5.4 KRITISCHE BETRACHTUNG UND AUSBLICK .....   | 136 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>6 LITERATUR</b>   | <b>140</b> |
| <hr/>  |            |
| <b>7 ANHANG</b>  |            |
| 7.1 DEHYDROGENASE NACH THALMANN .....                                | <b>151</b> |
| 7.2 WACHSTUMSVERHALTEN DER BAKTERIEN IM TOLERANZTEST .....           | <b>151</b> |
| 7.3 FLUORESZENZBILDER VERSCHIEDENER BAKTERIENARTEN (LIVE/DEAD) ..... | <b>154</b> |
| 7.4 TABELLENVERZEICHNIS. ....  | <b>163</b> |
| 7.5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....                                      | <b>164</b> |
| <b>DANKSAGUNG</b>  | <b>167</b> |
| <hr/>  |            |

## Verwendete Abkürzungen

|             |   |
|-------------|---|
| BAC         | Benzalkoniumchlorid   |
| Cy3         | indocarbocyanine  |
| Cy5         | indodicarbocyanine  |
| DAD         | Diodenarray - Detektor  |
| DAPI        | 4',6-diamidino-2-phenylindole   |
| DHA         | Dehydrogenase-Aktivität   |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| FA          | Formamid  |
| FID         | Flammenionisations - Detektor   |
| FISH        | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridization  |
| FLUOS       | 5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester   |
| G+C- Gehalt | gibt das Verhältnis der Mole der Basen <b>G</b> uanin und <b>C</b> ytosin zu der Summe der Mole der Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einer DNA (in Prozent) an |
| HPLC        | High Performance Liquid Chromatography  |
| HSM         | Holzschutzmittel  |
| KBE         | koloniebildende Einheiten   |
| OD          | Optische Dichte   |
| PBS         | phosphatgepufferte Saline   |
| PI          | Propidium Jodid   |
| PFA         | Paraformaldehyde  |
| PVP         | Polyvinylpyrrolidone  |
| rpm         | Umdrehungen (Runde) pro Minute  |
| SDS         | Natriumdodecylsulfat  |
| TE          | Tris/EDTA- Puffer   |
| TEB         | Tebuconazole  |
| Tris        | Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan   |
| TS          | Trockensubstanz   |
| TTC         | Triphenyltetrazoliumchlorid   |
| TPF         | Triphenyltetrazoliumformazan  |
| v/v         | Volumen pro Volumen   |
| WHK         | Wasserhaltekapazität  |
| WS          | Wirkstoff   |
| w/v         | Gewicht pro Volumen   |



# 1 Einleitung

## 1.1 Anlass

In den letzten Jahrzehnten stieg der Einsatz von Bioziden, und damit das Ausmaß der Verunreinigung unserer Umwelt, in sehr starken Maßen. Die nachteilige Reaktion dieser Verschmutzung auf die sogenannten „Nicht-Zielorganismen“ ist noch immer nicht ausreichend untersucht. Infolge der Zunahme von Verschmutzung wie z.B. der Böden wurden immer mehr Verfahren entwickelt, um die Schadstoffe aus der Umwelt zu beseitigen. Biologische Sanierungen erscheinen dabei als besonders attraktiv, weil sich dabei im Idealfall die Schadstoffe direkt im Erdreich mit Hilfe von Mikroorganismen zu anorganischen Verbindungen abbauen, also mineralisieren lassen. Gleichzeitig kann Biomasse in Form von Zellsubstanz entstehen und die Bodenfruchtbarkeit bleibt erhalten.

Für die biologische Sanierung von Böden müssen je nach Biozid jedoch erst einmal Mikroorganismen angereichert werden, die diese Biozide verwerten können. Es ist somit wichtig, über die Mikroorganismen im Boden Bescheid zu wissen. Stehen schon Mikroorganismen zum Abbau zur Verfügung oder reicht die natürliche Population im Boden aus? Kann man durch den Nachweis einer Anreicherung bestimmter Arten von Mikroorganismen potentieller Abbauer für Biozide finden? Kann man durch den Verlust wichtiger Vertreter der Biomikroflora eine Aussage über deren schädigende Auswirkung machen? Mikrobielle Aktivitäten im Boden sind für die Bodenqualität von entscheidender Bedeutung. Das Reinigungspotential des Systems Boden wird dabei besonders durch die Zusammensetzung und Vielfalt der mikrobiellen Besiedelung bestimmt. Die extreme Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften und die Komplexität ihrer Habitats stellen eine Herausforderung für wissenschaftliche Untersuchungen dar. Die Ökologie dieser Lebensgemeinschaften ist nicht annähernd so gut verstanden wie bei höheren Pflanzen und Tieren (ZHOU *et al.*, 2002). Der Wissensstand über die Verteilung und Funktion der verschiedenen Komponenten der Bodengemeinschaften und das Sortiment der Mechanismen, wodurch die verschiedenen Bodenbewohner miteinander reagieren, ist noch immer unvollständig (WAID, 1999). Die Methoden, die heutzutage zur Untersuchung der bakteriellen Diversität in Umweltpflanzen zur Verfügung stehen, sind jedoch teilweise mit Nachteilen behaftet. So zeigen gerade kultivierungsabhängige Methoden eine wesentliche Limitierung im Spektrum der erfassten Spezies. Einen neuen Ansatz eröffnet die Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Population im Boden. Mit dieser Methode lassen sich verschiedene Bakterienarten ohne vorheriges Kultivieren untersuchen.

### 1.2 Fragen und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Änderung in mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Boden infolge von Biozideinfluss zu beschreiben. Bei der Wahl der Schadstoffe, lag die besondere Gewichtung bei Bioziden, die im Holzschutz verwendet werden. Seit einiger Zeit werden Alternativ zu den als kanzerogen einzustufenden chromhaltigen HSM organische HSM eingesetzt. Über die Wirksamkeit und Auswirkung auf die sogenannten „Nicht-Zielorganismen“ gibt es bisher keine ausreichende Informationen, vor allem aufgrund von fehlenden adäquaten Methoden. Die Charakterisierung sollte mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden, um die Limitierung, denen einzelne Methoden unterliegen, auszugleichen.

Daraus leiten sich die Methodik und Fragen ab:

- **Was sind die Grenzen der unterschiedlichen Methoden?**
- **Wie ist die Einschätzung des Potentials der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung für eine quantitative Beschreibung der mikrobiellen Populationen im Boden?**

Damit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Böden angewendet werden kann, sollte eine **Methode entwickelt** werden. Diese Methode muss eine effiziente, reproduzierbare Reinigung und Isolierung von Bakterien aus Bodenproben durch Eliminierung der störenden Humusbestandteile erlauben.

Daraus folgend sollten weitere Themen bearbeitet werden:

**Welche Veränderungen** treten durch den Eintrag von Bioziden in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auf, die mit molekularbiologischen Methoden, insbesondere der *in situ* Hybridisierung, detektiert werden können. Denn damit wäre ein interessantes Werkzeug verfügbar, mit dem man eine eventuelle Anreicherung von bestimmten Vertretern der Bodenbakterien, und damit mögliche Abbauleistungen, im Boden detektieren kann. Außerdem sollte mit den verwendeten Methoden eine **Risikoabschätzung der Biozide** vorgenommen werden.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Diversität von mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Boden

Die Pedosphäre (*griech.*: pedon, Boden) bzw. die oberste Kruste der Erde, ist zwar im Verhältnis zum Erddurchmesser extrem dünn, bildet dennoch Lebensgrundlage und -raum für Menschen, Tiere, Pflanzen und Bodenorganismen. Im Gegensatz zur Atmosphäre oder zu Gewässern ist der Boden als „Festkörper“ ein unbewegliches, allerdings weitgehend heterogenes Medium. Dies führt dazu, dass in Böden sehr kleinräumige Strukturen über besonders lange Zeiten bestehen können, was wiederum zu einer hohen Biodiversität der Böden führt. Bei Zugrundelegung der Individuenzahlen der verschiedenen Bodenorganismen dominieren die Bakterien und Pilze stark (siehe *Tabelle 2.1*).

*Tabelle 2.1.: Lebewesen in den oberen 30 cm in einem Quadratmeter Boden (nach BLIEFERT, 1994)*

| <b>Gruppe</b>     | <b>Anzahl</b>      |
|-------------------|--------------------|
| Bakterien         | 60 000 000 000 000 |
| Pilze             | 1 000 000 000      |
| Einzeller         | 500 000 000        |
| Fadenwürmer       | 10 000 000         |
| Algen             | 1 000 000          |
| Milben            | 150 000            |
| Springschwänze    | 100 000            |
| weiße Regenwürmer | 25 000             |
| Regenwürmer       | 200                |
| Fliegenlarven     | 200                |
| Tausendfüßler     | 150                |
| Käfer             | 100                |
| Schnecken         | 50                 |
| Spinnen           | 50                 |
| Asseln            | 50                 |
| Hundertfüßler     | 50                 |
| Wirbeltiere       | 0,001              |

Bodenorganismen, insbesondere Bakterien, leisten einen wesentlichen Beitrag zur Funktion und nachhaltigen Nutzbarkeit von Böden. Sie beherrschen das Wiederverwerten von Stoffen bis zur Perfektion - es werden Pflanzenreste, Dünger und auch Pflanzen-

schutzmittel abgebaut, so dass Anbauflächen im Laufe einer Vegetationsperiode regeneriert werden, und das Grundwasser sauber bleibt. Die Zersetzungsleistung von Mikroorganismen wird allerdings bei komplizierten chemisch-synthetischen Stoffen, wie zum Beispiel polymeren Kunststoffen oder bestimmten polychlorierten Kohlenwasserstoffen stark eingeschränkt (TEBBE, 2002). Diversität und metabolische Vielseitigkeit der Bodenmikroorganismen ist außerdem von den herrschenden *in situ* Bedingungen abhängig, wie zum Beispiel von der Vielfalt der Kohlenwasserstoff- und Energiequellen als auch von dem kontinuierlichen Wechsel der physikalischen und chemischen Bedingungen sowie von biologischen Faktoren (REBER und WENDEROTH, 1997).

Es besteht kaum ein Zweifel, dass mikrobielle Gemeinschaften empfindlich gegenüber Änderungen im umgebenden Habitat sind. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass sie sich durch Störungen verändern (ATLAS *et al.*, 1991; MCCAIG *et al.*, 1999; ØVREAS und TORSVIK, 1998). In Böden mit unterschiedlicher historischer Nutzung, wie zum Beispiel Bodenzusätze, Bewässerung, Beackerung und unterschiedlichen Pflanzenbewuchs konnten Veränderungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaften beobachtet werden (BAATH *et al.*, 1995; BLOEM *et al.*, 1992; BOSSIO und SCOW, 1995; BOSSIO *et al.*, 1998; GUNAPLA und SCOW, 1998). BUCKLEY und SCHMIDT (2001) beobachteten, dass mikrobielle Gemeinschaften zwischen Standpunkten, die über historisch lange Zeit die gleiche landwirtschaftliche Nutzung hatten und Standorten, die erst kurze Zeit landwirtschaftlich genutzt wurden, trotz unterschiedlichem Pflanzenbewuchs in ihrer Zusammensetzung ungewöhnlich ähnlich waren. Im Gegensatz dazu beobachteten sie Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen Standorten ohne Beackerung und solchen mit einer Langzeit Kultivierung.

Bakteriengemeinschaften erfüllen wichtige Funktionen in terrestrischen Systemen (RØNN *et al.*, 2002), daher bedürfen Böden des besonderen Schutzes. Obwohl etliche Detailinformationen vorliegen, wird das Phänomen der Biodiversität, gemessen an seiner Komplexität, wissenschaftlich bislang nur sehr unzureichend verstanden. Nach der Definition des sogenannten Rio-Übereinkommens zur biologischen Vielfalt von 1992 wird die „Biologische Vielfalt“ bzw. „Biodiversität“ beschrieben als: „die Variabilität unter lebenden Organismen jeglicher Herkunft; dies umfasst die Vielfalt innerhalb der Art und zwischen den Arten und der Vielfalt der Ökosysteme“. Ziel des Übereinkommens ist es, die biologische Vielfalt zu erhalten, ihre Bestandteile unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit zu nutzen, sowie die sich aus der Nutzung der genetischen Ressourcen ergebenden Vorteile gerecht aufzuteilen. Das Rio-Übereinkommen unterstreicht auch die Notwendigkeit, die Bedeutung der

Vielfalt für das Funktionieren von Ökosystemen zu verstehen, um daraus Strategien zur Erhaltung und zu einer vertretbaren Nutzung der Vielfalt abzuleiten (WEIGEL, 2002).

## 2.2 Bodenbelastung durch Schadstoffe im Boden

Der Boden als Habitat für terrestrisches Leben stellt ein komplexes Ökosystem dar. Die Lebensraumfunktionen von Böden können durch Schadstoffe anthropogenen Ursprungs beeinträchtigt sein. In Abhängigkeit vom Ausgangsgestein enthält jeder Boden natürliche Hintergrundgehalte an Schwermetallen, die im Zuge der Verwitterung freigesetzt und über Mineralisation teilweise verfügbar werden (BLIEFERT, 1994). Unter Bodenbelastungen sind demnach Konzentrationen von toxischen Stoffen zu verstehen, die über den Gehalt der natürlichen Hintergrundgehalte hinausgehen (EHRlichMANN, 1999).

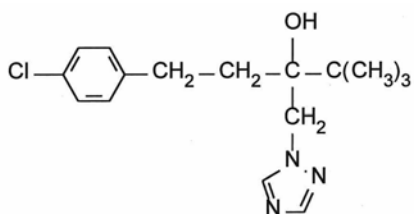
Schadstoffe haben charakteristische Eigenschaften, die darüber bestimmen, wie sie sich nach ihrer Freisetzung auf die Umwelt auswirken. Sie können für Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere und auch Menschen toxisch sein. Diese „Bodenbelastung“ kann in doppelter Weise wirken: Zum einen können die Schadstoffe direkt wirken. Zum anderen können sie aus dem Boden ausgewaschen werden und zu Belastungen des Grund- und Oberflächenwassers führen. Da Trinkwasser meistens aus Grundwasser gewonnen wird, führen erhöhte Schadstoffgehalte zwangsläufig früher oder später auch zu einer Beeinträchtigung des Trinkwassers (BLIEFERT, 1994).

Pestizide werden auf der ganzen Welt in der Landwirtschaft (z.B. Pflanzenschutz, Düngung) und für viele Zwecke (z.B. Materialschutz) im großen Umfang eingesetzt. Eingeteilt nach den Schadorganismen, die sie bekämpfen, sind Herbizide, Fungizide und Insektizide die wichtigsten Gruppen der eingesetzten Pestizide. Vor allem in den letzten 50 Jahren wurden Pestizide verstärkt angewandt (TARRADELLAS UND BITTON, 1996), breiteten sich in der Umwelt aus und sind inzwischen in den technologisch fortgeschrittenen Ländern in fast allen menschlichen und tierischen Geweben, in Böden und Nutzpflanzen sowie Grundwasser und in Flüssen und Seen nachzuweisen. Durch den Transport in die Atmosphäre, durch Meeresströmungen und über die marine Nahrungsketten haben sie sich im Laufe der Zeit weltweit verteilt (ALLOWAY UND AYRES, 1996). In dieser Arbeit lag das Interesse auf Biozide, die im Holzschutz angewendet werden. Seit einiger Zeit vollzieht sich ein Wandel in der Anwendung von anorganischen zu organischen Holzschutzmittelkomponenten. Während die erste einfache Anwendung von HSM, vermutlich seit der Antike, aus Arsenat und Quecksilbersublimaten bestand, fanden gegen Mitte des 19. Jahrhunderts Steinkohleeröle, Arsen, Kupfersulfat und Zinkchlorid weite Verbreitungen. Ab ca. 1910 wurden Natrium-

fluorid und Chlornaphthalin als Imprägniermittel eingesetzt, und ab ca. 1930 sind synthetische HSM wie Pentachlorphenol und Lindan im Gebrauch ebenso wie Zinnverbindung und Chromate. Diese Substanzen besitzen zumeist ein kanzerogenes Potential, daher werden seit einigen Zeiten Alternativen in organischen HSM gesucht, die bis jetzt noch nicht ausreichend hinsichtlich ihrer Wirkungen auf die „Nicht-Zielorganismen“, untersucht wurden.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Biozide kurz beschrieben:

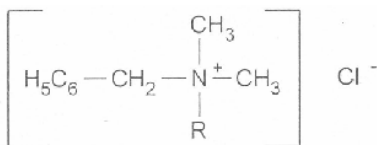
### TEBUCONAZOL



Tebuconazol (TEB) gehört zu der Gruppe der Triazole und ist ein systematisches Fungizid mit protektiver Wirkung gegen eine Vielzahl pilzlicher Krankheitserreger in zahlreichen Kulturen. Es wird als Spritz- und Beizmittel verwendet.

TEB ist in Wasser schlecht löslich (32 ppm), aber genügend löslich in den bei Holzschutzmitteln gebräuchlichen Lösungsmitteln.

### BENZALKONIUMCHLORID

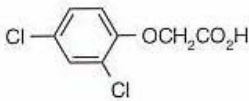


R steht für einen A kyl-Rest im C-Zahlbereich von 8-18. In Abhängigkeit von R liegt Benzalkoniumchlorid (BAC) als Feststoff oder Flüssigkeit vor und zeigt wie alle quartären Ammonium-Verbindungen kationtensidische Eigenschaften. Es wird als Bakterizid bzw.

Algecid im Bereich schwach alkalischer bis sauer eingestellten Desinfektionsmitteln und in Holzschutzmittel eingesetzt.

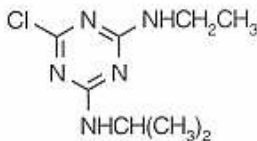
BAC ist in Wasser, Alkoholen und Ketonen leicht, in Benzol wenig sowie in unpolaren Kohlenwasserstoffen praktisch nicht löslich.

### 2,4-DICHLORPHENOXYAZETYL SÄURE (2,4-D)



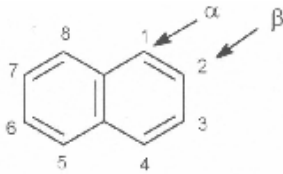
2,4-D gehört zu den mit am häufigsten eingesetzten Unkrautvernichtungsmitteln. Es steigert die DNA-, RNA- und Proteinsynthese und bewirkt damit eine Störung eines ausbalancierten, geregelten Wachstums. Die Pflanze wächst sich damit praktisch zu Tode. 2,4-D ist in Wasser nur wenig löslich.

### ATRAZIN



Atrazin ist ein selektives systematisches Herbizid gegen Unkräuter und Ungräsern. Es wird im Mais- Zuckerrohr- und Ananasbau sowie in Kombination mit anderen Herbiziden auf Nichtkulturland aufgebracht. Es ist schädlich vor allem für Pflanzen, Wasserlebewesen und Bodenorganismen. Außerdem ist es wassergefährdend (WGK 2). Atrazin ist in Wasser nahezu unlöslich.

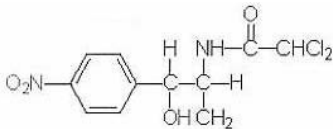
## NAPHTHALIN



Naphthalin ist eines der wichtigsten Ausgangsstoffe für Farbstoffe, Gerbestoffe, Insektizide und Pharmaka. Außerdem kam Naphthalin früher auch in der Mottenbekämpfung zur Anwendung.

Naphthalin ist in Wasser unlöslich, dagegen leicht löslich in Alkohol, Ether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol usw.

## CHLORAMPHENICOL



Chloramphenicol ist das erste synthetisch hergestellte sogenannte Breitband-Antibiotikum. Es wirkt gegen große Viren und die meisten Bakterien (Gram<sup>+</sup> und Gram<sup>-</sup> Bakterien und Kokken, Actinomyceten, Spirochäten und Leptospiren). Seine Wirkung übt es über die Hemmung der Protein-Biosynthese, über nicht unbedenkliche Chromosomen-Schädigungen aus. Die Chloramphenicolresistenz verschiedener Bakterien (Pseudomonaden und Bacillus) entsteht durch Acetylierung des Chloramphenicol Moleküls mit Hilfe bakterieneigener Enzyme.

Chloramphenicol ist in Wasser wenig, in polaren organischen Lösungsmitteln gut löslich.



### 2.3 Grundlagen zu Bakterien in Böden

Ein Gramm Boden beherbergt über eine Milliarde Bodenbakterien mit vermutlich Tausend verschiedenen Arten (TORSVIK und ØVREAS, 2002; ROSELLO-MORA *et al.*, 2001; TORSVIK *et al.*, 1990; WISE *et al.*, 1997). Nahezu alle Stoffkreisläufe der Erde werden durch mikrobielle Prozesse im Boden beeinflusst. Auch das Klima unseres Planeten und seine Atmosphäre hängt von diesen Vorgängen ab. Diese mikrobiologische Biosphäre im Boden ist quasi eine riesige „black box“, und man weiß wenig über die treibende Kraft, die die Struktur komplexer, natürlicher mikrobieller Gemeinschaften bestimmt (ZHOU *et al.*, 2002).

Aufgrund der hohen natürlichen Vielfalt der Bodenmikroorganismen können nicht alle Bodenbakterien im Zuge einer angewandten ökologischen Fragestellung charakterisiert werden (TEBBE, 2002). Will man zum Beispiel die Auswirkungen eines Schadstoffeintrages untersuchen, ist es günstiger, sich zunächst darauf zu beschränken, die Veränderungen der Vielfalt ausgesuchter Bakterienarten zu messen.

Alle Bakterienarten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden:

#### **Bacillus subtilis**

*Bacillus subtilis* ist ein Gram<sup>+</sup> Bakterium mit niedrigem G+C-Gehalt (siehe *Abbkürzungsverzeichnis*), dessen natürliches Habitat der Boden ist. Es besitzt die Möglichkeit, Nährstoffmangel durch Sporulation zu überstehen und lässt sich leicht kultivieren. Die Sporulation stellt eine der speziellen Adaptionstrategien an das Leben im Boden dar. Im Boden ist *B. subtilis* verschiedensten, häufig wachstumshemmenden Einflüssen wie zum Beispiel Hitze, Kälte und Trockenheit ausgesetzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich *B. subtilis* im Boden meist in einem ruhenden oder sehr langsam wachsenden Zustand (Generationszeit 50-100 Stunden) befindet. Um konkurrenzfähig zu sein und auch unter widrigen Bedingungen zu überleben, verfügt *B. subtilis* nicht nur über die Sporulation, sondern auch über verschiedenste andere Anpassungsmechanismen. Zu den offensiven Strategien gehört die Erschließung alternativer Nährstoff- und Energiequellen (z.B. Stickstoffkontrolle oder Katabolit-repression) oder die Reaktion auf oxidativen Stress. Nur unter Bedingungen, welche ein Überleben im vegetativen Zustand nicht mehr zulassen, nutzt *B. subtilis* die Option zu sporulieren.

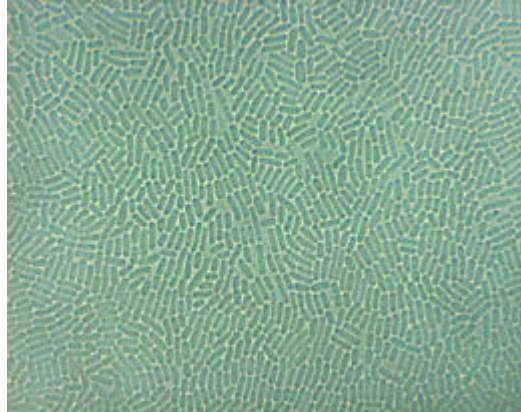


Abbildung 2.1: *B. subtilis*; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung.

Für diese Arbeit wurde *B. subtilis* auf Grund seiner Dominanz im Boden ausgewählt (SMALLA *et al.*, 2001) und da er zu den best beschriebenen Gram<sup>+</sup> Bakterien gehört.

### **Pseudomonas fluorescens**

*Pseudomonas fluorescens* ist ein Gram<sup>-</sup> Bakterium (Proteobakterium der gamma-Subgruppe). Morphologische Charakteristika aller Mitglieder dieser großen und wichtigen Bakteriengruppe sind stäbchenförmige Zellen, eine oder mehrere Flagellen sowie das Fehlen von Sporen. Die Pseudomonaceae sind ein wichtiger Bestandteil der Mikroflora freilebender Saprophyten in Böden, limnischen und marinen Habitaten und Abwässern. Vertreter dieser Gruppe findet man aber auch als Erreger von Tier- und Pflanzenkrankheiten.

Die Gattung *Pseudomonas* verkörpert den Prototyp der Familie und lässt sich durch stoffwechselphysiologische Merkmale charakterisieren. So erfolgt die Energiegewinnung durch aerobe Atmung; Gärung tritt in der gesamten Familie nicht auf. Pseudomonaden sind chemoorganotroph und zeichnen sich zusätzlich durch die Fähigkeit aus, eine große Zahl von organischen Verbindungen, darunter auch heterozyklische und aromatische Verbindungen, verwerten zu können.

Ein weiteres Merkmal der Pseudomonaden ist die aktiv-schwimmende Fortbewegung, die durch Flagellen ermöglicht wird. Die Zellen sind 0,5 - 1 µm breit und 1,3 - 5 µm lang. Sie treten in der Regel einzeln, in Paaren oder in sehr kurzen Ketten auf.

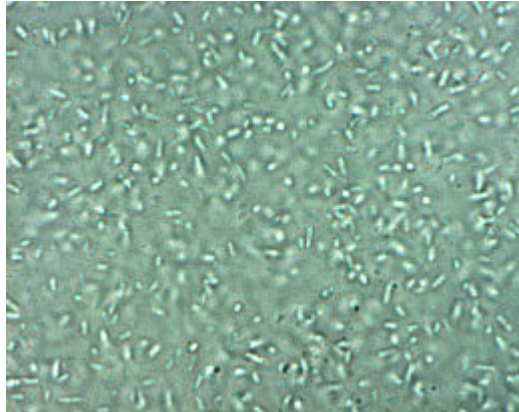


Abbildung 2.2: *P. fluorescens*; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung.

*P. fluorescens* wurde als Modellorganismus gewählt, da es die häufigsten Denitrifikanten an oligotrophen Standorten (23 - 30%) sind. Es ist vielseitig und fähig zum Abbau verschiedener organischer Substanzen, wie zum Beispiel Naphthalin und Atrazin, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### **Sinorhizobium meliloti**

Die zur Gruppe der Rhizobien gehörenden Bodenbakterien können in die Wurzeln von bestimmten Wirtspflanzen (Leguminosen) eindringen und dort nach einer Metamorphose Luftstickstoff binden. Über diese Symbiose kann der Stickstoffhaushalt von Böden ohne Düngung günstig beeinflusst werden (TEBBE, 2001).

Bodenbakterien der Gattung *Sinorhizobium*, die in *Abbildung 1.3* dargestellt sind, werden zur alpha-Subgruppe der Proteobakterien gezählt. *Sinorhizobium meliloti* (früher *Rhizobium meliloti*) gehört zu den Gram<sup>-</sup> Bakterien, ist stäbchenförmig, besitzt eine Länge von 1,2 - 1,3 µm und einen Durchmesser von 0,5 bis 0,9 µm. Seine Beweglichkeit erhält das Bodenbakterium durch zwei bis sechs peritrich angeordnete Flagellen (JORDAN, 1984). Das Bodenbakterium lebt chemorganotroph. *Sinorhizobium meliloti* sekretiert in der Regel unabhängig von den verwendeten Nahrungsquellen alkalische Substanzen in die Umgebung.

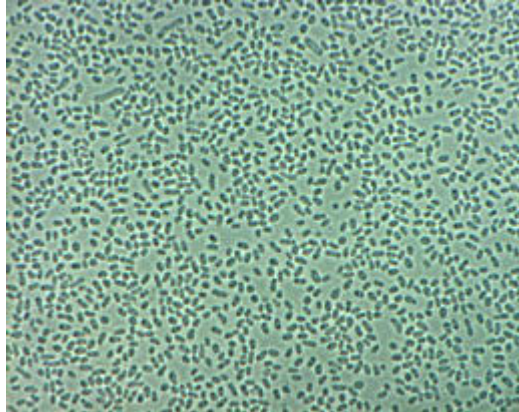


Abbildung 2.3: *S. meliloti*; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung.

*S. meliloti* ist die wichtigste natürliche N-Quelle im Boden, da es 100 - 200 kg Luftstickstoff pro Hektar und Jahr binden kann (BROER, 1995). Dieses macht das Bakterium wichtig für die Landwirtschaft, und wurde deswegen für die eigenen Untersuchungen ausgewählt.

### **Corynebacterium glutamicum**

*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram<sup>+</sup> (mit hohem G+C-Gehalt), unbewegliches, Biotin-auxotrophes Bakterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten (PASCUAL *et al.*, 1995).

Seine namensgebenden Merkmale sind zum einen seine stäbchen- bis keulenförmige (coryneforme) Gestalt und zum anderen seine Fähigkeit zur Glutamatproduktion. *C. glutamicum* ist im Gegensatz zu dem Gram<sup>-</sup> Enterobakterium *E. coli* weder in der Lage widrigen Umweltbedingungen durch Chemotaxis zu entgehen, noch kann es sich durch Sporulation entziehen wie das Gram<sup>+</sup> Bakterium *B. subtilis*. Außerdem ist es *C. glutamicum* im Gegensatz zu z. B. Rhizobien oder Cyanobakterien nicht möglich, molekularen Stickstoff zu fixieren.

*C. glutamicum* musste daher ein System der Stickstoffkontrolle „entwickeln“, das an seine spezifischen Eigenschaften und Umweltbedingungen angepasst ist und für eine bestmögliche Anpassung sorgt. So ist *C. glutamicum* in der Lage, andere im Boden vor-

kommende Stickstoffquellen aufzunehmen, die durch den Abbau von tierischen und pflanzlichen Materialien entstehen und in den Stickstoffmetabolismus einzuleiten.

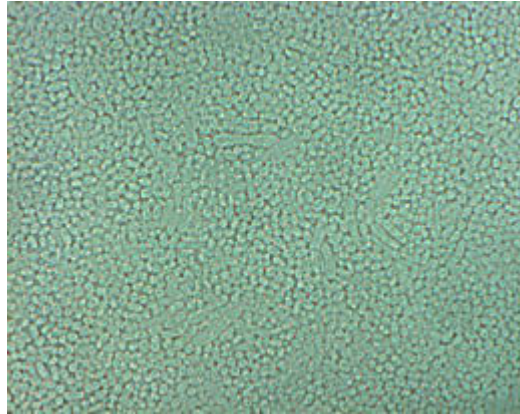


Abbildung 2.4: *C. glutamicum*; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung.

*C. glutamicum* wurde für diese Arbeit ausgewählt, da es ein schnellwachsendes Bodenbakterium von großer biotechnologischer Bedeutung ist.

### **Arthrobacter**

*A. globiformis* bildet die zahlenmäßig dominierende Fraktion der aeroben chemotrophen Bodenmikroflora. Eine charakteristische Eigenschaft der Gattung *Arthrobacter*, die zu den Gram<sup>+</sup> (mit hohem G+C-Gehalt) zuzählen sind, ist die Vielgestaltigkeit (Pleomorphie) während des Wachstumszykluses. In jungen Kulturen zeigen sich in der logarithmischen Phase Stäbchen, die teilweise verzweigt sind (0,5 - 0,8 \* 1 - 4 µm) und die sich in der stationären Phase zu kokkoiden Formen verkürzen (Ø 0,6 - 0,8 µm).

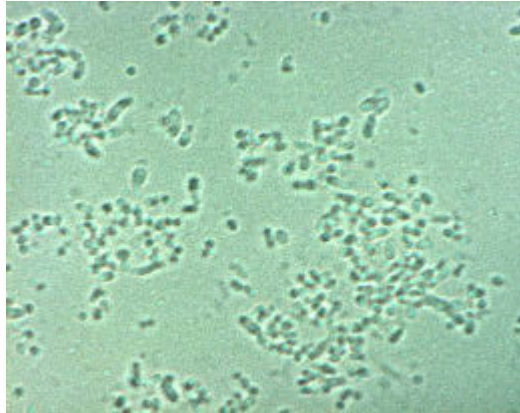


Abbildung 2.5: *A. globiformis*; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000fachen Vergrößerung.

*A. globiformis* ist in allen bodenähnlichen Habitaten dominant. Es kann ein weites Spektrum an organischen Substanzen als C-Quelle nutzen (CROCKER *et al.*, 2000), und wird teilweise als Toxizitätsindikator eingesetzt (LIAS und AHLF, 1997). Zusätzlich wurde auch noch *A. spec.* verwendet, da es das in dieser Arbeit verwendete 2,4-D abbauen kann.

## 2.4 Methoden zur Beurteilung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften

Untersuchungen der Diversität bakterieller Gemeinschaften sind normalerweise durch phenotypische Charakterisierung der Isolate eingeschränkt. Diese Methoden können jedoch nur auf Bakterien angewendet werden, die isoliert und kultiviert werden können. Die meisten (99,0- 99,5%) der Bodenbakterien unter dem Mikroskop können nicht isoliert und im Labor kultiviert werden (TORSVIK *et al.* 1990, WAGNER *et al.* 1993, TEBBE 2002). Trotz dieser Limitierung werden die sogenannten „koloniebildende Einheiten“ (die sich aus den in der Probe enthaltenen Keimen zu Kolonien entwickeln) häufig als Indikator für die Bodenqualität aufgeführt. Der Wert lässt sich einfach ermitteln, für viele ökologische Untersuchungen ist er jedoch zu grob und daher nicht sehr aussagekräftig (TEBBE, 2002).

Mit neuen kultivierungsunabhängigen Verfahren lassen sich Änderungen in den Populationen von Mikroorganismen unter verschiedenen Bodeneinflüssen wie intensive Bewirtschaftung, Schadstoffbelastung oder Schädlingsbefall von Pflanzen erkennen. Geht es um Zusammensetzung und Diversität von Populationen, spielen ribosomale Gene (rRNA) die Hauptrolle.

Mit Hilfe der Mikroskopie lassen sich Techniken wie Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Bildanalysen kombinieren. Hier liegt eine große Chance, die Struktur und Funktion von Gemeinschaften in ökologischen Nischen aufzuklären (TEBBE, 2002).

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, die zum Einen auf klassischer Weise den Einfluss von Schadstoffen auf Bodenorganismen bestimmen – die Messung der Bodenatmung, zum anderen kultivierungsunabhängige Methoden, die mikrobielle Gemeinschaften beschreiben – FISH, DGGE, TGGE, SSCP und (T)RFLP- Analysen.

### 2.4.1 Bodenatmung

Die Bodenatmung ist ein summarischer Aktivitätsparameter, der sämtliche mikrobielle Stoffumsätze der Bodenflora und -fauna umfasst. Unter natürlichen Bedingungen gehören dazu auch die Umsätze der höheren Pflanzen und die Atmung größerer Bodentiere. Den größten Beitrag zum Stoffwechsel weist die Mikroflora auf, zu der auch die Pilze zählen. Die Mikrofauna hingegen ist innerhalb der Mikroorganismen für die Stoffwechselbilanz eines Bodens weniger bedeutend. Insgesamt werden zweidrittel der Kohlenstoffdioxidmenge eines gewachsenen Bodens von Mikroorganismen freigesetzt und eindrittel von den größeren Bodentieren und den Wurzeln der höheren Pflanzen. Die gesamte im Boden erzeugte CO<sub>2</sub>-Menge kann bei starker Düngung bis zu 10 t/ha und Jahr betragen (SCHACHTSCHABEL *et al.*, 1992).

Bei der Messung der Bodenatmung wird zwischen der Basalatmung (ohne Zusatz von organischen Substanzen) (ANDERSON und SCHOENAU, 1993) und der durch substratin-duzierter Atmung (Zusätze von Glucose und Aminosäuren) unterschieden. Bei der ersten Methode wird die tatsächliche Aktivität, bei der zweiten die potentielle Aktivität gemessen. In der Regel ist nur ein geringer Teil der Biomasse im aktiven Zustand, während der größte Teil in Überdauerungsformen vorliegt. Nach BECK *et al.* (1992) beträgt der Anteil der stoffwechselaktiven mikrobiellen Biomasse in Ackerböden nur 1 bis 5% der organischen Masse des Bodens. In Wiesenböden liegt dieser Anteil mit 2 bis 8% etwas höher. Durch die Zugabe eines leicht abbaubaren Substrates wie zum Beispiel Glukose wird der passive Anteil aktiviert, da in der Regel die Kohlenstoffquelle den limitierenden Faktor für die Bodenatmung darstellt.

Die mikrobiologische Aktivität von Böden ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig, wie dem Gehalt an organischen Kohlenstoff (ANDERSSON und VALEUR, 1994), der

Temperatur (LOYD und TAYLOR, 1994), dem Wassergehalt (STARK und FIRESTONE, 1995; ILSTEDT *et al.*, 2000) und der Menge an bioverfügbaren Nährstoffen (VAN BRUGGEN und SEMENOV, 2000), deren Mangel zu einer Unterschätzung der Bodenatmung als Aktivitätsparameter führen kann (DOTT *et al.*, 1995).

Bezüglich der ökotoxikologischen Bewertung kontaminierter Böden existieren verschiedene Strategien, die in der Regel neben anderen biologischen Testverfahren die substratinduzierte Atmung beinhalten. Nach DOTT *et al.* (1995) werden folgende Grenzwerte für die Nutzung von Böden als Grün-, Park- oder Freizeitfläche vorgeschlagen:

CO<sub>2</sub>-Produktion ≥ 0,5 mg CO<sub>2</sub>/ (h x 100g TS)

O<sub>2</sub>-Produktion ≥ 0,3 mg O<sub>2</sub>/ (h x 100g TS)

#### **2.4.2 Nachweis von Bakterien durch kultivierungsunabhängige Methoden**

Da die Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen Methoden aus den oben genannten Gründen nicht ausreichend ist, wurden im letzten Jahrzehnt unterschiedliche molekularbiologische Methoden eingesetzt, um mikrobiologische Lebensgemeinschaften zu untersuchen (AMANN *et al.*, 1990; DAIMS *et al.*, 2001; ELLER und FRENZEL, 2001; GIESKE *et al.*, 2001). Molekularbiologische Methoden haben den Vorteil, dass die Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaft auf der Ebene des Genoms stattfindet und somit die unterschiedlichen Ansprüche zur Kultivierung der verschiedenen Organismen nicht mehr berücksichtigt werden müssen. Aus Untersuchungen vieler molekularbiologischer Analysen in unterschiedlichen Habitaten konnte gezeigt werden, dass viele bisher unbekannte Organismen in den untersuchten Systemen auftraten, deren Kultivierung bisher nicht gelungen war (HUGENHOLZ *et al.*, 1998; JURGENS *et al.*, 2000; JANSSEN *et al.*, 2002). Die Sequenz der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA, das 16S rRNA Gen, spielt eine wichtige Rolle bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften. Die rRNA ist ein sehr geeigneter phylogenetischer Marker, da sie funktionskonstant und in allen Bakterien vorhanden ist, und sowohl stark konserviert als auch variable Abschnitte enthält (WOESE, 1987; SCHLEIFER *et al.* 1992). Deshalb wurden die Sequenzen der 16S rRNA zu einem unverzichtbaren Parameter in der bakteriellen Taxonomie.



Von den molekularbiologischen Methoden verdient die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden besondere Beachtung, weil mit dieser Methode eine direkte Untersuchung der Zellen möglich wird. Andere Methoden wie DGGE, TGGE, SSCP und (T)RFLP- Analysen arbeiten mit extrahierter DNA und lassen nur eingeschränkt Aussagen über die Organisation der mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu. Durch *in situ* Hybridisierung konnte das Auftreten einzelner Gruppen von Organismen in anaeroben Systemen (HARMSSEN *et al.*, 1995; MERKEL *et al.*, 1999; RASKIN *et al.*, 1994) sowie die räumliche Organisation mikrobieller Gemeinschaften untersucht werden (SEKIGUCHI *et al.*, 1999).

### FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG (FISH) – NACHWEIS VON BAKTERIEN MIT GENSONDEN

Gensonden sind einzelsträngige DNA Fragmente, die komplementär zu bestimmten Zielregionen auf DNA oder RNA-Abschnitten sind. Die Sonden können auf physiologische oder funktionellen Gene zielen. Die in dieser Arbeit verwendeten zielen auf die rRNA (ribosomale RNA) zur Bestimmung von physiologischen Gruppen. Die gegen die rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden haben einen wichtigen Vorteil; in aktiven, wachsenden Bakterienzellen können bis zu einhunderttausend Ribosomen pro Zelle vorkommen. Dadurch kann an eine Zelle eine genügend große Menge Sonden binden, um sie bei geeigneter Markierung, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen, im Mikroskop sichtbar zu machen.

Diese Methode nutzt die Tatsache, dass DNA, sofern sie als Einzelstrang vorliegt, und RNA die Neigung haben, sich mit komplementären Partner zu verbinden - die sogenannte Hybridisierung. Unter definierten Bedingungen binden sich die markierten Gensonden mit denjenigen Zellen, die zu ihrer eigenen Sequenz komplementär passende rRNA-Sequenz aufweisen. Die so gefärbten Zellen lassen sich im Mikroskop sichtbar machen (siehe *Abbildung 2.6*). Der parallele Einsatz mehrerer Sonden mit unterschiedlichen farbigen Markierungen erlaubt es, die Verbreitungen und Verteilungen mehrerer Bakterienarten in ein und derselben Probe zu analysieren.

Die FISH-Methode hat den Vorteil, dass man die Zusammensetzung der Bakterien in der Probe direkt und schnell bestimmen und Veränderungen in Form und Struktur im Detail beobachten kann. Daher wurde für die Arbeit diese Methode gewählt.

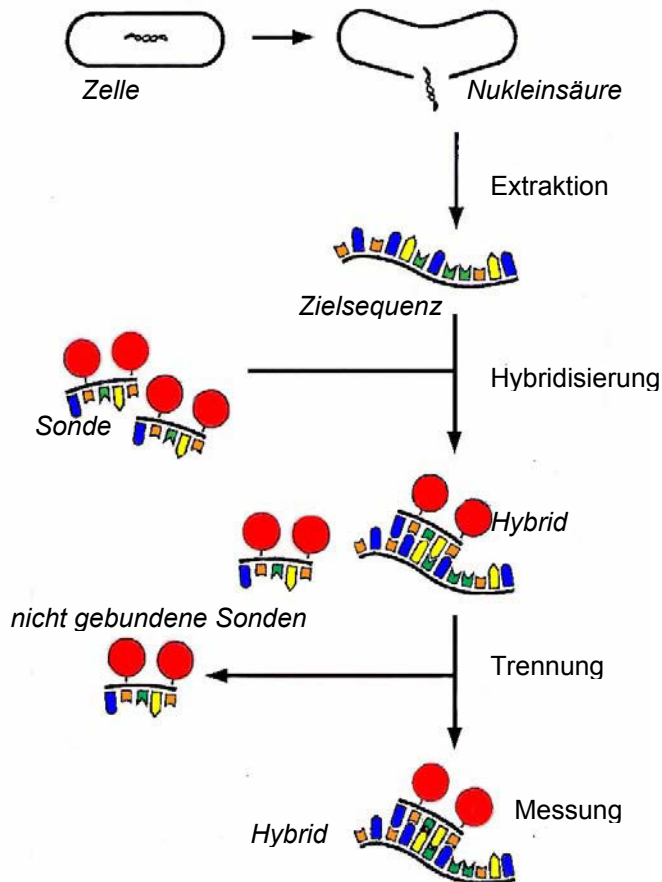


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Gensondentechnik (SCHLEIFER et al., 1992).

Grundlage der DNA-Fingerprintmethoden ist die Amplifikation von DNA-Abschnitten mithilfe der PCR (Polymerase Ketten Reaktion). Das Verfahren der PCR ermöglicht eine Vervielfältigung von spezifischen vorher ausgewählten DNA Fragmenten, wobei wenige Ausgangsmoleküle der Probe so vervielfältigt werden, dass "sichtbare" Mengen von identischen Molekülen entstehen. Danach werden Produkte nach ihrer Größe mittels Gelelektrophorese getrennt. Durch die Elektrophorese werden Bandenmuster erzeugt, die es ermöglichen, Veränderungen in den Bodenmikroorganismengemeinschaften zu erkennen. Alle auf der PCR basierenden Methoden zeigen einen genetischen

Fingerprint, das heißt ein Muster der Zusammensetzung in der Probe. Einen Schwachpunkt dieser Methoden stellt die hohe Diversität dieser Gemeinschaften dar, die zu einer sehr hohen Komplexität der Bandenmuster führt und daher das Erkennen geringfügiger Änderungen erschwert.

Den ersten Schritt aller DNA-Analysen ist die Extraktion bakterieller DNA aus den zu untersuchenden Bodenproben, mit anschließender PCR. Die PCR-Produkte bestehen aufgrund der Primerwahl aus gleich großen DNA Fragmenten. Sie unterscheiden sich aber in den variablen Sequenzabschnitten zwischen den allgemeingültigen Primersequenzen, entsprechend der unterschiedlichen Mikroorganismen in einer Probe. Diese unterschiedlichen DNA Moleküle müssen für die weitere Analyse mittels spezieller Elektrophoresen voneinander getrennt werden.

### **DGGE - DENATURIERENDE GRADIENTEN GELELEKTROPHORESE UND TGGE TEMPERATURE GRADIENTEN GELELEKTROPHORESE**

Dieses Verfahren erlaubt eine Auftrennung anhand des Schmelzverhaltens von DNA Molekülen gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz (MUYZER *et al.*, 1993) (DGGE: chemischer Gradient; TGGE: thermischer Gradient). Nachdem jedes Fragment ein charakteristisches Laufverhalten aufweist, sind Banden an gleichen Positionen unterschiedlicher Proben in der Sequenz identisch und stammen daher vom gleichen Organismus.

Um die Mikroorganismen zu identifizieren, die einzelnen Banden entsprechen, muss die in den Banden enthaltene DNA sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen werden in DNA-Datenbanken mit den Sequenzen bisher bekannter Organismen verglichen. Auf diese Weise erfolgt die phylogenetische Zuordnung und Identifizierung der im Probenmaterial enthaltenen Mikroorganismen.

### **SSCP - SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM**

RNA und einzelsträngige DNA binden - durch fehlende komplementäre Matrix - unter Umständen mit sich selbst und nehmen dabei hoch komplexe und kaum vorhersagbare Formen an. Diese Konformation ist von mehreren Faktoren wie Temperatur und Sequenz abhängig. Die Mutation einer einzigen Base kann also eine Änderung der Sekundärstruktur nach sich ziehen, welche die Laufeigenschaften des Fragments im Gel verändert.

Die SSCP (Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus) untersucht die strukturellen Veränderungen eines DNA-Abschnittes. Bei der SSCP Analyse werden beide Einzel-

stränge eines DNA-Fragmentes in Abhängigkeit von ihrer dreidimensionalen Konformation, die durch die Nukleotidsequenz bedingt ist, unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

### **T-RFLP- TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM**

Bei der T-RFLP-Analyse werden genetische Fingerabdrücke einer komplexen Lebensgemeinschaft mittels der terminalen Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus- Analyse erstellt. Der PCR-amplifizierten Genabschnitte werden nun DNA- spaltende Enzyme hinzugefügt, so genannte Restriktionsenzyme. Diese DNAsen dienen als chemische Scheren, die im Inneren der DNA schneiden. Restriktionsenzyme sind sequenzspezifisch und zertrennen den Doppelstrang nicht wahllos, sondern nur an bestimmten Erkennungsstellen, die aus Basenabfolgen von in der Regel vier bis sechs Nukleotiden bestehen. Je nachdem wie häufig oder selten, die für das Enzym charakteristische Sequenz vorkommt, entstehen längere oder kürzere Fragmente (Polymorphismen). Die Anzahl und Größe der Fragmente ist für jeden Organismus individuell. Aufgrund der Markierung eines Primers wird nicht das komplette Fragmentmuster, sondern nur das terminale Restriktionsfragment (T-RF) pro Sequenztyp sichtbar. Auf diese Weise ist es möglich, das Profil einer komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaft darzustellen, wobei die einzelnen T-RFs auf Basis bestehender Sequenzinformationen bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden können.

Die RFLP-Methode kann im Gegensatz zur DGGE- bzw. TGGE-Methode nicht so komplexe Gemische auftrennen, in der Regel zeigt schon eine einzige Bakterienart mehrere Banden. Diese führt bereits bei wenigen Spezies in einer Probe zu einer kaum auswertbaren Überlagerungen von Bandenmustern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien in p. A.- Qualität von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Oligonukleotide wurden von Thermohybrid GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 3.1: Verwendete Biozide und ihre verwendete Konzentration in Flüssigkulturen und in der Boden

| Biozide                                | Herkunft                        | Konz. in Lösung | Konz. in Erde [µg/g] |
|--|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| Benzalkoniumchlorid                    | Fluka, Buchs                    | 2 µM            | 60 - 19200           |
| Tebuconazol                            | Dr. Ehrensdorfer GmbH, Augsburg | 1 µM            | 0,128 - 400          |
| Naphthalene                            | Merck, Darmstadt                | 1 µM            | -                    |
| Atrazine                               | Riedel-de Haën, Seelze          | 1 µM            | -                    |
| 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) | Fluka, Buchs                    | 1 µM            | -                    |
| Chloramphenicol                        | Fluka, Buchs                    | 0,15 mM         | -                    |

#### 3.2 Aufbau des Modellsystem mit Holz und Erde

Für die Untersuchung des Eintrages von Bioziden aus dem Holz in den Boden wurde ein Modellsystem konstruiert.

