

Charakterisierung der mikrobiellen Population
und Untersuchungen zum Quorum Sensing
in der Rhizosphäre vom Weidelgras
(*Lolium perenne*) auf einer
Rückstandshalde der Kaliindustrie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von

Albert Dratwinski

aus Braunschweig

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Schmidt
2. Gutachter: Prof. Dr. Helge Schmeisky

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Rhizosphäre.....	1
1.2 Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre.....	2
1.3 Kalirückstandshalde Sigmundshall in Bokeloh.....	5
1.4 Quorum Sensing.....	7
1.5 Ziele dieser Studie.....	12
2 Material & Methoden.....	14
2.1.1 Verwendete Geräte.....	14
2.1.2 Verwendete Chemikalien.....	15
2.1.3 Enzyme und Reagenziensysteme.....	16
2.1.4 Primer.....	17
2.1.5 Verwendete Mikroorganismen.....	17
2.1.6 Kulturmedien.....	17
2.1.7 Hemmstoffe.....	19
2.1.8 Chemikalien für die DNA-Extraktion.....	19
2.1.9 Lösungen für die Gelelektrophorese.....	20
2.1.10 Nachweis des QS-Systems.....	21
2.2.1 Terminale Restriktionsfragmentanalyse (TRFLP).....	22
2.2.2 Probennahme.....	22
2.2.3 Ablösen der Mikroorganismen von der Bodenmatrix.....	22
2.2.4 Lyse der bakteriellen Zellen.....	24
2.2.5 Gelelektrophorese der extrahierten DNA.....	25
2.2.6 Aufreinigung der DNA.....	25
2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.3.2 16S rDNA PCR.....	26
2.3.3 Pseudomonaden-PCR.....	27
2.3.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	28
2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	28
2.3.6 Restriktionsanalyse der PCR-Produkte.....	28
2.3.7 Detektion der 16S-rDNA-Fragmentstücke.....	29
2.3.8 Auswertung der TRFLP-Daten.....	29
2.3.9 Analyse von TRF-Längen mit Microbial Community Analysis 3.....	31
2.4 Quorum Sensing.....	32
2.4.1 Biosensoren (Reporterstämme).....	32
2.4.2.1 Kultivierung & Isolierung von Rhizobakterien.....	32
2.4.2.2 Stammhaltung und Dauerkulturen.....	33
2.4.2.3 Zellernte und Bestimmung der optischen Dichte.....	33
2.4.3.1 Nachweis von AHL-Molekülen durch Kreuzstrich-Assay.....	33
2.4.3.2 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberständen.....	34
2.4.3.3 Dünnschichtchromatographie (DC).....	35
2.4.3.4 Softagar-Overlay mit Reporterstämmen (Biosensoren).....	36
2.5.1 Charakterisierung von Mikroorganismen.....	37
2.5.2 Identifizierung von Mikroorganismen mit API® 20 E/NE System.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1.1 TRFLP-Auswertung der bakteriellen Gemeinschaftsprofile.....	38
3.1.2.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-September Südhang (SH) 2008.....	39
3.1.2.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-September SH 2008.....	40

3.1.3.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-Juli Nordhang 2009.....	41
3.1.3.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-Juli NH 2009.....	44
3.1.4.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-Juli Südhang 2009.....	46
3.1.4.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-Juli SH 2009.....	49
3.2 Markante TRF in den Gemeinschaftsprofilen vom Nord- und Südhang.....	51
3.3.1 TRFLP-Ergebnisse Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften am Südhang 2008/2009 & Nordhang/Südhang 2009.....	51
3.3.2 TRFLP-Ergebnisse Mai Südhang 2008/2009 im Vergleich.....	51
3.3.3 TRFLP-Ergebnisse Juni Südhang 2008/2009 im Vergleich	52
3.3.4 TRFLP-Ergebnisse Juli Südhang 2008/2009 im Vergleich.....	53
3.3.5 TRFLP-Ergebnisse Mai 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich.....	55
3.3.6 TRFLP-Ergebnisse Juni 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich.....	56
3.3.7 TRFLP-Ergebnisse Juli 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich.....	57
3.4 Ergebnisse Quorum Sensing.....	60
3.4.1 Ergebnisse der Kreuzstrich-Assays.....	60
3.4.2 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie.....	61
3.5. Charakterisierung und Identifikation des AHL-Produzenten G-2.....	62
4. Diskussion.....	63
4.1 TRFLP-Analyse der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft	63
4.1.2 TRFLP-Fehlermöglichkeiten.....	71
4.2 Quorum Sensing.....	75
4.2.1 Häufigkeit von mikrobiellen AHL-Produzenten in der Rhizosphäre von <i>Lolium perenne</i>	75
4.2.2 Identifikation des AHL-Produzenten und Charakterisierung der AHL-Struktur der gebildeten Botenstoffe	76
5. Ausblick.....	78
6. Zusammenfassung.....	80
7. Literatur.....	82
8. Danksagung.....	96
9. Erklärung	97

Abkürzungsverzeichnis

AHLs	<i>N</i> -Acylhomoserinlactone
AI	Autoinducer
BHT	<i>N</i> -Butanoyl-L-homocysteinthiolacton
bp	Basenpaare
CFU	Colony Forming Unit
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dDHL	<i>N</i> -Dodecanoyl-L-homoserinlacton
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DHL	<i>N</i> -Decanoyl-L-homoserinlacton
dGTP	2'-Desoxyguanin-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
C6-HSL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton
HHL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton
MO	Mikroorganismen
NH	Nordhang
OHL	<i>N</i> -Octanoyl-L-homoserinlacton
3-Oxo-C8-HSL	3-Oxo- <i>N</i> -Octanoyl-L-homoserinlacton
PCR	Polymerasekettenreaktion
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Südhang
sp.	Spezies
tDHL	<i>N</i> -Tetradecanoyl-L-homoserinlacton
TGGE	Temperatur Gradientengelelektrophorese

TRF	Terminales Restriktionsfragment
TRFLP	Terminale Restriktionsfragmentanalyse
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Rhizosphäre

Lorenz Hiltner gilt als Pionier bezüglich der Erforschung der Rhizosphäre und der Bodenmikrobiologie (Hiltner, 1904). Laut Hiltner ist die Rhizosphäre der Bodenbereich, der von den Pflanzenwurzeln beeinflusst wird. Weiteren Studien zufolge wird die Rhizosphäre grob in drei Bereiche unterteilt: Rhizosphäre, Wurzeloberfläche und die Wurzel selbst.

Die Rhizosphäre ist der Bereich des Bodens, der von den ausgeschiedenen organischen Substanzen (Wurzelexsudaten) der Pflanzen beeinflusst wird und somit Auswirkungen auf die Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft hat (Grayston et al., 1996). Zu den Wurzelexsudaten gehören Monomere wie Glucose und Aminosäuren aber auch polymere Substanzen wie z. B. Polysaccharide und Proteine (Hawes and Lin, 1990; Hawes et al., 2003). Daneben können physikalische (Bodenbeschaffenheit, Dichte), chemische (Antibiotika, Schwermetalle) und biologische Faktoren (interspezifische Konkurrenz) ebenfalls die Struktur einer mikrobiellen Gemeinschaft formen (Sørensen, 1997; Brimecombe et al., 2001).

Zur Wurzeloberfläche gehören fest anhaftende Bodenpartikel. Das Wurzelgewebe der Wurzel kann von bestimmten Mikroorganismen, den Endophyten, besiedelt werden (Kennedy, 1998; Bowen and Rovira, 1999).

Die mikrobielle Kolonisierung der Wurzel und / oder Wurzeloberfläche wird als Wurzelkolonisierung definiert und die Besiedlung der Rhizosphäre wird Rhizosphärenkolonisierung genannt (Kloepper et al., 1991; Kloepper, 1994). Aufgrund des erhöhten Nährstoffvorkommens in der Rhizosphäre ist die bakterielle Zelldichte dort wesentlich höher als im Boden (Brimecombe et al., 2001). Die Nährstoffe sind Produkte der Photosynthese, die aus den Blättern zu den Wurzeln transportiert werden und schließlich als Wurzelexsudate in die Rhizosphäre ausgeschieden werden. Dieser Transport wird als Rhizodeposition bezeichnet. Die Rhizobakterien siedeln sich daher bevorzugt an Wurzelspitze, -epidermis und -cortex an und reagieren auf die von den Wurzeln ausgeschiedenen Nährstoffe (Lynch, 1990). Diese Interaktion zwischen Bakterien und Wurzel kann positive, negative oder überhaupt keine nachhaltigen Auswirkungen für die Pflanze haben.

Dabei können Pflanzenwachstum und -entwicklung, Nährstoffversorgung, Schwermetalltoleranz und die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber Krankheiten und abiotischen Streß beeinflusst werden (Barea et al., 2002; Barea et al., 2005; Bowen and Rovira, 1999; Lynch, 1990; Kennedy, 1998; Morgan and Whipps, 2001).

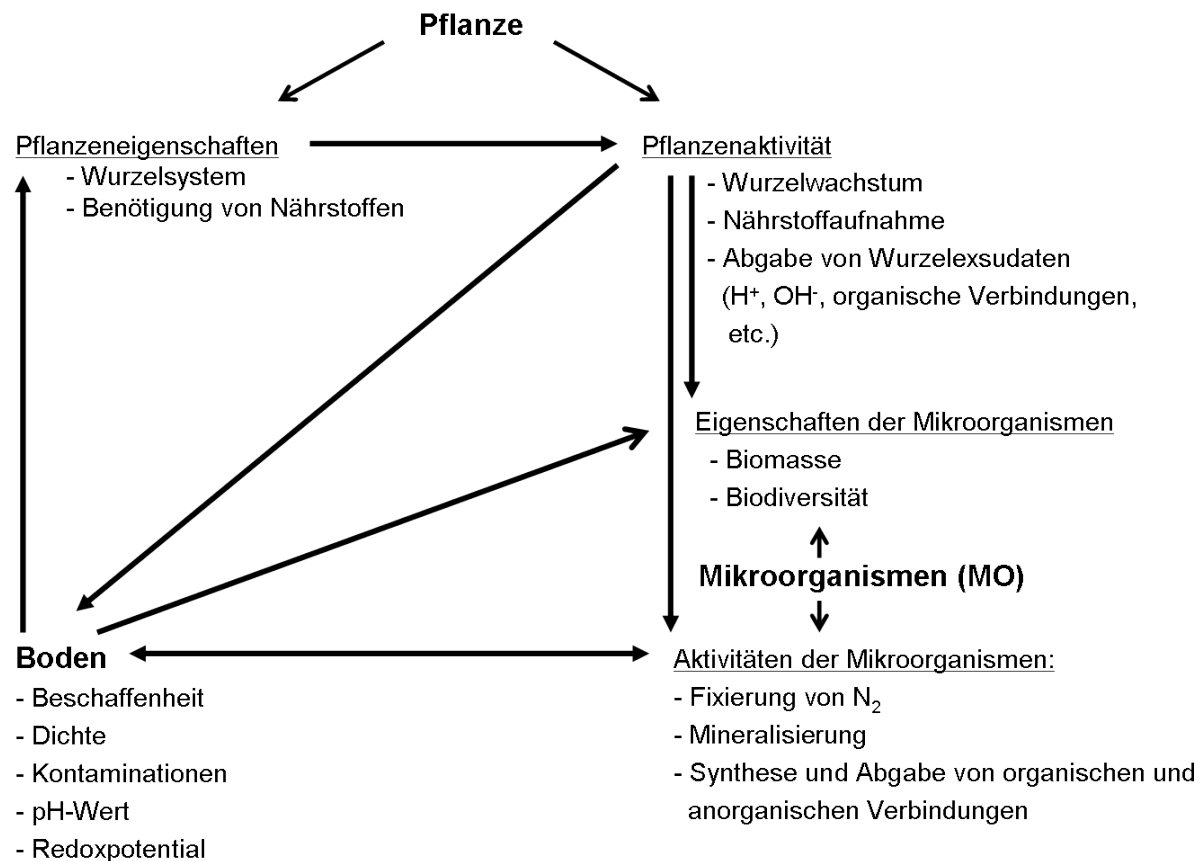


Abb. 1: Interaktionen zwischen Boden, Pflanze und Mikroorganismen (Lombi et al., 1999)

1.2 Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre

Der Sinn und Zweck der Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften ist die Ermittlung der Abundanz und Diversität von Mikroorganismen in ihrem Habitat, um die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft zu ermitteln. Im molekularökologischen Sinn wird die Biodiversität definiert als die Anzahl und Verteilung von unterschiedlichen Sequenztypen, die bei einer DNA-Extraktion in der Probe zu finden sind. Dabei können mikrobielle Gemeinschaften auf zwei Weisen beschrieben werden:

Zum einen mit kulturabhängigen und zum anderen mit kulturunabhängigen Methoden.

Bei der traditionellen, kulturabhängigen Methode werden die Mikroorganismen zunächst kultiviert und dann isoliert (van Elsas et al., 1998). Zu diesem Zweck stehen verschiedene Kulturmedien zur Verfügung, um den Nährstoffansprüchen diverser Gruppen von Bakterien zu genügen. Anhand der nun erhaltenen Stammsammlung werden die Bakterien auf metabolische, physiologische und morphologische Eigenschaften hin untersucht. Jedoch ergibt sich bei dieser Herangehensweise der Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften ein Problem: Die Abundanz und Vielfalt der im Labor kultivierten Mikroorganismen unterschreitet wesentlich die der Bakterien, die in der Umwelt vorzufinden sind. Diese Feststellung wird durch direkte, mikroskopische Zellzählungen bestätigt, bei denen die ermittelte Zellzahl weit über der Lebendzellzahl der kultivierten Keime liegt. Diese Lebendzellzahl beträgt in Böden nur 0,3% der mikroskopierten Bakterien (Amann, 1995; Holben et al., 1995; Pickup, 1991).

Kultivierungsunabhängige Methoden basieren im Allgemeinen auf PCR-Methoden und umgehen damit die Notwendigkeit einer Stammhaltung von Mikroorganismen mit all ihren eben erwähnten Widrigkeiten (Woese et al, 1987). Dabei werden die 16S und 18S ribosomale RNA (rRNA) oder ihre jeweiligen Gene (rDNA) als molekulare Chronometer für Pro- und Eukaryoten genutzt, welche ein hohes Maß an struktureller und funktioneller Konservierung aufweisen. Diese rRNA-Gene enthalten Domänen mit einem unterschiedlich hohen Gehalt an artspezifischen Sequenzänderungen (Woese et al, 1987). Durch die Ermittlung des Ausmaßes dieser Sequenzänderungen können phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen von Pro- und Eukaryoten gemessen werden. Mittels spezieller Primer werden bei einer PCR konservierte Regionen der 16S und 18S rDNA amplifiziert. Das Resultat sind dann unterschiedliche DNA Fragmente von diversen Spezies, die durch die PCR vermehrt werden konnten. Diese DNA-Fragmente können dann für die Erstellung von Klonbanken oder diversen Fingerprinttechniken verwendet werden.

Es gibt mittlerweile eine Reihe von Fingerprinttechniken, die mikrobielle Gemeinschaften analysieren können. Dazu zählen die **Amplifizierte rDNA Restriktionsanalyse (ARDRA)** (Massol-Deya et al., 1995), die **Denaturierende oder Temperatur Gradientengelelektrophorese (DGGE/TGGE)** (Heuer et al., 1997;

Muyzer et al., 1993; Muyzer & Smalla, 1998), der **Single-Strand-Conformation-Polymorphismus (SSCP)** (Schmalenberger & Tebbe, 2002), der **Ribosomale Intergenische Spacer-Längenpolymorphismus (RISA)** (Ranjard et al., 2001), der **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)** und der **Terminale Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus (TRFLP)** (Liu et al., 1997).

Diese Methoden können dafür verwendet werden, um Aussagen über die mikrobielle Population der Rhizosphäre zum jeweiligen Probennahmezeitpunkt zu treffen und Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft aufzuzeigen.

Mikrobielle Gemeinschaften in der Rhizosphäre werden durch den Boden, der Pflanzenart und durch die Bodennutzung geprägt.

Böden können bezüglich ihrer Beschaffenheit, Struktur, organischem Material, Mikroaggregatstabilität, pH und der Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Stickstoff, Phosphor und Schwefel variieren. Pflanzen üben einen selektiven Druck auf die bakterielle Gemeinschaft aus, indem sie abhängig von ihrer Art und ihrem Alter jeweils unterschiedliche Wurzelexsudate (Monomere wie Glucose und Aminosäuren aber auch polymere Substanzen wie z. B. Polysaccharide und Proteine) ausscheiden und damit den Mikroorganismen den Zugang zu diversen Nährstoffen ermöglichen. Die Bodenbearbeitung umfasst Maßnahmen wie Bewässerung, Einsatz von Düngemitteln und Herbiziden, Fruchtfolge bzw. Fruchtwechsel und die Auflockerung des Bodens (van Veen et al., 1997). Der Probennahmestandort der Rückstandshalde Sigmundshall (siehe 1.3) ist jedoch keine landwirtschaftlich genutzte Fläche und so treffen die Anwendungen bezüglich der Herbizide, Fruchtfolge bzw. Fruchtwechsel und die Auflockerung des Bodens in diesem Fall nicht zu.

Manche Mikroorganismen werden von sich ändernden Umweltbedingungen stärker betroffen als andere. Man unterscheidet hierbei K-Strategen von r-Strategen. Die K-Strategen kennzeichnen sich durch ein langsames Wachstum aus wie z.B. die Gattung *Arthrobacter* und die r-Strategen weisen hohe Wachstumsraten wie z.B. die Gattung *Pseudomonas* auf. Bei plötzlich eintretenden Nährstoffmangel werden die schnell-wachsenden r-Strategen empfindlicher gestört als die K-Strategen (van Veen et al., 1997).

Zu den typischen Bodenisolaten zählen die Stämme der Aktinobakterien, *Firmicutes* (grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt), der *Bacteroides* (alte Bezeichnung: *Cytophaga*, Flavobakterien und *Bacteroides*; **CFB**-Gruppe) und die

Klasse der Proteobakterien mit den Unterklassen α -, β -, γ -, δ - und ϵ - (van Elsas et al., 2007).

1.3 Kalirückstandshalde Sigmundshall in Bokeloh

Das niedersächsische Kaliwerk Sigmundshall in Bokeloh bei Hannover gehört zu den sechs Kaliproduktionsstätten in Deutschland, die der K+S AG angehören. Während des Kaliabbaus und der folgenden Kaliaufbereitung kommt es zu Produktionsrückständen, welche hauptsächlich Steinsalz (NaCl) beinhalten. Zudem befinden sich noch zusätzlich Sylvin (KCl), Kieserit ($\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), Carnallit ($\text{KCl} \times \text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), Anhydrit, Gips und Ton in den Rückständen. Die Bestandteile des Rückstands können jedoch von Werk zu Werk Unterschiede aufweisen (Krupp, 2004). Nach der anschließenden Verarbeitung bleiben ca. 66% der zu Tage geförderten Rohsalzmenge als unverwertbarer Rückstand übrig. 1/3 dieser Menge wird aufgehaldet (Krupp, 2004) und die verbliebenen 2/3 werden dazu genutzt, um die unter Tage leergeförderten Abbaugelände wieder aufzufüllen. Momentan werden 800.000 t/a aufgehaldet, doch in Zukunft soll diese Menge halbiert werden. Das Volumen der Rückstandshalde Sigmundshall in Bokeloh beträgt 16 Mio. m^3 auf einer Fläche von 40 ha. Salzige Haldenabwässer werden hierbei in einem Ringgraben gesammelt und über eine Pipeline in die Leine abgegeben (K+S, 1998).

Niederschlag bedingte Lösungserscheinungen der aufgehaldeten Rückstände führen zu einer Belastung des Grundwassers durch steigende Chloridkonzentrationen. Zudem gefährden sie die Stabilität der Haldenstruktur durch Erosion. Daher ist es nötig das Ausmaß der Haldenabwässer durch eine begrünbare Haldenabdeckung mit einer evapotranspirierenden Vegetation stark einzuschränken.

Der Haldenrückstand unterliegt jedoch Lösungs- und Rekristallisationsvorgängen und sorgt für eine bewegliche Oberfläche. Dieser Umstand erschwert die Abdeckung mit statischen Materialien (Schmeisky et al., 1993; Schmeisky & Lenz, 1998). Zudem kommt eine Abdeckung mit Boden auch nicht in Frage, weil dazu der Böschungswinkel der Halde zu hoch ist und daher auf 1:3 abgeflacht werden müsste. Für dieses Unterfangen steht aber nicht genügend Fläche zur Verfügung und die Verfügbarkeit von der benötigten großen Menge an Boden ist auch nicht gewährleistet. Aus der geschilderten Problematik wird nun ein Abdecksubstrat

benötigt, dass Standsicherheit bietet, gute plastische Eigenschaften hat und begrünbar ist, um eine dauerhafte Vegetationsdecke tragen zu können.

Zur Abdeckung der Rückstandshalde Sigmundshall in Bokeloh wird eine Substratmischung aus REKAL und SAV-Stabilisat verwendet. REKAL enthält einen 50%igen Salzanteil und ist ein Rückstand aus dem Aluminiumrecycling, dem es jedoch aufgrund einer tonigen, krümeligen und zum Teil breiigen Konsistenz an Stabilität mangelt (Diekmann, 2002). Daher wird dem REKAL SAV-Stabilisat hinzugefügt, welches eine Mischung aus Flugasche und einem Rauchgasentschwefelungsprodukt ist. Das SAV-Stabilisat verfestigt das Substrat und sorgt für Standsicherheit aufgrund von puzzolanischen Effekten. Diese aushärtenden Effekte treten ein, wenn den glasigen Bestandteilen des SAV-Stabilisats CaO und H_2O hinzugefügt werden und daraus stabile Mineralphasen hervorgehen (Demmich, 1990). Ferner ist das REKAL/SAV-Stabilisat nach einer vorigen Entsalzungsphase begrünbar, bietet eine hohe Wasserspeicherkapazität und eine daraus resultierende hohe Evapotranspiration (Scheer, 2001).

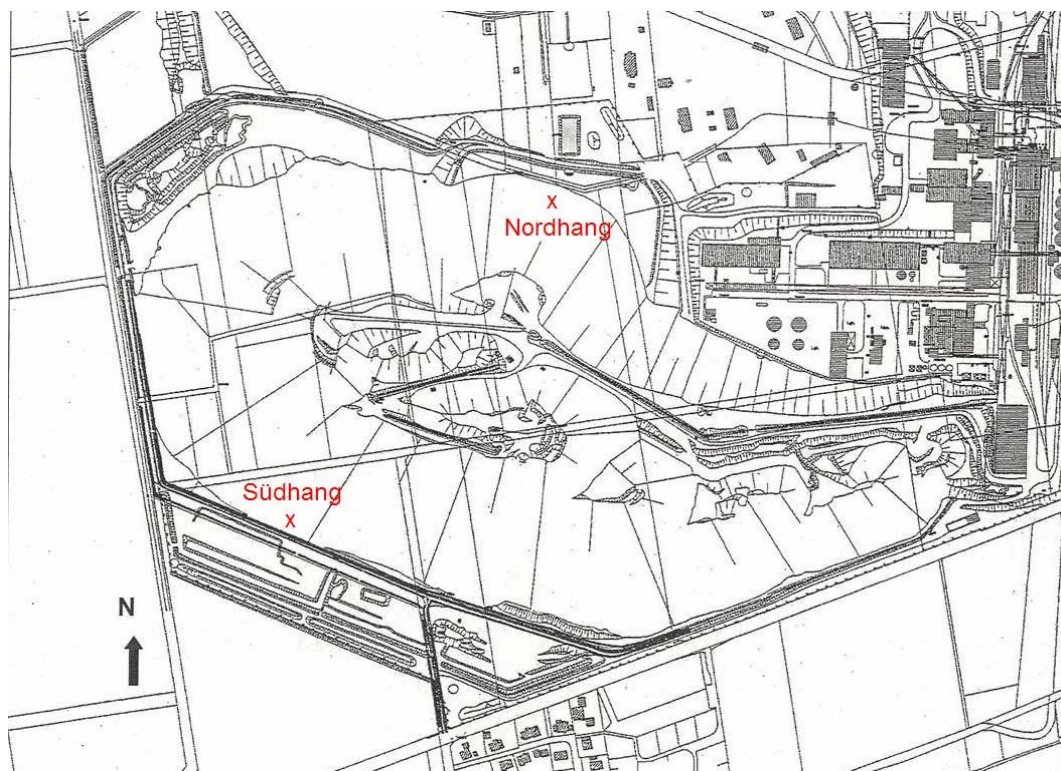


Abb. 2: Rückstandshalde der Kaliindustrie, Werk Sigmundshall, Bokeloh
x: Standorte der Probenahmen Nordhang und Südhang

Bei den ausgewählten Flächen zur Begrünung werden Ansaatmischungen aus verschiedenen Gräsern verwendet. Das Weidelgras *Lolium perenne* bildet dabei den Hauptbestandteil der Mischungen, weil es als Ammenpflanze für andere Gräser dient, eine schnelle Anfangsentwicklung aufweist und generell als Bestandsbildner fungiert.

1.4 Quorum Sensing

Quorum Sensing beschreibt die Fähigkeit mikrobieller Populationen mittels Signalmolekülen, die auch Autoinducer (AI) genannt werden (Salmond et al., 1995; Swift et al., 1996), die Zelldichte der gesamten Population festzustellen. Sie dient zur Regulation der Genexpression von Mikroorganismen.

Sobald die Signalmolekülkonzentration einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat, sind die Bakterien in der Lage ihre Genausprägung zu variieren. Dabei können wichtige, ökophysiologische Leistungen wie die Biofilmbildung, Schwärmen, Pathogenität und die Antibiotika-Produktion bei Bedarf initiiert werden, um sich auf veränderte Umweltbedingungen optimal anzupassen (Bainton et al., 1992, Davies et al., 1998, De Kievit & Iglewski, 2000, Eberl et al., 1996, Jones et al., 1993, Pearson et al., 1997, Pierson et al., 1994).

