

Aus dem Institut für Meereskunde

**Diversität und Dynamik
nitratreduzierender und denitrifizierender
Bakteriengruppen eines Ackerbodens**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Antje Lauer

Kiel 2001

Referent: Prof. Dr. J.F. Imhoff

Koreferent: Prof. Dr. P. Schönheit

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2001

Zum Druck genehmigt: Kiel, den _____

Der Dekan

Abstract

A combination of two methods led to a qualitative and quantitative estimation of bacterial diversity, especially of nitrate reducing and denitrifying bacteria, in three different agricultural fields treated with a mixture of nitrate-ammonia, pig liquid manure and without any fertilizer.

With community fatty acid profiles we could assess the broad taxonomic composition of the microbial community in the agricultural fields investigated, using biomarker fatty acids significant for different microbial groups. Furthermore we used selective primer pairs to amplify 16S rDNA-fragments of the *Cytophaga/Flavobacterium*-group, the genus *Bacillus* and the *Pseudomonas*-group out of DNA extracts of the arable soils followed by DGGE analysis. These bacterial groups had shown to be important members of the community according to isolation procedures. Periodical analyses over two crop seasons (1997-1998) should reveal a possible impact of fertilizers and crop rotation on the composition of the bacterial communities.

On the basis of different nitrate containing culture media, rich and poor in nutrients, about 1000 nitrate reducing and denitrifying bacterial isolates could be obtained in pure culture, which were grouped and identified by MIDI FAME profiles using the "Microbial Identification System, (Inc. MIDI)". Altogether 19 bacterial groups could be separated by using "Unweighted Pair Group Matching Analysis (UPGMA)" on the basis of >25 euclidian distances, each group containing various subgroups with different genera. For several of these bacterial groups characteristic fatty acids could be identified. A dominant part (12 groups) of the isolated bacterial groups were Gram⁺ nitrate reducing bacteria, related to the genus *Bacillus* and the Actinomycetales family showing an enormous diversity. 7 groups belonged to α -, β - and γ -proteobacteria, which contained the majority of the isolated denitrifiers, the *Cytophaga/Flavobacterium*-group and related bacteria. The community fatty acid profiles of soil samples indicated according to certain biomarker fatty acids that α -proteobacteria, β - and γ -proteobacteria (other than the isolated groups) and bacteria of the *Flexibacter/Bacteroides*-group are quantitative more abundant than the Gram⁺ bacterial groups. Fatty acids in the community profiles which could not correspond to isolated bacterial groups indicate an unknown part of not isolated bacterial diversity. No direct effect of fertilizer treatment and no significant long-termed differences in soil bacterial community composition according to crop rotation could be detected in comparison of the three agricultural fields investigated by using fatty acid community profiles.

In contrast, results of the DGGE analyses revealed a clear influence of crop rotation on the diversity of the *Cytophaga/Flavobacterium*-group, but no direct influence of fertilizer treatment was visible. The diversity of the *Pseudomonas*-group and the *Bacillus*-group was too enormous to be analyzed by DGGE banding patterns of selective amplified 16S rDNA fragments received by the chosen primer pairs. For many isolates of the *Cytophaga/Flavobacterium* group the presence of NO₃⁻-reductase, NO₂⁻-reductase and N₂O-reductase could be confirmed by using primer pairs for *narH*, *nirS* and *nosZ*, although nitrate reduction and denitrification could not be confirmed under laboratory conditions.

N₂O measurements under laboratory conditions showed that the nitrate-ammonia treated arable soil contains probably a microbial community physiologically adapted to react fast and more powerful upon periodically high nitrate concentrations in comparison to the bacterial communities in the untreated and pig liquid manure treated arable soils.

Inhalt:

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Problemstellung und Forschungskonzept dieser Arbeit.....	2
1.3 Ökologie und Physiologie der Denitrifikation.....	3
1.4 Fettsäuren als Biomarker	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Standort	8
2.2 Probenbearbeitung	12
2.3 Medien	12
2.4 Isolierung von Bakterien und Gewinnung von Reinkulturen	17
2.4.1 Isolierung heterotropher Bakterien auf Festmedien	17
2.4.2 Isolierung heterotropher Bakterien aus Anreicherungskulturen	18
2.5 Fettsäureanalyse	19
2.5.1 Fettsäureanalyse von Reinkulturen.....	19
2.5.2 Identifizierung von Bakterien mit dem „Microbial Identification System“ (MIS).....	22
2.5.3 Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben	25
2.6 Molekularbiologische Untersuchungen	25
2.6.1 DNA-Extraktion	26
2.6.2 Polymerase-Kettenreaktion – Polymerase Chain Reaction (PCR)	28
2.6.3 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)	31
2.7 Phylogenetisches Potential zur Nitrat-, Nitrit- und N ₂ O-Reduktion bei ausgewählten Isolaten	33
2.8 Untersuchungen zur physiologischen Diversität kultivierter Bakterien	33
2.8.1 Denitrifikationstest nach Alef, 1990	33
2.8.2 N ₂ O-Produktion von Bakteriengemeinschaften unter Laborbedingungen	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Isolierung heterotropher Bakterien mit verschiedenen Medien und ihre Identifizierung mittels Fettsäureanalyse	35
3.2 Fettsäureanalysen.....	41
3.2.1 Hauptfettsäuren und „Biomarkerfettsäure“ isolierter Bakteriengruppen (ECLD >25)	41
3.2.2 Diversität der Bakteriengruppen (ECLD >25) im Jahresgang	69
3.2.3 Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben.....	73
3.2.4 Charakteristische Biomarkerfettsäuren verschiedener Bakteriengruppen im Jahresgang.....	99
3.3 Molekularbiologische Untersuchungen	112
3.3.1 DNA-Extraktion	112
3.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	112
3.3.3 Molekularbiologische Untersuchungen zur prokaryontischen Diversität	113
3.3.3.1 Diversität der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> im Jahresgang	115
3.3.3.2 Diversität der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> in Anreicherungskulturen.....	123

3.3.3.3 Diversität der Bacilli im Jahresgang.....	129
3.3.3.4 Diversität der Bacilli in Anreicherungskulturen	138
3.3.3.5 Diversität der Gruppe <i>Pseudomonas</i> im Jahresgang	139
3.3.4 Untersuchungen des genetischen Potentials zur Reduktion von N- Verbindungen durch Isolate der <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> -Gruppe.....	141
3.4 Nachweis der Nitratreduktion/Denitrifikation von Bakterienisolaten unter Laborbedingungen	142
3.4.1 Denitrifikationstest nach Alef, 1991	142
3.4.2 N ₂ O-Produktion von Bakteriengemeinschaften unter Laborbedingungen.....	146
4. Diskussion	148
4.1 Signifikanz der ausgewählten Medien für die isolierten Bakteriengruppen.....	150
4.2 Diversität isolierter denitrifizierender und nitratreduzierender heterotropher Bakterien.....	151
4.3 Fettsäureanalysen zur Identifizierung von Reinkulturen.....	153
4.4 Gesamtfettsäureanalysen von Bodenproben zur Erfassung der bakteriellen Diversität im Jahresgang.....	155
4.4.1 Nachweis von α -, β - und γ -Proteobacteria in Bodenproben mittels Gesamtfettsäureanalysen.....	158
4.4.2 Nachweis Gram ⁺ und anderer Bakteriengruppen in Bodenproben mittels Gesamtfettsäureanalysen.....	162
4.5 Diversität ausgewählter Bakteriengruppen mittels DGGE.....	165
4.6 Untersuchungen zum Denitrifikationspotential der kultivierten Bakteriengemein- schaft.....	168
5. Zusammenfassung	170
6. Literatur.....	174
7. Abkürzungsverzeichnis.....	180
8. Abbildungsverzeichnis.....	181
9. Tabellenverzeichnis.....	185
10. Anhang.....	187

Abb. 11b: Detailliertes Dendrogramm (UPGM) isolierter Bakteriengruppen (ECLD >25) mit Angabe ihrer charakteristischen Haupt-, Neben- und Biomarkerfettsäuren, sowie der Anzahl Untergruppen (UG, ECLD >10) und den ähnlichsten Gattungen (MIS, "closest match")

Tab. 12a: Charakteristische eukaryontische Fettsäuren. Zusammenstellung aus der aktuellen Literatur

Tab. 12b: Charakteristische prokaryontische Fettsäuren. Zusammenstellung aus der aktuellen Literatur

Tab. 12c: Verhältnisse von Fettsäuren und Fettsäuregruppen zueinander und ihre Bedeutung. Zusammenstellung aus der aktuellen Literatur

Tab. 22: Darstellung der Fettsäuremuster sämtlicher Untergruppen (ECLD >10) der verschiedenen Hauptgruppen (ECLD >25) mit ihren signifikanten Haupt-, Neben- und Biomarkerfettsäuren (farbig markiert)

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Der Nachweis von spezifisch markierten genetisch veränderten Organismen (GVOs) und die Analyse ihres Schicksals in der Umwelt läßt sich heute ohne große Probleme bewältigen. Die Auswirkungen, die das massive Ausbringen von GMOs oder anderer Bakterien in die Umwelt oder auch andere die Standortbedingungen verändernde Maßnahmen auf natürliche Bakteriengemeinschaften haben, lassen sich hingegen bislang noch nicht hinreichend exakt abschätzen. Erforderlich hierfür sind Methoden zur Darstellung der Artenvielfalt am natürlichen Standort, die erst mit der Entwicklung genetischer Analysemethoden insbesondere der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierungsverfahren in greifbare Nähe gerückt sind. Auch wenn in diesem Bereich innerhalb der letzten Jahre große Fortschritte erzielt wurden, so gibt es keine überzeugenden und allgemein akzeptierten Konzepte die komplexe bakterielle Diversität natürlicher Standorte und ihre durch menschliche Aktivitäten und Umweltfaktoren bedingten Veränderungen zeitlich in ausreichender Auflösung zu verfolgen. Die bakterielle Diversität in Böden ist in der Regel so hoch, daß es mit praktikablem Aufwand kaum möglich erscheint sie als Ganzes zu analysieren. Es erscheint daher nötig, die Strategien auf physiologisch oder phylogenetisch definierte Gruppen zu beschränken. Die Auswahl phylogenetisch definierter Gruppen böte sich insofern an, als Sequenzdaten der 16S rDNA die größte derzeit verfügbare Datenbasis bilden und daher ausreichend Hintergrundinformation verfügbar ist. Auf der Basis von 16S rDNA Sequenzen aufbauende phylogenetische Untersuchungen lassen aber nur sehr bedingt Rückschlüsse auf physiologische Leistungen bzw. physiologisches Leistungspotential zu, das allerdings für ökologische Fragestellungen von hoher Relevanz ist. Hierzu sind Forschungsansätze zu entwickeln, die auf der Basis einer ökologisch relevanten, physiologischen Leistung differenzieren.

1.2 Problemstellung und Forschungskonzept dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen Methoden angewandt werden, die es erlauben die Diversität einer ökologisch bedeutenden physiologischen Bakteriengruppe zu analysieren. Diese Bakteriengruppe soll ein Anwendungspotential in biotechnologischen Verfahren haben und der zukünftige Einsatz von gentechnisch veränderten Vertretern dieser Gruppe in der Natur sollte sehr wahrscheinlich sein, oder sie soll potentiell durch den Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen beeinflusst werden. Dies trifft in besonderem Maße für Denitrifizierer und Nitratreduzierer zu, die in der Natur weit verbreitet und im Hinblick auf andere physiologische Leistungen ausgesprochen vielseitig sind. Die Nitratreduktion ist außerdem in zahlreichen phylogenetischen Gruppen vertreten, so daß kein phylogenetisch konzipierter Ansatz der Diversitätsanalyse diese Bakteriengruppe erfassen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der taxonomischen Diversität denitrifizierender und nitratreduzierender Bakterien in einem Ackerboden. Die Diversität soll durch Kulturmethoden und durch genetische Analysen direkt aus der DNA des Standortes dargestellt werden. Damit sollen Grundlagen geschaffen werden, dynamische Veränderungen auf anthropogene und umweltbedingte Veränderungen dieser Bakteriengemeinschaften zu erfassen. Ausgewählt wurde hierfür ein Ackerstandort mit unterschiedlich gedüngten Parzellen.

Durch die Isolierung wesentlicher Mitglieder dieser Bakteriengruppe und ihre Identifizierung über Fettsäuremuster soll ein Überblick über die am Standort vorhandenen und mit den eingesetzten Verfahren kultivierbaren Bakterien, die zum dissimilatorischen Umsatz von Nitrat in der Lage sind, geschaffen werden. Gleichzeitig soll eine Dynamik wesentlicher Mitglieder der Bakteriengemeinschaft im Jahresgang mit Hilfe der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) untersucht werden. Die isolierten Stämme sollen außerdem als Referenz für die Untersuchungen aus der Standort-DNA dienen.

1.3 Ökologie und Physiologie der Denitrifikation

Die Denitrifikation wird als Prozess definiert, bei dem Nitrat der Reihe nach über Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff reduziert wird (Ferguson *et al.*, 1994). Durch die mikrobielle Denitrifikation wird innerhalb des Stickstoffkreislaufes Nitrat über Nitrit zu gasförmigen Stickstoffkomponenten (NO, N₂O, N₂) reduziert und auf diese Weise dem betreffenden Ökosystem entzogen.

Die Denitrifikation findet vor allem bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken in anoxischen Habitaten statt, wobei Nitrat und andere reduzierte Stickstoffverbindungen anstelle von Sauerstoff als terminale Elektronenakzeptoren von den Bakterien genutzt werden, um ATP zu bilden. Bei der Reduktion der verschiedenen Stickstoffverbindungen wird ausreichend Energie freigesetzt, wobei jene der Nitritreduktion zu Stickstoffmonoxid energetisch am ungünstigsten ist.

Bei der Denitrifikation erfolgt die vollständige Reaktion vom Nitrat bis zum molekularen Stickstoff. Die Reaktionskette kann jedoch auch unterbrochen werden oder erst später beginnen, wie es die Akkumulation von Nitrit oder die Freisetzung von Stickoxiden in Untersuchungen an Bakterienpopulationen gezeigt hat. Auch eine aerobe Denitrifikation ist weit verbreitet (Robertson & Kuenen, 1990).

Denitrifikanten finden sich in einer Vielzahl von Bakteriengattungen mit unterschiedlichsten physiologischen Eigenschaften. Sie sind häufiger in der α - und β -Untereinheit der Proteobacteria zu finden, als in anderen phylogenetischen Bakteriengruppen. Ein einheitliches Verbreitungsmuster ist jedoch nicht erkennbar. Enterobakterien können nicht denitrifizieren, sind aber in der Lage Nitrat zu Nitrit und weiter zu Ammonium zu reduzieren. In Tabelle 1 sind Bakteriengattungen, die denitrifizierende Arten beinhalten, nach ihren charakteristischen Wachstumsformen oder anderen physiologischen Eigenschaften aufgelistet. Diese Tabelle zeigt, wie weit verbreitet die Fähigkeit zur Denitrifikation in den unterschiedlichsten Bakteriengruppen ist.

Tab. 1: Metabolische Diversität denitrifizierender Bakteriengattungen

Bacteria (Gram⁺)	Bacteria (Gram⁻)
Organotrophe	Diazotrophe
Sporenbildner	<i>Aquaspirillum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Azospirillum</i>
Keine Sporenbildner	<i>Azoarcus</i>
<i>Jonesia</i>	<i>Bacillus</i>
Bacteria (Gram⁻)	<i>Bradyrhizobium</i>
Phototrophe	<i>Pseudomonas</i>
<i>Rhodobacter</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Rhodoplanes</i>	<i>Sinorhizobium</i>
Lithotrophe	Thermophile
S-Oxidierer	<i>Aquifex</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Thiobacillus</i>	<i>Thermothrix</i>
<i>Thioploca</i>	Psychrophile
H₂-Oxidierer	<i>Aquaspirillum</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Halomonas</i>
<i>Paracoccus</i>	Halophile
<i>Pseudomonas</i>	<i>Halomonas</i>
NO₂⁻ oder NH₄⁺-Oxidierer	<i>Bacillus</i>
<i>Nitrobacter</i>	Pigmentbildner
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Chromobacterium</i>
Organotrophe	<i>Flavobacterium</i>
Carboxidotrophe	<i>Pseudomonas</i>
<i>Pseudomonas</i>	„Budding“
<i>Zavarzinia</i>	<i>Blastobacter</i>
Oligocarbophile	<i>Hyphomicrobium</i>
<i>Aquaspirillum</i>	„Gliding“
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Cytophaga</i>
Fermentative	<i>Flexibacter</i>
<i>Empedobacter</i>	Magnetotaxische
<i>Azospirillum</i>	<i>Magnetospirillum</i>
Facultativ Anaerobe	Pathogene
<i>Alteromonas</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>
Aerobe	<i>Agrobacterium</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Eikenella</i>
	<i>Ochrobactrum</i>
	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Tsukamurella</i>
	<i>Flavobacterium</i>
	<i>Kingella</i>
	<i>Moraxella</i>
	<i>Morococcus</i>
	<i>Neisseria</i>
	<i>Oligella</i>
	<i>Sphingobacterium</i>

Die meisten Denitrifikanten sind aerobe heterotrophe Organismen, die Redoxequivalente durch eine Oxidation diverser C-Quellen auf N-Oxide transferieren können. Autotrophe Denitrifikanten benötigen dagegen anorganische Schwefelkomponenten, Wasserstoff, Ammonium oder Nitrit. Auch mittels Eisenoxidation ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) ist ein vollständiger Denitrifikationsprozeß möglich (Zumft, 1992).

Eine Vielzahl von fakultativ anaeroben Mikroorganismen besitzt die Fähigkeit den in Nitrat und Nitrit gebundenen Sauerstoff für eine Oxidation organischer oder anorganischer Substrate zu verwerten. So sind z.B. 39% der Pseudomonaden, eine häufig im Boden vorkommende Bakteriengattung nach bisherigen Kenntnissen in der Lage zu denitrifizieren (Skinner, 1968). Diese Fähigkeit ermöglicht diesen Mikroorganismen in sauerstoffarmen bis sauerstofffreien Mikrohabitaten zu existieren und mehr Energie daraus zu gewinnen, als es gärende Mikroorganismen vermögen. Zu den allgemein häufig in Böden isolierten Denitrifikanten gehören auch Vertreter der Gattungen *Alcaligenes* und *Achromobacter*.

Der Denitrifikationsprozeß ist vom Nitratgehalt des Bodens, sowie von verschiedenen Umweltparametern wie Wassergehalt, pH-Wert, Temperatur und den verfügbaren organischen und anorganischen Substanzen abhängig. Nach Tiedje *et al.*, 1982, ist jedoch hierbei der Einfluß der C-Quellen und des Sauerstoffgehaltes höher zu bewerten, als der Nitratgehalt eines Bodens. Untersuchungen von Gamble *et al.* (1977), ergaben in landwirtschaftlich genutzten Böden durchschnittlich $1 - 5 \times 10^6$ Organismen/g Boden (TS). Nach Tietje *et al.* (1972) machen Denitrifikanten ca. 20% der Gesamtbakteriengemeinschaft von Böden aus.

Ein hoher Wassergehalt im Boden (> 80 %) führt zu einer verlangsamten Sauerstoffdiffusion durch die wassergefüllten Bodenporen ins Innere der Bodenaggregate. Der im Boden enthaltene Sauerstoff wird von den aeroben Mikroorganismen und durch die Wurzelatmung schnell verbraucht, so daß anaerobe Verhältnisse auftreten können. Der Boden muß jedoch nicht völlig sauerstofffrei sein, damit es zur Denitrifikation kommen kann, da im allgemeinen genügend anoxische Mikrohabitats existieren, zum Beispiel in wassergesättigten Bodenporen oder dort, wo der Abbau energiereichen Substrates einen Sauerstoffmangel auslöst. Neben der dissimilatorischen Nitratreduktion, bei der Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor genutzt wird, und zu der nur Bakterien befähigt sind, sind durch die assimilatorische Nitratreduktase neben Bakterien auch Pilze und Pflanzen in der Lage organische Stickstoffverbindungen für das Zellwachstum zu gewinnen. Für die dissimilatorische und die assimilatorische Nitratreduktion sind verschiedene Enzyme verantwortlich (Abb. 1).

Assimilatorische Nitratreduktion

Dissimilatorische Nitratreduktion

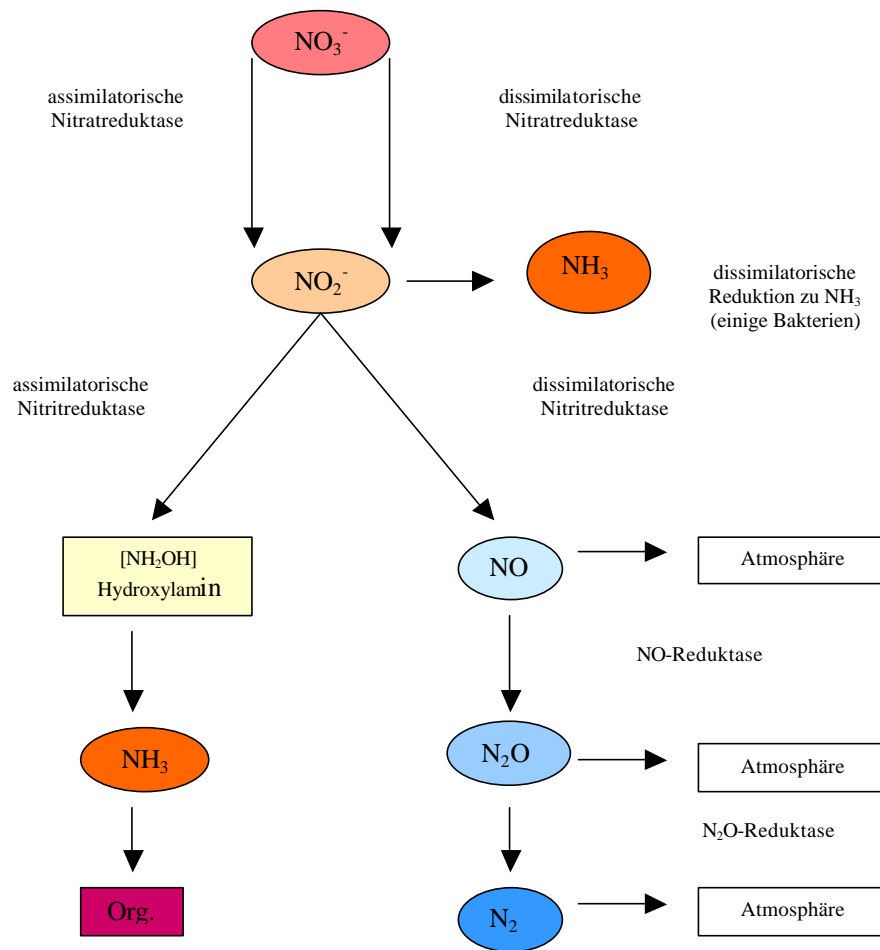


Abb. 1: Schema der assimilatorischen und dissimilatorischen Nitratreduktion (Brock *et al.*, 1998; verändert)

Die Denitrifikation beginnt bei ca. 5° C Bodentemperatur und steigt mit zunehmender Erwärmung des Bodens und dem Nitratgehalt an. Im allgemeinen ist die Denitrifikation bei niedrigen pH-Werten von <6 gering und höher bei einem pH-Wert von 6 – 8.

Weitere interessante Details zur prokaryontischen Nitratreduktion sind im Minireview von Moreno-Vivián *et al.* (1999) erschienen.