##### PROBEKÖRPER

Die verwendete Holzart war das Nadelholz Kiefer (*Pinus sylvestris* Linnaeus). Die Probekörper hatten folgende Abmessung:

(50 ± 0,5) mm x (25 ± 0,5) mm x (15 ± 0,5) mm

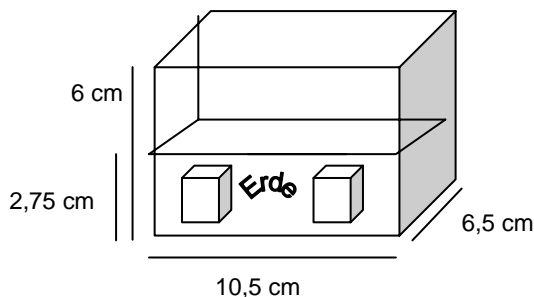


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau des Modellsystems. Probekörper in Erde eingebettet .

Die Probekörper wurden nach der Europäischen Norm EN 113 (Prüfung zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzerstörende Basidiomyceten) ausgewählt und mit den entsprechenden Lösungen mittels Vakuum im Exsikkator getränkt (Volltränkverfahren). Das Ansetzen der Tränklösungen fand jeweils kurz vor der Trängung gravimetrisch mittels einer Analysenwaage statt. Für alle Probehölzer wurde die Masse vor und nach der Trängung erfasst. Nach der Konditionierung (4 Wochen) wurden die Probekörper in die vorbereitete Erde in einem Verhältnis von 1:5 (Holz : Boden) eingebettet (Abbildung 3.1).

Nach dem Einbau der Probekörper wurden diese in einem Raum mit definierten Bedingungen (22 – 24 °C; Luftfeuchte: 65 %) ohne Lichteinwirkung eingelagert und die Feuchte ständig kontrolliert. Gleichzeitig zu den in dem Boden eingebetteten Probekörpern wurden von Referenzprobekörper an der Luft gelagert.

#### BODENMATERIAL

Der verwendete Boden ist ein Gemisch aus Gärtnererde ED 0 (Zusammensetzung: pH 5,5 – 6,5; Salz: 0,5 g l<sup>-1</sup>, N: 0,5 g l<sup>-1</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 80 mg l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>O: 80 mg l<sup>-1</sup>; Gebr. Patzer GmbH, Sinntal Jossa) mit 20% (2 mm) natürliche Erde, deren Feuchte auf 90% der WHK eingestellt wurde. Die Feuchte wurde über die Versuchsdauer ständig überprüft und gegebenenfalls nachbefeuchtet.

## BIOZIDE – HOLZSCHUTZMITTELKOMPONENTEN

Bei der Anwendung lösemittelbasierter Formulierungen betragen die Aufbringmengen der Wirkstoffe 25-350 g/m<sup>2</sup>; meist werden 100-250 g/m<sup>2</sup> aufgebracht (SCHOKNECHT *et al.*, 1998).

- |  |   |
|--|---|
| 1. Tebuconazol (C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O): | Als Preventol A8 <sup>®</sup> . In einer 0,008 %igen Lösung mit Toluol (0,07 WS kg/m <sup>3</sup> Holz).    |
| 2. Benzalkoniumchlorid (BAC):  | Als Basilit Bauholz KD <sup>®</sup> . In einer 1,7%igen Lösung mit Aqua dest (6 WS kg/m <sup>3</sup> Holz). |
| 3. Kupfer:   | Als Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> ). In einer 2 %igen wässrigen Lösung.                                   |
| 4. Bor:  | Als Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ). In einer 2 %igen wässrigen Lösung.                          |
| 5. Kontrolle   | Als Kontrolle wurden mit Aqua dest getränkte Probekörper verwendet.   |

### 3.3 Chemische Methoden

#### Holzaufbereitung

Die Hirnflächen der Probekörper mussten entfernt, und das Volumen bestimmt werden. Die Hölzer wurden (Streichholzgröße) zerkleinert, und für die Tebuconazol- und Benzalkoniumchloridbestimmung weiter in einer Schlagmühle (Culatti; Typ MFC) zu feinem Holzmehl (2 mm) gemahlen.

#### Tebuconazolbestimmung

##### PROBENVORBEREITUNGEN

DRAGENDORFF- REAGENZ:

Lösung A: 0,21 g Bismut(III)-nitrat basisch (Bismutsubnitrat) wurden in einer Mischung von 2,5 ml konz. Salpetersäure und 10 ml Aqua dest gelöst.

Lösung B: 4 g Kaliumjodid wurden in final 10 ml Aqua dest gelöst.

Sprühlösung: 1 ml der Lösung A und 1 ml der Lösung B wurden mit 7 ml Aqua dest gemischt.

3 g Holzmehl bzw. 10 g Boden wurden in graduierten Reagenzgläsern mit Schliff eingewogen, 20 ml Aceton dazugegeben, und 1 Stunde gut verschlossen im Ultraschallbad (Sonorex Super 10P, Bandelin electronics, Berlin) bei 40°C und maximaler Leistung extrahiert. Anschließend wurden die Suspensionen mittels Vakuumpumpe über eine Fritte - (Porengröße: 4 µm) gefiltert und das Holzmehl bzw. der Boden zweimal nachgespült. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200; Büchl Labor-technik AG, Flawil, CH) eingengt und in 1 bis 2 ml Chloroform aufgenommen.

Die Konzentrate wurden mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt: Dazu wurden die Konzentrate als 10 cm lange Linie und der Tebuconazolstandard am Ende der Linie als Punkt auf Kieselgelfolien aufgetragen. Damit der Startpunkt von Probe und Standard auf gleicher Höhe ist, wurde die Kieselgelfolie zunächst in Aceton (als Laufmittel) gestellt und nachdem die Folie getrocknet war in eine Glaskammer mit Ethylazetat als Laufmittel. Nach dem Durchgang des Laufmittels bis zum oberen Folienrand wurde diese herausgenommen, und nach Ausdünsten des Lösungsmittels wurde der Vorgang wiederholt.

Anschließend wurde die Folie abgedeckt und nur der Bereich frei gelassen, in dem sich der Standard befand. Dieser Bereich wurde mit dem Dragendorff-Reagenz besprüht. An der Stelle des Standards entwickelte sich ein orangefarbiger Punkt, die Linie auf gleicher Höhe wurde horizontal markiert und ausgeschnitten. Der ausgeschnittene Streifen wurde verkleinert, in 20 ml Aceton aufgenommen und im Ultraschallbad bei 40 °C und maximaler Leistung 10 min lang extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte mittels Vakuumpumpe über eine Fritte in Spitzenkolben filtriert, dreimal nachgespült. Danach wurden am Rotationsverdampfer die flüssige Phase entfernt. Die verbleibende trockene Phase wurde in 2 ml Aceton gelöst und für die Messung in Bördelgläschen überführt.

Für die Kalibrierung der HPLC (Knaur), ebenso wie für die GC (Series II, Hewlett Packard), wurden Standardlösungen zwischen 20 und 50 µg Tebuconazol pro µl Aceton hergestellt.



BESTIMMUNG MIT HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

|                    |  |                              |        |
|--------------------|--|------------------------------|--------|
| Säule:             | C 18 (Luna)  | Länge:                       | 124 mm |
|                    |  | Innendurchmesser:            | 4 mm   |
|                    |  | Partikelgröße:               | 5 µm   |
| Detektor:          | UV- Detektor von Knauer mit Wellenlänge: 230 nm; DAD |                              |        |
| Temperatur:        | Raumtemperatur ca. 20°C                              |                              |        |
| Injektionsvolumen: | 10 µl  |                              |        |
| Pumpen:            | 2  |                              |        |
| Flussrate:         | 0,5 ml min <sup>-1</sup>                             |                              |        |
| Laufzeit:          | 15 min   |                              |        |
| Eluent:            | Pumpe A:   | Acetonitril                  |        |
|                    | Pumpe B :  | Bidest. + 0,5% Phosphorsäure |        |
| Mischverhältnis:   | 80% Pumpe A  |                              |        |
|                    | 20% Pumpe B  |                              |        |

BESTIMMUNG MIT GC (GAS CHROMATOGRAPHIE)

|                   |                       |                   |         |
|-------------------|-----------------------|-------------------|---------|
| Säule:            | HP-5, crosslinked 5 % | Länge:            | 30 mm   |
|                   | Ph-Me- Silicon:       | Innendurchmesser: | 0,32 mm |
|                   |                       | Filmdicke:        | 0,25 µm |
| Detektor:         | FID                   |                   |         |
| Trärgas:          | Helium 5.5            |                   |         |
| Make-Up Gas:      | Stickstoff 5.0        |                   |         |
| Einspritzvolumen: | 1 µl                  |                   |         |

**Benzalkoniumchloridbestimmung**PROBENVORBEREITUNGEN

0,5 g Holzmehl bzw. 10 g Boden wurden mit 30 ml Ethanol versetzt und mit 2-3 Tropfen Essigsäure angesäuert. Die Proben wurden für 1 Stunde im Ultraschallbad bei 40 °C und maximaler Leistung extrahiert. Der Überstand wurde über Faltenfilter in Spitzenkolben gefiltert. Zu 0,5 g Holzmehl bzw. 10g Boden wurden erneut 30 ml Ethanol (mit Essigsäure angesäuert) gegeben und erneut im Ultraschallbad extrahiert. Die beiden Filtrate wurden

vereint und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Proben wurden in 2 ml Ethanol aufgenommen und in ein fest verschließbares Bördelglas gefüllt.

Für die Kalibrierung wurden Standardlösungen zwischen 0,2 und 10 µg Benzalkoniumchlorid in 10 µl Ethanol hergestellt.

#### BESTIMMUNG MIT HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

|                    |  |   |        |
|--------------------|--|---|--------|
| Säule:             | Whatman Partisil 5 SCX RAC II                        | Länge:  | 100 mm |
|                    |  | Innendurchmesser:                                       | 4,6 mm |
|                    |  | Partikelgröße:  | 0,2 µm |
| Detektor:          | UV- Detektor von Knauer mit Wellenlänge: 210 nm; DAD |   |        |
| Temperatur:        | Raumtemperatur ca. 20°C                              |   |        |
| Injektionsvolumen: | 10 µl  |   |        |
| Pumpen:            | 2  |   |        |
| Flussrate:         | 1 ml min <sup>-1</sup>                               |   |        |
| Laufzeit:          | 10 min   |   |        |
| Eluent:            | Pumpe A:   | Aqua <sub>bidest</sub> mit 0,4% Triethylamin + 0,3% HCl |        |
|                    | Pumpe B :  | Acetonitril   |        |
| Mischverhältnis:   | 60 % Pumpe A   |   |        |
|                    | 40 % Pumpe B   |   |        |

## **Kupferbestimmung**

#### PROBENVORBEREITUNGEN

Die ganzen Holzklötze wurden verascht. Der Boden wurde über Nacht bei 105 °C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und auch verascht. Danach wurden Holz und Boden für 2 Stunden bei 600 °C im Muffelofen geglüht. Dabei wandelt sich Kupfersulfat in Kupferoxid um.

Nach dem Abkühlen wurden die Holzproben angefeuchtet und mit 5 ml Schwefelsäure aufgeköcht. Die Lösungen wurden auf dem Sandbad zum Kochen gebracht und immer wieder mit 0,5 ml Salzsäure versetzt, bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in 100 ml Messkolben gefüllt und mit Aqua dest. bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Die Bodenproben wurden mittels Königswasser (1 Vol.-Teil konz. Salpetersäure und 3 Vol.-Teile konz. Salzsäure) aufgeschlossen: Dazu wurden die Proben mit Aqua dest. angefeuchtet und 20 ml Königswasser dazugegeben. Die Proben wurden 2 Stunden auf einem Rückflusskühler gekocht und nach dem Abkühlen durch eine Fritte gefiltert. Die Lösungen wurden in 100 ml Messkolben gefüllt und bis zur Marke aufgefüllt.

Die Standards wurden im Bereich 0,5 bis 5 ppm (1,000 +/- 0,002 g Cu l<sup>-1</sup> als Kupfer(II)-nitrat in 0,5 M Salpetersäure) angesetzt. Bei Konzentrationen über 5 mg l<sup>-1</sup> wurden die Proben (Holz und Boden) geeignet verdünnt.

### BESTIMMUNG MIT AAS (ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETER)

Es wurde ein mit einer Hohlkathodenlampe ausgestattetes Atomabsorptionsspektrometer (AAS UNICAM 969) verwendet. Die Messung von Kupfer wurde mit einer Cu/CR- Lampe, bei einer Wellenlänge von 324,8 nm durchgeführt. Die Flamme des Gerätes wurde mit Acetylen –Luft gespeist.

## **Borbestimmung**

### PROBENVORBEREITUNGEN

LÖSUNGEN:

Azomethin-H- Lösung: 1 g Azomethin-H-Natriumsalz und 3 g L(+)- Ascorbinsäure wurden in 100 ml Aqua dest gelöst.

Pufferlösung: 25 g Ammoniumacetat, 25 ml Aqua dest, 8 ml 29%ige Schwefelsäure, 0,5 ml 85%ige Phosphorsäure, 100 mg Citronensäure und 100 mg EDTA- Natriumsalz werden gemischt und der pH- Wert auf 5,9 eingestellt.

Reagenzlösung: Gleiche Volumina Azomethin-H-Lösung und Pufferlösung wurden kurz vor der Analyse gemischt.

Die Borbestimmung erfolgte nach der Methode von PEYLO (1993). Dazu wurden 5 g der zerkleinerten Holzstücke eingewogen und in 150 ml 10 %iger wässrige Mannitollösung

gegeben. Die Proben wurden 2 Stunden unter Rückfluss extrahiert und ein geeignetes Aliquot der Extrakte zur weiteren photometrischen Bestimmung mit Azomethin entnommen.

25 g luftgetrockneter Boden wurden in Kolben mit 50 ml Aqua dest unter Rückfluss gekocht und dann abfiltriert. Die Analyse dieser Extrakte erfolgte auch am Photometer.

Zur Kalibrierung wurde eine Borat - Standardlösung mit 572 mg Borsäure in 1 l Aqua dest hergestellt. Damit wurden Standards zwischen 5 und 60 µg Bor in 25 ml angesetzt. Lagen die Probenwerte außerhalb des linearen Bereiches der Standardkurve, wurden sie entsprechend verdünnt. Die Bestimmungen erfolgte mit 3 Parallelen.

#### BESTIMMUNG AM PHOTOMETER

25 ml der Probenextrakte und 25 ml der Standardlösungen wurden in Messkolben gefüllt und mit 10 ml Reagenzlösung versetzt. Als Blindwert diente 25 ml Aqua dest mit 10 ml Reagenzlösung. Die Messung erfolgte nach 1 Stunde am Photometer (UV- 2101PC, Shimadzu-Europa, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 414 nm.

### **3.4 Bestimmung allgemeiner Bodenparameter**

#### **Maximale Wasserhaltekapazität**

Die Fähigkeit des Bodens, Wasser beim Anlegen eines Vakuums zu halten, wird als Maß für die Wasserhalte-Kapazität (WHK) definiert.

Zur Bestimmung wurde der Boden über Nacht mit Wasser gesättigt, das Wasser wurde dann unter definierten Bedingungen abgesaugt. Der verbleibende Wassergehalt stellt die maximale Wasserkapazität (Wasserhaltevermögen) dar.

$$\text{WHK} = \frac{(B_f - B_t)}{B_t \times 100}$$

B<sub>f</sub>: Masse des feuchten Bodens  
B<sub>t</sub>: Masse des trockenen Bodens

## Bestimmung des Wassergehalt und des Gehalts an Trockensubstanz

Ca. 100 g feldfrischer Boden wurden für 24 Stunden bei 105 °C getrocknet und der Wasserverlust durch Rückwaage bestimmt. Daraus ließ sich der Gehalt an Trockensubstanz (TS in %) und der gravimetrische Wassergehalt (WG in %) wie folgt ermitteln:

$$\text{TS} = \frac{(B_f - B_t)}{B_f \times 100}$$

$$\text{WG} = \frac{(B_f - B_t)}{B_t \times 100}$$

$B_f$ : Masse des feuchten Bodens  
 $B_t$ : Masse des trockenen Bodens

### 3.5 Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung (Atmungskurven)

Die Bodenatmungskurven wurden in Anlehnung an die DIN ISO 17155 (Bestimmung der Abundanz und Aktivität der Bodenmikroflora mit Hilfe von Atmungskurven) bestimmt. Die Atmungskurven sind dazu geeignet, die mikrobielle Biomasse von Böden, ihrer Aktivität und Vitalität sowie der Wirkung von Chemikalien auf die Bodenmikroflora zu bestimmen.

#### Funktionsweise

Die CO<sub>2</sub>-Abgabe der Bodenproben während der Inkubationszeit wird durch einen Infrarot-Gasanalysator bestimmt. Die Bodenproben werden mit CO<sub>2</sub> freier Luft durchspült, dazu wird die Eingangsluft über eine Natronkalksäule geleitet. Um zu verhindern, dass die Bodenproben über die Messzeit austrocknen, wird die Luft, bevor sie in die Proben gelangt, zusätzlich noch über mit Aqua dest gefüllte Waschflaschen geleitet. Ein Teil der CO<sub>2</sub>-freien Luft wird direkt über eine Trockensäule zur Referenz- Infrarotzelle geleitet und mit der Luft aus den Proben verglichen. Durch Änderung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes der Probe ändert sich die Absorption der Infrarotstrahlung in der Messzelle. Das Gas aus den Proben wird nach einander zur Messzelle geleitet, daher erfolgt die Aufnahme der Werte der einzelnen Proben im 2-Stunden-Rhythmus.

## Durchführung

Die Feuchte der Bodenproben (< 2 mm gesiebt) wurde auf 50% maximale WHK eingestellt und bei  $22 \pm 2$  °C ein Tag vorkonditioniert. In diesem Meßsystem wurden die Basalatmung und Substratinduzierte Atmung (SIR) gleichzeitig bestimmt.

Basalatmung: 100 g der Proben wurden in die Säule gefüllt und bis zum Auftreten einer konstanten Atmungsrate gemessen.

Substratinduzierte Atmung: Parallel wurde den Proben 1 g Substrat pro 100 g Boden untergemischt. Als Substrat wird ein Gemisch aus Glucose, Ammoniumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat verwendet (80 g Glucose – wasserfrei, 13 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Da die Messung der einzelnen Proben in 5 min Abständen erfolgte, wurden den Proben das Substrat jeweils 5 min vor der ersten Messung zugegeben. Die Messungen erfolgten bei Dunkelheit und einer konstanten Temperatur von  $22 \pm 2$ °C.

## Auswertung

Die Auswertung der Atmungskurven erfolgte mit dem Programm SNOOP-PLOT Demo Version 1.32.

Die zu bewertenden Parameter waren (siehe auch *Abbildung 3.2*):

### BASALATMUNG

Basalatmung ( $R_B$ ) wird berechnet als Mittelwert der stündlichen Atmungsraten während eines stabilen Zeitabschnitts.

### SUBSTRATINDUZIERTER ATMUNG (SIR)

Die substratinduzierte Atmung ( $R_S$ ) wird als Mittelwert der Werte kurz nach der Substratzugabe berechnet, wenn die Atmung annähernd konstant ist.

### ATMUNGSAKTIVIERUNGSQUOTIENT

Der Atmungsaktivierungsquotient ( $Q_R$ ) wird durch Dividieren der Basalatmung durch die substratinduzierte Atmung berechnet.

$$Q_R = \frac{R_B}{R_S}$$

### LAG- PHASE

Die Lag- Phase ( $t_{LAG}$ ), ist die Zeit von der Substratzugabe bis zum Auftreten des exponentiellen Wachstum. Die Werte werden bei halblogarithmischer Darstellung der Atmungskurve ermittelt.

### PEAKMAXIMUM

$t_{Peakmax}$  wird definiert als der Zeitraum von der Substratzugabe bis zum Auftreten des höchsten Signal des  $CO_2$ - Ausstoßes

### WACHSTUMSRATE

Die Wachstumsrate ( $\mu$ ), die Steigung der Atmungskurve, wird bei halblogarithmischer Darstellung berechnet, und ist ein Maß für die maximale Zunahme der  $CO_2$ - Bildungsrate (maximales Wachstum der Mikroorganismenpopulation).

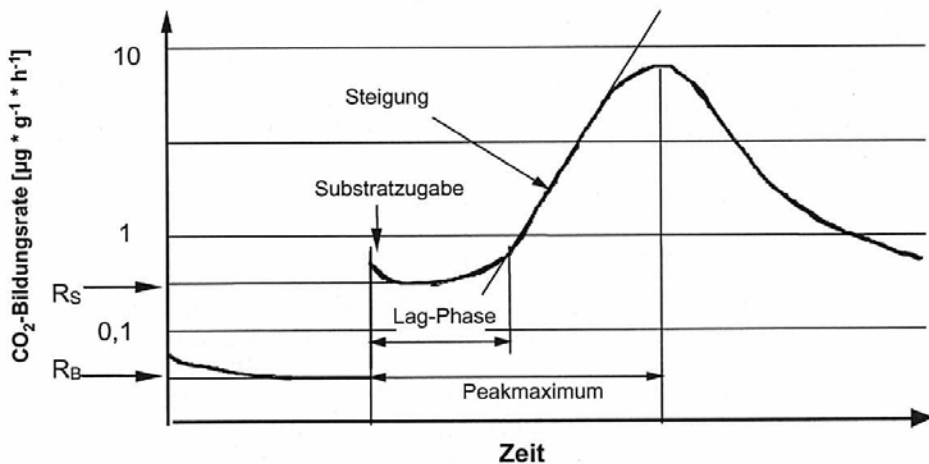


Abbildung 3.2: Beispiel der Auswertung einer Bodenatmungskurve (WILKE und WINKEL, 1999).

## Vorbereitung der Bodenproben für die Bestimmung der Bodenatmung

Die Böden wurden vor dem Versuchsansatz gesiebt (< 2 mm), auf eine maxWHK von 50 % eingestellt, und über Nacht bei 22 °C vorkonditioniert.

Den Böden wurde vor dem Versuchsstart die unterschiedlichen Konzentrationen (festgelegt in *Kapitel 4.4.1*) der Biozide zugefügt. Dazu wurden die Biozide in einem Flüssigkeitsvolumen gelöst, durch dessen Zuführung die Böden auf 60 % der maxWHK gebracht wurden. Die Zugabe von reinem Aqua dest und einem Aceton-Wasser Gemisch (1:4) dienen als Kontrollen. Die Hälfte der jeweiligen Bodenproben wurde sofort in die Untersuchung eingesetzt, die andere Hälfte zuvor für 3 Wochen bei 28,5 °C inkubiert, um die Langzeitauswirkung zu untersuchen.

### 3.6 Mikrobiologische Analysen

#### 3.6.1 Verwendete Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig (DSMZ) bezogen.

Tabelle 3.2: Übersicht über die ausgewählten Bakterien

| Organismus                        | Herkunft               |
|-----------------------------------|------------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>    | DSM 50090 <sup>T</sup> |
| <i>Arthrobacter globiformis</i>   | DSM 20124 <sup>T</sup> |
| <i>Arthrobacter spec</i>          | DSM 917                |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | DSM 10 <sup>T</sup>    |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i>     | DSM 30135 <sup>T</sup> |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | DSM 20300 <sup>T</sup> |

T= Typstamm



### 3.6.2 Medien

Die angeführten Nährmedien wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und der pH-Wert bei Bedarf mit 1 N NaOH bzw. HCl eingestellt. Für Agarmedien wurde Agar- Agar mit einer Konzentration von  $15 \text{ g l}^{-1}$  verwendet. Alle Lösungen wurden bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min im Autoklaven (Varioklav<sup>®</sup>, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) sterilisiert. Separat autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Lösungen wurden nach dem autoklavieren unter sterilen Bedingungen zusammengeführt.

#### STANDARD I ( MERCK)

|             |                       |
|-------------|-----------------------|
| Pepton      | $15 \text{ g l}^{-1}$ |
| Hefeextrakt | $3 \text{ g l}^{-1}$  |
| NaCl        | 102 mM                |
| Glucose     | $1 \text{ g l}^{-1}$  |

#### M9- MEDIUM ( ATLAS, 1995) MODIFIZIERT

Anzuchtmedium für *Escherichia coli* und verschiedenen anderen Bakterien.

|  |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                  | 42 mM                  |                        |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                   | 22,2 mM                |                        |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$                     | 18,7 mM                |                        |
| NaCl                                       | 8.6 mM                 |                        |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,8 mM                 | (separat autoklaviert) |
| $\text{CaCl}_2$                            | 0,1 mM                 | (separat autoklaviert) |
| Glucose                                    | 20 mM                  | (separat autoklaviert) |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,036 mM               |                        |
| Hefeextrakt                                | $0,1 \text{ g l}^{-1}$ |                        |
| SL 4                                       | $10 \text{ ml l}^{-1}$ | (sterilfiltriert)      |

pH 7

### SPURENELEMENTLÖSUNG SL 4 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

|  |          |
|--|----------|
| EDTA   | 1,7 mM   |
| FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 0,7 mM   |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 0,035 mM |
| MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O                | 0,015 mM |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0,5 mM   |
| CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 0,08 mM  |
| CuCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O                | 0,06 mM  |
| NiCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 0,008 mM |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 0,01 mM  |

### NÄHRSTOFF AGAR (DSMZ)

Anzuchtmedium für *P. fluorescence* und *B. subtilis*. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C.

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| Pepton         | 5 g l <sup>-1</sup> |
| Fleischextrakt | 3 g l <sup>-1</sup> |
|                | pH 7                |

### RHIZOBIUM MEDIUM (DSMZ)

Anzuchtmedium für *S. meliloti*. Die Platten wurden bei 26 °C inkubiert.

|              |                        |
|--------------|------------------------|
| Mannitol     | 55,5 mM                |
| Hefeextrakt  | 1 g l <sup>-1</sup>    |
| Bodenextrakt | 200 ml l <sup>-1</sup> |

pH 7

**BODENEXTRAKT**

Alle Komponenten wurden für 1 h bei 121°C autoklaviert und anschließend über einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell 595 ½, Ø 320 mm) gefiltert.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Luftgetrocknete Gartenerde      | 80 g   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 9,4 mM |
| Aqua dest.                      | 200ml  |

**CORYNEBACTERIUM AGAR (DSMZ)**

Anzuchtmedium für *C. glutamicum* und *A. globiformis*. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C.

|                                    |                      |                        |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|
| NaCl                               | 85,5 mM              |                        |
| Glucose                            | 25 mM                | (separat autoklaviert) |
| Pepton aus Kasein, tryptic digest. | 10 g l <sup>-1</sup> |                        |
| Hefeextrakt                        | 5 g l <sup>-1</sup>  |                        |
|                                    |                      | pH 7,2 – 7,4           |

**EYGA MEDIUM (DSMZ)**

Anzuchtmedium für *A. sp.*; Inkubation bei 30 °C.

|   |                      |                        |
|---|----------------------|------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 6,3 mM               |                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 6,3 mM               |                        |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,225 mM             |                        |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          | 0,8 mM               | (separat autoklaviert) |
| NaCl  | 1,7 mM               |                        |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,8 mM               |                        |
| Glucose   | 5 mM                 | (separat autoklaviert) |
| Hefeextrakt                                     | 1 g l <sup>-1</sup>  |                        |
| EDTA Spurenelementlsg.                          | 3 ml l <sup>-1</sup> | (separat autoklaviert) |
| Vitamin B <sub>12</sub>                         | 2 µg l <sup>-1</sup> |                        |

## EDTA SPURENELEMENTLÖSUNG

|   |         |
|---|---------|
| EDTA  | 28 mM   |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                | 12,5 mM |
| MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O                | 4,3 mM  |
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                | 1,8 mM  |
| CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O                | 1,13 mM |
| CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O                | 1 mM    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O | 1 mM    |

pH 6,8

### 3.6.3 Bestimmung mikrobiologischer Grundgrößen

#### Messung des Bakterienwachstums (OD)

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Die optische Dichte wurde mit einem Spektralphotometer (Novaspec II, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einer 1,5 ml Einmalküvette gemessen. Die Proben wurden verdünnt, wenn die Extinktion der Lösung den Wert 0,3 überschritt. Der Nullabgleich sowie die Verdünnung erfolgte mit dem jeweiligen sterilen Anzuchtmedium.

#### Zellzahlbestimmung der Mikroorganismen als koloniebildende Einheiten (KBE)

Üblicherweise wird die koloniebildende Einheit (KBE) als die gesamte Lebendzellzahl bestimmt. Diese Methode geht davon aus, dass jede lebende Bakterienzelle auf einem geeigneten festen Nährmedium zu einer makroskopisch sichtbaren und zählbaren Bakterienkolonie auswachsen kann. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Aliquots der Proben so verdünnt, dass zwischen 100 und 300 Kolonien pro Platten zu erwarten waren. In der Regel wurden drei verschiedene Verdünnungen in mindestens drei Wiederholungen auf den Agarplatten ausplattiert. Ausplattiert wurde zum einem mit einem Spiralplattenbeimpfer (Meintrup – Labortechnik) oder mit einem Drigalsky Spatel. Die Inkubation der Platten erfolgte im Klimaraum bei 28 °C über 24 Stunden. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt.

### 3.6.4 Stammhaltung, Kultivierung, Bakteriengewinnung

#### Stammhaltung

Die Bakterienkulturen wurden in getrocknetem Zustand geliefert und mit den empfohlenen Medien angezüchtet. Danach wurden sie auf modifizierte M9-Agarplatten überimpft.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden die verwendeten Bakterienstämme auf den modifizierten M9-Agarplatten ausgestrichen, bei 28 °C inkubiert und im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. Die Bakterienkulturen wurden alle 4 - 8 Wochen frisch überimpft.

Als Dauerkulturen wurde mit der Impföse einige Bakterienkolonien von der Agarplatte abgenommen und auf Kryoröhrchen (Cryobank<sup>TM</sup> –System; Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) gebracht. Diese Kulturen wurden bei – 70 °C verwahrt.

#### Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen

Die ausgewählten Bakterienkulturen wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml modifiziertem M9-Medium über Nacht bei 28,5 °C auf einem Schüttler (Innova 4230 Refrigerated Incubator, New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 165 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden diese vorgezogenen Zellen wiederum in 100 ml M9-Medium auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,8 eingestellt und bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1 (exponentielle Wachstumsphase) inkubiert.

#### Ansetzen der Mischkulturen in Flüssigmedium

Zur Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisation an Mischkulturen in flüssigem Medium, wurden die Bakterienarten zunächst *wie oben* beschrieben angezüchtet. Nach Einstellen einer  $OD_{600nm}$  von 0,4 wurden sie miteinander gemischt.

1. Die Kulturen wurden 10 min inkubiert, zur Durchmischung der einzelnen Bakterienarten.
2. Danach wurden den Kulturen die jeweiligen Schadstoffe, in den gleichen Konzentrationen wie beim Live/Dead-Test (siehe *Tabelle 3.1*), zugeführt.

Die Proben für die *in situ* Hybridisierung wurden sofort nach Entnahme mit Paraformaldehyde fixiert (*Kapitel 3.8.4*).

## Gewinnung von Bakterien

Für die Gewinnung von Bakterien aus Bodenproben zur Bestimmung der koloniebildende Einheiten (KBE) wurden 10 g Boden in 100 ml Duran-Laborflaschen mit 45 ml Natriumphosphatlösung (10 mM; pH) eingewogen, für 1 Stunde bei 30 Upm (Guwina-Hoffmann-Überkopfschüttler) überkopfgeschüttelt und ein Aliquot, zur Bestimmung der Lebendzellzahl, in entsprechender Verdünnung weiterverarbeitet.

Die Bakteriengewinnung aus Bodenproben wurde für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung modifiziert (Kapitel 4.4.3).

## 3.7 Biochemische Analysen

### 3.7.1 Proteingehaltbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts in Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe des sensitiven BC – Assay (Protein Quantification Kit, Uptima, Montiucon Cedex, Frankreich) (SMITH *et al.*, 1995). Diese Proteinnachweismethode basiert darauf, dass die Stickstoffgruppe der Proteine im alkalischen Milieu Kupfer(II)- Kationen zu Kupfer(I)-Kationen reduzieren können. Kupfer(I) reagiert mit zwei BCA-Molekülen (Bicinchoninic acid) zu einem violetten Komplex, der photometrisch bei 590 nm nachzuweisen ist. Aus einem Proteinstandard (2 mg ml<sup>-1</sup> Rinderserumalbumin in Aqua dest.) wurden für die Erstellung einer Eichkurve sieben Verdünnungen mit Aqua dest. hergestellt (20- 2000 µg ml<sup>-1</sup>).

Zellsuspension, Standards und Blindwert (M9 Medium) wurden in Anwesenheit von 0,15 M NaOH lysiert (100 °C, 10 min) und danach auf einem Vortex-Mixer resuspendiert. Nach dem Standardprotokoll für Mikrotiterplatten wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte 20 µl der lysierten Proteinproben pipettiert (in drei Parallelen) und mit 150 µl Reagens- Mischung aus 50 Teilen *Reagent A* (BCA, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) und 1 Teil *Reagent B* (4 % w/v CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und in einem Brutschrank inkubiert (38 °C, 30 min)<sup>1</sup>. Alle Proben wurden vorher derart mit Wasser verdünnt, dass der zu erwartende Proteingehalt zwischen 0,1 und 1 mg ml<sup>-1</sup> lag.

---

<sup>1</sup> Weil auf jeder Mikrotiterplatte eine Eichgerade mitgeführt wurde, konnte die Inkubationsbedingungen variiert werden; Temperatur und Verdünnung wurden so gewählt, dass nach ca. 30 min die maximale Absorption bei etwa 1,5 lag.

### 3.7.2 Glucosegehaltbestimmung

Der Glucosegehalt in Flüssigkulturen wurde mit dem Glucose liquiUV<sup>mono</sup> Kit (Hexokinase Methode, Human mbH, Wiesbaden) bestimmt. Der Test basiert darauf, dass D- Glucose mit Hilfe des Enzyms Hexokinase zuerst in Glucose-6-phosphat umgewandelt und letzteres durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und NADH-Bildung zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert wird. Entstehendes NADH wird im Photometer bei 365 nm bestimmt und entspricht direkt der Menge umgesetzter Glucose. Der Glucosegehalt in Schüttelkulturen wurde bestimmt, indem ein Aliquot entnommen wurde, das sofort nach der Entnahme (zur Entfernung von Zellmaterial) zentrifugiert (5 min; 16000 x g; 18 °C) und dessen Überstand bis zur Weiterverarbeitung eingefroren wurde.

Zur Glucosebestimmung wurden in 1,5 ml Plastikküvetten 1 ml Reagenzlösung „RGT“ pipettiert (enthält: 100 mmol l<sup>-1</sup> PIPES-Puffer (pH 7,6); 4,7 mmol l<sup>-1</sup> ATP; 3,1 mmol l<sup>-1</sup> NAD; 4,9 mmol l<sup>-1</sup> Magnesium- Ionen; ≥ 1,5 U ml<sup>-1</sup> Hexokinase; 1,5 U ml<sup>-1</sup> Glucose-6-phosphatdehydrogenase; 0,05 % Natriumazid). Danach wurden jeweils 10 µl der Standards und Proben über ein Plastikspatel zugegeben. Die Proben und Standards wurden für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend gegen die Reagenzlösung „RGT“ photometrisch gemessen. Bei allen Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 3.7.3 Dehydrogenasebestimmung nach Thalmann

Die Dehydrogenase-Aktivität (DHA) dient als Indikator für biologische Redoxsysteme und kann als Maß für die Intensität mikrobieller Stoffumsetzungen im Boden angesehen werden. Die Dehydrogenaseaktivität eines Bodens resultiert aus der Aktivität verschiedener Dehydrogenasen, welche ein wesentlicher Bestandteil des Enzymsystems sämtlicher Mikroorganismen sind.

Die DHA wurde nach der 2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)- Methode nach THALMANN (1968) bestimmt. Dabei dient TTC als Elektronenakzeptor anstelle von Sauerstoff. Durch die katalytische Wirkung der Dehydrogenasen der lebenden Zellen wird farbloses TTC zu rotem Triphenylformazan (TPF) reduziert. Das rot gefärbte TPF wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Rotfärbung dient als Maß für die DHA.

Zur Messung der DHA wurden jeweils 3 g feldfeuchter Boden in dreifacher Wiederholung in Reagenzgläser eingewogen und mit je 5 ml TTC-Lösung (TTC, 0,3 %ig in 0,1 M Trispuffer (pH 7,2) für humöse Sande - *siehe Anhang 7.1*) versetzt. Parallel wurden zwei Kontrollansätze nur mit Trispuffer versetzt. Damit wurde die Farbreaktion des Bodens ohne TTC-Zusatz bestimmt. Die Reagenzgläser wurden mit Wattestopfen verschlossen, geschüttelt und anschließend 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 15 ml Aceton versetzt und zwei Stunden lang in Abständen von 15 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde filtriert. Die Filtrate wurden bei 546 nm photometrisch gemessen. Zur Eichung wurden 0, 5, 10, 20, 30, 40 µg TPF ml<sup>-1</sup> angesetzt. Die Lösungen wurden mit 25 % Trispuffer und 75 % Aceton (diente gleichzeitig als Blindwert) hergestellt. Mit Hilfe einer aus der Eichgeraden resultierenden Formel (*siehe unten*), den Extinktionswerten und dem Wassergehalt der Bodenproben kann die Konzentration des TPF - und damit die DHA – bestimmt werden.

#### AUSWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE:

Die Bildungsrate an TPF je Trockenmasse (TM) Boden nach 24 Stunden Inkubationszeit als Maß für die Dehydrogenase- Aktivität wird wie folgt errechnet:

$$\mu\text{g TPF/ g TM Boden} = \frac{(K_1 \times A_{\text{korr}} + K_0) \times V_{\text{fl}}}{\text{TM Boden}}$$

- $A_{\text{korr}}$  = Probenmesswert – Durchschnittsmesswert der Kontrollansätze  
 $V_{\text{fl}}$  = Flüssigkeitsvolumen = Bodenwasser + Pufferlösung + Aceton  
*Der Wassergehalt des Bodens muss immer parallel mitbestimmt werden*  
 $K_1$  = Anstieg der Eichgeraden  
 $K_0$  = Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y- Achse



## 3.8 Molekularbiologische Methoden

### 3.8.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotid-Sonden sind einzelsträngige DNA-Fragmente, die auf komplementäre Abschnitte der 16S rRNA zielen, mit Ausnahme von GAM42a welche auf Abschnitte der 23S rRNA zielen.

Die Oligonukleotide wurden in getrocknetem Zustand von ThermoHybaid (Ulm) geliefert und in sterilem Aqua dest gelöst (Konzentration: FLUOS 50 ng/μl; CY3/ CY5 30 ng/μl). Die gelösten Oligonukleotide wurden in kleinen Portionen bei –20 °C gelagert, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu verhindern.

*Tabelle 3.3: Verwendete Oligonukleotide Sonden; Zielorganismen; Sequenz; Formamid (FA) –Konzentration in % für optimale Stringenz; Quelle*

| Sonde    | Zielorganismen                   | Sequenz                 | FA [%] | Referenz           |
|----------|----------------------------------|-------------------------|--------|--------------------|
| EUB 338  | Eubacteria                       | GCT GCC TCC CGT AGG AGT | 0-80   | Daims et al. 1999  |
| ALF 968  | alpha Proteobacteria             | GGT AAG GTT CTG CGC GTT | 20     | Neef, A. 1997      |
| GAM 42a  | gamma Proteobacteria             | GCC TTC CCA CAT CGT TT  | 35     | Manz et al. 1992   |
| HGC 69a  | gram positive Bacteria (high GC) | TAT AGT TAC CTC CGC CGT | 25     | Roller et al. 1994 |
| LGC 354A | gram positive Bacteria (low GC)  | TGG AAG ATT CCC TAC TGC | 20     | Loy et al. 2002    |
| LGC 354B | gram positive Bacteria (low GC)  | CGG AAG ATT CCC TAC TGC | 20     | Loy et al. 2002    |
| LGC 354C | gram positive Bacteria (low GC)  | CCG AAG ATT CCC TAC TGC | 20     | Loy et al. 2002    |

### 3.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

#### Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe: Eigenschaften und Filter

Alle für die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotidsonden wurden vom Hersteller fertig markiert bezogen. In den letzten Jahren wurden Cyaninfarbstoffe (Cy3, Cy5) entwickelt (SOUTHWICK *et al.*, 1990), die sich durch eine hohe Signalstabilität, schmale Emissionsbanden und hohe Extinktionskoeffizienten auszeichnen (HAUGHLAND, 1996).

Tabelle 3.4: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

| Farbstoffe | Absorptionsmaximum<br>[nm] | Emmissionsmaximum<br>[nm] | Extinktionskoeffizient<br>$\epsilon$ in [1 x mol x cm] |
|------------|----------------------------|---------------------------|--|
| Fluos      | 494                        | 518                       | $7,5 \times 10^4$                                      |
| Cy3        | 554                        | 570                       | $1,3 \times 10^5$                                      |
| Cy5        | 650                        | 667                       | $2 \times 10^5$  |

Tabelle 3.5: Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme (BP= Bandpaßfilter, LP= Langpaßfilter, HQ= High Quality)

| Filtersatz | Anregungsfilter | Farbteiler [nm] | Emmissionsfilter | eingesetzt für |
|------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| UV         | BP 360 nm       | 400             | LP 470 nm        | DAPI           |
| VB1        | BP 490          | 510             | LP 520           | SYTO9/PI/FLUOS |
| Cy3 HQ     | BP 540          | 565             | LP 630           | Cy3            |
| Titric HQ  | BP 620          | 660             | LP 680           | Cy5            |

## Mikroskop

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fluoreszenz- Auflichtmikroskop Polyvaar 2 der Firma Reichert (heute Leica; Wien; Österreich) verwendet. Als Lichtquelle, welche die Anregungswellenlänge des gewählten Fluoreszenzfarbstoffes enthalten muss, diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 100W/2 (Wellenlängen zwischen 360 nm und 700 nm). Durch Wahl der entsprechenden Filtereinsätze wurden die Präparate mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Digitalkamera Leica DC 300F und die weitere Auswertung der Bilder mit dem Softwarepaket Leica IM 50 (mit Messmodul).

### 3.8.3 Nachweis der bakteriellen Lebensfähigkeit

Die Bestimmung der bakterieller Lebensfähigkeit erfolgte via Live/ Dead BacLight™ Test Kit (L-7012; Molecular Probes, Leiden, NL). Dieser Test besteht aus zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen:

- 1) SYTO 9: grüne fluoreszierender DNA- Farbstoff
- 2) PropidiumJodid (PI): rot fluoreszierender DNA- Farbstoff

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass SYTO 9 alle Nukleinsäuren färbt, sowohl von Bakterienzellen mit geschädigter und nicht geschädigter Membran. Dagegen kann PI nur in Bakterienzellen mit geschädigter Membran eindringen. Die beiden Farbstoffe treten daher in Konkurrenz um die DNA- Bindungsstellen, wenn sie zusammen eingesetzt werden. In entsprechender Konzentration eingesetzt, werden Bakterien mit intakter Membran grün fluoreszierend angefärbt, während solche mit geschädigter Membran rot fluoreszieren. Aufgrund der geschädigten Membran, werden rot gefärbte Bakterienzellen als tot definiert, und grün gefärbte Bakterienzellen, Zellen mit intakter Membran, als lebende Bakterien definiert.

Zur Überprüfung, ob der Test für die ausgewählten Bakterienarten praktikabel ist, wurden die Farbstoffe nach Angaben des Herstellers überprüft. Für lebende Bakterien wurden die Bakterien sofort nach der Reinigung gefärbt (SYTO9), durch Abtöten der Bakterien mit 70 %igem Isopropanol und anschließenden Färben wurde der rote (PI) Farbstoff getestet.

#### AUFREINIGUNG DER BAKTERIENSUSPENSION:

##### HEPES PUFFER

Glucose und Hepes-Na wurden separat autoklaviert und sofort nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zusammengeführt.

|           |        |
|-----------|--------|
| Hepes- Na | 10 mM  |
| Glucose   | 100 mM |
|           | pH 7,2 |

Das vom Hersteller empfohlene Protokoll zur Entfernung von Mediumresten, die die Färbung stören können, wurde leicht modifiziert. Für eine bessere Handhabung von mehreren Proben wurden die verwendeten Volumina verringert. Ausserdem wurden die Waschschriffe statt mit Aqua dest. mit Hepes-Puffer durchgeführt. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Proben noch zweimal mit sterilisiertem Leitungswasser gewaschen und zwischen den Waschungen bei 4 °C (10 min, 10 000 x g) zentrifugiert.

### FÄRBEPROTOKOLL:

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers: Es wurden je gleiche Volumina beider Farbstoffe gemischt und  $3 \mu\text{l ml}^{-1}$  der Lösung zur Bakteriensuspension gegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden  $5 \mu\text{l}$  auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert und die Bilder digitalisiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Messmodul des Programmes Leica IM 50.

### **3.8.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisation (FISH)**

#### **Zellfixierung**

Um die Morphologie der Zielzellen zu erhalten, und die Zellwände durchlässig für die verwendeten Oligonukleotidesonden zu machen, wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehydlösung auf schonende Weise durch Quervernetzung von Aminogruppen fixiert.

#### PARAFORMALDEHYDFIXIERUNG VON FLÜSSIGEN PROBEN (AMANN ET AL., 1990)

##### 1 X PBS PHOSPHATE BUFFERED SALINE

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 137 mM |
| KCl                              | 2,7 mM |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4,3 mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 mM |

pH 7,2

##### 4 % PARAFORMALDEHYDELÖSUNG:

33 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wurden auf 60 - 65°C erhitzt. Nach Zugabe von 2 g Paraformaldehyde, wurde die Lösung tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt bis sie sich aufklärt. Nach Zugabe von 16,5 ml 3x PBS wurde die Lösung auf ca. 20°C abgekühlt und der pH Wert auf 7,2 – 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert. Zur Fixierung musste frisch angesetzte

Paraformaldehydelösung verwendet werden, sie war allerdings bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einige Wochen haltbar. Bei Bedarf wurde die benötigte Menge ausgefroren.

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet und in 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 Volumenteil (VT) 1 x PBS resuspendiert, in 3 VT frisch hergestellter 4 % Paraformaldehydelösung aufgenommen und 3 h (Bodenproben 24 h) bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Fixierungslösung wurde durch Zentrifugieren (5 min; 16 000 x g) entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, noch einmal zentrifugiert, in 1 VT 1 x PBS resuspendiert und in 1 VT 99 %igem Ethanol (eisgekühlt) aufgenommen. Die Aufbewahrung der fixierten Proben erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sie wurden in den darauffolgenden Wochen weiterverarbeitet.

### ETHANOLFIXIERUNG

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet und in 1x PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 Volumenteilen (VT) 1 x PBS resuspendiert, und anschließend 1 VT 99 %igem Ethanol (eisgekühlt) aufgenommen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte wie bei der Fixierung mit Paraformaldehydelösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und wurden in der darauffolgenden Wochen weiterverarbeitet.

Für die Gram<sup>-</sup> Bakterien ist die Fixierung mit Paraformaldehyde die beste Methode (AMANN, 1990). Für Gram<sup>+</sup> Bakterien, die eine komplexere Zellwandstruktur besitzen, gibt es noch kein ideales Fixierungsprotokoll, die Fixierung mit Ethanol ist allerdings die gängigste Methode (BRAUN-HOWLAND *et al.*, 1992; ROLLER *et al.*, 1994). Zur Bestimmung der idealen Fixierung wurden alle ausgewählten Bakterienarten einzeln aus Flüssigkulturen einmal mit Paraformaldehyde und einmal mit Ethanol fixiert. Die Bakterien wurden mit den für sie spezifischen Sonden hybridisiert und die positiven Hybridisierungssignale mikroskopisch ausgezählt und mit der Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Bakterien) verglichen.

## ***In situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (FISH)**

### ÜBERPRÜFUNG DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDSONDEN

Die Spezifität der Sonden gegenüber den verwendeten Organismen wurde mit Hilfe von BLAST und dem Programm CLUSTALW Origin 2 (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) überprüft. Ausserdem wurden alle Sonden vor Versuchsbeginn experimentell überprüft. Dazu wurde jede Bakterienart einzeln mit jeder vorhandenen Sonde hybridisiert.

Die Hybridisierungsreaktionen wurden auf teflonbeschichteten Objektträgern mit 10 Aussparungen (Paul, Marienfeld, Bad Mergentheim, Deutschland) durchgeführt. Um den Verlust von Zellen während der Hybridisierungsprozedur möglichst gering zu halten, wurden die Objektträger zusätzlich noch mit Gelatine beschichtet. Hierfür wurden diese zunächst mit einer 95 %igen Ethanollösung gereinigt, die getrockneten Objektträger wurden dann in die auf 70 °C vorgewärmte Gelatinelösung (0,1 % (w/v) Gelatine, 0,01 % (w/v) Kaliumchromsulfat) eingetaucht und anschließend in vertikaler Position staubfrei getrocknet.