Die Quorum Sensing-Systeme grampositiver und gramnegativer Mikroorganismen unterscheiden sich bezüglich ihrer Autoinducer. Grampositive Bakterien verwenden Oligopeptide, die durch membrangebundene Rezeptor-Histidin-Kinasen erkannt werden. Viele gramnegative Mikroorganismen benutzen als Basis ihrer kommunikativen Leistung niedrigmolekulare Substanzen, die man auch unter dem Begriff *N*-Acylhomoserinlactone (AHL) zusammenfasst (Lazdunski et al., 2004). Die AHL können durch die Cytoplasmamembran diffundieren und an regulatorische Proteine in der Zelle binden (siehe Abb. 3). Zudem gibt es noch Quorum Sensing-Systeme, die halogenierte Furanone, Autoinducer 2 (AI-2), Quinolone wie z.B. *Pseudomonas* Quinolone Signale (PQS) und Butyrolactone als Signalmoleküle besitzen (siehe Abb. 4). Im Folgenden wird das Quorum Sensing-System der acylierten Homoserinlactone vorgestellt werden.

Dieses System wurde zuerst beim Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* entdeckt und es steuert dort die Genausprägung für die Biolumineszenz (Eberhard et al., 1981;

Nealson et al., 1970). Hierbei regulieren die Proteine LuxI und LuxR das Luciferase-Operon von *Vibrio fischeri*. LuxI synthetisiert die Autoinducer, die an das Regulatorprotein LuxR binden und es somit aktivieren.

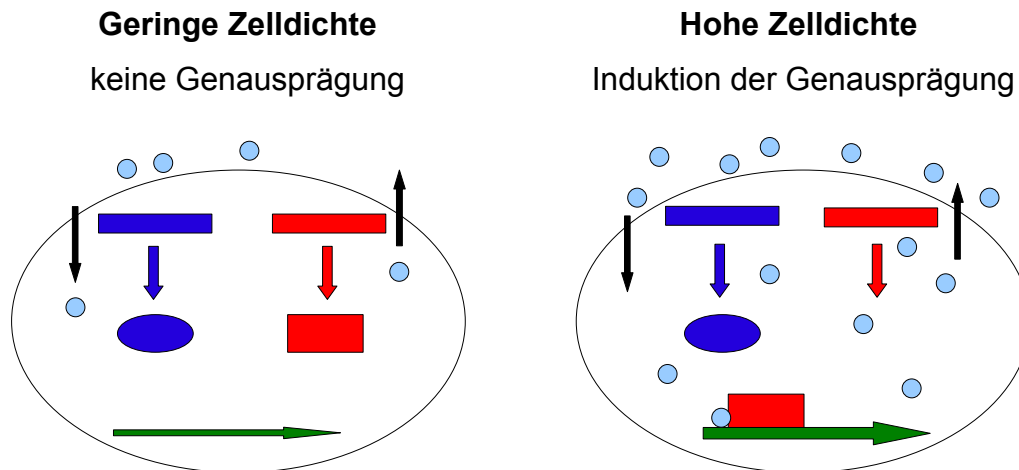


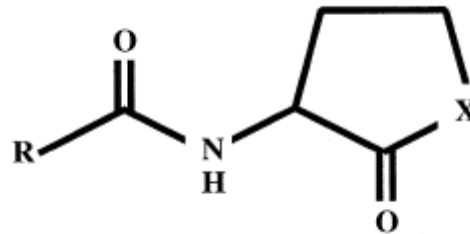
Abb. 3: Schematische Darstellung der bakteriellen Genregulation mit AHL-Signalmolekülen als Botenstoffe

LuxI - Gen: █ , Expression des LuxI - Proteins: ↓ , AHL-Synthetase (LuxI-Protein): ,
 LuxR - Gen: █ , Expression des LuxR - Proteins: ↓ , Rezeptorprotein (LuxR-Protein): ,
 AHL-Signalmoleküle: ● , Zielgen: → , Diffusion der AHL-Signalmoleküle: ↓
↑

Proteine von anderen Mikroorganismen, die nach dem gleichen Prinzip miteinander interagieren, werden seither der LuxI- bzw- LuxR-Familie zugeordnet, auch wenn ihre Funktion keine biolumineszenten Auswirkungen hat.

Die Struktur der AHL-Signalmoleküle besteht aus einem konservierten Homoserinlactonring, welcher vom S-Adenosylmethionin herrührt. Dieser ist durch eine Amidbindung mit einer variablen Acylseitenkette, die aus der Fettsäuresynthese hervorgegangen ist, verbunden. Die Beschaffenheit einer Acylseitenkette kann sich hinsichtlich der Anzahl Kohlenstoffatomanzahl (4 bis 18), der Oxidationsstufe und dem Sättigungsgrad unterscheiden (Fuqua et al., 1994) (siehe Tab. 1). Das LuxR-Regulatorprotein fungiert als Transkriptionsfaktor und besteht aus zwei Domänen: Zum einen aus der N-terminalen Region für die Bindung der Autoinducer und zum anderen aus der C-terminalen Region für die Bindung an die DNA (siehe Abb. 5). Sobald sich das AHL-Signalmolekül an das Rezeptorprotein anlagert, bildet sich ein

AI/LuxR-Komplex, der sich an die DNA bindet und die Transkription von Quorum Sensing-abhängigen Genen initiiert.

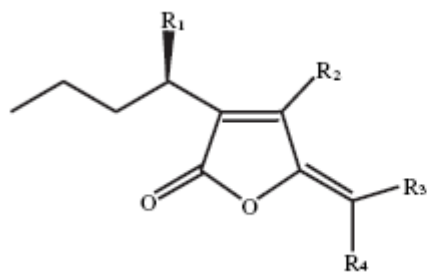


Tab. 1: Exemplarische Strukturen verschiedener AHL-Signalmoleküle (McClellan et al., 1997)

R	X	Chemischer Name	Abkürzung
CH ₃ CH ₂ CH ₂	O	<i>N</i> -Butanoyl-L-homoserinlacton	BHL
CH ₃ CH ₂ CH ₂	S	<i>N</i> -Butanoyl-L-homocysteinethiolacton	BHT
CH ₃ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxobutanoyl-L-homoserinlacton	OBHL
CH ₃ (CH ₂) ₄	O	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton	HHL
CH ₃ (CH ₂) ₄	S	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homocysteinethiolacton	HHT
CH ₃ (CH ₂) ₂ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxohexanoyl-L-homoserinlacton	OHHL
CH ₃ (CH ₂) ₂ COCH ₂	S	<i>N</i> -3-Oxohexanoyl-L-homocysteinethiolacton	OHHT
CH ₃ (CH ₂) ₆	O	<i>N</i> -Octanoyl-L-homoserinlacton	OHL
CH ₃ (CH ₂) ₄ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxo-octanoyl-L-homoserinlacton	OOHL
CH ₃ (CH ₂) ₈	O	<i>N</i> -Decanoyl-L-homoserinlacton	DHL
CH ₃ (CH ₂) ₆ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxodecanoyl-L-homoserinlacton	ODHL
CH ₃ (CH ₂) ₁₀	O	<i>N</i> -Dodecanoyl-L-homoserinlacton	dDHL
CH ₃ (CH ₂) ₈ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxododecanoyl-L-homoserinlacton	OdDHL
CH ₃ (CH ₂) ₁₂	O	<i>N</i> -Tetradecanoyl-L-homoserinlacton	tDHL
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COCH ₂	O	<i>N</i> -3-Oxotetradecanoyl-L-homoserinlacton	OtDHL

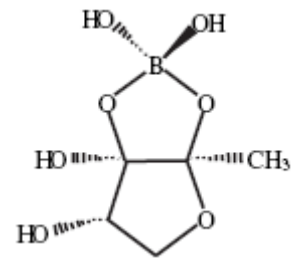
Die Bildung des AI/LuxR-Komplexes ist semispezifisch, so dass sich die Signalmoleküle der gleichen Bakterienspezies oder strukturell ähnliche AI an das LuxR-Regulatorprotein anlagern können.

In manchen ökologischen Nischen konkurrieren verschiedene bakterielle Populationen um Nährstoffe. Eine Möglichkeit, sich beim Erwerb von Nahrung einen Vorteil zu verschaffen, ist die Störung der Kommunikation der Konkurrenz.

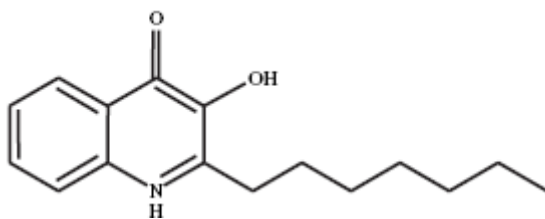


R1: H, OAc or OH
 R2: Br or H
 R3: Br or H
 R4: Br or I

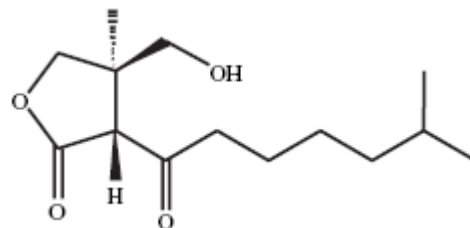
Halogenierte Furanone (*Delisea pulchra*)



Autoinducer 2 (AI-2)
 (*Vibrio harveyi*)



Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)
 (*Pseudomonas aeruginosa*)



Butyrolactone
 (*Streptomyces griseus*)

Abb. 4: Beispiele von Quorum Sensing-Botenstoffen (Barnard & Salmond, 2005)

Dieses Prinzip ist unter dem Begriff des Quorum Quenching bekannt und tritt auch in Erscheinung, wenn Wirte das Quorum Sensing-System pathogener Mikroorganismen stören, um deren Kolonisierung und Ausprägung von Virulenzfaktoren zu unterbinden (Chun et al., 2004).

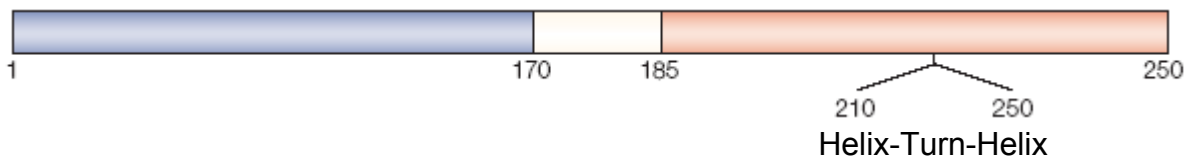


Abb. 5: Domänenstruktur eines typischen R-Proteins mit einer N-terminalen Ligandenbindungsdomäne (blau) und einer C-terminalen DNA-Bindungsdomäne (rot), welche ein Helix-Turn-Helix-Motiv beinhaltet (Lazdunski et al., 2004).

Zwei Klassen von AHL-degradierenden Enzymen sind bekannt, die von Mikroben verwendet werden: Dies sind zum einen die Lactonasen und zum anderen die Acylasen (Dong et al, 2001; Lee et al., 2002) (siehe Abb. 6). Die Lactonase AiiA von *Bacillus* sp. spaltet den Lactonring der AI von gramnegativen Spezies, die mit dem AiiA-Produzenten um Nährstoffreserven konkurrieren.

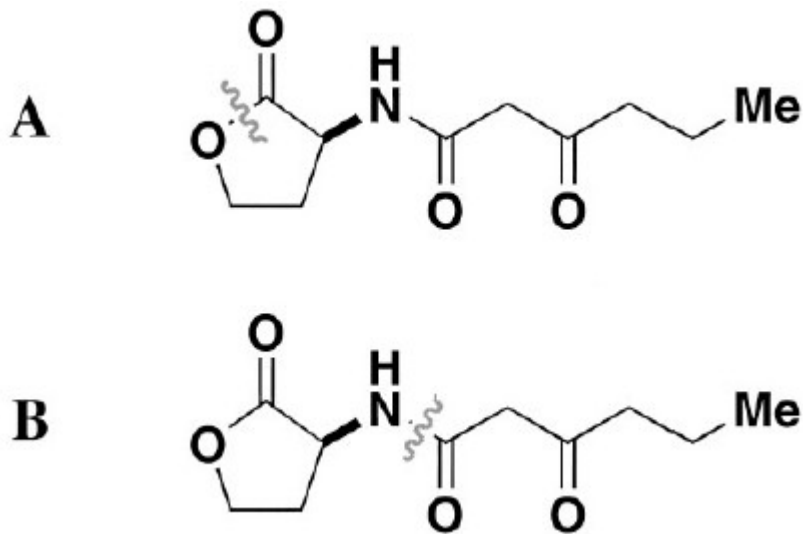


Abb. 6: Inaktivierung von AHL-Molekülen. A: Hydrolyse des Lactonrings;
B: Hydrolyse der Amidbindung (Roche et al., 2004)

Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei *Bacillus* sp. um ein grampositives Bakterium handelt, das als Signalmoleküle Oligopeptide nutzt und daher nicht Gefahr läuft sich die eigenen AI zu inaktivieren (Dong et al., 2001; Lee et al., 2002).

Das grampositive Bakterium *Streptomyces* sp. bildet eine Acylase, die fähig ist Acylseitenketten von sechs oder mehr Kohlenstoffatomen zu spalten (Park et al., 2005). Die Acylase AiiD, die von gramnegativen *Ralstonia*-Isolaten produziert wird, spaltet hingegen C4-HSL und 3-Oxo-C12-HSL (Lin et al., 2003). Die Produktion von Acylasen findet aber auch Anwendung bei intrazellulärer AI-Anhäufung. So spaltet *Pseudomonas aeruginosa* das 3-Oxo-C12-HSL, um auf sich verändernde Umweltbedingungen reagieren zu können (Sio et al., 2006).

Vergleicht man die Effektivität von Lactonase und Acylase bezüglich der Fähigkeit zur Interferenz von bakterieller Kommunikation, so ist die Wirkungsspezifität der Lactonase größer, weil sie als Angriffspunkt den Lactonring hat, dessen Struktur allen AHL-Signalmolekülen eigen ist. Die Acylasen sind hingegen bei der Entfaltung ihrer Wirkung auf spezifische Acylseitenkettenlängen angewiesen und können daher nur eine geringe Anzahl von AI beeinflussen.

Eine andere Möglichkeit das Quorum Sensing-System zu stören ist die Quorum Sensing-Biomimikry. Jenes Verfahren wird oft von Pflanzen angewendet, die eine potentielle Besiedlung durch pathogene Bakterien vermeiden wollen. Anstatt das AHL-Signalmolekül zu inaktivieren, bindet bei dieser Variante eine AI-ähnliche Substanz an das LuxR-Rezeptorprotein, die auch Quorum Sensing-Antagonist

genannt wird. Dieser Komplex ist jedoch nicht in der Lage an die DNA zu binden, um Quorum Sensing-relevante Gene zu exprimieren. Somit konkurrieren AHL-Signalmoleküle und Antagonisten, um freie LuxR-Rezeptorproteine binden zu können.

Zum Beispiel produziert die marine Rotalge *Delisea pulchra* Quorum Sensing-Antagonisten. Bei diesen Substanzen handelt es sich um eine Vielfalt von halogenierten Furanonen (siehe Abb. 4). Die Biomimikry-Substanzen binden an und destabilisieren LuxR-Regulatorproteine. Somit können alle Mikroorganismen, welche ein Quorum Sensing-System zur Kommunikation nutzen, die Rotalge nicht mehr kolonisieren (Givskov et al., 1996, Kjelleberg et al., 1997, Manefield et al., 2002).

Daraus ergeben sich noch weitere Verwendungsmöglichkeiten für den Einsatz von halogenierten Furanonen, um einen unerwünschten Bakterienbewuchs vorzubeugen wie z.B. beim Rostschutz für Schiffe und Besiedlungsschutz für Katheter und Kontaktlinsen.

1.5 Ziele dieser Studie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden zwei Themenkomplexe bearbeitet: Zum einen wird die mikrobielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre vom Weidelgras (*Lolium perenne*) mit der kulturunabhängigen Methode TRFLP charakterisiert und zum anderen soll in diesem Habitat nach potentiellen AHL-Produzenten gesucht werden, um deren Signalmoleküle zu identifizieren. Ein gravierender Unterschied im Vergleich zu anderen Studien ist hierbei das technogene Substratgemisch REKAL/SAV-Stabilisat, dass den natürlichen Boden ersetzt.

Bei der Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften sollen die Veränderungen der bakteriellen Populationen der Proben vom Südhang 2008/2009 und Nordhang 2009 betrachtet werden. Zudem werden Veränderungen im Rhizosphärenmuster innerhalb eines Jahres bei den Südhangproben 2008/2009 ermittelt und die Unterschiede der Rhizosphärenpopulationen von den beiden Standorten Nordhang- und Südhang 2009 erfasst. Der Nordhang unterscheidet sich vom Südhang in einigen wesentlichen Punkten: Zum einen bestehen die begrünten Flächen des Nordhangs seit 2003, während die Abschnitte des Südhangs erst seit 2006 begrünt

sind. Ferner ist die begrünte Fläche des Südhangs einer größeren Sonneneinwirkung ausgesetzt.

Mittels der kulturunabhängigen TRFLP-Methode können dann jahreszeitliche bzw. standortspezifische bakterielle Populationsdynamiken im Wurzelbereich des Weidelgrases ermittelt werden.

Der zweite Teil widmet sich der bakteriellen Kommunikation, dem sogenannten Quorum Sensing. Es ist bekannt, dass viele gramnegative Mikroorganismen aus der Rhizosphäre AHL-Signalmoleküle nutzen, um ihre Genregulation zu steuern. Demzufolge wäre es interessant in Erfahrung zu bringen, ob dies auch der Fall bei dem technologischen Substratgemisch REKAL/SAV-Stabilisat ist. Daher sollen AHL-Produzenten isoliert und mithilfe der Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und *Chromobacterium violaceum* CV026 nachgewiesen werden. Anschließend werden die produzierten AHL-Signalmoleküle mit der Dünnschichtchromatographie charakterisiert.

2 Material & Methoden

2.1.1 Verwendete Geräte

Analysewaage BA 110 S Sartorius, Göttingen

Autoklaven und Sterilisator / Trocknung:

Laborautoklav DANN 4-5-6 Zirbus, Osterode / Harz

Tisch-Autoklav DANN 250 Zirbus, Osterode / Harz

Trocknungsschrank UE300 Memmert GmbH, Schwabach

Automatisches Sequenziergerät, CEQ™ 2000 XL, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim

Eismaschine Ziegra, Isernhagen

Elektrophorese:

Minigel-Elektrophoresekammer Renner, Dannstadt

Horizontalgel-System Eigenbau Abt. Mikrobiologie

RTF Trennstelltrafo LTS 002 VEB, Thalheim

Power Supply A011 H. Hölzel, Dorfen

SDS-Gelsystem Mini PROTEAN 3 Cell Bio-Rad Laboratories, München

Power Supply PowerPac 300 Bio-Rad Laboratories, München

FastPrep FP120 Bio101 Savant Instruments, New York

Bilddokumentation:

UV-Transilluminator TFL-35M Appligene, Illkirch, Frankreich

Kamera Intas, Göttingen

PC incl. Software Intas, Göttingen

Drucker Modell P93DW Mitsubishi Electric Corporation

Canon Powershot A650 Digitalkamera

Gilson-Pipetten (5 ml, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl) ABimed, Langenfeld

Inkubation:

Brutschrank Modell 500 Memmert GmbH, Schwabach

Brutraum Kälte-Hunke, Bonn

Wasserbad Thermo Haake, Karlsruhe

Kühlung und Gefrieren:

Kühlzelle Typ 60/215 Viessmann, Hof /Saale

Gefrierschrank öko super Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen

Kühlschrank Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen

Stickstoffbehälter Messer, Griesheim (Abteilung Genetik)

Magnetrührer IKAMAG REO IKA Labortechnik, Staufen

Phasenkontrastmikroskop BH 2 Olympus, Hamburg

pH-Meter WTW, Weilheim

Präzisionswaage BA 610 Sartorius, Göttingen

Rotationsevaporator, Heidolph

Sicherheitswerkbank ASW-UP IV-1906 Bleyemehl Reinraumtechnik, Inden

Spektralphotometer Uvikon 930 Kontron Instruments, Eching

Thermocycler:

Primus 25 MWG Biotech, Ebersberg

Primus 96 plus MWG Biotech, Ebersberg

Tisch-Rundschüttler Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Vortex VF 2 IKA Labortechnik, Staufen

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge Sigma 3K30 Sigma Laborzentrifugen, Osterode / Harz

Tischzentrifuge Sigma Laborzentrifugen, Osterode / Harz

PCR-Cup Minizentrifuge ABImed, Langenfeld

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

DIFCO Laboratories, Detroit, USA

Invitrogen, Karlsruhe

MBI Fermentas, St. Leon Rot

Merck, Darmstadt

Oxoid, Hampshire, England

Roche Diagnostics GmbH, Heidelberg

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Agarose NEEO Ultra

Roth, Karlsruhe

Agar für die Bakteriologie

AppliChem, Darmstadt

Bacto-Pepton

Oxoid, Hampshire, England

Calciumchlorid-Dihydrat

Merck, Darmstadt

Cycloheximid

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mangansulfat-Hydrat	Merck, Darmstadt
Mannitol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
N-Butanoyl-L-homocystein-thiolacton	Merck, Darmstadt
N-Hexanoyl-L-homoserinlacton	Merck, Darmstadt
N-Octanoyl-L-homoserinlacton	Merck, Darmstadt
N-Decanoyl-L-homoserinlacton	Merck, Darmstadt
Safraninrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 80	Merck, Darmstadt
X-Gal	Merck, Darmstadt

2.1.3 Enzyme und Reagenziensysteme

Die Enzyme und Reagenziensysteme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

H ₂ O _{reinst.} für molekularbiologische Arbeiten	Roth, Karlsruhe
10x PCR Puffer	MBI Fermentas, St. Leon Rot

Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon Rot
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Ladder (100bp -10 kb)	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Primer 8-27F(6´FAM)	Invitrogen, Karlsruhe
Primer 907-926R	Invitrogen, Karlsruhe
Ps-forward	Invitrogen, Karlsruhe
Ps-reverse	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Hin6I</i> (5´-G [^] CGC-3´)	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Tango Enzympuffer	MBI Fermentas, St. Leon Rot

2.1.4 Primer

Tab. 2: Primer

Primer	Sequenz (5´-3´)	Referenz
8-27F(6´FAM)	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Liu et al., 1997
907-926R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Liu et al., 1997
Ps-forward	GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT	Widmer et al., 1998
Ps-reverse	TTA GCT CCA CCT CGC GGC	Widmer et al., 1998

2.1.5 Verwendete Mikroorganismen

Tab. 3: Bakterienstämme

<u>Stämme bzw. Isolate</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Herkunft bzw. Referenz</u>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 pCF218 pCF372 (Spec, Tet)	AHL-Reporterstamm (Biosensor)	Zhu et al., 1998
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	AHL-Reporterstamm (Biosensor)	McClellan et al., 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AHL-Produzent	Rhizosphärenisolat von <i>Lolium perenne</i>

2.1.6 Kulturmedien

Die Zusätze (Mineralsalze und Antibiotika) werden steril filtriert und nach dem Autoklavieren zum ca. 50°C abgekühlten Kulturmedium hinzugefügt.

NI-Agar [Fertigmedium von Merck]

- 37 g/l

Mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ auffüllen und für 20 min bei 121°C autoklavieren.

NI-PB-Agar

- 37 g/l
- 0,3 g/l Pararosanilin
- 200 ml/l Bodenextrakt

Mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ auffüllen und für 20 min bei 121°C autoklavieren.

NI-Bouillon [Fertigmedium von Merck]

- 25 g/l

Mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ auffüllen und für 20 min bei 121°C autoklavieren.

NI-Bouillon (Softagar)

- 25 g/l
- 0,8% Bacto-Agar

Mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ auffüllen und für 20 min bei 121°C autoklavieren.

Bac/Rhiz-Agar

- 5 g/l Bacto-Pepton
- 3 g/l Fleischextrakt
- 2 g/l Hefeextrakt
- 15 g/l Bacto-Agar
- 10 g/l Mannitol
- 200 ml/l Bodenextrakt

pH-Wert: 7

$MnSO_4 \cdot xH_2O$ 0,3 mM

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,7 mM

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,0 mM

Mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ auffüllen und für 20 min bei 121°C autoklavieren.

Bodenextrakt

- 400 g/l luftgetrockneter Haldenboden
- 1 g/l Na₂CO₃

Mit H₂O_{reinst.} auffüllen und für 1 h bei 121°C autoklavieren.

Bodenextrakt filtrieren und bei 4°C lagern.

2.1.7 Hemmstoffe

Zur Herstellung von Selektivmedien, der Kultivierung von plasmidhaltigen Stämmen und der Vermeidung von Pilzen wurden die folgenden Antibiotika mit den angegebenen Arbeitskonzentrationen verwendet.

Tetracyclin	4,5 mg/ml
Spectinomycin	50 mg/l
Cycloheximid	100 mg/l

2.1.8 Chemikalien für die DNA-Extraktion

Tween-Puffer:

(Tween 80 (0,1%), tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (0,1 %))

Extraktionspuffer Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB):

- 1 % CTAB
- 2 % SDS
- 1,5 M NaCl
- 100 mM Natriumphosphatpuffer
- 10 mM Tris-HCl, pH: 7
- 1 mM EDTA, pH: 8

Autoklavieren für 30 min bei 121°C.

Chloroform-Isoamylalkohol-Aliquots (24:1)

Isopropanol

70% EtOH p.a.

EtOH p.a.

TE-Puffer (121,14 g/mol)

pH-Wert: 7,5

Autoklavieren für 30 min bei 121°C.

2.1.9 Lösungen für die Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

Mit H₂O_{reinst.} auf 1 l auffüllen.

1 x TAE-Puffer:

50 x TAE-Puffer 1:50 (v/v) mit H₂O_{reinst.} verdünnen.

Längenstandard:

Fast Ruler™ DNA Ladder, Low Range, ready to use (Fermentas)

Ladepuffer:

6x MassRuler™ Loading Dye Solution (Fermentas):

10mM Tris-HCl (pH 7,6),

0,03 % Bromphenolblau,

60 % Glycerin

60 mM EDTA.