1.4 Fettsäuren als Biomarker

Spezifische Fettsäuren, insbesondere Phospholipide sind die Hauptbestandteile von Membranen aller lebenden Zellen und sind über Esterbindungen mit Glycerolmolekülen verknüpft. In Abbildung 2 ist der Aufbau der Cytoplasmamembran skizziert.

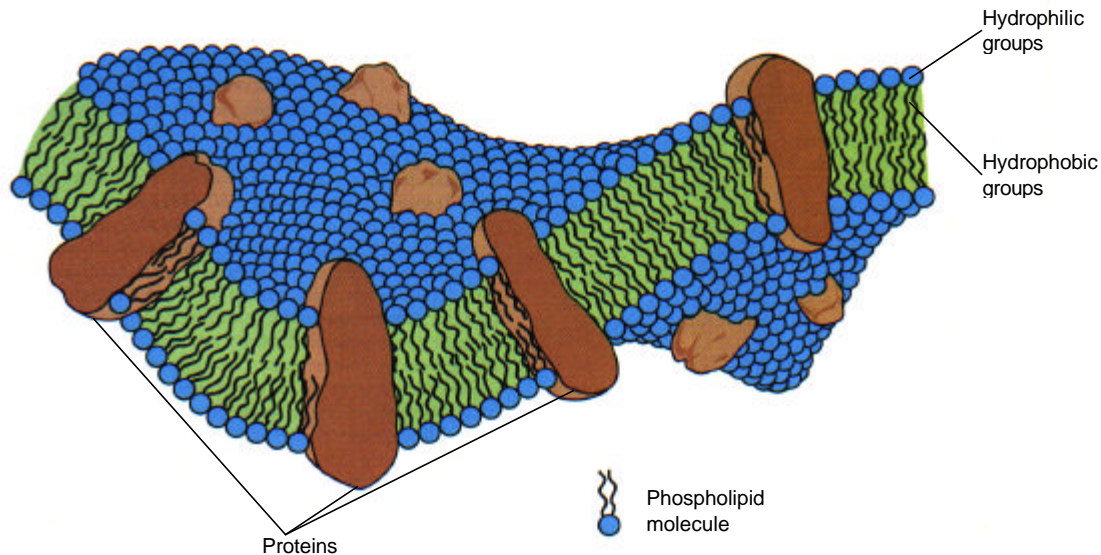


Abb. 2: Struktur der Cytoplasmamembran. Aufbau einer Doppelschicht („lipid bilayer“) aus Phospholipiden mit hydrophoben Gruppen (innen) und hydrophilen Gruppen (außen) sowie Transmembranproteinen. Die Grundstruktur der Cytoplasmamembran ist bei Prokaryonten und Eukaryonten ähnlich aufgebaut (aus Brock *et al.*, 1998).

Eine Ausnahme bildet hierbei die Membran der Archaeobacteria. Ihre Lipide beinhalten anstelle von Fettsäuren sich wiederholende Einheiten von verzweigten Kohlenwasserstoffen, den Isoprenen, deren hydrophobe Seitenketten über Etherbindungen mit den Glycerolmolekülen verbunden sind. Die Fettsäuren der Archaeobacteria werden daher bei der Fettsäureanalyse, so wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nicht erfaßt.

Einige Fettsäuren können als Biomarker für bestimmte Bakteriengruppen und einzelne Bakterienarten bezeichnet werden, und sind von großer Bedeutung in der Bakterientaxonomie (Parkes, 1987; Lechevalier, 1977; Mallory *et al.*, 1984, u.a.). Der Anteil der Membranfettsäuren an der Bakterienbiomasse ist relativ konstant. Nach dem Absterben der Zellen werden Phospholipide schnell abgebaut (White *et al.*, 1979). Aus diesem Grund ist die Analyse von Phospholipidfraktionen bakterieller Gemeinschaften eine bewährte Methode zur Bestimmung lebender bakterieller Biomasse und kann Informationen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung mehr oder weniger komplexer Bakteriengemeinschaften liefern (Petersen *et al.*, 1991; Vestal *et al.*, 1989; Frostegård *et al.*, 1993). Fettsäuren lassen sich mit einer Chloroform/Methanol-Extraktion aus Isolaten sowie aus Umweltproben extrahieren und können gaschromatographisch identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Standort

Der zur Untersuchung ausgewählte Standort befindet sich innerhalb des Versuchsgutes Hohenschulen auf einer ca. 3 ha großen Versuchsfläche und liegt zwischen einer Bahnlinie im Norden und der Rendsburger Landstraße im Süden (s. Abbildung 3).

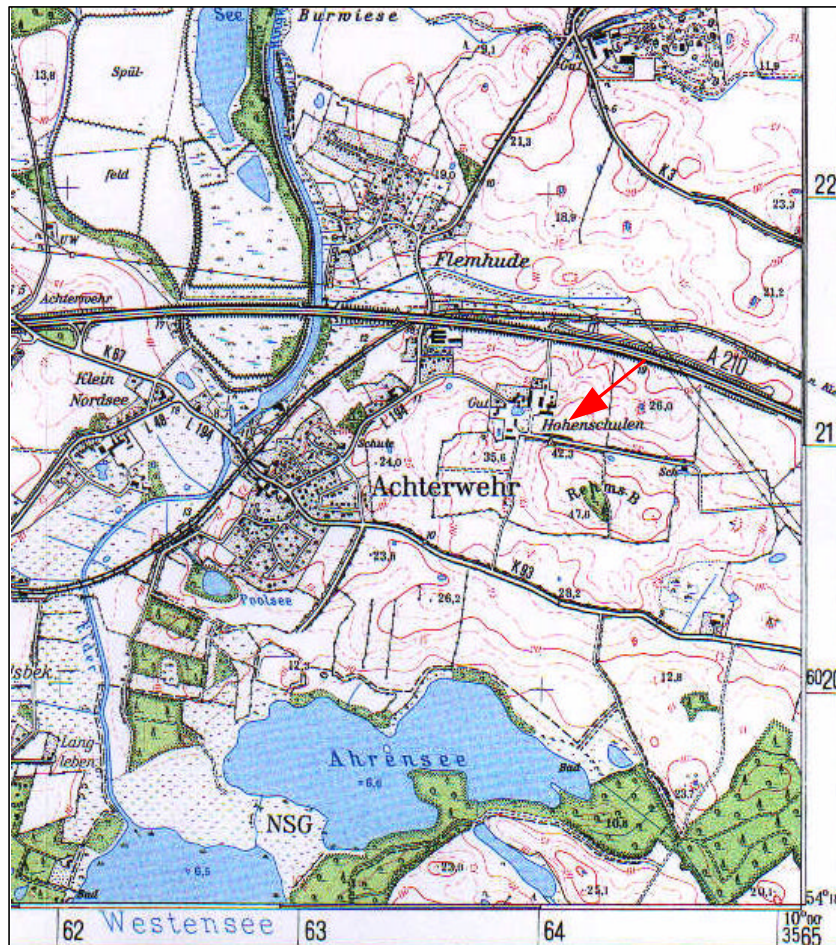


Abb. 3: Geographische Lage des Untersuchungsgebietes. Das Versuchsgut Hohenschulen ist mit einem roten Pfeil markiert. (Topographische Karte:1625, Flehmude, Landesvermessungsamt Schleswig-Holstein, 1:25000, 1998)

Im Rahmen des SFB 192 wurde die Versuchsfläche im Jahre 1990 von der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Universität Kiel in drei Schläge von 96x108 m Größe unterteilt. Jeder Schlag ist in 288 Einzelparzellen á 36 m² Größe aufgeteilt. Auf den Schlägen rotiert die typische ostholsteinische Fruchtfolge: Winterweizen (1996) – Wintergerste (1997) – Winterraps (1998).

Das Gelände fällt von Süden nach Norden auf einer Länge von 150 m um etwa 5 m ab (Nordhang). Die bodenkundliche Kartierung des Schlags III ergab eine Vielzahl von Böden, was typisch für eine Jungmoränenlandschaft ist (Abb. 4, Bodenkarte).

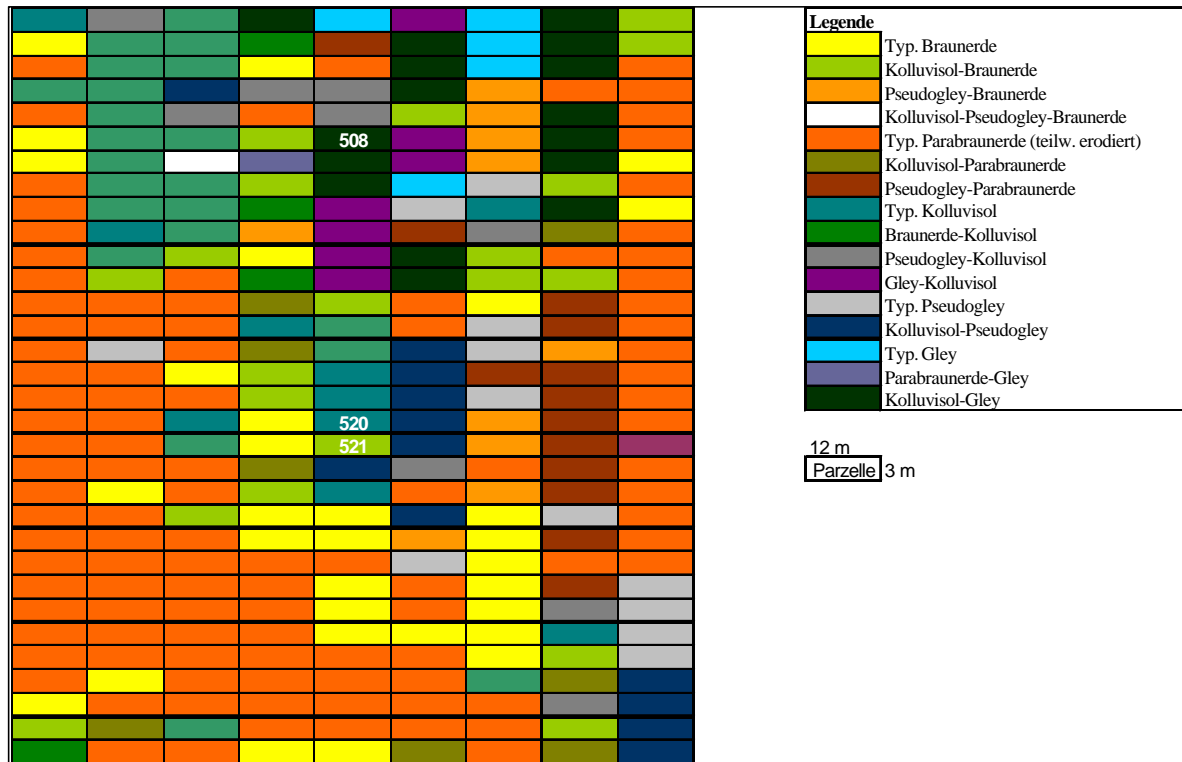


Abb. 4: Bodenkarte von Schlag III des Versuchsguts Hohenschulen (SFB 192) mit den eingezeichneten Probenahmeparzellen 508, 520 und 521 (Koebbemann & Thiele, 1994; unveröffentlicht)

Zu Projektbeginn wurden zwei dieser Parzellen (Nr. 520 und 521) zur Probenahme ausgewählt. Seit 1998 wurde eine dritte Parzelle regelmäßig mitbeprobt (Parzelle 508.) Alle Parzellen befinden sich auf Schlag III der Versuchsfläche. Bei der Bodenart der Parzellen 520 und 521 handelt es sich um einen sandigen, humusreichen Kolluvisol, bei 508 um einen Kolluvisol-Gley (Elsner, 1994). Die organische Substanz im Boden beträgt etwa 15g/kg. In der Bearbeitung unterscheiden sich die Parzellen hinsichtlich der Düngung. Während Parzelle 521 vollständig ungedüngt blieb, wurde auf Parzelle 520 eine geringe Mineralstoffgabe von 120 kg/ha eines Ammonium-Nitratgemisches in 3 Gaben/Jahr aufgebracht. Auf Parzelle 508 wurde anstelle von Mineraldünger zweimal im Jahr ca. 30 m³ Schweinegülle aufgebracht. Die Parzellen 520 und 521 wurden im Gegensatz zu Parzelle 508 nicht gepflügt, aber gegrubbert. Abhängig von der angebauten Pflanzenart (Raps, Weizen und Gerste im Wechsel) wurden alle Parzellen mehrmals im Jahr mit Herbiziden und Fungiziden behandelt (Tab. 2).

Tab. 2: Düngergaben und Pflanzenschutz zum Schlag III
(Angaben 1996-1999 von Dr. R. Ströh, Versuchsgut Hohenschulen, unveröffentlicht)

Datum	Parzelle 520	Parzelle 508	Parzelle 508, 520 und 521		
	min. Düngung*	Schweinegülle	Fungizide	Herbizide	Wachstumsregler
03.09.1996 08.10.1996		ca. 30 m ³ /ha		Isoproturon (500g/ha) Pendimethalin (800g/ha)	-
07.03.1997 10.04.1997 09.05.1997	40 kg/ha	ca. 21 m ³ /ha	Prochloraz (400g/ha, Fuß) Epoxiconazol (84g/ha, Blatt) Fenpropimorph (250g/ha)		
25.04.1997 12.05.1997	40 kg/ha				Chlormequadchlorid (458g/ha) Ethephon (233g/ha)
23.05.1997 30.05.1997	40 kg/ha		Epoxiconazol (84g/ha, Ähre) Fenpropimorph (250g/ha)		
21.08.1997 01.09.1997		ca. 30 m ³ /ha		Metazachlor (750g/ha) Quinmerac (250g/ha) Fluazifop-p-buthyl (125g/ha)	
03.09.1997 07.10.1997 26.02.1998	40 kg/ha		Tebuconazol (126g/ha)	Isoproturon (500g/ha) Pendimethalin (800g/ha)	
25.03.1998 26.03.1998 01.04.1998 15.04.1998 08.05.1998	- 40 kg/ha 40 kg/ha	ca. 21 m ³ /ha	Tebuconazol (167g/ha) Vinclozolin (312g/ha) Thiophonate-methyl (312g/ha)		
09.09.1998 10.03.1999 16.04.1999 21.04.1999 23.04.1999	40 kg/ha 40 kg/ha	ca. 20 m ³ ca. 20 m ³	Prochloraz (400g/ha), 520 u. 521		Chlormequadchlorid (936g/ha) Mangansulfat (2kg/ha) Fluroxypyt (90g/ha) Chlormequadchlorid (360g/ha)
05.05.1999 10.05.1999 03.06.1999			Epoxiconazol (105g/ha, Blatt), nur 521 Fenpropimorph (312g/ha), nur 521		
14.06.1999	40 kg/ha		Epoxiconazol (126g/ha, Blatt), 520 u. 521 Fenpropimorph (375g/ha), 520 u. 521		Lamda-Cyhalothrin /,5g/ha

(* mineralische Düngung mit NH₄NO₃ 74%, CaCO₃ 26%)

Grunddüngung für alle Parzellen einheitlich: K₂O (120-140 kg/ha), P₂O₅ (90 kg/ha), MgSO₄ (21 kg/ha)

Der gemessene pH-Wert der Böden betrug ca. 7 (bestimmt mit 0,025 N CaCl₂ im Verhältnis Lösung:Boden 2,5:1). Die Wassergehalte der Bodenproben lagen im Frühjahr und Herbst durchschnittlich bei 16%. In den Sommermonaten konnte der Oberboden jedoch fast völlig austrocknen. Gravierende Unterschiede im Wassergehalt der Parzellen untereinander gab es nicht. Der Nitratgehalt in Bodenproben der Parzelle 520 lag bei durchschnittlich 1,7 µg N

(1997) und bei $0,82 \mu\text{g N}$ bezüglich Parzelle 521, und war damit ungefähr doppelt so hoch (gemessen nach Kanderler, 1993). Nitratgehalte in Bodenproben der Parzelle 508 wurden nicht bestimmt.

Im Verlauf der Vegetationsperiode zeigten sich deutliche Unterschiede im Pflanzenwuchs auf den unterschiedlich behandelten Parzellen. Unabhängig von der angebauten Pflanzenart (Weizen, Gerste oder Raps) war der Pflanzenwuchs auf Parzelle 521 stets um mehrere cm niedriger als auf den Parzellen 520 und 508. Auch war auf Parzelle 521 die Dichte der jeweils angebauten Pflanzenart geringer, so daß diverse Kräuter ebenfalls ausreichend Licht zum Wachstum erhielten. Parzelle 508 besaß stets die dichteste am schnellsten wachsende Pflanzendecke im Vergleich zu den anderen Parzellen. In den Abbildungen 5 und 6 sind Ausschnitte des Probenahmestandortes Schlag III mit einzelnen Ackerparzellen dargestellt.



Abb. 5: Ausschnitt aus Schlag III mit Parzelle 520 im Vordergrund am 11.05.1998



Abb. 6: Ausschnitt aus Schlag III mit Parzelle 520 im Vordergrund am 13.12.1998

2.2 Probenbearbeitung

Die Proben wurden mit einem Stechzylinder aus 1-10 cm Bodentiefe entnommen. Repräsentativ für eine Bodenprobenahme waren jeweils 5 Einzelproben (je 100 g) pro untersuchter Parzelle, die zu einer Mischprobe vereinigt wurden. Die Proben wurden in einer Kühlbox zum Labor transportiert, sorgfältig durchmischt und sofort bearbeitet. Entdeckte Pflanzenreste, Wurzeln und Steinchen wurden entfernt.

2.3 Medien

Unter den verwendeten Medien waren unterschiedlich zusammengesetzte Komplexmedien, die in verschiedenen Konzentrationen der komplexen Substrate verwendet wurden. Zusätzlich wurden Mineralmedien mit ausgewählten Einzelsubstraten und Mineralmedien mit umfangreichen Mischsubstraten (= synthetische Medien) in jeweils geringer Konzentration des Einzelsubstrates eingesetzt. Einzelne Medien enthielten auch substantielle Mengen an Bodenextrakt. Allen Medien wurde eine Spurenelementlösung, sowie Nitrat als Elektronenakzeptor zugesetzt. Die Inkubation erfolgte unter anoxischen Bedingungen bei Raumtemperatur, so daß Nitratreduzierer und Denitrifizierer selektiert wurden.

Im Verlauf der Kultivierungsarbeiten wurden folgende nitrathaltige Medien eingesetzt:

Komplexmedien:**1. Tryptose-Soja-Agar**

Das Tryptose-Soja-Medium (TSB-Medium) wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (30 g, 3 g, und 0,3 g/L) als Komplexmedium eingesetzt, um oligotrophe und eutrophe Anzuchtbedingungen zu gewährleisten. Es ist gleichzeitig das Standardmedium für die Fettsäureanalyse (s. 2.5).

Trypticase-Soy-Broth	30,00 / 3,00 / 0,30 g
KNO ₃	1,00 g
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7,3

2. LB-Medium:

Als weiteres Komplexmedium wurde das LB-Medium ausgewählt, das sich besonders als Flüssigmedium auch zur Wiederanzucht schlecht oder nicht mehr auf TSB-Medium wachsender Isolate eignete.

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
KNO ₃	1,00 g
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest ad	1000 ml
pH	7,3

3. Denitrifikanten-Medium (Alef, 1991)

Hierbei handelt es sich nach Angaben aus der Literatur um ein besonders für die Anzucht von denitrifizierenden Bakterien geeignetes Medium.

Pepton (Bacto)	5,00 / 0,50 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
KNO ₃	0,50 g
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

4. D(Munch)-Medium (Eco Sys, Bd. 15, 1996)

Auch dieses Medium hat sich nach Literaturangaben für die Anzucht von Denitrifikanten bewährt.

Glycerin	1,00 g
Glucose	1,00 g
tri-Natriumcitrat	1,00 g
Hefeextrakt	1,00 g
Pepton (Casein)	5,00 g
KNO ₃	1,00 g
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

5. Maltose-Medium

Desweiteren wurden zwei bodenextrakthaltige (10%) Komplexmedien eingesetzt, um das C-Quellenangebot des natürlichen Standortes annähernd widerzuspiegeln, und somit einer möglichst großen Zahl verschiedener Bakterienarten mit unterschiedlichen Nahrungsansprüchen ideale Wachstumsbedürfnisse zu bieten.

Maltose	5,00 g
Hefeextrakt	0,50 g
KNO ₃	0,50 g
Bodenextrakt (s.u.)	100 ml
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

6. C-Mix-Medium

Auch dieses Medium enthält einen Zusatz von 10% Bodenextrakt und bietet aufgrund eines komplexen C-Quellen-Mixes einem breiten Spektrum verschiedener Bakterien Wachstumsmöglichkeiten.

C-Mix (s.u.)	10 ml
KNO ₃	0,50 g
Bodenextrakt (s.u.)	100 ml
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

C-Quellen-Mix (C-Mix, modifiziert nach Karstens und Imhoff, pers. Mitteilungen)		
D-Glucose x H ₂ O	7,90 g	40 mmol
D-Fructose	7,20 g	40 mmol
D-Galactose	7,20 g	40 mmol
Trehalose	10,26 g	30 mmol
Na-Acetat	7,38 g	90 mmol
K ₃ -Citrat x H ₂ O	12,98 g	40 mmol
Na-Pyruvat (Brenztraubensre.)	4,40 g	40 mmol
Na ₂ -Succinat x 6 H ₂ O	10,80 g	40 mmol
Mannit(ol)	7,28 g	40 mmol
Ethanol (abs., p.A)	2,33 ml	40 mmol
Glycerol	5,86 ml	80 mmol
Na-Benzotat	5,82 g	40 mmol
Salicylsäure (BDH)	5,58 g	40 mmol
Casamino acids (Difco)	76,50 g	
Bacto-Pepton	29,70 g	
Betain x HCl (=Glycin-Betain)	18,43 g	120 mmol
N-acetyl-D-glucosamin	4,42 g	20 mmol
Dimethylsulfid	0,62 g	10 mmol
Agar Agar	15,00 g	
aqua dest ad.	1000 ml	
pH	7	

In der original Medienrezeptur wurde zusätzlich eine Lösung langer und kurzkettiger Fettsäuren verwendet.

Der dem Maltose-Medium und dem C-Mix-Medium beigefügte Bodenextrakt wurde wie folgt gewonnen:

500 g unbelasteter Boden wurden mit 500 ml aqua dest. in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben vermischt und über Nacht stehengelassen. Das Gemisch wurde dann 30 min autoklaviert und der klare Extrakt nach Absetzen der Bodenpartikel vorsichtig dekantiert und im Dunklen aufbewahrt.

Synthetische Medien (7-8):

Neben den Komplexmedien wurden zwei Mineralmedien (= synthetische Medien) mit stark reduzierten C-Quellen (Acetat, Citrat, Ethanol, und Propionat) eingesetzt, um gärende Mikroorganismen auszuwählen und gezielt Nitratreduzierer bzw. Denitrifikanten zu isolieren.

7. Citrat-Glutamin-Medium (DMB)

Die Herstellung dieses Mineralmediums erfolgte nach Bollag *et al.* (1970, modifiziert). Alternativ zu Glutamin wurde dieses Medium auch mit Asparagin angesetzt.

Na-Citrat	2,00 g
L-Glutaminsäure / Asparagin	0,50 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,05 g
KNO ₃	3,00 g
SL 12 (s.u.)	1 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

8. Basalmedium (BM-Medium)

Die Herstellung dieses Mineralmediums erfolgte nach Evans *et al.* (1970, modifiziert).