### IMMOBILISIERUNG UND VORBEHANDLUNG DER FIXIERTEN ZELLEN AUF OBJEKTTRÄGERN

Es wurden 5 µl der Bakteriensuspension auf die Aussparungen der Objektträger verteilt. Zur Permeabilisierung von hydrophoben Zellwänden der Gram - positiven Bakterien wurde das Protokoll leicht modifiziert. Der Bakteriensuspension wurden 5 µl einer 20 %igen Lysozymlösung (Fluka 20 mg [47.000 U] wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> gelöst) zugesetzt und 10 min bei RT inkubiert.

Danach wurden die Bakterien 10 min bei 46 °C getrocknet (immobilisiert) und anschließend in einer fallenden Ethanolreihe dehydratisiert (jeweils 3 min in 50 %, 80 % und 100 % Ethanol).

HYBRIDISIERUNGSPROZEDUR (AMANN ET AL., 1995; HAHN ET AL., 1993)

## ZUSAMMENSETZUNG DES HYBRIDISIERUNGSPUFFERS

|                  |             |
|------------------|-------------|
| NaCl             | 0,9 mM      |
| Tris/ HCl (pH 8) | 20 mM       |
| SDS              | 0,01% (w/v) |
| Formamid (FA)    | 20- 35%     |

## ZUSAMMENSETZUNG DES WASCHPUFFERS

|                 |  |
|-----------------|--|
| Tris/HCl (pH 8) | 20 mM  |
| SDS             | 0,05%  |
| NaCl            | abhängig von der im Hybridisierungspuffer verwendeten FA-Konzentration (siehe <i>Tabelle 3.6</i> ) |

*Tabelle 3.6: NaCl-Konzentration im Waschpuffer*

| % FA im Hybridisierungspuffer | NaCl [mM] |
|-------------------------------|-----------|
| 20                            | 225       |
| 25                            | 159       |
| 35                            | 80        |

Ab 20 % Formamid im Hybridisierungspuffer wurden zusätzlich zur Komplexierung störender zweiwertiger Kationen 5 mM EDTA-Lösung zum Waschpuffer zugegeben.

Für die Ganzzellhybridisierung zur Identifizierung von Bakterienstämmen und die *in situ* Hybridisierung wurden einzelsträngige DNA-Oligonukleotidsonden verwendet, die mit komplementären RNA-Strängen Hybride ausbilden können. Die verwendeten rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden (*Tabelle 3.3*) waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (*Tabelle 3.4*) markiert.

Die Stringenz, mit der die *in situ* Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den ungefähren Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Je nach benötigter Stringenz wurde die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen Formamid (FA) verändert (die Angaben zu den Sonden wurde aus der Literatur bezogen). Die benötigte Stringenz wurde

im Waschpuffer zur Vermeidung großer Formamid Abfallmengen durch Variation der NaCl Konzentrationen eingestellt (Tabelle 3.6).

Zur Hybridisierung wurden 8  $\mu$ l Hybridisierungspuffer mit 1  $\mu$ l des markierten Oligonukleotids pipettiert. Die Objektträger wurden in einem 50 ml Greinergefäß, welches mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetem Zellstoff versehen war, gelegt und gut verschlossen (feuchte Kammer). Die Inkubation fand für 1,5 Stunden bei 46 °C statt. Anschließend wurde der Objektträger sofort mit 48 °C warmen Waschpuffer abgespült und in ein mit auf 48 °C erwärmten Waschpuffer gefülltes Greinergefäß überführt (zum Stoppen der Hybridisierungsreaktion). Dann erfolgte das Waschen des Objektträgers für 10 min bei 48 °C, der danach sofort mit eisgekühltem Aqua dest gespült und zügig mit Pressluft getrocknet wurde. Der hybridisierte Objektträger stand danach für die DAPI-Färbung bereit.

#### **Bestimmung relativer Populationsanteile nach *in situ*-Hybridisierung und DAPI-Färbung**

Zur Bestimmung des Verhältnisses der fluoreszenzmarkierten Zellen zur Gesamtzellzahl erfolgte im Anschluss an die Ganzzellhybridisierung ein Nachfärben mit DAPI (2'4-diamidino-2-phenylindole).

Nach beendeter Ganzzellhybridisierung wurde das Objektträgerfeld mit 10  $\mu$ l DAPI-Lösung (10  $\mu$ g/ml) überschichtet, für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, der Objektträger mit Aqua dest. vorsichtig gespült und im Dunkeln luftgetrocknet.

#### **Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch die Fluoreszenzmikroskopie**

Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu verhindern, wurden die hybridisierten Zellen in Citifluor – AF 1 (Citifluor Ltd., London, UK) eingebettet, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und unter dem Mikroskop ausgewertet. Es wurden Reichert Plan-Apo Öl-Objektive mit 40 und 100facher Vergrößerung benutzt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Digitalkamera Leica DC 300F und die Auswertung mit dem Programm Leica IM 50.



### 3.8.5 Methoden zur Etablierung einer Bodenextraktionsmethode für FISH

Die FISH-Methode wurde bis jetzt hauptsächlich für wässrige Systeme eingesetzt, bei einer Übertragung auf den natürlichen Boden konnte zunächst keine zufriedenstellende Signalmenge und –intensität erreicht werden. Eine Ursache dafür ist, dass sich im Boden die Bakterien mit verschiedenen Humusbestandteilen, wie Huminen oder Flavin- und Huminsäuren verbinden können und zum anderen die Huminstoffe störende Signale (Autofluoreszenz) zeigen. Huminsäuren sind hochmolekulare, heterozyklische Polyphenole.

Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass in natürlichen Ökosystemen Mikroorganismen in der Regel einem extremen Nährstoffmangel ausgesetzt sind. In diesen nährstoffarmen Umgebungen herrschen langsam wachsende Bakterien mit einer geringen metabolischen Aktivität vor. Die hiermit verbundenen niedrigen Ribosomenzahlen pro Zelle sorgen für ein schwaches Signal bei der *in situ* Hybridisierung (POULSEN *et al.*, 1993). Daher wurden die Bodenextrakte in Anwesenheit von Chloramphenicol geschüttelt. Diese Behandlung verursacht eine Vergrößerung des Zellvolumens und eine Erhöhung des Ribosomengehaltes unter gleichzeitiger Unterdrückung der Zellteilung (OUVERNEY und FUHRMANN, 1997).

Weiterhin wurden verschiedene Methoden ausprobiert, die Mikroorganismen von den Bodenbestandteilen zu trennen, um den Anteil an Humusbestandteilen zu verringern und um Bakterien anzureichern:

- Die Bakterien im Bodenextrakt wurden erst fixiert und dann jeweils einmal über Faltenfilter und über Spin Columns gefiltert.
- Der Bodenextrakt wurde erst gefiltert (Faltenfilter, Spin Colum) und erst dann wurden die Bakterien fixiert.

Außerdem wurden eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Isolierung der DNA aus Bodenhabitaten beschäftigten (HOLBEN *et al.*, 1988; ZHOU *et al.*, 1996; YOUNG *et al.*, 1993), für die Extraktion der Bakterienzellen verwendet. Bei diesen Methoden wurden die Bakterien zunächst vom Bodenmaterial getrennt und erst dann die Zellen lysiert. Dazu wurde PVP (Polyvinylpyrrolidon) bzw. PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) zur Reinigung eingesetzt. PVP in wasserunlöslicher Form (hochmolekular, vernetzt) kann sich an phenolische Gruppen binden und damit aus flüssigen Phasen entfernen werden. Zur Aufreinigung der Bodenextrakte wurden verschiedene Methoden ausprobiert:

### **„Filtern mit PVP“**

- Filtern des Bodenextraktes über PVP. Dazu wurden zwei gehäufte Teelöffel in einem Faltenfilter gefüllt und der Bodenextrakt gefiltert.

### **„Filtern über PVP in Spin Columns“**

- 30 g PVP wurden mit 400 ml 5 N Salzsäure überschichtet und bei RT über Nacht gerührt. Nach Absetzen des PVP wurde der Überstand abgegossen und das PVP dreimal mit TE-Puffer (pH 8) gewaschen. Nach Auffüllen auf das ursprüngliche Volumen mit TE-Puffer wurde der pH- Wert der Suspension mit 5 N Natronlauge auf pH 8 eingestellt. Mit dieser Suspension wurden Nanosep<sup>®</sup>MF Zentrifugenröhrchen (PALL Life Science, Dreieich) direkt vor Gebrauch befüllt. Dazu wurden 500 µl der Suspension in die Röhrchen pipettiert und bei 375 x g für 1 min zentrifugiert. Dieses wurde drei bis viermal wiederholt. Dann wurde der Extrakt aufpipettiert, 3- 4 min bei RT inkubiert und bei 375 x g 2 min zentrifugiert.

Die Bakterien im Extrakt wurden zum Einen vorher fixiert und zum Anderen nach der Prozedur.

### **„Waschen mit PVP“**

- 1 g PVP wurden in 100 ml TE- Puffer (pH 8) gelöst. 3 g Boden wurde in 20 ml modifizierten M9- Medium plus 3 ml des PVP/ TE- Puffers. Für 40 min bei 28 °C und 156 Upm geschüttelt. Danach wurde das Bodenextrakt über einen Faltenfilter gegeben und dann die Bakterien im Extrakt fixiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Eintrag und Einfluss von Holzschutzmittelkomponenten auf die Bakterienpopulation im Boden - Modellsystem

Der Eintrag verschiedener Holzschutzmittel (HSM)-Komponenten aus dem Holz in den Boden und die daraus resultierende Störung der Bodenbakterien wurde zunächst in einem Modellversuch untersucht. Holz und Boden wurden nach verschiedenen Zeiten chemisch analysiert und mittels konventioneller mikrobiologischer Methoden (Bestimmung der Lebendzellzahl pro g Boden) wurde die Bakterienpopulation im Boden bestimmt.

Das Modellsystem wurde, wie in *Kapitel 3.2* beschrieben, aufgebaut. Die Probekörper wurden nach der EN 113 mit den in *Kapitel 3.2* aufgelisteten Holzschutzmittelkomponenten getränkt. Nach der Konditionierung (vier Wochen) wurden die Probekörper in die vorbereitete Erde eingebettet.

Zur Bestimmung der Ausgangswerte wurden die ersten Probekörper und Boden sofort chemisch (*Kapitel 3.3*) und mikrobiologisch (*Kapitel 3.6.3 – Bestimmung der koloniebildenden Einheiten*) analysiert. Die weiteren Proben wurden jeweils nach zwei, acht und 16 Wochen genommen und jeweils analysiert.

#### 4.1.1 Gehalt an Bioziden

Die Hochrechnung der im GC/HPLC bzw. AAS und Photometer ermittelten Konzentrationen auf die absoluten Konzentrationen in der Probe erfolgte unter Berücksichtigung aller Extraktionsschritte. Für die Angaben in Prozent wurde die gesamte Masse des Probekörpers bzw. des Bodens berücksichtigt.

#### TEBUCONAZOL

Der Konzentrationsverlauf von Tebuconazol während des Versuchszeitraum im Holz und Boden ist in der *Abbildung 4.1* dargestellt. Die Konzentrationsabnahme wurde nach zwei, acht und 16 Wochen bestimmt. Probekörper, die über den gleichen Zeitraum an der Luft gelagert wurden, dienten als Bezugsgröße.

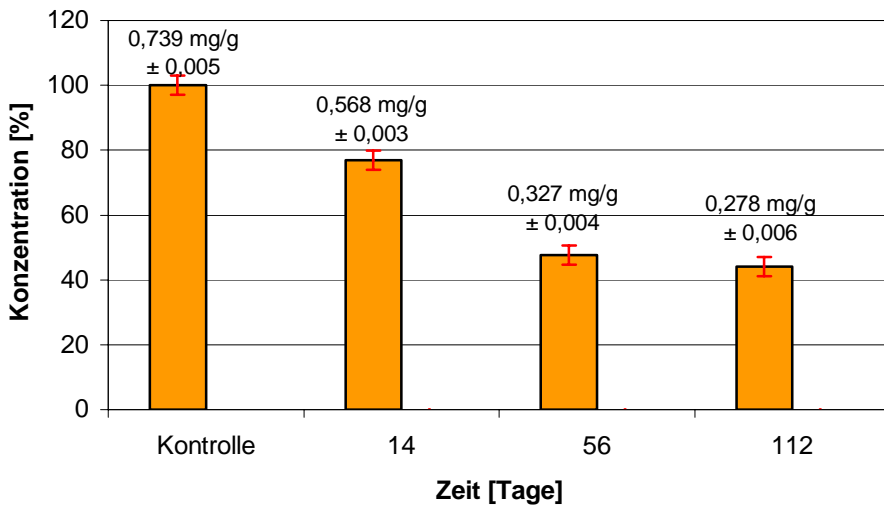


Abbildung 4.1: Konzentrationsverlauf von Tebuconazol ( $n=24; \pm SD$ ) im Holz nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau (Angabe in %, bezogen auf den Gehalt der Luftproben [Kontrolle]). Zu den einzelnen Messwerten wurde die Konzentration der Probe in mg/g Holz angegeben.

Nach 14 Tagen konnten nur noch 80 % der Ausgangsmenge im Holz nachgewiesen werden. Diese Konzentration verringerte sich nach 56 Tagen weiter auf 50 % des Ausgangswert, nahm aber zur 16ten Wochen nur noch sehr gering weiter ab.

Bei einer Wiederfindungsrate im Boden von 56 - 63 % gegenüber 90 % im Holz und einer Verteilung von TEB auf eine größere Probenmasse (Holz/Erde: Verhältnis 1:5) konnte im Boden kein TEB nachgewiesen werden. Trotz Aufreinigung gab es bei der Messung störende Signale durch Substanzen aus dem Boden (Abbildung 4.2), die bei einer Nachweisgrenze von  $0,003 \text{ mg g}^{-1}$  das Detektieren von TEB verhinderten.

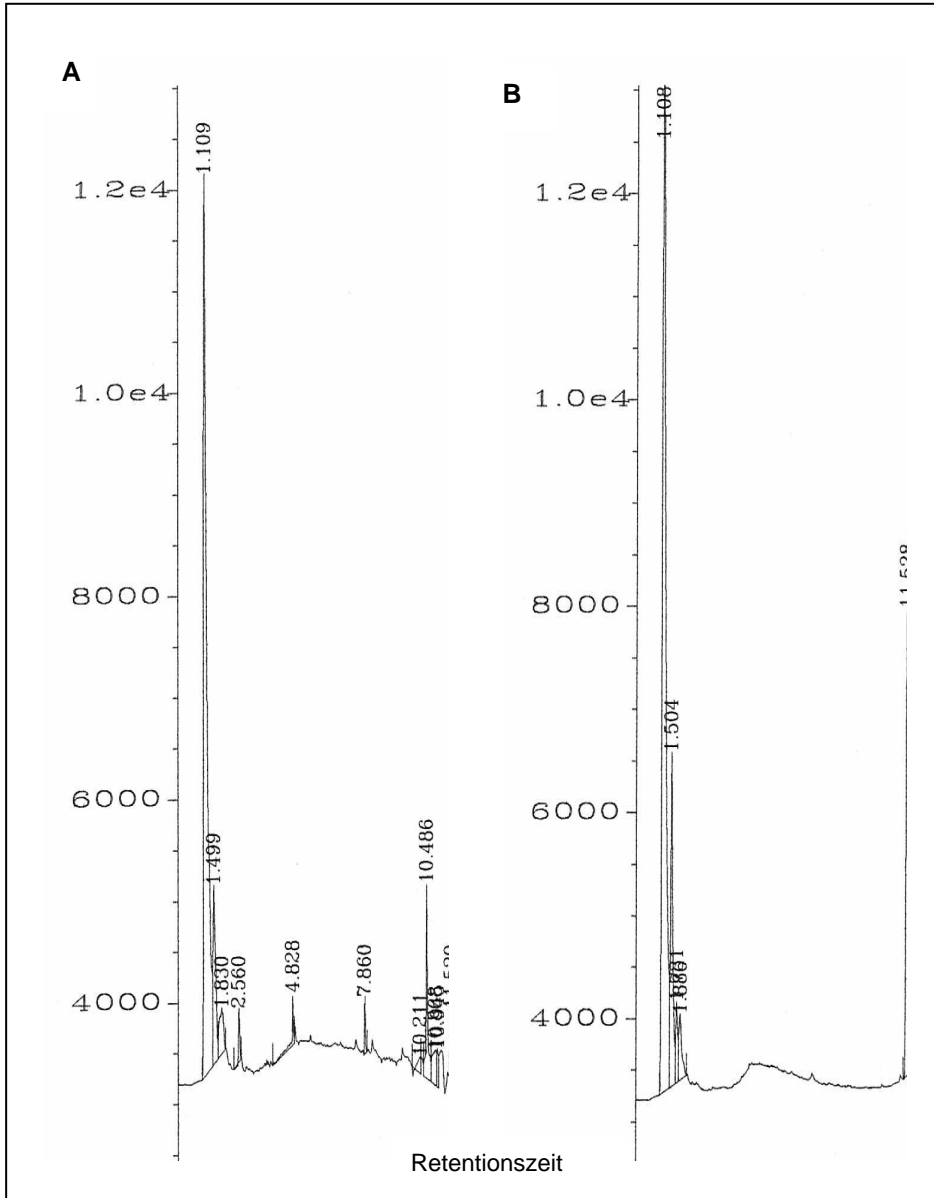
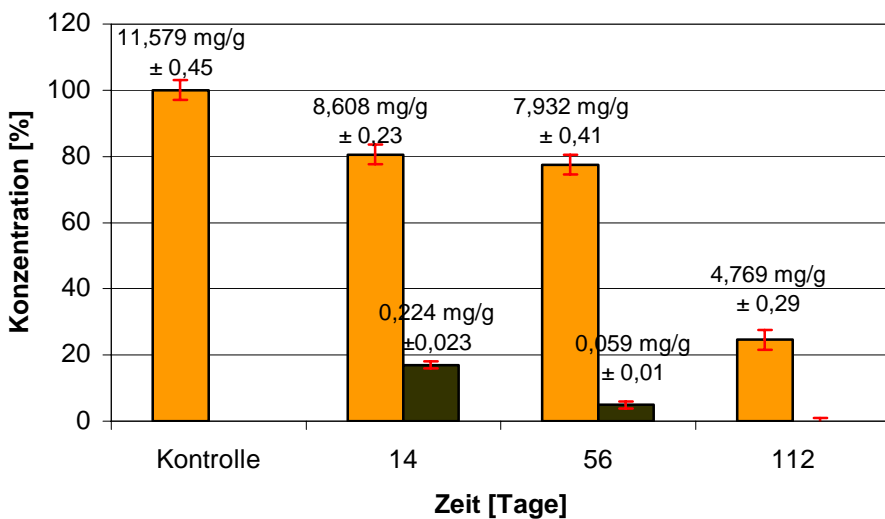


Abbildung 4.2: GC-Chromatogramme von Tebuconazol. Dessen Peak erscheint bei einer Retentionszeit von etwa 11,53 min; **A**: Chromatogramm einer Bodenprobe; **B**: Chromatogramm einer Holzprobe.

BENZALKONIUMCHLORID (BAC)

Der Konzentrationsverlauf von BAC im Holz und Erde während des Versuchszeitraum ist in *Abbildung 4.3* veranschaulicht. Die Proben wurden nach zwei, acht und 16 Wochen genommen, und sofort analysiert. Probekörper getränkt mit dem Wirkstoff, aber nicht im Boden eingebaut (Luftproben), dienten als Bezugswert für die BAC- Konzentration. Die Wiederfindungsrate lag im Holz bei 85 %, und im Boden bei 71 %.

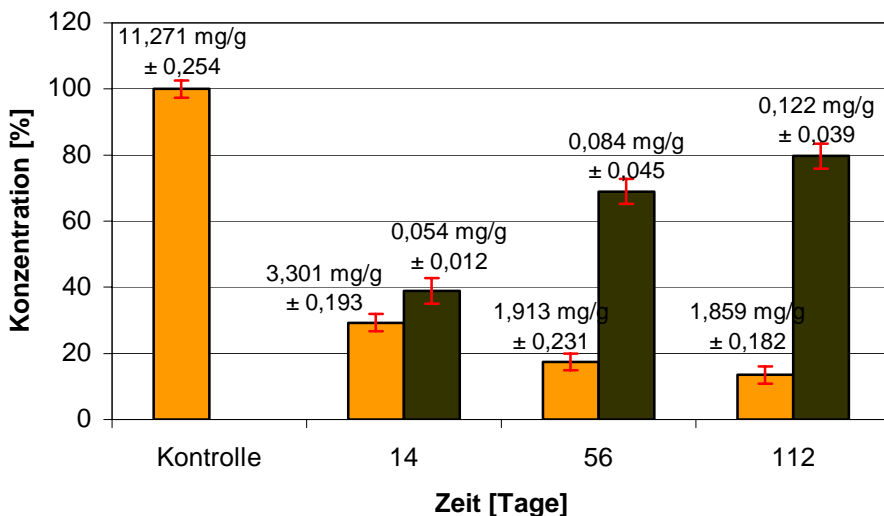


*Abbildung 4.3: BAC-Werte ( $n = 24$ ;  $\pm$  SD) im Holz ■ und Boden ■ nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau (Angabe in %, bezogen auf den Gehalt der Luftproben [Kontrolle]). Zu den einzelnen Messwerten wurde die jeweilige Konzentration der Probe in mg/g Holz bzw. Boden angegeben.*

Nach 14 Tagen waren noch 80 % der Ausgangskonzentration im Holz nachweisbar, und auch nach 56 Tagen hatte die Konzentration nicht viel stärker abgenommen. Nach 112 Tagen waren nur noch 55 % der Ausgangskonzentration im Holz zu finden. Im Boden dagegen konnten nach 14 Tagen 20 % der BAC-Konzentration gefunden werden, nach 56 Tagen allerdings nur noch 4 % und nach 112 Tagen konnte kein BAC im Boden detektiert werden. Die Nachweisgrenze lag bei  $0,002 \text{ mg g}^{-1}$ , die Konzentration muss also unter diesem Wert gelegen haben oder BAC lag nicht mehr in seiner ursprünglichen Form vor.

## KUPFER

Der Konzentrationsabnahme von Kupfer im Holz während des Versuchszeitraums ist in *Abbildung 4.4* dargestellt. Die Holz- und Bodenproben wurden nach zwei, acht und 16 Wochen genommen und sofort analysiert. Probekörper, getränkt mit dem Wirkstoff, aber nicht im Boden eingebaut (Luftproben), dienten als Bezugswert für die Kupferkonzentration. Die Wiederfindungsrate waren bei Kupfer extrem gut und lag im Holz wie auch im Boden bei über 90 %.

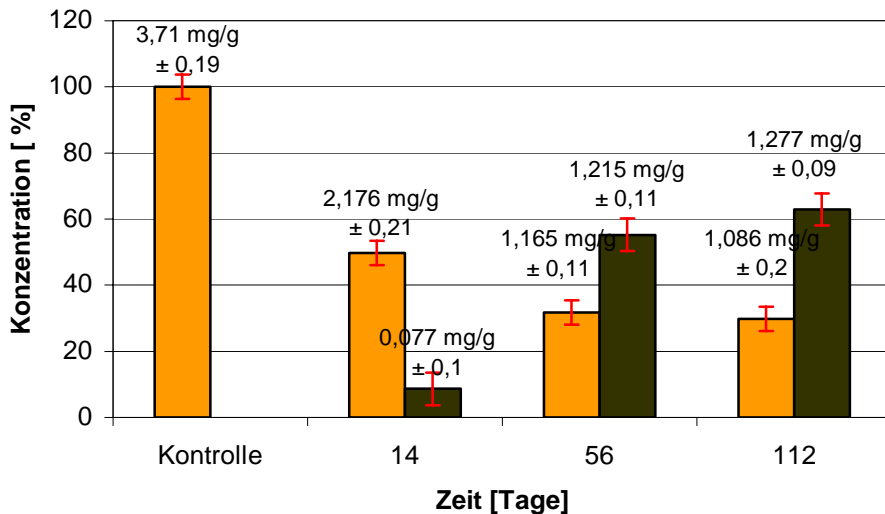


*Abbildung 4.4: Kupfer-Werte ( $n = 24$ ;  $\pm$  SD) im Holz ■ und Boden ■ nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau (Angabe in %, bezogen auf den Gehalt der Luftproben [Kontrolle]). Zu den einzelnen Messwerten wurde die jeweilige Konzentration der Probe in mg/g Holz bzw. Boden angegeben.*

Bei der Kupferbestimmung konnte schon nach zwei Wochen ein Rückgang der Konzentration von über 80 % im Holz gemessen werden. Die Konzentration im Holz nimmt nach acht und 16 Wochen noch weiter ab. Nach 16 Wochen war nur noch 15 % der Ausgangskonzentration im Holz zu finden. Im Boden nimmt die Kupferkonzentration im Gegenzug über den Zeitraum zu. Nach 16 Wochen sind 80 % der Kupferkonzentration im Boden zu finden.

BOR

Der Konzentrationsverlauf von Bor im Holz und Erde während des Versuchszeitraums wird in *Abbildung 4.5* gezeigt. Die Proben wurden nach zwei, acht und 16 Wochen genommen und sofort analysiert. Probekörper getränkt mit dem Wirkstoff, aber nicht im Boden eingebaut (Luftproben), dienten als Bezugswert für die Bor- Konzentration.



*Abbildung 4.5: Bor-Werte ( $n = 24$ ;  $\pm$  SD) im Holz ■ und Boden ■ nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau (Angabe in %, bezogen auf den Gehalt der Luftproben [Kontrolle]). Zu den einzelnen Messwerten wurde die jeweilige Konzentration der Probe in mg/g Holz bzw. Boden angegeben.*

Die Borkonzentration im Holz nahm nach 14 Tagen gegenüber der Ausgangskonzentration um 50 % ab. Nach 56 Tagen sank die Konzentration noch weiter auf 30 % der Ausgangskonzentration, die bis zum 112ten Tag bei diesem Wert stagnierte. Im Boden dagegen stieg die Konzentration über den Zeitraum an, bis zu 60 % nach 112 Tagen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Holz die Konzentrationen aller Wirkstoffe stark abnahm, allerdings nicht bei allen eine Anreicherung im Boden detektiert werden konnte. Dabei muss hier wiederum beachtet werden, dass die Werte prozentual auf die Gesamtmasse berechnet wurden. Das Volumen des Bodens war im Versuchsansatz grö-



ßer als das vom Holz. Das Fehlen von einem positiven Fund von TEB im Boden lag außerdem daran, dass die Ausgangskonzentration im Holz bei dieser Substanz um einiges niedriger lag (um 90% niedriger) als bei den anderen. Zusätzlich gibt es bei der konventionellen Bestimmung von organischen Substanzen im Boden Limitationen durch Nachweisgrenzen und Extraktionen.

#### 4.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl im Boden

Die Bodenproben wurden sofort nach Probenentnahme weiter verarbeitet, um Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Lagerzeiten zu vermeiden. Die Bodenextrakte (Kapitel 3.6.4) wurden mit dem Spiralplattenbeimpfer auf Standard I (1:10) Platten ausplattiert. Die Agarplatten wurden nach zwei, drei und vier Tagen ausgezählt. Für die Auswertung wurden die Werte nach drei Tagen gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Ausbeute am größten und stabilsten war.

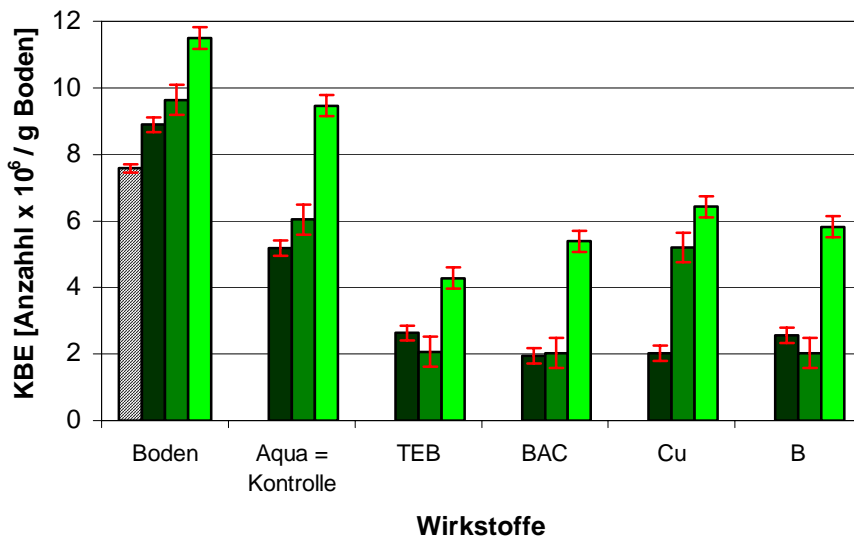


Abbildung 4.6: Koloniebildende Einheiten (KBE) mit  $n=36$  ( $\pm$ SD) vor Versuchsaufbau  $\square$ , nach 2  $\blacksquare$ , 8  $\blacksquare$  und 16  $\square$  Wochen, bezogen auf 1g Boden TS. Boden = ohne Probenkörper; Aqua = Aqua dest.; TEB = Tebuconazol; BAC = Benzalkoniumchlorid; Cu = Kupfer; B = Bor.

Als Kontrolle wurden jeweils eine Charge Erde ohne Holz und eine mit Wasser getränkten Hölzer gewählt. Bei den Bodenproben gab es eine stetige Zunahme der KBE. Bei der Kon-

trolle mit den wassergetränkten Probekörpern zeigte sich allerdings, dass schon die Anwesenheit von Holz eine, wenn auch nur kurzfristige, Abnahme der KBE bewirkt hat. Zur Überprüfung der Signifikanz wurden die Messwerte der Kontrolle mit den KBE der reinen Bodenproben mit Hilfe des t-Tests verglichen. Die Voraussetzungen für den t-Test (Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen) wurden vorab geprüft. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Bodenwerten und der Kontrolle konnte nicht festgestellt werden.

Die Auswirkungen der Schadstoffe auf die KBE wurden wiederum statistisch mit dem t-Test diesmal gegen die Referenzprobe (Wasser) verglichen. TEB bewirkte über acht Wochen eine Verringerung der KBE um fast 70 %, nach 16 Wochen stieg die Anzahl wieder um 50 % zur Referenzprobe. Die Auswirkung gegenüber der Referenz war allerdings nur nach 16 Wochen signifikant. Auch BAC bewirkte eine Abnahme der KBE um 80 %. Die KBE fingen allerdings schon nach 8 Wochen an sich leicht wieder zu vermehren und stiegen nach 16 Wochen auf 70 % der Kontrolle an. Der Unterschied zur Kontrolle war zu keinem Zeitpunkt signifikant. Der Kupfereintrag bewirkte nach zwei Wochen eine Verringerung der KBE auf 20 %, diese stiegen aber nach acht Wochen schon auf 70 %, und nach 16 Wochen auf über 80 % an. Beim statistischen Vergleich war der Unterschied zur Kontrolle nur nach 16 Wochen signifikant. Bor bewirkte eine Abnahme der KBE auf 25 % bis zur achten Woche, die Anzahl der KBE stieg dann bis zur 16ten Wochen wieder auf fast 80 % der Ausgangsmenge an. Beim Vergleich mit der Kontrolle war der Unterschied in der Anzahl der KBE damit auch nach nur 16 Wochen signifikant.

## 4.2 Auswirkung von Bioziden auf ausgewählte Bodenbakterien durch Messung der Lebensfähigkeit (Live/Dead)

Die Auswirkungen von verschiedenen Bioziden auf ausgewählte Bodenbakterien wurde mit Hilfe des Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit bestimmt. Mit diesem Test sollte die Lebensfähigkeit einzelner Bakterien nach unterschiedlicher Zeit der Biozidaussetzung bestimmt werden.

### 4.2.1. Modifizierung des Anzuchtmediums

Voraussetzung für die Abschätzung und Vergleich einer Auswirkung durch die Biozide waren die gleiche Ausgangsbedingungen für alle Bakterienarten. Dazu wurde ein Medium gesucht in dem die Bakterien alle gleich gut wachsen können, und es keine Limitierung durch das Wachstumsmedium gab.

Dafür wurde das M9-Medium (ATLAS, 1995) modifiziert:

- Zugabe von Spurenelementlösung SL4
- mit Hefeextrakt: 0,1 g/L

Ob die Bakterien Hefeextrakt zum besserem Wachstum benötigen, wurde vorab getestet. Dazu wurden Übernachtkulturen auf die gleiche OD eingestellt, in flüssigem M9-Medium mit SL4 und Hefeextrakt bzw. in M9-Medium mit SL4 ohne Hefeextrakt inkubiert, und die Zelldichte photometrisch bei 600 nm bestimmt.

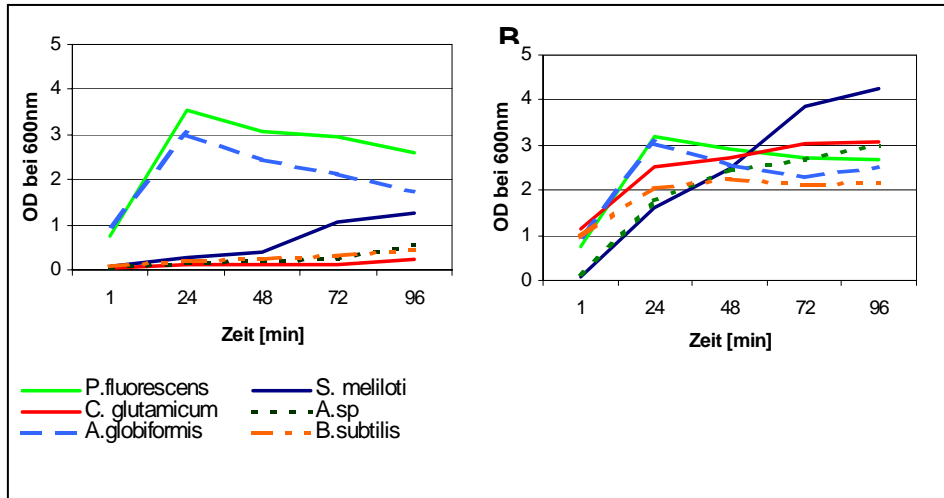


Abbildung 4.7: Wachstumsverlauf der einzelnen Bakterien ( $n = 3$ ) in den unterschiedlich modifizierten M9-Medien A: M9-Medium mit SL4 ohne Hefeextrakt, B: M9-Medium mit SL4 mit Hefeextrakt.

Wie in den Abbildungen 4.7 zu erkennen ist, hat sich eine Hefekonzentration von  $0,1 \text{ g l}^{-1}$  und die Zugabe von SL4 (B) als günstig erwiesen, da hier der Wachstumsverlauf aller Bakterien am gleichmäßigsten war, und die Kulturen bis zu einer ähnlichen optischen Dichte gewachsen sind. Für alle nachfolgenden Versuche wurde dieses modifizierte M9-Medium verwendet.

#### 4.2.2 Toleranztest

Zur Überprüfung der Auswirkungen der Schadstoffe auf die einzelnen Bakterien wurde vorab ein Screening bzw. Hemmtest auf festem modifizierten M9-Medium durchgeführt.

Die modifizierten M9-Platten mit Glucose (C-Quelle) dienen als Positivkontrolle. Zur Überprüfung der Hemmung der verschiedenen Biozide wurden diese eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn auf modifizierten M9-Platten appliziert (in einer entsprechenden Konzentration wie in den Flüssigkulturen, bezogen auf 20 ml Agar), und unter der Sterilbank abgedampft. Da einige der Biozide in Lösungsmittel gelöst wurden, wurde parallel auch die Auswirkung der Lösungsmittel Aceton und Ethanol geprüft.

Übernachtskulturen der Bakterien auf modifizierten M9-Medium (mit 1 mM Glucose) wurden auf die Testplatten mit Hilfe von vorher abgeplatteten und sterilisierten Zahn-

stochern gestempelt. Dabei wurden auf je eine Testplatte alle sechs Bakterienarten, in dreifachen Parallelansätzen, gestempelt. Die Auswertung erfolgte nach einem und vier Tagen. Quantitative Wachstumsunterschiede wurden als qualitatives Merkmal („positive Wuchs“) im Vergleich mit dem Kontrollmedium bestimmt.

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4.1* dargestellt. Die Lösungsmittel Aceton und Ethanol hatten keine negative Wirkung auf das Wachstum der Bakterien. *P. fluorescens* und *A. spec* zeigten durch die Anwesenheit aller Biozide keine Behinderung im Wachstum. Auch *A. globiformis* und *S. meliloti* wurden nur leicht in ihrem Wachstum beeinflusst. Dagegen wurde *B. subtilis* und *C. glutamicum* durch die Anwesenheit fast aller Biozide im Wachstum behindert. Das Antibiotikum Chloramphenicol diente als Kontrollsubstanz, das die meisten Bakterien in ihrem Wachstum behindert (*siehe Theoretischer Hintergrund*). *P. fluorescens* und *B. subtilis* wurden allerdings nicht behindert, da sie resistent gegen Chloramphenicol sind. Bilder des Wachstums sind im *Anhang 7.2* zu finden.

*Tabelle 4.1: Wachstumsbewertung der einzelnen Bakterienarten. Ein positives bzw. identisches Wachstum im Vergleich zur Kontrollplatte wurde mit einem + Zeichen symbolisiert; eingeschränktes Wachstum mit (+), und kein Wachstum mit einem - Zeichen.*

|                 | <i>P. fluorescens</i> | <i>A. spec</i> | <i>A. globiformis</i> | <i>S. meliloti</i> | <i>C. glutamicum</i> | <i>B. subtilis</i> |
|-----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| TEB             | +                     | +              | (+)                   | -                  | -                    | -                  |
| BAC             | +                     | +              | (+)                   | +                  | (+)                  | -                  |
| Atrazin         | +                     | +              | (+)                   | +                  | -                    | -                  |
| Naphthalin      | +                     | +              | +                     | -                  | -                    | -                  |
| 2,4- D          | +                     | +              | (+)                   | +                  | (+)                  | -                  |
| Chloramphenicol | +                     | -              | -                     | -                  | -                    | +                  |
| Aceton          | +                     | +              | +                     | +                  | +                    | +                  |
| Ethanol         | +                     | +              | +                     | +                  | +                    | +                  |

### 4.2.3. Live/ Dead-Test

Zur Durchführung des Lebensfähigkeitstests wurden die Bakterienkulturen (*siehe Material und Methoden 3.6.1*), wie in *Kapitel 3.6.4* beschrieben, angezüchtet. Danach wurden die ersten Proben zur Bestimmung der Ausgangssituation genommen und erst danach die unterschiedlichen Biozide (*Tabelle 3.1*) zu den Bakterien gegeben und weiter inkubiert. Weitere Proben wurden nach vier bzw. 24 Stunden genommen. Parallel zu den Proben für den Live/Dead-Test (*siehe Kapitel 3.8.3*), wurden Proben verdünnt (bis  $10^{-7}$ ) und für die Korrelation der Ergebnisse mit den KBE auf modifizierten M9-Platten ausplattiert sowie die OD der Kulturen bestimmt.

Die weitere Verarbeitung erfolgte sofort nach der Probenentnahme, um zu verhindern, dass Auswirkungen durch längere Standzeit die Ergebnisse verfälschen.

Vorab wurde überprüft, ob der Test für alle Bakterien geeignet war. Dazu wurde der Ablauf, wie in *Kapitel 3.8.3* beschrieben, mit den Reinkulturen durchgeführt. Der Test war für alle ausgewählten Organismen geeignet. Außerdem wurde geprüft, ob die Ergebnisse aus dem Live/ Dead-Test mit denen durch die Standardmethoden (KBE, optische Dichte) ermittelten Ergebnissen korrelieren. Exemplarisch ist diese Korrelation in *Abbildung 4.8* dargestellt. Die Zählung der KBE stimmte mit der Anzahl der grünen Bakterien überein. Da die KBE die Anzahl der lebenden Bakterien wiedergibt, wird im Folgenden die Anzahl der grünen Bakterien als Lebendzellzahl bezeichnet.

Da einige der Biozide nicht wasserlöslich sind, wurde parallel auch die Auswirkung von Aceton und Ethanol getestet. Aceton und Ethanol zeigten keine negative Auswirkung auf die Anzahl der grünen Zellen und wurden für das untersuchte System nicht weiter betrachtet.

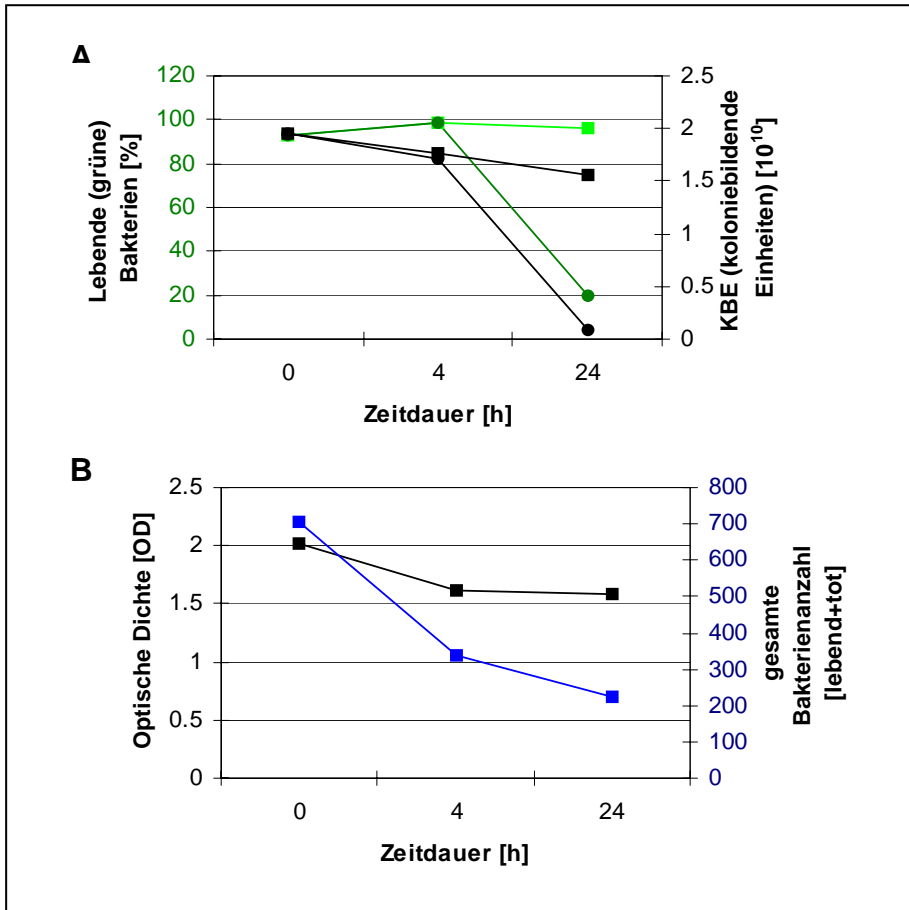


Abbildung 4.8: Korrelation der Live/Dead- Ergebnisse mit den OD- bzw. KBE- Ergebnissen am Beispiel der Auswirkung von TEB auf *S. meliloti*. A: Lebende Bakterien in [%] ohne TEB-Zugabe ■, und mit TEB-Zugabe ●; gegen Zählung der KBE (ohne TEB ■, mit TEB ●). B: Gesamte Zellzahlen aus dem Live/Dead- Test ■ gegen Messung der OD ■ bei 600nm.

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit der Bakterien ist am Beispiel von *B. subtilis* in Abbildung 4.9 A-F auf den folgenden Seite dargestellt. Zu sehen sind einzelne Bakterienzellen (grün = lebend; rot = tot), Fluoreszenzaufnahmen der anderen Bakterienarten sind im Anhang 7.3 zu finden.

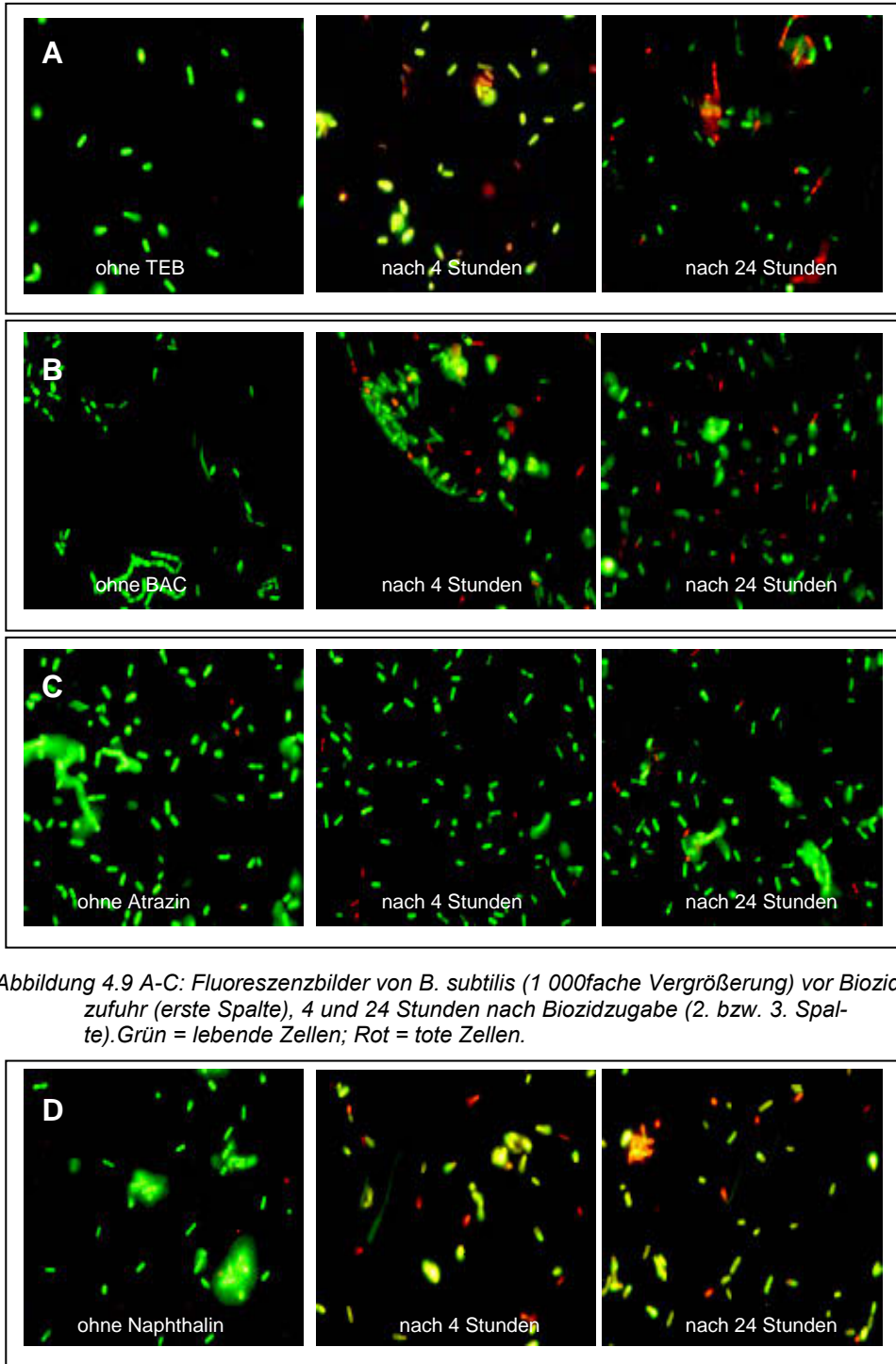


Abbildung 4.9 A-C: Fluoreszenzbilder von *B. subtilis* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (erste Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte). Grün = lebende Zellen; Rot = tote Zellen.