Ethidiumbromid (EtBr)-Stammlösung:

10 mg EtBr/1 ml H₂O_{reinst.}

Ethidiumbromid-Gelbad:

100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung

1 l H₂O_{reinst.}

2.1.10 Nachweis des QS-Systems

Ethylacetat

X-Gal

Methanol/Wasser (60:40; v/v)

Umkehrphasen-Dünnschicht-Chromatographie-Platten (RP-18 F_{254s}, 20x20 cm)
[Merck]

AHL-Signalmoleküle:

- *N*-Butanoyl-L-homocystein-thiolacton
- *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton
- *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton
- *N*-Decanoyl-L-homoserinlacton

2.2.1 Terminale Restriktionsfragmentanalyse (TRFLP)

Die Terminale Restriktionsfragmentanalyse (TRFLP) ist eine kulturunabhängige Methode mit der Gemeinschaften von Eubakterien, Archaea, Pilze, andere phylogenetische Gruppen und funktionelle Gene veranschaulicht werden können. Die Methode ist schnell, reproduzierbar und detektiert in der Regel mehr Spezies als bei den anderen PCR-Fingerprintmethoden (Marsh et al., 1999; Osborn et al., 2000). Bei der TRFLP wird mithilfe einer PCR das 16S rRNA-Gen vervielfältigt. Hierbei kann entweder ein Primer am 5'-Endefluoreszenzmarkiert sein oder auch der zweite am 3'-Ende. Das fluoreszenzmarkierte PCR-Amplifikat wird danach mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym geschnitten. Die geschnittenen DNA-Fragmentstücke werden als Ribotypen bezeichnet. Die vermehrte DNA von unterschiedlichen Mikroorganismen, welche unterschiedliche Restriktionsschnittstellen aufweisen, führt dann zu endständig fluoreszenzmarkierten Fragmenten von variierender Länge. Die Länge dieser terminalen Restriktionsfragmentstücke wird nun mit einem automatischen Sequenziergerät bestimmt (siehe Abb. 7). Dazu werden die Proben in Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Kavitäten abgefüllt. Hierbei entsteht ein molekularer Fingerprint, der charakteristisch für die betreffende Gemeinschaft ist (Thies, 2007). In Abb. 7 ist ein schematischer Ablauf der Methode dargestellt.

2.2.2 Probennahme

Die Probennahmen erfolgten am Hangfuß des Nord- und Südhangs der Rückstandshalde Sigmundshall in Bokeloh. Bei jeder Probennahme wurden 12 Büschel Weidelgras (*Lolium perenne*) dem Haldenboden entnommen und in sterilen Plastiktüten verstaut. Die Lagerung der gesammelten Pflanzen erfolgte bei 4°C bis sie am nächsten Tag weiterbearbeitet wurden.

2.2.3 Ablösen der Mikroorganismen von der Bodenmatrix

Das folgende DNA-Extraktionsprotokoll wird mit einigen Veränderungen nach Costa et al. (2004) durchgeführt.

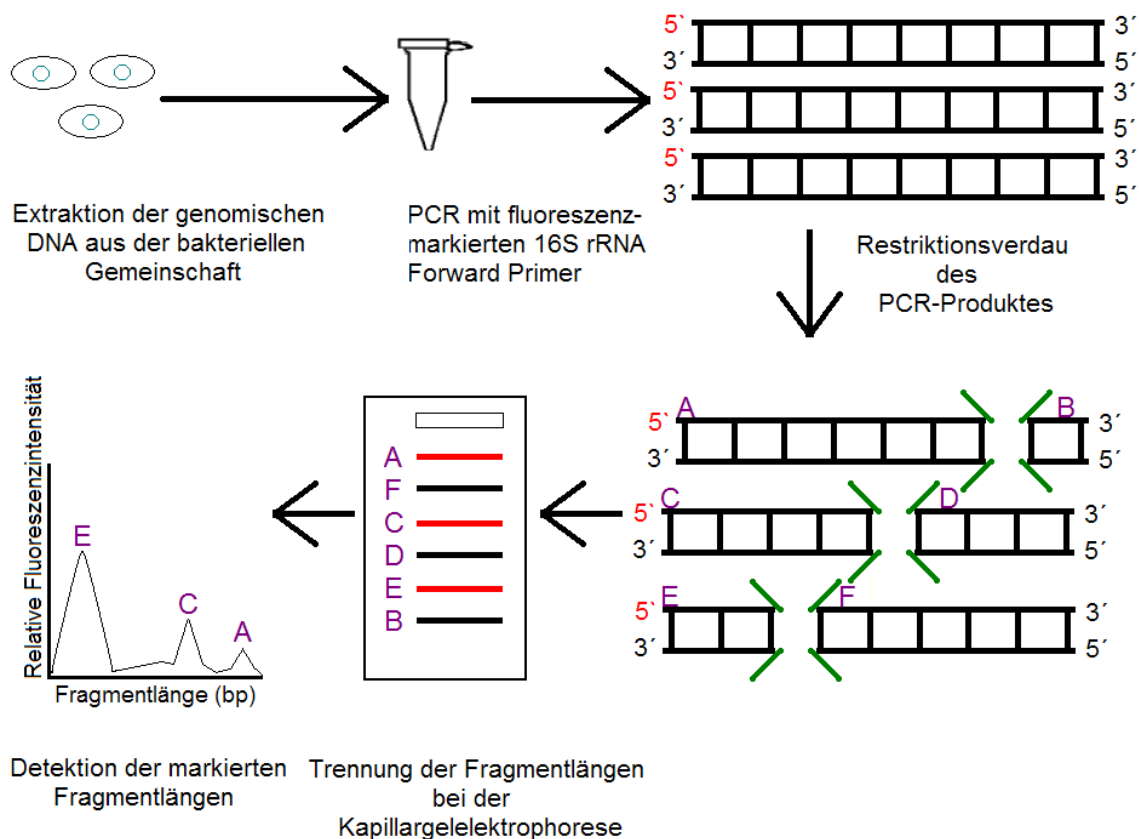


Abb. 7: Schematischer Ablauf der TRFLP-Methode

Als Ausgangsmaterial für die Arbeiten im Labor werden aus den 12 Pflanzen Kompositproben gefertigt. Es werden pro Probennahme drei Kompositproben erstellt und jede beinhaltet Pflanzenwurzeln und unmittelbar anhaftendes Bodenmaterial von vier Pflanzen, das mit einem sterilen Skalpell und einer sterilen Pinzette zerkleinert wird. In jedem Ansatz befindet sich 10 g zerkleinertes Wurzelmaterial. Diese Kompositprobe gewährleistet, dass sich in ihr eine ausgewogene Vielfalt an Bakterien befinden, weil sie die mikrobielle Rhizosphärenpopulationen von mehreren Pflanzen beinhaltet. Die weitere Durchführung bezieht sich auf die Bearbeitung einer Probe.

Die zerkleinerte Probe wird daraufhin in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit bereits darin befindlichen sterilen 10 g Glasperlen (\varnothing 4 mm) überführt. Danach fügt man 50 ml Tween-Puffer (Tween 80 (0,1%), tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (0,1%))

zum 500 ml Erlenmeyerkolben hinzu. Das im 500 ml Erlenmeyerkolben befindliche Bodenmaterial wird nun bei 150 rpm für 30 min geschüttelt.

Aus dem 500 ml Erlenmeyerkolben werden ca. 30-35 ml Bodensuspension entnommen und in jeweils in ein 40 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, welches bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert wird. Nun wird der Überstand entsorgt und das Pellet mit dem Tween-Puffer (Tween 80 (0,1%), tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (0,1%)) resuspendiert. Diese Bodensuspension überführt man in eine 2 ml Mikroschraubröhre und zentrifugiert bei 13.000 rpm für 5 min. Dann wird der Überstand entsorgt und das Gewicht des Pellets bestimmt. Es wird solange erneut Bodensuspension zur 2 ml Mikroschraubröhre hinzugefügt bis das resultierende Pellet ein Feuchtgewicht von 0,5 g aufweist. Das Pellet wird bei -20°C gelagert oder sofort weiter bearbeitet (siehe 2.2.4).

2.2.4 Lyse der bakteriellen Zellen

Die Probe wird bei diesem Arbeitsschritt auf Eis bearbeitet, falls es nicht anders angegeben wird.

Zum Pellet werden nun 0,4 g Glaskügelchen (\varnothing 0,17 mm) gegeben und zusätzlich 500 μ l 100 % EtOH pipettiert. Danach wird die Probe 2x im Fast Prep FP 120 bead beating system bei 5,5 m/s für 30 sec bearbeitet und bei 16.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand verworfen und 1,2 ml Extraktionspuffer CTAB hinzugefügt. Folglich wird der Inhalt homogenisiert, wobei Vortexen vermieden werden sollte. Anschließend wird die Probe im Wasserbad bei 65°C für 45 min inkubiert und alle 15 min wie bereits oben erwähnt homogenisiert.

Nun wird die Probe bei 16.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand in vorgekühlte 1 ml Chloroform-Isoamylalkohol-Aliquots (24:1) pipettiert.

Danach wird die Probe vorsichtig 10x invertiert und erneut bei 16.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wird die obere, wässrige DNA-haltige Phase in ein neues 2 ml Eppi überführt und 0,6 Volumenteile Isopropanol wird hinzugefügt. Folglich wird die Probe homogenisiert. Anschließend inkubiert man die Probe bei RT für mindestens 30 min (Fällung von Nukleinsäuren).

Es folgt nun eine Zentrifugation bei 16.000 rpm für 20 min, wobei der resultierende Überstand verworfen wird. Der folgende Arbeitsschritt wird zweimal durchgeführt: Das

Pellet mit 500 µl eiskalten 70% EtOH waschen, für 5 min bei 16.000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

Danach wird das Pellet luftgetrocknet und bei RT für 5 min inkubiert. Daraufhin wird das Pellet in 100 µl TE-Puffer (pH: 7,5) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute wird nun mithilfe der Gelelektrophorese durch einen Längenstandardvergleich bestimmt.

2.2.5 Gelelektrophorese der extrahierten DNA

Es wird zunächst ein 1 %iges Agarosegel gegossen. Die Agarose wird aufgekocht und in einen Gelträger ausgegossen. Das auspolymerisierte Gel wird in die Elektrophoresekammer plziert und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Taschen werden mit einem Gemisch aus 5 µl extrahierter DNA und 1 µl Ladepuffer beladen.

Der ebenfalls aufgetragene Längenstandard wird wie folgt verdünnt: 1 µl Längenstandard + 4 µl H₂O_{reinst} + 1 µl Ladepuffer. Die Elektrophorese erfolgt bei 60 V für ca. 60 min.

Das Gel wird anschließend für ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert und anschließend unter UV-Licht fotografiert (Bildokumentation). Anhand des aufgetragenen Längenstandards kann die Größe des Produkts abgeschätzt werden.

2.2.6 Aufreinigung der DNA

Die extrahierte Roh-DNA wird nun mithilfe des GENE CLEAN® SPIN KITS (Qbiogene, USA) aufgereinigt und steht dann zur Vervielfältigung mithilfe der PCR zur Verfügung.

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vermehrung und dem Nachweis kleinster Mengen an Nukleinsäure. Die sogenannte Amplifikation wird in drei Schritte unterteilt: Zunächst wird die zu amplifizierende DNA durch thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle überführt. Anschließend erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA, wobei die Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA binden (Primer-Annealing). Daraufhin vervollständigt

eine thermostabile Taq-DNA-Polymerase (von *Thermus aquaticus*) die Sequenz jeweils am 3'-Ende eines Primers und erzeugt so kurze DNA-Abschnitte gleicher Sequenz (Elongation). Die Produkte eines Zyklus dienen anschließend als Matrize für den nächsten Reaktionszyklus, wodurch es somit zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Produkte kommt.

Die 16S rDNA verfügt über konservierte wie auch variable Regionen. Daher können die Primer für unterschiedliche Zielsequenzen entwickelt werden, so dass z.B. 16S rDNA-Sequenz-Abschnitte einer bestimmten Gruppe von Bakterien amplifiziert werden.

2.3.2 16S rDNA PCR

Für diese PCR werden die 16S rDNA-spezifischen Primer 8-27F (6'FAM) und 907-926R (Liu et al., 1998) verwendet. Der Forward-Primer ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-carboxyfluorescein (6'FAM) markiert. Dies hat zur Folge, dass die PCR-Produkte ebenfalls am 5'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung aufweisen und damit später mit dem automatischen Sequenziergerät detektiert werden können.

Die Bandengröße des amplifizierten DNA-Fragments liegt bei 918 bp.

Tab. 4: PCR-Ansatz für die 16S rDNA PCR

Gesamtvolumen: 50 µl	Volumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O _{reinst.}	32,15	-
10x PCR Puffer	5	1x
Primer 8-27F (6'FAM)(25 µM)	0,8	0,4 µM
Primer 907-926R (25 µM)	0,8	0,4 µM
dNTPs (2 mM)	5	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	4	2 mM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25	1,25 U/µl
Template-DNA	2	10 ng

Die folgenden Arbeitsschritte gelten pro Ansatz, der in der PCR verwendet wird. Die PCR-Komponenten werden im Kühlblock oder auf Eis zusammenpipettiert.

Zunächst wird der Master-Mix hergestellt. Dieser besteht aus den oben aufgelisteten PCR-Komponenten. Er wird in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR-Cup) zusammenpipettiert und zuletzt das DNA-Template hinzugefügt.

Die beschickten PCR-Cups werden kurz in der Minizentrifuge zentrifugiert. Dadurch sollen Luftblasen vermieden werden. Danach werden die beschickten PCR-Cups in den Thermocycler gestellt und das entsprechende Programm gestartet.

Tab. 5: PCR-Programm für die 16S rDNA PCR:

Denaturierung	95°C	3 min
<u>35 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	50°C	40 sec
Elongation	72°C	90 sec
finale Elongation	72°C	10 min

2.3.3 Pseudomonaden-PCR

Für diese PCR werden die Pseudomonaden-spezifischen Primer Ps forward und Ps reverse (Widmer et al., 1998) verwendet. Die Bandengröße des amplifizierten DNA-Fragments liegt bei 990 bp.

Tab. 6: PCR-Ansatz für die Pseudomonaden-PCR

Gesamtvolumen: 50 µl	Volumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O _{reinst.}	14,8	-
10x PCR Puffer	2,5	1x
Ps forward (25 µM)	0,1	0,1 µM
Ps reverse (25 µM)	0,1	0,1 µM
dNTPs (2 mM)	2,5	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1	1 U/µl
Template-DNA	2	siehe Durchführung

Die Durchführung dieser PCR ist identisch mit der obigen mit der Ausnahme, daß das DNA-Template hier aus Zellmaterial von Pseudomonaden-Kolonien besteht. Dazu werden ein bis zwei gut gewachsene und junge Kolonien von einer Agarplatte mit einem Glasstab genommen, in 100 µl H₂O_{reinst.} überführt und resuspendiert.

Tab. 7: PCR-Programm für die Pseudomonaden-PCR:

Denaturierung	94°C	5 min
<u>35 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94°C	60 sec
Annealing	65°C	60 sec
Elongation	72°C	60 sec
finale Elongation	72°C	8 min

2.3.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Mittels der Gelelektrophorese (siehe 2.2.5) werden die PCR-Produkte überprüft.

2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems nach Herstellerangaben für die nachfolgende Restriktionsanalyse aufbereitet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde das Endvolumen von 50 µl auf 35 µl reduziert, um die DNA aufzukonzentrieren.

2.3.6 Restriktionsanalyse der PCR-Produkte

Die aufgereinigte DNA wird nun mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Dabei werden vorwiegend 4 bp Restriktionsenzyme verwendet (Liu et al., 1997). Bei dieser Charakterisierung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft wird das Restriktionsenzym *Hin6I* (5'-G⁺CGC-3') (Liu et al., 1997) benutzt.

Bei der Restriktionsanalyse wird folgender Ansatz verwendet:

Tab. 8: Restriktionsanalyse

Gesamtvolumen pro Ansatz: 20 µl	
Enzympuffer	2 µl
Restriktionsenzym (4U)	0,4 µl
PCR-Amplifikat	10 µl
H ₂ O _{reinst}	7,6 µl

Zunächst wird wie bei der PCR ein Master-Mix angesetzt und auf die jeweiligen 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Schließlich wird zu jedem Ansatz die entsprechende Menge des PCR-Amplifikats hinzupipettiert.

Die Proben werden danach im Thermocycler für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze bis zur TRFLP-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.3.7 Detektion der 16S-rDNA-Fragmentstücke

Ein automatisches Sequenziergerät detektiert die fluoreszenzmarkierten Fragmentstücke. Die Substanzen werden dabei nach dem Prinzip einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt. Große Moleküle wandern hierbei langsamer als kleinere durch das elektromagnetische Feld, weil ihre elektrische Ladung stärker ist. Die Proben werden jeweils noch vor Ort mit einem Längenstandard und einem Probenpuffer versetzt, bevor das automatische Sequenziergerät mit ihnen beschickt wird. Dieser Vorgang wird durch die Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt.

2.3.8 Auswertung der TRFLP-Daten

Nach dem Lauf der Kapillargelelektrophorese erhält man die TRFLP-Daten in Form eines Elektropherogramms (siehe Abb. 8) und eines dazu gehörigen Excel-Datenblattes.

Dabei repräsentiert das Elektropherogramm ein Abbild der bakteriellen Gemeinschaft. Die X-Achse des Elektropherogramms zeigt die Länge in bp der geschnittenen terminalen fluoreszenzmarkierten Fragmentstücke (TRF) auf und die Y-Achse die relative Fluoreszenzintensität jedes Fragmentstückes. Die relative Fluoreszenzintensität ist indirekt ein Maß für die Häufigkeit des betreffenden Fragmentstückes in der Probe.

In der Auswertung werden ausschließlich TRF mit einer Länge von mindestens 50 bp und maximal 700 bp verwendet, weil bei zu langen Fragmenten dessen Länge nicht mehr auf eine Base genau gemessen werden kann. Zudem werden nur TRF mit einer relativen Fluoreszenzintensität von mindestens 50 berücksichtigt, um Hintergrundrauschen bzw. falsche Peaks zu vermeiden (Egert et al., 2003).

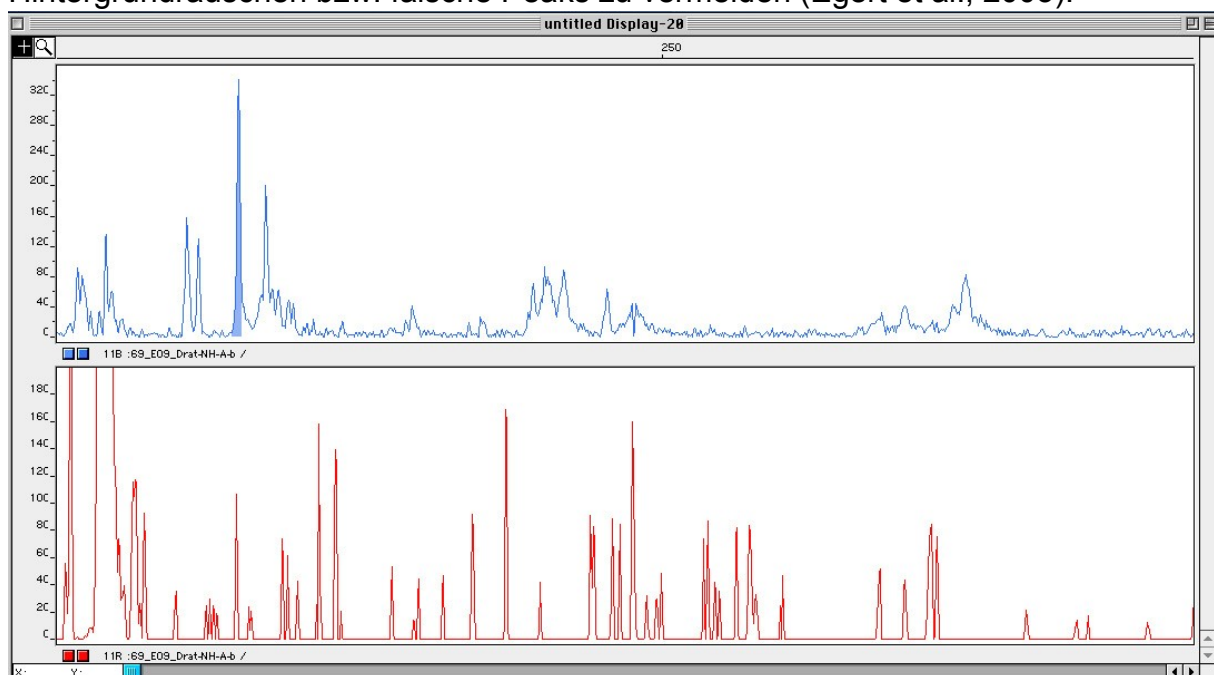


Abb. 8: Elektropherogramm

X-Achse: Fragmentlänge (bp), Y-Achse: Fluoreszenzintensität

Bild oben: Elektropherogramm der Probe A1 Nordhang Juni 2009

Bild unten: Längenstandard

Die anschließende Analyse der erstellten bakteriellen Gemeinschaften umfasst den Vergleich der TRF von vielen verschiedenen Proben, wobei es darum geht gemeinsame und einzigartige TRF zu identifizieren. Damit der Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften schnell und objektiv erfolgen kann wird das Programm T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) genutzt (Smith et al., 2005).

Der Vergleich der TRF-Profile wird mit einem Konfidenzintervall von 0,5 bp durchgeführt. Dabei werden alle TRF, dessen Länge sich um 0,5 bp oder weniger unterscheiden, behandelt als ob sie die gleiche Länge haben und werden daher zusammengefasst. Damit wird berücksichtigt, dass durch Messfehler des automatisierten Sequenziergeräts bei mehreren Analysen ein TRF unterschiedliche Längen aufweisen kann.

Pro Probennahme werden drei Proben für die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft verwendet. Diese Proben werden doppelt bearbeitet, so dass man

Replikatproben erhält. Die Bezeichnungen der Replikatproben sind jeweils A1 & A2, B1 & B2 und C1 & C2.

Zuerst wird bei T-Align ein Consensus-Profil aus jeweils zwei Replikatproben hergestellt, in dem nur TRF verzeichnet werden, die in den beiden Replikatproben vorkommen. Diese erstellten TRF sind die Durchschnittswerte zweier Replikatproben, die sich in einem Konfidenzintervall von 0,5 bp befinden. Die resultierenden Consensus-Proben, die aus den Replikatproben hervorgehen, tragen die Bezeichnungen A, B und C. Der Zweck dieses Verfahrens ist Pseudo-TRF (Egert et al., 2003) auszuschließen, die die Analyse verfälschen könnten.

Nun werden die Consensus-Proben A, B und C von allen Probennahmen in einem Comparison Profil miteinander verglichen und nur diejenigen TRF, die sich in einem Konfidenzintervall von 0,5 bp befinden, werden für die weitere Analyse verwendet.

2.3.9 Analyse von TRF-Längen mit Microbial Community Analysis 3

Nachdem markante TRF aus den mikrobiellen Gemeinschaftsprofilen unter Verwendung von TAlign bestimmt wurden, kann mithilfe des Programms Microbial Community Analysis 3 (MICA3) die Identifikation dieser unbekanntes Bakterien vorgenommen werden (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>).

Zunächst wird die entsprechende Primer- und Restriktionsenzymkombination eingegeben, die bei der Erstellung der bakteriellen Gemeinschaftsprofile benutzt wurde. Dann wird eine Datenbank ausgewählt, dessen hinterlegte Sequenzen mit der ausgewählten Primer- und Restriktionsenzymkombination *in silico* bearbeitet werden. In dieser Arbeit wurde die Datenbank RDP (R10 U12) mit den Parametern > 1200 bp von der 16S rRNA verwendet.

Die *in silico* generierten TRF können dann mit den Fragmenten der bakteriellen Gemeinschaften verglichen werden. Die erhaltenen TRF-Längen aus dem TAlign-Programm weisen jedoch rundungs bedingt zum Teil ungerade Fragmentlängen auf wie z.B. 144,22 bp. Solche TRF-Längen müssen zunächst jeweils auf- oder abgerundet werden, um sie mit dem MICA3-Output zu vergleichen (144,22 bp = 144 bp). Um einem bestimmten Fragment nun einen korrespondierenden Mikroorganismus zuzuordnen, sucht man die identische Länge des Fragments im

MICA3-Output. Alle Mikroorganismen, die bei der entsprechenden TRF-Länge aufgelistet sind, kommen dann in Frage dieses Fragment zu repräsentieren.

2.4 Quorum Sensing

2.4.1 Biosensoren (Reporterstämme)

Mit Hilfe von spezifischen Reporterbakterien (Biosensoren) können AHL-Moleküle detektiert werden. Dazu werden die Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 (Zhu et al., 1998) und *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) verwendet.

Biosensoren sind zwar im Gegensatz zu ihren Wildtypstämmen nicht mehr in der Lage AHL-Signalmoleküle auszubilden, sie können jedoch externe Botenstoffe anderer Bakterien immer noch detektieren. Diese Reporterbakterien haben bezüglich der Detektionsfähigkeit eine hohe Affinität für die AI, die von ihren Wildtypstämmen ausgeprägt werden.

Agrobacterium tumefaciens A136 beinhaltet die Plasmide pCF218 und pCF372. Das Sensorplasmid pCF372 besitzt eine β -Galactosidase-Aktivität, falls 3-Oxo-*N*-Octanoyl-L-homoserinlactone (3-Oxo-C8-HSL-Moleküle) in ausreichender Konzentration vorliegen. Das Plasmid pCF218 ermöglicht eine Überexpression von TraR (Rezeptorprotein der LuxR-Gruppe), welches die Sensitivität bezüglich der Detektion von 3-Oxo-C8-HSL erhöht. Bei der Verwendung von diesem Biosensor wird dem Kulturmedium X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galaktosid) hinzugefügt. Die β -Galactosidase setzt dann das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff um.

Chromobacterium violaceum bildet einen lila Farbstoff namens Violacein. Der Biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 ist hingegen eine Mini-Tn5-Violacein-Mutante des Wildtyps, die nur Violacein produzieren kann, wenn sie aus der Umgebung spezifische *N*-Acyl-homoserinlactone aufnimmt (McClellan et al., 1997). Dieser Biosensor hat eine hohe Spezifität für das *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (C6-HSL).

2.4.2.1 Kultivierung & Isolierung von Rhizobakterien

Die Kultivierung der Rhizobakterien erfolgt entweder auf Agarplatten oder in Flüssigkultur auf einem Rundschüttler in Erlenmeyerkolben bzw. Reagenzgläsern.

Alle Mikroorganismen werden bei 28°C inkubiert.

Die Isolierung der Mikroorganismen aus der Rhizosphäre erfolgt durch die Herstellung von Verdünnungsreihen. Dazu wird 0,1 g frisches Probenmaterial, welches aus Wurzeln und REKAL/SAV-Stabilisat besteht, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 900 µl 0,85% NaCl zugegeben. Die hergestellten Suspensionen werden auf *NI*-PB-Agar und Bac/Rhiz-Agar ausplattiert, die zusätzlich das Fungizid Cycloheximid 100 mg/ml enthalten. Die ausplattierten Kulturmedien werden für 7 d inkubiert.