Als C-Quellen wurden im Basalmedium alternativ Acetat, Citrat, Ethanol und Propionat in Anteilen von jeweils 1g/1000 ml zugegeben.

KH ₂ PO ₄	2,00 g
K ₂ HPO ₄	0,60 g
NaCl	0,50 g
Na ₂ SO ₄	0,14 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,12 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,20 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,20 mg
N-Quelle: NH ₄ Cl	1,00 g
C-Quelle: Na-Acetat	1,40 g
KNO ₃	1,80 g
SL12 (s.u.)	1,00 ml
Agar Agar	15,00 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH	7

Die pH-Werte aller Medien entsprechen den am Standort gemessenen Werten und lagen bei ca. 6 – 7. Alle Medien enthielten 0,1 % einer Spurenelementlösung (SL 12).

Spurenelementlösung SL12
(Bergey, 1996)

CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ x 5 H ₂ O	2 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mg
ZnCl ₂	42 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	18 mg
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1100 mg
EDTA	3000 mg
aqua dest. ad	1000 ml

Flüssigmedien:

Neben der Herstellung von Festmedien wurden alle Medien, mit Ausnahme der synthetischen Medien DMB und BM, auch als Flüssigmedien (gleiche Medienzusammensetzung ohne Agar Agar) zur Gewinnung von Anreicherungskulturen verwendet.

2.4 Isolierung von Bakterien und Gewinnung von Reinkulturen

2.4.1 Isolierung heterotropher Bakterien auf Festmedien

Die Gewinnung von Bakterienisolaten erfolgte direkt nach der Probenahme aus frischem Bodenmaterial.

10 g Bodenmaterial wurden mit 90 ml einer 0,1%igen Tween 80-Lösung, einem Dispersionsmittel, aufgeschwemmt und 10 min auf einem Überkopfschüttler bei 110 U/min geschüttelt. Aus geeigneten Verdünnungsreihen (10^5 und 10^6) wurden dann 100 µl auf Agarplatten ausplattiert. Dabei wurden jegliche Anreicherungsschritte vermieden, um Konkurrenz- und Verdrängungsprozesse zu vermeiden und die auf den entsprechenden Medien kultivierbare Diversität auch möglichst umfassend darzustellen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei Raumtemperatur in Anaerobenbehältern (Abb. 7), oder in einer Anaerobenbank. Nach Zählung der koloniebildenden Einheiten wurden von geeigneten Verdünnungsstufen, die zwischen 20 und 100 Kolonien enthielten, alle Kolonien zur Vereinzelung transferiert. Soweit sie subkultiviert werden konnten, wurden daraus Reinkulturen erhalten und mittels Membranfettsäureanalyse identifiziert. Auf diese Weise wurden 900 Isolate in Reinkultur gewonnen.

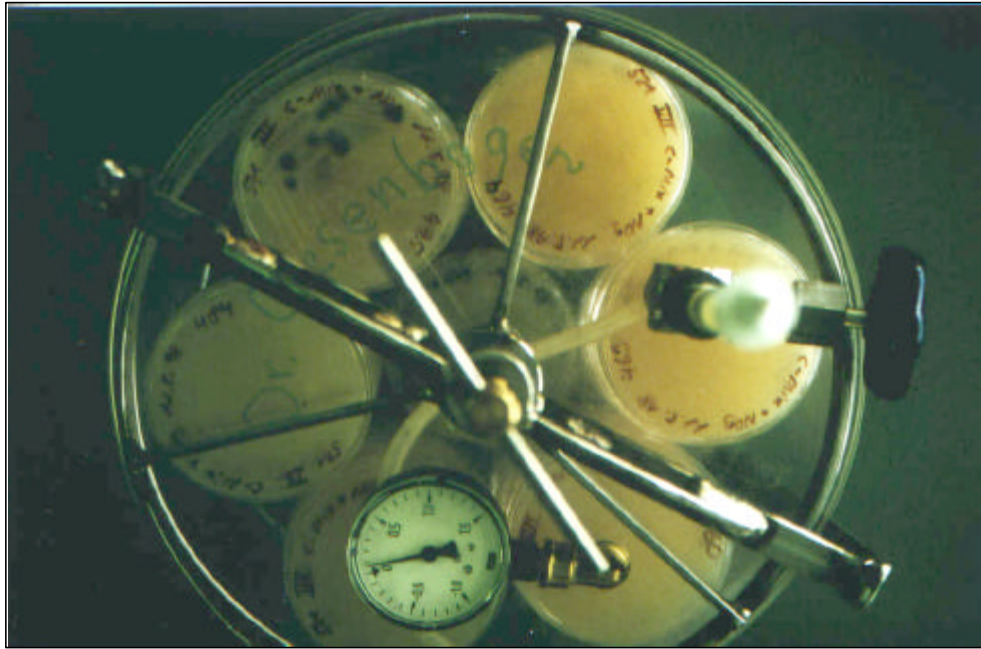


Abb. 7: Anaerobe Inkubation von Agarplatten verschiedener Medien bei Raumtemperatur in einem Anaerobenbehälter (Eigenbau AG Marine Mikrobiologie, Hans Sell)

2.4.2 Isolierung heterotropher Bakterien aus Anreicherungskulturen

Neben der Isolierung von Bakterien aus aufgeschwemmtem Bodenmaterial wurden auch aus Anreicherungskulturen verschiedener Medien ca. 100 Isolate in Reinkultur gewonnen.

90 ml des jeweiligen Flüssigmediums wurden in 100 ml Enghalsflaschen mit Schraubverschluß (DIN 5090) abgefüllt, 15 min autoklaviert, nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen mit Stickstoff begast und danach mit 1 g Boden beimpft. Die Proben wurden parallel bei 4° C, 15° C und bei Raumtemperatur 14 Tage inkubiert. Aus den Anreicherungen wurden Proben entnommen, 1:10⁶ verdünnt und jeweils 100 µl dieser Verdünnung auf entsprechenden Festmedien ausgespatelt. Bakterienkolonien aus Anreicherungen bei Raumtemperatur wurden dann bis zum Erhalt von Reinkulturen vereinzelt.

Außerdem wurde aus den Anreicherungskulturen Probenmaterial für anschließende molekularbiologische Untersuchungen entnommen, um die Einflüsse unterschiedlicher Inkubationstemperaturen, sowie die Zusammensetzung verschiedener Medien auf die isolierbare Bakteriengemeinschaft zu untersuchen. Von besonderem Interesse war hierbei ein Vergleich nährstoffarmer gegenüber nährstoffreicher Medien.

2.5 Fettsäureanalyse

2.5.1 Fettsäureanalyse von Reinkulturen

Zum raschen Vergleich von isolierten Bakterienstämmen kam ein Verfahren zum Einsatz, das auf dem Rechner-gestützten Vergleich von bakteriellen Fettsäuremustern beruht. Unter standardisierten Bedingungen wurden Bakterienstämme angezogen, Lipide aus Zellmaterial extrahiert und zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert. Diese wurden mittels Kapillar-Gaschromatographie getrennt, durch das "Microbial Identification System-Sherlock" (MIS, Version 3.0, MIDI Incorporation, Newark, Delaware, USA) anhand eines umfangreichen Kalibrierungsstandards identifiziert und über ein Rechenprogramm mit Chromatogrammdaten einer vorhandenen Datenbank (TSBA40, Environmental) verglichen. Es wurde die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren erfaßt, die einen direkten Vergleich der Stämme untereinander erlauben und im Vergleich mit der Datenbank eine Identifizierung von Arten zulassen. Mit Hilfe des „Microbial Identification System“ wurden für die einzelnen analysierten Bakterienstämme sogenannte „composition reports“ und „comparison charts“ angegeben, in denen die jeweiligen Fettsäuremuster der untersuchten isolierten Bakterien aufgeführt, und mit den in der Datenbank des Systems enthaltenen Fettsäuremustern von ca. 400 Bakterienarten verglichen wurden. Hierbei gibt der „composition report“ die detaillierte qualitative und quantitative Zusammensetzung der einzelnen identifizierten Fettsäuren in Prozent der Gesamtfettsäuren des jeweiligen analysierten Fettsäurespektrums an. Nach der Analyse liefert der „comparison chart“ einen Vergleich des jeweiligen Fettsäurespektrums eines unbekanntes Isolates mit den Fettsäurespektren bekannter Bakterien aus der Datenbank. Eine Unterscheidung von cis und trans Isomeren war per gaschromatographischer Analyse nicht möglich. Auch konnte das System nicht eindeutig zwischen einigen Fettsäuren unterscheiden, die in den „composition reports“ als „summed features“ angegeben wurden. Im einzelnen handelt es sich dabei um die Fettsäuren C18:2 ω 6c/C18:0anteiso, C16:1 ω 7t/C15:0iso2OH, C18:1 ω 7c,9t,12t und C16:0isoI/C14:03OH.

Die Übereinstimmung mit den ähnlichsten Datenbank-Fettsäuremustern („closest match“) wird in Similaritätsindizes und euklidischen Distanzen angegeben. Mit Hilfe einer Clusteranalyse kann das System dann auf der Basis von „unweighted pair group matchings“ (UPGM's), ausgedrückt in euklidischen Distanzen, die Ähnlichkeit der verschiedenen Fettsäuremuster unbekannter Isolate in Dendrogrammform darstellen. Die auf der Basis

bestimmter euklidischer Distanzen erkennbare Gruppenbildung ist hilfreich für die Identifizierung der Isolate und ihre Gruppierung mit bestimmten Gattungen und Arten.

Im Einzelnen wurde die Fettsäureanalyse folgendermaßen durchgeführt:

Die aus den Bodenproben gewonnenen Isolate wurden als Reinkulturen auf TSB30-Medium überimpft (4er-Ausstrich) und 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Etwa 40 mg von Ausstrich 2, 3 und 4 wurden danach mit einem Spatel vorsichtig abgeerntet, in Röhrchen überführt und sofort bei -20° C eingefroren. Zur Gewinnung freier Fettsäuren wurden die Proben mit 1 ml Reagenz 1 versetzt und sorgfältig mit Hilfe eines „Whirl-Mix“ gemischt. Danach wurden die Proben in einem Wasserbad 5 min gekocht. Es folgte ein nochmaliges Mischen der Proben, um sicher zu gehen, daß sämtliches Probenmaterial vollständig in Reagenz 1 gelöst ist, bevor sie weitere 25 min gekocht wurden. Danach wurden die auf diese Weise extrahierten Fettsäuren ein paar Minuten in einem Leitungswasserbad abgekühlt bevor sie mit 2 ml Reagenz 2 versetzt wurden. Die Proben wurden wiederum sorgfältig gemischt und 10 min bei 80° C in einem Wasserbad inkubiert. Die hierdurch gewonnenen Fettsäuremethylester wurden nach Abkühlung mit 1,5 ml Reagenz 3 versetzt und 10 min auf einem Überkopfschüttler bei 100 U/min geschüttelt. Zur Phasentrennung folgte eine 2 minütige Zentrifugation des Reagenzgemisches (4000 x g) bevor die Wasserphase (untere Phase) mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen wurde. Die nun in der organischen Phase vorliegenden Fettsäuremethylester wurden mit Reagenz 4 gewaschen. Das Waschen der Proben dient der Neutralisierung von Restsäure aus der Methylveresterung und dem Erhalt eines besseren 2-Phasen-Systems. Hierbei wurden 3 ml Reagenz 4 und 0,4 ml Reagenz 5 zur Probe gegeben und 5 min auf dem Überkopfschüttler geschüttelt, bevor das Gemisch 5 min zentrifugiert wurde (4000 x g). Nach vorsichtigem Abziehen und Überführen der Oberphase in „Vials“ mittels Pasteurpipetten, wurden die Proben auf etwa 300 µl Restvolumen mit Stickstoff aufkonzentriert bevor sie gaschromatographisch gemessen wurden.

Die einzelnen benutzten Reagenzien setzen sich wie folgt zusammen:

Reagenz 1:

NaOH	40,5 g
Methanol	135 ml
Milli Q Wasser	135 ml

Reagenz 2:

6 N HCl	146,25 ml
Methanol	123,75 ml

Reagenz 3:

Hexan	100 ml
tert-Buthylethan	100 ml

Reagenz 4 (Waschlösung):

NaOH	6,48 g
Milli Q Wasser	540 ml

Reagenz 5:

NaCl	30,00 g
Milli Q Wasser	ad 100 ml

Bei der gaschromatographischen Analyse wurde ein Hewlett Packard 5890 series II Gaschromatograph mit einer 25 m Ultra 2 (5%-phenyl)-Methylpolysiloxan Säule (Fa. Machery & Nagel) benutzt. Es wurden 2 µl Injektionen, mit einem 1:50 Split aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisation (FID). Als Trägergas diente Wasserstoff, als Brenngase ein Gemisch aus Wasserstoff und synthetischer Luft (Reinheitsgrad 5). Die Anfangstemperatur betrug 170°C und steigerte sich bis 260°C bei 2°C/min bei einer konstanten Flußrate von 0,4 ml/min. Peaks wurden mit Hilfe eines bakteriellen Fettsäurestandards („MIS Calibration Standard Mix“) und der MIDI peak identification software (MIDI, Inc., Newark, DE) identifiziert.

2.5.2 Identifizierung von Bakterien mit dem „Microbial Identification System“ (MIS)

Ziel der Fettsäureanalyse war die Identifizierung und eine verlässliche Clusterbildung der Isolate auf der Basis euklidischer Distanzen und Similaritätsindices, die einen Vergleich der verschiedenen Bakteriengruppen anhand ihrer Fettsäuremuster ermöglichen. Eine verlässliche Einordnung unbekannter Isolate, sollte hierdurch auch ohne entsprechenden Datenbankeintrag annähernd möglich sein. Grundlage für die Bewertung einer Identifizierung von unbekanntem Isolat mittels MIS sind die in den „comparison charts“ angegebenen Similaritätsindices (SI) und euklidischen Distanzen zum „closest match“ in der Datenbank. Laut Literatur („Microbial Identification Handbook, MIDI, 1996) ist ein Similaritätsindex von $>0,75$ ein „excellent match“, ein Index von $0,3-0,75$ ein „good match“ und ein Index von $>0,3$ ein „no match“, bezogen auf die Datenbank-Fettsäuremuster. Demnach haben Fettsäuremuster mit einem Similaritätsindex von $>0,3$ zu Datenbankeinträgen eine hohe Wahrscheinlichkeit „korrekt“ zu sein, während solche mit einem SI zwischen $0,75$ und 1 als „excellent match“ bezeichnet werden.

Bei Vergleichen von Fettsäuremustern unbekannter Isolate mit Fettsäuremustern aus der Datenbank des MIS gilt nach den Erfahrungen von Brown & Leff (1996) ein SI von $>0,7$ als „excellent match“, wenn ein Similaritätsunterschied zum zweiten Vorschlag der Datenbank von mindestens $0,2$ besteht. Ein SI zwischen $0,5$ und $0,7$ wird als „good match“ bezeichnet, wenn der Unterschied zwischen zwei Vorschlägen mindestens einen SI von $0,1$ aufweist. Ein SI von $0,3$ bis $0,5$ gilt als „acceptable match“, zeigt aber einen atypischen Stamm an. Ein SI von $<0,3$ ist ein „no match“, diese Arte wäre nicht in der Datenbank vertreten.

Nach dem „Microbial Identification-Handbook“ (1996) ist eine Unterscheidung verschiedener Bakteriengattungen, -arten, -unterarten und -stämmen auf der Basis einer euklidischen Distanz von >25 , >10 , >6 , >2 möglich.

Zur Absicherung der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu den Literaturangaben, wurden die Fettsäuremuster eines Isolates nach unterschiedlicher Vorkultivierung mehrmals analysiert, um das Ausmaß einer möglichen Varianz von Fettsäuremustern festzustellen. Das Isolat Ki-55 (Kiel-55) stammt aus der Bodenprobenahme vom 04.10.1996 (Parzelle 520, Denitrifikanten-Medium) und wurde als *Bacillus mycoides* GC subgr. A mit einem SI von durchschnittlich $0,45$ identifiziert. Nach MIDI (1996) wäre dies ein „good match“; nach Leff & Brown ein „acceptable match“ (atypischer Stamm). Aufgrund der Koloniemorphologie (mycelbildende Strukturen), gilt es als sicher, daß es sich bei diesem Isolat um die mittels MIS identifizierte Bakterienart handelt.

Zunächst war zu klären, ob das Alter einer Reinkultur und eine eventuelle Anpassung an Medium und Inkubationstemperatur zu einer längerfristigen Änderung der Fettsäurezusammensetzung führen kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Drei unterschiedliche Vorkultivierungen des Isolates Ki-55 sind in den Farben **rot** (vorkultiviert auf TSB 30-Medium, Raumtemperatur), **grün** (vorkultiviert auf Denitrifikanten-Medium, Raumtemperatur) und **blau** (vorkultiviert auf Denitrifikanten-Medium bei Raumtemperatur, dann bei 4°C mehrere Wochen gelagert) dargestellt. Nach unterschiedlicher Vorkultivierung wurden Zellen auf TSB 30-Medium überimpft, inkubiert, abgeerntet und die Fettsäuren wie unter 2.5.1 beschreiben gewonnen und als Fettsäuremethylester gaschromatographisch analysiert.

Die Similarität der Fettsäuremuster von Ki-55 variierte hierbei um bis zu 0,2 (SI), die euklidische Distanz um maximal vier. Insgesamt bilden die Fettsäureanalysen des Isolates Ki-55 ein gemeinsames Cluster bei ca. fünf euklidischen Distanzen und clustern mit dem Bibliothekseintrag (schwarz dargestellt) bei einer ECLD von 9,5.

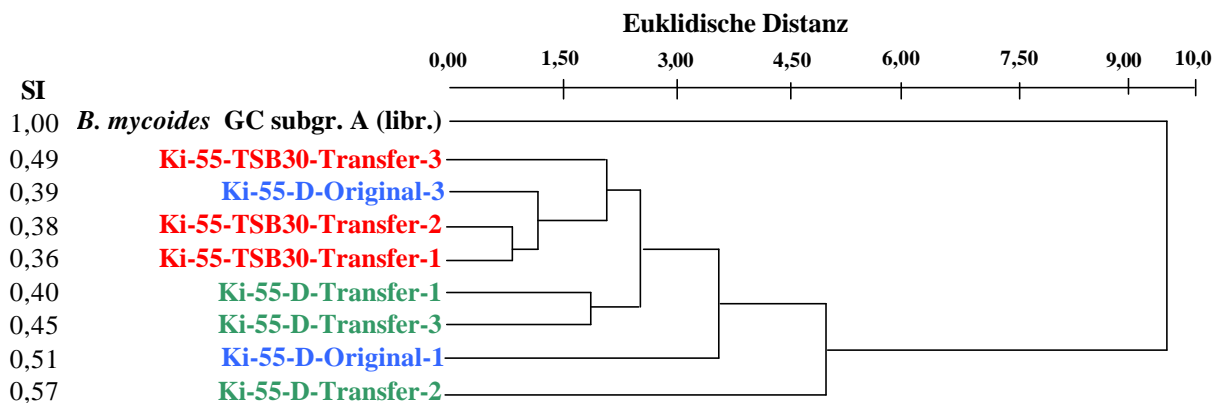


Abb. 8: Untersuchung eines Isolates (Ki-55) auf Variation der Fettsäurezusammensetzung bei Unterschiedlicher Vorkultivierung (rot=vorkultiviert auf TSB30-Medium, Raumtemperatur, grün=Vorkultiviert auf Denitrifikanten-Medium, Raumtemperatur, blau=vorkultiviert auf Denitrifikanten-Medium, 4°C)

Trotz strikter Einhaltung der Standardkultivierungsmaßnahmen und des Protokolls zum Erhalt von Fettsäuremethylestern und nachfolgender Analyse, muß nach den Ergebnissen dieser Voruntersuchung eine gewisse Variation der Fettsäuremuster bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Da Ki-55 im Bereich von 10 euklidischen Distanzen zu dem Datenbank-Fettsäuremuster dieser Art clustert, wurden im Folgenden bei der Einteilung der Isolate in Bakterienhauptgruppen (ECLD >25), die Untergruppen auf der Basis von 10 euklidischen Distanzen gebildet. Eine Gruppenbildung von Fettsäuremustern isolierter Bakterien auf der Basis von 25 bzw. 10 euklidischen Distanzen entspricht nach MIDI der Gattungs- bzw. -Artebene. Dies schien aufgrund der enormen isolierten Diversität der

Bakterien nicht abgesichert, da die verwendete Datenbank des MIS (TSBA 40, Aerobe, Environmental) nur ca. 400 Einträge enthielt.

In den gebildeten Bakterienhauptgruppen (ECLD >25) und Untergruppen (ECLD >10), so wie sie in dieser Arbeit definiert sind, fallen daher verschiedene Bakteriengattungen und verschiedene Bakterienarten mit ähnlichen Fettsäuremustern.

Eine Trennung der Bakterien auf Artebene (ECLD >6, MIS-Manual, 1996) war aufgrund der enormen Diversität der Isolate und der begrenzten Datenbank des MIS nicht möglich. In die gebildeten Untergruppen fielen stets mehrere Bakteriengattungen und –arten mit ähnlichen Fettsäuremustern. Auch kam es bei der Eingruppierung einiger weniger „no matches“ vor, daß der „closest match“ z.B. eine Gattung der α -Proteobacteria bezeichnete, das Isolat aber in einer Gruppe Gram⁺ Bakterien clusterte.

Als Hauptfettsäuren wurden diejenigen Fettsäuren bezeichnet, die in allen Untergruppen einer Hauptgruppe in hohen Anteilen (>10%) vorkamen, während die Nebenfettsäuren in vielen der Untergruppen ebenfalls einen hohen Anteil hatten, in einigen aber auch völlig fehlten. Die Biomarkerfettsäuren waren nur für jeweils eine gesamte Hauptgruppe oder der Mehrzahl der Untergruppen einer Hauptgruppe signifikant, fehlten in anderen Hauptgruppen dagegen völlig oder traten nur in Ausnahmefällen in wenigen Untergruppen anderer Hauptgruppen in geringen Abundanzen auf, waren dann aber niemals für diese Gruppen charakteristisch.

Nach den Ergebnissen aus der Literatur (Tab. 12a, b, c; siehe Anhang) und eigenen Erkenntnissen wurden die auf der Fettsäureanalyse basierenden Bakteriengruppen nach erfolgter Dendrogrammauswertung und Gruppenbildung auf ihre Hauptfettsäuren und eventuelle „Biomarkerfettsäuren“ untersucht. Die Nomenklatur der hier aufgeführten Fettsäuren ist im MIS-Manual, 1996 nachzulesen. Einige Fettsäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da die gaschromatographische Auftrennung dieser Fettsäuremethylester zu überlagernden Peaks führte. Diese Fettsäuren sind in der „peak naming table“ des MIS-Handbuchs als „summed features“ aufgeführt. Einige dieser „summed features“ traten auch in Fettsäuremustern von Isolaten und Bodenproben auf. Ist im Text von ihnen die Rede, so sind sie mit „/“ gekennzeichnet (z.B. C18:2 ω 6c/C18:0anteiso).

2.5.3 Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben

Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben der Parzellen 520 und 521 wurden regelmäßig im Jahresgang alle 4-6 Wochen vom Frühjahr 1997 bis Frühjahr 1999 durchgeführt. Ab Frühjahr 1998 wurde eine dritte Parzelle, 508 mit beprobt. Auf diese Parzelle wurde anstelle von mineralischem Dünger mehrmals im Jahr Schweinegülle aufgebracht. Den Analysen liegen zwei bis drei gemittelte Parallelproben zu Grunde.