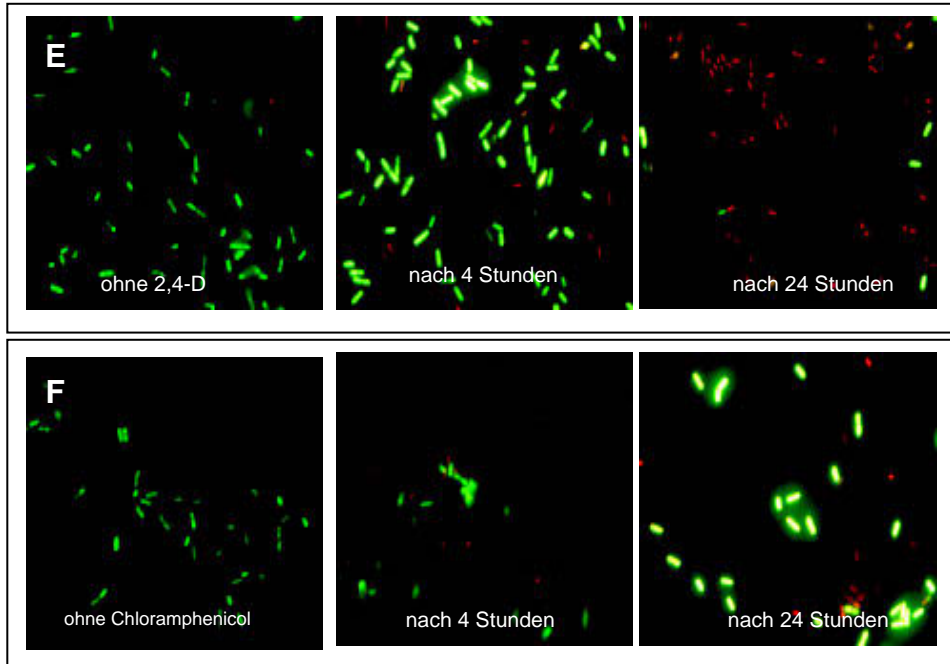


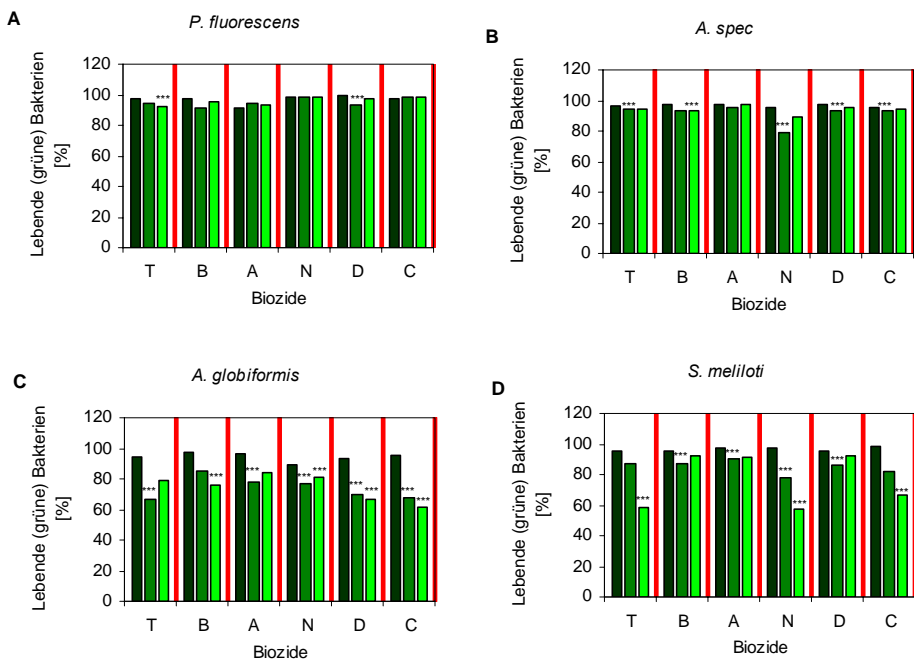
Abbildung 4.9 D-F: Fluoreszenzbilder von *B. subtilis* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (erste Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte). Grün = lebende Zellen; Rot = tote Zellen.

Die Ergebnisse wurden statistisch mit Hilfe des Dunnett „leftside“ Tests geprüft. Die Anzahl der Lebendzellzahl vier und 24 Stunden nach der Zugabe der Biozide wurden mit der Anzahl in der Kultur ohne Biozidzugabe verglichen. Da die Ergebnisse in Prozent, wenn sie gegen Null oder 100 gehen, zur Verfälschung der Varianz führen, wurden die Werte für die statistische Auswertung einer inversen Sinustransformation unterzogen (BARLETT, 1947; BLISS, 1937).

Wie in *Abbildung 4.10 A* zu erkennen, wurde *P. fluorescens* durch die Biozide kaum beeinflusst. Die Biozide zeigten ebenfalls eine relative geringe Auswirkung auf die Lebendzellzahl von *A. spec* (*Abbildung 4.10 B*). Eine signifikante Abnahme gab es meistens nach vier Stunden, allerdings nach 24 Stunden allerdings die Zahl wieder an. *A. globiformis* dagegen wurde durch alle Biozide signifikant beeinflusst (*Abbildung 4.10 C*). TEB, Naphthalin und Atrazin bewirkten vier Stunden nach Zugabe eine signifikante Reduzierung der Lebendzellzahl um 30 %. Danach stieg die Anzahl der lebenden Bakterien wieder auf 80 % bis 24 Stunden nach der Zugabe an. Durch Zugabe von

2,4-D und Chloramphenicol wurde die Lebendzellzahl nach 24 Stunden sogar um 40 % reduziert.

*S. meliloti* (Abbildung 4.10. D) und *C. glutamicum* (Abbildung 4.10 E) wurden durch alle Biozide unterschiedlich stark beeinflusst. Durch Zugabe von TEB, Naphthalin und Chloramphenicol nahm die Anzahl der lebenden Zellen von *S. meliloti* um fast 50 % nach 24 Stunden ab. Die Auswirkungen der Biozide auf *C. glutamicum* zeigten sich in der Regel erst nach 24 Stunden. Durch Zugabe von Naphthalin, 2,4-D und Chloramphenicol sank die Lebendzellzahl auf 56 – 65 % nach 24 Stunden. *B. subtilis* (Abbildung 4.10 F) wurde meistens bereits nach vier Stunden nach der Zugabe signifikant beeinflusst. TEB, BAC, Naphthalin und 2,4-D bewirkten nach 24 Stunden einen Rückgang der Lebendzellzahl um 60 %, während Atrazin und Chloramphenicol so gut wie keine Auswirkung auf die Anzahl der lebenden Bakterien hatte.



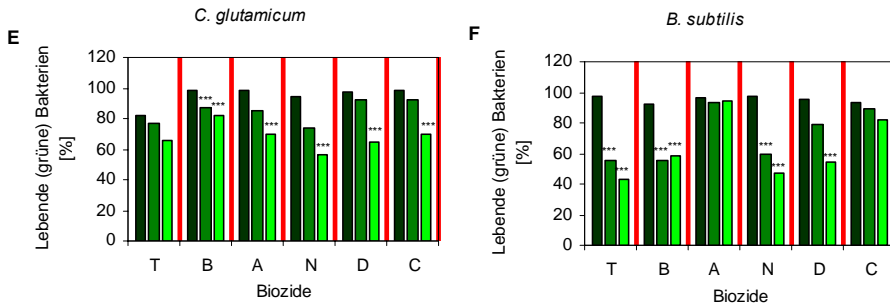


Abbildung 4.10: Anzahl der lebenden Bakterien in [%] vor Biozidzugabe ■; nach 4 ■ und 24 Stunden ■; T = Tebuconazol; B = Benzalkoniumchlorid; A = Atrazin; N = Naphthalin; D = 2,4-D; C = Chloramphenicol. Die Auswirkungen auf die Anzahl der lebenden Bakterien wurde gegen den jeweiligen Wert ohne Biozid bezogen, \*\*\* = signifikant ( $p = 0,05$ ).

Durch die Gegenüberstellung der signifikanten Auswirkungen der getesteten Bakterienarten (Tabelle 4.1) erhält man Informationen über die Wirksamkeit der einzelnen Biozide. Betrachtet nach dem Zeitpunkt ihrer signifikanten Auswirkungen lässt sich die folgende Rangliste erstellen:

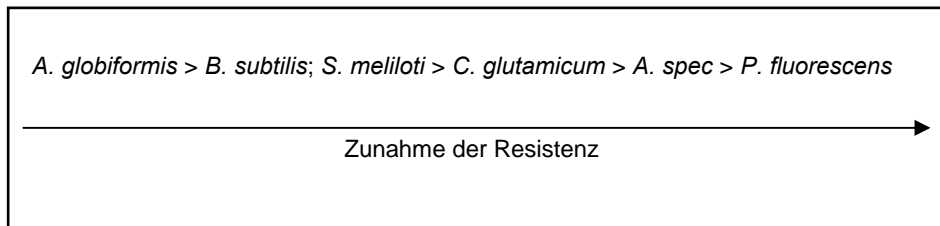
|                              |                                |                                 |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Wirksamkeit nach 24 Stunden: | 1. BAC, Naphthalin             | ↓<br>Abnahme der<br>Wirksamkeit |
|                              | 2. TEB, 2,4-D, Chloramphenicol |                                 |
|                              | 3. Atrazin                     |                                 |
| Wirksamkeit nach 4 Stunden:  | 1. 2,4-D, Naphthalin           | ↓<br>Abnahme der<br>Wirksamkeit |
|                              | 2. TEB, BAC                    |                                 |
|                              | 3. Atrazin, Chloramphenicol    |                                 |

Für diese Testbedingungen folgt, dass Naphthalin die ausgewählten Bakterien am stärksten beeinflusst, gefolgt von TEB und BAC.

Tabelle 4.2: Vergleich der Wirksamkeit der Biozide auf die einzelnen Bakterien nach 4 und 24 Stunden; Angabe der lebenden Bakterien in [%]. Unterlegte Flächen = signifikante Auswirkung

| Zeitpunkt             | TEB  |      | BAC  |      | Atrazin |      | Naphthalin |      | 2,4-D |      | Chlor-<br>amphenicol |      |
|-----------------------|------|------|------|------|---------|------|------------|------|-------|------|----------------------|------|
|                       | 4    | 24   | 4    | 24   | 4       | 24   | 4          | 24   | 4     | 24   | 4                    | 24   |
| <i>P. fluorescens</i> | 93,3 | 92   | 93,4 | 94,5 | 96,1    | 93,2 | 98,4       | 98,6 | 93,2  | 97   | 98,3                 | 98,1 |
| <i>A. spec.</i>       | 92,8 | 93,4 | 93,3 | 92,2 | 95,3    | 95,9 | 76,9       | 88,3 | 93,9  | 95   | 93,6                 | 94,1 |
| <i>C. glutamicum</i>  | 76   | 85,8 | 85,6 | 81,7 | 84,1    | 71,2 | 76,6       | 61,9 | 91,3  | 63,3 | 92,2                 | 68   |
| <i>S. meliloti</i>    | 85   | 51,4 | 85,2 | 91,6 | 87,4    | 90,3 | 76,2       | 60,4 | 88,1  | 90,5 | 98,3                 | 54,8 |
| <i>A. globiformis</i> | 69,6 | 78,9 | 78,6 | 67,3 | 79,5    | 83,5 | 76,7       | 75,5 | 67,7  | 57,7 | 66,2                 | 57   |
| <i>B. subtilis</i>    | 58,2 | 34,5 | 55,6 | 55,4 | 93,9    | 94,1 | 55         | 45,1 | 76,9  | 42,2 | 91                   | 85,9 |

Aus der Tabelle 4.2 ergibt sich für dieses untersuchte System eine Resistenzreihenfolge der Bakterien wie folgt:



Um mehr Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die Wasserlöslichkeit der einzelnen Biozide eine Auswirkung auf ihre Wirksamkeit hatte, wurde der logarithmische Octanol–Wasser–Koeffizient ( $\log K_{OW}$ ) mit der Hemmung, das heißt den roten (toten) Bakterien, verglichen. Der  $K_{OW}$ , der Verteilungskoeffizient zu 1-Octanol pro Wasser, ist ein Maß für die Fettlöslichkeit. Je größer  $K_{OW}$  (steigt mit zunehmender Fettlöslichkeit und sinkender Wasserlöslichkeit) ist, desto eher kann eine Bioakkumulation stattfinden (HULPKE *et al.*, 1993). Die Werte werden als Logarithmus ( $\log K_{OW}$ ) aus der Literatur (RUELLE, 2000) angegeben. Je kleiner der Wert, desto besser die Wasserlöslichkeit.

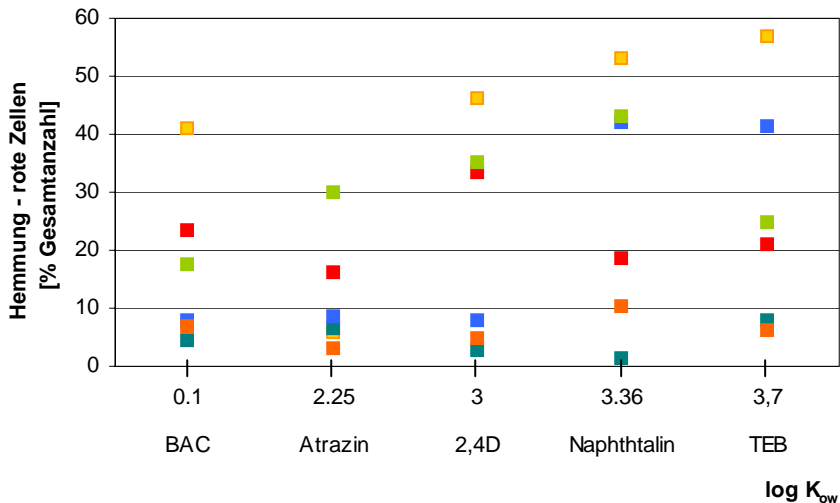


Abbildung 4.11: Hemmung des Wachstums (Angabe in %, wurde auf die Anzahl aller Zellen bezogen) nach 24 Stunden. Rot = *A. globiformis*; Hellgrün = *C. glutamicum*; Orange = *B. subtilis*; Blau = *S. meliloti*; Dunkelorange = *A. spec.*; Dunkelgrün = *P. fluorescens*.

Aus *Abbildung 4.11* kann man entnehmen, dass mit abnehmender Wasserlöslichkeit eine stärkere störende Wirkung zu verzeichnen ist.

Die Auswirkungen waren für die einzelnen Organismen unterschiedlich ausgeprägt. So zeigte sich *B. subtilis* mit abnehmender Wasserlöslichkeit am stärksten gehemmt (55 %), wohingegen *A. spec.* unabhängig von der Wasserlöslichkeit kaum gehemmt wurde. Bei *S. meliloti* kann man sehr gut eine zunehmende Hemmung (von 8 zu 40 %) bei abnehmender Wasserlöslichkeit der Biozide erkennen. Beim schlecht wasserlöslichen TEB war die Spannweite der Hemmung am größten (von 5 - 55 %), während die Hemmreaktionen beim sehr gut wasserlöslichen BAC enger zusammenlagen (von 5 – 40 %).

### 4.3 Auswirkungen der Schadstoffe auf Bakteriengemeinschaften im Modellsystem mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisation (FISH)

Zur Überprüfung, wie sich Schadstoffe auf mikrobielle Gemeinschaften auswirken, wurden Kombinationen von drei Bakterienarten in Flüssigkulturen verschiedener Schadstoffe ausgesetzt. Dabei wurden die Informationen aus den vorherigen Versuchen mit dem Live/Dead-Test in die Auswahl der Bakterienkombinationen einbezogen. Die Veränderung in der Verteilung der Bakterien wurde mittels der FISH- Methode detektiert.

#### 4.3.1 Wachstumsraten der ausgewählten Bakterien

Für den Versuch wurden zunächst die Wachstumsraten der einzelnen Bakterienarten, der Glucoseverbrauch und der Proteingehalt in modifiziertem M9-Medium bestimmt.

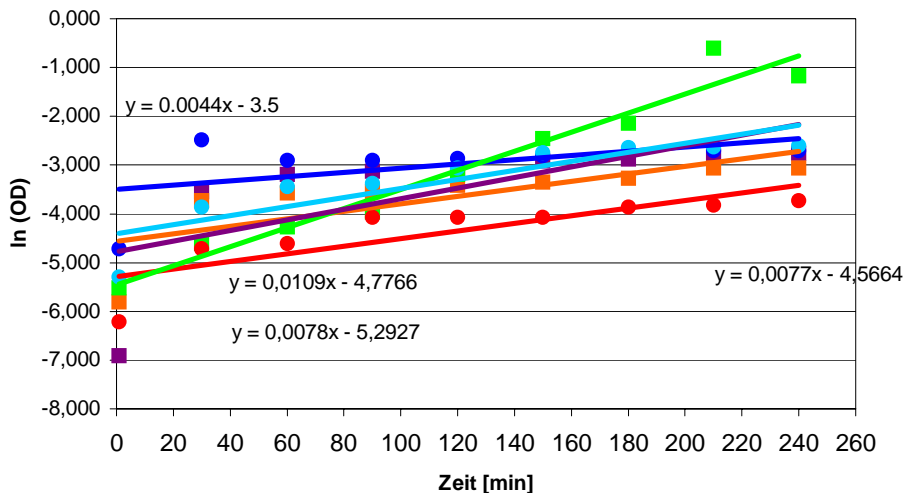


Abbildung 4.12: Lineare Regression des natürlichen Logarithmus vom  $OD_{600nm}$  in der exponentiellen Phase gegen die Zeit, zur Bestimmung der Wachstumsrate. Blau: *S. melliloti*; Rot: *A. spec*; Hellblau; *P. fluorescens*; Orange: *C. glutamicum*; Lila: *A. globiformis*; Hellgrün: *B. subtilis*

Tabelle 4.3: Wachstumsrate und Verdopplungszeit der einzelnen Bakterien

| Organismus            | Verdopplungszeit $t_d$ [h] | Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ] |
|-----------------------|----------------------------|---|
| <i>A. globiformis</i> | 2,5                        | 0,416   |
| <i>C. glutamicum</i>  | 2,8                        | 0,19  |
| <i>P. fluorescens</i> | 1,5                        | 0,482   |
| <i>A. spec</i>        | 1,0                        | 0,636   |
| <i>S. meliloti</i>    | 3,5                        | 0,162   |
| <i>B. subtilis</i>    | 1,7                        | 0,306   |

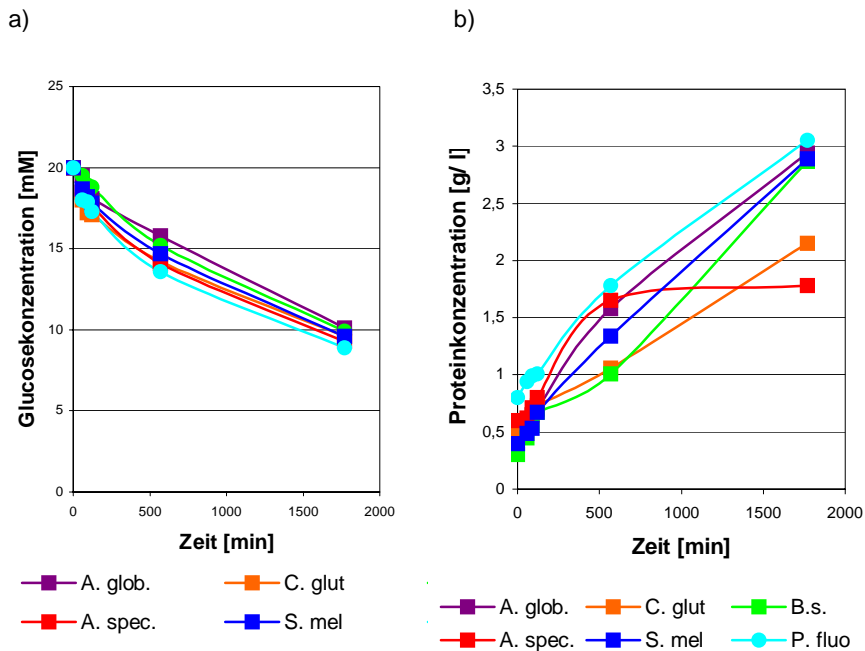


Abbildung 4.13: a) Glucosekonzentration und b) Proteingehalt der einzelnen Bakterienstämme.

In den Flüssigkulturen kommt es zu einer Änderung von Milieuparametern, da zu Beginn eines solchen Experiments hohe Substratkonzentrationen vorliegen, die zunehmend verringert werden, wohingegen die Nebenproduktkonzentrationen ständig steigen. Es wurde überprüft, ob alle Zellen wachsen können, bis ein essentieller Nahrungsbestandteil (Glucose) verbraucht ist, oder ob es zu einer toxischen Anreicherung von Stoffwechselprodukten kommt.

Wie in *Abbildung 4.12* und *Tabelle 4.3* zu erkennen ist, wachsen *A. globiformis* und *P. fluorescens* etwas schneller als die anderen Bakterienarten und wurden daher in den Mischkulturen in entsprechend geringerer Ausgangskonzentrationen eingesetzt. *B. subtilis* wächst zunächst langsamer als die anderen Bakterienarten, allerdings, wie am Proteingehalt zu erkennen, erlangt es die gleichen Konzentrationen im Medium wie die anderen Bakterien.

Der Verbrauch der Glucose war bei allen Reinkulturen gleich und die Vermehrung bzw. der Anstieg der Proteinkonzentration lag bei allen Kulturen bei  $3 \text{ g l}^{-1}$ , nur bei *A. spec* und *C. glutamicum* etwas weniger (*Abbildung 4.13*). Die Bakterien waren alle geeignet für die Verwendung in Mischkulturen, die mit Hilfe dieser Informationen hergestellt wurden, damit das Verhältnis in den Ausgangskulturen ausgewogen war.

#### 4.3.2 Wirkung von Biozide charakterisiert durch FISH

Zur Durchführung der Tests wurden die Bakterienarten zunächst einzeln wie in *Kapitel 3.6.4* beschrieben, angezüchtet, dann die Mischkulturen in unterschiedlichen Kompositionen (*Tabelle 4.4*) hergestellt (*Kapitel 3.6.4*).

Die Proben für die *in situ* Hybridisierung wurden sofort mit Paraformaldehyd fixiert (*Kapitel 3.8.4*) und bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Die Proben für den Glucose- und Proteintest wurden, wie in *Kapitel 3.7.1* und *3.7.2* beschrieben, behandelt. Die  $OD_{600\text{nm}}$  wurde sofort bestimmt.

*Tabelle 4.4: Bakterienkombinationen und Art der Schadstoffzugabe*

| Bakterien  | Schadstoff         |
|--|--------------------|
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ; <i>B. subtilis</i>  | BAC; Naphthalin    |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ; <i>S. meliloti</i>  | TEB; Atrazin; BAC  |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>S. meliloti</i> ; <i>A. spec.</i>       | Naphthalin ; 2,4-D |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>S. meliloti</i> ; <i>A. globiformis</i> | Naphthalin         |

Vor Versuchsbeginn wurden alle Sonden experimentell überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die ausgewählten Sonden tatsächlich nur an die rRNA der Bakterien banden, für die diese spezifisch waren.



Zur Bestimmung des idealen Fixierungsprotokoll wurden die Hybridisierungssignale mit der Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Bakterien) ins Verhältnis gesetzt, dabei erwies sich die Paraformaldehydefixierung mit 80 - 90 % positive Hybridisierungssignale, gegenüber 5 – 50 % bei der Ethanol Fixierung, als günstigere Fixierung.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Mischkulturen dargestellt:

Der Proteingehalt in den Flüssigkulturen bei allen Mischkulturen stieg über 24 Stunden von  $0,5 \pm 0,07$  auf  $1,1 \pm 0,1 \text{ g l}^{-1}$  in der Kontrolle und in den Biozid belasteten Kulturen gleichermaßen.

### **Bakterienkomposition: *P. fluorescence*, *C. glutamicum* und *B. subtilis***

Die **Auswirkung von Naphthalin** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.14* (A-C) exemplarisch dargestellt:

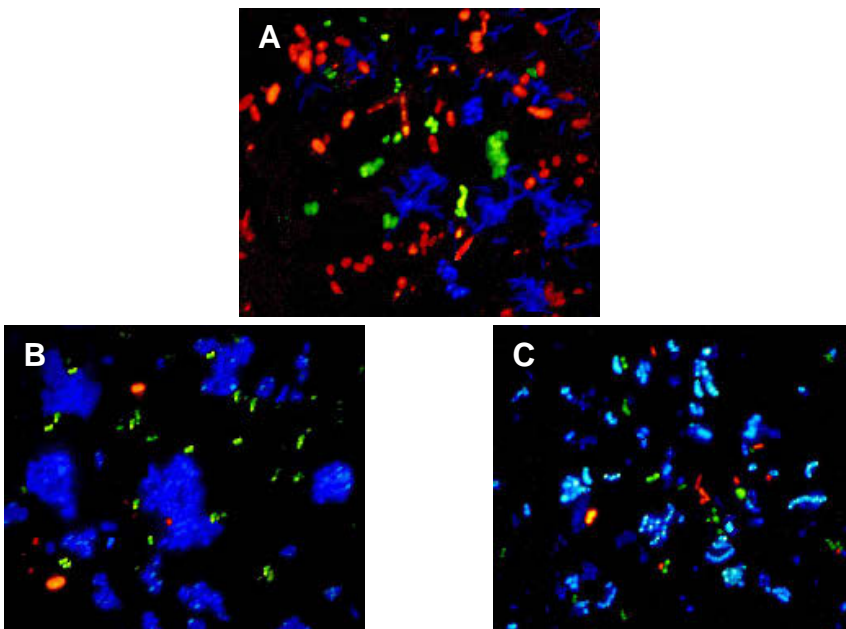


Abbildung 4.14: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (blau), *C. globiformis* (grün) und *B. subtilis* (rot) **A:** vor Biozidzugabe; **B:** 4 Stunden nach Naphthalinzugabe; **C:** 24 Stunden nach Naphthalinzugabe.

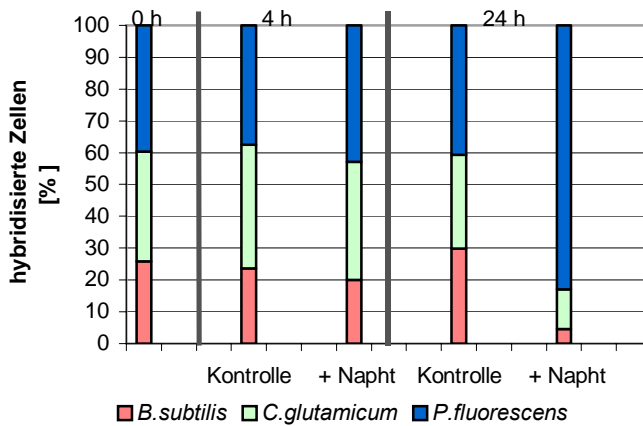


Abbildung 4.15: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von Naphthalin (0), 4 und 24 Stunden nach der Naphthalinzugabe (Kontrollen ohne Naphthalin).

Abbildung 4.15 zeigt die Verteilung der verschiedenen Bakterienarten nach der Naphthalinzugabe. Nach vier Stunden hat sich das Verhältnis der Arten untereinander noch nicht sehr stark verändert, aber eine Verschiebung zu *P. fluorescens* und *C. glutamicum* ist bereits zu erkennen. 24 Stunden nach der Zugabe von Naphthalin erkennt man, dass *P. fluorescens* dominierend in der Kultur war und die Anzahl von *C. glutamicum* und *B. subtilis* fast vollständig zurück gegangen waren.

Die **Auswirkung von BAC** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.16* (A-C) an einem Beispiel dargestellt:

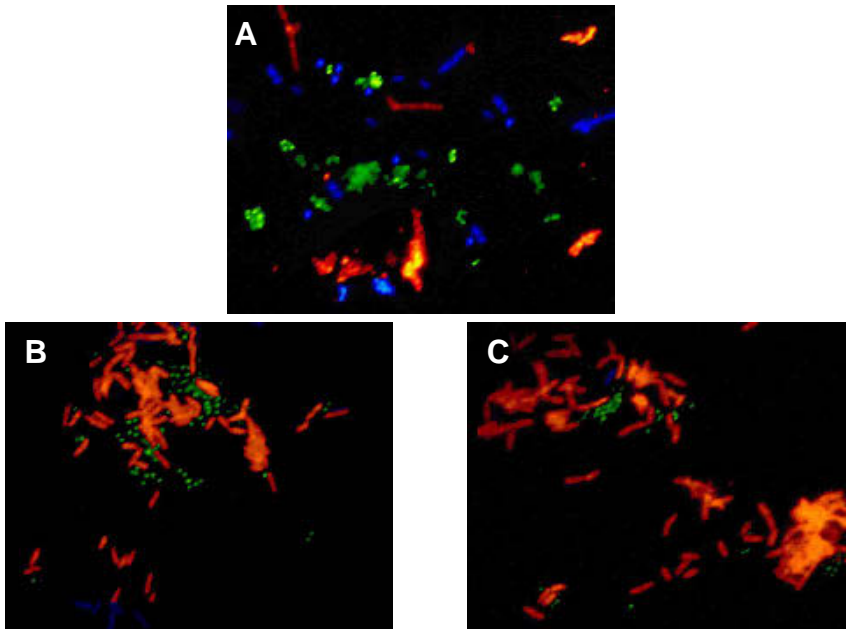


Abbildung 4.16: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *C. globiformis* (grün) und *B. subtilis* (blau) **A**: vor Biozidzugabe; **B**: 4 Stunden nach BAC - Zugabe; **C**: 24 Stunden nach BAC - Zugabe.

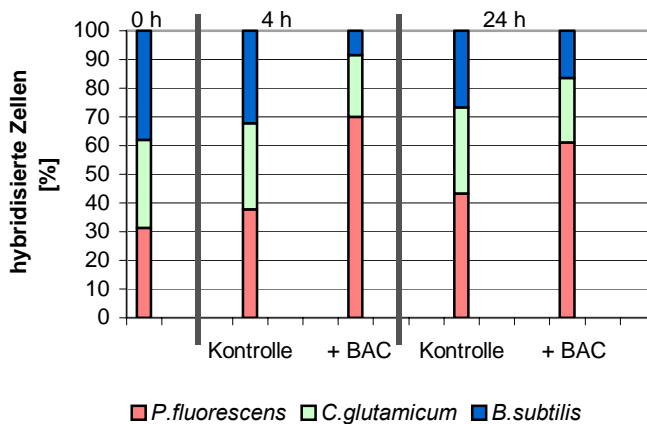


Abbildung 4.17: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von BAC (0), 4 und 24 Stunden der BAC - Zugabe (Kontrolle ohne BAC).

Abbildung 4.17 zeigt die Auswirkung von BAC auf *P. fluorescens*, *C. glutamicum* und *B. subtilis*. Bereits vier Stunden nach der Zugabe von BAC kann man eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichtes hin zu *P. fluorescens* erkennen, eine starke Abnahme von *B. subtilis* und auch von *C. glutamicum*. Nach 24 Stunden hat sich die Zellanzahl von *B. subtilis* wieder etwas erholt.

In dieser Konstellation von Bakterien bewirkte die Zugabe der ausgewählten Biozide immer eine starke Zunahme von *P. fluorescens* (60 – 80 % der Zellen) im Vergleich zu *B. subtilis*, der stark abnahm (4 - 15 % der Zellen).

### **Bakterienkomposition: *P. fluorescens*, *C. glutamicum* und *S. meliloti***

Die **Auswirkung von TEB** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.18* (A-C) dargestellt:

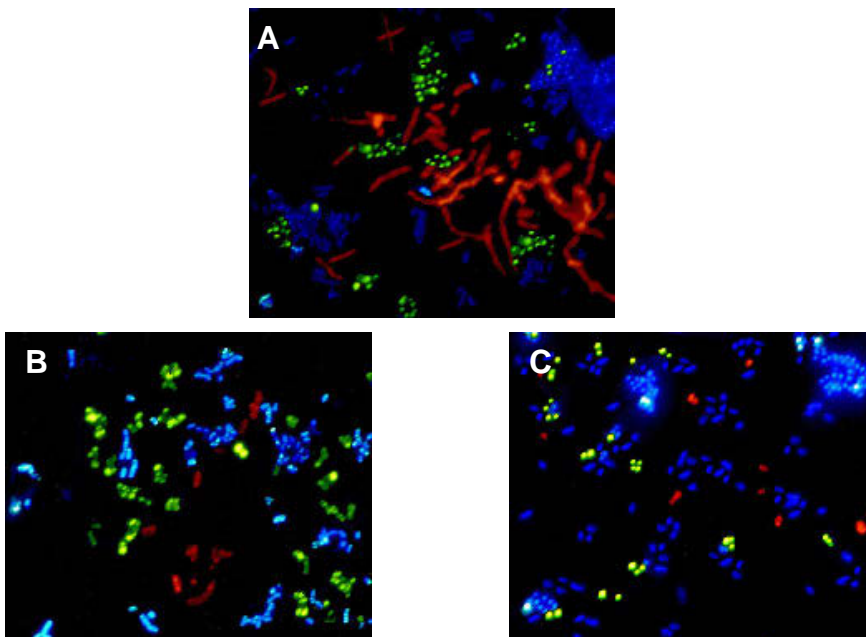


Abbildung 4.18: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *C. globiformis* (grün) und *S. meliloti* (blau) **A:** vor Biozidzugabe; **B:** 4 Stunden nach TEB-Zugabe; **C:** 24 Stunden nach TEB-Zugabe

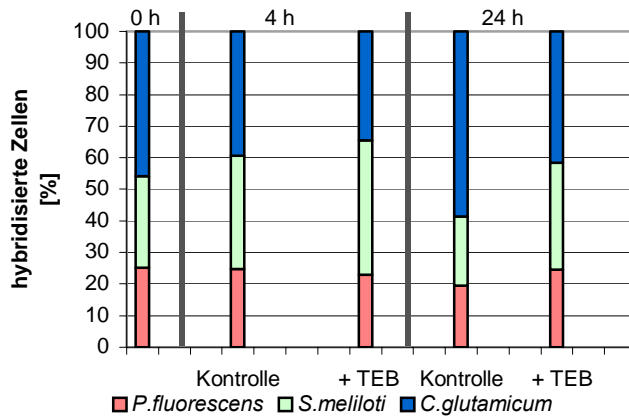
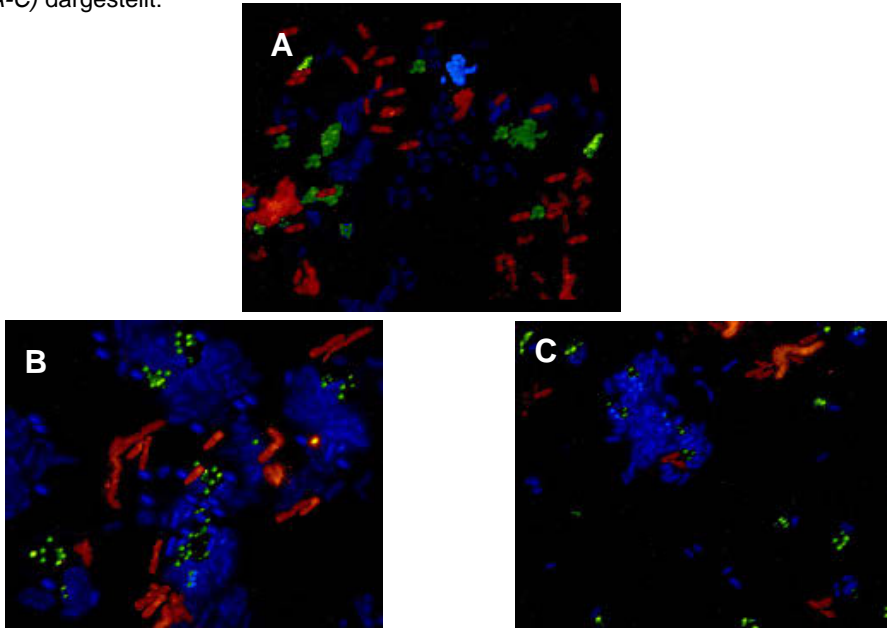


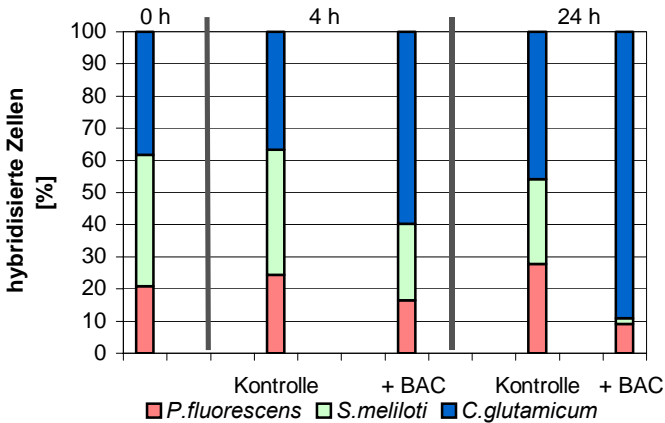
Abbildung 4.19: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von TEB (0), 4 und 24 Stunden nach der TEB-Zugabe (Kontrollen ohne TEB).

Abbildung 4.19 zeigt die Auswirkung von TEB auf *P. fluorescens*, *C. glutamicum* und *S. meliloti*. Nach vier und 24 Stunden Einwirkzeit von TEB hat sich die Zusammensetzung kaum verändert, es gibt nur eine leichte Verschiebung zu Gunsten von *C. glutamicum*.

Die **Auswirkung von BAC** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.20* (A-C) dargestellt:



*Abbildung 4.20: Hybridisierte Zellen von P. fluorescens (rot), C. globiformis (blau) und S. meliloti (grün) A: vor Biozidzugabe; B: 4 Stunden nach BAC-Zugabe; C: 24 Stunden nach BAC-Zugabe.*



*Abbildung 4.21: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von BAC (0), 4 und 24 Stunden nach der BAC-Zugabe (Kontrolle ohne BAC).*

Abbildung 4.21 zeigt die Auswirkung von BAC auf *P. fluorescens*, *C. glutamicum* und *S. meliloti*. vier Stunden nach der Zugabe steigt die Anzahl der *C. glutamicum* Zellen im Verhältnis zu den Anderen an. Nach 24 Stunden verstärkt sich dieser Effekt soweit, dass *S. meliloti* fast gar nicht mehr zu beobachten war und sich auch *P. fluorescens* um 20 % verringerte. Nach 24 Stunden war in der Kontrolle und der BAC belasteten Kultur fast keine Glucose mehr zu finden.

Die **Auswirkung von Atrazin** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.22* (A-C) dargestellt:

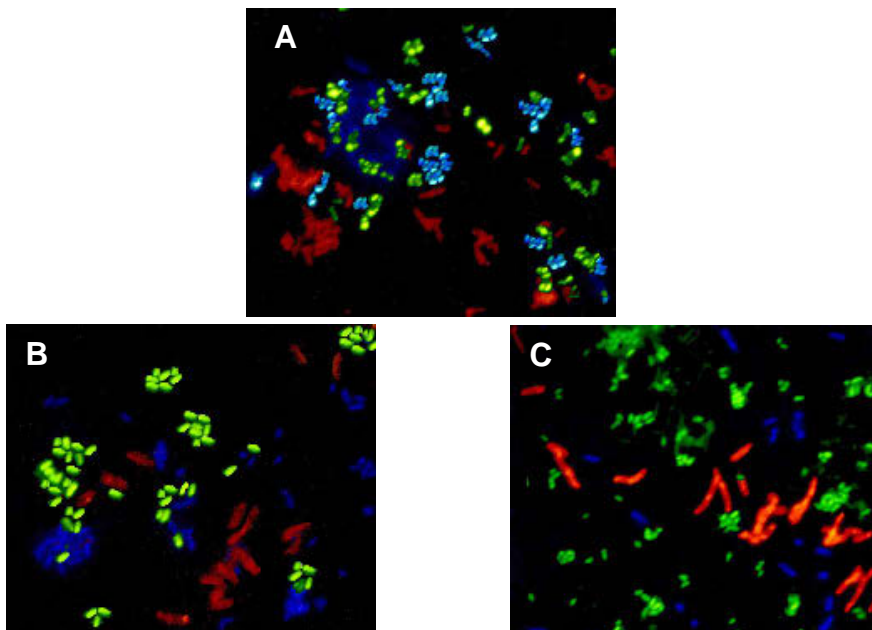


Abbildung 4.22: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *C. globiformis* (blau) und *S. meliloti* (grün) **A**: vor Biozidzugabe; **B**: 4 Stunden und **C**: 24 Stunden nach Atrazin-Zugabe.

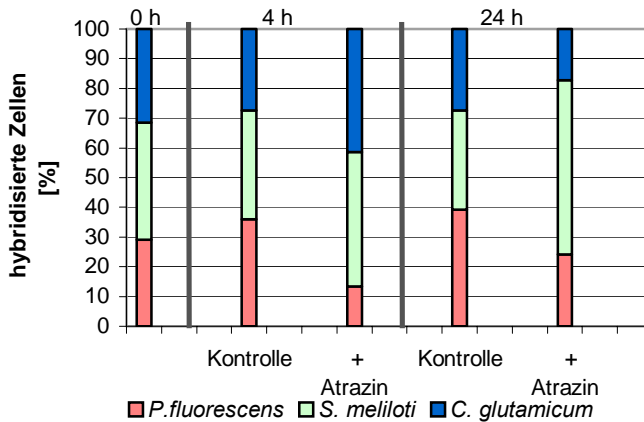


Abbildung 4.23: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von Atrazin (0), 4 und 24 Stunden nach der Atrazinzugabe (Kontrollen ohne Atrazin).

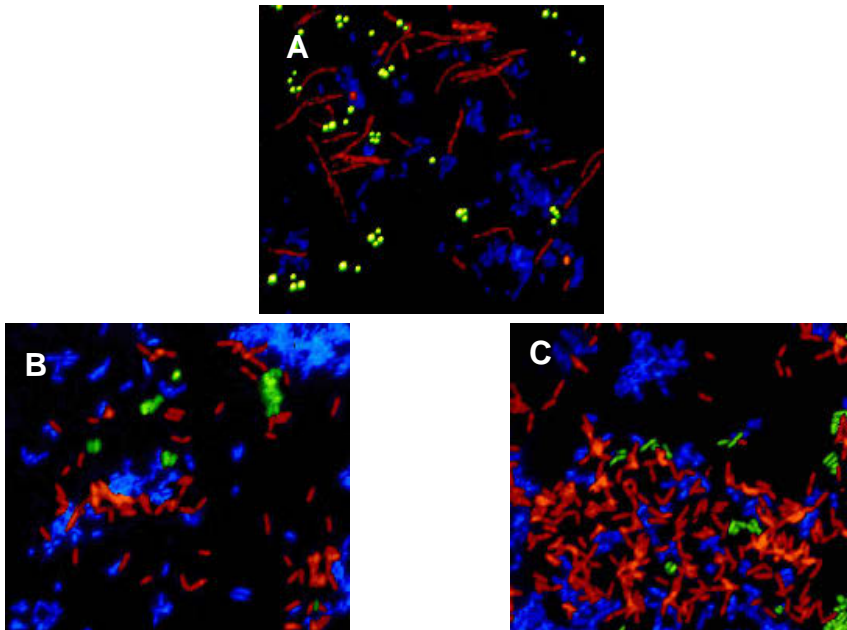
Abbildung 4.23 zeigt die Auswirkung von Atrazin auf *P. fluorescens*, *C. glutamicum* und *S. meliloti*. Vier Stunden nach der Atrazinzugabe ging die Anzahl der *P. fluorescens* Zellen um 20 % zurück, *C. glutamicum* und *S. meliloti* waren nahezu gleich stark in der Probe vertreten. 24 Stunden nach der Zugabe nahm dann auch die Anzahl der *C. glutamicum* Zellen in der Probe stark ab, *S. meliloti* war die vorherrschende Art in der Probe.

Durch die Zugabe von TEB setzte sich in dieser Bakterienzusammensetzung keine bestimmte Art durch. Bei der BAC-Zugabe dominierte dagegen *C. glutamicum* (90 % der Zellen), während nach der Atrazin-Zugabe sich *S. meliloti* (50 % der Zellen) durchsetzte.



**Bakterienkomposition: *P. fluorescens*, *S. meliloti* und *A. globiformis***

Die **Auswirkung von Naphthalin** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.24* (A-C) dargestellt:



*Abbildung 4.24.: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *A. globiformis* (grün) und *S. meliloti* (blau) A: vor Biozidzugabe; B: 4 Stunden und C: 24 Stunden nach Naphthalin-Zugabe.*

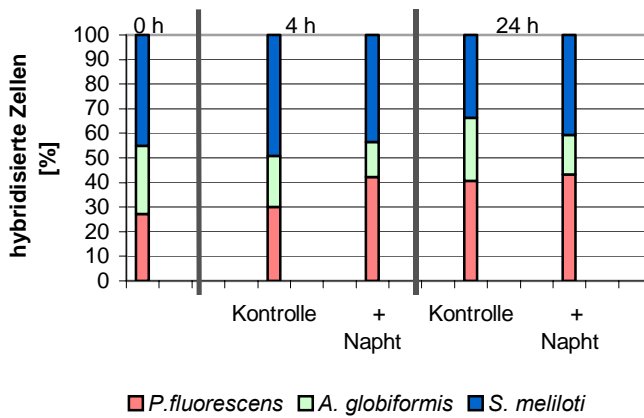


Abbildung 4.25: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von Naphthalin (0), 4 und 24 Stunden nach der Naphthalin-Zugabe (mit Kontrolle ohne Naphthalin).

Abbildung 4.25 zeigt die Auswirkung von Naphthalin auf *P. fluorescens*, *A. globiformis* und *S. meliloti*. Vier Stunden nach der Naphthalin-Zugabe hatten *P. fluorescens* und *S. meliloti* ein ausgewogenes Verhältnis, und die Anzahl von *A. globiformis* Zellen sank auf 20%. Nach 24 Stunden hatte sich an diesem Verhältnis nichts geändert.

Die Zugabe von Naphthalin bewirkte keine starke Verschiebung in der Zusammensetzung.

### Bakterienkomposition: *P. fluorescens*, *A. spec* und *S. meliloti*

Die Auswirkung von Naphthalin auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.26* (A-C) dargestellt:

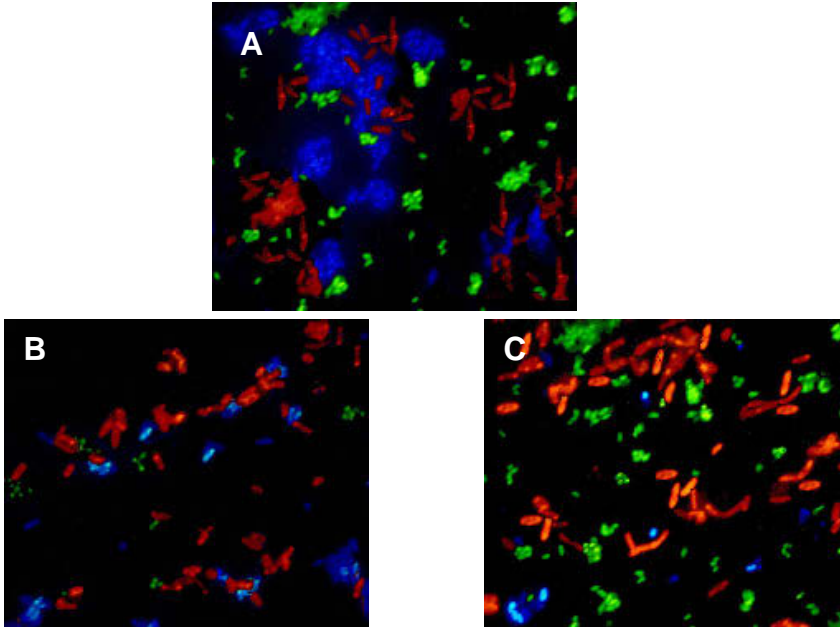


Abbildung 4.26: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *A. sp* (grün) und *S. meliloti* (blau) **A:** vor Biozidzugabe; **B:** 4 Stunden nach Naphthalin-Zugabe; **C:** 24 Stunden nach Naphthalin-Zugabe.

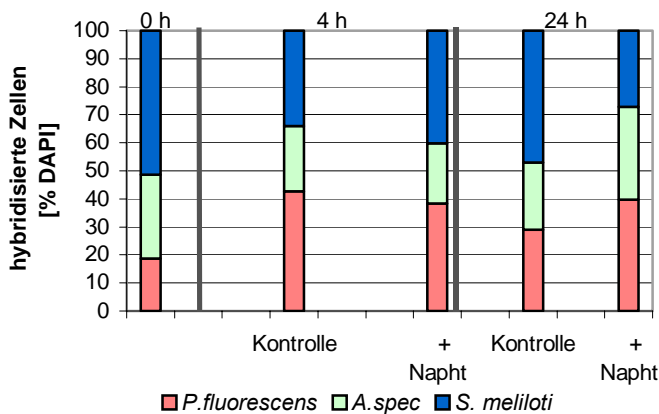


Abbildung 4.27: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von Naphthalin (0), 4 und 24 Stunden der nach Naphthalinzugabe (Kontrolle ohne Naphthalin).

Abbildung 4.27 zeigt die Auswirkung von Naphthalin auf *P. fluorescens*, *A. spec* und *S. meliloti*. Nach vier Stunden zeigte sich noch keine große Verschiebung im Verhältnis. Nach 24 Stunden nahm die Anzahl der *P. fluorescens* Zellen zu und die Anzahl der *S. meliloti* Zellen sank ab.

Die **Auswirkung von 2,4-D** auf die Mischkultur ist in den folgenden *Abbildungen 4.28* (A-C) dargestellt:

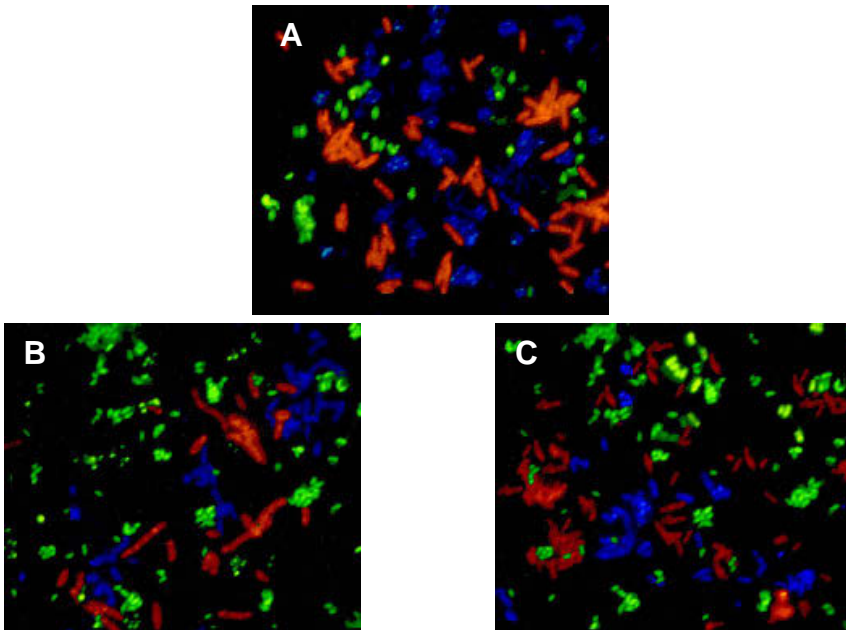


Abbildung 4.28: Hybridisierte Zellen von *P. fluorescens* (rot), *A. sp* (grün) und *S. meliloti* (blau) **A:** vor Biozidzugabe; **B:** 4 Stunden nach 2,4-D-Zugabe; **C:** 24 Stunden nach 2,4-D-Zugabe.