2.4.2.2 Stammhaltung und Dauerkulturen

Kultivierte Bakterienstämme auf festen Nährmedien werden bei RT aufbewahrt und jede Woche überimpft. Die Überprüfung von Reinkulturen erfolgt durch Verdünnungsausstriche und Mikroskopie. Die Herstellung von Dauerkulturen erfolgt durch Zugabe von 1 ml Glycerin zu einer 1 ml stark angewachsenen Übernachtskultur (Mc Farland: 5) in einer Mikroschraubröhre. Die Lagerung der Mikroschraubröhren erfolgt bei -80°C.

2.4.2.3 Zellernte und Bestimmung der optischen Dichte

Die zellfreien Kulturüberstände werden durch Zentrifugation der Flüssigkulturen bei 7500 x g für 20 min hergestellt. Die photometrische Bestimmung der Zelldichte erfolgt mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Nährmedium.

2.4.3.1 Nachweis von AHL-Molekülen durch Kreuzstrich-Assay

Mit dem Kreuzstrich-Assay können AHL-produzierende Bakterien identifiziert werden (siehe Abb. 9). Hierfür werden auf einer Agarplatte ein Biosensor (Reporterstamm) (Biosensor) und ein Teststamm in unmittelbarer Nähe zueinander ausgestrichen. Bei Produktion von AHL-Molekülen seitens des Teststammes verfärbt sich dann der Biosensor auf charakteristische Weise, falls es sich um AHL-Signalmoleküle handelt, die innerhalb seines Detektionslimits liegen und in ausreichender Konzentration vom Teststamm produziert wurden (McClellan et al., 1997).

Für den Kreuzstrich-Assay werden NI-Agarplatten benutzt. Die Agarplatten, auf denen der Biosensorstamm *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 ausgestrichen wird, beinhalten zusätzlich X-Gal (60 µg/ml).

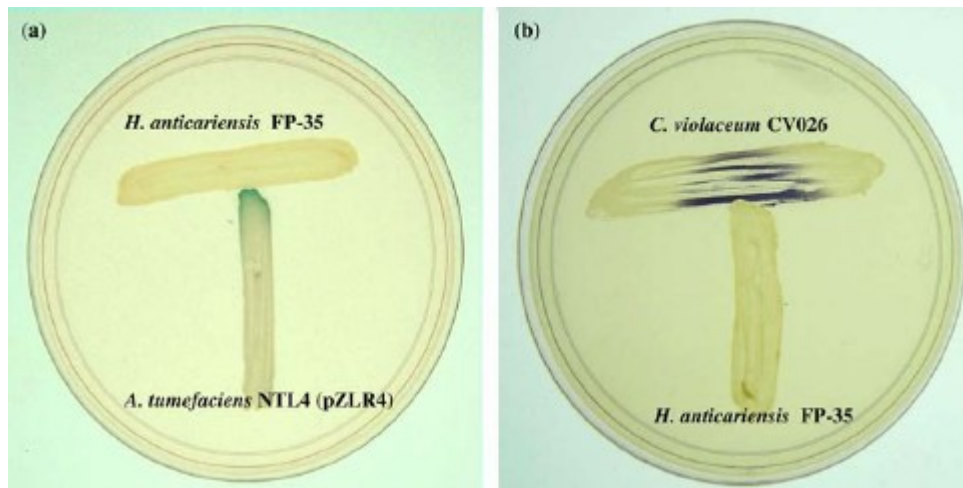


Abb. 9: Kreuzstrich-Assay; AHL-Produktion von *Halomonas anticariensis* FP-35.
 Bild a: Nachweis durch Biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4),
 Bild b: Nachweis durch Biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 (Llamas et al., 2005)

Zunächst wird eine Kolonie des Biosensorstamms in 0,5 ml Kochsalzlösung (0,85% NaCl) resuspendiert. Dann wird ein Glasstab mit der Biosensorstammssuspension benetzt und die anhaftende Flüssigkeit in einem ca. 1 cm breiten Streifen in der Mitte der Agarplatte verteilt. Die Agarplatte läßt man nun trocknen. Daraufhin wird ebenfalls eine Kolonie eines Teststammes in 0,5 ml Kochsalzlösung (0,85% NaCl) resuspendiert und die Bakteriensuspension mit einem Glasstab rechtwinklig in unmittelbarer Nähe, aber ohne Kontakt zum Biosensor, ausgestrichen. Alle Ansätze werden dann für 24 h bei 28°C inkubiert.

2.4.3.2 Isolierung von AHL-Molekülen aus Zellkulturüberständen

Zur Isolierung der AHL-Extrakte aus den untersuchten Stämmen wird 1 l Zellkulturüberstand hergestellt. Von dem zellfreien Überstand werden jeweils 250 ml in einen 1000 ml Scheidetrichter vorgelegt und 100 ml Dichlormethan zugegeben. Die beiden Flüssigkeiten werden durch kräftiges Schütteln für 2 min gemischt. Aus Sicherheitsgründen (Explosionsgefahr!) wird der Schüttelkolben nach jeweils 20 sec belüftet, um einen Druckausgleich herzustellen. Nachdem sich beide Phasen deutlich voneinander trennen wird die untere Dichlormethan-Phase in einen Erlenmeyerkolben aufgefangen. Die obere, wässrige wird noch einmal mit 100 ml

Dichlormethan für 2 min geschüttelt und danach werden beide Extrakte vereinigt. Das verbleibende Wasser aus den Dichlormethanextrakten wird durch Zugabe von wasserfreiem Magnesiumsulfat entfernt. Dazu wird unter kräftigem Rühren der Dichlormethan-Wasser-Emulsion wasserfreies Magnesiumsulfat hinzugefügt bis die Dichlormethan-Phase klar wird. Daraufhin werden die Extrakte filtriert und mit einem Rotationsevaporator bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C eingedampft und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lagerung der AHL-Extrakte erfolgt bei -20°C.

2.4.3.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die Stofftrennung durch Verteilung des Analyts zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt. Dazu wird die zu untersuchende Probe in einer mobilen Phase gelöst und über einer stationären Phase bewegt. Dividiert man die zurückgelegte Distanz des Analyts durch die zurückgelegte Distanz des Laufmittels, so erhält man den Retentionsfaktor (R_f-Wert) der aufgetragenen Substanz:

$$R_f = \frac{\text{zurückgelegte Distanz des Analyts}}{\text{zurückgelegte Distanz des Laufmittels}}$$

Während des Transports findet ein ständiger Stoffaustausch zwischen beiden Phasen statt. Die Auftrennung eines Gemisches erfolgt durch spezifische Wechselwirkungen der gelösten Substanzen mit der stationären Phase.

Als stationäre Phase dienen Umkehrphasen-Dünnschicht-Chromatographie-Platten (RP-18 F_{254s}, 20x20 cm). Im Gegensatz zur üblichen Adsorptionschromatographie ist die stationäre Phase hierbei unpolar und bewirkt eine stärkere Zurückhaltung des Analyts und damit eine bessere Auftrennung der zu untersuchenden Proben (Bauer et al., 1989). Die DC ist eine einfache und schnelle Methode, um AHL-Moleküle aus Zellkulturüberständen nachzuweisen (Shaw et al., 1997).

Zunächst wird das Laufmittel Methanol/Wasser (60:40; v/v) in die DC-Kammer gefüllt bis der gesamte Boden bedeckt ist (maximal 1 cm Höhe). Nun wird ein Filterpapier in das Laufmittel gestellt und fixiert, welches sich durch Kapillarkräfte mit dem Laufmittel vollsaugt. Eine abgeschlossene Sättigung der Kammer ist an den Kondensattropfen am Kammerdeckel zu erkennen.

Daraufhin wird auf eine DC-Platte mit einem weichen Bleistift eine Auftragslinie auf gezeichnet, wobei ein Abstand von 2 cm zu den Seitenrändern und dem unteren Rand eingehalten wird.

Danach wird entlang der Auftragslinie der AHL-Extrakt (siehe 2.4.3.2) und bekannte AHL-Signalmoleküle als Längenstandard aufgetropft.

Die DC-Platte wird dann in einem kalten Luftstrom getrocknet. Daraufhin wird die getrocknete DC-Platte in eine Kammer gestellt und die aufgetropften Proben werden durch das Laufmittel aufgetrennt.

Nachdem die mobile Phase die letzten 2 cm der DC-Platte erreicht hat wird die entwickelte DC-Platte herausgenommen und an der Luft für ca. 30 min getrocknet. Dann wird die DC-Platte in einen Behälter gelegt und an allen vier Ecken fixiert.

2.4.3.4 Softagar-Overlay mit Reporterstämmen (Biosensoren)

Mit dem Softagar-Overlay werden die aufgetrennten Botenstoffe auf der DC-Platte visualisiert. Der Softagar-Overlay enthält die Kultur eines Biosensors, der bei Kontakt mit den AHL-Signalmolekülen, diese durch farbige Spots erkennbar macht.

Zunächst werden Übernachtskulturen von Biosensoren hergestellt. Dazu werden 10 ml NI-Bouillon mit frischem Zellmaterial des Biosensors (*Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) oder *Chromobacterium violaceum* CV026) beimpft und bei 150 rpm und RT inkubiert. Am folgenden Tag wird 200 ml flüssiger NI-Softagar mit einer stark angewachsenen 10 ml Übernachtskultur (Mc Farland: 5) eines Reporterstamms inokuliert und durch Schwenken gemischt. Der Softagar mit dem *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 enthält zusätzlich X-Gal (60 µg/ml).

Nun wird die entwickelte DC-Platte vorsichtig mit einem dünnen Film des NI-Softagar/Biosensor-Gemisches bedeckt und für 24 h bei 28°C inkubiert.

2.5.1 Charakterisierung von Mikroorganismen

Die Charakterisierung der AHL-Produzenten erfolgt durch die Ermittlung der Zell- und Koloniemorphologie, Beweglichkeit und der Gramreaktion.

2.5.2 Identifizierung von Mikroorganismen mit API® 20 E/NE System

Die API® 20 E/NE-Schnellbestimmungssysteme (bioMérieux®) sind standardisierte Testsysteme zur Identifikation einer eingeschränkten Anzahl von gramnegativen **Enter-** bzw. **Nicht-Enterobakterien**. Die Testsysteme bestehen aus jeweils 20 kleinen Reaktionsgefäßen, in denen die Substrate vorliegen. Aufgrund der Verwertung von bestimmten Substraten durch das unbekannte Bakterium kommt es zu pH-abhängigen Farbveränderungen in den Reaktionsgefäßen. Diese „Bunte Reihe“ stellt ein charakteristisches physiologisches Profil eines Bakteriums dar, anhand dessen unbekannte Mikroorganismen identifiziert werden können.

Die Auswertung erfolgt mit der Software Api-lab. Zudem generiert das API® 20 E/NE-System noch einen T-Wert, der widersprechende Reaktionen berücksichtigt und daher die Testgüte repräsentiert. Der T-Wert liefert Zahlenwerte zwischen 0 und 1, wobei ein Resultat umso präziser ist, je weiter sich der T-Wert an einen Wert von 1 annähert.

Das zu untersuchende Bakterium muß vor der Benutzung des Testsystems überprüft werden, ob es zu den Enterobakterien gehört. Dazu wird der Teststamm auf das Vorhandensein von Cytochromoxidase untersucht. Bei einem positivem Testresultat handelt es sich um ein „Nicht-Enterobakterium“ und es wird das API® 20 NE-Schnellbestimmungssystem zur weiteren Identifikation verwendet.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3. Ergebnisse

3.1.1 TRFLP-Auswertung der bakteriellen Gemeinschaftsprofile

Bei der TRFLP-Analyse der bakteriellen Gemeinschaftsprofile der Bodenproben von 2008/2009 werden die Listen der TRF zunächst mithilfe des Programms TAlign miteinander verglichen. Mit dem Programm Microbial Community Analysis 3 (MICA3) und der dazugehörigen Datenbank RDP (R10 U12) mit den Parametern > 1200 bp von der 16S rRNA können dann TRF-Längen aus den verschiedenen Gemeinschaftsprofilen bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Einige TRF können jedoch nicht weiter analysiert werden, weil sie in der Datenbank nicht aufgeführt sind. Bei anderen TRF sind nur unkultivierte Mikroorganismen hinterlegt, die keinen Gattungs- und Artnamen aufweisen und deshalb auch nicht weiter identifiziert werden können.

In den folgenden Tabellen sind die Resultate der TAlign-Analyse aufgeführt. Dabei handelt es sich um Vergleiche bestimmter Probennahmezeiten. Die Tabellen beinhalten das Comparison-Profil (siehe 2.3.8), das aus dem Vergleich der Replikatproben (Consensus-Profil) hervorgegangen ist.

In der linken Spalte ist die Länge der Fragmente der jeweiligen Proben aufgelistet. Diese TRF-Größen sind die Durchschnittswerte der terminalen Restriktionsfragmente innerhalb des Konfidenzintervalls.

Eine 0 zeigt ein Fehlen des korrespondierenden terminalen Restriktionsfragmentes in der aufgeführten Probe an und eine Zahl die Präsenz eines TRF und gleichzeitig dessen prozentuale Fluoreszenzintensität der Probe.

Einige Fragmente einer Probennahme weisen hohe prozentuale Fluoreszenzintensitäten auf. Die Fluoreszenzintensität spiegelt dabei die Abundanz (Häufigkeit) eines TRF in den Proben wider. Alle TRF einer Probennahme zählen zu den häufigst vorkommenden Ribotypen, wenn die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Proben A, B und C $>3\%$ ist.

3.1.2.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-September Südhang (SH) 2008

In Tab. 9 wird die bakterielle Gemeinschaft am Südhang zu vier verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Im Verlauf des Jahres 2008 nahm die Populationsdichte & Diversität von Mai bis Ende Juli stetig ab. Erst im September erhöhte sich die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft wieder.

In den Maiprobe kamen neun TRF vor. Die Fragmentlänge 76 bp dominierte die Proben mit Fluoreszenzintensitäten von 6,49 - 8,65% gefolgt von den Ribotypen 75 bp, 143 bp, 197 bp und 90 bp. Zudem traten die TRF-Größen 89 bp, 90 bp, 143 bp, 197 bp, 203 bp und 204 bp ausschließlich im Mai auf.

Die frühen Juliprobe wiesen fünf Fragmente auf. Der Ribotyp der Größe 76 bp war hier ebenfalls, wie im Mai schon, am Häufigsten vertreten gefolgt von den TRF-Längen 75 bp, 61 bp, 208 bp und 205 bp. Die Fragmentgrößen 205 bp und 208 bp traten im Jahr 2008 nur in den frühen Juliprobe auf.

Die späten Juliprobe enthielten nur die zwei TRF-Größen 91 bp und 201 bp. Das Fragment mit der Länge von 91 bp kommt nur in diesen Proben vor.

In den Septemberprobe kamen drei Ribotypen vor. Das am Häufigsten vorkommende Fragment wies eine Länge von 56 bp und Fluoreszenzintensitäten von 19,33 - 25,54% auf. Es folgten die TRF mit 61 bp und 76 bp.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass lediglich das Fragment mit der Größe 76 bp in drei von vier Probennahmen im Jahr 2008 auftrat.

Tab. 9: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangprobe vom 28.05.08, 03.07.08, 29.07.08 & 09.09.08

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.08			#	03.07.08			#	29.07.08			#	09.09.08		
		A	B	C		A	B	C		A	B	C		A	B	C
56		0	0	0		0	0	0		0	0	0	1	19,33	25,54	19,48
61		0	0	0	3	5,78	4,22	3,85		0	0	0	2	12,35	19,45	15,28
75	2	6,25	7,81	5,66	2	7,35	10,12	6,99		0	0	0		0	0	0
76	1	7,18	6,49	8,65	1	11,75	9,34	9,55		0	0	0	3	15,75	13,58	16,83
89		3,04	2,1	2,29		0	0	0		0	0	0		0	0	0
90	5	3,76	3,48	2,43		0	0	0		0	0	0		0	0	0
91		0	0	0		0	0	0	2	6,41	3,68	4,67		0	0	0

Tab. 9: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 28.05.08, 03.07.08, 29.07.08 & 09.09.08 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probenahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		28.05.08			03.07.08			29.07.08			09.09.08					
bp	#	A	B	C	#	A	B	C	#	A	B	C	#	A	B	C
143	3	3,88	8,13	3,16		0	0	0		0	0	0		0	0	0
197	4	3,5	3,93	4,29		0	0	0		0	0	0		0	0	0
201		3,67	3,07	2,04		0	0	0	1	2,71	6,74	5,89		0	0	0
203		1,9	2,47	1,64		0	0	0		0	0	0		0	0	0
204		1,93	1,77	1,56		0	0	0		0	0	0		0	0	0
205		0	0	0	5	5,88	2,48	3,88		0	0	0		0	0	0
208		0	0	0	4	5,53	2,57	4,22		0	0	0		0	0	0

3.1.2.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-September SH 2008

In Tab. 10 sind die möglichen bakteriellen Vertreter aufgelistet, die für diejenigen TRF in Frage kommen.

In den Maiprobe wurden die TRF durch die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Proteobakterien (β - und γ -) und *Tenericutes* (zellwandlose, grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt) repräsentiert.

Bei den frühen Juliprobe kamen die Reiche *Aquifex*, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Firmicutes*, *Planctomyces* und Proteobakterien (α -, β -, γ - und δ -) vor.

Die TRF in den späten Juliprobe wurden durch die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, *Firmicutes* und Proteobakterien (δ -) vertreten.

Die Fragmente der Septemberprobe repräsentieren die Reiche *Aquifex*, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Firmicutes*, *Planctomyces* und der Proteobakterien (α - und δ -).

Tab. 10: TRF in den Südhangproben vom Mai-September 2008

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probennahme auf

29.05.08 TRF (bp)	03.07.08 TRF (bp)	29.07.08 TRF (bp)	09.09.08 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Vertreter der TRF
			56	Nicht in Datenbank hinterlegt
	61		61	69x α -Proteobakterien, 5x δ -Proteobakterien, 24x <i>Firmicutes</i> , 1x <i>Planctomyces</i> ; 1x <i>Aquifex</i>
75	75			1x <i>Firmicutes</i>
76	76		76	1x <i>Firmicutes</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
89				1x <i>Bacteroides</i>
90				14x <i>Bacteroides</i> , 2x Grüne Schwefelbakterien
		91		3x <i>Bacteroides</i> , 2x δ -Proteobakterien, 2x Grüne Schwefelbakterien
143				12x Aktinobakterien
197				5x <i>Firmicutes</i> , 2x γ -Proteobakterien, 1x <i>Deinococcus-Thermus</i> , 1x <i>Tenericutes</i>
201		201		4x Aktinobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
203				2x β -Proteobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
204				1x β -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 1x <i>Aquifex</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
	205			14x β -Proteobakterien, 3x γ -Proteobakterien
	208			3x β -Proteobakterien

3.1.3.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-Juli Nordhang 2009

In Tab. 11 wird die Populationsdynamik in der Rhizosphäre des Nordhangs im Jahr 2009 veranschaulicht. Von Mai bis Juni verringerte sich die Biodiversität der mikrobiellen Population. In den Juliprobe stieg sie jedoch wieder sehr stark an, zu sehen an der enormen Anzahl an TRF.

In den Maiprobe kamen 17 Ribotypen vor. Das dominante TRF wies die Länge von 56 bp auf mit den Fluoreszenzintensitäten von 4,38 - 7,38% gefolgt von den TRF-Längen 55 bp und 87 bp. Die Fragmente mit den Größen 206 bp und 211 bp - 226 bp kamen ausschließlich im Mai vor.

Im Folgemonat waren 11 Fragmente vertreten. In den Juniprobe wies die TRF-Länge 76 bp mit 12,81 - 13,14% die höchste Abundanz auf gefolgt von den Ribotypen 87 bp, 55 bp, 59 bp, 209 bp, 202 bp, 197 bp und 204 bp. Zudem traten die Fragmentlängen 59 bp, 202 bp, 204 bp und 375 bp nur im Juni auf.

Die Juliprobe wies 40 Fragmente auf. Die TRF-Größe 76 bp dominierte wie im Juni auch das Gemeinschaftsprofil im Juli und hatte eine Fluoreszenzintensität von 8,38 - 10,84% in den Proben A, B & C gefolgt von den TRF-Größen 144 bp, 55 bp, 197 bp und 349 bp. Die Fragmentlängen 96 bp - 194 bp, 200 bp, 203 bp, 227 bp – 374 bp, 376 bp-566 bp kamen nur im Juli vor und veranschaulichen dadurch die enorme Vielfalt der bakteriellen Population dieses Monats. Abschließend ist noch zu erwähnen, dass die TRF mit der Größe von 55 bp und 209 bp in allen drei Probennahmen in der mikrobiellen Gemeinschaft vertreten waren.

Tab. 11: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nordhangproben vom 28.05.09, 30.06.09 & 28.07.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.09			#	30.06.09			#	28.07.09		
		A	B	C		A	B	C		A	B	C
54		0	0	0		0	0	0		1,9	3,4	2,21
55	2	4,92	5,18	3,8	3	5,81	7,41	4,93	3	4,49	4,49	4,77
56	1	4,38	4,93	7,38		2,17	3,36	2,09		0	0	0
59		0	0	0	4	4,82	6,97	3,93		0	0	0
76		0	0	0	1	12,96	13,14	12,81	1	8,38	9,3	10,84
86		5,07	1,19	1,15		0	0	0		1,63	0,73	0,58
87	3	4,83	3,89	1,3	2	5,9	7,02	8,9		0	0	0
90		0	0	0		2,26	2,49	3,05		1,36	0,98	1,13
96		0	0	0		0	0	0		0,37	0,3	0,23
97		0	0	0		0	0	0		0,35	0,29	0,22
98		0	0	0		0	0	0		0,66	0,45	0,54
144		0	0	0		0	0	0	2	4,64	4,65	5,98
147		0	0	0		0	0	0		1,4	1,55	1,65
150		0	0	0		0	0	0		0,29	0,18	0,29
194		0	0	0		0	0	0		1,28	1,32	1,54
197		0	0	0	7	2,98	3,55	4,22	4	4,02	4,27	5,44
200		0	0	0		0	0	0		0,81	0,8	1,18
202		0	0	0	6	4,17	3,74	3,21		0	0	0
203		0	0	0		0	0	0		0,48	0,26	0,38
204		0	0	0	8	2,93	4,22	3,45		0	0	0
205		1,3	1,2	0,74		0	0	0		0,91	0,67	1,08
206		0,98	0,91	0,84		0	0	0		0	0	0

Tab. 11: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nordhangproben vom 28.05.09, 30.06.09 & 28.07.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.09			#	30.06.09			#	28.07.09		
		A	B	C		A	B	C		A	B	C
208		0,7	1,61	1,03		0	0	0		1,05	0,72	0,71
209		2,25	2,13	1,54	5	5,97	4,79	4,3		1,55	1,75	0,94
211		1,33	1,12	1,19		0	0	0		0	0	0
212		1,72	1,38	1,2		0	0	0		0	0	0
213		1,33	1,01	1,99		0	0	0		0	0	0
214		1,44	1,39	1,32		0	0	0		0	0	0
218		1,15	1,33	1,47		0	0	0		0	0	0
220		1,37	2,21	1,16		0	0	0		0	0	0
221		1,41	1,31	0,93		0	0	0		0	0	0
223		1,06	0,6	1,95		0	0	0		0	0	0
226		0,48	0,78	0,65		0	0	0		0	0	0
227		0	0	0		0	0	0		0,89	0,66	0,23
235		0	0	0		0	0	0		0,13	0,2	0,36
330		0	0	0		0	0	0		0,26	0,33	0,61
340		0	0	0		0	0	0		1,17	2,73	3,65
342		0	0	0		0	0	0		0,15	0,2	0,19
343		0	0	0		0	0	0		0,14	0,3	0,34
344		0	0	0		0	0	0		0,16	0,25	0,31
349		0	0	0		0	0	0	5	3,69	4,02	3,7
363		0	0	0		0	0	0		0,22	0,21	0,28
365		0	0	0		0	0	0		0,12	0,18	0,19
366		0	0	0		0	0	0		0,13	0,14	0,18
367		0	0	0		0	0	0		0,26	0,3	0,41
369		0	0	0		0	0	0		0,21	0,4	0,48
370		0	0	0		0	0	0		0,36	0,35	0,42
372		0	0	0		0	0	0		0,99	1,36	0,44
374		0	0	0		0	0	0		1,86	1,92	2,97
375		0	0	0		1,93	2,25	0,77		0	0	0
376		0	0	0		0	0	0		0,84	0,52	0,4
378		0	0	0		0	0	0		0,48	0,47	0,51

Tab. 11: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nordhangproben vom 28.05.09, 30.06.09 & 28.07.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		28.05.09			30.06.09			28.07.09				
bp	#	A	B	C	#	A	B	C	#	A	B	C
379		0	0	0		0	0	0		0,43	0,26	0,48
380		0	0	0		0	0	0		0,43	0,35	0,44
381		0	0	0		0	0	0		0,24	0,17	0,25
566		0	0	0		0	0	0		0,1	0,12	0,15

3.1.3.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-Juli NH 2009

In der Tab. 12 werden den Fragmenten nun die korrespondierenden phylogenetischen Gruppen zugewiesen.

In den Maiproben repräsentierten die prägnanten TRF die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Cyanobakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Fusobakterien, Proteobakterien (β -, γ - und δ -), *Tenericutes* und *Thermatoga*.

Bei den Juniproben kamen die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Fusobacteria, Proteobakterien (α -, β - und γ -), *Tenericutes* und *Thermatoga* vor.

Die TRF in den Proben des Monats Juli wurden durch die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, Cyanobakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Fusobakterien, Proteobakterien (α -, β -, γ - und δ -) und *Tenericutes* vertreten.