Die Gesamtfettsäureextraktion erfolgte in Anlehnung an Dobbs und Findlay (1993). Bei der Extraktion aus Bodenproben wurden 3 g Bodenmaterial (Trockengewicht) mit 23 ml einer Ein-Phasen-Extraktionsmischung bestehend aus Chloroform:Methanol:Phosphatpuffer (8,7 g K_2HPO_4/l , pH 7,4) (1:2:0,8) versetzt, 10 min bei 100 U/min geschüttelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen stengelassen. Es wurden jeweils zwei bis drei Parallelproben untersucht. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 2500 x g wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Bodenmaterial einer zweiten 30 min Reextraktion unterzogen. Die Überstände wurden mit Chloroform und Phosphatpuffer versetzt, so daß das Verhältnis der Reagenzien 1:1:0,9 betrug. Die Proben wurden wiederum 10 min bei 100 U/min geschüttelt und über Nacht (12 h) zur Phasentrennung stengelassen. Die Phasentrennung erfolgte ebenfalls im Dunklen bei Raumtemperatur, um eine lichtinduzierte Oxidation empfindlicher Fettsäuren zu verhindern. Die lipidhaltige Phase wurde dann von der wässrigen Phase getrennt, unter N_2 -Strom bei ca. 30° C getrocknet und bis zur Methylveresterung der freien Fettsäuren und GC-Analyse bei -20°C eingefroren. Auf eine Trennung in Phospho-, Glyco- und Neutrallipide wurde wegen des zu erwartenden Verlustes von Probenmaterial bei einer Auftrennung der Lipide über eine Silica-Säule oder DC-Platten verzichtet. Die Gesamtfettsäureextrakte wurden wie unter 2.5.1 methylyverestert und gaschromatographisch analysiert.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Untersuchung komplexer Bakterienpopulationen stellt ein Problem dar, das lediglich mit Hilfe geeigneter molekularbiologischer Methoden zu lösen ist. Die klassische Methode, Bakterien anhand physiologischer und morphologischer Eigenschaften zu identifizieren, setzt umfangreiche Untersuchungen an Reinkulturen voraus. Da die spezifischen Kulturbedingungen wie beispielsweise Zusammensetzung des Nährmediums, die atmosphärischen Bedingungen oder auch der pH-Wert von den natürlichen Bedingungen

abweichen, ist davon auszugehen, daß der überwiegende Anteil der Bakterien mit selektiven Anreicherungskulturen nicht erfaßt werden kann (Muyzer *et al.*, 1993, Amann *et al.* 1990),. Nach sehr vorsichtigen Schätzungen stellen die bisher beschriebenen Arten einen Bruchteil von maximal ca. 20% der vermuteten Arten dar (Wayne *et al.*, 1987).

Die Isolierung von DNA aus Standortmaterial erfolgte mit einem Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) enthaltenden DNA-Extraktionspuffer, der eine Entfernung störender Verunreinigungen durch Huminstoffe mit einschloss (Zhou *et al.*, 1996). Das Verfahren der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE), das für die Trennung von 16S rDNA Fragmenten beschrieben wurde (Muyzer *et al.*, 1995), ist für die qualitative Zusammensetzung von Bakterienpopulationen in Umweltproben besonders geeignet. Die DGGE ist neben der Klonierung derzeit die einzige DNA-basierte Methode zur Auftrennung bakterieller Standortdiversität. Sie hat gegenüber der Klonierung den Vorteil, daß damit auch dynamische Veränderungen einer Gemeinschaft abgebildet werden können. Die Methode stellt jedoch bestimmte Ansprüche an die als Primer verwendeten Oligonukleotide. Ferner verlangt die Extraktion der 16S rDNA-Fragmente aus dem Gel und ihre anschließende Sequenzierung ausreichend scharfe und klar getrennte Banden. Aus diesem Grunde wurde eine neue Entwicklung aus der medizinischen Analytik, die Doppelgradienten-DGGE (Cremonesi *et al.*, 1997) eingesetzt. Die Überlagerung zweier Gradienten, zum einen des denaturierenden Formamid/Harnstoffgradienten, und zum anderen des Polyacrylamidgradienten, führt bei diesen Gelen zu extrem scharfen Banden, die sich gut voneinander trennen und sich entsprechend gut aus dem Gel extrahieren und sequenzieren lassen.

2.6.1 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus Bodenproben und Anreicherungskulturen

Für die Isolierung von DNA aus Standortmaterial stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die jedoch für die Bedürfnisse des Projektes optimiert werden mußten. Ein wesentliches Problem stellte die Verunreinigung der erhaltenen DNA mit Huminstoffen dar, die eine Amplifikation von DNA-Fragmenten empfindlich stören.

Die DNA-Isolierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Zhou *et al.* (1996):

Jeweils 1 g Boden wurde in 10 ml Polypropylen-Röhrchen eingewogen und mit 2,7 ml DNA-Extraktionspuffer (100 mmol NaPO₄, 100 mmol Tris HCl, 100 mmol Na-EDTA, 1,5 M NaCl, 1% CTAB, pH 8) und 100 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C in einem

Wasserbad inkubiert. Danach wurden 0,3 ml einer 20%igen SDS-Lösung und 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) dazugegeben, gut gemischt und 2 Stunden bei 65°C inkubiert. Dann wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig mit Pasteurpipetten in neue 10 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Pellets wurden noch jeweils zweimal mit 0,9 ml DNA-Extraktionspuffer und 0,1 ml 20%iger SDS-Lösung versetzt, 10 s gemischt und weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden alle Überstände zusammengegeben. Nach Zugabe des gleichen Volumens (ca. 5 ml) an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und kurzem Mischen wurden die Proben zur Phasentrennung abzentrifugiert (6000 x g, 10 min). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Polypropylen-Röhrchen überführt und die extrahierte DNA durch Zusatz von ca. 2,7 ml Isopropanol ausgefällt. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 16000 x g wurde die DNA bei Raumtemperatur pelletiert und das Pellet mit ca. 0,5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und dann nochmals bei 16000 x g 10 min zentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden in 1 ml sterilem, DNA-freiem Wasser gelöst, mit dem DNA-Aufreinigungs-kit (QIA Quick 250) der Fa. QIAGEN gereinigt und bei -20° C eingefroren.

Für die DNA-Extraktion aus Anreicherungskulturen wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g) pelletiert und ebenfalls nach obigem Protokoll verfahren.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung, ob die DNA-Extraktion erfolgreich verlief, wurden jeweils 10 µl extrahierter DNA auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und photographiert.

Hierfür wurden nach einer DNA-Isolierung aus Bodenproben oder Anreicherungskulturen 2 µl – 10 µl jeder Probe mit ca. 5 µl „Tracking Dye“ (0,1% Bromphenolblau, 70% Glycerol) versetzt und auf einem 1%igen Agarose-Gel (1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer) aufgetragen. Die größenspezifische Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld (100 V; 15 min).

Das im Ladepuffer enthaltene Glycerin erhöht die spezifische Dichte der aufgetragenen Probe, so daß Makromoleküle wie DNA oder RNA innerhalb der Probentasche absinken. Der Farbstoff Bromphenolblau zeigt die Lauffront der Probe an, da sein Laufverhalten etwa dem eines 500 bp großen DNA-Fragmentes entspricht. Das Gel konnte nach erfolgtem Lauf 10 Minuten im Ethidiumbromid-Bad angefärbt werden. Nach 10 minütiger Entfärbung in

deionisiertem Wasser wurde das Gel über einem UV-Transilluminator fotografiert. Als DNA-Längenstandard diente der Marker L1 (Fa. Boehringer).

2.6.2 Polymerase Kettenreaktion – Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei der PCR (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.* 1988) werden bestimmte Abschnitte eines Genoms mit selektiven Primern *in vitro* exponentiell amplifiziert. Die enzymatische DNA-Amplifikation besteht aus drei sich wiederholenden, temperaturabhängigen Schritten: Bei einer hohen Temperatur denaturiert die DNA in ihre Einzelstränge. Kühlt das Reaktionsgemisch aus Einzelnukleotiden, DNA-Probe (template) und Primern auf eine primerspezifische Temperatur (50-65° C) ab, so lagern sich die Primer an die komplementäre Sequenz jedes Einzelstranges an (Annealing). Schließlich werden Einzelnukleotide entsprechend der komplementären Sequenz des Einzelstranges eingefügt (Extension). Diese Reaktion wird von dem Enzym DNA-Polymerase katalysiert, wobei hier die *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* – einem thermophilen Bakterium – verwendet wurde. Mit jedem Zyklus (Denaturierung-Annealing-Extension) kann nur der Teil der DNA-Sequenz vermehrt werden, der zwischen den beiden Oligonukleotid-Primern liegt.

Durch die Wahl der einzusetzenden Primer läßt sich somit ein Abschnitt festlegen, der vervielfältigt werden soll. Verwendet wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primer. Die 16S rDNA wird aufgrund ihres konservativen Charakters für taxonomische und phylogenetische Fragestellungen herangezogen (Stahl *et al.*, 1988; Amann *et al.*, 1995). Die Primer 5'-372 und 5'- Start besitzen am 5'- Ende eine 40 bp lange, GC-reiche Klammer, die einen hohen Schmelzpunkt von etwa 90°C besitzt (Newton und Graham, 1994). Während des DGGE-Laufes verhindert diese ein vollständiges Denaturieren der DNA zu Einzelsträngen.

Nach erfolgter Optimierung der DNA-Extraktion und dem Erhalt von ausreichend vorliegender aufgereinigter DNA, zielten die molekularbiologischen Untersuchungen darauf ab, das Spektrum der Bakteriengemeinschaft in den beprobten Parzellen möglichst umfassend wiederzugeben. Mit Hilfe eines Alignments (Süling, 1994, unveröffentlicht) wurden Primer für die Gruppe der Bacilli, *Cytophaga/Flavobacterium* und *Pseudomonas* ausgewählt. Die darauf folgenden PCR und die verwendeten Primerpaare, die eine ausreichende Spezifität in der Abgrenzung der Zielorganismen von anderen Standortvertretern garantieren, und das aus diesen Ansprüchen heraus entwickelte PCR-Programm sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Tab. 3: Sequenzen verwendeter Primerpaare

Primerpaare	Sequenz	Phylogenetische Gruppe, Gattungen	amplifizierte bp
5'-372+GC 3'-534	5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3' + GC-Klammer* 5'-ATT ACC GCG GCT GC TGG-3'	Eubacteria	193
5'-Start+GC 3'-534	5'-GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG-3' + GC-Klammer* 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Eubacteria	542
5'-Start 3'-1020	5'-GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG-3' 5'-CAT TTA AGC CTT GGT AAG G-3'	<i>Cytophaga/Flavobacterium</i>	1030
5'-Start 3'-1080	5'-GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG-3' 5'-GAT GTC AAG ACC TGG TAA G-3'	<i>Bacillus</i>	1091
5'-Start 3'-660	5'-GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG-3' 5'-CCC AGG TTG AGC CCG GGG-3'	<i>Pseudomonas</i>	669

*GC-Klammer: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCC

Tab. 4: Die PCR folgte dem hier dargestellten Temperaturprogramm.

Phase	Segmente eines Zyklus	T	Zeit für Segment	Zyklenzahl	weiter Phase
1 Start	1. Denaturierung	94°C	4 min	1 Zyklus	2
2 Touchdown	1. Denaturierung 2. Annealing 3. Extension	94°C 65°C 72°C	30 s 30 s 30 s	15 Zyklen -1°C T _{AN} pro Zyklus bis 51°C	3
3	1. Denaturierung 2. Annealing 3. Extension	94°C 50°C 72°C	30 s 30 s 30 s	20 Zyklen	4
4	1. Denaturierung 2. Annealing 3. Extension	94°C 50°C 72°C	30 s 4 min 10 min	1 Zyklus	5
5	1. Kühlen	4°C	99 h		

Bei der dargestellten „Touchdown“-PCR-Technik liegt die Annealing-Temperatur des ersten Zyklus bei 65°C und wurde in den folgenden Zyklen um 1°C verringert. Die relativ hohen Annealingtemperaturen verhindern zunächst unspezifische Primeranlagerungen und damit Amplifikationsfehler, welche zu Beginn starke Auswirkungen hätten. Erst wenn die spezifischen PCR-Produkte als „Vorlagen“ dominieren, kann die Annealing-Temperatur zugunsten einer erhöhten Anlagerung und damit Vermehrung der DNA auf 50°C gesenkt werden (Don *et al.*, 1991).

Für die Amplifizierung bestimmter phylogenetischer Gruppen wurde das PCR-Programm den T_m-Werten der verwendeten Primer angepaßt. Für die Amplifizierung von rDNA der Bacilli wurden nach einem Touchdown von 65°C auf 59°C (-1°C/Zyklus) weitere 25 Zyklen bei 58°C durchgeführt. Bei einer Amplifikation von *Cytophaga/Flavobacterium*-rDNA wurden nach einem Touchdown von 65°C auf 53°C (-1°C/Zyklus) weitere 25 Zyklen bei 52°C durchgeführt. Die optimalen Template-Konzentrationen und Temperaturen der PCR-Programme wurden in Vorversuchen bestimmt.

Die PCR wurde mit Ready-To-Go[®] PCR Beads der Firma „Amersham Pharmacia Biotech“ und mit dem MasterAmp[™] PCR Core Kit der Firma „Epicentre Technologies“ durchgeführt. Zu den PCR Beads mußten für einen 25 µl Ansatz lediglich noch je 1 µl Primer (10 pm/µl) und 22 µl H₂O (DNA-frei) hinzugefügt und diese mit 15 µl Paraffin überschichtet werden. Die PCR mit Hilfe des MasterAmp[™] PCR Core Kits wurde wie folgt angesetzt:

PCR-Ansatz:

Template	1 µl
Primer (Forward + Reverse) (je 10 pm/µl)	je 1 µl
dNTP-Mix (200 µM Endkonzentration/Nukleotid)	1 µl
MgCl ₂ (1 mM Endkonzentration)	2 µl
PCR Puffer	2 µl
MasterAmp PCR Enhancer	6 µl
Amplitherm DNA Polymerase (1,25 units)	0,1 µl
H ₂ O (DNA-frei)	12 µl
Gesamtansatz	25,1 µl
Paraffin	15 µl

Hierbei wurde das Template und die beiden Primer in 0,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert, und aus den restlichen Komponenten ein „Master-Mix“ angesetzt, der dann gleichmäßig auf alle Reaktionsgefäße verteilt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde kurz anzentrifugiert und das PCR-Programm mit dem PROGENE-Cycler der Firma Techne gestartet. Bei jedem PCR Ansatz wurde eine Blindprobe durchgeführt. Da weder der Primer 5′Start noch die spezifischen Primer 3′-1020 (*Cytophaga/Flavobacterium*), 3′-1080 (Bacilli) und 3′-660 (*Pseudomonas*) eine GC-Klammer aufweisen, folgte nach erfolgreicher Amplifikation mit diesen Primern stets eine PCR mit den Primern 5′-372 + GC und 3′- 534. Hierzu wurde das jeweilige PCR-Produkt 1:20 verdünnt. Die mit den spezifischen Primern amplifizierten Fragmente sind aufgrund ihrer Länge von ca. 1000 bp zu lang, um in der DGGE erfolgreich aufgetrennt zu werden. Die mit den eubakteriellen Primern erhaltenen Fragmente von ca. 200 bp führen dagegen zu einem gut auswertbaren Bandenmuster. Nach heutigen Erkenntnissen ist eine Auftrennung von bis zu ca. 500 bp problemlos mit der DGGE möglich.

Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarose-Gel (1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer) wurde überprüft, ob die PCR erfolgreich verlaufen ist. Die Größe der PCR-Produkte konnte mittels einem DNA Längenstandard (L1, Fa. Boehringer) überprüft werden.

2.6.3 Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Mit Hilfe der DGGE ist es möglich DNA-Fragmente gleicher Länge aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten aufzutrennen (Fisher & Lerman, 1979; Lerman *et al.*, 1984). Eine Auftrennung in einem Agarosegel ist in diesem Fall nicht möglich. Die Technik wurde 1993 von Muyzer *et al.* (1993) aus der medizinischen Forschung übernommen und auf amplifizierte 16S rDNA aus Umweltproben angewandt. Dies ermöglichte die elektrophoretische Auftrennung von Fragmenten gleicher Länge, die sich jedoch in ihren Basenzusammensetzungen unterscheiden. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der Klonierung ist, Unterschiede in der Diversität verschiedener Bakteriengemeinschaften und deren Dynamik vergleichend auf einem Gel darzustellen, während quantitative Angaben bezüglich einzelner Bakterienarten kaum möglich sind (Muyzer & Smalla, 1998).

Mit zunehmender Harnstoff/Formamid-Konzentration im Gel denaturieren die DNA-Doppelstränge; wobei eine GC-reiche Klammer eine vollständige Trennung der PCR-Produkte zu Einzelsträngen jedoch verhindert (Myers *et al.*, 1987; Sheffield *et al.*, 1989). Beim Öffnen der Doppelstränge verringert sich die Laufgeschwindigkeit der PCR-Produkte bis sie schließlich gegen null strebt (Muyzer *et al.*, 1993). Je nach DNA-Sequenz der Fragmente verringert sich deren Laufgeschwindigkeit, so daß sequenzspezifische Bandenmuster entstehen. Die Charakterisierung eubakterieller Populationen mittels DGGE folgt der Methode von Muyzer *et al.* (1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem Doppelgradienten-Gel gearbeitet in Anlehnung an Cremonesi *et al.*, 1997. Zusätzlich zum denaturierenden Harnstoff/Formamid-Gradienten wurde auch ein Polyacrylamidgradient von 6 – 8 % im Gel eingestellt. Nach Angaben der Fa. BioRad ist ein Polyacrylamid-Gradient von 6% für eine Trennung von 300 – 1000 bp, von 8% für eine Trennung von 200 – 400 bp und von 10% für eine Trennung von 100 – 300 bp zu empfehlen. Die Verwendung eines Polyacrylamidgradienten von 6 – 8 % in einem Gel führte bei Amplifikaten von ca. 200 bp zu extrem scharfen Banden.

Herstellung des Polyacrylamid-Gels mit linearem Harnstoff/Formamid Gradienten

Je nach gewähltem Denaturierungsgradient wurden die Lösungen A – D in unterschiedlichen Anteilen zueinander gemischt. Neben dem denaturierenden Harnstoff/Formamid-Gradienten von 0 – 80 % (Stammlösungen), wurde auch ein Polyacrylamidgradient von 6 – 8% gewählt. In Tabelle 5 sind die Stammlösungen und ihre Zusammensetzung aufgelistet.

Tab. 5: Stammlösungen für DGGE-Gele

Stammlösungen:		
A	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	20 ml
	TAE (10x)	5 ml
	dd H ₂ O	ad 100 ml
B	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	20 ml
	Formamid	32 ml
	Harnstoff	33,6 g
	TAE (10x)	5 ml
C	dd H ₂ O	ad 100 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	15 ml
	TAE (10x)	5 ml
D	dd H ₂ O	ad 100 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	15 ml
	Formamid	32 ml
	Harnstoff	33,6 g
	TAE (10x)	5 ml
	dd H ₂ O	ad 100 ml

Die verwendeten Glasplatten (20 x 20 cm), „Spacer“ und Käbme wurden vor dem Gebrauch sorgfältig mit einer SDS-Lösung (0,5% Natriumdodecylsulfat) und danach mit Ethanol (abs.) gereinigt. Danach wurde 120 µl Repel-Silane auf die Platteninnenseiten aufgetragen und mit einem fusselfreien Tuch verteilt. Die Verwendung von Repel-Silane führt zu einem leichten Ablösen der Gele von den Glasplatten, wenn diese nach einem DGGE-Lauf in das Färbebad überführt werden. Bei dem Zusammenbau eines „Glas-Sandwiches“ sorgen zwei „Spacer“ für den nötigen Abstand zwischen den Platten. Nach dem ordnungsgemäßen Zusammenbau kann das „Glas-Sandwich“ in den DGGE-Gießständer gestellt werden und mit Hilfe eines Gradientenmischers befüllt werden. Der Gradientenmischer sorgt mit einem System aus zwei verbundenen Röhren für ein langsames Durchmischen zweier Lösungen mit unterschiedlichen Gradienten im Verlauf des Gelgießens. Hiedurch stellt sich der denaturierende Gradient im Gel ein. Wenn nicht ausdrücklich anders aufgeführt, wurde ein Gradient von 40 – 64 % verwendet. Die Polymerisation der Gelmatrix wird durch Zugabe von 140 µl APS (Ammoniumperoxosulfat) und 6 µl TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-

ethylendiamin) eingeleitet. Im Anschluß wird der Kamm, der die Probestaschen ausspart, luftblasenfrei eingesetzt. Nach dem vollständigem Aushärten des Geles (ca. 2 h) wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen. Das Gel konnte dann in die mit 0,5 x TAE-Puffer (20 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) gefüllte DGGE-Kammer gestellt werden und die Proben nach Zugabe eines Auftragspuffers (s. Agarosegelelektrophorese) aufgetragen werden. Durchgeführt wurde die DGGE in einer Laufkammer der Firma CBS Scientific, Model DGGE-4000. Ein Umwälzthermostat und eine Pumpe sorgten für eine gute Durchmischung und Temperierung des Puffers während des DGGE- Laufes. Bei Umweltproben wurde die gesamte PCR-Probe (25 µl) nach sorgfältigem Spülen der Taschen aufgetragen, bei Isolaten und Anreicherungskulturen 12,5 µl. Die Elektrophorese erfolgte 14 h bei 60° C, 75 V. Anschließend konnte das Gel auf eine fusselfreie Klarsichtfolie transferiert und in einem Ethidiumbromid-Färbebad 30 min gefärbt werden. Nach dem Entfärben (30 min) wurde das Gel über einem UV-Transilluminator fotografiert. Die Auswertung der DGGE-Bandenmuster erfolgte mit Unterstützung des Image Analysis System „Gel Doc 2000“ der Fa. Bio-Rad.

2.7 Genetisches Potential zur Nitrat-, Nitrit und N₂O-Reduktion bei ausgewählten Isolaten

Hierzu wurden Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* mit *narH*-, *nirS*- und *nosZ*-Primern getestet. Diese Primer amplifizieren Bereiche der 16S rDNA bezüglich der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktase, sowie der N₂O-Reduktase. Informationen über die Sequenzen der *nirS* und *nosZ* Primer stammen aus der Literatur (Braker *et al.*, 1998, Scala & Kerkhof, 1999). Die *narH* Primer wurden von Herrn Petri entwickelt und mir zur Verfügung gestellt (Petri, 1999).

2.8 Untersuchungen zur physiologische Diversität kultivierter Bakterien

2.8.1 Denitrifikationstest nach Alef, 1990

625 Isolate wurden in Flüssigkultur auf ihre Fähigkeit zur Nitratreduktion getestet. Hierfür wurde das Denitrifikantenmedium (Alef, 1990) verwendet. Die Reinkulturen wurden in 10 ml Reagenzgläsern, welche mit Durhamröhrchen zur Gassammlung versehen waren, überimpft

und 14 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde Nitrat, Nitrit und Ammonium mit Teststäbchen (Merkoquant, Fa. Merk) gemessen und auf Gasbildung in den Durham-Röhrchen geachtet.