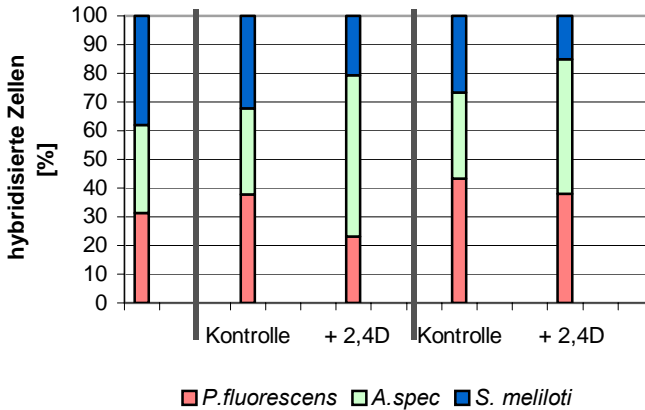


Abbildung 4.29: Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte). Vor Zugabe von 2,4-D (0), nach 4 und 24 Stunden der 2,4-D Zugabe (mit Kontrolle ohne Zugabe).

Abbildung 4.29 zeigt die Auswirkung von 2,4-D auf *P. fluorescens*, *A. spec* und *S. meliloti*. Nach 4 Stunden zeigte sich, dass *A. spec*, eine Bakterienart die 2,4-D abbauen kann, in der Probe am häufigsten zu finden war. Nach 24 Stunden nahm auch die Anzahl der *P. fluorescens* Zellen zu und die Anzahl der *A. spec* Zellen sank etwas ab. Die Anzahl der *S. meliloti* Zellen war bereits nach vier Stunden auf unter 20 % gesunken.

In dieser Mischkultur reagierte *S. meliloti* am empfindlichsten, vor allem durch die Zugabe von 2,4-D (13 % der Zellen), während *P. fluorescens* (40% der Zellen) und *A. spec* (30 – 45% der Zellen) ein ausgewogenes Verhältnis hatten.

Tabelle 4.5: Übersicht über die Änderung der einzelnen Bakterienarten im Vergleich zur Kontrolle. Angaben in Prozent.

| Biozidzugabe | Bakterienart 1        |         | Bakterienart 2       |        | Bakterienart 3        |        |
|--------------|-----------------------|---------|----------------------|--------|-----------------------|--------|
|              | 4 h                   | 24 h    | 4 h                  | 24 h   | 4 h                   | 24 h   |
|              | <i>P. fluorescens</i> |         | <i>C. glutamicum</i> |        | <i>B. subtilis</i>    |        |
| BAC          | + 84,5                | + 41,5  | - 27,9               | - 25,7 | - 73,5                | - 38,3 |
| Naphthalin   | + 14,6                | + 103,9 | - 4,5                | - 58,1 | - 15,6                | - 84,6 |
|              | <i>P. fluorescens</i> |         | <i>C. glutamicum</i> |        | <i>S. meliloti</i>    |        |
| TEB          | - 7,9                 | - 25,6  | - 12,8               | - 29,1 | + 19,6                | + 54,9 |
| Atrazin      | - 62,9                | - 38,6  | + 51,4               | - 36,8 | + 23,3                | + 75,4 |
| BAC          | - 32,4                | - 67,4  | + 62,8               | + 94,3 | - 38,9                | - 93,1 |
|              | <i>P. fluorescens</i> |         | <i>S. meliloti</i>   |        | <i>A. spec</i>        |        |
| Naphthalin   | - 10,4                | + 37,3  | + 17,7               | - 42,1 | - 6,9                 | + 37,8 |
| 2,4-D        | - 38,8                | - 12,4  | - 35,7               | - 43,4 | + 87,6                | + 56,2 |
|              | <i>P. fluorescens</i> |         | <i>S. meliloti</i>   |        | <i>A. globiformis</i> |        |
| Naphthalin   | + 40,4                | + 6,1   | - 11,6               | + 20,1 | - 31,1                | - 36,3 |

Wie aus *Tabelle 4.5* zu erkennen ist, haben sich *P. fluorescens* und *A. spec.* in den Mischkulturen oft durchgesetzt und sind auch nach der Beurteilung aus *Kapitel 4.2.3* die Bakterienarten mit der größten Toleranz gegenüber den Bioziden. Die Anzahl von *A. globiformis* und *B. subtilis*, die auch in Reinkulturen am empfindlichsten waren, sind auch in den Mischkulturen nach der Biozidzugabe am geringsten. *A. spec* setzte sich gegenüber *P. fluorescens* in Anwesenheit von 2,4-D durch. *P. fluorescens* war, wie in *Kapitel 4.2.1* festgestellt wurde, tolerant gegenüber 2,4-D. Dagegen kann *A. spec* 2,4-D abbauen und war somit in der Mischkultur so im Vorteil. Die Glucosekonzentration nahm hier gegenüber der Kontrolle nicht so stark ab (*Tabelle 4.6*). In den Mischkulturen von 20 mM (vor Zugabe) nahm die Glucose über  $17,5 \pm 1$  mM (nach 4 Stunden) bis zu  $5 \pm 0,4$  mM in den Kontrollen ab. Im Verhältnis dazu nahm die Glucosekonzentration in den Mischkulturen, in denen Bakterienarten waren, die das Biozid abbauen bzw. zu verwerten konnten, nicht so stark ab.

Tabelle 4.6: Abnahme der Glucosekonzentration vor Biozidzugabe, und 4 und 24 Stunden nach der Zugabe. Angaben in Prozent wurden auf die Kontrolle bezogen.

| Kultur  | Biozid     | vor<br>Zugabe | nach 4<br>Stunden | nach 24<br>Stunden |
|---|------------|---------------|-------------------|--------------------|
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ;<br><i>B. subtilis</i>  | Naphthalin | 100           | + 12,1            | - 52,9             |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ;<br><i>B. subtilis</i>  | BAC        | 100           | + 9,2             | +34,8              |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ;<br><i>S. meliloti</i>  | TEB        | 100           | + 0,6             | - 66,7             |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ;<br><i>S. meliloti</i>  | Atrazin    | 100           | - 0,8             | + 21,4             |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>C. glutamicum</i> ;<br><i>S. meliloti</i>  | BAC        | 100           | - 11,4            | - 80               |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>S. meliloti</i> ; <i>A. spec.</i>          | Naphthalin | 100           | + 65,4            | - 33,2             |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>S. meliloti</i> ; <i>A. spec.</i>          | 2,4- D     | 100           | + 46,3            | + 91,6             |
| <i>P. fluorescens</i> ; <i>S. meliloti</i> ;<br><i>A. globiformis</i> | Naphthalin | 100           | + 65,4            | + 33,2             |

## 4.4 Auswirkung von unterschiedlicher Kontamination auf den natürlichen Boden

Um die Lebensraumfunktion von Bodenmikrobiozöosen zu erfassen, wurden zwei unbelastete Böden mit Bioziden versetzt und nach unterschiedlicher Lagerzeit (null und drei Wochen) untersucht. Die Auswirkungen auf die gesamten Bodenorganismen wurde mittels der klassischen Bestimmung der Atmungskurven ermittelt. Parallel hierzu wurde mit Hilfe der FISH-Methode die Änderung in der Zusammensetzung der Bodenbakterien untersucht.

### 4.4.1 Bestimmung des Wirkungsbereiches der eingesetzten Biozide mittels Messung von Atmungskurven

Es sollte die Auswirkung von BAC und TEB auf die Bodenmikroflora bestimmt werden. Dazu wurde zunächst durch Messung der Bodenatmung der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem das Auftreten von Wirkung wahrscheinlich ist. Der Boden wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Stoffe (*siehe Tabelle 4.7*) in einer logarithmischen Reihe, einschließlich einer Blindprobe (d.h. ohne Biozid) in mindestens doppelter Ausführung untersucht.

*Tabelle 4.7: Eingesetzte Konzentrationen von TEB und BAC zur Bestimmung des Wirkungsbereiches.*

|                           | TEB1  | TEB2 | TEB3 | TEB4 | TEB5 | BAC1 | BAC2 | BAC3 | BAC4  |
|---------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Konz. im Boden<br>[µg/ g] | 0,128 | 4    | 12,5 | 40   | 400  | 60   | 600  | 6000 | 19200 |

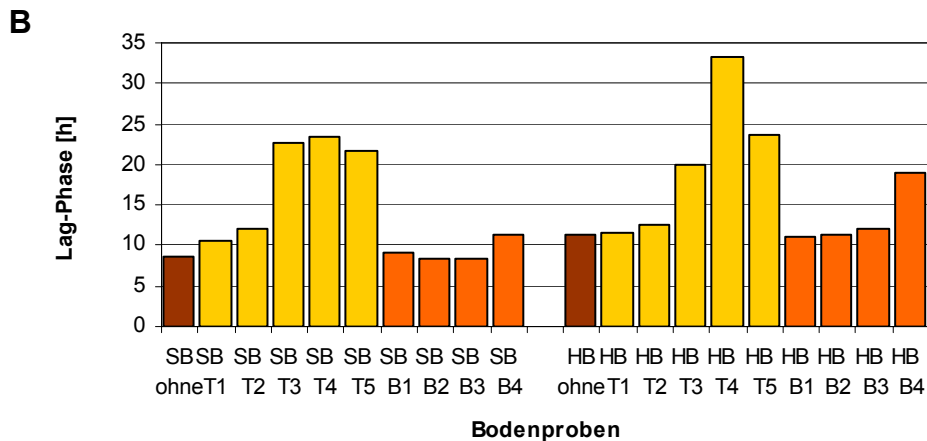
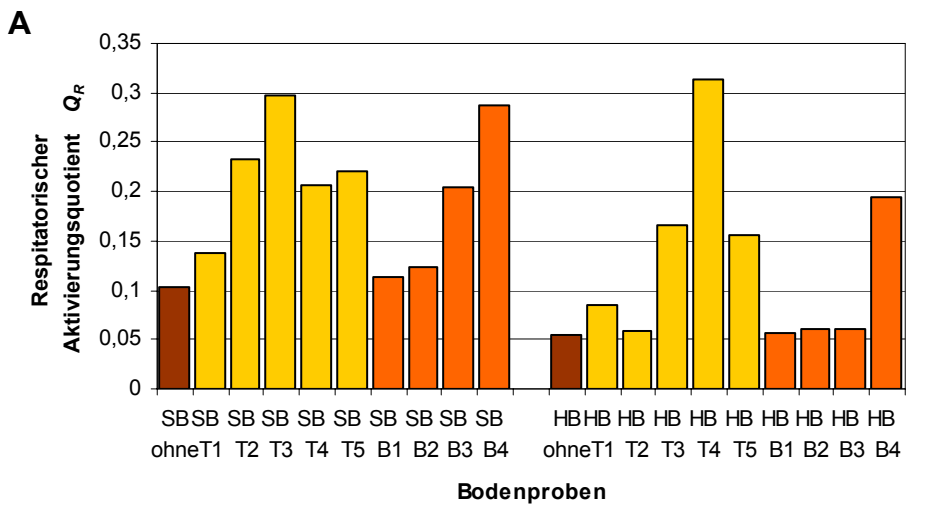
Für BAC wurden  $600 \text{ mg kg}^{-1}$  als mittlere Konzentration gewählt, da dieses die Hemmkonzentration für Mikroorganismen im Sediment ist (ISO 171 55). Für TEB liegt die Rattensterblichkeit bei  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ . Da die Löslichkeitsgrenze in Wasser von TEB bei  $3,2 \text{ mg l}^{-1}$  liegt (höchst mögliche Menge im Boden:  $0,128 \text{ µg g}^{-1}$ ), wurde zur Vermeidung von größeren Mengen von Lösungsmitteln  $400 \text{ µg g}^{-1}$  als höchste Konzentration gewählt. Die unterschiedlichen Lösungsmittel und deren Auswirkungen wurden separat getestet.

Nach der DIN ISO 17155 zeigen verunreinigte Böden oft höhere Atmungsquotienten  $Q_R$ , längere Lag-Phasen (Zeit ab Substratzugabe bis Anfang des exponentiellen Wachstum) und längere Zeiten bis zum Peakmaximum ( $t_{\text{Peakmax}}$ ). Die Werte für Verunreinigungen liegen nach der Norm bei:



|               |   |      |
|---------------|---|------|
| $Q_R$         | > | 0,3  |
| Lag           | > | 20 h |
| $t_{Peakmax}$ | > | 50 h |

Zur Bestimmung der Konzentrationen, die für die weiteren Versuche genommen werden sollten, wurde der respiratorische Aktivierungsquotient ( $Q_R$ ) (Abbildung 4.30 A), die Lag-Phase (Abbildung 4.30 B) und die Zeit bis zum Peakmaximum (Abbildung 4.30 C) im Vergleich mit der unbehandelten Probe betrachtet.



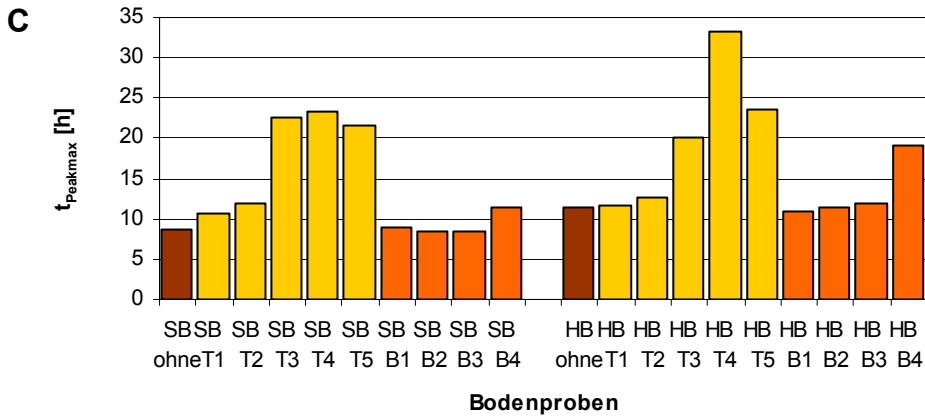


Abbildung 4.30: Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen von TEB (T) und BAC (B) auf den **A**: respiratorischen Aktivierungsquotient, **B**: die Lag-Phase und **C**: der Zeitspanne bis zum Auftreten des Peakmaximum in zwei unterschiedlichen Böden (sandiger Boden (SB) und humusreicher Boden (HB)).

Tabelle 4.8: Übersicht zur Auswirkung der Biozidkonzentrationen auf  $Q_r$ , der Lag-Phase und Peakmaximum im humusreichen Boden (HB) und sandigem Boden (SB). 4 zeigt die stärkste Auswirkung an, die zu 0 hin abnimmt = schwächste Auswirkung.

|    |             | TEB1 | TEB2 | TEB3 | TEB4 | TEB5 | BAC1 | BAC2 | BAC3 | BAC4 |
|----|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| HB | $Q_R$       | 0    | 3    | 4    | 1    | 2    | 0    | 1    | 2    | 4    |
|    | Lag-Phase   | 0    | 1    | 2    | 4    | 3    | 1    | 1    | 3    | 4    |
|    | Peakmaximum | 0    | 1    | 2    | 4    | 3    | 0    | 1    | 3    | 4    |
| SB | $Q_R$       | 0    | 3    | 4    | 1    | 2    | 0    | 1    | 3    | 4    |
|    | Lag-Phase   | 0    | 1    | 3    | 4    | 2    | 3    | 1    | 1    | 4    |
|    | Peakmaximum | 0    | 1    | 3    | 4    | 2    | 3    | 1    | 0    | 4    |

Die jeweilige Konzentration mit der größten und die mit der geringsten Auswirkung (Tabelle 4.8) wurden für die folgenden Versuche ausgewählt:

Geringste Auswirkung: BAC 2 ( $600 \mu\text{g g}^{-1}$ ) und TEB 1 ( $0,128 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Größte Auswirkung: BAC 4 ( $19200 \mu\text{g g}^{-1}$ ) und TEB 4 ( $40 \mu\text{g g}^{-1}$ )

Die hohe Konzentration TEB 4 wurde in einem Aceton-Wasser (1:4) Gemisch gelöst, welches keine nennenswerte Auswirkung auf die Atmungskurve hatte.

#### 4.4.2 Untersuchung der Atmungskurven mit ADC 2250 Gasanalysator

Es wurde für die Überprüfung der Wirkung von BAC und TEB auf die Bodenmikroflora zwei verschiedene Böden verwendet.

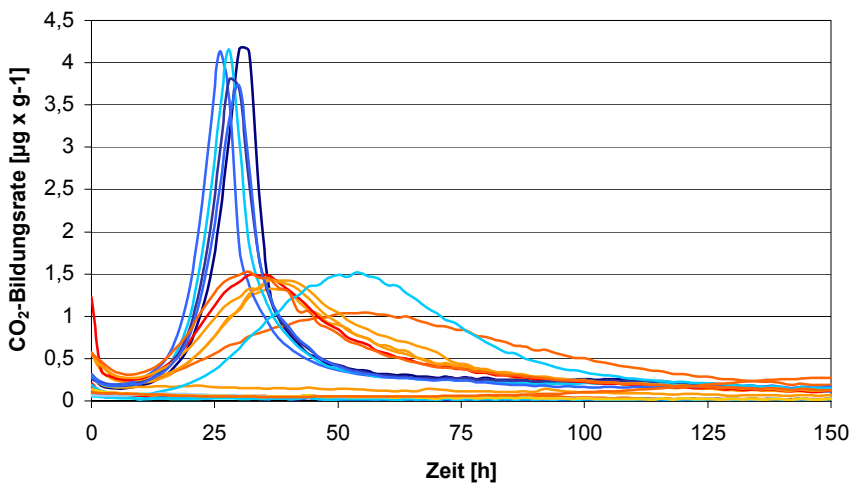
- Ein humusreiches Bodengemisch (HB) aus dem *Kapitel 3. 1.*
- Ein sandiger Berliner Gartenboden (SB).

Den vorbereiteten Böden wurden, wie in *Kapitel 3.5* beschrieben, vor dem Versuchsstart die unterschiedlichen Konzentrationen (festgelegt in *Kapitel 4.4. 1*) der Biozide zugefügt. Die Zugabe von reinem Aqua dest und ein Aceton-Wasser Gemisch (1:4) dienen als Kontrollen. Die Befüllung des Bodenatmungsgerätes (*Abbildung 4.31*) erfolgte wie in *Kapitel 3.5* beschrieben. Für die Untersuchung der Kurzzeitwirkung und für die Untersuchung der Langzeitwirkung (*siehe Kapitel 3.5*), wurde von den Bodenproben nach Aufnahme der Atmungskurven die Dehydrogenase bestimmt und die FISH-Analyse durchgeführt.



Abbildung 4.31: Aufbau zur Messung der Bodenatmungskurven mit der Gaseinheit und dem 2250 GAS Analyser (FA ADC)

Der Verlauf der Atmungskurve ist in *Abbildung 4.32* exemplarisch dargestellt. Die blauen Linien beschreiben die Atmung des sandigen Gartenboden (SB) und die rötlichen Linien die Atmung des humusreicheren Boden (HB). Humusreichere Böden zeigen immer flachere Kurven als sandigere Böden, da hier die Mikroorganismen von Anfang an mehr Material zum Atmen zur Verfügung haben. In sandigen Böden verwenden die Mikroorganismen direkt das Substrat, Atmungskurven steigen dadurch schneller und sind damit steiler und höher. Die verzögerte blaue Linie, sowie auch die flache rote Linie, zeigt den Atmungskurvenverlauf eines kontaminierten Bodens.



*Abbildung 4.32: Atmungskurven von HB-Boden (rötliche Linien) und SB-Boden (blaue Linien). Gezeigt ist die CO<sub>2</sub>- Bildungsrate pro Gramm Boden in µg (n = 3 pro Messpunkt). Die relativ geraden Linien am unteren Rand zeigen die Basalatmung der Böden.*

Die Ergebnisse der sofort untersuchten Proben (Kurz) wurden mit den Proben verglichen, die drei Wochen bei 28,5 °C (Lang) inkubiert wurden. Dabei wurde zur Beurteilung der Auswirkung von Bioziden auf die Bodenatmung alle messbaren Parameter (siehe *Kapitel 3.5*) betrachtet. Als Bezugsgrößen dienten die jeweiligen Werte der unbehandelten Probe.

**Respiratorischer Aktivierungsquotient [ $Q_R$ ] und Lag-Phase [h]**

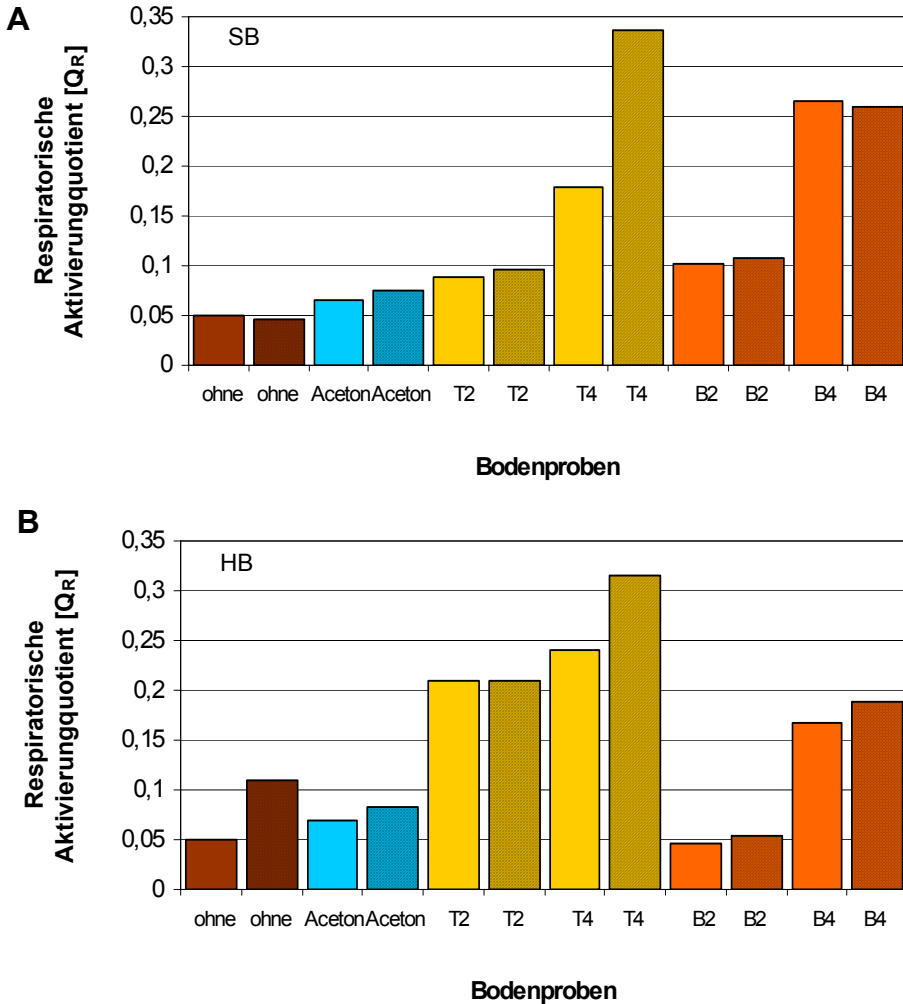


Abbildung 4.33: Respiratorischer Aktivierungsquotient sofort nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe und nach 3 Wochen Inkubation (strukturiert). Im **A**: Gartenboden, und **B**: im humusreichen Boden.

Je größer der respiratorische Aktivierungsquotient  $Q_R$  ist, desto toxischer war die Wirkung der Biozide. Im Vergleich mit den Kontrollen (ohne Biozide; mit Aceton) kann man erkennen, dass der sandige Boden (HB) sofort nach der Zugabe nur auf die höhere BAC (B4) Konzentration reagierte und eingeschränkt auch auf die höhere TEB (T4) Konzentration.

Nach dreiwöchiger Einwirkung der Biozide zeigte die hohe TEB-Konzentration einen Anstieg der toxischen Wirkung um fast 50 % zum Kurzzeitversuch, während sich bei allen anderen Bioziden die Auswirkung vom Kurzzeitversuch zum Langzeitversuch kaum änderte. Der humusreiche (HB) Boden reagierte auch sofort nach der Zugabe eindeutig (dreifacher Wert) auf die höhere BAC-Konzentration (B4), außerdem stieg der  $Q_R$  schon bei der niedrigen TEB (T2) Konzentration und der hohen TEB- Konzentration an (vierfacher bzw. fünffacher Wert). Nach drei Wochen Einwirkzeit wurde nur der  $Q_R$  bei T4 um 30 % größer, bei allen Anderen blieb der Wert zum Kurzzeitversuch konstant.

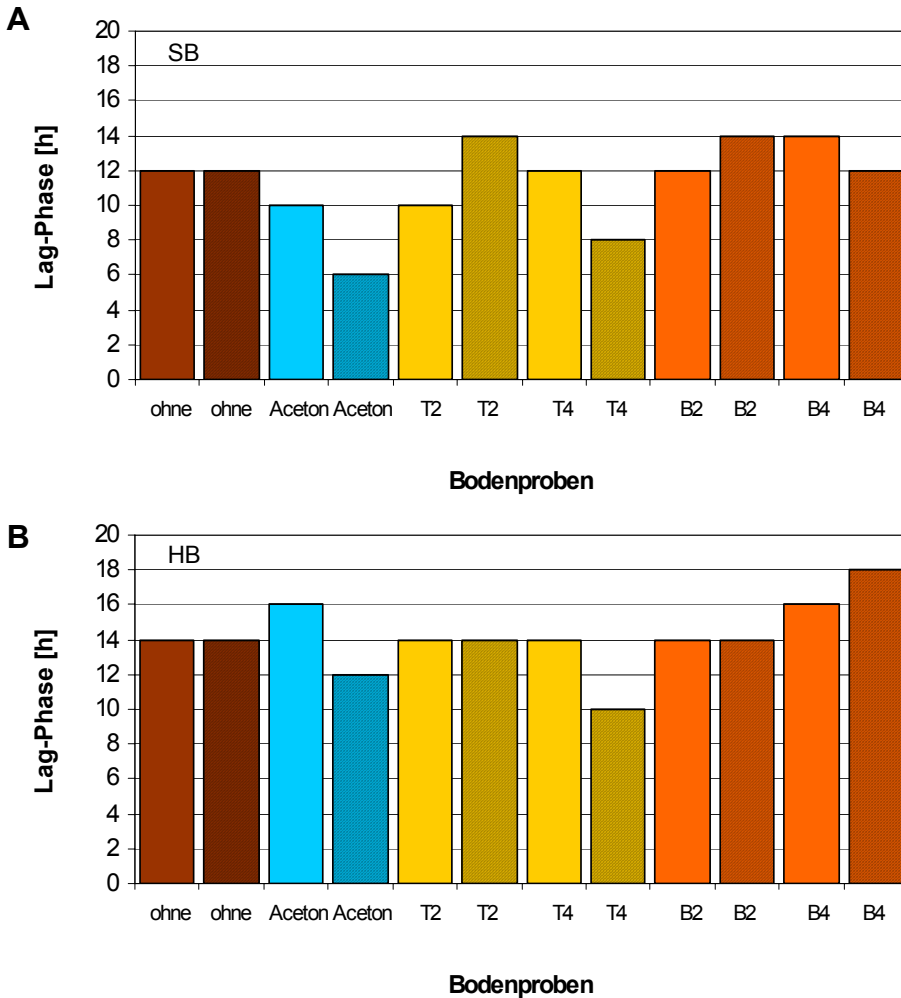
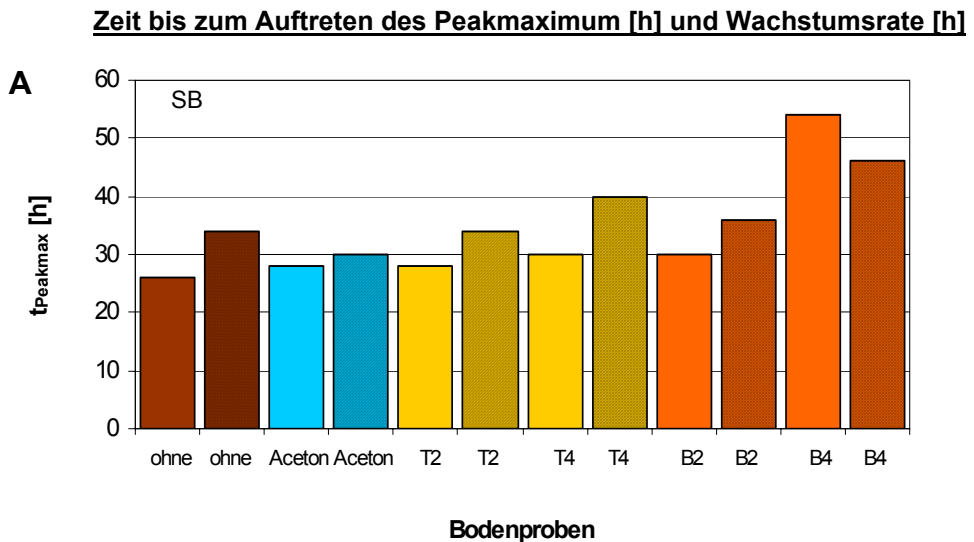


Abbildung 4.34: Lag-Phasen sofort nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe und nach 3 Wochen Inkubation (strukturiert). Bei **A**: dem Gartenboden, und **B**: dem Humusboden.

Je größer die Lag-Phase ist, also je länger die Zeit bis zum Einsetzen des Wachstums ist, um so toxischer war die Wirkung auf die Mikroorganismen im Boden. Die Auswirkungen auf die Lag-Phase war bei beiden Böden nicht sehr ausgeprägt. Der humusreichen Boden (HB) zeigte beim Kurzzeitversuch nur nach Zugabe der hohen BAC-Konzentration (B4) eine Verlängerung der Zeit um 20 %, die beim Langzeitversuch weiter ausgedehnt war (30 %). Die Zugabe der niedrigen BAC (B2) Konzentration im sandigen Boden (SB) bewirkte erst nach drei Wochen Einwirkzeit eine Verlängerung der Lag-Phase um 15 %, das gleiche gilt auch für die niedrige TEB (T2)- Konzentration. Die Verlängerung der Lag-Phase durch die Biozide war im allgemeinen beim humusreichen Boden (HB) nicht so ausgeprägt wie im Gartenboden (SB) Boden.



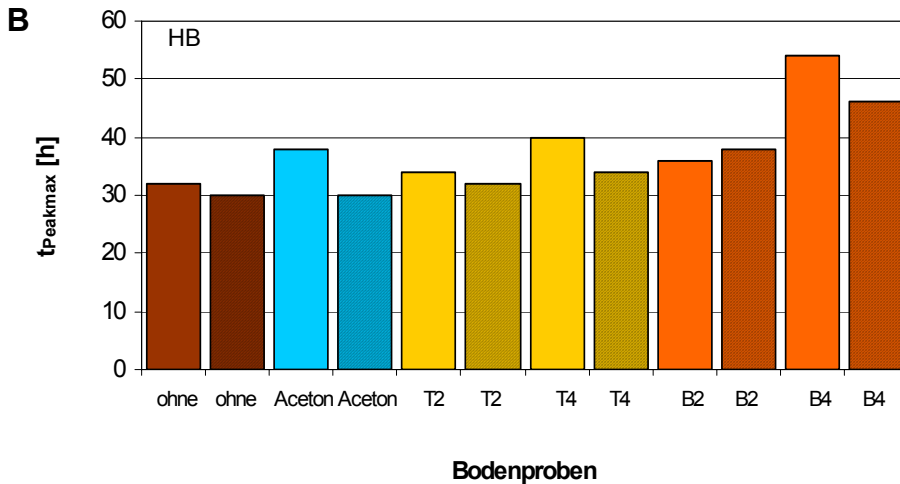


Abbildung 4.35: Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums sofort nach TEB, BAC, Aceton - Zugabe und nach 3 Wochen Inkubation (strukturiert). Beim **A**: sandiger Boden (HB), und **B**: humusreicher Boden (HB).

Je länger die Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums (bis zum Zeitpunkt des höchsten  $\text{CO}_2$ -Ausstosses) war, um so toxischer waren die Auswirkungen der Biozide. Auf die Atmung im HB- Boden wirkten die niedrige BAC-Konzentration (B2), die hohen BAC- und TEB-Konzentrationen (B4, T4) sofort nach der Zugabe toxisch (Verlängerung der Zeit um 20 % (T4; B2) bzw. 50 % (B4) zur Kontrolle). Durch Einwirken der hohen TEB-Konzentration über drei Wochen stieg diese Wirkung noch an (auf 30 %). Dagegen verringerte sich die Zeit bis zum Peakmaximum wieder etwas nach dem Einwirken der hohen BAC- Konzentration.

Die gleiche Auswirkung spiegelte sich auch bei dem HB- Boden wieder: Erst verlängerte sich die Zeit durch Zugabe der hohen BAC-Konzentration und nach dreiwöchiger Einwirkung ging diese Wirkung wieder etwas zurück. Ansonsten verlängerte sich die Zeit nur durch die hohe TEB- Konzentration um 20 % sofort nach Zugabe.



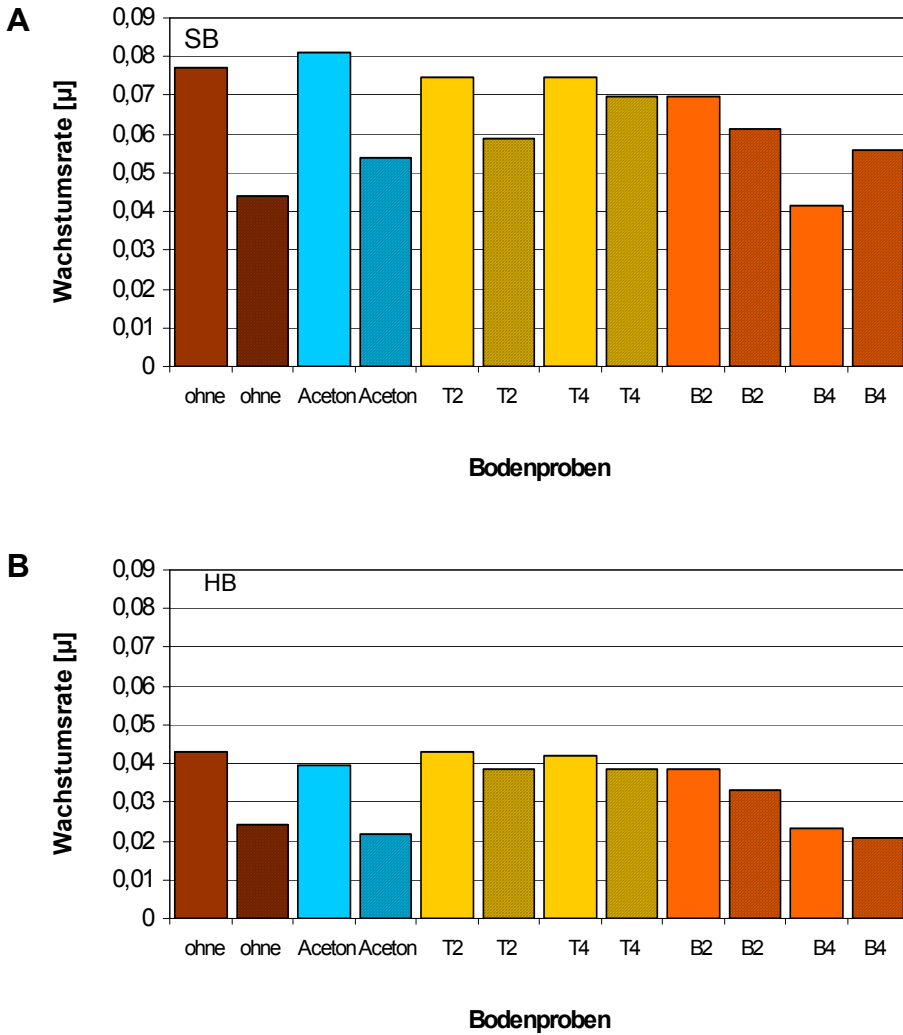


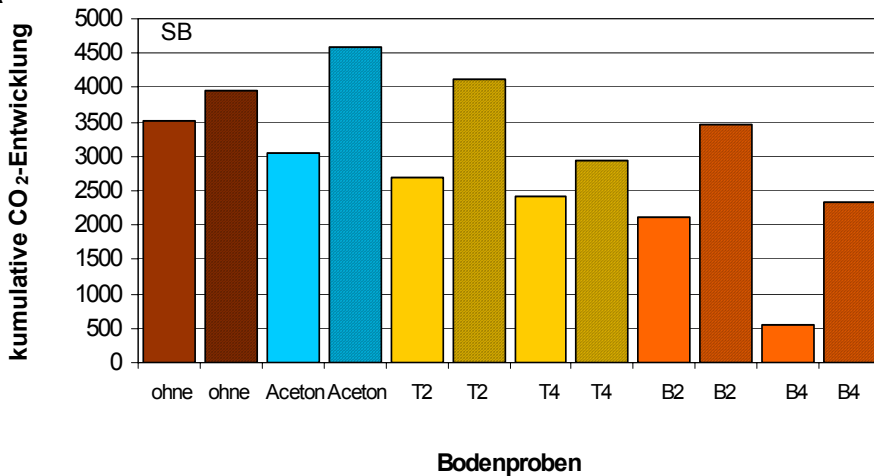
Abbildung 4.36: Wachstumsrate bzw. Steigung der Atmungskurven sofort nach TEB, BAC, Aceton - Zugabe und nach 3 Wochen Inkubation (strukturiert). In **A**: einem sandigen Boden, und **B**: einen Humusreichen Boden.

Je flacher die Atmungskurve ist, also je kleiner die Steigung bzw. der Wert ist, um so größer ist die toxische Auswirkung. Sofort nach der Zugabe der Biozide konnte bei beiden Böden (HB/SB) nur durch die hohe BAC (B4)-Konzentration eine Auswirkung (40 – 50% Ver-

ringerung) beobachtet werden, die aber nach dreiwöchigem Einwirken keine Auswirkung mehr zeigte. Ansonsten konnten keine eindeutige Auswirkungen beobachtet werden.

**Kumulative CO<sub>2</sub>-Entwicklung**

**A**



**B**

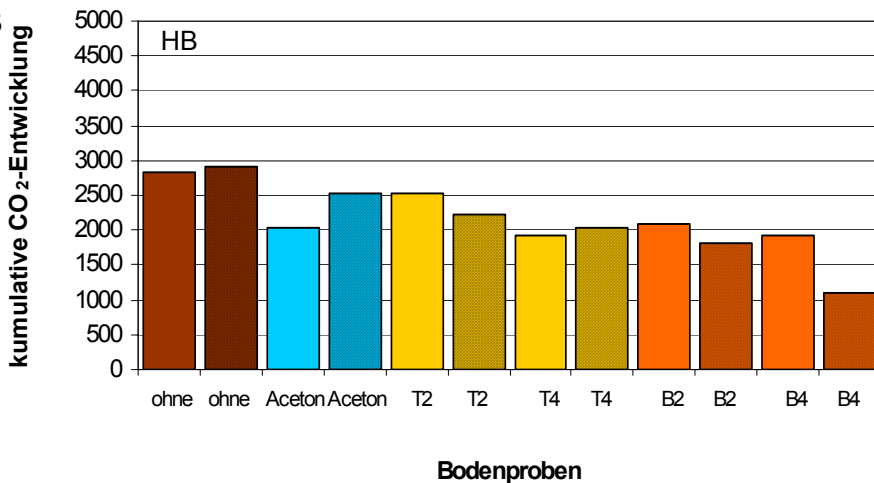


Abbildung 4.37: Kumulative CO<sub>2</sub>- Entwicklung sofort nach TEB, BAC, Aceton - Zugabe und nach 3 Wochen Inkubation (strukturiert). In **A**: einem Gartenboden, und **B**: einem Humusreichen Boden.

Die kumulative CO<sub>2</sub>-Entwicklung ( $C_R$ ) beschreibt die Fläche unterhalb der Atmungskurve vom Zeitpunkt der Substratzugabe bis zum Auftreten des Peakmaximum der Kontrolle. Die Fläche der Kontrolle wurde über die Kurven der Proben gelegt. Die Schnittmenge der Flächen bis zum Peakmaximum der Kontrolle ergab  $C_R$ . Je kleiner der Wert (bzw. die Fläche) war, desto toxischer war die Auswirkung.

Auf die Atmung des sandigen Bodens (SB) hatte die hohe BAC-Konzentration (B4) sofort nach der Zugabe die größte Auswirkung (85 % Abnahme), während im Langzeitversuch diese Auswirkung wieder zurück ging (40 % Abnahme). Die niedrige BAC-Konzentration verhielt sich ähnlich, nur in geringerem Ausmaß (Kurzeittest: Abnahme um 40 %; Langzeittest: Abnahme um 11 %). Die höhere TEB (T4) Konzentration wirkte sich sofort (Abnahme um 20 %) und nach drei Wochen Einwirkung (Abnahme um 40 %) negativ aus.

Die Atmung des sandigen (SB) Bodens wurde durch alle Biozide beeinflusst. Die hohe TEB- Konzentration und die niedrige BAC-Konzentration zeigten keine unterschiedliche Auswirkung durch die unterschiedliche Einwirkzeit. Die niedrige TEB- und die hohe BAC-Konzentration bewirkte nach drei Wochen Einwirkung eine Verstärkung der Wirkung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es durch die Zugabe der hohen BAC-Konzentration bei beiden Böden immer eine toxische Auswirkung gab, die durch die längere Einwirkzeit wieder verringert wurde. Diese konnte durch die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden bestätigt werden (*Tabelle 4.9*). Die niedrige BAC-Konzentration zeigte kaum eine Auswirkung auf die beiden Böden, und wenn, dann nur sofort nach Zugabe der Biozide. Die hohe TEB-Konzentration zeigte bei beiden Böden eine toxische Auswirkung, die sich beim sandigen (SB) Boden durch die längere Einwirkzeit noch verstärkt und beim humusreicheren (HB) Boden unverändert blieb. Die niedrige TEB-Konzentration zeigte keine Auswirkung auf den sandigen (SB) Boden, allerdings führte sie zu einer leichten Verringerung auf die Atmung des humusreicheren (HB) Bodens. Das Aceton-Wasser Gemisch zeigte keine Auswirkung auf die Bodenatmung. Diese Ergebnisse konnten auch durch die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität bestätigt werden.

Tabelle 4.9: Dehydrogenaseaktivität im Boden (Humusreicher HB und sandiger SB) nach 0 und 3 Wochen. Angabe der Mittelwerte ( $n = 3 \pm SD$ ) in  $\mu\text{g TPF/g TM Boden}$

|             | HB                |                   | SB                |                   |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | 0                 | 3                 | 0                 | 3                 |
| Unbehandelt | 314,49 $\pm$ 5,76 | 351,8 $\pm$ 4,6   | 477,53 $\pm$ 8,78 | 467,51 $\pm$ 6,2  |
| Aceton      | 361,97 $\pm$ 2,6  | 374,32 $\pm$ 5,9  | 512,5 $\pm$ 4,51  | 513,06 $\pm$ 4,76 |
| TEB2        | 430,43 $\pm$ 2,72 | 489,86 $\pm$ 3,5  | 517,07 $\pm$ 4,75 | 75,659 $\pm$ 3,95 |
| TEB4        | 426,02 $\pm$ 5,07 | 273,8 $\pm$ 2,13  | 435,56 $\pm$ 4,31 | 497,3 $\pm$ 5,77  |
| BAC2        | 253,27 $\pm$ 1,96 | 236,78 $\pm$ 3,72 | 220,03 $\pm$ 1,78 | 462,59 $\pm$ 2,94 |
| BAC4        | 42,89 $\pm$ 2,49  | 86,8 $\pm$ 1,73   | 29,52 $\pm$ 7,52  | 20,63 $\pm$ 4,79  |

#### 4.4.3 Etablierung einer Methode zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Bodenbakterien

Um Mikroorganismen effizient aus den Bodenhabitaten zu lösen, und störende Signale durch Autofluoreszenz zu minimieren, wurden verschiedene Methoden (siehe Kapitel 3.8.5) ausprobiert. Der Versuch, das Fluoreszenzsignal durch Chloramphenicol zu verbessern, führte nicht zu einer besseren Bakterienausbeute.

Daher wurden verschiedene Methoden ausprobiert, die Mikroorganismen von den Bodenbestandteilen zu trennen, um den Anteil an Humusbestandteilen zu verringern, und um Bakterien anzureichern. Der Boden wurden in der Regel 40 min bei 28 °C und 156 Upm extrahiert. Die Vorgehensweise ist in *Abbildung 4.38* schematisch dargestellt:

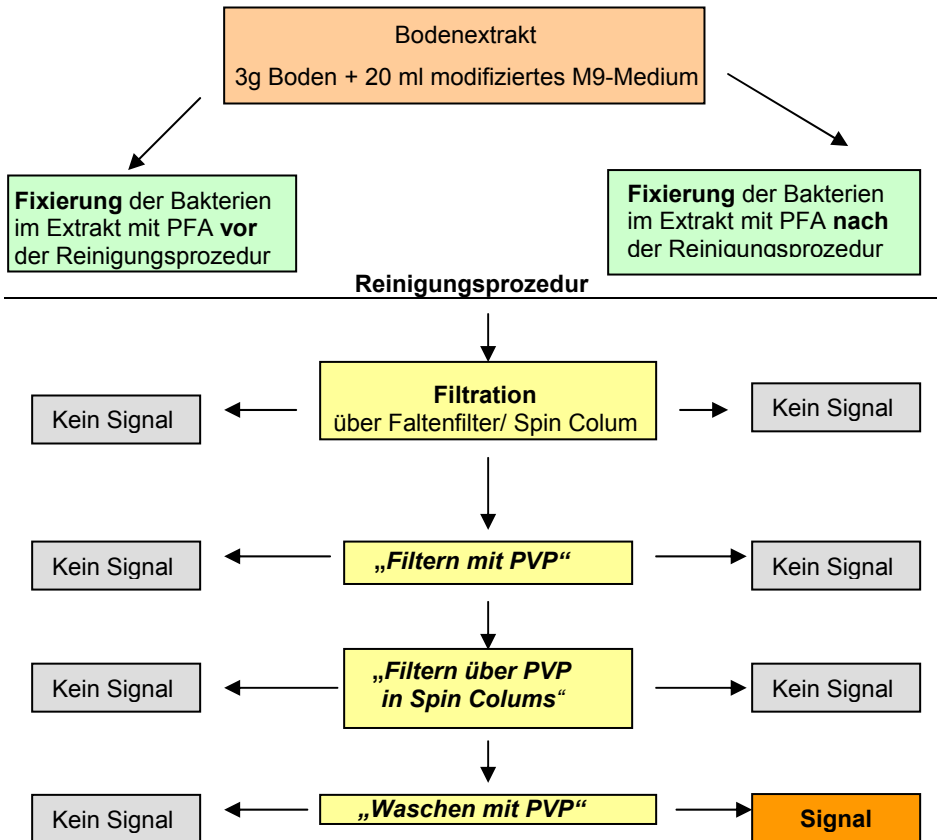


Abbildung 4.38: Schematische Darstellung der Verfahren zur Reinigung der Extrakte und Gewinnung von Fluoreszenzsignal der Bakterienzellen aus dem Boden. (PFA = Paraformaldehyde; PVP = Polyvinylpyrrolidon).

Die letzte Variante erwies sich am effektivsten und wurde noch weiter modifiziert. Durch die Bestimmung der KBE (koloniebildende Einheiten) wurde zunächst die optimale Schütteldauer festgelegt. *Abbildung 4.39* verdeutlicht, dass sich 40 min als optimale Zeit erwiesen.

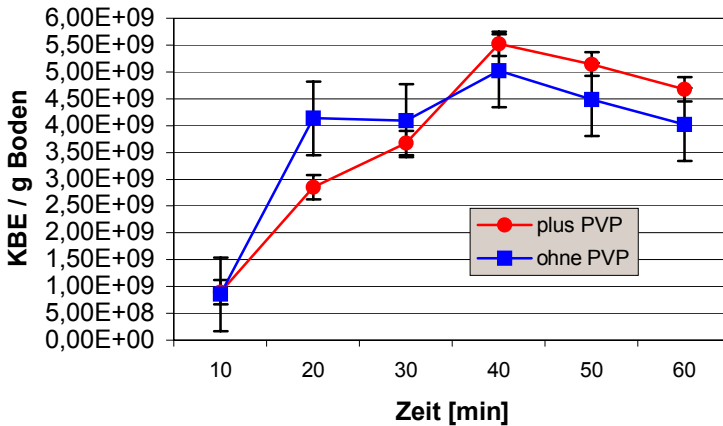


Abbildung 4.39: Koloniebildende Einheiten pro Gramm Boden ( $n = 3$ ) in Abhängigkeit von der Schütteldauer. **Plus PVP** = TE- Puffer mit PVP wurde zur Bodenextraktion hinzugefügt, und **ohne PVP** = nur TE Puffer wurde zur Bodenextraktion dazugegeben.