Tab. 12: TRF in den Nordhangproben vom Mai-Juli 2009

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probennahme auf

28.05.09 TRF (bp)	30.06.09 TRF (bp)	28.07.09 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Vertreter der TRF
		54	Nicht in Datenbank hinterlegt
55	55	55	Nicht in Datenbank hinterlegt

Tab. 12: TRF in den Nordhangproben vom Mai-Juli 2009 (Fortführung)

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probennahme auf

28.05.09 TRF (bp)	30.06.09 TRF (bp)	28.07.09 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Verteter der TRF
56	56		Nicht in Datenbank hinterlegt
	59		3x <i>Firmicutes</i> , 2x <i>Thermotoga</i> , 1x α -Proteobakterien
	76	76	1x <i>Firmicutes</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
86		86	1x δ -Proteobakterien, 1x <i>Deinococcus-Thermus</i> , 1x <i>Bacteroides</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
87	87		Nur unkultivierte Mikroorganismen hinterlegt
	90	90	14x <i>Bacteroides</i> , 2x Grüne Schwefelbakterien
		96	44x <i>Bacteroides</i>
		97	1x α -Proteobakterien, 15x δ -Proteobakterien, 1x <i>Bacteroides</i>
		98	17x <i>Bacteroides</i>
		144	1x <i>Tenericutes</i>
		147	2x Aktinobakterien
		150	Nicht in Datenbank hinterlegt
		194	1x Cyanobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
	197	197	5x <i>Firmicutes</i> , 2x γ -Proteobakterien, 1x <i>Deinococcus-Thermus</i> , 1x <i>Tenericutes</i>
		200	3x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 1x Fusobakterien
	202		1x Grüne Nichtschwefelbakterien, 1x <i>Thermotoga</i>
		203	2x β -Proteobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
	204		1x β -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 1x <i>Aquifex</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
205		205	14x β -Proteobakterien, 3x γ -Proteobakterien
206			8x β -Proteobakterien, 3x <i>Firmicutes</i> , 3x <i>Tenericutes</i> , 2x Fusobakterien, 1x <i>Deinococcus-Thermus</i>
208		208	3x β -Proteobakterien
209	209	209	1x Aktinobakterien, 8x <i>Firmicutes</i> , 6x β -Proteobakterien
211			8x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien, 2x γ -Proteobakterien, 1x Fusobakterien
212			1x γ -Proteobakterien, 1x Fusobakterien
213			3x β -Proteobakterien, 20x γ -Proteobakterien, 2x <i>Firmicutes</i> , 1x Aktinobakterien
214			1x β -Proteobakterien, 2x γ -Proteobakterien, 2x <i>Tenericutes</i> , 1x <i>Firmicutes</i> , 1x <i>Bacteroides</i>
218			49 <i>Firmicutes</i>
220			4x <i>Firmicutes</i> , 1x γ -Proteobakterien
221			7x <i>Tenericutes</i> , 2x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien
223			25x <i>Firmicutes</i> , 4x Aktinobakterien, 3x <i>Tenericutes</i>

Tab. 12: TRF in den Nordhangproben vom Mai-Juli 2009 (Fortführung)

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probennahme auf

28.05.09 TRF (bp)	30.06.09 TRF (bp)	28.07.09 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Verteter der TRF
226			3x <i>Firmicutes</i> , 1x Cyanobakterien, 1x <i>Tenericutes</i>
		227	16x <i>Tenericutes</i> , 5x α -Proteobakterien, 1x δ -Proteobakterien 5x <i>Firmicutes</i> , 2x Cyanobakterien
		235	6x <i>Tenericutes</i> , 2x <i>Firmicutes</i>
		330	1x α -Proteobakterien
		340	22x Cyanobakterien, 10x α -Proteobakterien
		342	2x α -Proteobakterien
		343	19x α -Proteobakterien
		344	3x α -Proteobakterien
		349	1x Aktinobakterien
		363	5x Aktinobakterien, 2x <i>Firmicutes</i>
		365	2x β -Proteobakterien, 2x γ -Proteobakterien, 22x Aktinobakterien
		366	8x Aktinobakterien, 1x <i>Bacteroides</i>
		367	38x Aktinobakterien, 6x β -Proteobakterien, 2x <i>Firmicutes</i>
		369	26x Aktinobakterien, 4x β -Proteobakterien
		370	9x Aktinobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
		372	5x Aktinobakterien, 1x Proteobakterien
		374	2x <i>Firmicutes</i> , 1x γ -Proteobakterien, 1x Aktinobakterien
	375		3x γ -Proteobakterien, 2x <i>Firmicutes</i> , 2x Aktinobakterien
		376	2x Aktinobakterien, 3x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien
		378	4x Aktinobakterien
		379	1x Aktinobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
		380	3x <i>Firmicutes</i>
		381	1x Aktinobakterien
		566	10 β -Proteobakterien

3.1.4.1 TRFLP-Ergebnisse: Vergleich Mai-Juli Südhang 2009

Tab. 13 zeigt die Rhizosphärenmuster der Probennahmen vom Südhang 2009. In den Mai- und Juniprobe waren zwar mit jeweils sechs TRF die gleiche Populationsdichte vertreten aber sie wiesen keine gemeinsamen Ribotypen auf. In den Juliprobe stieg jedoch die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft mit 37 Fragmenten stark an.

In den Maiprobe n war die Fragmentlänge 55 bp mit einer Fluoreszenzintensität von 3,23 - 5,23% dominant vertreten. Die TRF-Größen 221 bp, 369 bp und 372 bp kamen nur im Mai vor.

Das prägnante Fragment in den Juniprobe n wies eine Länge von 76 bp auf und hatte eine Fluoreszenzintensität von 13,24 -15,59% gefolgt von den Ribotypen 90 bp, 203 bp, 209 bp und 204 bp. Ferner kam die TRF-Länge 87 bp und 90 bp nur im Juni vor.

Die TRF-Länge von 76 bp wies auch im Juli die höchste Abundanz auf. Sie war dort mit einer Fluoreszenzintensität von 11,65 -18,45% vertreten gefolgt von 55 bp, 59 bp und 197 bp. Die Fragmente mit den Längen 54 bp, 56 bp, 59 bp, 79 bp, 82 bp, 92 bp - 200 bp, 211 bp, 213 bp, 253 bp, 254 bp-367 bp, 370 bp, 378 bp-674 bp waren nur in den Juliprobe n vertreten und veranschaulichen die enorme bakterielle Diversität zur Zeit der Probennahme.

Schließlich ist noch das Fragment mit der Größe 87 bp hervorzuheben, weil es in allen Probe n auftritt.

Tab. 13: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangprobe n vom 28.05.09, 30.06.09 & 28.07.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Probe n A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Probe n A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.09			#	30.06.09			#	28.07.09		
		A	B	C		A	B	C		A	B	C
54		0	0	0		0	0	0		2,79	2,81	2,47
55	1	3,63	3,23	5,32		0	0	0	2	4,52	4,82	3,89
56		0	0	0		0	0	0		1,75	1,57	2,76
59		0	0	0		0	0	0	3	3,33	3,59	2,39
76		0	0	0	1	15,07	15,59	13,24	1	15,04	18,45	11,65
79		0	0	0		0	0	0		0,21	0,19	0,16
82		0	0	0		0	0	0		0,89	1,12	0,29
86		0,8	0,55	1,26		0	0	0		0,57	0,42	0,57
87		0	0	0		2,49	2,23	3,92		0	0	0
90		0	0	0	2	9,86	10,08	5,66		0	0	0
92		0	0	0		0	0	0		1,8	1,55	1,91
119		0	0	0		0	0	0		0,47	0,43	1,15
144		0	0	0		0	0	0		0,38	0,29	0,19
172		0	0	0		0	0	0		1,22	1,16	1,49

Tab. 13: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 28.05.09, 30.06.09 & 28.07.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #:Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.09			#	30.06.09			#	28.07.09		
		A	B	C		A	B	C		A	B	C
197		0	0	0		0	0	0	4	4,84	3,39	0,91
200		0	0	0		0	0	0		0,48	0,61	0,93
203		0	0	0	3	5,63	5,92	5,95		2,48	2,28	2,39
204		0	0	0	5	3,74	3,74	3,11		3,51	2,57	0,98
209		0	0	0	4	3,31	4,95	3,45		2,19	2,21	2,95
211		0	0	0		0	0	0		0,83	0,77	211
213		0	0	0		0	0	0		1,33	0,63	213
221		1,48	0,82	0,59		0	0	0		0	0	221
254		0	0	0		0	0	0		0,92	0,81	254
330		0	0	0		0	0	0		1,55	1,2	330
340		0	0	0		0	0	0		0,63	0,49	0,22
342		0	0	0		0	0	0		0,26	0,19	0,28
345		0	0	0		0	0	0		0,46	0,3	0,68
364		0	0	0		0	0	0		0,78	1,69	0,38
367		0	0	0		0	0	0		0,21	0,11	0,17
369		0,44	0,9	0,64		0	0	0		0	0	0
370		0	0	0		0	0	0		0,38	0,61	1,35
372		0,73	1,1	0,51		0	0	0		0	0	0
373		1,06	1,5	1,25		0	0	0		0,46	0,9	0,64
378		0	0	0		0	0	0		0,43	0,53	0,7
379		0	0	0		0	0	0		0,38	0,39	0,22
380		0	0	0		0	0	0		0,19	0,21	0,28
381		0	0	0		0	0	0		0,2	0,12	0,27
382		0	0	0		0	0	0		0,19	0,17	0,18
438		0	0	0		0	0	0		0,28	0,21	0,17
472		0	0	0		0	0	0		2,04	0,87	0,36
475		0	0	0		0	0	0		0,89	0,77	0,37
674		0	0	0		0	0	0		0,87	0,78	0,38

3.1.4.2 TRFLP-Ergebnisse: Analyse der TRF-Längen Mai-Juli SH 2009

In der Tab. 14 werden den einzelnen TRF nun die korrespondierenden phylogenetischen Gruppen zugewiesen.

Die Fragmente der Maiprobe repräsentierten die phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Bacteroides*, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Proteobakterien (β -, γ - und δ -) und *Tenericutes*.

Im Folgemonat kamen die TRF mit den phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, *Firmicutes*, Fusobakterien, Proteobakterien (α -, β - und γ -) vor.

In den Juliprobe wurden die TRF durch die folgenden phylogenetischen Gruppen repräsentiert: Aktinobakterien, *Aquifex*, *Bacteroides*, Grüne Nichtschwefelbakterien, Cyanobakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, Fusobakterien, Proteobakterien (α -, β -, γ - und δ -), *Tenericutes* und *Thermatoga*.

Tab. 14: TRF in den Südhangproben vom Mai-Juli 2009

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probennahme auf

28.05.09 TRF (bp)	30.06.09 TRF (bp)	28.07.09 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Vertreter der TRF
		54	Nicht in Datenbank hinterlegt
55		55	Nicht in Datenbank hinterlegt
		56	Nicht in Datenbank hinterlegt
		59	3x <i>Firmicutes</i> , 2x <i>Thermotoga</i> , 1x α -Proteobakterien
	76	76	1x <i>Firmicutes</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
		79	2x β -Proteobakterien, 2x γ -Proteobakterien, 1x <i>Bacteroides</i>
		82	38x α -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 3x <i>Bacteroides</i> , 2x <i>Deinococcus-Thermus</i>
86		86	1x δ -Proteobakterien, 1x <i>Deinococcus-Thermus</i> , 1x <i>Bacteroides</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
	87		Nur unkultivierte Mikroorganismen hinterlegt
	90		14x <i>Bacteroides</i> , 2x Grüne Schwefelbakterien
		92	16x <i>Bacteroides</i> , 3x α -Proteobakterien, 5x δ -Proteobakterien
		119	Nur unkultivierte Mikroorganismen hinterlegt
		144	1x <i>Tenericutes</i>
		172	7x Aktinobakterien
		197	2x <i>Firmicutes</i> , 1x Fusobakterien

Tab. 14: TRF in den Südhangproben vom Mai-Juli 2009 (Fortführung)

Rot: TRF kommt in mehreren Probenahmen vor;

Rot: TRF weist die höchste Abundanz bei einer Probenahme auf

28.05.09 TRF (bp)	30.06.09 TRF (bp)	28.07.09 TRF (bp)	Potentielle mikrobielle Vertreter der TRF
		200	3x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 1x Fusobakterien
	203	203	2x β -Proteobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
	204	204	1x β -Proteobakterien, 1x γ -Proteobakterien, 1x <i>Aquifex</i> , 1x Grüne Nichtschwefelbakterien
	209	209	8x <i>Firmicutes</i> , 6x β -Proteobakterien, 1x Aktinobakterien
		211	8x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien, 2x γ -Proteobakterien, 1x Fusobakterien
		213	3x β -Proteobakterien, 20x γ -Proteobakterien, 2x <i>Firmicutes</i> , 1x Aktinobakterien
221			7x <i>Tenericutes</i> , 2x <i>Firmicutes</i> , 1x β -Proteobakterien
		254	4x <i>Firmicutes</i>
		330	1x α -Proteobakterien
		340	22x Cyanobakterien, 10x α -Proteobakterien
		342	2x α -Proteobakterien
		345	1x α -Proteobakterien
		364	10x Aktinobakterien
		367	38x Aktinobakterien, 6x β -Proteobakterien, 2x <i>Firmicutes</i>
369			26x Aktinobakterien, 4x β -Proteobakterien
		370	9x Aktinobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
372			5x Aktinobakterien, 1x Proteobakterien
373		373	8x β -Proteobakterien, 8x γ -Proteobakterien, 8x Aktinobakterien, 1x <i>Bacteroides</i>
		378	4x Aktinobakterien
		379	1x Aktinobakterien, 1x <i>Firmicutes</i>
		380	3x <i>Firmicutes</i>
		381	1x Aktinobakterien
		382	Nur unkultivierte Mikroorganismen hinterlegt
		438	6x Aktinobakterien
		472	15x Aktinobakterien, 2x <i>Deinococcus-Thermus</i>
		475	7x <i>Deinococcus-Thermus</i> , 3x Aktinobakterien
		674	3x Cyanobakterien, 2x Aktinobakterien

3.2 Markante TRF in den Gemeinschaftsprofilen vom Nord- und Südhang

Die TRF-Größe 76 bp wies sowohl in den Proben vom Nordhang 2009 als auch in den Südhangproben 2008/2009 oft die höchste Abundanz auf. Bei dieser Fragmentlänge waren die zwei Mikroorganismen DQ132856 *Thermoanaerobacter* sp. 185g3 und CP000804 *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 in der Datenbank hinterlegt.

3.3.1 TRFLP-Ergebnisse Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften am Südhang 2008/2009 & Nordhang/Südhang 2009

In diesem Abschnitt wird die Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft des Südhangs im Zeitraum von einem Jahr (2008/2009) dargestellt. Zudem werden die mikrobiellen Populationsunterschiede der Standorte Nordhang und Südhang im Jahr 2009 erläutert. Bei den folgenden Vergleichen der bakteriellen Populationen werden den TRF anschließend keine phylogenetischen Gruppen zugeordnet, weil dies schon in den vorangegangenen Erläuterungen erfolgte.

3.3.2 TRFLP-Ergebnisse Mai Südhang 2008/2009 im Vergleich

Die Bandenmuster der bakteriellen Gemeinschaften vom Mai 2008/2009 in Tab. 15 zeichneten sich dadurch aus, dass sie keine gemeinsamen TRF aufwiesen. Die Diversität der mikrobiellen Population war im Jahr 2008 mit neun TRF höher als in den Proben vom Südhang 2009 in denen sechs Fragmente auftraten.

Im Jahr 2008 dominierte das TRF mit der Größe 76 bp und den Fluoreszenzintensitäten von 6,49 – 8,65% gefolgt von den Ribotypen 75 bp, 143 bp, 197 bp und 90 bp.

Im Folgejahr wies das Fragment mit der Größe von 55 bp und einer Fluoreszenzintensität von 3,23 – 5,32% die höchste Abundanz in den Proben A, B & C auf.

Tab. 15: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 28.05.08 & 28.05.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	28.05.08			#	28.05.09		
		A	B	C		A	B	C
55		0	0	0	1	3,63	3,23	5,32
75	2	6,25	7,81	5,66		0	0	0
76	1	7,18	6,49	8,65		0	0	0
86		0	0	0		0,8	0,55	1,26
89		3,04	2,1	2,29		0	0	0
90	5	3,76	3,48	2,43		0	0	0
143	3	3,88	8,13	3,16		0	0	0
197	4	3,5	3,93	4,29		0	0	0
201		3,67	3,07	2,04		0	0	0
203		1,9	2,47	1,64		0	0	0
204		1,93	1,77	1,56		0	0	0
221		0	0	0		1,48	0,82	0,59
369		0	0	0		0,44	0,9	0,64
372		0	0	0		0,73	1,1	0,51
373		0	0	0		1,06	1,5	1,25

3.3.3 TRFLP-Ergebnisse Juni Südhang 2008/2009 im Vergleich

Die Rhizospährenmuster der bakteriellen Gemeinschaften vom Juni 2008/2009 werden in Tab. 16 dargestellt. Die Bakterienpopulationen sind mit Ausnahme des Fragments mit der Länge von 76 bp vollkommen unterschiedlich.

Die Proben des Jahres 2008 wiesen fünf TRF auf, wobei der Ribotyp mit der Länge 76 bp mit den Fluoreszenzintensitäten 9,34 - 11,75 dominierte gefolgt von den TRF-Größen 75 bp, 61 bp, 208 bp und 205 bp.

In den Proben des Folgejahres traten sechs TRF auf und die Fragmentlänge 76 bp hatte mit den Fluoreszenzintensitäten 13,24 - 15,59 die höchste Abundanz gefolgt von den Ribotypen der Größe 90 bp, 203 bp, 209 bp und 204 bp.

Tab. 16: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 03.07.08 & 30.06.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	03.07.08			#	30.06.09		
		A	B	C		A	B	C
61	3	5,78	4,22	3,85		0	0	0
75	2	7,35	10,12	6,99		0	0	0
76	1	11,75	9,34	9,55	1	15,07	15,59	13,24
87		0	0	0		2,49	2,23	3,92
89		0	0	0		0	0	0
90		0	0	0	2	9,86	10,08	5,66
203		0	0	0	3	5,63	5,92	5,95
204		0	0	0	5	3,74	3,74	3,11
205	5	5,88	2,48	3,88		0	0	0
208	4	5,53	2,57	4,22		0	0	0
209		0	0	0	4	3,31	4,95	3,45

3.3.4 TRFLP-Ergebnisse Juli Südhang 2008/2009 im Vergleich

In Tab. 17 sind die bakteriellen Gemeinschaftsprofile vom Südhang Juli 2008/2009 dargestellt. In den beiden Gemeinschaftsprofilen waren keine gemeinsamen Fragmente vorhanden. Ferner wiesen die Proben des Südhangs 2009 eine stark erhöhte Anzahl an Ribotypen im Vergleich zum Vorjahr auf.

In den Proben des Jahres 2008 kamen nur zwei TRF vor. Die Fragmente mit den höchsten Abundanzen hatten die Längen 201 bp und 61 bp.

Die Juliprobe zeichneten sich durch eine beträchtlich hohe Anzahl von 37 Ribotypen aus. Die TRF-Größe 76 bp dominierte die Proben mit Fluoreszenzintensitäten von 11,65 - 18,45 gefolgt von den Fragmentlängen 55 bp, 59 bp und 197 bp.

Tab. 17: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 29.07.08 & 28.07.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

bp	#	29.07.08			#	28.07.09		
		A	B	C		A	B	C
54		0	0	0		2,79	2,81	2,47
55		0	0	0	2	4,52	4,82	3,89
56		0	0	0		1,75	1,57	2,76
59		0	0	0	3	3,33	3,59	2,39
76		0	0	0	1	15,04	18,45	11,65
79		0	0	0		0,21	0,19	0,16
82		0	0	0		0,89	1,12	0,29
86		0	0	0		0,57	0,42	0,57
91	2	6,41	3,68	4,67		0	0	0
92		0	0	0		1,8	1,55	1,91
119		0	0	0		0,47	0,43	1,15
144		0	0	0		0,38	0,29	0,19
172		0	0	0		1,22	1,16	1,49
197		0	0	0	4	4,84	3,39	0,91
200		0	0	0		0,48	0,61	0,93
201	1	2,71	6,74	5,89		0	0	0
203		0	0	0		2,48	2,28	2,39
204		0	0	0		3,51	2,57	0,98
209		0	0	0		2,19	2,21	2,95
211		0	0	0		0,83	0,77	2,67
213		0	0	0		1,33	0,63	0,44
254		0	0	0		0,92	0,81	0,42
330		0	0	0		1,55	1,2	0,82
340		0	0	0		0,63	0,49	0,22
342		0	0	0		0,26	0,19	0,28
345		0	0	0		0,46	0,3	0,68
364		0	0	0		0,78	1,69	0,38
367		0	0	0		0,21	0,11	0,17
370		0	0	0		0,38	0,61	1,35
373		0	0	0		0,46	0,9	0,64
378		0	0	0		0,43	0,53	0,7
379		0	0	0		0,38	0,39	0,22

Tab. 17: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Südhangproben vom 29.07.08 & 28.07.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		29.07.08			28.07.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
380		0	0	0		0,19	0,21	0,28
381		0	0	0		0,2	0,12	0,27
382		0	0	0		0,19	0,17	0,18
438		0	0	0		0,28	0,21	0,17
472		0	0	0		2,04	0,87	0,36
475		0	0	0		0,89	0,77	0,37
674		0	0	0		0,87	0,78	0,38

3.3.5 TRFLP-Ergebnisse Mai 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich

Die Rhizosphärenmuster der Mai-Proben vom Nord- und Südhang 2009 sind in Tab. 18 dargestellt. Die Anzahl der Ribotypen war in den Nordhangproben mit 17 TRF fast dreimal so hoch wie in den Südhangproben mit sechs Fragmenten. Die Ribotypen mit den Größen 55 bp und 86 bp kamen in den Proben beider Standorte vor.

In den Proben des Nordhangs wies das TRF der Länge 56 bp mit Fluoreszenzintensitäten von 4,38 - 7,38 die höchste Abundanz auf gefolgt von den Ribotypen 55 bp und 87 bp.

Das dominante Fragment von den Südhangproben wies eine Größe von 55 bp und eine Fluoreszenzintensität von 3,23 - 5,32 auf.

Tab. 18: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nord- und Südhangproben vom 28.05.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		Nordhang 28.05.09			Südhang 28.05.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
55	2	4,92	5,18	3,8	1	3,63	3,23	5,32
56	1	4,38	4,93	7,38		0	0	0
86		5,07	1,19	1,15		0,8	0,55	1,26
87	3	4,83	3,89	1,3		0	0	0

Tab. 18: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nord- und Südhangproben vom 28.05.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		Nordhang 28.05.09			Südhang 28.05.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
205		1,3	1,2	0,74		0	0	0
206		0,98	0,91	0,84		0	0	0
208		0,7	1,61	1,03		0	0	0
209		2,25	2,13	1,54		0	0	0
211		1,33	1,12	1,19		0	0	0
212		1,72	1,38	1,2		0	0	0
213		1,33	1,01	1,99		0	0	0
214		1,44	1,39	1,32		0	0	0
218		1,15	1,33	1,47		0	0	0
220		1,37	2,21	1,16		0	0	0
221		1,41	1,31	0,93		1,48	0,82	0,59
223		1,06	0,6	1,95		0	0	0
226		0,48	0,78	0,65		0	0	0
369		0	0	0		0,44	0,9	0,64
372		0	0	0		0,73	1,1	0,51
373		0	0	0		1,06	1,5	1,25

3.3.6 TRFLP-Ergebnisse Juni 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich

In der Tab. 19 werden die bakteriellen Populationen der Nord- und Südhangproben vom Juni 2009 miteinander verglichen. In den Nordhangproben kamen mit 11 TRF fast doppelt so viele Fragmente vor wie in den Südhangproben, die sechs Ribotypen aufwiesen. Die TRF der Längen 55 bp, 56 bp, 59 bp, 197 bp, 202 bp und 375 bp waren nur in den Proben des Nordhangs vorhanden, während die Fragmentlänge 203 bp ausschließlich in den Proben vom Südhang auftrat.

Das dominante Fragment in den Nordhangproben war der Ribotyp mit der Länge 76 bp und einer Fluoreszenzintensität von 12,81 - 13,14 gefolgt von den Fragmentlängen 87 bp, 55 bp, 59 bp, 209 bp, 202 bp, 197 bp und 208 bp.

In den Südhangproben wies das TRF der Größe 76 bp mit einer Fluoreszenzintensität von 13,24 - 15,59 die höchste Häufigkeit auf gefolgt von den Ribotypen der Längen 90 bp, 203 bp, 209 bp und 204 bp.

Tab. 19: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nord- und Südhangproben vom 30.06.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		Nordhang 30.06.09			Südhang 30.06.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
55	3	5,81	7,41	4,93		0	0	0
56		2,17	3,36	2,09		0	0	0
59	4	4,82	6,97	3,93		0	0	0
76	1	12,96	13,14	12,81	1	15,07	15,59	13,24
87	2	5,9	7,02	8,9		2,49	2,23	3,92
90		2,26	2,49	3,05	2	9,86	10,08	5,66
197	7	2,98	3,55	4,22		0	0	0
202	6	4,17	3,74	3,21		0	0	0
203		0	0	0	3	5,63	5,92	5,95
204	8	2,93	4,22	3,45	5	3,74	3,74	3,11
209	5	5,97	4,79	4,3	4	3,31	4,95	3,45
375		1,93	2,25	0,77		0	0	0

3.3.7 TRFLP-Ergebnisse Juli 2009 Nordhang/Südhang im Vergleich

Die Rhizosphärenmuster der Nord- und Südhangproben vom Juli 2009 werden in der Tab. 20 veranschaulicht. In den Proben beider Standorte kamen in diesem Monat eine enorme Anzahl an TRF vor. Die Nordhangproben wiesen 40 Ribotypen auf und die Südhangproben 37. Die folgenden Fragmentlängen waren in den Proben beider Standorte vertreten: 54 bp, 55 bp, 76 bp, 86 bp, 144 bp, 197 -203 bp, 209 bp und 330 bp-342 bp.

Der Ribotyp der Länge 76 dominierte die Proben des Nordhangs mit Fluoreszenzintensitäten von 8,38 - 10,84 gefolgt von den TRF-Größen 144 bp, 55 bp, 197 bp und 349 bp.

Die Fragmentgröße 76 wies ebenfalls in den Südhangproben die höchste Abundanz mit Fluoreszenzintensitäten von 11,65 - 18,45 auf gefolgt von den Ribotypen der Längen 55 bp, 59 bp und 197 bp.