2.8.2 N₂O-Produktion von Bakteriengemeinschaften unter Laborbedingungen

Die N₂O-Produktion von Bodenproben der Parzellen 508, 520 und 521 wurde vergleichend mit Hilfe der Acetylen-Inhibierungsmethode untersucht. Die Methode beruht auf einer kompletten Hemmung der N₂O-Reduktase durch 0,1 – 10 kPa Acetylen (C₂H₂). Durch die niedrige N₂O-Konzentration der Atmosphäre läßt sich die N₂O-Produktion leicht detektieren und Denitrifikationspotentiale von Anreicherungskulturen/Bodensuspensionen, sowie Bodenproben *in situ* ermitteln (Fedorova, 1973; Knowles, 1990).

Hierzu wurden 100 ml Kulturfläschchen mit Butylgummisepten und Aluminiumkappen verwendet, in die jeweils 1 g Bodentrockensubstanz und 7 ml steriles Denitrifikanten-Medium gefüllt wurde. Zu Versuchsbeginn wurden die Kulturfläschchen mit Stickstoff begast. Durch den Zusatz von 10 ml gasförmigem Acetylen mit einer gasundurchlässigen Spritze sollte die N₂O-Reduktase gehemmt werden und eine weitere Reduzierung des N₂O zu N₂ unterbleiben. Die Inkubation der Proben und Blindproben erfolgte 3 Tage bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (50 U/min). Die Messung der N₂O-Produktion wurde mit einem GC der Firma Hewlett Packard, ausgestattet mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) und einer Säule der Firma Machery & Nagel (HyeSep D) durchgeführt. Als Trägergas diente Helium (20 ml/min). Die Ofentemperatur betrug 50°C. Analysiert wurde jeweils 1 ml Gas aus der Atmosphäre der Kulturfläschchen. Es wurden pro Parzelle und Probenahmetermin zwei Parallelen angesetzt und gemessen. Vor der Analyse wurden die Retentionszeiten von N₂ (20 s), CO₂ (52 s) und N₂O (70 s) ermittelt. Zur Bestimmung der N₂O-Konzentrationen in den Anreicherungskulturen wurde ein Standard von bekannter Konzentration gemessen und über die Peakhöhe der prozentuale Anteil N₂O in der Atmosphäre der Anreicherungskulturen berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Selektivität verschiedener Medien zur Isolierung heterotropher Bakterien

Durch den Einsatz verschiedener Kulturmedien, denen lediglich die Selektion im Hinblick auf die Nutzung von Nitrat als Elektronenakzeptor gemeinsam war, konnte eine große Zahl an Bakterienstämmen und -arten in Reinkultur gewonnen werden. Die Isolierung von Bakterien wurde zu Projektbeginn im Oktober 1996 hauptsächlich mit Mineralmedien begonnen. Durch den Zusatz weitgehend reduzierter C-Quellen sollte ein Aufkommen von gärenden Bakterien weitgehend vermieden werden. Die Mehrzahl der auf den Mineralmedien (BM+C und DMB+A/G) gewonnenen und mittels Fettsäureanalyse identifizierten Isolate waren Denitrifizierer und gehörten der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe an (Abb. 9).

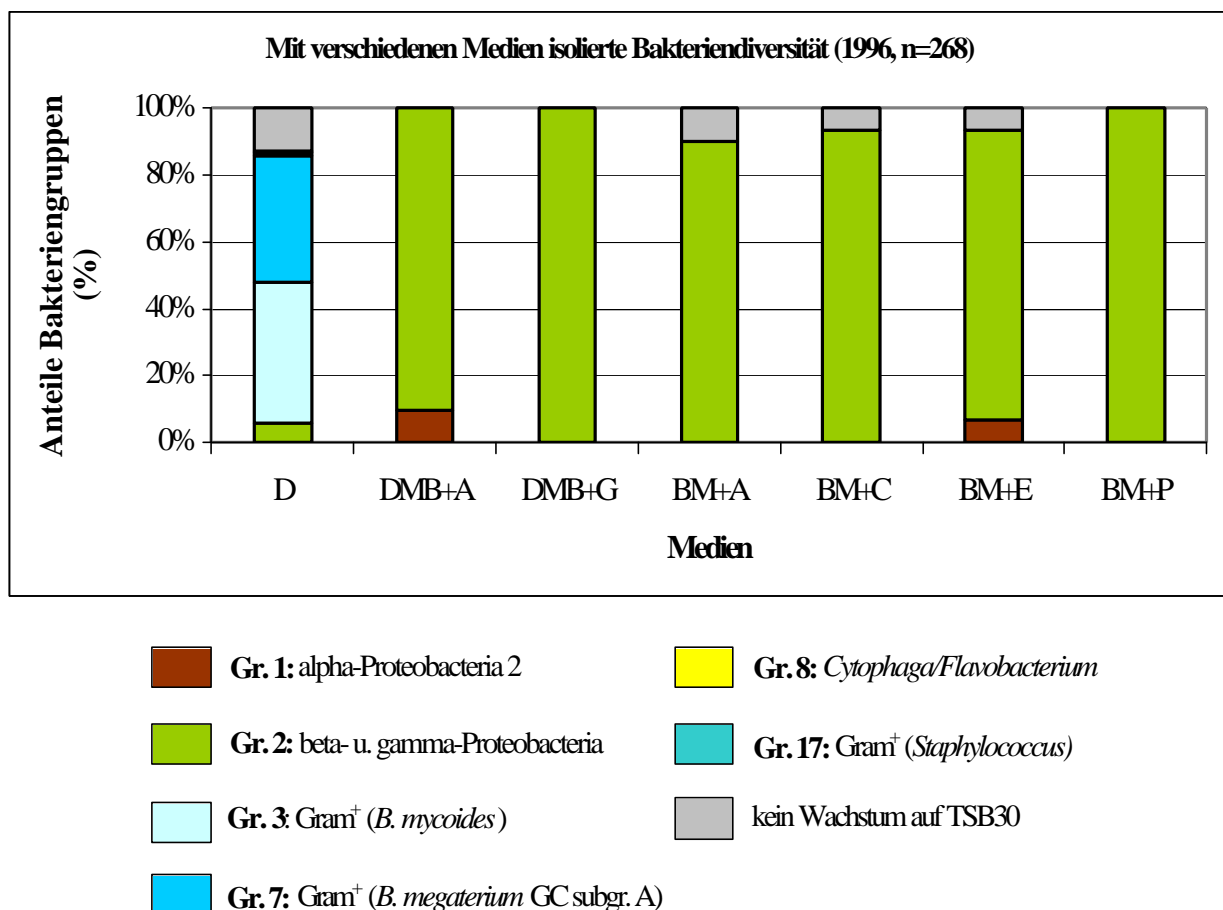


Abb. 9: Spezifität verschiedener Medien für distinkte Bakteriengruppen.

Auswertung der Clusteranalyse (UPGMA) auf der Basis von euklidischen Distanzen > 25 der Fettsäuremuster (Microbial Identification System, MIS) isolierter Bakteriengruppen.

Die Bezeichnung der verschiedenen Bakterienhauptgruppen (Gr. 1, Gr. 2 etc.) richtet sich nach der Clusterung dieser Gruppen (Reihenfolge) in gemeinsamen Dendrogrammen aller isolierter Bakterien.

Ein Teil der Isolate (bis 12%, je nach Medium) konnte nicht mittels Fettsäureanalyse identifiziert bzw. eingruppiert werden, da diese nicht auf TSB 30-Medium wuchsen. Neben Vertretern der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe konnten diverse Gram⁺-Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Staphylococcus*, sowie Bakterien der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe und der Gattung *Agrobacterium* identifiziert werden. Während Vertreter der Pseudomonaden auf allen Medien isoliert wurden, wuchsen Gram⁺-Bakterien und Bakterien der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe ausschließlich auf dem D-Medium. Vertreter der Gattung *Agrobacterium* konnten dagegen nur auf zwei der sechs Mineralmedien isoliert werden.

Aufgrund der mit Ausnahme einiger Agrobakterien einseitigen Isolierung von Vertretern der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe mittels verschiedener Mineralmedien, wurde die Medienpalette um diverse nitrathaltige Komplexmedien erweitert, auf denen vor allem eine größere Anzahl verschiedener Nitratreduzierer mit Nitrit als Hauptprodukt isoliert werden konnte. Unter den Isolaten der verschiedenen Komplexmedien dominierten in der Regel Gram⁺ Arten. Hierbei handelte es sich vor allem um aerobe Sporenbildner (*Bacillus*) und Vertreter der Aktinomyceten nebst verwandten Bakterienarten. Ein Teil der auf den verschiedenen Medien gewachsenen Isolate wuchs nicht auf TSB 30-Medium und konnte daher nicht mittels Fettsäureanalyse identifiziert bzw. eingruppiert werden. Je nach verwendetem Medium lag der Anteil nicht identifizierter Bakterien zwischen 6% und 56% (DMB+A/G- bzw. C-Mix-Medium) (siehe Abb. 10).

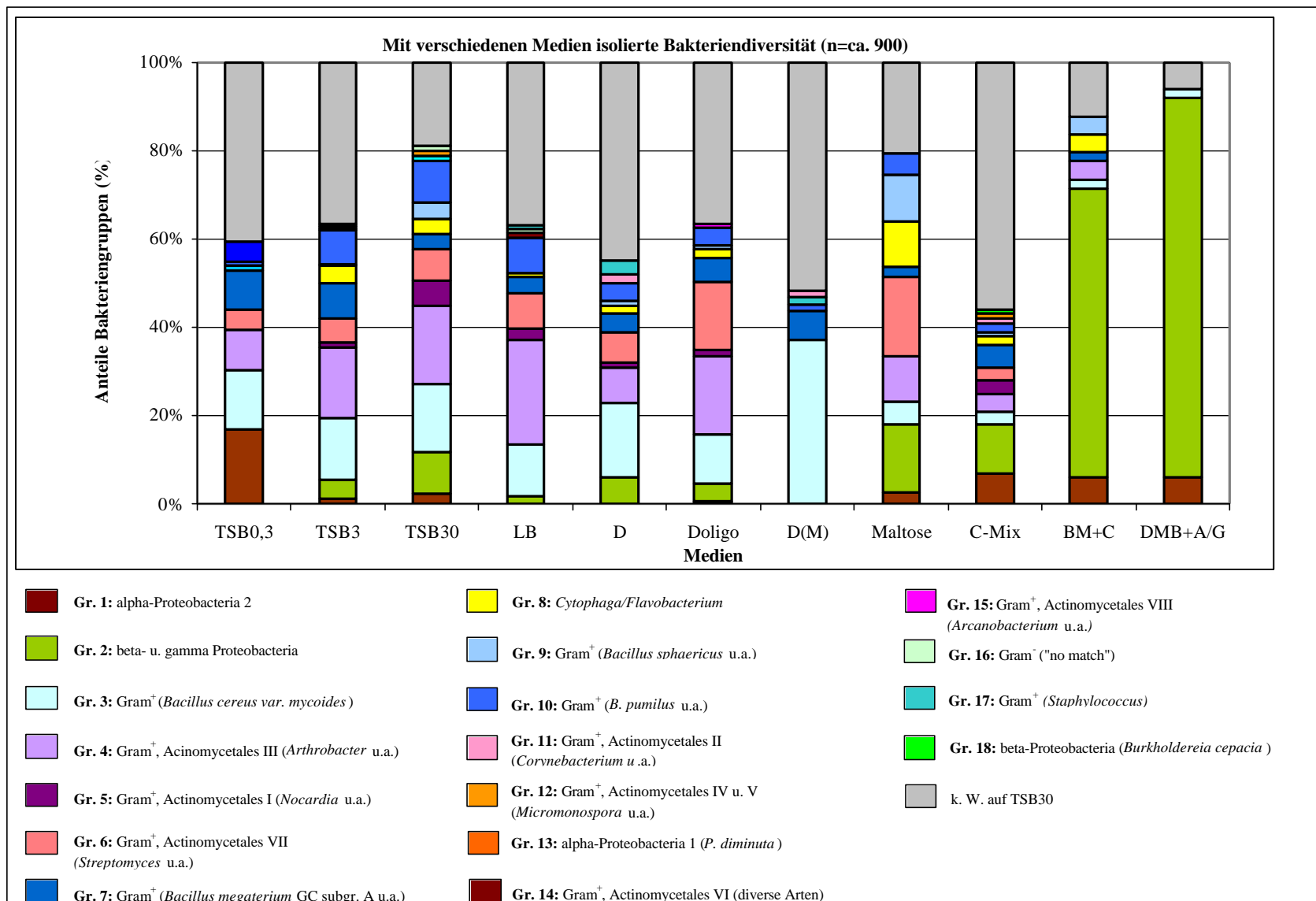


Abb. 10: Spezifität verschiedener Festmedien für distinkte Bakteriengruppen. Die Isolate entstammen der Probenahmen von 1997 und 1998. Auswertung der Clusteranalyse auf der Basis von euklidischen Distanzen > 25 der Fettsäuremuster (Microbial Identification System, MIS). Die Bezeichnung der verschiedenen Bakterienhauptgruppen (Gr. 1, Gr.2 etc.) richtet sich nach der Clusterung dieser Gruppen (Reihenfolge) in gemeinsamen Dendrogrammen aller isolierter Bakterien

Mit der Erweiterung der Medienpalette um acht Komplexmedien 1997, konnten neben den Gattungen *Pseudomonas* und *Bacillus* regelmäßig Vertreter der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe, der Gattung *Agrobacterium*, sowie der zu den Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt gehörenden Vertretern der *Actinomycetales* wie *Micrococcus* und *Arthrobacter* isoliert werden. Weitere Gattungen wie zum Beispiel *Paracoccus*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus*, *Comamonas*, *Corynebacterium* und *Burkholderia* waren gelegentlich, aber nicht regelmäßig und nur in geringer Zahl vertreten. Weitere Isolate der Gattungen *Proteus*, *Neisseria*, *Variovorax*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Serratia* und *Yersinia* konnten über eine Anreicherung in Flüssigkultur mit verschiedenen Medien erhalten werden. Eine Vielzahl weiterer Isolate anderer Gattungen wurde in sehr geringen Abundanzen und abhängig vom Standort und der Jahreszeit isoliert. Viele von ihnen konnten mit Hilfe der Fettsäureanalyse lediglich eingruppiert aber nicht identifiziert werden. Einige dieser Isolate bilden eigene Hauptgruppen (ECLD >25). Besonders auffällig war die Diversität der isolierten Vertreter der Aktinomyceten was ihre Fettsäuremuster, aber auch ihre Koloniemorphologie betraf.

Viele Bakterienisolate ließen sich nicht eindeutig identifizieren, da entweder kein Wachstum auf dem zur Standardisierung verwendeten TSB 30-Medium erfolgte oder keine Übereinstimmung mit einem Eintrag in der Bibliothek des "Microbial Identification System" (MIS) gefunden wurde. Insgesamt waren bei Betrachtung aller Medien etwa 62% der isolierten Bakterien durch die Fettsäureanalysen identifizierbar oder eingruppiierbar, etwa 6% zeigten keine hinreichende Übereinstimmung mit Bibliothekseinträgen der Datenbank („no match“-MIS; ECLD >10 zum nächstähnlichen Fettsäuremuster aus der Datenbank des MIS), und etwa 32% wuchsen nicht auf TSB 30-Medium. Der Anteil nicht identifizierter Bakterien war auf einigen Komplexmedien besonders hoch. So konnten auf den Medien TSB 0,3; D(M) und C-Mix 41%, 52% bzw. 56% der Isolate nicht identifiziert werden, verglichen mit lediglich 5–10% der auf Mineralmedien gewonnenen Isolate. Ein großer Teil der über die Fettsäurezusammensetzung nicht identifizierten Isolate konnte aufgrund seiner Clusterung in Dendrogrammen („unweighted pair group matching analysis“, UPGMA) dennoch verschiedenen Bakteriengruppen (ECLD > 25) zugeordnet werden.

Die Fettsäureanalysen der Isolate zeigten, daß mit den unterschiedlichen Medien verschiedene Bakterien und Bakteriengruppen selektiert werden konnten. Das Artenspektrum, das mit verschiedenen Medien erhalten wurde, war signifikant Medien-spezifisch.

Die in Abbildung 10 mittels verschiedener Medien isolierten Bakteriengruppen, sind in Prozent der Gesamtisolate, auf der Basis unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung (ausgedrückt in euklidischen Distanzen von >25) aufgeführt. Insgesamt wurden 19 Hauptgruppen auf der Basis von euklidischen Distanzen > 25 ermittelt. Bei sechs weiteren Gruppen handelte es sich um Einzelisolate, die aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung in keine der größeren Gruppen fielen und zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten unregelmäßig isoliert wurden. Isolate dieser Gruppen bleiben bei der weiteren Betrachtung der isolierten bakteriellen Diversität unberücksichtigt. Isolate der Gruppe 19 (*Acinetobacter*) wurden nach vorheriger Anreicherung in verschiedenen Medien isoliert und fehlen deshalb in Abbildung 10.

Die höchste Diversität auf der Basis von ECLD-Gruppen > 25 lieferte das TSB 3-Medium mit 15 Hauptgruppen. Die geringste ermittelte Diversität wurde auf dem DMB+A/G-Medium (3 Hauptgruppen) und dem D(M)-Medium (4 Hauptgruppen) ermittelt. Mit Hilfe der anderen Medien konnten Bakterien aus 6 bis 11 solcher Hauptgruppen isoliert werden: TSB 0,3 (7 Hauptgruppen), TSB 30 (13 Hauptgruppen), LB (11 Hauptgruppen), D (11 Hauptgruppen), Doligo (11 Hauptgruppen), Maltose (9 Hauptgruppen), C-Mix (13 Hauptgruppen) und BM+C (7 Hauptgruppen). Innerhalb der hier dargestellten Hauptgruppen war in der Regel weiterhin eine sehr hohe Diversität festzustellen (s. Abschnitt 3.2.1). So war z.B. unter den etwa 30 Isolaten der *Cytophaga/Flavobacterium*- Hauptgruppe die Fettsäurezusammensetzung derart unterschiedlich, daß möglicherweise nur in Einzelfällen mehrere Stämme einer Art isoliert wurden. Dies galt ebenso für die isolierten Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt, die in verschiedenen Hauptgruppen clusterten, insbesondere für die Isolate der Hauptgruppe 6 (*Actinomycetales* VII), die auch eine enorme Variabilität in der Koloniemorphologie aufwiesen. Die Fettsäurezusammensetzung in den der Gattung *Bacillus* zugeordneten Isolaten war ebenfalls so unterschiedlich, so daß diese in verschiedenen dieser Hauptgruppen auftraten. Insgesamt war gemessen an der Zahl der Isolate die Diversität so hoch, daß die unter den gewählten Kulturbedingungen erfaßbare Diversität mit den etwa 900 Isolaten der Probenahmen von 1997 und 1998 nicht erschöpfend dargestellt werden konnte.

Hinsichtlich der Selektivität der Medien fiel besonders der hohe Anteil an Isolaten der Hauptgruppe 2 (vor allem Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe) auf den Mineralmedien DMB+A/G und dem BM+C auf. Pseudomonaden konnten mit Ausnahme des D(M)-Mediums jedoch mit allen Medien in geringen Abundanzen isoliert werden. Neben den Pseudomonaden fanden sich in der Hauptgruppe 2 auch die Gattungen *Achromobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Variovorax* und verschiedene Vertreter der Enterobakterien. α -

Proteobacteria (*Agrobacterium* sp. u.a.) konnten in jeweils geringen Abundanzen auf 8 der 11 Medien isoliert werden, wuchsen aber deutlich bevorzugt auf den Mineralmedien, dem TSB 0,3- und C-Mix-Medium. In diese Gruppe (Hauptgruppe 1) fielen neben den Agrobakterien auch Vertreter der Gattungen *Paracoccus* und *Ochrobactrum*. *Bacillus mycoides* GC subgr. A (Gruppe 3), ebenso wie Vertreter der Gruppe 4 (Actinomycetales III), 7 (Actinomycetales VIII) und 10 (*Bacillus pumilus* u.a.) konnten hauptsächlich von den verschiedenen Komplexmedien isoliert werden. In der Hauptgruppe 4 dominierten die Gattungen *Arthrobacter* und *Micrococcus*. Ebenfalls vertreten waren die Gattungen *Cellulomonas* und *Bacillus*. Den Actinomycetales I zugehörigen Isolate (Hauptgruppe 5) konnten in höheren Abundanzen besonders auf dem TSB 30-, LB-, und C-Mix-Medium isoliert werden. Die zu Hauptgruppe 5 ähnlichsten Gattungen aus der Datenbank des MIS waren *Rhodococcus*, *Gordona* und *Nocardia*. Da die Similaritätsindizes fast sämtlich unter 0,1 lagen, galten diese Isolate als nicht identifiziert. Dies galt ebenso für die Vertreter der Hauptgruppe 6 mit den ähnlichsten Gattungen (MIS) *Streptomyces*, *Bacillus* und *Xanthomonas*. Isolate dieser Hauptgruppe konnten auf allen Medien abgesehen von dem D(M)- und DMB+A/G-Medium isoliert werden. Das Vorhandensein eines Luftmycels wies viele Vertreter dieser beiden Gruppen eindeutig als Aktinomyceten aus, Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Bakterien der Hauptgruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium*) entwickelten sich besonders gut auf dem mit Bodenextrakt supplementierten Maltose-Medium. Vertreter der Hauptgruppe 9 (*Bacillus sphaericus*) konnten fast ausschließlich von dem TSB 30- und dem Maltose-Medium, sowie auf dem BM+C-Medium isoliert werden. Auch für viele der anderen kleinen Hauptgruppen war bei genauer Betrachtung eine unterschiedliche Selektivität auf den verschiedenen Medien erkennbar. Berücksichtigte man die in der Abbildung nicht dargestellte Spezifität innerhalb der dort aufgeführten Hauptgruppen, so ergab sich eine noch wesentlich erweiterte Selektivität der Medien auf Artniveau. Die ca. 32 % der nicht auf TSB 30 wachsenden Bakterien waren möglicherweise vor allem oligotrophe Bakterien, deren Medienspezifität in Abbildung 10 nicht berücksichtigt werden konnte.

3.2 Fettsäureanalysen

Die Auswertung der Fettsäuremuster der Isolate von 1997 und 1998 mittels Clusteranalyse führte zur Bildung distinkter Bakteriengruppen auf der Basis euklidischer Distanzen (Abb. 11-21). In die Darstellung der Dendrogramme gehen ca. 600 identifizierte bzw. eingruppierte Isolate ein. Die verbleibenden ca. 300 Isolate (kein Wachstum auf TSB 30) konnten nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in Dendrogrammform dargestellt. Die Einteilung der Isolate in Hauptgruppen erfolgte auf der Basis von euklidischen Distanzen > 25 (s. 3.2.1).

Die Bakterienhauptgruppen wiesen jeweils für sie charakteristische Haupt- und Nebenfettsäuren, sowie zum Teil sogenannte „Biomarkerfettsäuren“ auf. Die Hauptgruppen konnten aufgrund von Unterschieden im jeweiligen Fettsäuremuster in weitere Untergruppen (UG) auf der Basis von euklidischen Distanzen > 10 aufgespalten werden: Hauptgruppe 1 (5 UG), Hauptgruppe 2 (10 UG), Hauptgruppe 3 (8 UG), Hauptgruppe 4 (17 UG), Hauptgruppe 5 (6 UG), Hauptgruppe 6 (20 UG), Hauptgruppe 7 (20 UG), Hauptgruppe 8 (10 UG), Hauptgruppe 9 (5 UG) und Hauptgruppe 10 (12 UG). Die verbleibenden Hauptgruppen 11-19 umfassten zu wenige Isolate, als daß eine weitere Unterteilung sinnvoll wäre.