Danach wurde PVP mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden (K30 und K90) ausprobiert. Die Ausbeute erwies sich mit PVP 90 günstiger als mit PVP K30 (Abbildung 4.40). Darauf hin wurden unterschiedliche Konzentrationen von 10 - 35 mg PVP pro  $\text{ml}^{-1}$  TE- Puffer ausprobiert. Abbildung 4.41 zeigt, dass mit einer Konzentration von 35 mg  $\text{ml}^{-1}$  die beste Ausbeute zu erwarten ist.

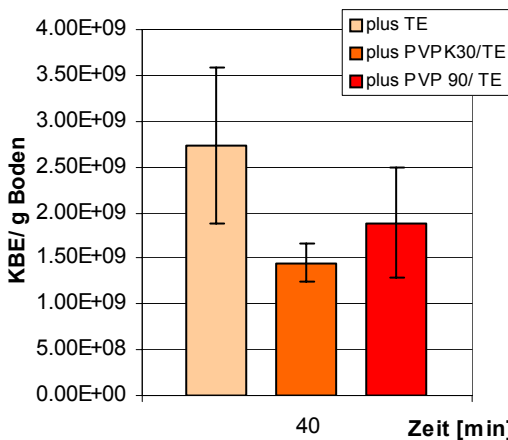


Abbildung 4.40: KBE pro Gramm Boden nach 40 min Extraktion mit PVP K 30 und K90 ( $n = 6$ )

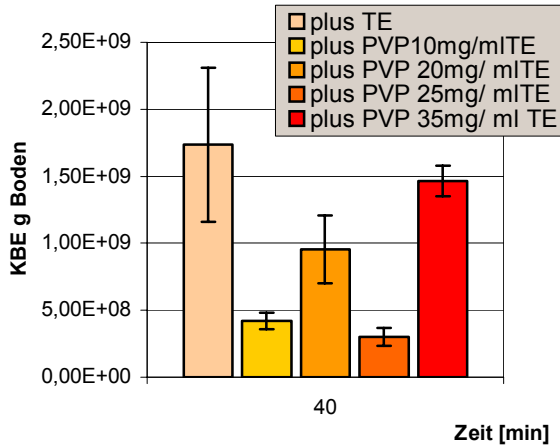


Abbildung 4.41: KBE pro Gramm Boden nach 40 min Extraktion bei unterschiedlicher Konz. von PVP K90 (n = 6)

Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Menge von PVP in der Extraktionslösung schon entscheidend ist. Mit  $35 \text{ mg ml}^{-1}$  war unter den Versuchsbedingungen allerdings die maximale Löslichkeit von PVP 90 erreicht, die Menge PVP in der Extraktionslösung konnte nur durch Erhöhung des Volumens des PVP/TE- Puffers erhöht werden. Allerdings war durch Zugabe von 3 ml die Effizienz am besten (Abbildung 4.42). Durch Nachspülen oder Ausdrücken der Filter konnte die Bakterienausbeute nicht erhöht werden.

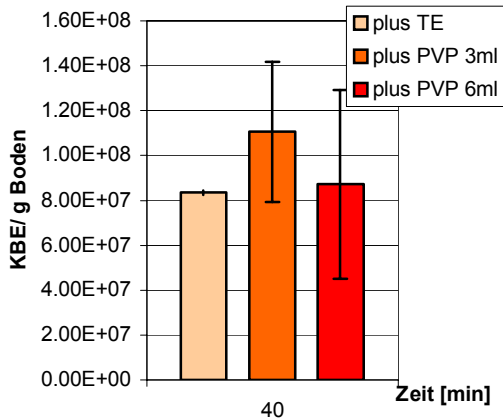


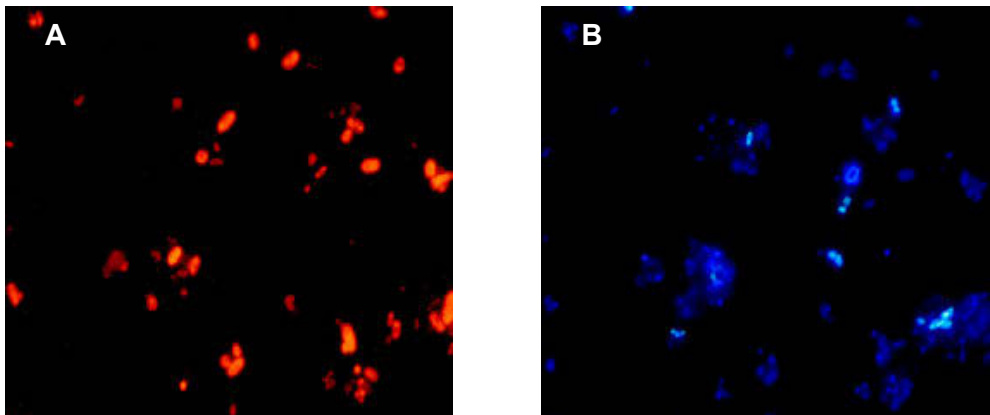
Abbildung 4.42: KBE pro Gramm Boden nach 40 min. Schütteln. Zugabe mit Extraktion waren unterschiedliche Mengen PVP/ TE- Puffer (n = 6).

Für alle weiteren Experimente wurde die Extraktion folgendermaßen durchgeführt:

3 Gramm Boden wurden in 20 ml modifizierten M9-Medium mit 3 ml PVP/ TE- Puffer (35 mg PVP 90 in ml<sup>-1</sup> TE- Puffer (pH 8)) über 40 min bei 28,5 °C mit 156 Upm extrahiert.

#### 4.4.4 Quantitative Bestimmung von mikrobiellen Populationen nach DAPI-Färbung und *in situ* Hybridisierung (FISH) mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisation wurde eingesetzt, um einen Überblick über die Populationszusammensetzung zu erhalten. In *Abbildung 4.43* sind repräsentativ für die *in situ* Detektion von Mikroorganismen in den beprobten Bodenproben DAPI-gefärbte Zellen und solche, die mit der Sonde EUB338 reagierten, dargestellt. Eine quantitative Auswertung der Sondersignale (A) im Vergleich zum unspezifischen DAPI- Signal (B) zeigte, dass in allen Proben durchschnittlich zwischen 80 und 93 % der Gesamtzellzahl durch *in situ* Hybridisation erfasst werden konnten.



*Abbildung 4.43: A: Mit Sonde EUB 338 detektierte Zellen; B: Durch DAPI- Färbung detektierte Zellen.*

Es können auch bei der *in situ* Hybridisation Probleme durch unspezifische Sonden, durch zu geringe Konzentrationen von Ribosomen in den Zellen oder durch mangelnde Penetration entstehen (AMANN und SCHLEIFER, 1995).



Penetrationsprobleme treten in der Regel bei komplexen Zellwandstrukturen auf. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Fixierungsmethoden auf die Hybridisierbarkeit zu untersuchen, wurde das Bodenmaterial einmal mit Formaldehyd und einmal mit Ethanol fixiert und anschließend mit der EUB338 hybridisiert. Die positiven Hybridisierungssignale wurden mikroskopisch ausgezählt und zur Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte) ins Verhältnis gesetzt. Es konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Messreihen festgestellt werden. Somit war ein Einfluss unterschiedlicher Fixierungsmethoden auf die Hybridisierbarkeit der Zellen im untersuchten System nicht nachzuweisen. Es wurde daraufhin immer die Fixierung mit Paraformaldehyd durchgeführt.

#### POPULATIONSVERTeilUNG IM HUMUSREICHEN (HB) BODEN

**Gram positive Organismen mit hohem G + C-Gehalt** wurden durch den Einsatz der Sonde HGC69a nachgewiesen. Sie traten im unbelasteten Boden auf und waren bestandsbildend. Es ließen sich hauptsächlich coccoide Zellen nachweisen. Durch Zugabe der unterschiedlichen Biozide gab es nach kurzer Zeit der Einwirkung nur eine geringe Änderung in der Anzahl. Durch den Einfluss der höheren BAC-Konzentration sank die Anzahl jedoch um fast 50 % (*Abbildung 4.44*). Obwohl das Aceton-Wasser Gemisch scheinbar keinen Einfluss auf die Atmungsleistung des Bodens hatte (*siehe Kapitel 4.4.2*), zeigte diese Untersuchung, dass auch der Einfluss von Aceton einen Rückgang der Gram positiven Organismen mit hohem G + C-Gehalt bewirkte. Nach dreiwöchiger Einwirkung bewirkte das Aceton ein vollständiges Verschwinden dieser Gruppe (*Abbildung 4.45*). Die Zahl der Organismen stieg in Anwesenheit der niedrigen TEB-Konzentration im Verhältnis zur Kontrolle an, und auch die hohe Konzentration (gelöst in Aceton-Wasser Gemisch) ließ die Anzahl konstant bleiben. BAC bewirkte keinen erneuten Rückgang der Organismen.

**Gram positive Organismen mit niedrigem G + C-Gehalt** wurden mit den Sonden LGC354A-C hybridisiert. Diese Organismen waren in der unbehandelten Probe vorhanden aber nicht bestandsbildend. Es traten verschiedene Zellmorphologien auf (coccoide Zellen, gerade und gekrümmte Stäbchen). Die Vertreter dieser Gruppe zeigten sich nach der sofortigen Zugabe der Biozide unterschiedlich beeinflusst (*Abbildung 4.44*). Durch Zugabe von Aceton und der hohen BAC-Konzentration stieg die Anzahl enorm an, während sie durch die niedrige TEB- und BAC-Konzentration kaum beeinflusst waren. Durch Zugabe der

hohen TEB-Konzentration verschwanden diese Organismen fast vollständig. Nach dreiwöchiger Inkubation erholten sich die Vertreter dieser Gruppe wieder (Abbildung 4.45). Nur die niedrige BAC-Konzentration bewirkte eine Abnahme der Anzahl, während die hohe BAC-Konzentration die Anzahl ansteigen ließ.

**Proteobacteria der Subklasse  $\gamma$**  wurden mit der Sonde GAM42a hybridisiert. Die Vertreter dieser Gruppe traten im Boden auf, waren aber nicht bestandsbildend. Durch die Biozideinwirkung sank die Anzahl (Abbildung 4.44), die Anwesenheit der hohen TEB-Konzentration bewirkte allerdings einen Anstieg. Nach dreiwöchiger Einwirkung sank die Anzahl durch alle Biozide um etwa 50 % (Abbildung 4.45).

**Proteobacteria der Subklasse  $\alpha$**  wurden mit der Sonde ALF968 nachgewiesen. Vertreter dieser Gruppe waren in den Proben stark vertreten, und ließen sich nur durch die Zugabe von der niedrigen TEB-Konzentration und der hohen BAC-Konzentration stark beeinflussen (Abbildung 4.44). Nach dreiwöchiger Einwirkung der Biozide bewirkten Aceton und die niedrige TEB-Konzentration sogar einen Anstieg um fast 50 %, während durch BAC (niedrig und hoch konzentriert) die Anzahl eher um 10 % abnahm (Abbildung 4.45).

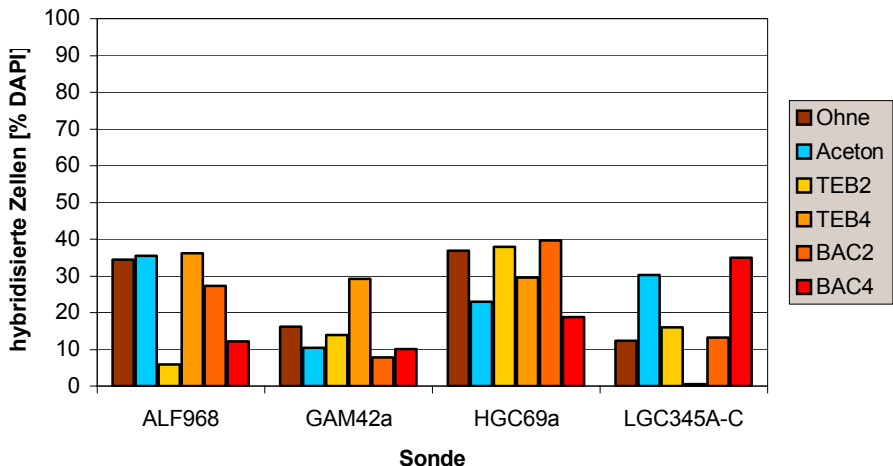


Abbildung 4.44: Verteilung der Bakterienarten im Boden (HB) sofort nach der Biozidzugabe. Angaben in % bezogen auf die Gesamtzellzahl, ermittelt durch DAPI – Färbung

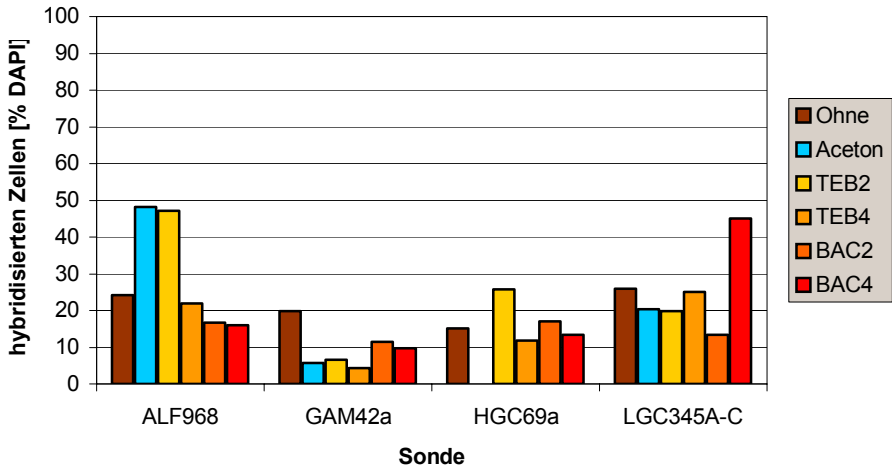


Abbildung 4.45: Verteilung der Bakterienarten im Boden (HB) nach dreiwöchiger Lagerung nach der Biozidzugabe. Angaben in % bezogen auf die Gesamtzellzahl, ermittelt durch DAPI-Färbung

#### POPULATIONSVERTeilUNG IM SANDIGEN (SB) BODEN)

**Gram positive Organismen mit hohem G + C-Gehalt** wurden durch den Einsatz der Sonde HGC69a nachgewiesen. Auch im sandigen Boden ließen sich hauptsächlich coccoide Zellen nachweisen. Vertreter dieser Gruppe waren immer anwesend und meistens bestandsbildend. Durch die Zugabe von Aceton sank die Anzahl um fast 20 %. Allerdings wirkte sich das Aceton in der hohen TEB-Konzentration nicht sehr stark auf die Anzahl dieser Vertreter im Boden aus (diese Gemisch bewirkte nur eine Populationsabnahme um 1 %), während durch die niedrigere TEB-Konzentration (gemischt mit Aceton) die Anzahl um 10 % sank. Die Zugabe der niedrigen Konzentration BAC bewirkte einen Anstieg der Vertreter dieser Gruppe (Abbildung 4.46). Nach dreiwöchiger Inkubation sank die Anzahl in der unbehandelten Probe und im Boden bei hoher BAC-Konzentration im Vergleich zum Kurzzeitversuch (Abbildung 4.47). Durch die Anwesenheit der Biozide und Aceton stieg die Anzahl dieser Vertreter bis zu über 50 % im Vergleich zur Kontrolle und auch im Verhältnis zum Kurzzeitversuch.

**Gram positive Organismen mit niedrigem G + C-Gehalt** wurden mit den Sonden LGC354A-C hybridisiert. Diese Organismen waren in der unbehandelten Probe vorhanden aber nicht bestandsbildend. Auch im sandigen Boden traten verschiedene Zellmorphologien auf (coccoide Zellen, gerade und gekrümmte Stäbchen), es war aber zum humusreichem Boden kein Unterschied zu erkennen. Nach der Zugabe der Biozide konnte man nach kurzer Einwirkzeit kaum ein Unterschied zur unbehandelten Bodenprobe erkennen (*Abbildung 4.46*). Nach drei Wochen stieg der Anteil in der unbehandelten Probe im Verhältnis zu den anderen Organismengruppen stark an. Die mit Biozid behandelten Bodenproben zeigten allerdings keinen Anstieg (*Abbildung 4.47*), sondern durch die hohe BAC- und die niedrige TEB-Konzentration eine Abnahme um über 50 % im Vergleich zur Bodenprobe nach kurzer Einwirkzeit.

**Proteobacteria der Subklasse  $\gamma$**  wurden mit der Sonde GAM42a hybridisiert. Die Vertreter dieser Gruppe traten im Boden auf, waren aber auch in diesem Boden nicht bestandsbildend. Die Zugabe von Aceton ließ Vertreter dieser Gruppe fast verschwinden. Alle anderen Biozide zeigten kaum Auswirkung auf deren Anzahl (*Abbildung 4.46*). Nach dreiwöchiger Einwirkung der Biozide zeigte sich ein ganz anderes Bild. Durch Anwesenheit von Aceton und auch durch die Zugabe der niedrigen TEB- Konzentration sank die Anzahl um über 50 %. Eine hohe BAC-Konzentration bewirkte einen Anstieg dieser Organismen um über 200 % (*Abbildung 4.47*).

**Proteobacteria der Subklasse  $\alpha$**  wurden mit der Sonde ALF968 nachgewiesen. Vertreter dieser Gruppe waren im sandigen Boden anwesend, aber nicht bestandsbildend. Durch die Zugabe der Biozide stieg die Anzahl dieser Organismen in allen Fälle, außer durch die Zugabe der niedrigen BAC-Konzentration, hier sank die Zahl etwas ab (*Abbildung 4.46*). Nach dreiwöchiger Lagerung stieg die Anzahl der Vertreter dieser Gruppe in allen Proben an. Nur durch die Anwesenheit der hohen BAC-Konzentration sank die Anzahl um 25 % (*Abbildung 4.47*), während die anderen Konzentrationen keinen großen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bewirkten.

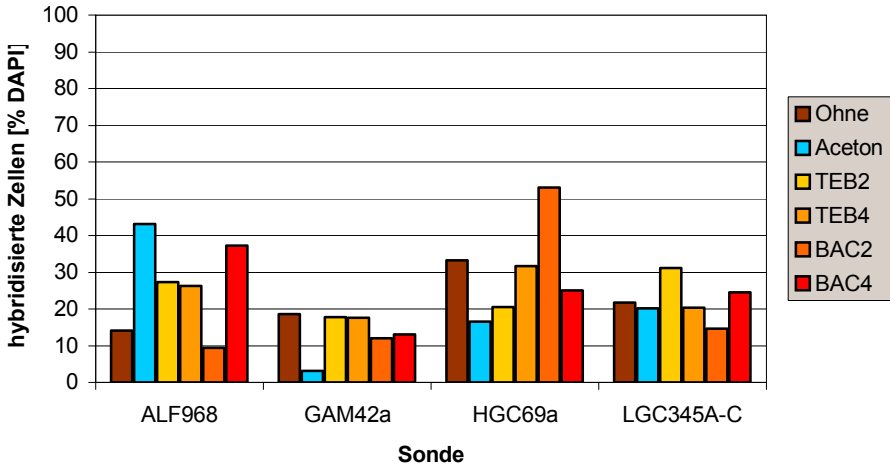


Abbildung 4.46: Verteilung der Bakterienarten im Boden (SB) sofort nach der Biozidzugabe. Angaben in % wurden auf die Gesamtzellzahl, ermittelt durch DAPI-Färbung, bezogen

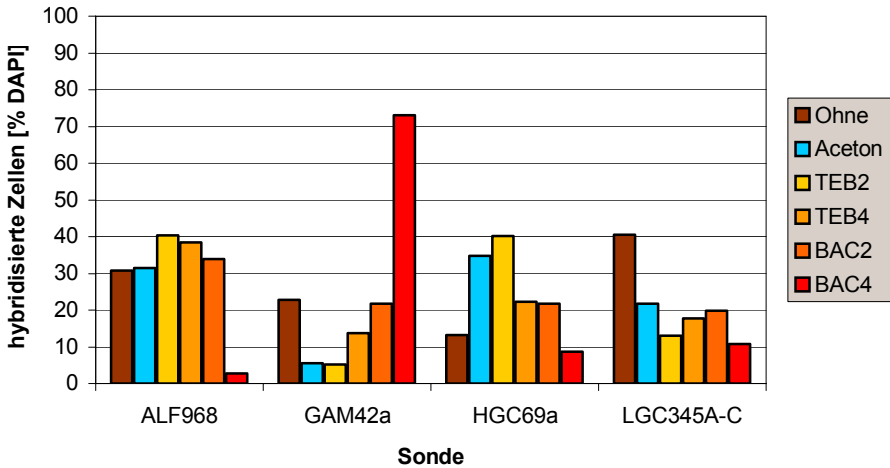


Abbildung 4.47: Verteilung der Bakterienarten im Boden (SB) nach dreiwöchiger Lagerung nach der Biozidzugabe. Angaben in % wurden auf die Gesamtzellzahl, ermittelt durch DAPI-Färbung, bezogen.

*Tabelle 4.10: Übersicht über die Auswirkung der Biozide auf die einzelnen Gruppen. Angaben in Prozent.*

| Wochen |             | ALF 968 |    | GAM42a |    | HGC69a |    | LGC345A-C |    |
|--------|-------------|---------|----|--------|----|--------|----|-----------|----|
|        |             | 0       | 3  | 0      | 3  | 0      | 3  | 0         | 3  |
| HB     | Unbehandelt | 33      | 23 | 17     | 20 | 38     | 15 | 11        | 27 |
|        | Aceton      | 34      | 49 | 10     | 5  | 22     | 0  | 30        | 20 |
|        | TEB2        | 7       | 48 | 12     | 6  | 39     | 26 | 16        | 20 |
|        | TEB4        | 36      | 22 | 29     | 4  | 19     | 11 | 1         | 26 |
|        | BAC2        | 28      | 18 | 8      | 11 | 39     | 18 | 13        | 13 |
|        | BAC4        | 12      | 17 | 10     | 10 | 19     | 14 | 35        | 45 |
| SB     | Unbehandelt | 12      | 31 | 19     | 22 | 33     | 12 | 21        | 40 |
|        | Aceton      | 42      | 31 | 2      | 5  | 27     | 35 | 20        | 21 |
|        | TEB2        | 29      | 40 | 19     | 50 | 21     | 40 | 31        | 13 |
|        | TEB4        | 28      | 39 | 19     | 12 | 31     | 21 | 20        | 18 |
|        | BAC2        | 10      | 34 | 12     | 21 | 53     | 21 | 15        | 20 |
|        | BAC4        | 38      | 2  | 13     | 12 | 26     | 9  | 25        | 11 |

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Proteobacteria der Subklasse  $\gamma$  nach drei Wochen in beiden Böden durch die Wirkung fast aller Biozide abnahm, zu Gunsten der Gram<sup>+</sup> Bakterien, deren Anzahl in fast allen Fällen anstieg. In einigen Fällen zeigte sich ein Wirkung auf die Anzahl der Bakterienart erst nach drei Wochen (z.B. Proteobacteria der Subklasse  $\alpha$  im SB-Boden). In anderen Fällen wurden die Bakterien kurzzeitig reduziert, und erholten sich über die drei Wochen Inkubation wieder (z.B. Proteobacteria der Subklasse  $\alpha$  im HB-Boden).

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert die Auswirkung von Pestiziden auf mikrobielle Lebensgemeinschaften in Bodenmaterialien. Das Wissen über die Diversität dieser Gemeinschaften in verunreinigten Böden ist von erheblicher Bedeutung, da es grundsätzlich Schlussfolgerungen über denjenigen Typ von Bakterien zulässt, der fähig ist, diese Habitate zu besiedeln (NOGALES *et al.*, 2001). Zudem empfehlen OMAR *et al.* (2001), den Effekt von neuen Pestiziden auf Bodenmikroorganismen und ihre Aktivität abzuschätzen, bevor sie in der Landwirtschaft eingesetzt werden dürfen. Daher ist sowohl ein detailliertes Wissen über die Auswirkungen in Reinkulturen und Modellgemeinschaften, als auch die Verfügbarkeit adäquater Methoden für die direkte Untersuchung von Umweltproben erforderlich. Im Folgenden werden einerseits die hier eingesetzten Methoden bewertet, andererseits erfolgt die Bewertung der neuentwickelten Methode sowie die Diskussion der gewonnenen Ergebnisse.

### 5.1 Methodischer Ansatz

#### Was sind die Grenzen der unterschiedlichen Methoden?

Pestizide nehmen auf die einzelnen bakteriellen Stoffwechselaktivitäten in unterschiedlicher Weise Einfluss. Die verschiedenen fungiziden Verbindungen wirken auf bestimmte Aktivitäten der Bakterien nicht im gleichen Maße (MITTERER *et al.*, 1981), es sollte daher der Einfluss eines Pestizids auf die Bodenmikroorganismen und ihre Aktivität bevorzugt durch unterschiedliche Methoden charakterisiert werden.

Die Erfassung der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde als Indikator für eine Veränderung der mikrobiellen Populationen (hinsichtlich ihrer Anzahl) und zur Überprüfung von neuverwendeten Methoden benutzt. Durch die Etablierung einer Aufreinigungsmethode für die Bodenextrakte wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Untersuchung der Zusammensetzung der Populationen im Boden einsetzbar gemacht, während die Messungen der Bodenatmung und der Dehydrogenase-Aktivität Aufschluss über eine Veränderung der Vitalität bzw. Aktivität der Bodenmikroorganismen geben sollten.

### 5.1.1 Kultivierung der Bakterien (Erfassung der KBE)

Zuerst wurde versucht, eine Veränderung der Diversität des Bodens in seiner Gesamtheit zu bestimmen. Es zeigte sich, dass durch die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten nur eine Tendenz über die Auswirkung der Pestizide erzielt, aber keine eindeutige signifikante Aussage getroffen werden konnte. Die Anzahl und das Spektrum der isolierten bzw. kultivierten Bakterien erwies sich als mediumspezifisch. Die Auswahl des Mediums und die gewählten Inkubationsbedingungen selektierten bestimmte Bakterien. Insbesondere langsam wachsende Vertreter, sowie an bestimmte C-Quellen, Mikrohabitate oder spezielle physiologische Bedingungen gebundene Spezialisten (K-Strategie, *s.u.*) unter den Bakterien wurden nur eingeschränkt kultiviert. Im Vergleich zu der enormen bakteriellen Diversität eines fruchtbaren Ackerbodens konnte mit dem ausgewählten Medium nur ein geringer Bruchteil der Bakteriengemeinschaft bewertet werden, während ein erheblicher Teil unentdeckt blieb (AMANN *et al.*, 1990; TORSVIK *et al.*, 1990). TORSVIK *et al.* (1990) fanden bei der Analyse bakterieller Diversität anhand von DNA-Reassoziationsuntersuchungen eine zweihundertfach höhere genetische Diversität in Bodenproben als in Isolaten des untersuchten Standortes. Ergebnisse dieser Art stützen die Theorie, dass es sich bei den auf Festmedien wachsenden Bakterienarten i. d. R. um sogenannte r-Strategen handelt, die eine hohe Wachstumsrate besitzen. Das für diese Untersuchungen gewählte Medium (Standard I) wurde daher verdünnt (1:10), um auch den langsamer wachsenden Bakterienarten die Möglichkeit zu bieten, sich durchzusetzen. Da das Wachstum der Bakterien allerdings auch von der Art der Nährstoffe abhängig ist, und das Standard I Medium hauptsächlich aus vorverdaulichem Fleischpepton und ähnlichen Nährstoffen besteht, wurden damit auch überwiegend r-Strategen bevorzugt. Bei der Mehrheit nicht kultivierter Bakterienarten handelt es sich dagegen also um hochspezialisierte K-Strategen mit häufig niedrigen Wachstumsraten. In vielen Systemen liegt die Kultivierbarkeit durch Einsatz von Standardmethoden oft deutlich unter 1% der Gesamtzellzahl (FANTROUSSI *et al.*, 1999). Allerdings ließen sich durch Angleichung der Kultivierungsbedingungen an die physikochemischen Parameter des untersuchten Systems deutlich mehr Zellen kultivieren (BARTSCH *et al.*, 1999; BUSMANN *et al.*, 2001; KALMBACH *et al.*, 1997). Durch Anpassung der Kultivierungsmethoden an „natürliche“ Bedingungen ist es nun möglich, die Zahl der kultivierbaren Zellen zu erhöhen. Durch die selektive Anreicherung kann ein breites Spektrum unterschiedlicher Bakterienarten isoliert werden, wobei gleichzeitig die Zahl der einzelnen Arten in den verschiedenen Ansätzen gering bleibt. Kultivierungsansätze können also durchaus sinnvoll zur Beschreibung mikro-



bieller Systeme - und bei der Verfolgung bestimmter Bakterienarten - herangezogen werden, auch wenn dies einen beträchtlichen Zeit- und Arbeitsaufwand bedeutet.

In Verbindung mit den in dieser Arbeit durchgeführten chemischen Analysen konnten erste Hinweise auf eine Auswirkung der Pestizide erlangt werden. Die Ergebnisse reichten allerdings nicht für eine quantitative Aussage. Das Ziel der Arbeit bestand daher auch in der Entwicklung einer Methode zur schnellen und unkomplizierten Charakterisierung der Populationsänderung. Es wurde die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten nachfolgend nur noch zur Kontrolle der eingesetzten molekularbiologischen Methoden verwendet.

### 5.1.2 Eignung des Modellsystems zur Beurteilung der Biozidauswirkung

Zum Studium der Auswirkungen von Bioziden auf Bodenmikroorganismen wurde ein Modellsystem verwendet. Für die Modellsystemexperimente wurden ausgewählte Bakterienarten in Flüssigkulturen gezüchtet. Um das System auf Bodenhabitate zu übertragen, in denen i. d. R. ein Nährstoffmangel vorliegt, wurde ein Minimalmedium gewählt, das alle ausgewählten Bakterienarten gleichermaßen im Wachstum unterstützte. Der Vorteil der Experimente mit Modellsystemen liegt darin, dass die Entwicklung der Bakterienarten in Medien untersucht werden kann, in denen nur die Zugabe der Biozide als definierte Störung eine Änderung verursacht. Generell sind Bakterien aufgrund ihrer geringen Größe und kurzen Generationszeiten geeignete Modellorganismen, da für sie eine Vielzahl replizierbarer miniaturisierter Modell-Lebensgemeinschaften konstruiert werden können. So konnten z.B. ABRAHAM *et al.* (2002) mit Hilfe von Modellsystemen nachweisen, dass Bakterien in Biofilmen zur Mineralneubildung in saueren Tagebaurestseen beitragen. Künftig sollten unterschiedliche Bakteriensets eingeführt werden, die helfen können, verschiedene Fragestellungen in unterschiedliche Bodensystemen zu beantworten. So z.B. können Bakteriensets zur Beantwortung von landwirtschaftlich relevanter Fragestellungen (Nitrifikanten, Stickstofffixierer) hergestellt werden oder Sets, die für bestimmte Bodenarten (z.B. sandige, humusreiche Böden) zur Verfügung stehen.

### 5.1.3 Lebensfähigkeit der Bakterien nach Biozidzugabe

Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit wurde der Live/Dead- Test<sup>TM</sup> (Moleculare Probes, Leiden, NL) verwendet, der darauf beruht, dass SYTO9 die Zellmembranen aller Bakterien durchdringen kann und die Zelle färbt, während PI nur geschädigte Zellmembranen zu durchdringen vermag (*siehe Kapitel 3.8.3*). Nach KORBER *et al.* (1996) fungiert die Zellmembran im Falle des Zelltodes nicht mehr länger als selektive Barriere zwischen Zelle und Umgebung. Daher bietet der Nachweis einer intakten bzw. geschädigten Zellmembran eine schnelle und preiswerte Methode zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Bakterien.

Anhand der Auswahl der Biozide und dem Wissen über die Abbaufähigkeit einiger Bakterienarten konnte gezeigt werden, dass diese Methode ein praktikables Mittel ist, die Auswirkungen von Bioziden auf bestimmte Bakterienarten zu untersuchen. Mit der angewandten Methode konnte festgestellt werden, welche der ausgewählten Bakterienarten widerstandsfähig gegenüber bestimmten Bioziden ist, bzw. welche durch sie negativ beeinflusst wird. Allerdings kann man mit dieser Methode nur die Lebensfähigkeit der Bakterien bestimmen. Durch das Fehlen von eindeutigen morphologischen Unterschieden zwischen den Bakterienarten ist es jedoch nicht möglich, Aussagen über Änderungen in der Populationszusammensetzung zu treffen.

### 5.1.4 Analyse der bakteriellen Zusammensetzung in Flüssigkulturen mit FISH

Für die quantitative Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung der Flüssigkulturen nach unterschiedlicher Biozidzugabe wurde FISH mit rRNA gerichteten Sonden eingesetzt. Zur Darstellung der genotypischen Diversität in Umweltproben steht grundsätzlich alternativ zur ribosomalen RNA (rRNA) auch die messenger RNA (mRNA) oder DNA zur Verfügung. Während die DNA einer Bakterienzelle grundsätzlich nur in einer Kopie vorliegt, sind mRNA und rRNA in vielen Kopien in einer Zelle vorhanden. Bereits ohne PCR kann daher bei Verwendung der rRNA zur Hybridisierung durch die zahlreichen Zielsequenzen eine Verstärkung des Signals erzeugt werden. Der Nachweis eines funktionalen Gens auf der DNA weist lediglich auf die Möglichkeit zu einem bestimmten Synthese- oder Abbauweg hin, aber nicht ob dieses Gen augenblicklich transkribiert wird. Im Gegensatz dazu eignet sich die mRNA zur Detektion von funktionellen, aktiven Genen und damit zur Bestimmung des funktionellen Zustands einer Bakterienart (KLEIN und JUNEJA, 1997). Allerdings ist die Ver-

wendung von mRNA teilweise schwierig, da durch die geringe Halbwertszeit von 0,5 – 2 Minuten und die Anfälligkeit für RNasen schnell ein Abbau erfolgen kann. Die rRNA hingegen ist, bedingt durch ihre Sekundärstruktur, wesentlich stabiler und leichter zu isolieren (KING *et al.*, 1986). Außerdem beruhen die derzeitigen Kenntnisse über die phylogenetische Verwandtschaft der Bakterien in erster Linie auf dem Sequenzvergleich von 16S- und 23S rRNA (WOESE, 1987), die hoch konservierte bis hoch variable Bereiche enthalten und sich daher hervorragend für die Herstellung von Sonden mit sehr unterschiedlicher Spezifität eignen. GIOVANNI *et al.* (1988) bewiesen erstmals, dass aufgrund der hohen Kopieanzahl der rRNA individuelle Zellen durch Sonden identifiziert werden können. Seitdem werden phylogenetische Sonden (Oligonukleotide) in Untersuchungen der mikrobiellen Ökologie vielseitig eingesetzt, z.B. bei der Identifizierung von bislang nicht kultivierbaren Organismen (AMANN *et al.*, 1995) oder der Analyse komplexer bakterieller Gemeinschaften in technischen Systemen zur Abwasserbehandlung (AMANN *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 1993; MANZ *et al.*, 1992).

Ein Vorteil der *in situ* Hybridisierung ist die Möglichkeit, durch Sonden unterschiedlicher Spezifität bestimmte Teile der Population zu untersuchen. Dadurch eignet sich diese Methode zur Bearbeitung verschiedener ökologischer Fragestellungen. Das Auftreten und die Verteilung phylogenetischer Gruppen lässt sich ebenso untersuchen wie das Auftreten einzelner Arten (DEVEREUX *et al.*, 1992; HARMSSEN *et al.*, 1996). Darüber hinaus kann durch den Einsatz unterschiedlich markierter Oligonukleotide die räumliche Struktur mikrobieller Biozönosen bestimmt (SELKIGUCHI *et al.*, 1999) und damit auf mögliche Interaktionen zwischen den Zellen geschlossen werden. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Bioziden, deren Auswirkung auf die Reinkulturen bekannt war, auf Bakteriengemeinschaften mittels der FISH-Methode untersucht.

Trotz aller Möglichkeiten treten bei der FISH-Methode aber auch Aspekte auf, die bei der Beurteilung der Methode berücksichtigt werden müssen. Die Signalintensität ist bei der *in situ* Hybridisierung direkt abhängig von der Anzahl der Ribosomen, die mit der eingesetzten Oligonukleotidsonde hybridisieren können. Bevor die Sonde an die Zielmoleküle gelangt, muss die Zellwand durchdrungen werden. Das kann bei Gram<sup>+</sup> Organismen mit einer mehrlagigen Mureinschicht problematisch sein. Die Zellwände dieser Organismen sind weitaus schwieriger zu permeabilisieren. Während sich für Gram<sup>-</sup> Zellen die Fixierung mit einer 4 %igen Formaldehydlösung als Standardprozedur etabliert hat, gibt es für Gram<sup>+</sup> Bakterien noch keine adäquate Fixierprozedur. Allerdings wird die Verwendung von Ethanol für eine weitgehend effektive Fixierung empfohlen (BRAUN-HOWLAND *et al.*, 1992;

ROLLER *et al.*, 1994). In Mischkulturen mit Gram<sup>+</sup> und Gram<sup>-</sup> Bakterien ist es schwierig die Zell-wände der Gram<sup>+</sup> Organismen ausreichend zu permeabilisieren, und gleichzeitig die Integrität der Zellwände von Gram<sup>-</sup> Organismen zu erhalten. Ein direkter Vergleich der beiden Fixierungsprotokolle an den Reinkulturen zeigt, dass bei der Verwendung von 4 %iger Formaldehydlösung sowohl Gram<sup>-</sup> als auch Gram<sup>+</sup> Zellen ein stärkeres Signal als bei der Fixierung mit Ethanol hervorrufen. Daher wurde in den hier durchgeführten Versuchen die Fixierung mit einer Formaldehydlösung verwendet.

DELONG *et al.* (1989) zeigten, dass die Signalintensität außerdem noch direkt mit dem physiologischen Status der Zelle verbunden ist. Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase besitzen mehr Ribosomen als Zellen in der stationären Phase (POULSEN *et al.*, 1993). Untersuchungen von CHRISTENSEN *et al.* (1999) unterstützen die Aussage, dass *in situ* Hybridisierung hauptsächlich die aktiven Zellen detektiert. Eine Kombination mit dem Live/Dead-Test ist allerdings nicht möglich, da nach WILKINSON *et al.* (1998) die Fixierungsprozedur für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung scheinbar die Zelloberfläche zerstört und daher mit anderen „Färbungs“-Techniken nicht kompatibel ist. Eine Möglichkeit wäre vielleicht, die Lebensfähigkeit der Bakterien vorab mit dem Live/Dead-Test abzuschätzen, und anschließend die Bakterien für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zu fixieren. In dieser Reihenfolge würden sich die beiden Methoden nicht stören, und durch den Live/Dead-Test könnten weitere Information über den Zustand der Zelle erzielt werden.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eine geeignete Methode zur Untersuchung der Biozidauswirkung in Modellsystemen. Sie lässt sich für eine Abschätzung gut einsetzen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie sich die ausgewählten Bakterien nach Biozidzugabe in der Modellgemeinschaft verhalten.

### 5.1.5 Bodenfunktionen: Bodenatmung und Dehydrogenase

Ergebnisse von flüssigen Systemen (Flüssigmedium) können nicht direkt auf terrestrische Systeme transferiert werden (RÖNNPAGEL *et al.*, 1998), sie können zur Unterschätzung der totalen Bodentoxizität führen. Daher ist es notwendig, Methoden für Böden einsetzbar zu machen (*s.u.*, Kapitel 4.2), die die Zusammensetzung der Bodenbakterien beschreiben. Versucht man deren mikrobieller Aktivität zu untersuchen, gibt es eine Vielzahl von Prozessen, die eine Rolle spielen. Unter dem Begriff „mikrobielle Aktivität“ sind sämtliche Stoffumsetzungen durch Mikroorganismen bzw. solche die durch diese katalysiert werden, d.h.

intra- und extrazelluläre Umsetzungen, zu verstehen. Nicht alle im Labor gemessenen Daten lassen Aussagen über natürliche Verhältnisse zu, da diese Messungen oftmals unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden. Ein Vergleich verschiedener Böden und das Erfassen von Veränderungen durch Umweltfaktoren (z.B. Schadstoffeintrag) ist aber möglich. Daher kann auch die Erhebung solcher „Basisdaten“ ein wichtiger Beitrag zum Monitoring des Einflusses von Bioziden sein. Eine Schlüsselfunktion im Boden ist der Mineralkreislauf, und eine der gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Mineralisation ist die Messung der Bodenatmung (MÜLLER *et al.*, 2002). In der Bodenökologie wird häufig die Bodenatmung als Bewertungskriterium für unterschiedliche Aspekte herangezogen: zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse (ANDERSON und DOMSCH, 1978) sowie zur Überprüfung der Einflüsse von Chemikalien auf die Bodenmikroorganismen (MALKOMES, 1997). Weiterhin kann die Basalatmung und die Atmungsaktivität nach Substratzugabe zur ökotoxikologischen Bewertung von Böden verwendet werden (DIN ISO 17155:2003-06 2003).

Ziel war es, zu zeigen, wie sich eine unterschiedliche Kontaminationen auf die Diversität (bestimmt durch FISH) und die Funktion (Bodenatmung) auswirkt. Grundsätzlich sind ökotoxikologische Auswirkungen von Schadstoffen in einem metabolisch aktiven Boden leichter zu erkennen als z. B. in kohlenstofflimitierten Böden, in denen die Bodenorganismen oft eingeschränkt aktiv sind (VAN BEELEN und DOELMAN, 1997). Es zeigte sich, dass nicht alle Parameter der Boden-atmungsmessung zur Bestimmung von Auswirkungen der Biozide geeignet sind. Ergebnisse anderer Untersuchungen beweisen, dass in kontaminierten Böden einige Parameter nicht zwingend niedriger bzw. höher sind (DAHLIN *et al.*, 1997; DAHLIN und WITTER 1998; GILLER *et al.*, 1998; WITTER *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der einzelnen Parameter werden daher vorsichtig bewertet:

- Die Bestimmung des respiratorischen Aktivierungsquotienten ( $Q_R$ : Quotient aus Basalatmung und substratinduzierter Atmung) war durch die verwendete Messapparatur limitiert, da die Messungen zur Bestimmung der Basalatmung und der substratinduzierten Atmung parallel abliefen. Zudem wird die Basalatmung nicht immer von Schwermetallen (BAÄTH, 1989; GUPTA *et al.*, 1987) und organischen Chemikalien (WALTON *et al.*, 1989) beeinflusst. Ursächlich dafür ist die große Anzahl von Arten an Mikroorganismen, die an der Bodenatmung beteiligt sind und durch die verschiedenen Schadstoffe in unterschiedlichem Maße beeinträchtigt werden. Demzufolge können toxische Effekte auf Teile der Population durch die Aktivität toleranter Arten überdeckt werden (VAN BEELEN und DOELMANN, 1997).

Allerdings konnte in allen Messungen eine konstante Basalatmung und ein Anstieg der Atmung durch Substratinduzierung registriert werden. Damit ließ sich durch den  $Q_R$ -Wert eine toxische Auswirkung der Biozide auf die Atmung feststellen. Diese Kriterien in Betracht gezogen und durch den direkten Vergleich von unkontaminierten und kontaminierten Böden gleicher Art, eignet sich der  $Q_R$ -Wert dennoch als ein qualitatives Bewertungsparameter.

- Die Parameter, die von der Substratzugabe abhängig sind (Steigung der Atmung, Dauer der Lag- Phase, kumulierter Gasumsatz, Zeit bis zum Erreichen des Peakmaximums [ $t_{Peakmax}$ ]), charakterisieren die Kinetik der Gasumsätze. Die Kinetik der Gasumsatzraten unkontaminierter Böden nach Substratzugabe ist häufig beschrieben worden, da das Niveau der Lag-Phase zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse eingesetzt wird (ANDERSON und DOMSCH, 1978). Bei unkontaminierten Böden wird durch die Substratzugabe meist eine annähernd ideale Kinetik induziert. Kontaminierte Böden zeigen hingegen oftmals eine stark abweichende Kinetik. Zur ökotoxikologischen Bewertung durch substratinduzierte Atmung erscheint es also sinnvoll Kriterien heranzuziehen, die auch beim Fehlen einer idealen Kinetik der Umsatzrate als Wert erfassbar sind oder berechnet werden können, wie zum Beispiel der Zeitraum bis zum Erreichen der maximalen Umsatzrate ( $t_{Peakmax}$ ). Ein zu geringer oder zu hoher Wassergehalt des Bodens kann auf die Kinetik der Gasumsätze ähnliche Auswirkungen zeigen wie Schadstoffe, z.B. keine exponentielle Phase. Somit ist die Ermittlung der Steigung und der Dauer der Lag-Phase nicht möglich (ILLSTEDT *et al*, 2000). Auch wenn in dieser Arbeit die Bestimmung dieser Parameter durchgeführt wurde, zeigen sie eine schlechte Übereinstimmung mit den anderen Parametern. Der  $Q_R$ -Wert zeigt zum Beispiel bei der Kontamination durch Tebuconazol (niedrige und hohe Konzentration) eine eindeutige toxische Auswirkung auf die Atmung. Die Berechnung von der Dauer der Lag-Phase dieser Kontaminationen wiesen auf keine toxische Auswirkung auf die Atmung hin.
- Der kumulierte Gasumsatz ( $C_R$ ) gibt unabhängig von der Kinetik der Umsatzrate den Gasumsatz an. Spezifische Merkmale der Kinetik gehen somit nur eingeschränkt in die Auswertung ein. Dieser Parameter gibt daher zusätzlich Informationen über den Zustand eines Bodens.

Die Auswertungskriterien für die Bestimmung der Bodenatmungsmessungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an ausgewählten Kontaminationen bezüglich einer Beeinträchtigung der mikrobiellen Lebensraumfunktion im Boden unter Berücksichtigung einer Änderung in der bakteriellen Zusammensetzung (bestimmt durch FISH) beurteilt. Zur Bewertung wurden folgende Parameter herangezogen: der respiratorische Aktivierungsquotient  $Q_R$ , die Zeit bis zum Erreichen des Peakmaximums  $t_{Peakmax}$  und die kumulierten Gasumsätze  $C_R$ . Die Steigung  $\mu$  und die Dauer der Lag-Phase geben weitere Zusatzinformationen.

Die Dehydrogenasen (DHA) sind wichtige intrazelluläre Enzyme der Atmungskette und dienen der Elektronenübertragung. Sie sind nur in intakten Zellen aktiv und reflektieren somit die mikrobielle Aktivität (NANNIPIERI, 1994). Eine Verringerung der DHA-Aktivität zeigt daher den negativen Effekt von Kontaminationen (MORENO *et al.*, 2001) und kann in vielen verschiedenen Bodenarten eingesetzt werden (MERLIN *et al.*, 1995). Auch weil die Messung der DHA mit der Atmung verbunden werden kann (KELLEY *et al.*, 1999), wurde diese Methode parallel angewandt: Sie unterstützte dabei die Auswahl der Bewertungskriterien der Atmungskurven.

## 5.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) im Boden

### 5.2.1 Etablierung einer Extraktionsmethode

Eine direkte Übertragung der an der Modellgemeinschaft getesteten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf die Analyse im Boden ist nicht möglich. Im Boden sind Mikroorganismen in der Regel einem Nährstoffmangel ausgesetzt. Dadurch herrschen in diesem Medium langsam wachsende Bakterien mit einer geringen metabolischen Aktivität vor. Man erhält verbunden mit dem niedrigen Ribosomengehalt (s.o.) von vornherein schwächere Signale. Die zweite und größere Herausforderung bei der Anwendung von FISH im Boden ist die Eliminierung der Huminstoffe aus den Proben, da diese zum einen mit den Bakterien komplexieren und nachfolgende zur Detektion notwendige Reaktionen inhibieren können, zum anderen können sie das Signal durch Autofluoreszenz stören.

Ziel der Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode, um Mikroorganismen effizient aus den Bodenhabitaten zu lösen und störende Autofluoreszenz zu minimieren. Dabei stellte sich heraus, dass das Herstellen von Bodenextrakten mit einem Minimal-

medium und anschließender Filtration nicht ausreicht, die störenden Huminstoffe zu entfernen und zugleich genügend Bakterienzellen für die Detektion zu erhalten. Es konnten nach der Filtration kaum Bakterien detektiert werden, da sie von undefinierten Signalen überdeckt wurden, oder gar nicht extrahiert werden konnten. Die meisten Methoden zur Huminstoffeliminierung aus Proben sind aus Arbeiten zur Aufreinigung der bakteriellen DNA aus Bodenhabitaten für PCR und Folgemethoden bekannt. Dazu gibt es eine Reihe von Verfahren, die alle vor der Reinigung die Lyse und Extraktion der DNA beinhalten (FUHRMANN *et al.*, 1988; BRUCE *et al.*, 1992; SMITH und TIEDJE, 1992; ABBASZADEGAN *et al.*, 1993). Für die Untersuchungen von Bakterien im Boden mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung war es allerdings notwendig, die Bakterienzellen in ihrer Form und Struktur zu erhalten. Dadurch erwiesen sich die meisten Methoden als nicht geeignet. Nur eine Aufreinigung der Proben durch Polyvinylpyrrolidon (PVP) zeigten sich als brauchbar, da diese die Bakterienzellen nicht zerstören und sich die Huminsäuren an das PVP binden (TSAI und OLSON, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Aufreinigung der Bodenextrakte durch PVP, für die anschließende Verwendung in der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, eingesetzt. Unterschiedliche Variationen dieser Methoden wurden ausprobiert. Es zeigte sich, dass eine Kombination aus klassischer Bodenextraktion durch Zugabe von PVP und anschließender Filtration am geeignetsten ist. PVP und die Huminstoffe komplexieren und bilden große filtrierbare Moleküle. In weiteren Modifikationen erwies sich, dass das hochmolekulare PVP K90 effizienter ist als das niedermolekulare PVP K30, die eine Komigration von Huminsäuren zu verhindern. Mit PVP K90 konnten 20 % mehr Zellen aus dem Boden extrahiert werden.