Tab. 20: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nord- und Südhangproben vom 28.07.09

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		Nordhang 28.07.09			Südhang 28.07.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
54		1,9	3,4	2,21		2,79	2,81	2,47
55	3	4,49	4,49	4,77	2	4,52	4,82	3,89
56		0	0	0		1,75	1,57	2,76
59		0	0	0	3	3,33	3,59	2,39
76	1	8,38	9,3	10,84	1	15,04	18,45	11,65
79		0	0	0		0,21	0,19	0,16
82		0	0	0		0,89	1,12	0,29
86		1,63	0,73	0,58		0,57	0,42	0,57
90		1,36	0,98	1,13		0	0	0
92		0	0	0		1,8	1,55	1,91
96		0,37	0,3	0,23		0	0	0
97		0,35	0,29	0,22		0	0	0
98		0,66	0,45	0,54		0	0	0
119		0	0	0		0,47	0,43	1,15
144	2	4,64	4,65	5,98		0,38	0,29	0,19
147		1,4	1,55	1,65		0	0	0
150		0,29	0,18	0,29		0	0	0
172		0	0	0		1,22	1,16	1,49
194		1,28	1,32	1,54		0	0	0
197	4	4,02	4,27	5,44	4	4,84	3,39	0,91
200		0,81	0,8	1,18		0,48	0,61	0,93
203		0,48	0,26	0,38		2,48	2,28	2,39
204		0	0	0		3,51	2,57	0,98
205		0,91	0,67	1,08		0	0	0
208		1,05	0,72	0,71		0	0	0
209		1,55	1,75	0,94		2,19	2,21	2,95
211		0	0	0		0,83	0,77	2,67
213		0	0	0		1,33	0,63	0,44
227		0,89	0,66	0,23		0	0	0
235		0,13	0,2	0,36		0	0	0

Tab. 20: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaftsprofile der Nord- und Südhangproben vom 28.07.09 (Fortführung)

bp: Fragmentlänge des TRF; #: Auflistung der häufigsten TRF (Durchschnittswert der Fluoreszenzintensitäten der Proben A, B und C >3%) einer Probennahme; Zahlenwerte in den Proben A, B & C: Prozentuale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fragmente

		Nordhang 28.07.09			Südhang 28.07.09			
bp	#	A	B	C	#	A	B	C
254		0	0	0		0,92	0,81	0,42
330		0,26	0,33	0,61		1,55	1,2	0,82
340		1,17	2,73	3,65		0,63	0,49	0,22
342		0,15	0,2	0,19		0,26	0,19	0,28
343		0,14	0,3	0,34		0	0	0
344		0,16	0,25	0,31		0	0	0
345		0	0	0		0,46	0,3	0,68
349	5	3,69	4,02	3,7		0	0	0
363		0,22	0,21	0,28		0	0	0
364		0	0	0		0,78	1,69	0,38
365		0,12	0,18	0,19		0	0	0
366		0,13	0,14	0,18		0	0	0
367		0,26	0,3	0,41		0,21	0,11	0,17
369		0,21	0,4	0,48		0	0	0
370		0,36	0,35	0,42		0,38	0,61	1,35
372		0,99	1,36	0,44		0	0	0
373		0	0	0		0,46	0,9	0,64
374		1,86	1,92	2,97		0	0	0
376		0,84	0,52	0,4		0	0	0
378		0,48	0,47	0,51		0,43	0,53	0,7
379		0,43	0,26	0,48		0,38	0,39	0,22
380		0,43	0,35	0,44		0,19	0,21	0,28
381		0,24	0,17	0,25		0,2	0,12	0,27
382		0	0	0		0,19	0,17	0,18
438		0	0	0		0,28	0,21	0,17
472		0	0	0		2,04	0,87	0,36
475		0	0	0		0,89	0,77	0,37
566		0,1	0,12	0,15		0	0	0
674		0	0	0		0,87	0,78	0,38

3.4 Ergebnisse Quorum Sensing

3.4.1 Ergebnisse der Kreuzstrich-Assays

Mithilfe der Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und *Chromobacterium violaceum* CV026 wurden die Isolate aus der Rhizosphäre von *Lolium perenne* auf die Produktion von AHL-Molekülen untersucht. Bei den Kreuzstrich-Assays konnte mit dem Reporterstamm *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 nur ein Rhizosphärenisolat (Teststamm G⁻²) nachgewiesen werden, dass reproduzierbar AHL-Moleküle bildet. Der zweite Biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 detektierte keine AHL bei den Isolaten.

In Abb. 10 wurde *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 viermal vertikal ausgestrichen und der Teststamm G⁻² zweimal horizontal. Bei Anwesenheit von AHL-Molekülen verfärbte sich der Reporterstamm blau, wenn diese im Detektionsbereich vom Biosensor lagen. Der Reporterstamm verfärbte sich bei der Positivkontrolle (+) über den gesamten Ausstrich hin blau, weil die Konzentration der synthetischen AHL-Moleküle sehr hoch war. Die Negativkontrolle (-) verfärbte sich nicht. Der Biosensor verfärbte sich nur an den zum Teststamm G⁻² grenzenden Rändern, was die Diffusionsrichtung der gebildeten AHL-Moleküle veranschaulicht. Zudem wurde vom Teststamm G⁻² eine geringere Konzentration an AHL-Molekülen gebildet im Vergleich zur Menge der Positivkontrolle.

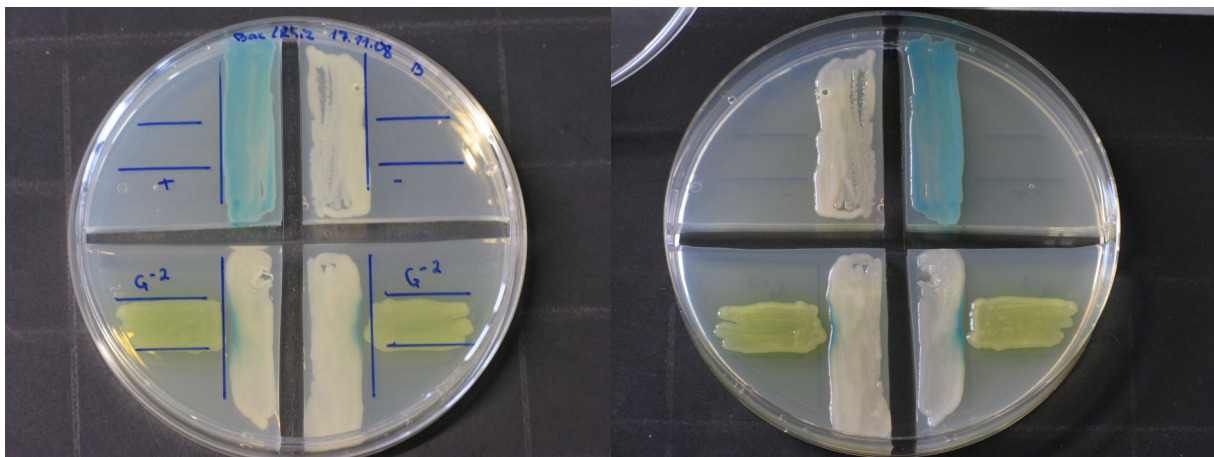


Abb. 10: Kreuzstrich-Assay mit dem Biosensor *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und dem Teststamm G⁻² auf Bac/Rhiz-Agar

Bild links: Kreuzstrich-Assay von unten (+: Positivkontrolle (1µl 20 mM OHL aufgetropft);

-: Negativkontrolle; Horizontale Ausstriche: Teststamm G⁻²; Vertikale Ausstriche: *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 (Positivkontrolle: blaue Farbreaktion; Negativkontrolle: keine Farbreaktion; Teststamm G⁻²: blaue Farbreaktionen an den zum Teststamm G⁻² grenzenden Rändern)

Bild rechts: Kreuzstrich-Assay von oben

3.4.2 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

Die Zellkulturüberstände vom Teststamm G⁻² wurden mit einem Rotationsevaporator eingengt und das resultierende Zellextrakt wurde danach auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (RP-18 F_{254s}, 20x20 cm) aufgetropft. Daraufhin wurde die entwickelte Platte mit einem Softagar-Overlay mit dem Biosensor *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 überschichtet und inkubiert.

In Abb. 11 ist die überschichtete DC-Platte zu sehen. Bei den ersten drei Spuren von links wurden jeweils 20 µl, 10 µl und 5 µl Zellextrakt auf die DC-Platte aufgetragen. Auf die vierte Spur wurden 2 µl 8 mM OHL aufgetropft. In der ersten und zweiten Spur von links sind zwei Spots zu sehen, die auf der Höhe vom OHL sind. Auf der dritten Spur ist kein Spot deutlich zu erkennen. Der Retentionsfaktor (Rf-Wert) beträgt für die Spots der beiden Zellextrakte und für den Spot des synthetischen OHL 0,15.

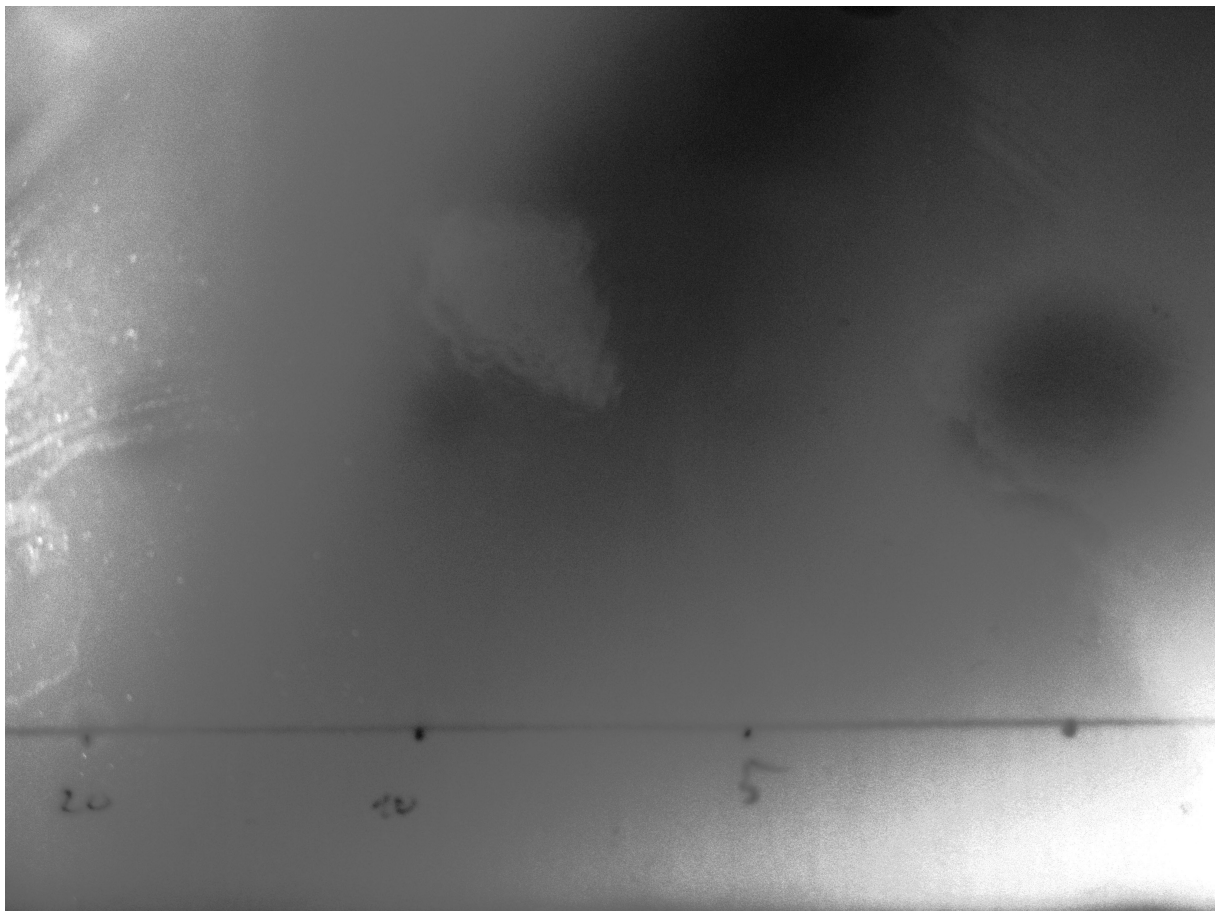


Abb. 11: Dünnschichtchromatographie des Zellextrakts vom Teststamm G⁻²
20: 20 µl Zellextrakt aufgetropft; 10: 10 µl Zellextrakt aufgetropft; 5: 5 µl Zellextrakt aufgetropft; keine Beschriftung: 2 µl 8 mM OHL aufgetropft

3.5. Charakterisierung und Identifikation des AHL-Produzenten G⁻²

Mithilfe des Biosensors *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 wurde in den Kreuzstrich-Assays der Nachweis erbracht, daß der Teststamm G⁻² ein AHL-Produzent ist. Dieser unbekannte Mikroorganismus wurde daraufhin bezüglich seiner Zell- und Koloniemorphologie, Gramreaktion und seines biochemischen Profils mit dem API® 20 E/NE-System untersucht. Ferner wurde mit dem Teststamm eine Pseudomonaden-spezifische PCR durchgeführt.

Bei dem Teststamm G⁻² handelte es sich um ein bewegliches, gramnegatives Stäbchen mit den Maßen 2x1 µm. Die glattrandigen, runden Kolonien auf den NI-Agarnährböden wiesen eine gelbe Pigmentierung auf.

Bei der biochemischen Charakterisierung wurde das API® 20 NE-System zur weiteren Identifizierung verwendet, weil der Teststamm G⁻² Cytochromoxidase positiv war. Das biochemische Profil stimmte zu 99,8% mit dem des Mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens* überein. Die Testgüte entsprach einem Wert von 0,77.

Ferner wurde der Teststamm G⁻² mit einer Pseudomonaden-spezifischen PCR untersucht (siehe 2.3.3). Das Resultat der PCR war positiv und daher gehört der Teststamm G⁻² der Gattung der Pseudomonaden an. Dieses Ergebnis untermauert das Resultat des biochemischen API-Profiles.

4. Diskussion

4.1 TRFLP-Analyse der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft

Mithilfe der kulturunabhängigen Methode des Terminalen Restriktionslängenpolymorphismus (TRFLP) wurden Veränderungen in der Rhizosphärenpopulation von *Lolium perenne* zu bestimmten Probennahmezeiten und Probennahmestandorten untersucht. Es wurden hierbei bakterielle Gemeinschaftsprofile von folgenden Probennahmen erstellt und miteinander verglichen: Südhang 2008 (29.05, 03.07, 29.07 & 09.09), Nordhang 2009 (28.05, 30.06., 28.07) und Südhang 2009 (28.05, 30.06 & 28.07). Zusätzlich wurden die Proben vom Südhang 2008 mit denen des Folgejahres verglichen und die Proben vom Nordhang 2009 mit denen des Südhangs 2009.

In den erstellten mikrobiellen Gemeinschaftsprofilen des Südhangs 2008/2009 und des Nordhangs 2009 repräsentierten die terminalen Restriktionsfragmente nach Datenbankabgleich Vertreter der Bakterien folgender phylogenetischer Gruppen:

Aquifex, *Bacteroides*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, Cyanobakterien, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* (grampositive Bakterien), Aktinobakterien, Fusobakterien, *Planctomyces*, Proteobakterien (α , β , γ und δ), *Tenericutes* und *Thermatoga*.

In den meisten Fällen wurde jedoch einem Ribotyp mehrere Bakterien desselben Reiches oder sogar mehrere Mikroorganismen von unterschiedlichen Reichen zugeordnet. Dies schmälert die Aussagekraft der TRF-Identifikation.

Anhand kulturunabhängiger Studien von unterschiedlichen Bodenproben gemäßigter Klimazonen ist bekannt, daß die meisten identifizierten Bodenbakterien zu den acht großen phylogenetischen Gruppen der *Bacteroides*, *Firmicutes* und Proteobakterien (α -, β -, γ -, δ - und ϵ -) gehören. Zu dieser Erkenntnis kamen ebenfalls kulturabhängige Arbeiten (Buckley et al., 2003; Hugenholtz et al., 1998).

Weitere typische Bodenbakterien gehören aufgrund molekularer Analysen zu den Gruppen *Planctomyces* und *Verrucomicrobiales*. Von diesen drei Gruppen konnten bisher jedoch nur wenige Vertreter kultiviert werden (Buckley et al., 2003; Hugenholtz et al., 1998).

Die *Firmicutes* sind grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Sie werden weiterhin nach den Merkmalen sporulierend und nichtsporulierend eingeteilt. Exemplarische Bodenbakterien sind die Endosporenbildner der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* (Slepecky and Hemphill, 2006; Wiegel et al., 2006).

Die Aktinobakterien gehören dem Reich der grampositiven Bakterien an und weisen einen hohen GC-Gehalt auf. Beispielhafte Bodenmikroorganismen sind Vertreter der Gattungen *Corynebacterium*, *Arthrobacter* und *Streptomyces* (Jones and Keddie, 2006; Kämpfer, 2006; Liebl, 2006).

Das Reich der *Bacteroides* enthält eine Mischung physiologischer Typen von sowohl obligaten Aerobiern als auch obligaten Anaerobiern, die viele verschiedene Arten von Habitaten besiedeln. Die drei Hauptgattungen sind *Bacteroides*, *Flavobacterium* und *Cytophaga*. Die Gattungen *Cytophaga* und *Sporocytophaga* sind obligat aerob und im Boden und Wasser weit verbreitet (Reichenbach, 2006).

Die Proteobakterien mit den Unterklassen (α -, β -, γ -, δ - und ϵ -) sind allesamt gramnegativ und zeigen eine extreme Stoffwechselvielfalt. Dieses Reich umfasst momentan die meisten und phylogenetisch unterschiedlichsten Mikroorganismen. Exemplarische Bodenbakterien der Unterklassen (α -, β -, γ - und δ -) sind Arten der Gattungen *Agrobacterium* (α -), *Azospirillum* (α -), *Caulobacter* (α -), *Comamonas* (β -), *Phyllobacterium* (β -), *Erwinia* (γ -), *Pseudomonas* (γ -) und *Bdellovibrio* (δ -). Zudem kommen auch nitrifizierende Bakterien (β -) und Myxobakterien (δ -) in diesem Habitat vor (Abeliovich, 2006; Hartmann & Baldani, 2006; Jurkevitch, 2006; Kado, 2006; Matthyse, 2006; Moore et al., 2006; Poindexter, 2006; Shimkets et al., 2006; Swings et al., 2006; Willems and De Vos, 2006).

Das Reich *Planctomyces* weist eine Reihe morphologisch einzigartiger Mikroorganismen auf, die gestielt sind und deren Zellwände statt Peptidoglykan Protein aufweisen. Zu den Gattungen dieses Reiches zählen *Planctomyces*, *Pirella*, *Gemmata* und *Isosphaera*. Vertreter der Gattungen *Planctomyces* und *Gemmata* wurden schon aus Böden isoliert (Ward et al., 2006).

Die im Experiment ermittelten phylogenetischen Gruppen *Aquifex*, Grüne Schwefelbakterien, Grüne Nichtschwefelbakterien, Cyanobakterien, *Deinococcus-Thermus*, Fusobakterien, *Tenericutes* und *Thermatoga* gehören nicht zu den klassischen Mikroorganismen, die für gewöhnlich im Boden vorkommen.

Die beiden Reiche *Aquifex* und *Thermatoga* beinhalten Prokaryoten, von denen sehr viele die physiologische Eigenschaft der Hyperthermophilie aufweisen. Diese Reiche bestehen aus jeweils ein bis zwei Hauptgattungen. Die Gattung *Aquifex* ist der thermophilste Einzeller aller bekannten Bakterien und *Thermatoga*-Arten wurden aus marinen hydrothermalen Einflüssen und aus terrestrischen heißen Quellen isoliert und kultiviert. Daher benötigen diese Mikroorganismen für ein optimales Wachstum Temperaturen von über 80°C, welche in der Rhizosphäre nicht gegeben sind (Huber and Eder, 2006; Huber and Hannig, 2006).

Die grünen Schwefelbakterien sind unbeweglich, obligat anaerob, phototroph und leben in anoxischen aquatischen Umgebungen. Demnach kommen dessen Vertreter auch nicht in Frage in der Biozönose vertreten zu sein. Die Gattung *Chlorobium* gehört zu den bekanntesten Vertretern dieses Reiches (Overmann, 2006).

Die kultivierten Vertreter der grünen Nichtschwefelbakterien wurden aus neutralen bis alkalischen heißen Quellen isoliert und sind deshalb thermophil. Aufgrund dieser Tatsache können sie ebenfalls nicht zu den Rhizobakterien gezählt werden. Die am Besten bekannte Gattung ist der anoxyphototrophe *Chloroflexus* (Hanada & Pierson, 2006).

Die Cyanobakterien sind im Gegensatz zu den anoxyphototrophen grünen Schwefelbakterien oxygene Phototrophe. Ein großer Anteil der untersuchten Arten ist obligat phototroph und bevorzugt daher einen aquatischen Lebensraum, dennoch wurden Cyanobakterien nicht nur aus Meerwasser- und Süßwasserbiotopen, sondern auch aus terrestrischen Habitaten isoliert. Daher können Vertreter der Grünalgen (Chlorophyceen), Blaualgen (Cyanophyceen) und Kieselalgen (Diatomeen) durchaus in den bakteriellen Populationen von Böden auftreten (Waterbury, 2006).

Das Reich *Deinococcus / Thermus* besteht aus drei Hauptgattungen, wobei die bestuntersuchten Vertreter zu den Gattungen *Deinococcus* und *Thermus* gehören. *Thermus*-Arten sind thermophil, deshalb scheidet diese Gattung auch als potentieller Bewohner der Rhizosphäre aus. Die grampositiven Deinokokken können hingegen zu den möglichen Mikroben der Rhizosphäre gezählt werden, weil sie im Gegensatz zur Gattung *Thermus* nicht thermophil sind und bereits aus gefilterter Luft, Hackfleisch, Staub und Boden isoliert werden konnten (Da Costa et al., 2006).

Die Gattung *Fusobacterium* beinhaltet einige obligat anaerobe, nicht sporenbildende, bewegliche oder unbewegliche, gramnegative Stäbchen. Andere Vertreter dieser Gattung sind schmale spindelförmige Bacillen. Ihr Habitat sind die Schleimhäute von Menschen und Tieren und daher gelten sie nicht als typische Bodenbakterien (Hofstad, 2006).

Bei den *Tenericutes* handelt es sich um zellwandlose, grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Die Hauptgattungen sind *Mycoplasma* und *Spiroplasma*. Viele Vertreter sind Human-, Tier- und Pflanzenpathogene. So ruft die Gattung *Ureplasma* Harnwegsinfektionen beim Menschen hervor und Spiroplasmen verursachen die hartnäckige Zitruskrankheit, Maisstaudenkrankheit, Honigbienenspiroplasmose, Babymauskatarakt und die Lethargiekrankheit des Käfers *Melontha*. Es ist durchaus vorstellbar, dass Pflanzenpathogene und Krankheitserreger von Insekten zwar in die Rhizosphäre von Pflanzen gelangen können aber sind dabei lediglich als Kontaminationen anzusehen. Sie überdauern zwar im Boden vermehren sich dort jedoch nicht und sind deshalb keineswegs als klassische Bodenbakterien anzusehen (Hartmans, 2006).

Zusätzlich zu den phylogenetischen Gruppen der Aktinobakterien, *Bacteroides*, *Firmicutes* und Proteobakterien (α -, β -, γ -, und δ -) dessen Vertreter als charakteristische Bodenbakterien angesehen werden, können daher auch bestimmte Arten der Cyanobakterien und Deinokokken durchaus in der Rhizosphäre vertreten sein.

Ferner war das Fragment der Größe 76 bp sehr oft in den Probenahmen vom Südhang 2008/2009 und Nordhang 2009 mit großer Abundanz vertreten. Bei dieser Fragmentlänge sind die zwei Mikroorganismen DQ132856 *Thermoanaerobacter* sp. 185g3 und CP000804 *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 in der Datenbank hinterlegt. Bei diesen beiden Bakterien handelte es sich jedoch um thermophile Mikroorganismen, die nicht in der Rhizosphäre vorkommen können. Demnach bleibt die Identität dieses Ribotyps unbekannt.

Dieses Bakterium wies eine gute Rhizosphärenkompetenz auf, weil es ubiquitär in den Gemeinschaftsprofilen vertreten war. Für eine solche effiziente Besiedlung der Rhizosphäre ist es von Vorteil das Wachstum der Konkurrenten durch die Produktion von Antibiotika wie z.B. 2,4-Diacetylphloroglucinol (Raaijmakers et al., 2001), Pyoluteorin, Pyrrolnitrin und Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA) (Homma et al., 1989;

Maurhofer et al., 1994; Thomashow et al., 1988) zu inhibieren. In den Studien von (Chin-A-Woeng et al., 2001) erhöhte sich die Rhizosphärenkompetenz von *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 durch die Einführung des *phzH*-Gens, welches für PCA kodiert, in dessen Genom.

Der Vergleich mit anderen TRFLP-Studien ist schwierig, weil z.B andere fluoreszenzmarkierte Forward-Primer, Restriktionsenzyme und Datenbanken verwendet wurden. Bei Veränderung dieser Parameter werden dann unterschiedliche Gemeinschaftsprofile generiert (Blackwood et al., 2003; Costello & Schmidt, 2006; Kopecký et al., 2009; Székely et al., 2008). Zudem wird zum Teil mit unterschiedlichen PCR-Volumen gearbeitet. Yi et al. (2009) kombinierten die PCR-Produkte von sechs PCR-Durchgängen, um schließlich ein Volumen von 300 µl anstatt 50 µl pro Probe zu verwenden.

Kopecký et al. (2009) verwendeten bei ihrer TRFLP-Analyse der bakteriellen Gemeinschaft von sommergrünen Waldböden pro Probe zwei Primerpaare mit jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Forward-Primern. Ein Primerpaar wurde für die Vermehrung des eubakteriellen Amplicons verwendet, während das zweite Primerpaar ausschließlich die DNA der taxonomische Gruppe der Actinomyceten amplifizierte. Damit konnte direkt der Anteil der Actinomyceten in der gesamten Diversität der Bodenbakterien bestimmt werden.

Die folgenden Studien verwendeten ebenfalls den gleichen fluoreszenzmarkierten Forward-Primer und das gleiche Restriktionsenzym wie in dieser Doktorarbeit.