3.2.1 Hauptfettsäuren und „Biomarker-Fettsäuren“ isolierter Bakteriengruppen (ECLD 25)

Insgesamt konnten 19 Hauptgruppen auf der Basis einer euklidischen Distanz > 25 ermittelt werden, wobei sich die Mehrzahl der Isolate auf 10 verschiedene dominante Hauptgruppen verteilte. Bei weiteren 6 Gruppen handelte es sich um wenige Isolate, die aufgrund ihrer Fettsäuremuster nicht den anderen Gruppen zugeordnet werden konnten und in der detaillierten Betrachtung der Bakterienhauptgruppen unberücksichtigt bleiben.

In Tabelle 6 sind die isolierten 19 Bakterienhauptgruppen und ihre genetische Zuordnung aufgeführt.

Tab. 6: Isolierte Bakterienhauptgruppen (ECLD >25); die genannten Gattungen entsprechen dem „closest match“ (MIS)

Gruppe	genetische Zuordnung	Familie/Gattung
1	α -Proteobacteria	diverse Gattungen
2	β - und γ -Proteobacteria	diverse Gattungen
3	Gram ⁺	<i>Bacillus</i>
4	Gram ⁺	Actinomycetales
5	Gram ⁺	Actinomycetales
6	Gram ⁺	Actinomycetales
7	Gram ⁺	<i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Kurthia</i> , <i>Arthrobacter</i>
8	<i>Cytophaga/Flavobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i>
9	Gram ⁺	<i>Bacillus</i>
10	Gram ⁺	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>
11	Gram ⁺	Actinomycetales
12	Gram ⁺	Actinomycetales
13	α -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
14	Gram ⁺	Actinomycetales
15	Gram ⁺	Actinomycetales
16	Gram ⁺	„no match“ (<i>Flexibacter</i> ?)
17	Gram ⁺	<i>Staphylococcus</i>
18	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>
19	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>

Neben einer großen Anzahl von Fettsäuren, welche in allen Gruppen vorkamen, zeichneten sich viele Gruppen durch besonders hohe Anteile bestimmter Fettsäuren aus. Auch gab es Fettsäuren und Fettsäuregruppen, die nur für bestimmte Bakteriengruppen charakteristisch waren. Unter den geradkettigen, gesättigten Fettsäuren wurde vor allem die Fettsäure C16:0 als dominante Fettsäure bei vielen Gruppen gefunden. Häufige verzweigt-kettige Fettsäuren waren iso und anteiso C15:0, isoC16:0, sowie iso und anteiso C17:0. Bei den ungesättigten Fettsäuren dominierten C18:1 ω 7c/9t/12t, C18:1 ω 9c, C16:1 ω 7c, iso17:1 ω 9c und 16:1 ω 7c alcohol. Während sich einige dieser Fettsäuren in fast allen Gruppen finden ließen, waren andere in höheren Anteilen auf einzelne Gruppen beschränkt. Im Folgenden ist für jede der Bakterienhauptgruppen jeweils eine Tabelle mit einer Übersicht der Untergruppen mit Identifizierung der Isolate nach dem MIS, sowie eine Beurteilung der Similaritätsindices zu den Datenbankeinträgen nach Leff & Brown (1996) aufgeführt.

In Abbildung 11a sind die wichtigsten Bakterienhauptgruppen nach erfolgter gemeinsamer Clusteranalyse (UPGMA) in Dendrogrammform dargestellt. Bei Betrachtung des Dendrogramms ist die Clusterbildung bestimmter Bakterienhauptgruppen bei ca. 45 euklidischen Distanzen zu erkennen. Eindeutig ein gemeinsames Cluster bilden die α -, β - und γ -Proteobacteria. Die Einordnung der Hauptgruppe 5 (Actinomycetales I u.a.) in dieses Cluster ist auf die gemeinsame Hauptfettsäure C18:1 ω 9c zurückzuführen, die bei den

isolierten Proteobacteria und bei Bakterien der Gruppe 5 vorkommt, in anderen Bakteriengruppen dagegen fehlt. Ein weiteres gemeinsames Cluster bilden die Bakterienhauptgruppen 4 (Actinomycetales III), 11 (Actinomycetales II) und 17 (Staphylococci). Bei diesen Bakteriengruppen ist die Fettsäure C15:0anteiso überwiegend dominant gegenüber C15:0iso und in sehr hohen Anteilen von 30-80% vertreten, im Gegensatz zu den übrigen Gram⁺ Bakteriengruppen. Eine klare Unterteilung der übrigen hauptsächlich Gram⁺ Bakteriengruppen ist aufgrund der Vielzahl gemeinsamer Fettsäuren nicht möglich.

Ein detailliertes gemeinsames Dendrogramm mit angegebenen Haupt- und Nebenfettsäuren, sowie signifikante Biomarkerfettsäuren aller Untergruppen, wie sie auch im Text erläutert wurden, befindet sich im Anhang (Abb. 11b und Tab. 22).

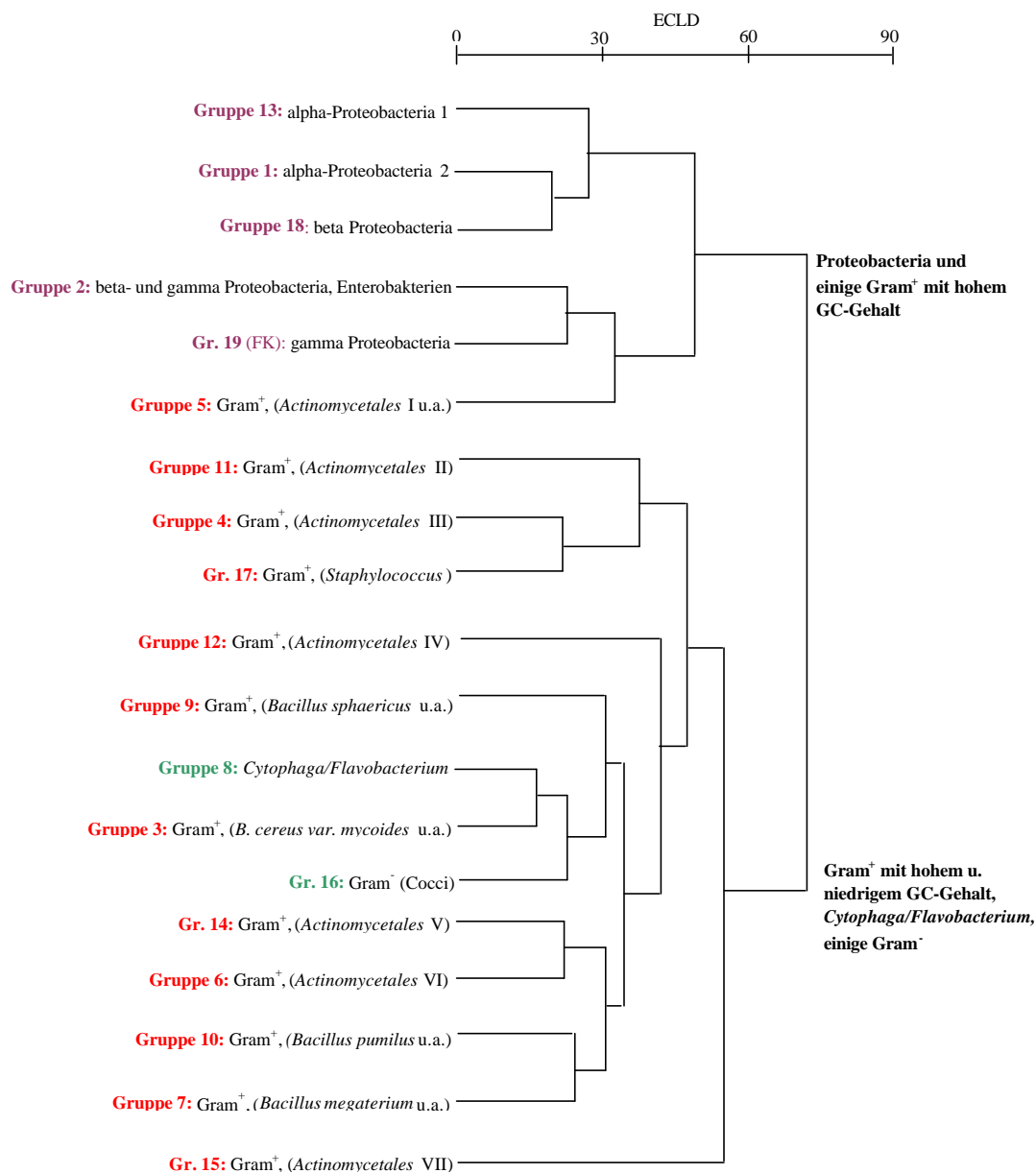


Abb. 11a: Clusteranalyse (UPGMA) der 19 Bakterienhauptgruppen auf der Basis von euklidischen Distanzen > 25 in Dendrogrammform

Es folgt eine genaue Betrachtung der einzelnen Bakterienhauptgruppen mit ihren Untergruppen unter Berücksichtigung von Haupt-, Neben- und Biomarkerfettsäuren. Die Tabellen 7-16 zeigen zusammenfassend für die verschiedenen Untergruppen der jeweiligen Hauptgruppen die Ergebnisse der Fettsäureanalyse mit dem „closest match“ des MIS, deren Beurteilung nach Leff & Brown (1996), sowie charakteristische Haupt- und Biomarkerfettsäuren.

In den Abbildungen 12-21 sind die Fettsäuremuster von 10 Bakterienhauptgruppen mit ihren Untergruppen detailliert in Dendrogrammform dargestellt (Clusteranalyse, UPGMA) und erläutert. Vertreter dieser Gruppen wurden regelmäßig isoliert.

Gruppe 1 (α -Proteobacteria 2):

Vertreter der Hauptgruppe 1 gehörten sämtlich zu den α -Proteobacteria. Bei den identifizierten Bakteriengattungen handelte es sich um *Agrobacterium*, *Paracoccus*, *Ochrobactrum* und *Phyllobacterium* (s. Tab. 7 und Abb. 12).

Tab. 7: Bakterienhauptgruppe 1 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS („closest match“) und Phylogenie	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
1	1	<i>Paracoccus denitrificans</i> (α -Proteobacteria)	0,6	„good match“	C19:0cyclo ω 8c
1	2	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (α -Proteobacteria)	0,8	„excellent match“	C19:0cyclo ω 8c
1	3	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (α -Proteobacteria)	0,1-0,4	„no match“ – „acceptable match“	-
1	4	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (α -Proteobacteria)	0,3-0,5	„acceptable match“	C19:0cyclo ω 8c
1	5	<i>Phyllobacterium rubiacearum</i> (α -Proteobacteria)	0,02	„no match“	C19:0cyclo ω 8c

Bei Bakterien dieser Gruppe war die Fettsäure C18:1 ω 7c/9t/12t in Anteilen bis >80% charakteristisch. Diese in den isolierten α -Proteobacteria als Hauptfettsäure ermittelte Fettsäure ist eine charakteristische Fettsäure aller α -, β - und γ -Proteobacteria. In fast allen Untergruppen der Gruppe 1 (ECLD >10) fand sich auch die auf die isolierten α -Proteobacteria beschränkte Fettsäure C19:0cyclo ω 8c (2-15%). In geringen Anteilen (3%) kam diese Fettsäure jedoch auch in der Gruppe 18 (*Burkholderia* sp., β -Proteobacteria) vor.

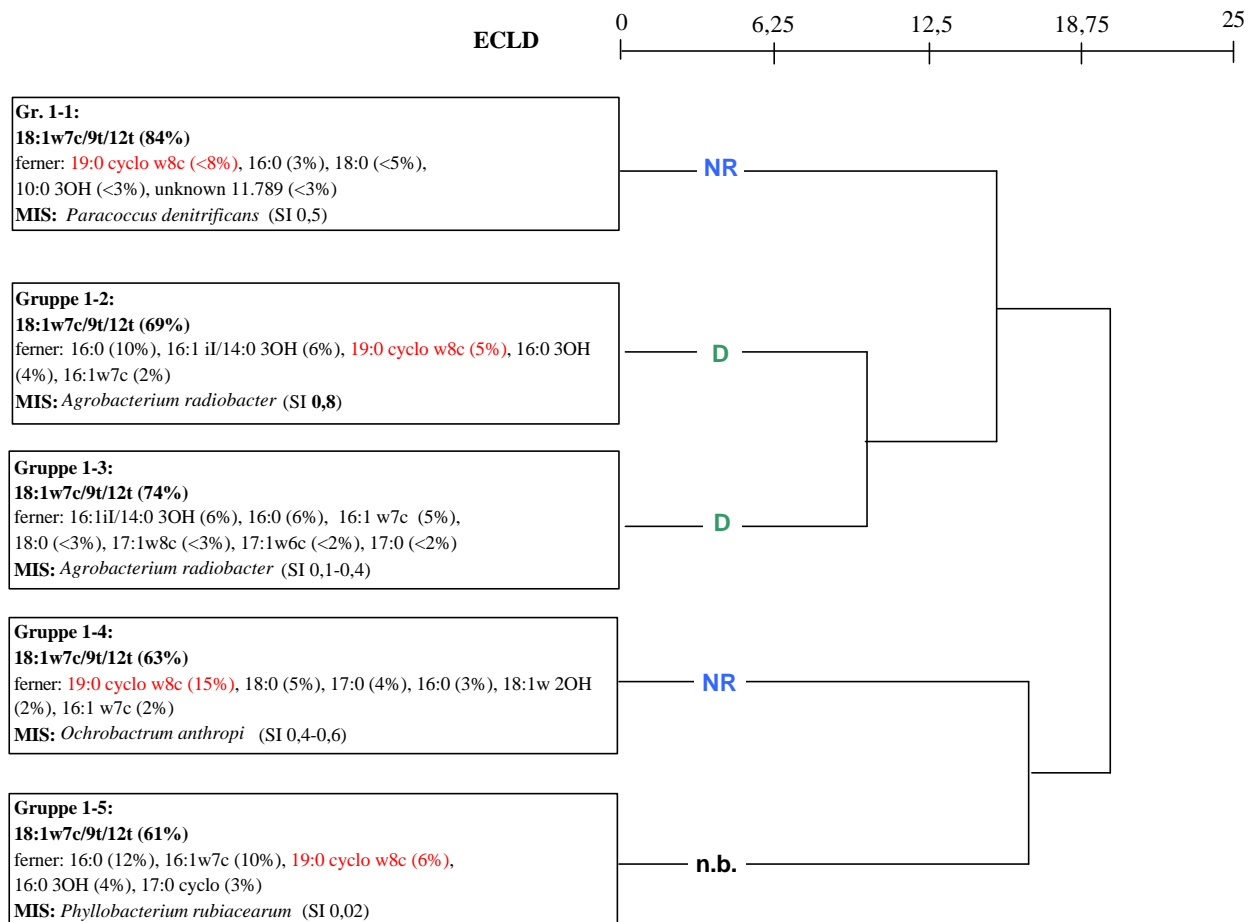


Abb. 12: Fettsäuremuster der Gruppe 1 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 2 (b- und g-Proteobacteria):

In dieser Hauptgruppe fanden sich ausschließlich β - und γ -Proteobacteria. Insgesamt wurden in dieser Hauptgruppe die Gattungen *Achromobacter*, *Comamonas*, *Variovorax*, *Neisseria* (β -Proteobacteria), die *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe, die Gattung *Actinobacillus*, sowie die Enterobacteria *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Proteus* sp. und *Serratia* sp., (γ -Proteobacteria) identifiziert (s. Tab. 8 und Abb. 13).

Tab. 8: Bakterienhauptgruppe 2 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, „(MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS („closest match“) und Phylogenie	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäuren
2	1	<i>Pseudomonas fluor. GC subgr. F</i> (γ -Proteobacteria)	0,01	„no match“	C10:0 3OH, C12:0 2OH, 12:0
2	2	<i>Proteus myxofaciens</i> (γ -Proteobacteria)	0,8	„good match“	C17:0cyclo
2	3	<i>Enterobacter amnigenus, Erwinia chrysanthemum</i> (γ -Proteobacteria)	0,8 0,1-0,3	„excellent match“ „no match“	C17:0cyclo
2	4	<i>Achromobacter xylosoxydans denitrificans</i> (β -Proteobacteria)	0,6-0,8	„good match“ - „excellent match“	C12:0 2OH
2	5	<i>Achromobacter piechaudii</i> (β -Proteobacteria)	0,5-0,7	„good match“ - „excellent match“	17:0cyclo
2	6	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (γ -Proteobacteria)	0,4-0,9	„good match“ - „excellent match“	C17:0cyclo, C12:0 2OH, C10:0 3OH, C12:0
2	7	<i>Comamonas acidovorans</i>	0,3	„acceptable match“	C10:0 3OH, C17:0cyclo
2	8	<i>Comamonas terrigena</i> <i>Variovorax paradoxus</i>	0,6 0,8	„good match“ „excellent match“	C10:0 3OH, C12:0
2	9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (γ -Proteobacteria)	0,1-0,2	„no match“	C10:0 3OH, C12:0, C12:0 2OH
2	10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>P. putida</i> GC subgr. B <i>P. fluorescens</i> GC subgr. A,B,C <i>P. corrugata</i> <i>P. syringae tabaci</i> (γ -Proteobacteria)	0,5-0,9 0,6 0,4-0,8 0,3 0,7	„good match“ - „excellent match“ „good match“ „acceptable match“ - „excellent match“ „acceptable match“ „good match“	C10:0 3OH, C12:0 2OH, C12:0, C17:0 cyclo

Als Hauptfettsäuren galten die Fettsäuren C16:1 ω 7c (24-38%), C16:0 (22-36%), und C18:1 ω 7c/9t/12t (8-21%), wobei die Fettsäure C18:1 ω 7c/9t/12t eine charakteristische Fettsäure von α -, β - und γ -Proteobacteria ist. In fast allen Untergruppen mit Ausnahme der Gruppen 2-2 (*Proteus* sp.) und 2-4 (*Achromobacter* sp.) ließen sich die Hydroxy-Fettsäuren C10:0 3OH, C12:0 2OH, sowie die Fettsäuren C12:0 und C17:0cyclo in verschiedenen Anteilen nachweisen. Diese Fettsäuren waren auf die Gruppe 2 beschränkt und könnten als „Biomarker-Fettsäuren“ für die isolierten Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe gelten. Für einzelne Untergruppen ließen sich keine Biomarkerfettsäuren ermitteln. Generell können die kurzkettigen C10 – C12 Hydroxyfettsäuren als charakteristisch für die Mehrzahl der isolierten Vertreter dieser Bakteriengruppe gelten.

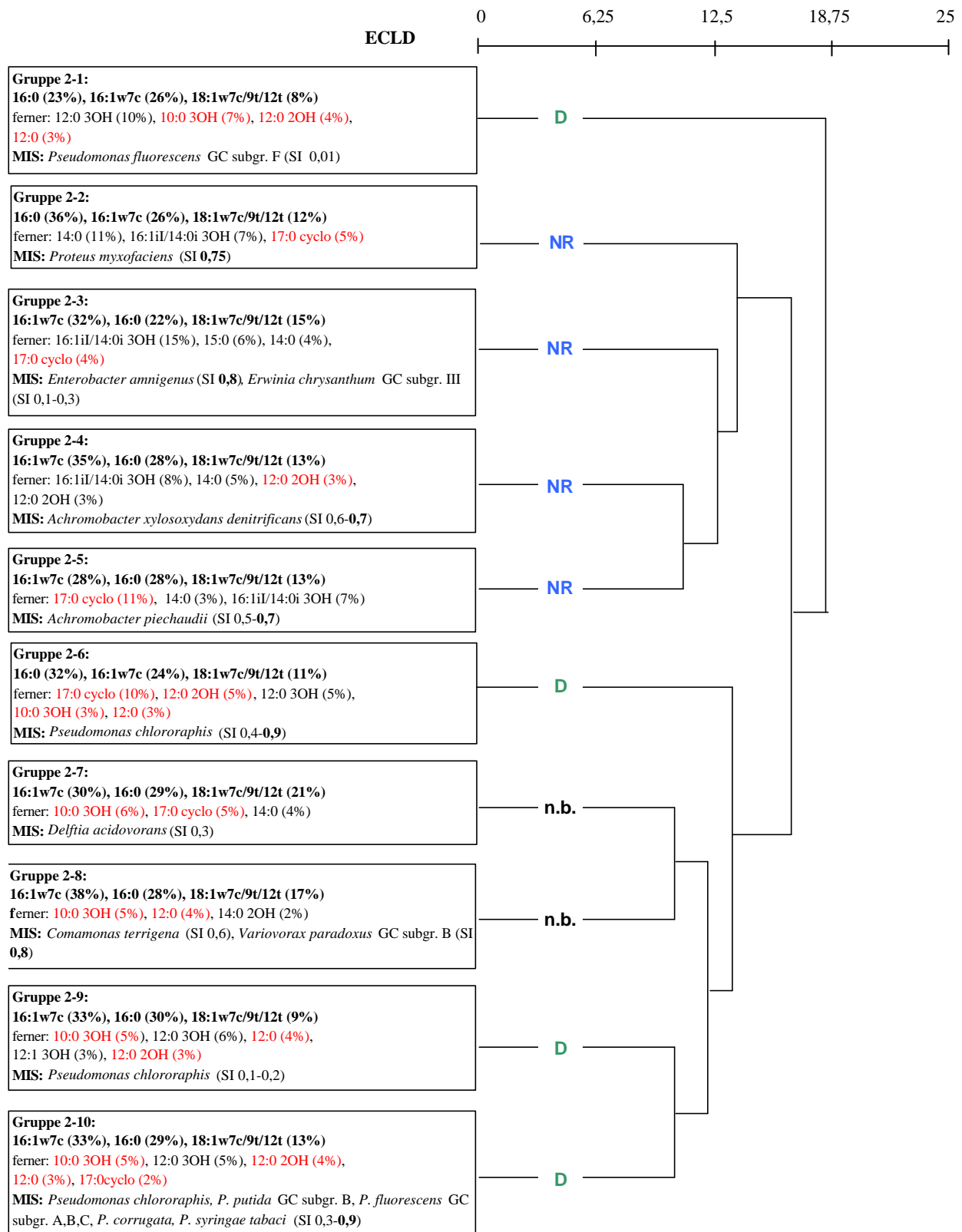


Abb. 13: Fettsäuremuster der Gruppe 2 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 3 (Gram⁺, *Bacillus mycooides* und ähnliche):

In diese Hauptgruppe fielen vor allem Gram⁺ Bakterien der Art *Bacillus mycooides*, sowie ähnliche Bakterien der Gattung *Bacillus* (s. Tab.9 und Abb. 14).