Damit wurde es möglich, die *in situ* Hybridisierung auch für Bodensysteme anzuwenden. Vergleiche der durch FISH hybridisierten Zellen mit den durch den DNA-Farbstoff DAPI gefärbten Zellen zeigten eine Hybridisierbarkeit von 90 % aller gefärbten Zellen. Unspezifisch bleibt, um welche Organismen es sich handelt, die nicht mit der EUB 388 Sonde (zielt auf die meisten Organismen der Domäne Bacteria) reagierten. NEEF *et al.* (1998) fand heraus, dass z.B. *Verrucomicrobia* und *Planctomyces*, beides Vertreter der Domäne Bacteria, nicht mit dieser Sonde hybridisieren können.



## 5.2.2 Probleme bei der Analyse der bakteriellen Diversität

### Wie ist die Einschätzung des Potential der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung?

So wichtig eine genaue Kenntnis der bakteriellen Population im Boden ist, ist die Analyse dieses Systems mit einigen Problemen behaftet. Eine einfach taxonomische Klassifizierung, wie sie zum größten Teil bei Eukaryonten möglich ist, ist bei den Prokaryonten i.d.R. nicht möglich. Bakterien zeigen wenige signifikante morphologische Eigenschaften, die eine genaue Zuordnung einzelner Arten ermöglicht. Die Besetzung einer ökologischen Nische durch eine bestimmte Bakterienart ist letztendlich das Resultat der genetischen Möglichkeiten der besiedelnden Art. Das phänotypische Erscheinungsbild einer Bakterienart entspricht dabei der jeweiligen Anpassung an die Milieubedingungen, die hauptsächlich durch das vorhandene Nahrungsangebot bestimmt wird. Spezies, deren DNA die genetische Information enthält, die als phänotypische Ausprägung genau den Erfordernissen an den jeweiligen Lebensraum entspricht, sind dabei im Vorteil. Dadurch wird die Adaptionsfähigkeit einer Bakterienart gewährleistet.

Gerade die Möglichkeit der Nutzung der genetischen Information ohne vorhergehende Kultivierung, ermöglichen den Zugriff auf Bakterienarten, die sonst nur schwer bzw. überhaupt nicht hätten untersucht werden. Durch die Einsetzbarkeit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung im Boden, ergeben sich einige Untersuchungsmöglichkeiten. Es lassen sich einzelne Bakterienarten im Boden verfolgen, für z.B. die Überwachung der Abbauer im Boden. Durch den Einsatz von unterschiedlich markierten gruppenspezifischen Sonden lassen sich quantitative Aussagen über eine Populationsverschiebung durch äußere Einflüsse beschreiben. Vor dem Einsatz von Gensonden braucht man allerdings zunächst die Sequenz der Bakterienart, die man detektieren möchte, daher kann hier die Limitation dieser Methode gesehen werden. Es gibt aber eine große ständig wachsende 16S rDNA Sequenzdatenbank (ungefähr 16 000 Vollsequenzen), die es erlaubt, Bakterien taxonomisch einzuordnen sowie phylogenetische Sonden unterschiedlicher Spezifität zu entwickeln.

### 5.3 Reaktion der Bodenmikroorganismen auf unterschiedliche Belastung

Die Bodenmikroflora treibt die notwendigen elementaren Kreislaufprozesse an und steuert die meisten Bodenfunktionen. Daher ist dieser Teil des Bodenlebens von besonderem Interesse bei ökotoxikologischen Studien (RÖNNPAGEL *et al.*, 1998). Die Reaktionen auf Änderungen in der Umgebung sind fundamentale Eigenschaften einer lebenden Zelle. Besonders wichtig ist dieses für einzellige Organismen, die direkt auf Änderungen in der Mikroumgebung reagieren. Die Auswirkung auf die Mikroorganismen im Boden ist, seit dem Pflanzenpathologen in den 50er Jahren die Nebenwirkungen untersuchten, bekannt (SALONIUS, 1981). Diese Untersuchungen galten allerdings aus methodischen Gründen, lange Zeit als nicht ausreichend. Erst durch die Entwicklung von molekularbiologischen, chemischen und physiologischen Methoden haben die Diversitätsanalysen in der mikro-biellen Ökologie einen großen Aufschwung erfahren. Seit dem wurden zahlreiche Untersuchungen vor allem an durch Schwermetall verunreinigte Böden durchgeführt (GRIFFITH *et al.*, 1997; RÖNNPAGEL *et al.*, 1998; SANDAA *et al.*, 1999; KOZDROIJ und VAN ELSAS, 2001). SANDAA *et al.* (1999) zeigten, dass, basierend auf DNA-Reassoziationsuntersuchungen, in unkontaminierten Böden 16000 Genome pro Gramm feuchten Bodens, dagegen in leicht Schwermetall verunreinigten Böden nur noch 6400 Genome, und in stark Schwermetall kontaminierten Böden nur noch 2000 bakterielle Genome pro Gramm feuchten Bodens gefunden werden konnten. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zielten vor allem auf die Auswirkungen von organischen Bioziden auf die Bodenmikroorganismen. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an den Reinkulturen im Flüssigmedium zeigten, dass vor allem Gram<sup>+</sup> Bakterien durch die unterschiedlichen Biozide beeinflusst waren, wobei *A. globiformis*, ein Vertreter der Gram<sup>+</sup> mit hohem G+C-Gehalt, am stärksten beeinflusst wurde (durch 2,4-D nahmen die lebenden Bakterien z.B. um 40 % ab). Anscheinend reichern sich die als r-Strategen einzustufenden Gram<sup>-</sup> Pseudomonaden unter Stress von organischen Bioziden gegenüber Gram<sup>+</sup> an. Dies gilt besonders für *A. globiformis*, der aufgrund seines langsamen Wachstums eher zu den K-Strategen zu rechnen ist. *B. subtilis* (Gram<sup>+</sup>) zeigte sich hauptsächlich sensitiv gegenüber schlecht wasserlöslichen Bioziden (TEB, BAC und Naphthalin bewirkten eine Abnahme der lebenden Zellen um rund 50%). Auch SMALLA *et al.* (2001) konnten beobachten, dass die schnell- wachsenden  $\gamma$  Proteobakterien (zu denen *P. fluorescens* gehört) bei besonderen Ereignissen wie bestimmte erhöhte Substratkonzentrationen verstärkt aufkommen. *P. fluorescens* wurde durch keines der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biozide signifikant im Wachstum beeinträchtigt.

Das Hauptangriffsziel toxischer Substanzen ist die Zellmembran von Bakterienzellen (HEIPEIPER und DE BONT, 1994). SIKKEMA *et al.* (1994) konnten eine Verbindung zwischen  $\log K_{OW}$  Werten ( $\log$  des Verteilungskoeffizient in einem Mix aus 1-Octanol und Wasser) und der Teilung der biologischen Membran durch Substanzen herleiten. Die Korrelation zwischen dem  $\log K_{OW}$ -Wert von Verbindungen und ihrer Toxizität ist oft beschrieben (BELTRAME *et al.*, 1984; SAITO *et al.*, 1993) und gut dokumentiert für organische Lösungsmittel: Lösungsmittel mit einem  $\log K_{OW}$  zwischen 1,5 und 3 werden als extrem toxisch eingestuft (RAMOS *et al.*, 1997).

Wie aus den Untersuchungen mit Bakterien in Flüssigkulturen zu erkennen ist, zeigen sich einige Bakterienarten sensitiv gegenüber bestimmten Bioziden, während andere Arten sich offenbar an diese Biozide adaptieren können, bzw. eine Resistenz aufbauen. Bakterien können auf unterschiedlichen Wegen eine Adaptation zu ungünstigen Umweltbedingungen erreichen: z.B. durch Mutation und Selektion oder durch Übertragung genetischen Materials von anderen Stämmen oder Individuen. Bei der Adaptation unterscheidet man zwischen plasmidgebundener und chromosomaler Adaptation. Erstere ist zwischen Bakterien übertragbar und breitet sich entsprechend schnell aus. Ein Adaptationsmechanismus ist z.B. die Aktivierung des Effluxsystems, um Chemikalien aus der Zelle zu eliminieren und eine Akkumulation zu verhindern. Bakterielle Effluxsysteme können aus einer oder mehreren Proteinuntereinheiten bestehen, die den Transport von Substraten bzw. Chemikalien aus der Zelle hinaus bewältigen. Diese Art der Adaptation konnte bei metallresistenten Bakterienarten beobachtet werden, z.B. eine Resistenz gegen Arsenat, Arsenit und Antimonit bei Gram<sup>-</sup> und Gram<sup>+</sup> Bakterien durch ein Anioneneffluxsystem oder ein Kationeneffluxsystem in *S. aureus*, das eine Resistenz gegen Cadmium und Zink bewirkte (SILVER und MISRA, 1988). Ein anderer Mechanismus ist die Verminderung der Zellmembranpermeabilität. Durch Veränderung der Fettsäuren-zusammensetzung der Zelloberfläche kann verhindert werden, dass zellfremde Chemikalien in das Zytoplasma der Zelle eindringen so, z.B. eine Isomerisierung von *cis*- zu *trans*-Formen der ungesättigten Fettsäuren beim gegen Lösungsmittel resistenten Bakterium *P. putida* (HEIPEIPER und DE BONT, 1994).

Bakterien können auch die Affinität zur Zielstruktur vermindern. Sie ändern den internen Bindungsort des angreifenden Stoffes (z.B. durch Änderung des Penicillin bindenden Proteins bei *S. pneumoniae*), oder sie produzieren ein Enzym, das den zellfremden Stoff inaktiviert (z.B. Lactamase Enzym bei *H. influenza* und *M. catarrhalis*).

Benzalkoniumchlorid (BAC), eine sehr gut wasserlösliche quaternäre Ammoniumverbindung, war hauptsächlich gegen Gram<sup>+</sup> Bakterien wirksam (Verminderung der lebenden Zellen von *B. subtilis*, *A. globiformis*, *C. glutamicum* um 30 - 50 %). Auch in den Untersuchungen der Mischkulturen zeigten sich die Gram<sup>+</sup> Bakterien empfindlicher. Die Anzahl der lebenden *B. subtilis* und *C. glutamicum* Zellen nahm in Mischkulturen mit *P. fluorescens* oder *S. meliloti* am häufigsten ab (30 - 80 % zur Kontrolle). Allerdings wirkte BAC auch teilweise gegen Gram<sup>-</sup> Bakterien (*S. meliloti*). Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Arbeiten (To *et al.*, 2002; LANGSRUD und SUNDHEIM, 1997). Quartäre Ammoniumverbindungen verursachen schon durch niedrige Konzentrationen einen Verlust des zytoplasmischen Materials (To *et al.*, 2002). Die beobachteten Wirkungen von BAC im Boden weisen darauf hin, dass einige Vertreter der Gram<sup>-</sup> Bakterien (vor allem im sandigen Boden) und auch Gram<sup>+</sup> Bakterien (im humusreichen Boden) unempfindlich gegenüber BAC waren bzw. möglicherweise eine Resistenz aufgebaut haben. Die Proteobakterien der Subklasse Gamma nahmen durch die Kontamination mit BAC nach drei Wochen im sandigen Boden um rund 60 % gegenüber den anderen Bakteriengruppen zu, während im humusreichen Boden von Anfang an (sofort nach Zugabe von BAC) Gram<sup>+</sup> Bakterien mit einem niedrigen G+C- Gehalt stärker (30 %) vertreten waren. SUNDHEIM *et al.* (1992) konnten z.B. eine Adaptation und Resistenz von Gram<sup>+</sup> Bakterien zu BAC beobachten, während LANGSRUD und SUNDHEIM (1997) eine Adaptation von Gram<sup>-</sup> Bakterien wie *Pseudomonas* spp. beschrieben haben. Untersuchungen von To *et al.* (2002) mit *Listeria monocytogens* (Gram<sup>+</sup>), adaptiert an BAC, zeigten eine Induzierung eines Effluxsystems. Ausserdem sind Bakterien allgemein fähig, Biofilme und eine extrazelluläre Saccharid-Polymer Schicht (EPS) zu erzeugen (COSTERTON *et al.*, 1987), die die Zellen direkt vor BAC und auch anderen Bioziden schützen. Dies könnte die teilweise starke Anreicherung bestimmter Bakteriengruppen im kontaminiert Boden erklären. Zu Biofilmen organisiert weisen Bakterien in der Regel völlig andere Eigenschaften auf. Hier akkumulieren und tauschen sie Nährstoffe aus, weisen auch Resistenzen gegenüber Fressfeinden auf.

Die Verwertung von hydrophoben Substraten stellt für Mikroorganismen eine besondere Schwierigkeit dar, da diese Verbindungen wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser (wie z. B. Tebuconazol) nicht bioverfügbar sind. Einige Bakterien produzieren daher Lösungsvermittler (Biotenside), welche wie Waschmittel die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen. Diese Verbindungen (z.B. Lichenysin A, ein zyklisches Lipoheptapeptid) werden nicht-ribosomal synthetisiert und das dafür verantwortliche Enzym enthält Domänen, welche die einzelnen Aminosäuren der Verbindung zusammenfügen.

In einem natürlichen Boden resultieren die Effekte der Kontamination nicht nur durch die aquatische Phase, was Untersuchungen mit stark absorbierenden Substanzen zeigten (RÖNNPAGEL *et al.*, 1998). Tebuconazol (TEB), ein sehr schlecht wasserlösliches Biozid, zeigte sich stark wirksam gegenüber fast alle Bakterienarten. Sowohl in Flüssigkultur als auch im Boden zeigte sich keine bevorzugte Wirkung auf Gram<sup>+</sup> oder Gram<sup>-</sup> Bakterien. TEB hat einen relativ hohen log K<sub>OW</sub>-Wert, es verhindert die Sterolproduktion und beeinflusst damit die Zellwandproduktion der Organismen. TEB wurde in den Flüssigkulturen in Konzentrationen bis zu seiner Wasserlöslichkeitsgrenze eingesetzt und zeigte eine Abnahme der lebenden Zellen der Bakterien *B. subtilis*, *A. globiformis* und *S. meliloti* bis 50 %. Dies lässt vermuten, dass die wasserlösliche Menge ausreicht, um die Bakterien zu schädigen. Generell binden sich Pestizide mit hohen log K<sub>OW</sub>-Werten stark an das organische Material im Boden und an Sedimente und bewegen sich dadurch nicht weit im System Boden, sondern tendieren dazu sich zu akkumulieren. Es konnte gezeigt werden, dass TEB selbst über längere Wirkzeit im Boden noch eine toxische Wirkung zeigte, die sich teilweise noch verstärkte durch dreiwöchiges Einwirken von TEB (Proteobakterien der Subklasse Gamma nahmen im Verhältnis noch mal um 20 % ab), während BAC keine Steigerung der toxischen Wirkung über eine längere Zeit aufweist. Der Anstieg einer bestimmten Bakteriengruppe in BAC und TEB kontaminierten Böden zeigte sich stärker durch die BAC Kontamination. In humusreicheren Böden nahmen die Gram<sup>+</sup> Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt und im sandigen Boden verstärkt Proteobakterien der Subklassen Gamma und Alpha zu. Eine ähnliche Zunahme durch die TEB Kontamination bei den Proteobakterien der Subklasse Gamma zeigte sich dagegen nur vereinzelt. Wie aus den Versuchen in Flüssigkultur gezeigt werden konnte, befinden sich unter den Proteobakterien der Subklasse Gamma tolerante sowie auch zum Abbau fähige Organismen befinden. Weiterhin kann BAC durch seine gute Wasserlöslichkeit eher dem System Boden durch die längere Wirkzeit entzogen worden sein.

Naphthalin, das als vorrangige Verunreinigung von der US Environmental Protection Agency genannt wird, findet sich meistens in industriellen Abwässern. Es gilt als leicht abbaubar und wird daher oft als Modellsubstanz für *in situ* Biodegradation (biologischer Abbau) eingesetzt (PANDEY und JAIN, 2002). Dennoch zeigten sich in dieser Arbeit die untersuchten Bakterienarten stark beeinflusst. In den Mischkulturen setzte sich nur der zum Naphthalinabbau fähige *P. fluorescens* durch. Das verfügbare Substrat (hier Glucose) in den Flüssigkulturen wurde langsamer abgebaut als in den Kontrollen. Da *P. fluorescens* Naphthalin als C-Quelle nutzen, schienen die anderen Bakterienarten in der Kultur durch den Stress das Substrat nicht mehr nutzen zu können. Anders als in den mit BAC und TEB

versetzten Flüssigkulturen, wurde hier die Glucose schneller verbraucht (4 Stunden nach Zugabe schon ein gesteigerter Glucoseverbrauch von über 60 % im Vergleich zur Kontrolle).

2,4-D verhindert die Zellteilungen, die Bildung von neuem Zellgewebe und verursacht Wachstumsstörungen mit eventuell sogar totaler Zellzerstörung. Niedrige Konzentrationen können auch Wachstum stimulieren. In dieser Arbeit zeigte 2,4-D sich hauptsächlich gegen Gram<sup>+</sup> Bakterien (mit Ausnahme von *A. spec.*) wirksam, und nur bedingt gegen die Gram<sup>-</sup> Bakterien. *A. spec.*, fähig, 2,4-D abzubauen, war sowohl in Reinkultur nicht beeinträchtigt und setzte sich auch in den Mischkulturen durch. *P. fluorescens*, der sich aus den Untersuchungen in Reinkultur sich als tolerant gegenüber 2,4-D erwies, konnte sich in einer Mischkultur mit *A. spec* nicht durchsetzen (Abnahme von *P. fluorescens* um 20 - 40 % gegenüber der Kontrolle). Offenbar konnte *P. fluorescens* das zugeführte Substrat nicht mehr nutzen und in der Kontrolle ohne 2,4-D wurde mehr Glucose (9mal soviel) verbraucht. An diesem Beispiel ist sehr gut zu erkennen, dass die Untersuchungen an einer Modellgemeinschaft gut geeignet sind, Auswirkungen von Bioziden zu charakterisieren.

Atrazin war gegen die ausgewählten Bakterienarten am wenigsten wirksam, sowohl in den Untersuchungen der Reinkulturen als auch in Mischkulturen. Der Glucoseverbrauch war in Mischkulturen, in denen zum Abbau fähige Organismen (*P. fluorescens*) und das entsprechende Biozid vertreten waren um das 10fache geringer als in BAC und TEB kontaminierten Kulturen, von denen noch keine Abbauer bekannt sind. Dieses liegt daran, dass leicht abbaubare Substrate (Glucose) bei ausreichender Konzentration immer vor schwer abbaubaren genutzt werden und zu einer Anreicherung von schnellwachsenden Arten führt (hier beobachtete, Anreicherung von *P. fluorescens*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*). Durch die Untersuchungen in Flüssigkulturen lassen sich Abschätzungen über die Wirkung von Bioziden auf die Bakterien machen. Es wird vermutet, dass auch hier ein Effluxsystem eine Rolle spielt, da Atrazin gut löslich ist. Allerdings erfordern Aussagen über Resistenz und Adaptation weitere Untersuchungen.

Über den Mechanismus der Adaptation ist bisher nicht viel bekannt. Untersuchungen an BAC resistenten Bakterien zeigten eine Änderung des Fettsäure-Profiles (To *et al.*, 2002). Gram<sup>-</sup> Bakterien sind generell resistenter (RUSSELL und GOULD, 1988; McDONNELL und RUSSELL, 1999); ihre äußere Membran fungiert als Barriere und limitiert damit den Zugang vieler chemisch zellfremder Substanzen (HANNCOCK, 1984; AYRES *et al.*, 1993; PAULSEN *et al.*, 1997). Ein wichtiges Kriterium für die Stressempfindlichkeit, bzw. Toleranz der Bakterien gegenüber Stress (hier in Form von Kontamination) ist, ob das genutzte bzw.

verfügbare Substrat ausreichende Energie zur Verfügung stellen kann (REBER und WENDEROTH, 1997).

Im Boden ist die Aktivität der Mikroorganismen wegen geringer Verfügbarkeit (Konzentration) der Substrate immer geringer als beim Wachstum im Labormedium. Daher leben die Mikroorganismen im Boden meist am Existenzminimum und reagieren besonders empfindlich auf Stress (hier besonders in Form von Bioziden), wenn sie keine spezifische Resistenz besitzen und die Effizienz der Substratnutzung nicht, z. B. durch Mutation, verbessern können. Sporulierende Gram<sup>+</sup> Bakterien können diesen Stress im Boden teilweise überdauern und den Boden wiederbesiedeln. Ob auch ein Großteil der Gram<sup>-</sup> Bakterien diese Fähigkeit besitzt für sie ungünstige Perioden zu überwinden und bei entsprechenden günstigen Umweltbedingungen wieder zu wachsen, ist unklar. Der Boden wird hauptsächlich durch Gram<sup>+</sup> Bakterien besiedelt (LINDAHL *et al.*, 1997; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; SMALLA *et al.*, 2001), die sensitiv gegenüber Schwermetallstress sind. Untersuchungen an schwermetallkontaminierten Böden zeigten eine Verschiebung in der Population im Boden zu einer Gram<sup>-</sup> dominierten Bakteriengemeinschaft (RÖNNPAGEL *et al.*, 1998; REBER und WENDEROTH, 1997). Im hier untersuchten Bodensystem nahmen die Gram<sup>+</sup> Bakterien nur bedingt gegenüber den Gram<sup>-</sup> Bakterien ab. Dieses lag zum einen daran, dass die verwendeten Sonden (HGC69a und LGC354 A-C) fast die gesamten Gram<sup>+</sup> Bakterien detektierten, während die Sonden ALF968 und GAM42a nur zwei Unterklassen der Proteobakterien und damit nur einen kleinen Teil der Gram<sup>-</sup> Bakterien, detektierten. SANDAA *et al.* (1999) beobachteten einen selektiven Vorteil der Proteobakterien der Subklasse Alpha gegenüber anderen Bakterien in Böden mit hohen Metallkonzentrationen. Durch die Zugabe von organischen Bioziden zeigten sie auch in dieser Untersuchung nach längerer Zeit eine scheinbare Unempfindlichkeit. Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich bestimmte Bakterienarten bzw. -gruppen unter unterschiedlichen Kontaminationen durchsetzen oder sogar anreichern können. In den Flüssigkulturen setzte sich zum Beispiel *A. spec* durch, da er das 2,4-D abbauen kann, und *P. fluorescens*, da er einerseits Naphthalin abbauen kann und andererseits generell sehr unempfindlich gegenüber vielen Schadstoffen ist. Im Boden setzte sich gerade bei der BAC Kontamination, besonders nach dreiwöchiger Einwirkung, Gram<sup>+</sup> Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt durch, da sie sich an BAC adaptieren und zum anderen durch Sporulation überdauern können. Die Untersuchung in Modellsystemen eignet sich gut, um die unterschiedlichen Reaktionen (Abbau/ Unempfindlichkeit) der Bakterienarten zu beschreiben. Auch die Untersuchungen im Boden, wenn auch im Rahmen dieser Arbeit nur exemplarisch durchgeführt, zeigten,

dass die optimierte FISH-Technik durchaus geeignet ist, Biozidauswirkungen zu untersuchen und darzustellen.

Aus den unterschiedlichen Untersuchungen scheinen Naphthalin, BAC und TEB die größte Auswirkung auf die „Nicht-Zielorganismen“ zu haben. Um eine wirklich aussagekräftigere Bewertung machen zu können, benötigt man allerdings noch weiter ökotoxikologische Untersuchungen (z.B. Chloroform-Fumigations-Extraktionsmethode, Urease- und Proteaseaktivität).

## 5.4 Kritische Betrachtung und Ausblick

Die Beschreibung der bakteriellen Diversität in Umweltproben ist eine Grundvoraussetzung, um den Einfluss von natürlichen oder anthropogenen Umweltveränderungen feststellen zu können. Dazu ist eine möglichst gute Kenntnis der bakteriellen Besiedlung, sowohl vor als auch nach dem Schadstoffeintrag, notwendig. Hierzu ist die Verfügbarkeit von angemessenen Methoden erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Einführung eines Modellsystems und die Weiterentwicklung der FISH-Technik, für Untersuchungen in Bodensystemen geeignet ist, Biozide hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung auf Bodenmikroorganismen einzuschätzen. Durch die Wahl einer auf die Fragestellung abgestimmten bakteriellen Modellgemeinschaft (z.B. Auswirkung von Bioziden auf Nitrifikanten) lassen sich mit diesem Untersuchungsmodell Biozide vor ihrem Einsatz überprüfen.

Seit Einführung der FISH-Technik als Werkzeug zur Untersuchung der bakteriellen Population in Umweltproben wird diese Methode hauptsächlich zur Überprüfung von technischen Systemen zur Abwasserbehandlung (AMANN *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 1993; MANZ *et al.*, 1992) angewendet. Mit Hilfe gruppenspezifischer Sonden konnte durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass durch Biozidkontamination bestimmte Bakteriengruppen im Boden unterschiedlich beeinflusst werden. Das Wissen über metabolisch aktive Mikroorganismen in verunreinigten Böden ist relevant, um optimale *in situ* Bioremediations-Strategien (mikrobiologische Sanierung) zu entwickeln. Ebenso wichtig ist die Identifikation von bis jetzt noch unbeschriebenen (z.B. noch nicht kultivierten)



Bakterien, welche möglicherweise eine wichtige, wenn auch noch unbekannte Rolle im Schadstoffabbau oder anderen Materialumbauprozessen spielen.

Die Analyse verunreinigter Böden unter Verwendung der FISH-Technik zeichnet sich – gerade im Vergleich mit klassischen kultivierungsabhängigen Techniken – durch einen geringen Zeitbedarf aus. Von der Probenahme bis zum Fluoreszenzbild werden nur zwei bis drei Tage benötigt. Untersuchungen mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ermöglichen es, quantitativ bestimmte Bakteriengruppen in ihrer natürlichen Zusammensetzung aufzuzeigen (gleichzeitig erlaubt sie Aussagen über mögliche morphologische Änderungen). Andererseits können durch Bestimmung der Anwesenheit bestimmter Gene Sonden konstruiert werden, mit denen bestimmte Funktionen im Boden verfolgt werden können. KOZDRÓJ und VAN ELSAS (2001) gelang es auf diese Weise, mit Hilfe von Sonden metallresistente Bakterien in verunreinigten Böden zu detektieren. Somit könnten mit der FISH-Technik verunreinigte Böden (hinsichtlich ihres selbstreinigenden Potentials) kontrolliert und außerdem potentielle Abbauer bestimmter Schadstoffe detektiert werden.

Allerdings sollte eine abschließende Bewertung der FISH-Technik zur Untersuchung der bakteriellen Diversität in Umweltproben auch vor dem Hintergrund des generellen methodischen Ansatzes gesehen werden. Die Analyse der 16S rRNA/DNA mit molekularbiologischen Methoden ist, aufgrund der weiten Verbreitung und der Genstruktur mit konservierten und variablen Bereichen geradezu ein ideales Ziel der genotypischen Untersuchung. Daraus resultieren allerdings auch Probleme, die betrachtet und bewertet werden müssen. So kann z.B. die Existenz von mehreren Kopien mit geringen Sequenzunterschieden des ribosomalen Gens, die zu Fehlbindungen führen können, eine Fehlinterpretation herbeiführen. Gensonden sollten daher regelmäßig durch gängigen Datenbanken überprüft werden, um dieses Problem zu minimieren. Ein anderes Problem liegt in der bis heute noch nicht gänzlich gelungenen Automatisierung der FISH-Technik (LEE und HALKJÆR, 1999).

Grundsätzlich ist die Analyse der genetischen Information von Bakterien ein zusätzliches Mittel zur Identifizierung der vertretenden Arten und deren Populationsstruktur in Umweltproben. Gerade in Verbindung mit anderen Charakterisierungstechniken, stehen heute eine ganze Reihe von Methoden zur Verfügung, die je nach Fragestellung und untersuchter Matrix verwendet werden können. Durch die rasant fortschreitende Entwicklung der molekularbiologischen Techniken sind auch für die Umweltbiologie in Zukunft wesentliche Verbesserungen zu erwarten. Der „Zyklische RNA Ansatz“ spielt dabei eine besondere Rolle. Dabei werden die Gesamtnukleinsäuren eines Habitats isoliert, darin befindliche Gene für die rRNA über PCR Techniken vervielfältigt, diese Gene durch Klonierung verein-

zelt und anschließend deren Nukleinsäuresequenz bestimmt. Konstruiert man nun spezifische Sonden, die spezifisch an Abschnitte der neu erhaltenen Sequenz hybridisieren, kann man durch FISH die mikrobielle Vielfalt und Häufigkeit bestimmter Organismen selbst in komplexen Habitaten untersuchen und der Zyklus ist damit geschlossen. Aber wie erwähnt, es können nur bestimmte Organismen mit FISH untersucht werden.

Unterschiedliche Methoden zur Beschreibung von Mikroorganismen in Umweltproben können unter Umständen voneinander abweichende Ergebnisse erzielen. Daher muss die zu benutzende Methode sorgfältig ausgewählt werden (WIDADA *et al.*, 2002). Alternative Methoden bieten die sogenannten „Fingerprint“-Methoden (*siehe Kapitel 2.4.2*), bei denen DNA-Moleküle unter bestimmten Bedingungen getrennt werden. Das entstehende Bandenmuster gibt dabei Auskunft über die mikrobielle Artenzusammensetzung. Allen „Fingerprint“-Methoden geht die PCR voraus und stellt damit eine zusätzliche Fehlerquelle dar. Nicht nur Huminsäuren (TSAI und OLSON, 1992; TEBBE und VAHJEN, 1993), sondern auch andere in den Proben vorhandene Stoffe können die PCR stören wie z. B. Eisen und andere zweiwertige Ionen (ABU AL-SOUD und RADSTRÖM, 1998). Auch Störsubstanzen, die durch die Zellyse eingebracht werden können zu einer Inhibierung der PCR führen, z. B. SDS und Phenol (WILSON *et al.*, 1997).

Die Analysen der vervielfältigten 16S rRNA mittels der DGGE/TGGE zeigen hauptsächlich methodische Probleme: zum einem in der Handhabung, aber auch prinzipiell, wie zum Beispiel durch das Auflösungsvermögen. Das hohe Auflösungsvermögen von nur einer einzigen Base, führt auch bei der Verwendung von Reinkulturen zum Auftreten von mehreren Banden (GARCIA-PICHEL *et al.*, 1996; KOWALCHUK *et al.*, 1997; ROSADA *et al.*, 1998). Allerdings können durch das Anfärben der DGGE-Gele mit Silbernitrat selbst Banden mit einem Gehalt von nur 0,5 – 2 ng DNA nachgewiesen werden, was gerade bei der Detektion von Zielsequenzen, die in extrem geringen Konzentrationen vorliegen bzw. bei einer durch Inhibitoren verringerten PCR-Effizienz, von Bedeutung ist.

Eine weitere Alternative der hochauflösenden gelelektrophoretischen Trennung ist die SSCP-Methode. Auch hier treten einige methodische Nachteile auf. Durch die Denaturierung des DNA-Doppelstranges vor der Elektrophorese treten häufig drei Banden, sogar bei der Analyse von nur einer DNA-Sequenz, auf. Ein anderes Problem ist die hohe Rate der Wiedervereinigungen der DNA-Stränge während der Elektrophorese, gerade bei hohen DNA-Konzentrationen (SELVAKUMAR *et al.*, 1997). Hohe DNA-Konzentrationen werden aber oft für Untersuchungen von extrem diversen Gemeinschaften benötigt. SCHWIEGER und

TEBBE (1998) konnten allerdings durch Einführen von einer Methode, und damit weiteren Arbeitsschritten, die Leistung dieser Methode erhöhen.

Noch eine weitere Alternative ist die T-RFLP-Methode. Die Besonderheit dieses Verfahrens liegt darin, dass es im Gegensatz zu den anderen „Fingerprint“-Methoden Muster erzeugt, die direkte phylogenetische Ableitungen ermöglichen. Die Korrelation zwischen T-RFs und phylogenetischen Informationen ist jedoch nicht in allen Fällen gegeben, da Organismen, die verschiedenen monophyletischen Gruppen angehören, durch das gleiche T-RF charakterisiert sein können. Daher müsste diese Methode mit anderen Methoden kombiniert werden.

Trotz all der methodischen Nachteile sollte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, die auch einige methodische Einschränkungen aufweist (s.u. 5.1.4 und 5.2), mit anderen Methoden günstig kombiniert werden, z.B. mit DGGE. Die DGGE-Trennung ist ein idealer Ausgangspunkt für weitere Analysenmethoden (Sequenzierung) und beschreibt die Änderung der Zusammensetzung keiner bestimmten Art, sondern im Ganzen. Durch Einsatz von spezifischen Primern in der vorgeschalteten PCR kann die DGGE verwendet werden, um einzelne Stämme einer Art zu unterscheiden (ROSADO *et al.*, 1998) bis hin zur Analyse von übergeordneten Gruppen (MURRAY *et al.*, 1996). Während FISH die einzige Methode ist, die auch eine quantitative Aussage über die Bakterienzusammensetzung von ausgewählten Bakterienarten zulässt, geben die „Fingerprint“-Methoden eine Aussage über die generelle Änderung in der Bakterienzusammensetzung und sind eine wichtige Ergänzung. Probleme bereitet allerdings immer noch die qualitative Aussage über die Aktivität der Bakterien. Auch hier gibt es seit einiger Zeit neue Methoden, basierend auf molekularbiologischen Methoden, wie z.B. die Anwendung von Mikrosensoren, die in der Kombination mit FISH eine vielversprechende Methodik für ökologische Fragestellungen darstellt (AMANN und KÜHL, 1998).

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1993: Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No. 5): 1318- 1324.
- Abraham, W.-R., 2002: Molekulare mikrobielle Ökologie. In: *Forschungs- und Entwicklungsarbeiten*, Forschungsschwerpunkt: Umweltbiotechnologie.
- Abu Al-Soud, W., Rådström, P., 1998: capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR- inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (No. 10): 3748- 3753.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990: Combination of 16S rRNA- targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (No. 6): 1919- 1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995: Phylogenetic Identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* **59** (No.1): 143- 169.
- Amann, R.I., Kühn, M., 1998: In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 352- 358.
- Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M., 1998: Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 205- 215.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1987: A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **10**: 215 - 221.
- Anderson, D.W., Schoenau, J.J., 1993: Soil humus fractions. In: *Soil sampling and methods of analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. (Hrsg.: Carter, M.R.) Lewis Publisher, Boca Raton Ann Arbor, London, Tokyo.
- Andersson, S., Valeur, I. 1994: Influence of lime on soil respiration; leaching of DOC, and C/S relationships in the mor humus of haplic podsol. *Environment International* **20**: 81- 88.
- Alloway, B.J., Ayres, D.C., 1996: Schadstoffe in der Umwelt. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Kap. 2.
- Atlas, R.M., 1995: Handbook of Media for Environmental Microbiology. *CRC Press Inc.* pp. 540.
- Atlas, R.M., Horowitz, A., Krichevsky, M., Bej, A.K., 1991: Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology* **22**: 249- 256.

- Ayres, H., Furr, J.R., Russell, A.D., 1993: A rapid method of evaluating permeabilizing activity *Pseudomonas aeruginosa*. *Letter of Applied Microbiology* **17**: 149-151.
- Bååth, E., 1989: Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air and Soil Pollution* **47**: 335- 379.
- Bååth, E., Frostegard, A., Pennanen, T., Fritze, H., 1995: Microbial community structure and pH response in relation to soil organic-matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 229 - 240.
- Bartsch, K., Cypionka, H., Overmann, J., 1999: Evaluation of cell activity and methods for the cultivation of bacteria from a natural community. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 249– 259.
- Beck, T., Capriel, P., Müller, C., 1992: Das Bodenbeobachtungsprogramm der LBP. Ergebnisse humusreicher und bodenmikrobiologischer Untersuchungen. Bayer. Staatsm. f. Ernähr., Landwirtsch. und Forsten, Schule und Beratung
- Beltrame P., Beltrame, P.L., Carniti, P., 1984: Inhibiting action of chloro- and nitro- phenols on biodegradation of phenol: A structure-toxicity relationship. *Chemosphere* **13** (No. 1): 3- 9.
- Bliefert, C., 1994: Umweltchemie. Wiley-VCH, 2. Auflage, pp. 510.
- Bloem, J., Ruiter, P.C., Koopman, G.J., Lebbink, G., Brussard, L., 1992: Microbial numbers and activity in dried and rewetted arable soil under integrated and conventional management. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 655 - 665.
- Bossio, D.A., Scow, K.M., 1995: Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (No. 11): 4043- 4050.
- Bossio, D.A., Scow, K.M., Gunapala N., Graham, K.J., 1998: Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* **36** (1): 1- 12.
- Buckley, D.H., Schmidt, T.M., 2001: The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* **42** (1): 11-21.
- Bussmann, I., Philipp, B., Schink, B., 2001: Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **47**: 41- 50.
- Braun-Howland, E.B., Danielson, S.A., Nierzwicki-Bauer, S.A., 1992: Development of a rapid method for detecting bacterial cells in situ using 16S rRNA- targeted probes. *BioTechniques* **13**: 928- 933.
- Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P., Ritchie, D.A., 1992: Amplification of DNA from native populations of soil bacteria using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (No. 10): 3413- 3416.

- Christensen, H., Hansen, M., Sørensen, J., 1999: Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (No.4): 1753- 1761.
- Costerton, J.W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* **41**: 435- 464.
- Dahlin, S., Witter, E., 1998: Can the low microbial biomass-C-to-organic C ratios in an acid and a metal contaminated soil be explained by differences in growth characteristics, substrate utilization efficiency or maintenance requirements? *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 633- 641.
- Dahlin, S., Witter, E., Mårtensson, A.M., Turner, A., Bååth, E., 1997: Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1405- 1415.
- Daims, H., Ramsing, N.B., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 2001: Cultivation- independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (No. 12): 5810- 5818.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1989: Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360- 1363.
- Devereux, R., Kane, M.D., Winfrey, J., Stahl, D.A., 1992 : genus- and group- specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 601- 609.
- DIN 38412-48 – *Arthrobacter globiformis* Kontakttest für kontaminierte Feststoffe (L48). Ref. Nr. E DIN 38412-48: 2000-xx.
- DIN ISO 17155 – Bestimmung der Abundanz und Aktivität der Bodenmikroflora mit Hilfe von Atmungskurven. Ref. Nr. DIN ISO 17155:2003-06.
- Dott, W., van Afferden, M., Ahlf, W., Croeißmann, G., Daei, B., Dorgerloh, M., Eikmann, T., Fabig, W., Gauglitz, U., van Gestel, C.A.M., Hartmann, A., Hund, K., Kaestner, M., Kalnowski, G., Kanne, R., Mueller-Wegener, U., Mueller-Markgaf, W., Pfeifer, F., Schaefer-Treffenfeld, W., Rippen, G., Schulz-Berendt, V., Sellner, W.M., Sprenger, B., Weißenfels, W.D., Werner, D., Wiegand-Rosinus, M., Wiesner, J., Wilke, B.M., 1995: Biologische Testmethoden für Böden. 4. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umwelttechnologie-Böden". DECHEMA Deutsche Ges. f. Chemische Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. Frankfurt am Main.
- Eller, G., Frenzel, P., 2001: Changes in activity and community structure of methane-oxidizing bacteria over the growth period of rice. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (No.6): 2395- 2403.

- EN 113 - Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzzerstörende Basidiomyceten. Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit. CEN: 1996.
- Fantroussi, S. el, Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999: Effect of Phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community- level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (No. 3) 982- 988.
- Fuhrmann, J.A., Comeau, D.E., Hagström, Å., Chan, A.M., 1988: Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Applied and Environmental Microbiology* **54** (No. 5): 1426- 1429.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L., Muyzer, G. 1996: Phenotypic analysis show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (No.9): 3248- 3291.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A., 2001: Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (No. 3): 1351- 1362.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 1998: Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 1389- 1414.
- Giovanni, S.J., DeLong, E.F., Olson, G.J., Pace, N.R., 1988: Phylogenetic group- specific oligonucleotide probes for the identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* **170**: 720- 726.
- Griffiths, B.S., Díaz- Raviña, M., Ritz, K., McNicole, J. W., Ebbelwhite, N., Bååth, E., 1997: Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 103- 112.
- Gunapala N., Scow, K.M., 1998: Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 805– 816.
- Gupta, S.K., Hani, H., Santschi, E., Stadelmann, F.X., 1987: Effect of graded doses of nickel on the yield, the nickel content of lettuce and the soil respiration. *Toxicological and Environmental Chemistry*. **14**: 1- 10.
- Hahn, D., Amann, R., Zeyer, J., 1993: Whole-cell hybridization of *Frankia* strains with Fluorescence- or Dioxigenin- Labeled, 16S rRNA – targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No.6): 1709- 1716.
- Hancock, R.E.W., 1984: Alterations in membrane permeability. *Annual Review of Microbiology* **38**: 237- 264.

- Harmsen, H.J.M., Kengen, H.M.P., Akkermans, A.D.L., Stams, A.J.M., deVos, W.M., 1996: Detection and localization of syntrophic propionate- oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA- based Oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (No.5): 1656- 1663.
- Haughland, R.P., 1996: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. *Molecular Probes, Inc.*
- Heipieper, H.J., de Bont, J.A.M., 1994: Adaption of *Pseudomonas putida* S 12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (No.12): 4440- 4444.
- Holben, W.E., Jansson, L.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988: DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology* **54** (No. 2): 703- 711.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998: Impact of culture- independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180** (No. 18): 4765- 4774.
- Hulpke, H., Koch, H.A., Wagner, R., 1993: Römpp Lexikon Umwelt. Georg Thieme Verlag
- Illstedt, U., Nordgren, A., Malmer, A., 2000: Optimum soil water for soil respiration before and after amendment with glucose in humid tropical acrisols and a boreal mor layer. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1591- 1599.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M., 2002: Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (No. 5): 2391- 2396.
- Jurgens, G., Glöckner, F.-O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M., Münster, U., 2000: Identification of novel Archea in bacterioplankton of boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Ecology* **34**: 45- 56.
- Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U., 1997: Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (No. 11): 4164- 4170.
- Kelley, J.J., Häggblom, M., Tate, I.I.I., 1999: Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1455- 1465.
- King, T.C., Sirdeskumukh, R., Schlessinger, D. 1986: Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in prokaryotes. *Microbiological Review* **50**: 428- 451.



- Klein, P.G., Juneja, V.K., 1997: Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (No.11): 4441- 4448.
- Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M., Caldwell, D. E., 1996: Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (No. 11): 3939- 3947.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., 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** (No.4): 1489- 1497.
- Kozdrój, J., van Elsas, J. D., 2001: Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods* **43**: 197- 212.
- Langsrud, S. Sundheim, G., 1997: Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. Exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 705- 712.
- Lee, N., Halkjær, P., et al., 1999: Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography – a new tool for structure- function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (No. 3): 1289- 1297.
- Lindahl, V., Frostegard, Å., bakken, L., Bååth, E., 1997: Phospholipid fatty acid composition of size fractionated indigenous soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1565- 1569.
- Loyd, J., Taylor, J.A., 1994: On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* **8**: 315- 323.
- Malkomes, H.-P., 1997: Messung der Effekte von Pflanzenschutzmittel auf mikrobielle Aktivitäten im Boden: II. Einfluß von Glukose und mineralischem Stickstoff auf die substratinduziert Kurzzeitmessung. *Agribiological Research* **50**: 2.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H., 1992: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 593- 600.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.L., 1999: Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (No.4): 1721- 1730.
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999: Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Review* **12** (No. 1): 147- 179.
- Merkel, W., Manz, W., Szewzyk, U., Krauth, K., 1999: Population dynamics in anaerobic wastewater reactors: modelling and in situ characterization. *Water Research* **33**: 2392- 2402.

- Merlin, G., Lissolo, T., Morel, V., Rossel, D., Tarradellas, J., 1995: Precautions for routine use of INT- reductase activity for measuring biological activities in soil and sediments. *Environmental Toxicology and Water Quality* **10** (3): 185- 192.
- Mitterer, M., Bayer, H., Schinner, F., 1981: Der Einfluss von Fungiziden auf die mikrobielle Aktivität eines Bodens. *Zentralblatt der Pflanzenernährung und Bodenkunde* **144**,
- Moreno, J.L., García, C., Landi, L., Falchini, L., Pietramellara, G., Nannipieri, P., 2001: The ecological dose value (ED<sub>50</sub>) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 483- 489.
- Müller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S., Sørensen, S.J., 2002: The diversity and function of Soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology* **44**: 49- 58.
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996: Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (No.7): 2676- 2680.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No.3): 695- 700.
- Nannipieri, P., 1994: the potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace P.R. (Eds.). *Soil biota: Management in Sustainable Farming Systems*, CSIRO, Australian: 238- 244.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.-H., 1998: Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA- targeted probes. *Microbiology* **144**: 3257- 3266.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet- Brossa, E., Rossello- Mora, R., Amann, R., Timmis, K. N., 2001: Combined use of 16S ribosomal DNA and 16 S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl- polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (No. 4): 1874- 1884.
- Omar, S.A., Abdel-Sater M.A., 2001: Microbial population and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water, Air, and Soil Pollution* **127**: 49- 63.
- Ouverney, C.C., Fuhrmann, J.A., 1997: Increased fluorescence intensity of 16S rRNA *in situ* hybridization in natural samples treated with Chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (No.7): 2735- 2740.
- Øvreås, L., Torsvik, V., 1998: Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* **36**: 303- 315.

- Pandey, G., Jain, R.K., 2002: Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (No. 12): 5789- 5795.
- Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S., Saier, M.H., 1997: A family of gram-negative outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **156**: 1-8.
- Peylo, A., 1993: Borbestimmung im Holz durch Extraktion mit Mannitol. *Holz als Roh- und Werkstoff* **51**: 335- 338.
- Poulsen, L., Ballard, K.G., Stahl, D.A., 1993: Use of rRNA fluorescence in situ hybridisation for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No.5): 1354- 1360.
- Ramos, J.L., Duques, E., Rodríguez-Herva, J.-J., Godoy, P., Haïdours, A., Reyes, F., Fernández-barrero, A., 1997: Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (No. 7): 3887- 3890.
- Reber, H.H., Wenderoth, D.F., 1997: Diversität und metabolische Vielseitigkeit von Mikroorganismengemeinschaften im Boden. *Schriftreihe des BML“ Angewandte Wissenschaft“ Heft 465* „Biologische Vielfalt im Ökosystem“: 168- 184.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1994: In situ probing of gram- positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**: 2849- 2858.
- Rønn, R., McCaig, A.E., Griffiths, B.S., Prosser, J.I., 2002: Impact of Protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (No.12): 6094- 6105.
- Rönnpapel, K., Janßen, E., 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** (No. 6): 1291- 1304.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., van Elsas, J.D., 1998: Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (No. 8): 2770- 2779.
- Ruelle P., 2000: The n-octanol and n-hexane/ water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics. *Chemosphere* **40** (No. 5): 457- 512.
- Russell, A.D., Gould, G.W., 1988: resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied and Bacteriological Symposiums and Supplements* **65**: 167S- 195S.

- Saito, H., Koyasu, J., Yoshida, K., Shigeoka, T., Koike, S., 1993: Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationship with 1-octanol/water partition coefficient. *Chemosphere* **26** (No. 5): 1015- 1028.
- Salonius, P.O., 1981: Metabolic capabilities of forest soil microbial populations with reduced species diversity. *Soil Biology and Biochemistry* **13**: 1- 10.
- Sandaa, R.-A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D., 1999: Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 237- 251.
- Schachtschabel, P., Blume, H.-P., Brümmer, G., Hartge, K.-H., Schwertmann, U., 1992: Lehrbuch der Bodenkunde. (Hrsg.: F. Scheffer) Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. ISBN 3-432-84773.
- Schleifer, K.H., Ludwig, W., Amann, R., 1992: Gensonden und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. *Naturwissenschaften* **79**: 213- 219.
- Schoknecht, U., Gunschera, J., Marx, H.-N., Marx, G., Peylo, A., Schwarz, G., 1998: Holzschutzmittelanalytik – Daten- und Literaturzusammenstellung für Wirkstoffe in geprüften Holzschutzmitteln. *Forschungsbericht 225 der Bundesanstalt für Materialprüfung und –Forschung*. pp.156.
- Schwieger, F., 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** (No. 12): 4870- 4876.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H., 1999: Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA- targeted oligonucleotides reveals localization of methanodens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (No. 3): 1280- 1288.
- Selvakumar, N., Ding, B.-C., Wilson, S.M., 1997: Separation of DNA strand facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *BioTechniques* **22**: 604- 606.
- Sikkema J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994: Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **269** (2): 1015-1028.
- Silver, S., Misra, T. K., 1988: Plasmid- mediated heavy metal resistance. *Annual Review of Microbiology* **42**: 717- 743.
- Smalla K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G., 2001: Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant- dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (No. 10): 4742- 4751.
- Smith, P., 1995: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. **150**: 76-85.