In der Studie von Ulrich et al. (2006) wurden Proben von verschiedenen Ackerflächen aus Ost-Deutschland genommen, die sich anhand der Bodentextur Sand, Lehm und Schlick voneinander unterschieden. Die Bodenproben wiesen pH-Werte von 5,2 bis 6,2 auf. Alle Proben zeigten ein individuelles Rhizosphärenmuster auf, wobei dominante TRF Längen von 90 bp, 92 bp, 99 bp, 144 bp, 281 bp, 302 bp und 358 bp die phylogenetischen Gruppen der Acidobakterien, Betaproteobakterien, *Bacteroides*, *Verrucomicrobia* und *Gemmatimonades* repräsentierten.

Die Acidobakterien bevorzugen saure Böden und sind in Böden mit hohen pH-Werten selten oder gar nicht vorhanden. Da das alkalische REKAL/SAV-Stabilisat einen pH-Wert von 8,4 aufwies wäre dies eine Ursache für das Fehlen dieser phylogenetischen Gruppe.

In der Studie von Smalla et al. (2007) wurden in Niedersachsen Proben von unterschiedlichen Bodentypen Pelosol, Gley, Parabraunerde und Podsolbraunerde und unterschiedlicher Bodentextur genommen. Auch hier zeigten die verschiedenen Böden individuelle Gemeinschaftsprofile auf. Es wurde jedoch keine Aussage zu den jeweiligen dominanten phylogenetischen Gruppen in den Proben getroffen.

Die Gemeinschaftsprofile vom Südhang 2008/2009 und des Nordhangs 2009 durchliefen viele zeitliche Veränderungen.

So nahm die bakterielle Diversität im Verlauf der Probennahmen vom Südhang des Jahres 2008 stetig ab und erhöhte sich erst wieder in den Probennahmen des Septembers.

Ebenso verringerte sich zunächst die Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaft vom Nordhang 2009 von Mai bis Juni und erhöhte sich sehr stark im Juli.

Die Populationsdichten im Mai und im Juni vom Südhang 2009 waren identisch, aber sie unterschieden sich vollkommen bezüglich der vorhandenen Ribotypen. In den Juliprobe n hingegen war eine ebenso starke Zunahme der Diversität in der bakteriellen Gemeinschaft zu verzeichnen wie in den Juliprobe n vom Nordhang.

Im Vergleich der Proben vom Mai und Juni des Südhangs von 2008/2009 hatten die beiden Gemeinschaftsprofile kaum gemeinsame Fragmente zu verzeichnen. Hinsichtlich der Populationsdichte ähnelten sie sich jedoch.

Die Proben vom Juli des Südhangs 2008/2009 unterschieden sich jedoch sehr stark voneinander, weil in den Proben von 2009 wesentlich mehr TRF vertreten waren als in 2008.

Im Vergleich der Nordhang - Südhangproben vom Mai des Jahres 2009 wiesen die Nordhangproben fast dreimal so viele Ribotypen auf als in den Südhangproben. Zudem unterschieden sich die Profile bezüglich der vorherrschenden Bakteriengruppen stark voneinander.

In den Juniprobe n des Jahres 2009 vom Nordhang waren fast doppelt so viele Fragmente vertreten als in denen des Südhangs. Dennoch wiesen die Profile viele gemeinsame Ribotypen auf.

Sowohl in den Juliprobe n von 2009 des Nordhangs sowie des Südhangs kam es bezüglich zu den den vorigen Probennahmen des Jahres zu einem drastischen Anstieg der TRF. Daher ähneln sich die beiden bakteriellen Gemeinschaftsprofile.

Die Probennahmestandorte des Nord- und Südhangs unterscheiden sich in zwei Aspekten voneinander: Zum einen besteht die begrünte Fläche des Nordhangs schon seit 2003 während die des Südhangs erst seit 2006 begrünt ist. Zum anderen ist der Südhang aufgrund der wesentlich höheren Sonneneinstrahlung erhöhter Trockenheit ausgesetzt als es beim Nordhang der Fall ist.

Die wesentlich erhöhte Populationsdichte und Diversität in den mikrobiellen Gemeinschaftsprofilen des Nordhangs gegenüber des Südhangs 2009 lässt darauf schließen, dass aufgrund der längeren Begrünungsdauer am Nordhang eine artenreichere bakterielle Population sich dort etabliert hat. Die sehr starke Zunahme von TRF in den Juliprobe an den beiden Standorten könnte sich mit optimalen Wachstumsbedingungen im Zeitraum der Probennahme begründen lassen.

Die sehr geringe Anzahl an Fragmenten in den Proben vom späten Juli (zwei TRF) und September (drei TRF) des Südhangs 2008 könnte dadurch zu erklären sein, dass der Südhang einer stärkeren Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist und somit Trockenheit für die geringe bakterielle Population verantwortlich ist.

Die auftretenden Veränderungen in den obigen geschilderten bakteriellen Gemeinschaftsprofilen können durch mehrere Faktoren verursacht worden sein.

Zum einen beeinflussen Pflanzen selektiv die bakterielle und pilzliche Besiedlung der Rhizosphäre durch die Abgabe von Wurzelexsudaten wie z.B. Glucose, Aminosäuren, Polysaccharide und Proteine (Grayston et al., 1996; Hawes and Lin, 1990; Hawes et al., 2003). Eine erhöhte Wurzelexsudation hat oft einen Anstieg der bakteriellen Abundanz zur Folge (Grayston et al., 1998; Grayston et al., 2001). Einige Mikroorganismen können manche Nährstoffe zum Wachstum nutzen während andere Bakterien nicht die zur Verstoffwechslung benötigten Enzyme besitzen. Letztere kommen dann in einem bakteriellen Gemeinschaftsprofil mit nur einer geringen Abundanz oder überhaupt nicht vor. Sollte sich jedoch in der Zusammensetzung der abgegebenen Wurzelexsudate etwas verändern, so wird es auch zu Verschiebungen im bakteriellen Gemeinschaftsprofil kommen.

Die Vielfalt und Menge der ausgeschiedenen Wurzelexsudate ist zum einen abhängig vom Alter der Pflanze. So konnte Gomes et al. (2001) zeigen, dass in der Rhizosphäre von jungen Maispflanzen (*Zea mays*) nur wenige dominante Banden auftraten, während in ausgereiften Pflanzen eine größere Diversität an dominanten Banden auftrat. In der Studie von Yi et al. (2009) fanden während der Entwicklung

von Wassermelonen im Zeitraum von Mai bis Juni ebenfalls signifikante Änderungen in der Rhizobakterienpopulation statt.

Bei den einzelnen Probennahmen wurde zwar darauf geachtet gleich große Weidelgrasbüschel zu sammeln, aber es konnte nicht garantiert werden, daß alle Pflanzen das gleiche Alter hatten.

Zudem können auf die Pflanze einwirkende Streßfaktoren wie z.B. Fraßschäden durch Herbivore die Abgabe von Wurzelexsudaten verändern. In den Studien von Grayston et al. (2001) erhöhte sich die Population der Pseudomonaden signifikant in der Rhizosphäre von Klee (*Trifolium repens*) und Weißem Straußgras (*Agrostis capillaris*) durch Fraßschäden an den Trieben und Wurzeln hervorgerufen durch die Schnakenlarven von *Tipula paludosa*. Aufgrund der Fraßschäden an den Wurzeln wurde eine erhöhte Menge an C-Quellen in die Rhizosphäre abgegeben. Da Pseudomonaden zu den schnell wachsenden r-Strategen gehören, konnten sie die zusätzliche Nährstoffzufuhr für ein verstärktes Wachstum nutzen.

Die Bodeneigenschaften beeinflussen ebenfalls die Zusammensetzung der mikrobiellen Population. Bakterien und Pilze bauen organische Substanzen ab und setzen damit Stickstoff und Phosphor für Pflanzen frei.

Bodentiere wie z.B. Asseln, Insektenlarven und Diplopoden zersetzen abgestorbene Pflanzenstreu und Tierleichen und fungieren daher als Destruenten, wie auch die Bakterien und Pilze. Diese Tiere werden als Erstzersetzer bezeichnet, weil sie die tote Biomasse zunächst mechanisch zerkleinern und dann in Form von Exkrementen den Mikroorganismen zur weiteren Mineralisierung zur Verfügung stellen. Andere Bodentiere wie Collembolen oder Hornmilben besitzen eine Darmflora mit Enzymen zur Spaltung von Cellulose und Lignin, womit die Streu biochemisch abgebaut wird. Ein Nebeneffekt der Mineralisierung ist die Vermeidung einer Schicht aus abgestorbener organischer Substanz, die die Bodenoberfläche bedeckt. Diese Deckschicht erschwert es Keimlingen an die Bodenoberfläche vorzudringen (Blume et al., 2002). Auf der Rückstandshalde Sigmundshall wird jedoch momentan diese Streuauflage nicht abgebaut, was ein Indiz für schlechte Lebensbedingungen für Bodentiere sein könnte. Dabei ist zu bedenken, dass es sich bei der aufliegenden Deckschicht des Haldenrückstands nicht um einen herkömmlichen Boden handelt, sondern um ein technogenes Substrat (REKAL/SAV-Stabilisat).

4.1.2 TRFLP-Fehlermöglichkeiten

Die erstellten mikrobiellen Gemeinschaftsprofile werden durch einige Faktoren und Probleme beeinflusst. Diese bezogen sich auf die Probennahme, das Ablösen der Mikroorganismen von der Bodenmatrix, DNA-Extraktion, PCR, Restriktionsverdau, Elektrophorese, Kriterien für die TRF-Detektionsgrenzen und Datenbankabgleich von detektierten TRF. Alle erwähnten Aspekte von der Probenahme bis zur PCR gelten generell auch bei anderen Methoden, die die Untersuchung von bakteriellen Populationen in Böden zum Ziel haben.

Als Ausgangsmaterial für die Arbeiten im Labor wurden Kompositproben verwendet. Jede Kompositprobe beinhaltete Pflanzenwurzeln und unmittelbar anhaftendes Bodenmaterial von vier Pflanzen. Diese Kompositprobe gewährleistete, dass sich in ihr eine ausgewogene Vielfalt an Bakterien befanden. Bei der Verwendung von Einzelproben könnte hingegen das Phänomen auftreten, dass nur eine geringe Anzahl und Vielfalt an Rhizobakterien im resultierendem Gemeinschaftsprofil vorhanden ist.

Nach dem Erstellen der Kompositproben gilt es die Mikroorganismen von den Wurzeln abzulösen. Dies geschah in dieser Studie mit Glasperlen (\varnothing 4 mm), die unter Schütteln die Bakterien vom Probenmaterial ablösen sollten. Eine andere Methode, um die Anheftung der Mikroben vom Wurzelmaterial zu isolieren, stellt die Nutzung eines Stomachers dar. Die Probe wird hierbei in einen Stomacherbeutel mitsamt Puffer gefüllt und für kurze Zeit im Stomacher heftig abgeklopft. Das starke Abklopfen der Probe sorgt dafür, daß die Bakterien vom Wurzelmaterial in den Puffer gelangen (Nybroe et al., 2007).

Nun folgt die DNA-Extraktion dessen Protokolle so verschieden und mannigfaltig wie die Habitate der zu untersuchenden bakteriellen Populationen sind. Die DNA-Extraktion kann durch verschiedene Vorgehensweisen erfolgen, die einzeln oder in Kombination angewendet werden können. Diese Zellyseprotokolle umfassen enzymatische, chemische und physikalische Methoden, um die Zellen von Mikroorganismen zu lysieren, wobei die beiden letzteren Zellysemethoden in dieser Arbeit verwendet wurden. Oft kann das unterschiedliche Lyseverhalten von gramnegativen und grampositiven Mikroorganismen den DNA-Gehalt des Extraktes beeinflussen, weil letztere durch zahlreiche Zellwände oder durch Ausbildung von Sporen besser vor Zellaufbruch geschützt sind als die gramnegativen

Mikroorganismen. Ein physikalischer Zellaufbruch unter Verwendung eines Bead Beaters in Kombination mit entweder einer enzymatischen oder chemischen Zellysemethode soll die beste Möglichkeit zur Extraktion von DNA sein (Frostegard et al., 1999).

Nachdem die DNA extrahiert wurde wird sie per PCR vermehrt. Bei der Untersuchung von bakteriellen Gemeinschaften werden für die PCR DNA-Templates verwendet, in denen unterschiedliche DNA-Moleküle zahlreicher Mikroorganismen vorliegen. Die Amplifikation der DNA kann dann zu Komplikationen führen, wenn bestimmte DNA-Moleküle bevorzugt durch bessere Primer-Homologien amplifiziert werden (Farrelly et al., 1995; Polz et al., 1998; Qiu et al., 2001; Tanner et al., 1998). Dies führt dann zu einer überdurchschnittlichen Repräsentation einiger Spezies im Gemeinschaftsprofil, während andere nur in geringer Anzahl oder gar nicht vertreten sind. Damit also auch die Mikroorganismen mit einer geringen Primer-Homologie erfasst werden, muß eine hohe PCR-Zyklenzahl verwendet werden. In dieser Arbeit wurden 35 PCR-Zyklen gewählt und gewöhnlicherweise werden 20-35 PCR-Zyklen bei kulturunabhängigen Studien verwendet (Osborn et al., 1999).

Bei der Primerwahl für die PCR kommt es darauf an, dass die beiden Primerbindungsstellen weit auseinander liegen, damit eine große Sequenzdivergenz zwischen ihnen liegt. Zu kurze amplifizierte PCR-Produkte fehlt es an potentiellen Restriktionsschnittstellen, so dass die generierten Profile an mikrobieller Vielfalt einbüßen. Wenn die Primer jedoch zu weit voneinander entfernt liegen kann es zu Fragmenten kommen, die sehr lang sind und deren Größe sich aufgrund von zunehmenden Meßfehlern bei langen Fragmenten nicht exakt feststellen lässt. In dieser Arbeit wurden Amplicons mit einer Länge von 918 bp verwendet und es wird empfohlen eine Sequenzlänge von 400 bp bis 700 bp zu nehmen (Kitts, 2001).

Nach der Vermehrung der DNA wird diese durch Restriktionssenzyme geschnitten. Die Verwendung der Restriktionssenzyme *HhaI*, *MspI*, *RsaI* oder dessen Isoschizomere produzierten Fragmente, die am besten die mikrobielle Vielfalt in den Proben veranschaulichten (Brunk et al., 1996, Maidak et al., 2000). In dieser Studie wurde das Amplicon mit dem Restriktionssenzym *Hin6I* geschnitten, welches ein Isoschizomer des Enzyms *HhaI* ist.

Als ersten Schritt bei der Analyse des mikrobiellen Gemeinschaftsprofils wurden Detektionskriterien für die TRF festgelegt. Hierbei setzt man eine Mindest- und

Maximalgröße und einen Grenzwert für die Fluoreszenzintensität eines TRF fest. Generell wird der Grenzwert für die Fluoreszenzintensität bei 50 festgelegt, um Hintergrundrauschen zu vermeiden. Zudem können Fragmente erst ab einer Länge von 50 bp zuverlässig detektiert werden, wobei Messungen von TRF mit Größen von über 700 bp stark fehleranfällig und daher aus der Analyse ausgeschlossen werden sollten. Diese Kriterien wurden ebenfalls für diese Arbeit verwendet.

Die Ergebnisse aus zwei Replikatprofilen wurden miteinander verglichen, um die Fehlerquote zu minimieren (Egert et al., 2003; Smith et al., 2005). Die TRF-Längen aus den beiden Proben, die sich in ihrer Größe weniger oder gleich 0,5 bp voneinander unterscheiden, werden zu einer Größe zusammengefasst, indem ein Durchschnittswert aller in Frage kommender Fragmente erstellt wird. Alle anderen TRF werden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Standardeinstellung des Programms TAlign für diesen Vergleich ist ein Konfidenzintervall von 0,5 bp, welches auch in dieser Arbeit verwendet wird. Bei Erhöhung des Konfidenzintervalls würden vermehrt TRF-Fragmente in die Analyse miteinbezogen, was zur Folge hätte, dass das Gemeinschaftsprofil nun eine erhöhte Vielfalt an Mikroorganismen aufweist.

Die Genescan-Software generiert Daten bei denen die gemessenen Peakgrößen in Basenpaaren mit zwei Dezimalstellen hinter dem Komma angegeben werden. Damit die Daten jedoch später weiter prozessiert werden können müssen die TRF-Längen auf 1 bp genau auf-oder abgerundet werden (Clement et al., 1997, Kaplan et al., 2001).

Das Auf- oder Abrunden führt jedoch zu einer gewissen Problematik, wenn Peaks verschiedener Proben miteinander verglichen werden. Die Größen 203,37 bp und 203,76 bp liegen eng beieinander und es ist zunächst offensichtlich, dass sie die gleichen Mikroorganismen im bakteriellen Gemeinschaftsprofil repräsentieren. Nach dem Auf- und Abrundungsprozeß ist dies jedoch nicht mehr der Fall, weil die TRF-Länge 203 bp für andere Mikroorganismen charakteristisch ist als die Fragmentgröße 204 bp.

4.1.3 Vor- und Nachteile der TRFLP-Methode

Trotz der aufgezählten Fehlerquellen ist die TRFLP-Methode gegenüber anderen Methoden zur Erstellung von mikrobiellen Populationen im Vorteil. Zum einen können dank der automatisierten Sequenziergeräte in nur kurzer Zeit hunderte

reproduzierbare Gemeinschaftsprofile erstellt werden. Dadurch können zeitlich bedingte Verschiebungen in den Bakterienpopulationen verfolgt werden. Ferner führt die rasche Bearbeitung der Proben dazu, dass auch zusätzlich Replikatproben mitbearbeitet werden können, welche die statistische Genauigkeit erhöhen.

Zudem garantiert die Form des Elektrophoresedaten-Outputs eine schnelle Weiterverarbeitung der Daten. Die Elektrophoresedaten werden dank der Fragmentanalyse-Software in Excel-Tabellen exportiert, die dann bequem in ein beliebiges Statistik-Programm geladen werden, um eine Auswertung vorzunehmen.

Aufgrund der Kombination aus schneller Datengenerierung, bequemen Datenexport und einer zügigen statistischen Datenanalyse ist es möglich die Populationen von Mikroben in einem Umfang und einer Genauigkeit zu charakterisieren wie sie zuvor noch nie möglich war.

Es ist auch möglich den detektierten TRF identische Fragmente aus Datenbanken zuzuordnen, um damit Mikroorganismen zu identifizieren.

Ferner werden die Elektrophoresesysteme, die zur Erstellung des bakteriellen Gemeinschaftsprofils bei der TRFLP verwendet werden, auch zur DNA-Sequenzierung genutzt. Diese besticht durch eine große Präzision, um Sequenzen auf eine Base genau zu bestimmen. Kulturunabhängige Methoden, die andere Systeme zur Messung verwenden sind daher weitaus ungenauer (Lüdeman et al., 2000; Marsh et al., 1999).

Diese hohe Auflösung erlaubt den Vergleich von Elektrophoresegelen von verschiedenen Profilen, wobei z.B. bei der DGGE-Methode Vergleiche zwischen Profilen aufgrund der geringeren Auflösung dieses Elektrophoresesystems auf dem selben Gel getätigt werden sollten.

Die TRFLP-Methode wird durch alle Aspekte beschränkt, die für DNA- und PCR-basierende Arbeiten gelten. Sowohl bei der DNA-Extraktion, der PCR und der Elektrophorese können sich Fehler in das zu erstellende Gemeinschaftsprofil einschleichen, die dann die Analyse beeinträchtigen können. Da dies jedoch auch für andere Methoden gilt ist es keine charakteristische Schwäche der TRFLP.

Die Identifikation von Mikroorganismen stellt jedoch eine gewisse Schwierigkeit dar. Das Resultat eines Datenbankabgleichs führt oft zu Fragmenten, die mehrere verwandte oder auch nicht verwandte Mikroorganismen repräsentieren können. Dies

verringert die Aussagekraft der TRF-Identifikation. Hierbei bietet sich jedoch die Möglichkeit an, die DNA vor der PCR zu fraktionieren. Mit einem CsCl-Gradienten läßt sich die genomische DNA auftrennen, weil sie unterschiedliche GC-Gehalte von 30% - 80% aufweisen kann. Bei der anschließenden GC-TRFLP-Analyse der einzelnen Fraktionen werden überlappende TRF von nicht verwandten Bakterien reduziert (Doroghazi & Buckley, 2008).

Da die Identifizierung von Bakterienspezies bei der TRFLP eine umfangreiche Datenbank voraussetzt kann es bei lückenhaften Datenbanken dazu kommen, dass bestimmte Fragmente keinen Mikroben zugeordnet werden können. Dieses Phänomen kann bei anderen Sequenzen als der 16S rRNA sogar durchaus häufiger auftreten.

4.2 Quorum Sensing

4.2.1 Häufigkeit von mikrobiellen AHL-Produzenten in der Rhizosphäre von *Lolium perenne*

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 47 gramnegative Mikroorganismen aus der Rhizosphäre von *Lolium perenne* isoliert und auf die Produktion von AHL-Signalmoleküle getestet. Zur Detektion der mikrobiellen Botenstoffe wurden bei den Kreuzstrich-Assays die beiden Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und *Chromobacterium violaceum* CV026 verwendet. Nur der Teststamm G⁻² wurde mit Hilfe des Reporterstamms *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 als AHL-Produzent identifiziert. Der Biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 detektierte bei keinem Rhizosphärenisolat die Bildung von AHL-Signalmolekülen.

Gramnegative Mikroorganismen, die AHL-Moleküle zur Genregulation verwenden, sind jedoch in der Rhizosphäre weit verbreitet (Steidle et al., 2001; Whitehead et al., 2001). Häufig werden dabei Quorum-Sensing-regulierte Funktionen wie z.B. die Bildung von Pathogenitätsfaktoren, Antibiotika- und Siderophorenproduktion, konjugaler Plasmidtransfer, Fungizide und Schwärmen von Bakterien genutzt, um sich in der Rhizosphäre zu etablieren (Blosser et al., 2000). Dies konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden.

Die geringe Häufigkeit der detektierten AHL-Produzenten kann folgende Gründe haben: Die untersuchten Bakterien bildeten schlichtweg keine AHL-Signalmoleküle

und regulierten daher ihre Gene mit anderen Substanzen wie z.B. Quinolone oder Fettsäuremethylester (FAME) (Williams, 2007). Infolgedessen konnten auch keine auf AHL-basierenden Botenstoffe mithilfe der Biosensoren detektiert werden.

Ferner kommt es zur Hydrolyse des Homoserinlactonrings des AHL-Moleküls bei hohen pH-Werten, welche in dem Habitat (pH: 8,4) der zu untersuchenden Mikroorganismen vorliegen (Schaefer et al., 2000). In diesem Fall können die AHL-Moleküle nicht mehr vom Reporterstamm detektiert werden. Dies würde dafür sprechen, dass die Bakterien mit anderen Signalmolekülen kommunizieren.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Teststämme ihre jeweiligen Botenstoffe in einer zu geringen Konzentration ausgebildet haben, die jenseits des Detektionsbereichs der Biosensoren lag. Zudem könnte es auch sein, dass die Struktur der produzierten AHL-Signalmoleküle von den Teststämmen zu sehr von denen abwich, die bevorzugt von den beiden Biosensoren detektiert wird. Für die beiden Reporterstämme *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und *Chromobacterium violaceum* CV026 wären das jeweils 3-Oxo-N-Octanoyl-L-homoserinlactone und N-Hexanoyl-L-homoserinlactone mit Detektionssensitivitäten von jeweils 3×10^{-9} M und 3×10^{-11} M (Zhu et al., 1998; McClean et al., 1997).

Zudem können auch methodische Mängel bezüglich des Kreuzstrich-Assays nicht ausgeschlossen werden. In der Studie von Laue et al. (2000) wurden aus Zellkulturüberständen von *Pseudomonas fluorescens* F113 AHL-Moleküle extrahiert, obwohl die vorläufigen Kreuzstrich-Assays keine Botenstoffe nachweisen konnten. Dies hätte zur Folge, dass der Nachweis von AHL-Molekülen am Besten über deren Extraktion aus Zellkulturüberständen erfolgen sollte. Das wäre jedoch eine sehr aufwendige Prozedur, mit der es nicht möglich ist in kurzer Zeit viele Isolate auf die Bildung von AHL-Molekülen zu untersuchen.

4.2.2 Identifikation des AHL-Produzenten und Charakterisierung der AHL-Struktur der gebildeten Botenstoffe

Der AHL-produzierende Teststamm G² wurde mit dem API® 20 NE System identifiziert. Das biochemische Profil ergab eine 99,8%ige Übereinstimmung mit dem Mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens* und die Testgüte entsprach einem Wert von 0,77. Zudem ergab die Pseudomonaden-spezifische PCR (Widmer et al., 1998),

dass der Teststamm G⁻² zur Gattung der Pseudomonaden gehört. Ferner bestätigten Untersuchungen zur Morphologie, Beweglichkeit und dem Gramverhalten typische Kennzeichen der Pseudomonaden: Es handelt sich bei diesem Isolat um ein gramnegatives, bewegliches Stäbchen (Moore et al., 2006).

Die Pseudomonaden gehören zu den typischen Bodenbakterien (Costa et al., 2006) und einige Vertreter unter ihnen sind bekannt, dafür pflanzenwachstumsfördernde Eigenschaften aufzuweisen ("Plant growth promoting rhizobacteria" = **PGPR**) und eine Reihe von Fungiziden wie Phenazine, Pyoluteorin und 2,4-Diacetylphloroglucinol (Woods et al., 1997) zu produzieren. Diese Bakterien besiedeln bevorzugt Pflanzenwurzeln (Lutgenberg et al., 2001; Raaijmakers and Weller, 2001), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass es sich bei dem Teststamm G⁻² um einen Pseudomonaden handelt.

Zusätzlich wurden aus dem Zellkulturüberstand des Teststamm G⁻² die bakteriellen AHL-Signalmoleküle extrahiert und mithilfe der Dünnschichtchromatographie deren Struktur charakterisiert. Die Spots der AHL-Extrakte wiesen den gleichen Retentionswert auf wie das synthetische *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton. Demzufolge könnte es sich bei dem detektierten AHL um ein *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton handeln.