Tab. 9: Bakterienhauptgruppe 3 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
3	1	<i>Bacillus</i> sp.	–	„no match“	C11:0iso3OH, C11:0iso
3	2	<i>Micrococcus sedentarius</i>	14 (ECLD)	„no match“	C11:0iso3OH
3	3	<i>Bacillus mycooides</i> GC subgr. A	0,03	„no match“	C13:0iso
3	4	<i>Bacillus mycooides</i> GC subgr. A	0,1-0,8	„no match“ – „excellent match“	C13:0iso
3	5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,4-0,6	„acceptable match“ – „good match“	isoC17:0ω5c, C13:0iso
3	6	<i>Bacillus mycooides</i> GC subgr. B	11 (ECLD)	„no match“	isoC17:0ω5c
3	7	<i>Bacillus mycooides</i> GC subgr. B	0,05-0,5	„no match“ – „acceptable match“	isoC17:0ω5c, C13:0iso

Diese Gruppe zeichnete sich durch die Hauptfettsäuren C15:0iso (19-34%), C17:0iso (7-18%) und C16:0iso (3-15%) aus. Die Fettsäure C13:0iso fand sich ausschließlich in den Untergruppen 3-3 („no match“), 3-4 (*Bacillus mycooides* GC subgr. A), 3-5 (*Bacillus thuringiensis*) und 3-7 („no match“) mit einem Anteil von 9-10%, sowie in sehr geringen Abundanzen (3%) in der Hauptgruppe 9 (*Bacillus sphaericus*). Die kurzkettigen Fettsäuren C11:0iso und C11:0iso3OH (5-8%) fanden sich außer in den Untergruppen 3-1 („no match“) und 3-2 („no match“) lediglich in einigen Untergruppen der Hauptgruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium*). In den Untergruppen 3-5, 3-6 und 3-7 („no match“) trat die Biomarkerfettsäure isoC17:1ω5c in Anteilen von 5-12% auf. Die dominierenden Vertreter dieser Hauptgruppe waren der Art *Bacillus mycooides* zuzurechnen, welche auf Festmedien und auch im Boden ein ausgedehntes, verzweigtes Myzel anlegt.

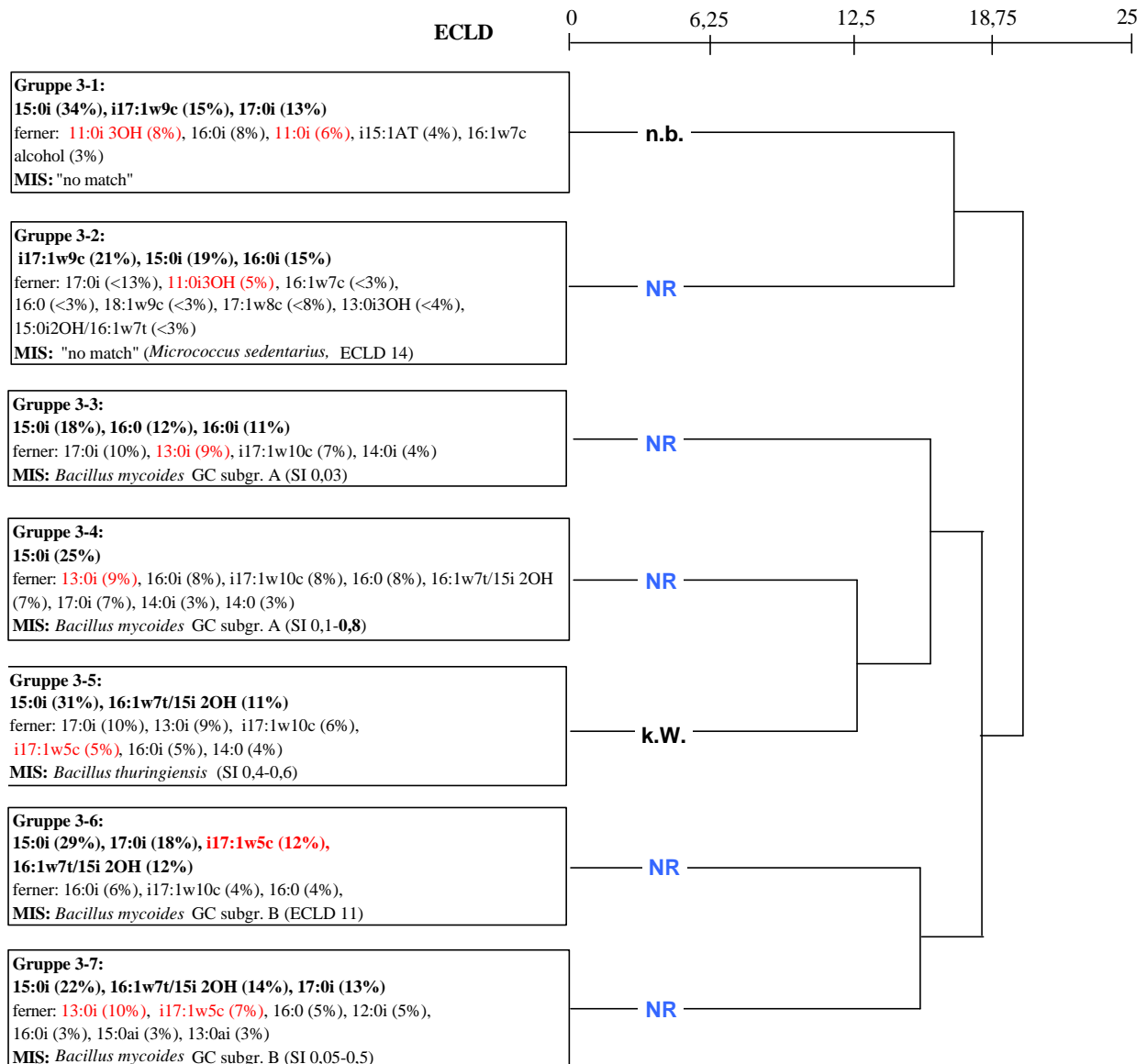


Abb. 14: Fettsäuremuster der Gruppe 3 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

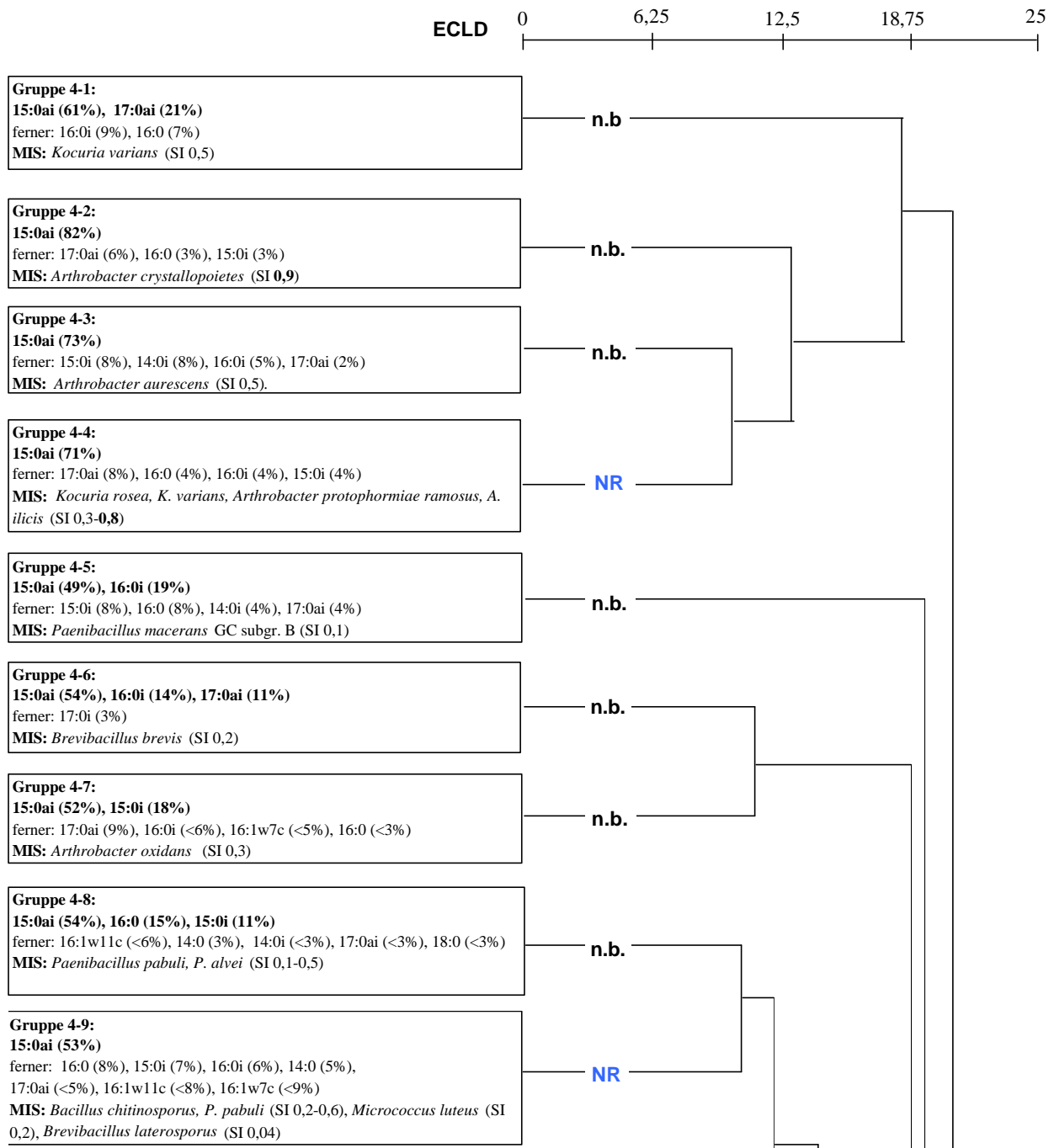
Gruppe 4 (Gram⁺, Actinomycetales III):

Bei Hauptgruppe 4 handelte es sich um verschiedene Gram⁺ Bakterien, vorwiegend Actinomycetales, die sich aufgrund der Diversität der Fettsäuremuster in 17 Untergruppen aufteilen ließen. Identifiziert wurden u.a. die Gattungen *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* (hoher GC-Gehalt) und *Bacillus* (niedriger GC-Gehalt) (s. Tab. 10 und Abb. 15).

Tab. 10: Bakterienhauptgruppe 4 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker- Fettsäure
4	1	<i>Kocuria varians</i>	0,5	„acceptable match“	-
4	2	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	0,9	„excellent match“	-
4	3	<i>Arthrobacter aureescens</i>	0,5	„acceptable match“	-
4	4	<i>Kocuria rosea</i>	0,4-0,7	„good match“	-
		<i>M. varians</i>	0,6	„good match“	
		<i>Arthrobacter ilicis</i>	0,8	„excellent match“	
		<i>A. protophormiae ramosus</i>	0,5-0,8	„good match“	
4	5	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr.B	0,1	„no match“	-
4	6	<i>Brevibacillus brevis</i>	0,2	„no match“	-
4	7	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0,3	„acceptable match“	-
4	8	<i>Paenibacillus pabuli</i>	0,1-0,5	„no match“ –	-
		<i>Paenibacillus alvei</i>		„acceptable match“	
4	9	<i>Bacillus chitinosporus</i>	0,2-0,6	„no match“ –	-
		<i>Paenibacillus pabuli</i>		„acceptable match“	
		<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,04	„no match“	
		<i>Micrococcus luteus</i>	0,2	„no match“	
4	10	<i>Cellulomonas fimi</i>	0,3	„acceptable match“	-
		<i>Arthrobacter nicotinae</i>	0,2	„no match“	
4	11	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0,4	„acceptable match“	-
		<i>Paenibacillus pabuli</i>	0,1-0,2	„no match“	
		<i>Bacillus chitinosporus</i>	0,3-0,6	„acceptable match – „good match“	
		<i>Arthrobacter citreus</i>	0,3	„acceptable match“	
4	12	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0,4-0,8	„acceptable match“	-
		<i>Kocuria rosea</i>		– „good match“	
		<i>Paenibacillus polymyxa</i>			
4	13	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. B	0,7	„good match“	-
		<i>Bacillus</i> sp.	0,3-0,6	„acceptable match“	
4	14	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. B	0,2-0,4	„no match“ –	-
		<i>Brevibacillus laterosporus</i>		„acceptable match“	
		<i>B. psychrophilus</i>	0,3-0,5	„acceptable match“	
		<i>B. chitinosporus</i>	0,2	„no match“	
			0,4-0,6	„acceptable match“	
		<i>Brevibacillus brevis</i>		– „good match“	
		<i>Arthrobacter mysorens</i>	0,3	„acceptable match“	
			0,6	„good match“	
4	15	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0,05-0,5	„no match“ –	-
		<i>Brevibacillus brevis</i>		„acceptable match“	
		<i>Paenibacillus validus</i>			
4	16	<i>Paenibacillus pabuli</i>	12 (ECLD)	„no match“	-
4	17	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,1-0,2	„no match“	-

Es ließen sich keine auf diese Gruppe beschränkten Fettsäuren nachweisen. Bakterien dieser Gruppe waren gekennzeichnet durch einen sehr hohen Anteil der Fettsäure C15:0anteiso (ca. 40-80%). Ebenso fanden sich die Fettsäuren C17:0anteiso, C16:0iso, C15:0iso und C16:0 in bedeutenden Konzentrationen von bis zu 20% in vielen Untergruppen.



Fortsetzung siehe nächste Seite

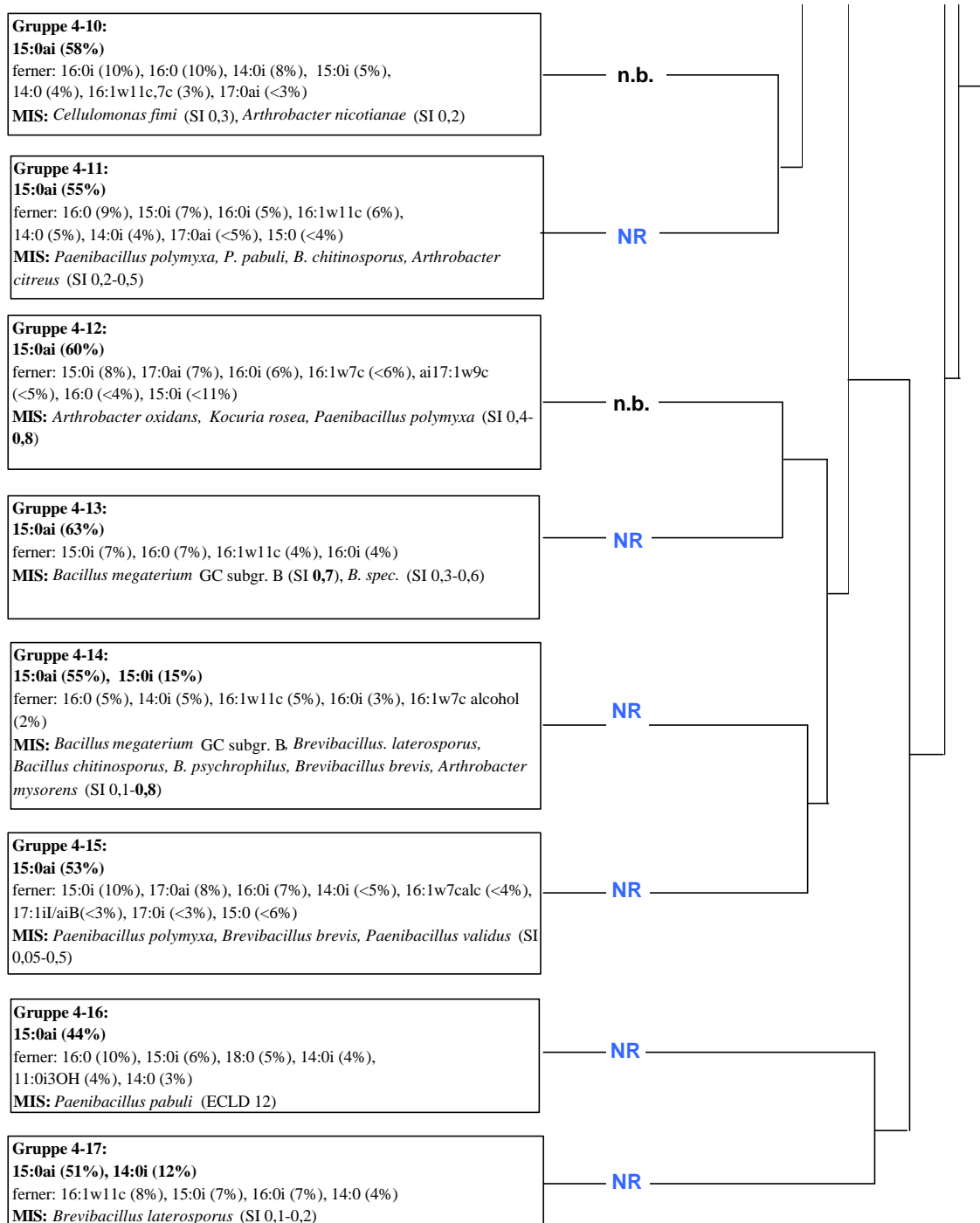


Abb. 15: Fettsäuremuster der Gruppe 4 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 5 (Gram⁺, Actinomycetales I und ähnliche):

In dieser Bakterienhauptgruppe finden sich ausschließlich verschiedene den Actinomycetales zugehörige Isolate. Die Fettsäuremuster der Hauptgruppe 5 waren den Aktinomycetales *Gordona*, *Nocardia* und *Rhodococcus* am ähnlichsten (s. Tab. 11 und Abb. 16).

Tab. 11: Bakterienhauptgruppe 5 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker- Fettsäure
5	1	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> GC subgr. A	0,04	„no match“	10MethylC18:0
5	2	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> GC subgr. A	0,1	„no match“	10MethylC18:0
5	3	<i>Gordona bronchialis</i>	0,1	„no match“	10MethylC18:0
5	4	<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,01-0,1	„no match“	10MethylC18:0
5	5	<i>Nocardia asteroides</i>	10,5 ECLD	„no match“	10MethylC18:0
5	6	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> GC subgr. A	0,02	„no match“	10MethylC18:0

Diese Gruppe war gekennzeichnet durch die für Aktinomyceten charakteristische Fettsäure 10Methyl C18:0 (Tuberkulostearinsäure). Alle Untergruppen wiesen diese Fettsäure in Anteilen von <7-18% auf. Die Fettsäure C18:1 ω 9c fand sich nur in einigen Untergruppen der Actinomycetales mit Anteilen von 13-30%. In Anteilen um 10% war diese Fettsäure auch in den Hauptgruppen 12 und 19 mit ca. 40% in Hauptgruppe 15 (ebenfalls Actinomycetales) zu finden. Die Fettsäuremuster der Hauptgruppen 12 und 15 ähnelten denen von *Micromonospora* und *Arcanobacterium*. Es handelte sich hier um Einzelisolate, welche nicht näher identifiziert wurden. In hohen Anteilen fanden sich ebenfalls die Hauptfettsäuren C16:0 (24-33%) in Isolaten der Gruppe 5. In einigen Untergruppen ließen sich die Fettsäuren C16:1 ω 7t/C15:0iso2OH, C18:0, C17:1 ω 8c und C16:1 ω 7c in Anteilen von bis zu 20% nachweisen. Die Fettsäure C17:1 ω 8c fand sich außer in Hauptgruppe 5 nur noch in den Untergruppen 1-2 (*Ochrobactrum* sp.), 1-3 (*Agrobacterium* sp.), 3-2 („no match“) und in Hauptgruppe 12 (*Micromonospora* sp.).

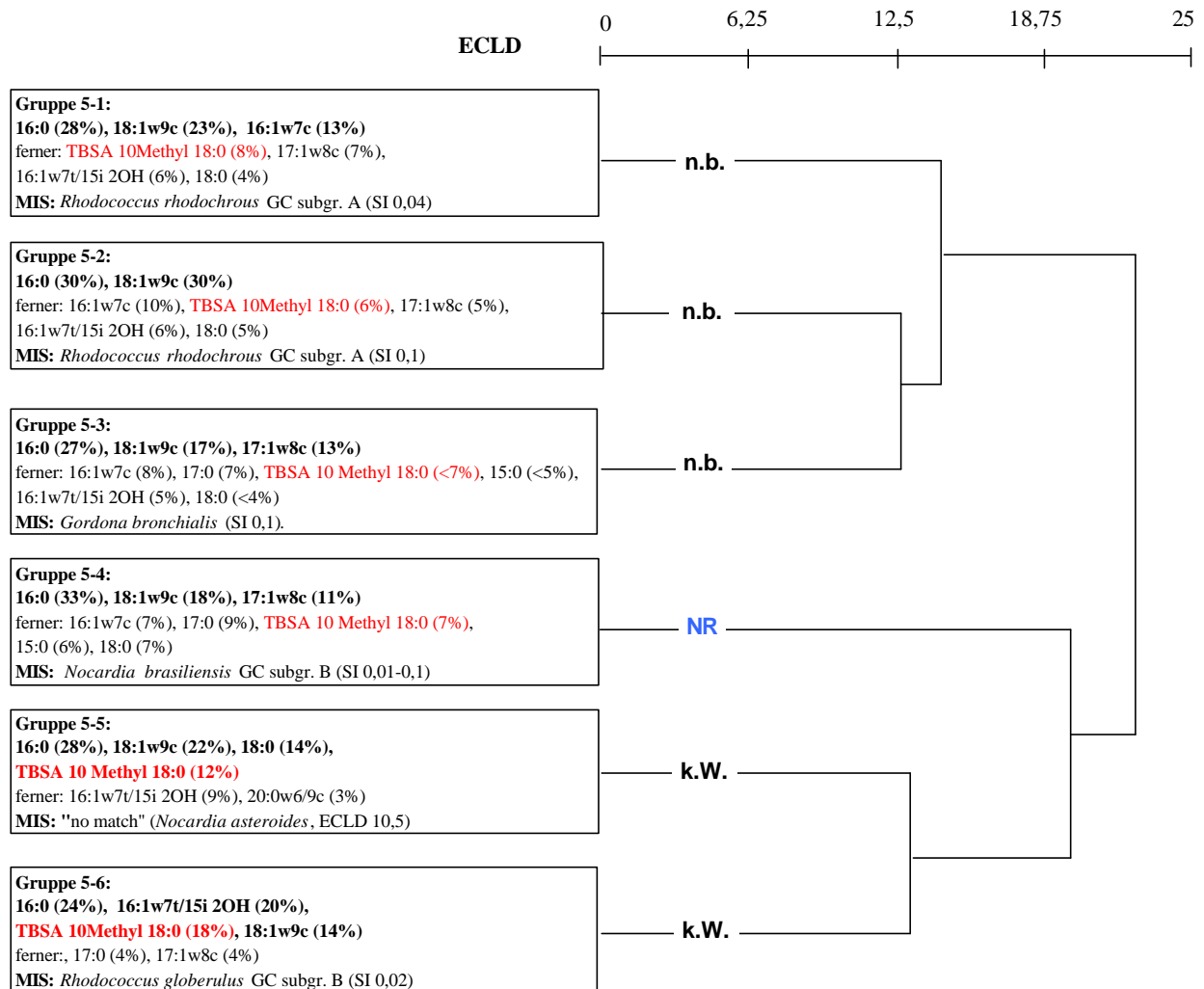


Abb. 16: Fettsäuremuster der Gruppe 5 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