- Smith, G.B., Tiedje, J.M., 1992: Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (No. 1): 376- 384.
- Stark, J.M., Firestone, M.K., 1995: Mechanism for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (No. 1): 218-221.
- Tarradellas, J., Bitton, G., 1996: Chemical Pollutants in Soils. In: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D.: "*Soil Ecotoxicology*" CRC Press, Inc., 1996, 3-32.
- Tebbe, C., 2002: Was Mikroorganismen für den Boden tun. In: *Forschungsreport – Schwerpunkt Biologische Vielfalt* **2**: 22- 25.
- Tebbe, C.C., Vahjen, W., 1993: Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No. 8): 2657- 2665.
- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W., 2002: Postadapational resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent physicochemical modification of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (No. 11): 5258- 5264.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L., 1990: High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (No. 3): 782- 787.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in Microbiology* **5** (Issue 3): 240- 245.
- Tsai, Y.-L., 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** (No. 7): 2292- 2295.
- van Beelen, P., Doelman, P., 1997: Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* **34** (No. 3): 455- 499.
- van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M., 2000: In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* **15**: 13- 24.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H., 1993: Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied Environmental Microbiology* **59** (No.5): 1520- 1525.
- Waid, J. S., 1999: Does soil diversity depend upon metabiotic activity and influences? *Applied Soil Ecology* **13**: 151- 158.
- Walton, B.T., Anderson, T.A., Hendricks, M.S., Talmage, S.S., 1989: Physicochemical properties as predictors of organic chemical effect on soil microbial respiration. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**: 53- 63.

- Weigel, H.-J., 2002: *Forschungs Report – Schwerpunkt Biologische Vielfalt* **2**: 1.
- Widada, J., Nojiri, H., Omori, T., 2002: Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic- degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 45- 59.
- Wilke, B.-M., Winkel, B.: Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes: Praxiserprobung biologischer Testverfahren. In: *Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Kapitel 9.3.1.*: 1- 26.
- Wilkinson, M.H.F., Schut, F., 1998: Quantitative Measurements of intestinal ecology by digital image analysed microscopy. *Bioscience and Microflora* **17**: 7- 14.
- Wilson, I.G., 1997: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (No. 10): 3741- 3751.
- Wise, M.G., McArthur, J.V., Shimkets, L.J., 1997: Bacterial diversity of a Carolina Bay as determined by 16S rRNA gene analysis: Confirmation of novel taxa. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (No. 4): 1505- 1514.
- Witter, E., Gong, P., Bååth, E., Marstorp, H., 2000: a study of the structure and metal tolerance of the soil microbial community 6 years after cessation of sewage sludge applications. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 1983- 1991.
- Woese, C.R., 1987: Bacterial evolution. *Microbiological Review* **51** (No. 2): 221- 271.
- Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., Hinton, S.M., 1993: Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction – amplifiable DNA from soils. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (No. 6): 1972- 1974.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.-Y., Marsh, T.L., O'Neill, R.V., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., 2002: spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (No.1): 326- 334.

## 7 Anhang

### 7.1 Dehydrogenaseaktivität nach Thalmann

GEBRAUCHSLÖSUNGEN:

- Tris- Puffer: 2,4 g Tris in 153,6 ml 0,1 M HCl – auffüllen auf 200ml mit Aqua dest
- TTC- Lösung:

| Boden                             | [TTC] in Tris- Puffer in % |
|-----------------------------------|----------------------------|
| humusarmer Sandboden              | 0,1                        |
| schluffige Sande, humöse Sande    | 0,3 – 0,4                  |
| Schluffe, humöse sandige Schluffe | 0,6 – 0,8                  |
| Tonige Schluffe                   | 0,8 – 1,0                  |
| Tone, Humusböden                  | > 1,0                      |

### 7.2 Wachstumsverhalten der Bakterien im Toleranztest

A:



B:



Abbildung 7.1: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Tebuconazol, **B:** M9- Platte mit Tebuconazol.

**A:**



**B:**



Abbildung 7.2: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne BAC, **B:** M9- Platte mit BAC.

**A:**



**B:**



Abbildung 7.3: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Atrazin, **B:** M9- Platte mit Atrazin.

**A:**



**B:**



Abbildung 7.4: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Naphthalin, **B:** M9- Platte mit Naphthalin.



A:



B:



Abbildung 7.5: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Chloramphenicol, **B:** M9-Platte mit Chloramphenicol.

A:



B:

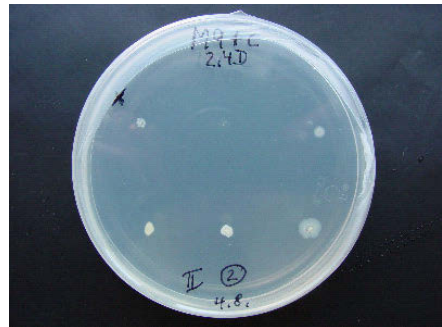


Abbildung 7.6: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne 2,4-D, **B:** M9-Platte mit 2,4-D.

A:



B:



Abbildung 7.7.: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Aceton, **B:** M9-Platte mit Aceton.

**A:**



**B:**

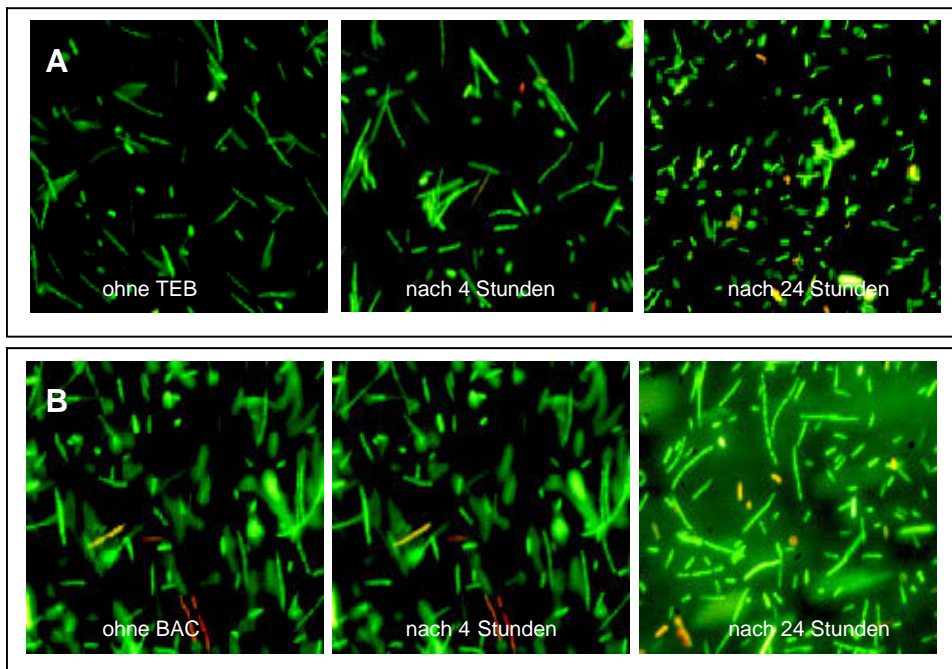


Abbildung 7.8.: Koloniewachstum auf M9-Platten: Von links oben nach rechts unten *A. sp.*, *B. subtilis*, *S. meliloti*, *C. glutamicum*, *A. globiformis*, *P. fluorescens*. **A:** M9-Platte ohne Ethanol, **B:** M9- Platte mit Ethanol.

### 7.3 Fluoreszenzbilder der verschiedenen Bakterienarten

#### *P. FLUORESCENS*

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit von *P. fluorescens*, sind in *Abbildung 7.9 A-F* dargestellt.



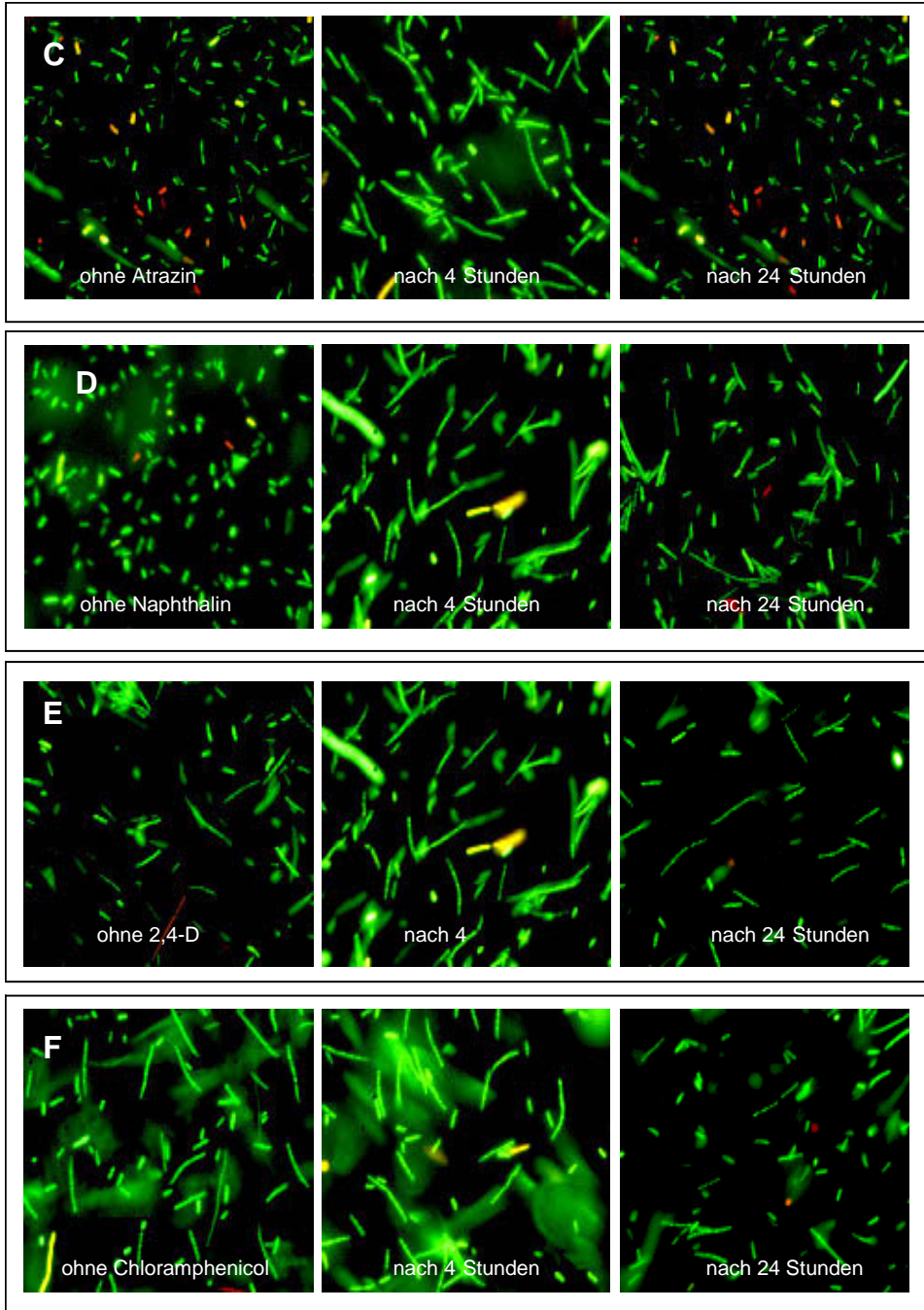
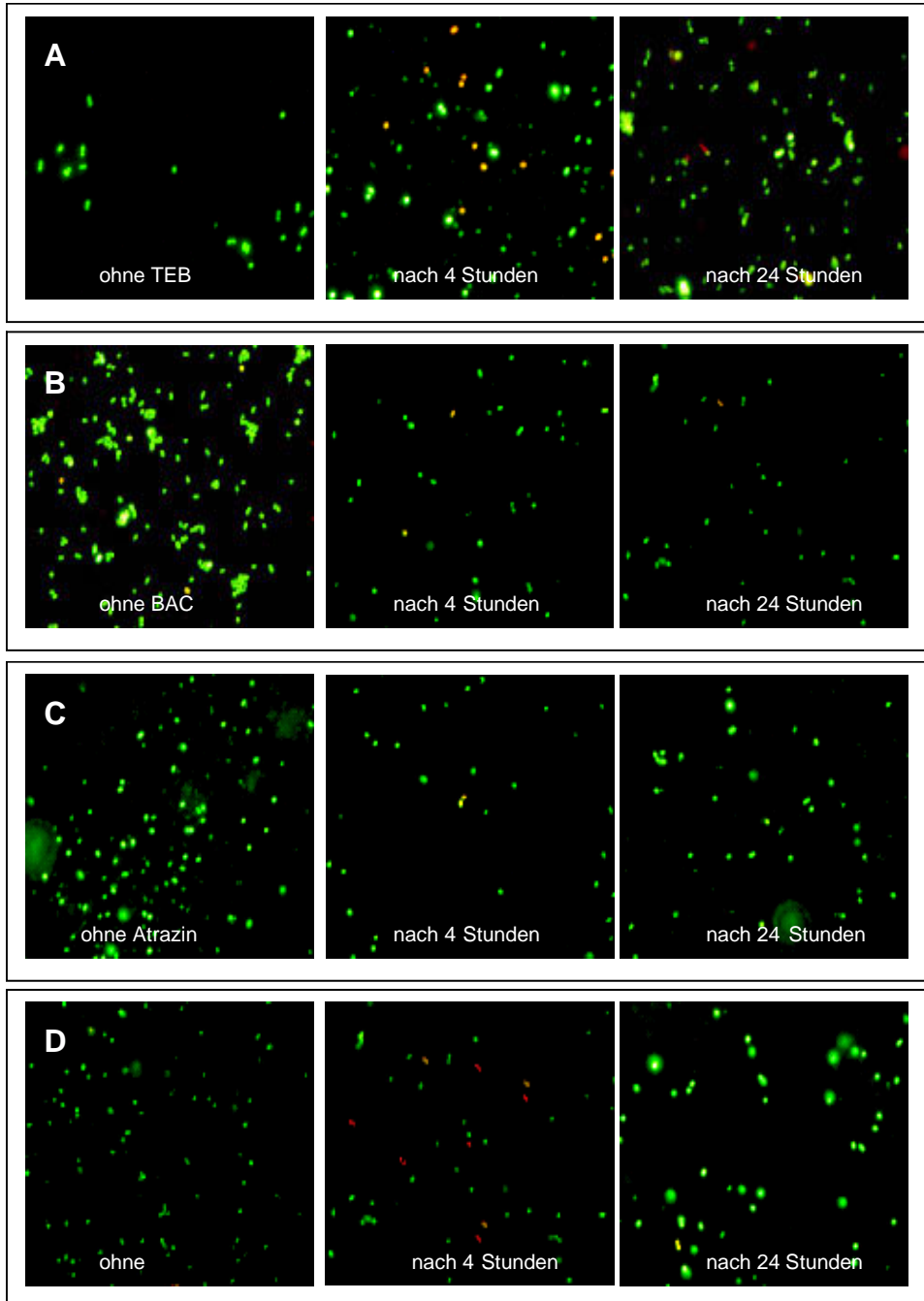


Abbildung 7.9: Fluoreszenzbilder von *P. fluorescens* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (erste Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte).

ARTHROBACTER SP.

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit von *A. sp.*, sind in *Abbildung 7.10 A-F* dargestellt.



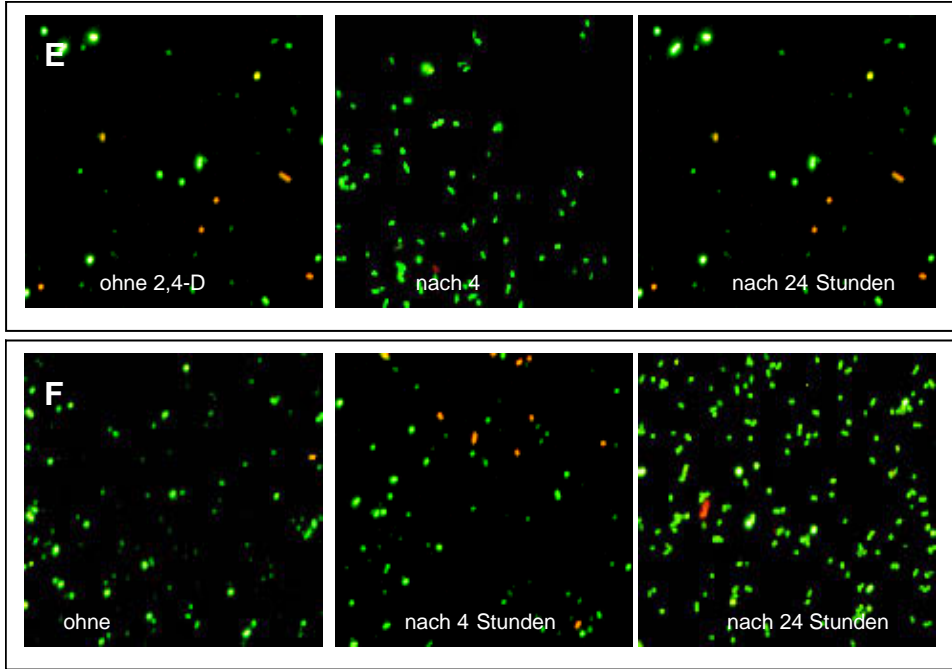
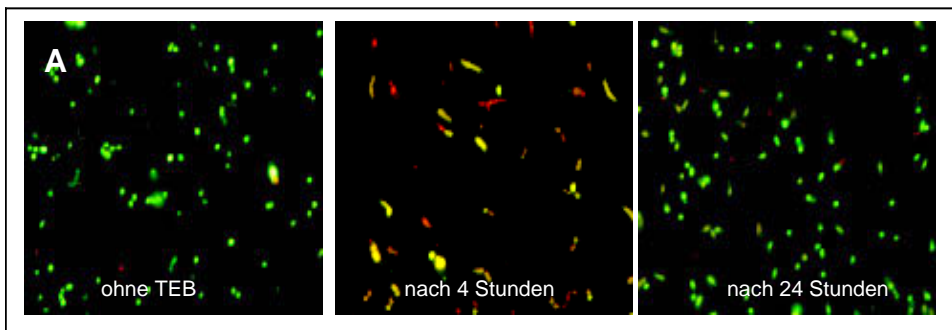
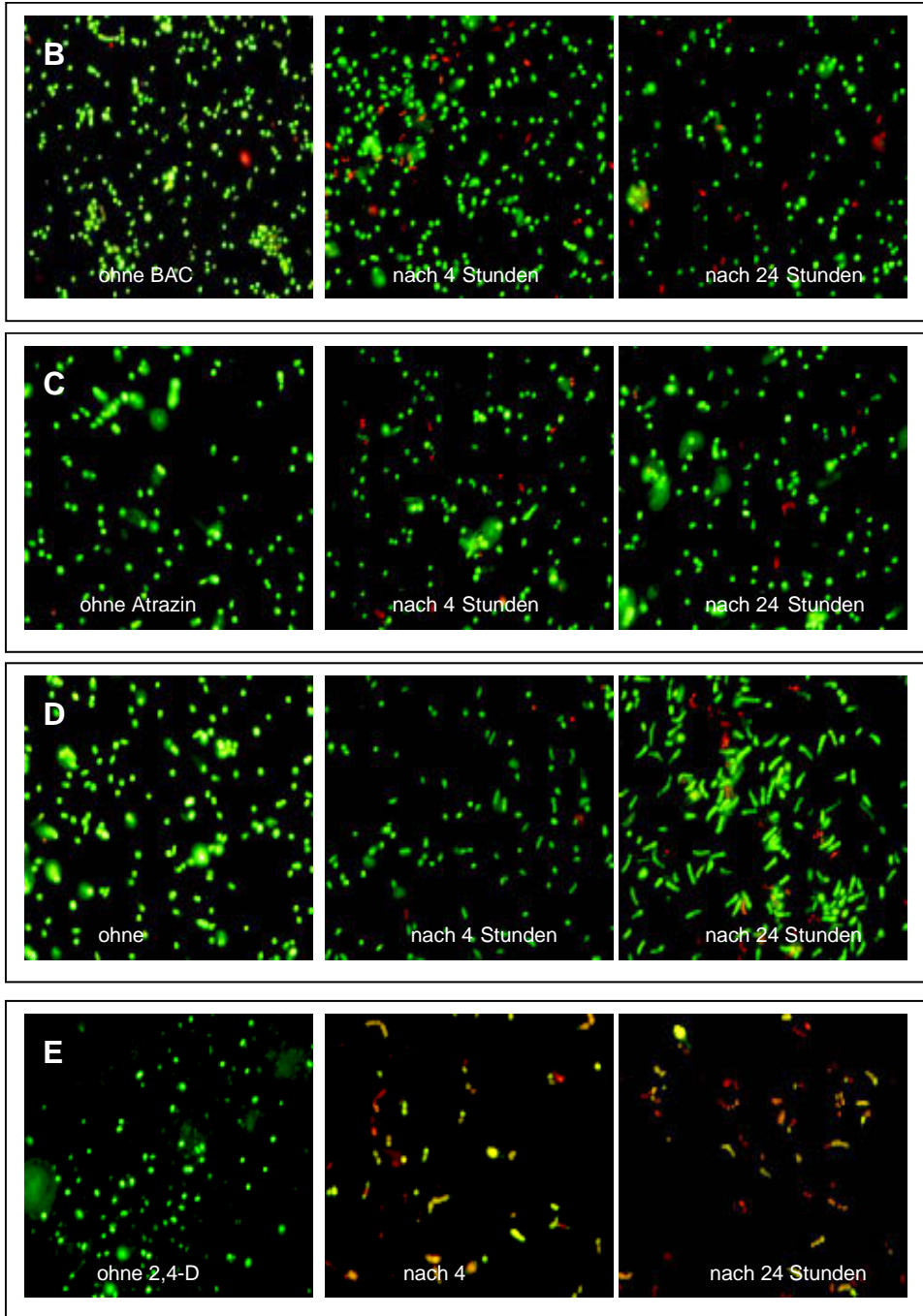


Abbildung 7.10: Fluoreszenzbilder von *A. sp.* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (1. Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte).

#### ARTHROBACTER GLOBIFORMIS

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit von *A. globiformis*, sind in *Abbildung 7.11 A-F* dargestellt.





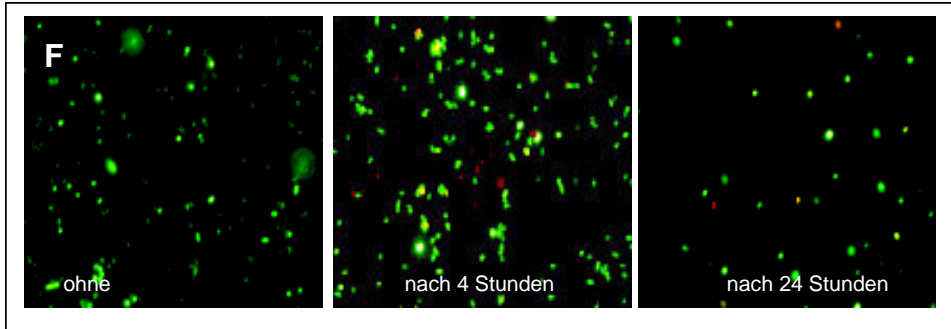
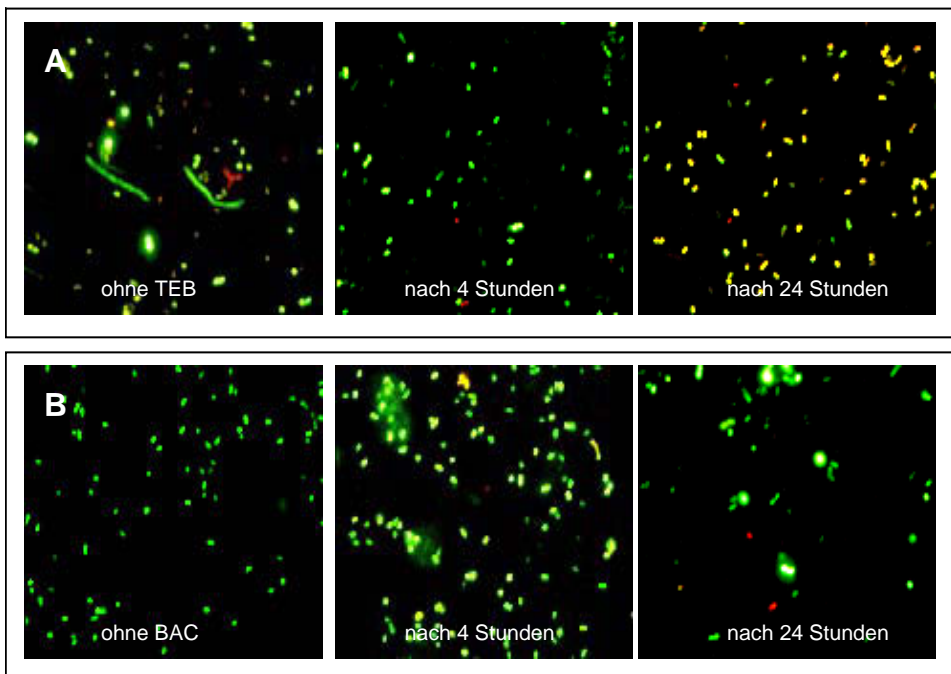


Abbildung 7.11: Fluoreszenzbilder von *A. globiformis* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (1. Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte).

#### SINORHIZOBIUM MELILOTI

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit von *S. meliloti*, sind in *Abbildung 7.12 A-F* dargestellt.



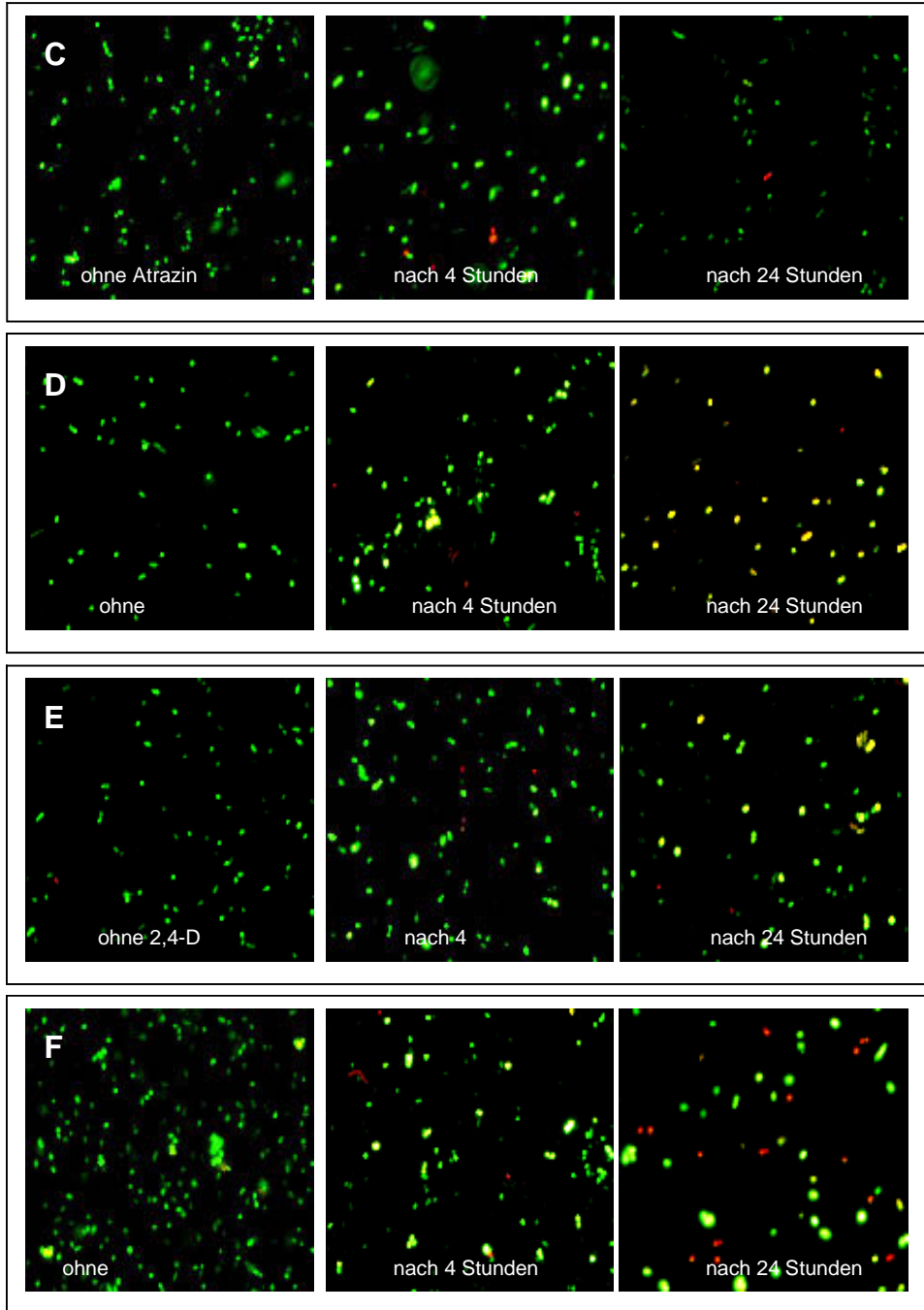
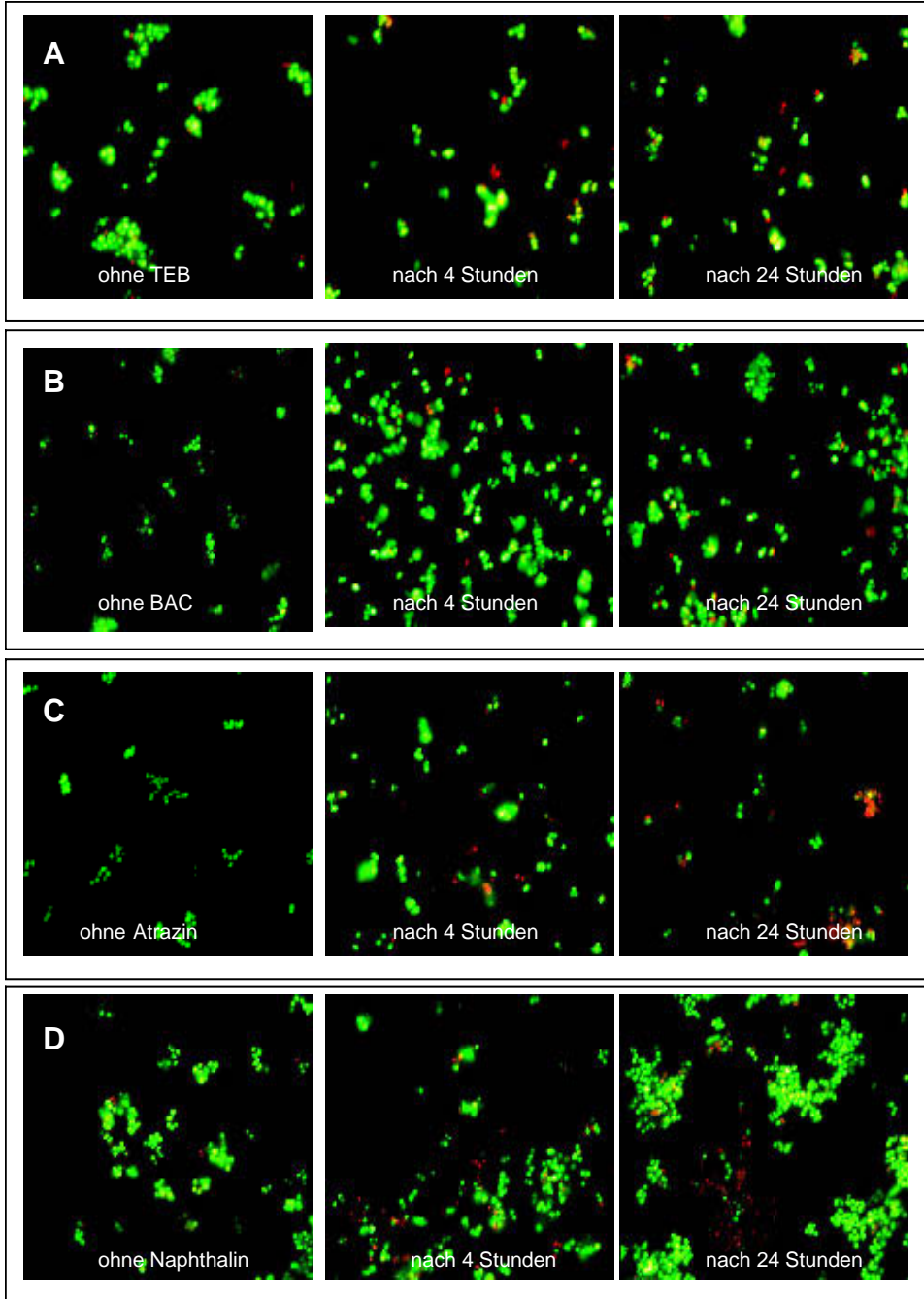


Abbildung 7.12: Fluoreszenzbilder von *S. meliloti* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (1. Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte).



CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

Die Auswirkungen der verschiedenen Biozide auf die Lebensfähigkeit von *C. glutamicum* sind in *Abbildung 7.13 A-F* dargestellt.



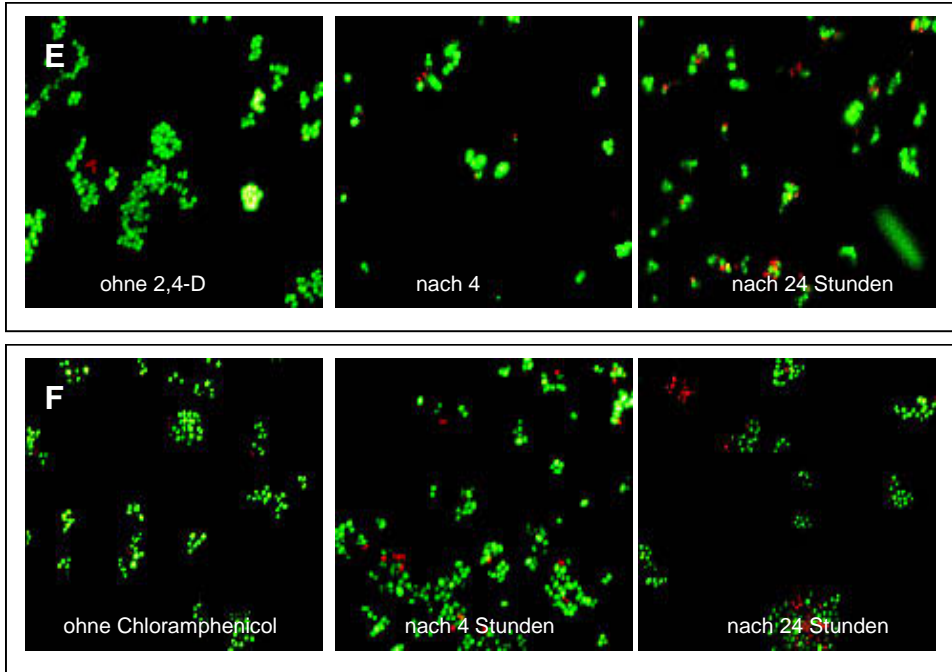


Abbildung 7.13: Fluoreszenzbilder von *C. glutamicum* (1 000fache Vergrößerung) vor Biozidzufuhr (1. Spalte), 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe (2. bzw. 3. Spalte).

---

**7.4 TABELLENVERZEICHNIS**

|                     |  |            |
|---------------------|--|------------|
| <b>Tabelle 2.1</b>  | Lebewesen in den oberen 30 cm in einem Quadratmeter Boden  | <b>13</b>  |
| <b>Tabelle 3.1</b>  | Verwendete Biozide und ihre verwendete Konzentration in Flüssigkulturen und im Boden   | <b>31</b>  |
| <b>Tabelle 3.2</b>  | Übersicht über die ausgewählten Bakterien  | <b>42</b>  |
| <b>Tabelle 3.3</b>  | Verwendete Oligonukleotide Sonden; Zielorganismen; Sequenz; Formamid (FA) –Konzentration in % für optimale Stringenz; Quelle | <b>51</b>  |
| <b>Tabelle 3.4</b>  | Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe  | <b>52</b>  |
| <b>Tabelle 3.5</b>  | Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme   | <b>52</b>  |
| <b>Tabelle 3.6</b>  | NaCl- Konzentration im Waschpuffer   | <b>57</b>  |
| <b>Tabelle 4.1</b>  | Wachstumsbewertung der einzelnen Bakterienarten.   | <b>71</b>  |
| <b>Tabelle 4.2</b>  | Vergleich der Wirksamkeit der Biozide auf die einzelnen Bakterien nach 4 und 24 Stunden                                      | <b>78</b>  |
| <b>Tabelle 4.3</b>  | Wachstumsrate und Verdoppelungszeit der einzelnen Bakterien  | <b>81</b>  |
| <b>Tabelle 4.4</b>  | Bakterienkombinationen und Art der Schadstoffzugabe.   | <b>82</b>  |
| <b>Tabelle 4.5</b>  | Übersicht über die Änderung der einzelnen Bakterienarten   | <b>96</b>  |
| <b>Tabelle 4.6</b>  | Abnahme der Glucosekonzentration   | <b>97</b>  |
| <b>Tabelle 4.7</b>  | Eingesetzte Konzentrationen von TEB und BAC zur Bestimmung des Wirkungsbereiches.  | <b>98</b>  |
| <b>Tabelle 4.8</b>  | Übersicht zur Auswirkung der Biozidkonzentrationen auf $Q_r$ , der Lag-Phase und Peakmaximum                                 | <b>100</b> |
| <b>Tabelle 4.9</b>  | Dehydrogenaseaktivität im Boden  | <b>109</b> |
| <b>Tabelle 4.10</b> | Übersicht über die Auswirkung der Biozide auf die einzelnen Gruppen  | <b>120</b> |

---

## 7.5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                         |   |             |
|-------------------------|---|-------------|
| <b>Abbildung 2.1</b>    | <i>B. subtilis</i> ; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000facher Vergrößerung   | <b>20</b>   |
| <b>Abbildung 2.2</b>    | <i>P. fluorescens</i> ; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000facher Vergrößerung.   | <b>21</b>   |
| <b>Abbildung 2.3</b>    | <i>S. meliloti</i> ; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000facher Vergrößerung.  | <b>22</b>   |
| <b>Abbildung 2.4</b>    | <i>C. glutamicum</i> ; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000facher Vergrößerung.  | <b>23</b>   |
| <b>Abbildung 2.5</b>    | <i>A. globiformis</i> ; Aufnahme mit Reichert Polyvaar (Leica) bei einer 1000facher Vergrößerung.   | <b>24</b>   |
| <b>Abbildung 2.6</b>    | Schematische Darstellung der Gensondentechnik   | <b>28</b>   |
| <b>Abbildung 3.1</b>    | Versuchsaufbau des Modellsystem   | <b>32</b>   |
| <b>Abbildung 3.2</b>    | Beispiel der Auswertung einer Bodenatmungskurve   | <b>41</b>   |
| <b>Abbildung 4.1</b>    | Konzentrationsverlauf von Tebuconazol (n=24;± SD) im Holz nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau  | <b>62</b>   |
| <b>Abbildung 4.2</b>    | GC- Chromatogramme von Tebuconazol, erscheint bei einer Retentionszeit von etwa 11.,53 min; A: Chromatogramm von einer Bodenprobe; B: Chromatogramm einer Holzprobe.          | <b>63</b>   |
| <b>Abbildung 4.3</b>    | BAC-Werte (n=24; ± SD) im Holz und Boden nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau   | <b>64</b>   |
| <b>Abbildung 4.4</b>    | Kupfer-Werte (n=24; ± SD) im Holz und Boden nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau  | <b>65</b>   |
| <b>Abbildung 4.5</b>    | Bor-Werte (n=24; ± SD) im Holz und Boden nach 2, 8 und 16 Wochen Einbau   | <b>66</b>   |
| <b>Abbildung 4.6</b>    | Koloniebildende Einheiten (KBE) mit n=36 (±SD) vor Versuchsaufbau, nach 2, 8 und 16 Wochen, bezogen auf 1g Boden TS.  | <b>67</b>   |
| <b>Abbildung 4.7</b>    | Wachstumsverlauf der einzelnen Bakterien (n= 3) in den unterschiedlich modifizierten M9- Medien A: M9- Medium mit SL4 ohne Hefeextrakt, B: M9-Medium mit SL4 mit Hefeextrakt. | <b>70</b>   |
| <b>Abbildung 4.8</b>    | Korrelation der Live/Dead- Ergebnisse mit den OD- bzw. KBE- Ergebnissen am Beispiel der Auswirkung von TEB auf <i>S. meliloti</i> .   | <b>73</b>   |
| <b>Abbildung 4.9A-C</b> | Fluoreszenzbilder von <i>B. subtilis</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe   | <b>74</b>   |
| <b>Abbildung 4.9D-F</b> | Fluoreszenzbilder von <i>B. subtilis</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe   | <b>75</b>   |
| <b>Abbildung 4.10</b>   | Anzahl der lebenden Bakterien in [%];vor Biozidzugabe; nach 4 und 24 Stunden  | <b>76/7</b> |

|                       |   |               |
|-----------------------|---|---------------|
| <b>Abbildung 4.11</b> | Hemmung des Wachstums $\log K_{OW}$ gegenübergestellt   | <b>79</b>     |
| <b>Abbildung 4.12</b> | Lineare Regression des natürlichen Logarithmus vom $OD_{600nm}$ in der exponentiellen Phase gegen die Zeit        | <b>80</b>     |
| <b>Abbildung 4.13</b> | Glucosekonzentration und Proteingehalt der einzelnen Bakterienstämme  | <b>81</b>     |
| <b>Abbildung 4.14</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>C. globiformis</i> und <i>B. subtilis</i> ; Naphthalinzugabe  | <b>83</b>     |
| <b>Abbildung 4.15</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>84</b>     |
| <b>Abbildung 4.16</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>C. globiformis</i> und <i>B. subtilis</i> ; BAC-Zugabe        | <b>85</b>     |
| <b>Abbildung 4.17</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>85</b>     |
| <b>Abbildung 4.18</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>C. globiformis</i> und <i>S. meliloti</i> ; TEB-Zugabe        | <b>86</b>     |
| <b>Abbildung 4.19</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>87</b>     |
| <b>Abbildung 4.20</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>C. globiformis</i> und <i>S. meliloti</i> ; BAC-Zugabe        | <b>88</b>     |
| <b>Abbildung 4.21</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>88</b>     |
| <b>Abbildung 4.22</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>C. globiformis</i> und <i>S. meliloti</i> ; Atrazin-Zugabe    | <b>89</b>     |
| <b>Abbildung 4.23</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>90</b>     |
| <b>Abbildung 4.24</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>A. globiformis</i> und <i>S. meliloti</i> ; Naphthalin-Zugabe | <b>91</b>     |
| <b>Abbildung 4.25</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>92</b>     |
| <b>Abbildung 4.26</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>A. sp.</i> und <i>S. meliloti</i> ; Naphthalin-Zugabe         | <b>93</b>     |
| <b>Abbildung 4.27</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>93</b>     |
| <b>Abbildung 4.28</b> | Hybridisierte Zellen von <i>P. fluorescens</i> , <i>A. sp.</i> und <i>S. meliloti</i> ; 2,4-D Zugabe              | <b>94</b>     |
| <b>Abbildung 4.29</b> | Hybridisierte Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl  | <b>95</b>     |
| <b>Abbildung 4.30</b> | Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen von TEB und BAC  | <b>99/100</b> |
| <b>Abbildung 4.31</b> | Aufbau zur Messung der Bodenatmungskurven   | <b>101</b>    |
| <b>Abbildung 4.32</b> | Atmungskurven von HB-Boden und SB-Boden   | <b>102</b>    |
| <b>Abbildung 4.33</b> | Respiratorischer Aktivierungsquotient nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe  | <b>103</b>    |
| <b>Abbildung 4.34</b> | Lag-Phasen nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe   | <b>104</b>    |
| <b>Abbildung 4.35</b> | Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe  | <b>105/6</b>  |

|                          |   |               |
|--------------------------|---|---------------|
| <b>Abbildung 4.36</b>    | Steigung der Atmungskurven nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe   | <b>107</b>    |
| <b>Abbildung 4.37</b>    | Kumulative CO <sub>2</sub> - Entwicklung nach TEB, BAC, Aceton-Zugabe   | <b>108</b>    |
| <b>Abbildung 4.38</b>    | Schematische Darstellung der Verfahren zur Reinigung der Extrakte und Gewinnung von Fluoreszenzsignal                 | <b>111</b>    |
| <b>Abbildung 4.39</b>    | Koloniebildende Einheiten pro Gramm Boden in Abhängigkeit von der Schütteldauer                                       | <b>112</b>    |
| <b>Abbildung 4.40</b>    | KBE pro Gramm Boden nach 40 min Extraktion mit PVP K 30 und K90   | <b>112</b>    |
| <b>Abbildung 4.41</b>    | KBE pro Gramm Boden nach 40 min Extraktion bei unterschiedlicher Konz. von PVP K90                                    | <b>113</b>    |
| <b>Abbildung 4.42</b>    | KBE pro Gramm Boden unter Zugabe zur Extraktion von unterschiedlichen Mengen PVP/ TE- Puffer                          | <b>113</b>    |
| <b>Abbildung 4.43</b>    | Mit Sonde EUB 338 detektierte Zellen und durch DAPI-Färbung detektierte Zellen  | <b>114</b>    |
| <b>Abbildung 4.44</b>    | Verteilung der Bakterienarten im humusreichen Boden sofort nach der Biozidzugabe                                      | <b>116</b>    |
| <b>Abbildung 4.45</b>    | Verteilung der Bakterienarten im humusreichen Boden nach dreiwöchiger Lagerung nach der Biozidzugabe.                 | <b>117</b>    |
| <b>Abbildung 4.46</b>    | Verteilung der Bakterienarten im sandigen Boden sofort nach der Biozidzugabe  | <b>119</b>    |
| <b>Abbildung 4.47</b>    | Verteilung der Bakterienarten im sandigen Boden nach dreiwöchiger Lagerung nach der Biozidzugabe.                     | <b>119</b>    |
| <b>Abbildung 7.1-7.8</b> | Koloniewachstum auf M9-Platten; Unter TEB, BAC, Atrazin, Naphthalin, 2,4-D, Chloramphenicol, Aceton, Ethanol-Einfluss | <b>153/7</b>  |
| <b>Abbildung 7.9</b>     | Fluoreszenzbilder von <i>P. fluorescens</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe                      | <b>157/8</b>  |
| <b>Abbildung 7.10</b>    | Fluoreszenzbilder von <i>A. spec.</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe                            | <b>159/60</b> |
| <b>Abbildung 7.11</b>    | Fluoreszenzbilder von <i>A. globiformis</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe                      | <b>160/2</b>  |
| <b>Abbildung 7.12</b>    | Fluoreszenzbilder von <i>S. meliloti</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe                         | <b>162/3</b>  |
| <b>Abbildung 7.13</b>    | Fluoreszenzbilder von <i>C. glutamicum</i> vor Biozidzufuhr, 4 und 24 Stunden nach Biozidzugabe                       | <b>164/5</b>  |

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) und wurde von dieser finanziert. Dabei habe ich von vielen Personen Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Rudolph, der mir nicht nur ermöglichte meine Arbeit an der BAM durchzuführen, sondern auch für viele interessante und fachübergreifende Diskussionen Zeit fand.

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. U. Bismayer, der trotz räumlicher Entfernung die Arbeit stets engagiert begleitet hat, für die Freiräume in der inhaltlichen Gestaltung und vor allem für die Unterstützung in der Schlussphase.

Herrn Dr. H. Hertel danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Betreuung vor Ort auf „den letzten Metern“ der Arbeit, für seine Unterstützung und konstruktiven Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. K. Göller für die konstruktive Kritik und neuen Denkanstöße, die maßgebend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Sie ist für mich immer ein wichtiger, beruhigender und verlässlicher Pol gewesen.

Des weitern bedanke ich mich für die hilfreichen Impulse herzlich bei Frau Prof. Dr. E.M. Pfeiffer.

Frau Dr. U. Schoknecht, Frau Dr. H. Mathies und Hanni Bergmann danke ich für die vielfältige Hilfestellung bei den chemischen Analysen.

Herrn Prof. Dr. B.-M. Wilke und Maiko Mai danke ich für die Überlassung des Computerprogramms SNOOP-PLOT Demo Version 1.32 und für die Diskussion meiner Bodenatmungskurven.

Frau G. Petrowitz danke ich für die Unterstützung im Laboralltag, vor allem für die zuverlässige Zubereitung meiner sterilen Arbeitslösungen und Medien.

Für ein reibungsloses Arbeiten und immer freundliche Unterstützung bei allen Arbeitsanliegen sorgten die Menschen des Labors IV.1. der BAM sowie für einen Kalorienausgleich durch zahlreiche Eis- und Kuchengelage. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Last but not least danke ich sehr herzlich meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und ihre unendliche Geduld während der gesamten Zeit.