In der Studie von Cui et al. (2005) verwendet das Phytopathogen *Pseudomonas fluorescens* 5064 als Botenstoff *N*-3-hydroxyoctanoyl-homoserinlactone, um die Genregulation für die Ausbildung von Adhäsinen zur Besiedlung von Pflanzen zu steuern. Demnach könnte der detektierte Botenstoff vom Teststamm G⁻² ebenfalls die Ausprägung von Adhäsinen regulieren, weil die Strukturen des *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton vom *N*-3-hydroxyoctanoyl-homoserinlacton mit Ausnahme der Hydroxylgruppe identisch sind.

Mit der Dünnschichtchromatographie ist es jedoch nicht möglich die exakte Struktur einer Substanz zu ermitteln. Daher könnte es durchaus möglich sein, dass das detektierte AHL vom Teststamm G⁻² noch zusätzliche Substituenten wie Wasserstoff, Sauerstoff oder Hydroxyl am dritten C-Atom der Acylseitenkette aufweist.

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mithilfe des „Terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus“ (TRFLP) zeitliche und standortbedingte Veränderungen in den Rhizosphärenmustern der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre von *Lolium perenne* ermittelt. Alle Probenahmen wurden hierbei von der Rückstandshalde in Bokeloh genommen, die mit dem technogenen Substrat REKAL/SAV-Stabilisat bedeckt ist. Demnach wären Probenahmen aus natürlichen Böden erforderlich, um einen potentiellen Einfluss des technogenen Substrats auf die mikrobielle Gemeinschaft zu ermitteln.

In dieser Studie wurden zwar Gemeinschaftsprofile der Rhizobakterien erstellt, aber deren ökologische Funktion blieb offen. Dies könnte mit der Verwendung von Primern behoben werden, die funktionelle Gene amplifizieren. So könnte beispielhaft ein Primerpaar gewählt werden, dass selektiv die DNA von nitrifizierenden Bakterien vermehrt anstatt die DNA aller Mikroorganismen bei der Nutzung von universellen Primern.

Die Ergebnisse des TRF-Datenbankabgleichs führten oft dazu, dass mehrere verwandte oder auch nicht verwandte Mikroorganismen einem Ribotyp zugeordnet wurden. Dies verringerte die Aussagekraft der TRF-Identifikation. Mit der Anwendung einer GC-TRFLP lassen sich jedoch überlappende TRF reduzieren.

Die Charakterisierung der AHL-Signalmoleküle wurde mithilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Um die bakteriellen Botenstoffe genauer zu untersuchen bieten sich die Methoden der Massenspektrometrie und des Kernresonanzspektrometers (NMR = Nuclear Magnetic Resonance) an. Die Massenspektrometrie liefert Informationen bezüglich des Molekulargewichts der betreffenden Substanz und das Kernresonanzspektrometer über die Struktur des zu untersuchenden Moleküls.

Die Identifikation des AHL-Produzenten *Pseudomonas fluorescens* wurde mithilfe von morphologischen Untersuchungen, Gramreaktion, der Erstellung eines

biochemischen Profils und einer Pseudomonaden-spezifischen PCR durchgeführt. Zusätzlich könnte die 16S rRNA des Bakteriums sequenziert werden, um die Identifikation zu bestätigen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die mikrobielle Populationsdynamik in der Rhizosphäre von *Lolium perenne* untersucht. Zudem wurden AHL-Signalmoleküle eines AHL-Produzenten charakterisiert.

Die Daten über die Häufigkeit einzelner Ribotypen zu bestimmten Probennahmezeiten wurden mit der kulturunabhängigen Methode des „Terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus“ (TRFLP) erstellt.

Die mikrobiellen Gemeinschaften vom Südhang 2008 nahmen im Verlauf des Jahres von Mai bis zum späten Juli stetig ab. In den folgenden Septemberproben wurde ein geringer Anstieg der bakteriellen Populationen verzeichnet.

Die Diversität der Bakterien in der Rhizosphäre blieb in den Südhangproben des Jahres 2009 von Mai bis Juni gleich. In den Juliproben stieg sie jedoch sehr stark an. Die Anzahl an detektierten Fragmenten nahm vom Mai bis Juni in den Nordhangproben stetig ab. Sie erhöhten sich jedoch ebenso stark in den Juliproben wie es auch schon bei den Juliproben des Südhangs 2009 der Fall war.

Im Jahresvergleich der Rhizosphärenmuster vom Südhang 2008/2009 waren mehr Fragmente im Mai 2008 vertreten als in 2009. In den Juniproben wiesen die Proben von 2008/2009 eine ähnlich hohe Anzahl an TRF auf. Im Vergleich der Juliproben überstieg die Diversität von 2009 die von 2008 um ein Vielfaches.

Beim Standortvergleich des Nord- und Südhangs 2009 waren jeweils in den Mai- und Juniproben fast dreimal und doppelt so viele TRF vorhanden als in den Südhangproben. In den Juliproben erhöhte sich die jedoch die bakterielle Diversität enorm an beiden Standorten.

Die starke Abnahme an Ribotypen der Südhangproben im Jahresverlauf von 2008 und die im Vergleich von Nord- und Südhang 2009 deutlich geringere Anzahl an Fragmenten in den Südhangproben im Mai und Juni lassen sich durch die extremen Standortbedingungen erklären. Der Südhang ist einer stärkeren Sonneneinstrahlung ausgesetzt als der Nordhang. Demnach könnte Trockenheit eine Ursache für eine geringere Diversität der bakteriellen Gemeinschaft bei den betreffenden Probenahmen sein.

Die starke Zunahme an Ribotypen in den Juliproben des Nord- und Südhangs 2009

könnte hingegen mit sehr guten Wachstumsbedingungen für die Mikroorganismen zur Zeit dieser Probenahmen zu erklären sein.

Generell sind starke Schwankungen in der Bakterienpopulation bei Freilandversuchen zu erwarten, weil anders als bei einem Gewächshausversuch verschiedene Parameter wie Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, chemische bzw. mechanische und biotische Faktoren sich auf die Mikroorganismen und die Pflanzen auswirken können.

Beim zweiten Themenkomplex zur Untersuchung des Quorum Sensing wurden Bakterien aus der Rhizosphäre von *Lolium perenne* isoliert und mithilfe von den Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 und *Chromobacterium violaceum* CV026 auf die Produktion von AHL-Signalmolekülen überprüft.

Von den 47 getesteten gramnegativen Bakterien konnten nur bei einem Rhizosphärenisolat reproduzierbar AHL-Moleküle mithilfe des Reporterstamms *Agrobacterium tumefaciens* A136 pCF218 pCF372 nachgewiesen werden. Der AHL-Produzent wurde als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert. Die Charakterisierung der AHL-Signalmoleküle wurde mithilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt, wobei der Retentionswert des AHL-Extraktes mit dem des synthetischen AHL-Moleküls *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton übereinstimmte.

7. Literatur

- **Abeliovich, A.** 2006. The Nitrite-Oxidizing Bacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 5: 861-872.
- **Amann, R.I.** 1995. Fluorescently labeled, ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* 4: 543–53.
- **Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P., Stewart, G.S., & Williams, P.** 1992. *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288: 997–1004.
- **Barea, J.M., Gryndler, M., Lemanceau, Ph., Schüepp, H., and Azcón, R.** 2002. The rhizosphere of mycorrhizal plants. In: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, K. Haselwandter, eds. Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1–18.
- **Barea, J-M., Pozo, M.J., Azco´n, R., Azco´n-Aguilar, C.** 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1761–1778.
- **Barnard, A.M.L. & Salmond, G.P.C.** 2005. Quorum Sensing: The Complexities of Chemical Communication between Bacteria. *ComPlexUs Original Research Paper*: 87-101.
- **Bauer, K., Gros, L. & Sauer, W.** 1989. Dünnschichtchromatographie, Eine Einführung, Darmstadt, Eigenverlag Merck.
- **Bernhard, A.E., and Field, K.G.** 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 4571-4574.
- **Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.-H. and Paul, E.A.** 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 69: 926–932.
- **Blosser, R.S. and Gray, K.M.** 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods* 40: 47–55.
- **Blume, H.P. Brümmer G.W., Schwertmann, U., Horn, R., Kögel-Knabner, Stahr, K., Auerswald, K., Beyer, L., Hartmann, A., Litz, N., Scheinost, A., Stanjek, H.,**

- Welp, G., Wilke, B.M.** 2002. Lehrbuch der Bodenkunde-Scheffer / Schachtschabel, 15. Auflage, Spektrum, Heidelberg.
- **Bowen, G.D., and Rovira, A.D.** 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1–102.
 - **Brimecombe M.J., De Leij F.A., Lynch J.M.** 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinto R., Varanini Z., Nannipieri P., eds. *The rhizosphere*. New York: Marcel Dekker, 95–141.
 - **Buckley, T.H., and Schmidt, T.M.** 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems, *Environmental Microbiology* 5: 441-452.
 - **Brunk, C.F., Avaniss-Aghajani, E., and Brunk, C.A.** 1996. A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial smallsubunit rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 872-879.
 - **Chin-A-Woeng, T.F.C., Thomas-Oates, J.E., Bloemberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V.** 2001. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 extends the range of biocontrol ability phenazine-1-carboxylic-acid producing *Pseudomonas*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14, 1006–1015.
 - **Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., Greenberg, E.P.** 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3587–3590.
 - **Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L., and Kitts, C.L.** 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Methods* 31: 135-142.
 - **Costa, R., Gomes, N.C.M., Milling, A., and Smalla, K.** 2004. An Optimized Protocol For Simultaneous Extraction of DNA and RNA from Soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 230-234.
 - **Costa, R., Gomes, C.M., Peixoto, R.S., Rumjanek, N., Berg, G., Mendonça-Hagler, L.C.S., Smalla, K.** 2006. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2434-2447.
 - **Costello, E.K. and Schmidt, S.K.** 2006. Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental Microbiology* 8: 1471–1486.

- **Cui, X., Harling, R., Mutch, P. and Darling, D.** 2005. Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *European Journal of Plant Pathology* 111: 297–308.
- **Da Costa, M.S., Rainey, F.A. and Nobre, M.F.** 2006. The Genus *Thermus* and Relatives. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 797-812.
- **Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, M.J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., & Greenberg, E.P.** 1998. The involvement of cell to cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295–298.
- **De Kievit, T.R., & Iglewski, B.H.** 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68: 4839–4849.
- **Demmich, J.** 1990. Reststoffe aus Kohlekraftwerken. *Müll und Abfall – Beihefte* 29: 9-11.
- **Diekmann, R.** 2002. Renaturierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie mit geringem zusätzlichem Flächenbedarf am Beispiel der Halde des Kaliwerkes Sigmundshall, in *Kali und Steinsalz Nr.3 – 2002*, Hrsg. Kaliverein e.V.
- **Dong, Y-H. , Wang, L-H., Xu, J-L., Zhang, H-B., Zhang, X-F., Zhang, L-H.** 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817.
- **Doroghazi, J.R., Buckley, D.H.** 2008. Evidence from GC-TRFLP that Bacterial Communities in Soil Are Lognormally Distributed. *PLoS ONE* 3(8): e2910.doi:10.1371/journal.pone.0002910.
- **Eberhard, A., Burlingame, A.L., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Openheimer, J.J.** 1981. Biochem 20: 2444–2449. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase *Biochemistry* 20: 2444–2449.
- **Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C. & 7 other authors.** 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 20: 127–136.
- **Egert, M. and Friedrich, M.W.** 2003. Formation of pseudoterminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length

polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2555–2562.

- **Farrelly, V., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E.** 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2798-2801.

- **Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, P.E.** 1994. *J Bacteriol* 176: 269–275.

- **Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. and Simonet, P.** 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5409-5420.

- **Givskov, M., De Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S.** 1996. *J Bacteriol* 178: 6618–6622.

- **Gomez, N.C.M., Heuer, H., Schönfeld, J., Costa, R., Mendoca, L.H. & Smalla, K.** 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 232: 167-180.

- **González, J.M., Simó, R., Massana, R., Covert, J.S., Casamayor, E.O., Pedrós-Alió, C., and Moran, M.A.** 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4237-4246.

- **Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D.** 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5: 29–56.

- **Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C.** 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere, *Soil Biol. Biochem.* 30: 369–378.

- **Grayston, S.J., Dawson, L.A., Treonis, A.M., Murray, P.J., Ross, J., Reid, E.J., MacDougall, R.** 2001. Impact of root herbivory by insect larvae on soil microbial communities. *Eur. J. Soil Biol.* 37: 277-280.

- **Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D., Bardgett, R.D.** 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems, *Soil Biol. Biochem.* 33: 533–551.

- **Hanada, S. and Pierson, B.K.** 2006. The Family Chloroflexaceae. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 815-842.

- **Hartmann, A. & Baldani, J.I.** 2006. The Genus *Azospirillum*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 6: 115-140.
- **Hartmans, S., De Bont, J.A.M. & Stackebrandt, E.** 2006. The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 3: 889-918.
- **Hawes, M.C. & Lin, H.J.** 1990. Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* 94: 1855-1859.
- **Hawes, M.C., Bengough, G., Cassab, G., & Ponce, G.** 2003. Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Regul* 21: 352-367.
- **Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H.** 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-41.
- **Hiltner, L.** 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Ges. Berl.* 98: 59-78.
- **Hofstad, T.** 2006. The Genus *Fusobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 7: 1016-1027.
- **Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H. & Suzui, T.** 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21: 723-728.
- **Huber, R. and Eder, W.** 2006. Aquificlaes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 7: 925-938.
- **Huber, R. and Hannig, M.** 2006. Thermotogales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 7: 899-922.

- **Hugenholtz, P., Goebel, B., and Pace, N.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180: 4765-4774.
- **Holben, W.E., Harris, D.** 1995. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.* 4: 627–31.
- **Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J. & 7 other authors.** 1993. The luxautoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* 12: 2477–2482.
- **Jones, D. & Keddie, R.M.** 2006. The Genus *Arthrobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 3: 945-960.
- **Jurkevitch, E.** 2006. The Genus *Bdellovibrio*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 12-30.
- **Kado, C.I.** 2006. *Erwinia* and Related Genera. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 443-450.
- **Kämpfer, P.** 2006. The Family Streptomycetaceae. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 3: 538-604.
- **Kaplan, C.W., Astaire, J.C., Sanders, M.E., Reddy, B.S., and Kitts, C.L.** 2001. 16S rDNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in rat feces during ingestion of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1935-1939.
- **Kennedy, A.C.** 1998. The rhizosphere and spermosphere. In: D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, D. A. Zuberer, eds. *Principles and applications of soil microbiology*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 389–407.
- **Kitts, C.L.** 2001. Terminal Restriction Fragment Patterns: A Tool for Comparing Microbial Communities and Assessing Community Dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2(1): 17-25.
- **Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., de Nys, R.** 1997. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquat Microb Ecol* 13: 85–93.

- **Kloepper J.W., Zablutowick R.M., Tipping E.M., Lifshitz R.** 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister DL, Cregan PB, eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 315–326.
- **Kloepper, K.L.** 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Y. Okon Y, eds. Azospirillum/plant associations. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 111–118.
- **Kopecký, J., Novotná, G., Ságová-Marečková, M.** 2009. Modification of the terminal restriction fragment length polymorphism analysis for assessment of a specific taxonomic group within a soil microbial community. *Plant Soil Environ.* 9: 397–403.
- **Krupp, R.** 2004. Kalibergbau und Aluminiumrecycling im Raum Hannover. Eine Studie über Missstände und Verbesserungspotentiale, im Auftrag des Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, Kreisverband Hannover.
- **K+S.** 1998. 100 Jahre Sigmundshall 1898-1998. Hrsg. Kali und Salz GmbH Kassel, Copyright Kali und Salz GmbH.
- **Lazdunski, A.M., Ventre, I. and Sturgis, J.N.** 2004. REGULATORY CIRCUITS AND COMMUNICATION IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *Nature* 2: 581-592.
- **Lee, S-J., Park, S-Y., Lee, J-J, Yum, D-Y, Koo, B-T, Lee, J-K.** 2002. *Appl Environ Microbiol* 68: 3919–3924.
- **Liebl, W.** 2006. *Corynebacterium*-Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Springer, New York, 3: 796-818.
- **Lin, Y-H, Xu, J-L, Hu, J., Wang, L-H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., Zhang, L-H.** 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* str. XJ12B represents a novel and potent class of quorum quenching enzymes *Mol Microbiol* 47: 849–860.
- **Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J.** 1997. Characterization of microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516–22.
- **Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Gronquist, M., Eberhard, A., & González, J.E.** 2005. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extremophiles* 9: 333–341.

- **Lombi E., Wenzel, W.W., Gobran, G.R. & Adriano, D.C.** 1999. Dependency of Phytoavailability of Metals on Indigenous and Induced Rhizosphere Processes: A Review. *In*: Gobran, G.R., Wenzel, W.W. and Lombi, E. (eds.), Trace elements in the rhizosphere, CRC Press LLC, Boca Raton, 3-24.
- **Lüdemann, H., Arth, I., and Liesack, W.** 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 754-62.
- **Lutgenberg, B.J.J., Dekkers, L., Bloemberg, G.V.** 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* 34: 461-490.
- **Lynch, J.M.** 1990. The rhizosphere. New York: John Wiley.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T. Jr., Saxman, P.R., **Stredwick, J.M., Garrity, G.M., Li, B., Olsen, G.J., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M.** 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucl. Acids Res.* 28: 173-174.
- **Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., and Givskov, M.** 2002. *Microbiology* 148: 1119–1127.
- **Marsh, T.L.** 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 323-7.
- **Massol-Deya, A.A., Odelson, D.A., Hickey, R.F., Tiedje, J.M.** 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal RNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). See Ref. 6, 2: 1–8.
- **Matthysse, A.G.** 2006. The Genus *Agrobacterium*. *In*: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 91-114.
- **Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G.** 1994. Pyoluterin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO is involved in the suppression of Phytium damping-off of cress but not of cucumber. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 221-232.
- **McClellan, K. H., M. K. Winson, Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P.** 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum* : exploitation

of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703–3711.

- **Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.L. & Palleroni, N.J.** 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 646-703.

- **Morgan, J.A.W., Whipps, J.M.** 2001. Methodological approaches to the study of rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, eds. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface*. New York: Marcel Dekker: 373–410.

- **Muyzer, G., deWaal, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.

- **Muyzer, G., Smalla, K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127–41.

- **Nealson, K. H., and Markovitz, A.** 1970. *J Bacteriol* 104: 300–312.

- **Nybroe, O., Brandt, K.K., Nicolaisen, M.H. and Sørensen, J.** 2007. Methods to Detect and Quantify Bacteria in Soil. In *Modern Soil Microbiology 2nd Edition*. J. D. Van Elsas, J. K. Jansson, J. T. Trevors. CRC Press: 283-316.

- **Osborn, A. M., Moore, E. R. B., and Timmis, K. N.** 2000. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2: 39–50.

- **Overmann, J.** 2006. The Family Chlorobiaceae. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 359-378.

- **Park, S-Y., Kang, H-O., Jang, H-S, Lee, J-K, Koo, B-T, and Yum, D-Y.** 2005. *Appl Environ Microbiol* 71: 2632–2641.

- **Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., & Greenberg, E.P.** (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 197–201.

- **Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., and Young, L.Y.** 1998. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 269-279.
- **Pickup, R.** 1991. Detection and study of microorganisms in the environment—new approaches. 8: 499–503.
- **Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. & Greenberg, E.P.** 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1490-1494.
- **Pierson, L.S.I., Keppenne, V.D., & Wood, D.W.** (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 176: 3966–3974.
- **Poindexter, J.S.** 2006. Dimorphic Prosthecate Bacteria: The Genera *Caulobacter*, *Asticcaulus*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas* and *Thiodendron*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 72-90.
- **Polz, M.F., and Cavanaugh, C.M.** 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3723-3730.
- **Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., and Zhou, J.** 2001. Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 880–887.
- **Raaijmakers, J.M., and Weller, D.M.** 2001. Exploiting Genotypic Diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp.: Characterization of Superior Root-Colonizing *P. fluorescens* Strain Q8r1-96. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2545-2554.
- **Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougel C, Thioulouse J, Nazaret S.** 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4479–87.
- **Reichenbach, H.** 2006. The Order Cytophagales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 549-590.

- **Roche, D.M., Byers, J.T., Smith, D.S., Glansdorp, F.G., Spring, D.R. & Welch, M.** 2004. Communications blackout? Do N-acylhomoserinelactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* 150: 2023-2028.
- **Sait, M., Davis, K.E.R. and Janssen, P.H.** 2006. Effect of pH on Isolation and Distribution of Members of Subdivision 1 of the Phylum *Acidobacteria* Occurring in Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 72: 1852–1857.
- **Salmond, G.P., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. & Williams, P.** 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol* 16: 615–624.
- **Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Parsek, M.R. & Greenberg, E.P.** 2000. Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol.* 305: 288-301.
- **Scheer, T.** 2001. Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie – 4 – Untersuchungen zur Nutzbarkeit aufbereiteter Salzschlacke der Sekundäraluminium-Industrie als Rekultivierungsmaterial einer Kalirückstandshalde. In: *Ökologie und Umweltsicherung 20/2001*, Universität – Gesamthochschule Kassel; Fachbereich Landwirtschaft, internationale Agrarentwicklung und Ökologische Umweltsicherung.
- **Schmalenberger, A., Tebbe, C.C.** 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of transgenic, herbicideresistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 29–37.
- **Schmeisky, H., Kunick, M., Lenz, O.** 1993. Zur Begrünung der Rückstandshalden der Kaliindustrie. In: *Kali und Steinsalz* 5/6: 132-152.
- **Schmeisky, H., Lenz, O.** 1998. Zur Begrünung von Rückstandshalden der Kaliindustrie – Ergebnisse einer 25jährigen Forschungsarbeit. In: *Kali und Steinsalz* 9: 501-515.
- **Shaw, P.D., Gao, P., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E.M., Jr, Rinehart, K.L. & Farrand, S.K.** (1997). Detecting and characterizing N-acylhomoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6036-6041.
- **Shimkets, L.J., Dworkin, M. & Reichenbach, H.** 2006. The Myxobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 31-115.
- **Sio, C.F, Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P., Quax, W.J.** 2006. *Infect Immun* 74: 1673–1682.

- Székely, A.J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdú, C. & Márialigeti, K. 2008. DGGE and T-RFLP Analysis of Bacterial Succession during Mushroom Compost Production and Sequence-aided T-RFLP Profile of Mature Compost. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-008-9424-5.
- **Slepecky, R.A. & Hemphill, H.E.** 2006. The Genus *Bacillus*-Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 530-562.
- **Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C.C.** 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69: 470–479.
- **Smith ,C.J., Danilowicz ,B.S., Clear , A.K., Costello , F.J., Wilson , B., and Meijer, W.G.** 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 375–380.
- **Sørensen, J.** 1997. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: JD van Elsas; JT Trevors & EMH Wellington. (eds). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp 21-45.
- **Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C. and Eberl, L.** 2001. Visualization of *N*-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5761-5770.
- **Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P. & Stewart, G.S.** 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci* 21: 214–219.
- **Swings, J., Lambert, B., Kersters, K. & Holmes, B.** 2006. The Genera *Phyllobacterium* and *Ochrobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 747-750.

- **Tanner, M.A., Goebel, B.M., Dojka, M.A., and Pace, N.R.** 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3110-3113.
- **Thies, J.E.** 2007. Soil Microbial Community Analysis using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71: 579–591.
- **Thomashow, L.S. & Weller, D.M.** 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170: 3499-3508.
- **Ulrich, A. & Becker, R.** 2006. Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 430–443.
- **van Elsas, J.D., Duarte, G.E., Rosado, A.S., Smalla, K.** 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *J. Microbiol. Methods* 32: 133–54.
- **van Elsas, J.D., Torsvik, V., Hartmann, A., Øvreås, L. & Jansson, J.K.** 2007. The Bacteria and Archaea in Soil. In: van Elsas, J.D., Jansson, J.K. & Trevors, J.T., eds. *Modern Soil Microbiology*, CRC Press, 4: 83-106.
- **van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D.** 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 121–35.
- **Ward, N., Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovanni, S., Schlesner, H., & Stackebrandt, E.** 2006. The Order Planctomycetales, Including the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus Genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 757-793.
- **Waterbury, J.B.** 2006. The Cyanobacteria-Isolation, Purification and Identification. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 4: 1053-1073.
- **Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., & Salmond, G.P.C.** 2001. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365–404.

- **Widmer, F., Seidler R.J., Gillevet, P.M., Watrud, L.S., and Di Giovanni, G.D.** 1998. A Highly Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2545-2553.
- **Wiegel, J., Tanner, R. & Rainey, F.A.** 2006. An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 7: 654-678.
- **Willems, A. & De Vos, P.** 2006. *Comamonas*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds. *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Springer, New York, 6: 723-736.
- **Williams, P.** 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153: 3923–3938.
- **Woese, C.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–71.
- **Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M., Williams, P. & Pierson, L. S.** 1997. N-Acylhomoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol* 179: 7663-7670.
- **Yi, H., Kim, H.-J., Kim, C.-G., Harn, C.H., Kim, H.M. & Park, S.** 2009. Using T-RFLP to Assess the Impact on Soil Microbial Communities by Transgenic Lines of Watermelon Rootstock Resistant to Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV). *J. Plant Biol.* (2009) 52: 577–584.
- **Zhu, J., Beaber, J.W., More, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C.** 1998. Analogs of the Autoinducer 3-Oxo-octanoyl-Homoserine Lactone Strongly Inhibit Activity of the TraR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 180: 5398-5405.

8. Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Schmidt, der mir die Möglichkeit zur Doktorarbeit an der Universität Kassel gegeben hat. Meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Schmeisky vom Fachgebiet Landschaftsökologie und Naturschutz Witzenhausen danke ich für die kritische Diskussion meiner Arbeit und der Erlaubnis den Bus des Fachgebietes für meine Probennahmen zu nutzen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frauenrath für die Verwendung diverser Laborgeräte und seiner Arbeitsgruppe für die hilfreiche Unterstützung meiner Tätigkeiten.

Zudem danke ich der K+S AG für die Gelegenheit, Proben aus dem technogenen Substrat REKAL/SAV-Stabilisat nehmen zu dürfen sowie die finanzielle Unterstützung meiner Studie.

Anschließend gilt mein Dank allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, dass jederzeit im Labor herrschte. Zusätzlich bedanke ich mich bei Christian Eichler für die konstruktive Kritik an dieser Studie.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern für ihre liebe Unterstützung.

9. Erklärung

Die vorliegende Arbeit habe ich selbst angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

KS, den 29.01.10