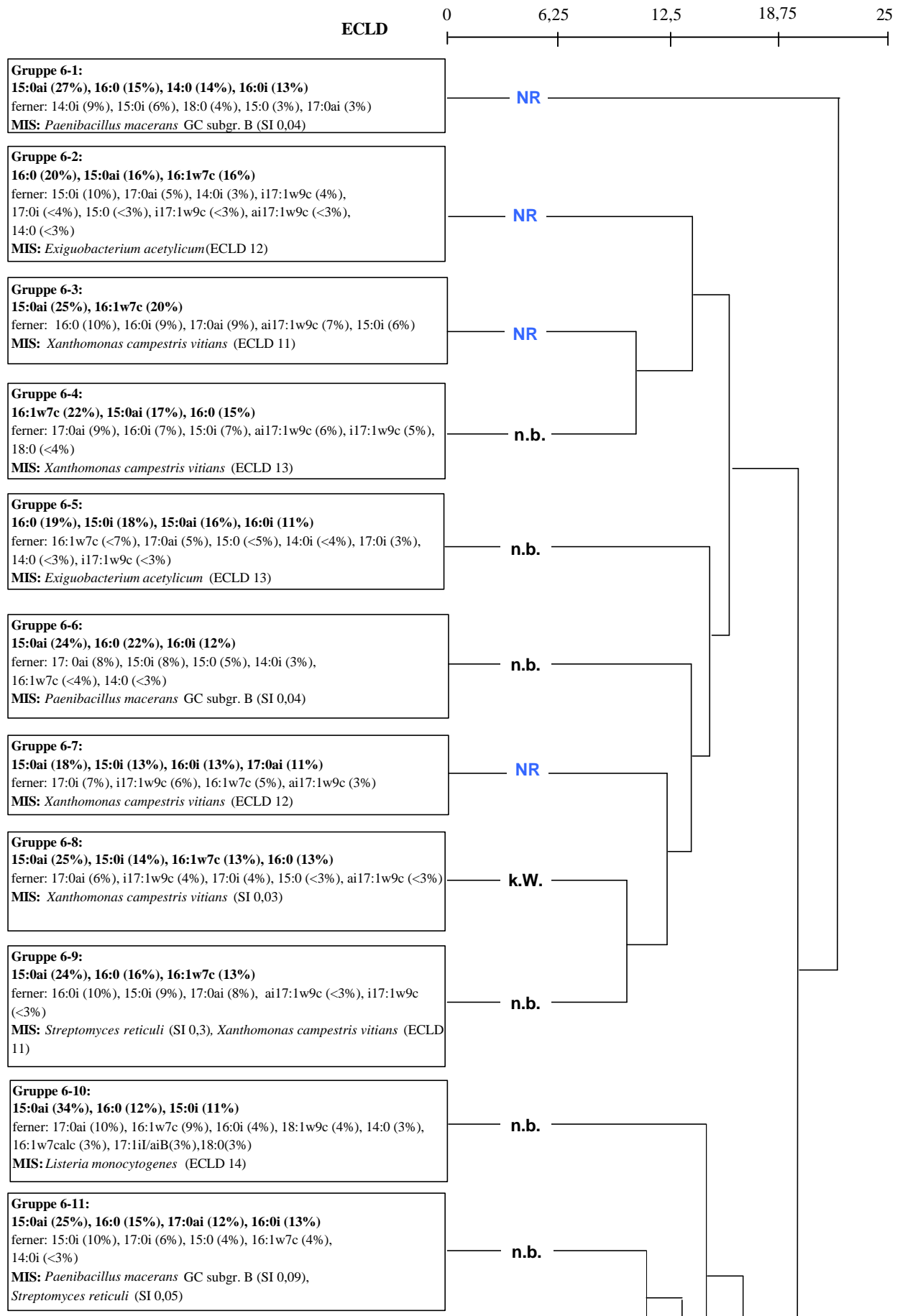
Gruppe 6 (Gram⁺, Actinomycetales VII):

Zu dieser Gruppe gehörten ebenfalls Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt und ausgeprägtem Luftmycel. In der Datenbank des MIS (TSBA 40) waren keine entsprechenden Fettsäuremuster zu diesen Isolaten enthalten. Der Similaritätsindex des „closest match“ lag stets unter 0,1. Lediglich in einem Ausnahmefall konnte ein Isolat der Bakterienart *Streptomyces reticulum* mit einem Similaritätsindex von 0,5 zugeordnet werden (6-12). Weitere Gattungsvorschläge lauteten u.a. *Brevibacterium* und *Bacillus*. Die Fettsäuremuster dieser Bakterienhauptgruppe waren außerordentlich divers und führten zur Bildung von 20 Untergruppen (s. Tab. 12 und Abb. 17).

Tab. 12: Bakterienhauptgruppe 6 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker- Fettsäure
6	1	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,04	„no match“	-
6	2	<i>Brevibacterium acetylenicum</i>	12 (ECLD)	„no match“	-
6	3	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	11 (ECLD)	„no match“	-
6	4	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	13 (ECLD)	„no match“	-
6	5	<i>Brevibacterium acetylenicum</i>	13 (ECLD)	„no match“	-
6	6	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,04	„no match“	-
6	7	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	12 (ECLD)	„no match“	-
6	8	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	0,03	„no match“	-
6	9	<i>Streptomyces reticulum</i> <i>Xanthomonas campestris vitians</i>	0,3 11 (ECLD)	„no match“ „no match“	-
6	10	<i>Listeria monocytogenes</i>	14 (ECLD)	„no match“	-
6	11	<i>Streptomyces reticulum</i> <i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,05 0,09	„no match“ „no match“	-
6	12	<i>Streptomyces reticulum</i> <i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,03-0,5 0,04	„no match“- „acceptable match“ „no match“	-
6	13	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,05	„no match“	-
6	14	<i>Streptomyces reticulum</i>	0,02	„no match“	-
6	15	<i>Streptomyces reticulum</i> <i>Arthrobacter oxydans</i>	0,04 14 (ECLD)	„no match“ „no match“	-
6	16	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	0,05	„no match“	-
6	17	<i>Listeria welshimeri</i> <i>Paenibacillus macerans</i>	17 (ECLD) 12 (ECLD)	„no match“	-
6	18	<i>Listeria innocua</i>	15 (ECLD)	„no match“	-
6	19	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B	11 (ECLD)	„no match“	-
6	20	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. B <i>Streptomyces</i> sp.	0,1	„no match“	-

Isolate dieser Hauptgruppe waren im Gegensatz zu den Vertretern der Hauptgruppe 5 durch keine besonderen Fettsäuren gekennzeichnet. Die Hauptfettsäuren waren C15:0anteiso (15-42%), C16:0iso (4-22%) und C17:0anteiso (3-13%). In höheren Anteilen waren in einigen Untergruppen auch die Fettsäuren C16:0 (<3-22%), C16:1 ω 7c (0-22%) und C15:0iso (0-18%) nachweisbar.



Fortsetzung siehe nächste Seite

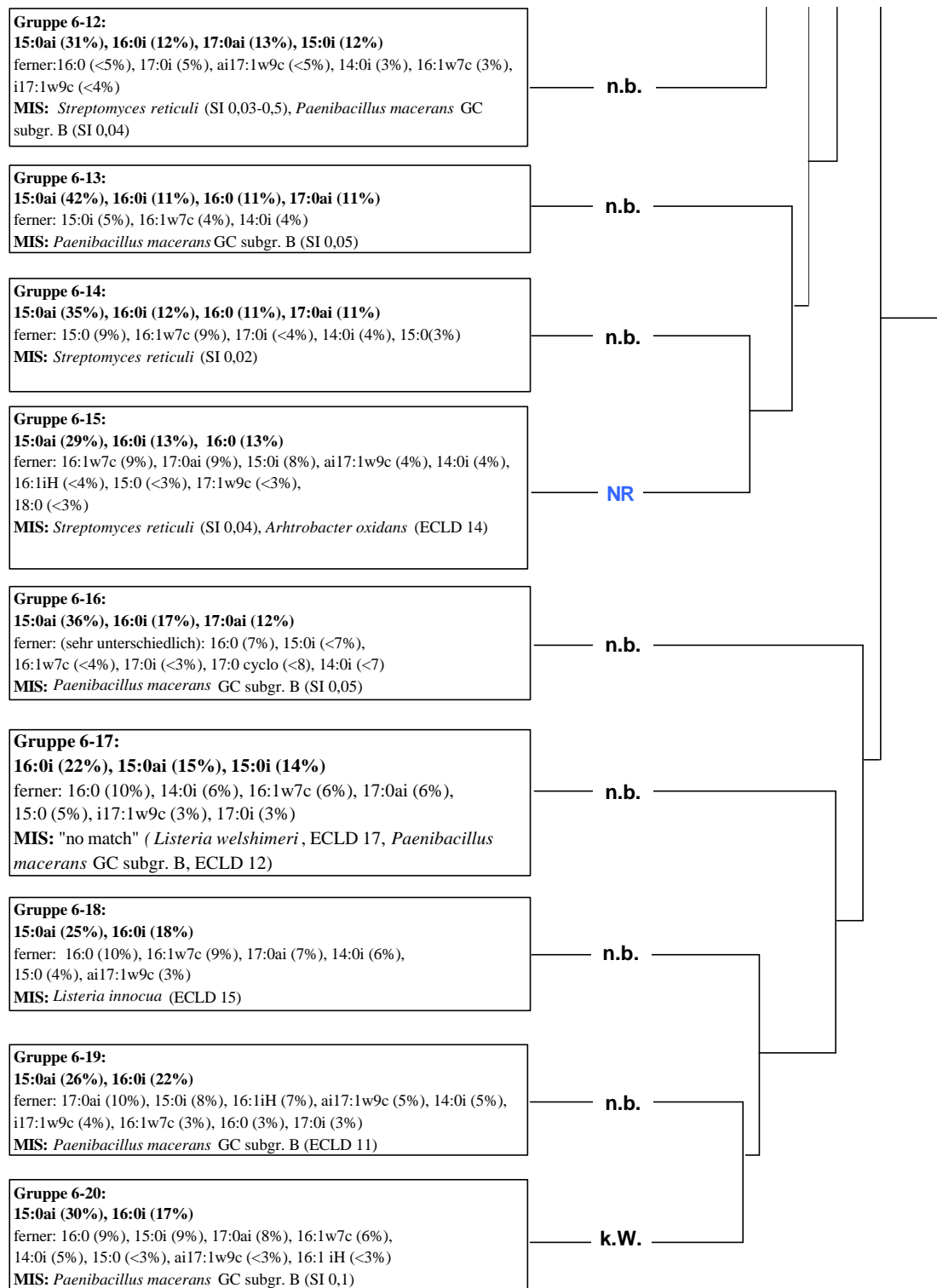


Abb. 17: Fettsäuremuster der Gruppe 6 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 7 (Gram⁺, *Bacillus megaterium* und ähnliche):

In dieser Gruppe waren vor allem Gram⁺ Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt vertreten. Die Mehrzahl der Isolate dieser Gruppe gehörte der Gattung *Bacillus* an. Einige Vertreter dieser Gruppe wurden als *Bacillus megaterium* GC subgr. A identifiziert. Auch diese Hauptgruppe war sehr heterogen in der Zusammensetzung ihrer Fettsäuremuster und besaß 20 Untergruppen (s. Tab. 13 und Abb. 18).

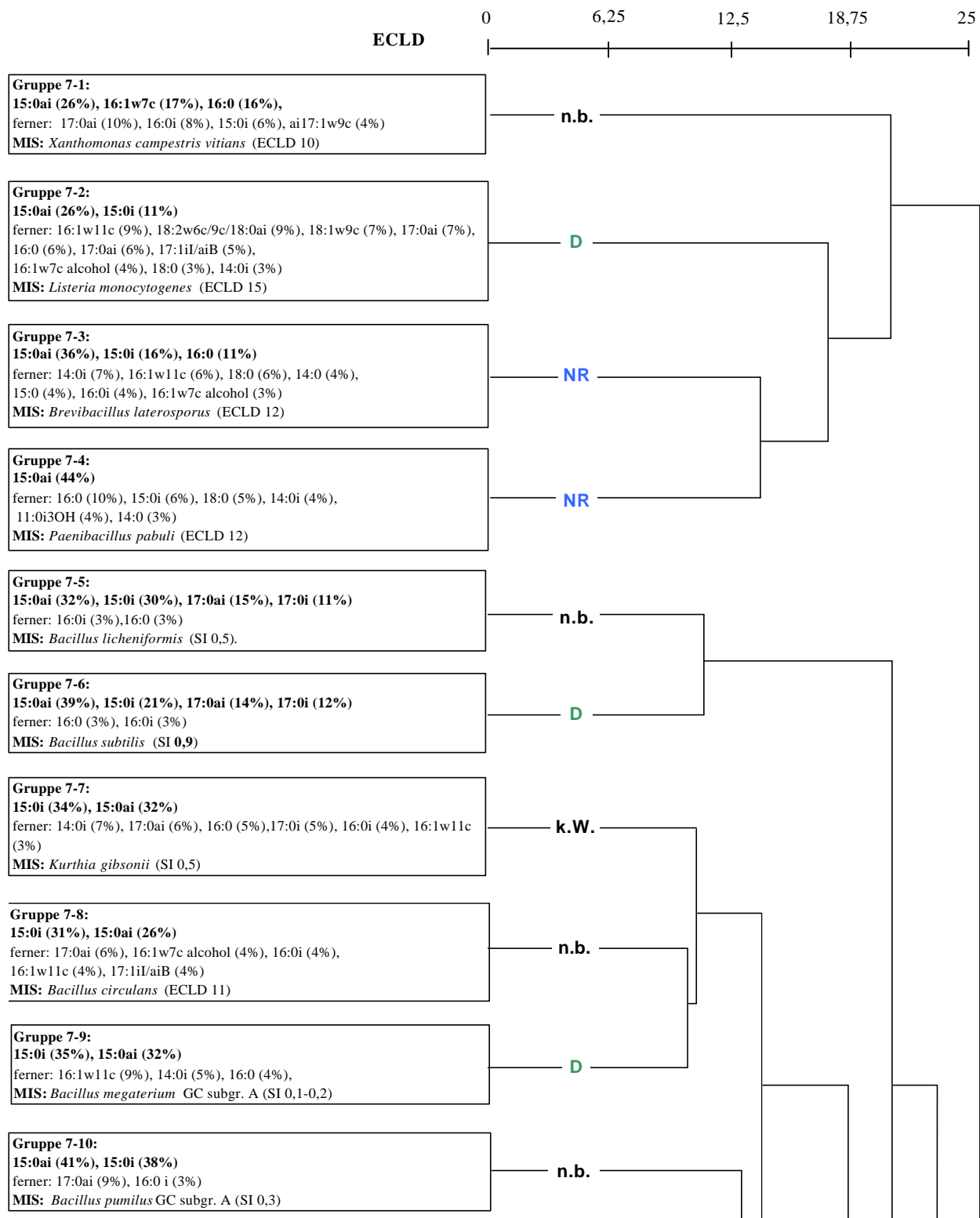
Tab. 13: Bakterienhauptgruppe 7 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
7	1	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	10 (ECLD)	„no match“	-
7	2	<i>Listeria monocytogenes</i>	15 (ECLD)	„no match“	-
7	3	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	12 (ECLD)	„no match“	-
7	4	<i>Paenibacillus pabuli</i>	12 (ECLD)	„no match“	-
7	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	0,6	„good match“	-
7	6	<i>Bacillus subtilis</i>	0,9	„excellent match“	-
7	7	<i>Kurthia gibsonii</i>	0,5	„good match“	-
7	8	<i>Bacillus circulans</i>	11 (ECLD)	„no match“	-
7	9	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A	0,1-0,2	„no match“	-
7	10	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgr. A	0,3	„acceptable match“	-
7	11	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A	0,4	„acceptable match“	-
7	12	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A	0,4-0,9	„good match“- „excellent match“	-
7	13	<i>Bacillus psychrophilus</i>	0,05	„no match“	-
7	14	<i>Deinococcus erythromyxa</i>	0,2	„no match“	-
7	15	<i>Bacillus filicolonicus</i> <i>Arthrobacter viscosus</i>	0,3 0,3	„acceptable match“ „acceptable match“	-
7	16	<i>Bacillus firmus</i> <i>Xanthomonas campestris vitians</i>	0,02 0,06	„no match“	-
7	17	<i>Bacillus longisporus</i>	0,2	„no match“	-
7	18	<i>Arthrobacter viscosus</i> <i>Bacillus laterosporus</i>	0,2-0,4 0,5	„no match“ – „acceptable match“ „acceptable match“	-
7	19	<i>Bacillus</i> sp.	-	„no match“	-
7	20	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. III <i>B. psychrophilus</i>	0,02 10 (ECLD)	„no match“ „no match“	-

Es ließen sich keine auf diese Gruppe beschränkten Fettsäuren detektieren. Hauptgruppe 7 besaß generell einen hohen Anteil der Hauptfettsäure C15:0anteiso (26-45%). Dazu eine Vielzahl verschiedener Fettsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen. Einige dieser Fettsäuren machten in den diversen Untergruppen einen beträchtlichen Anteil am Fettsäurespektrum aus: C15:0iso (0-38%), C14:0iso (0-22%), C16:0 (0-16%), C17:0anteiso (0-15%) und C16:0iso (0-8%), fehlten aber in anderen Untergruppen völlig. Bei genauerem Betrachten fielen jedoch bei einigen wenigen Untergruppen Besonderheiten auf. So besaß die Untergruppe 7-2 („no match“) Anteile der mehrfach ungesättigten Fettsäure C18:2ω6c/C18:0

anteiso (9%). Einige andere Untergruppen wiesen im Vergleich zu den restlichen Untergruppen der Hauptgruppe 7 unverhältnismäßig hohe Anteile verschiedener anderer Fettsäuren auf.

Fortsetzung siehe nächste Seite



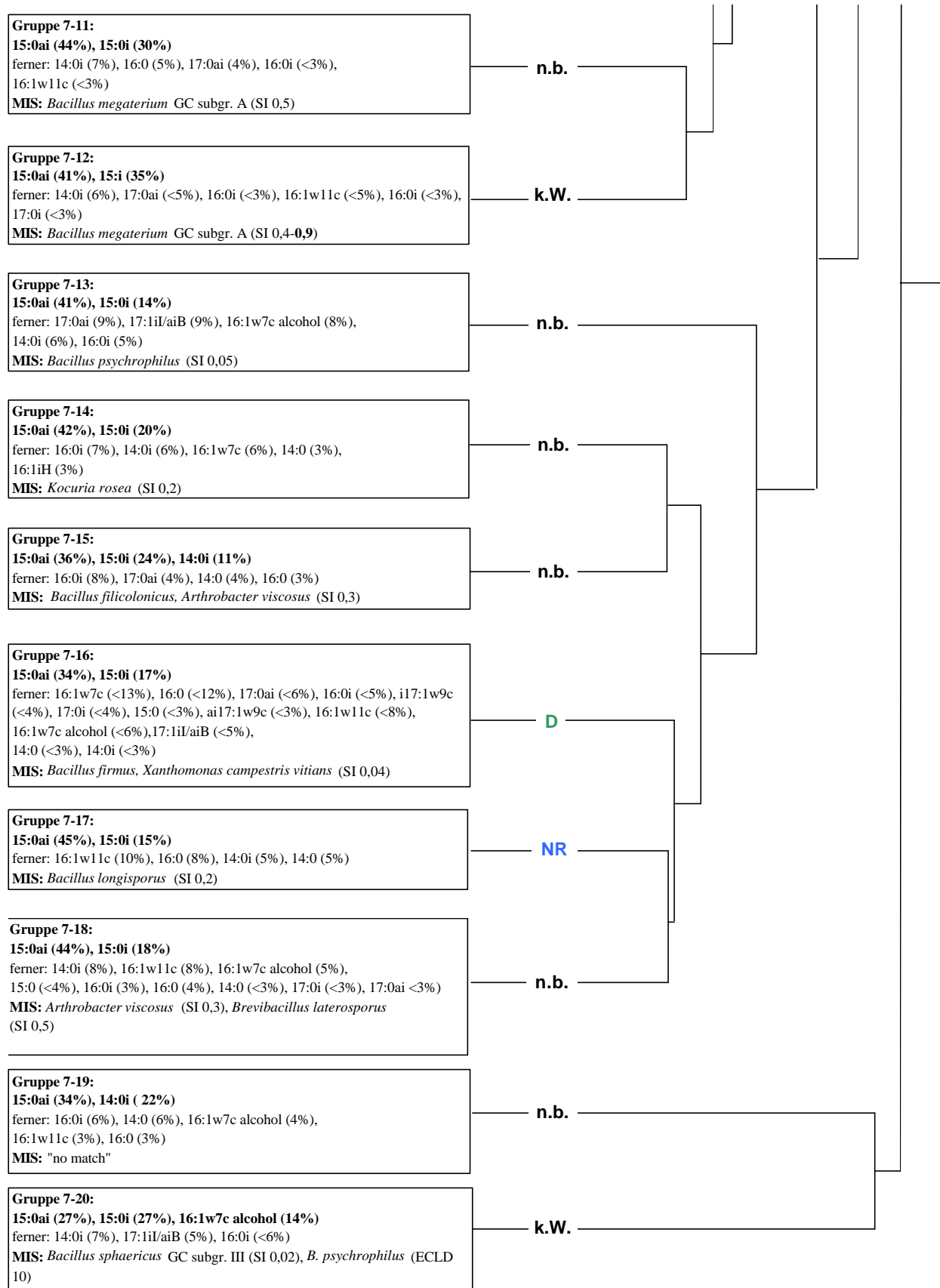


Abb. 18: Fettsäuremuster der Gruppe 7 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium* und ähnliche):

Hierzu gehörten Bakterien der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*, die den Gattungen *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas* und *Xanthomonas* zugeordnet werden konnten. Die Similaritätsindices der Zuordnung zur Gattung *Xanthomonas* und *Stenotrophomonas* (Proteobacteria) lagen jedoch unter 0,4 und gelten als nicht eindeutig identifiziert (s. Tab. 14 und Abb. 19).

Tab. 14: Bakterienhauptgruppe 8 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
8	1	<i>Xanthomonas campestris vitians</i>	21 (ECLD)	„no match“	-
8	2	<i>Bacillus circulans</i>	19 (ECLD)	„no match“	-
8	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,1	„no match“	-
8	4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,4	„acceptable match“	-
8	5	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,3	„acceptable match“	C15:0iso3OH, C16:03OH
8	6	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,6	„good match“	C17:0iso3OH, C15:0iso3OH, C16:03OH, C15:1ω6c
8	7	<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,3	„acceptable match“	C17:0iso3OH, C15:0iso3OH
8	8	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,1	„no match“	C17:0iso3OH, C15:0iso3OH, C15:1ω6c, C17:1ω6c
8	9	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,1-0,4	„no match“ - „acceptable match“	C17:0iso3OH, C15:0iso3OH, C15:1ω6c, C17:1ω6c
8	10	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,1-0,4	„no match“ - „acceptable match“	C17:0iso3OH, C15:0iso3OH, C15:1ω6c, C17:1ω6c

Die Isolate wiesen neben ihrer Hauptfettsäuren C15:0iso (21-40%) und den Nebenfettsäuren C16:1ω7c (0-19%) und C17:1ω9c (0-15%) eine Reihe von spezifischen Fettsäuren auf. Neben den Fettsäuren C11:0iso und C11:0iso3OH der Untergruppen 8-1 („no match“), 8-3 und 8-4 (beide *Stenotrophomonas*), die sich lediglich noch in der Hauptgruppe 3 (*Bacillus mycoides*) fanden, zeichneten sich verschiedene Untergruppen durch eine Kombination verschiedener Anteile besonderer Fettsäuren in teilweise hohen Anteilen aus. Hierbei handelte es sich um die Fettsäuren C15:0iso3OH, C15:1ω6c, C16:0 3OH, C17:0iso3OH und C17:1ω6c in Anteilen von 3-21%.

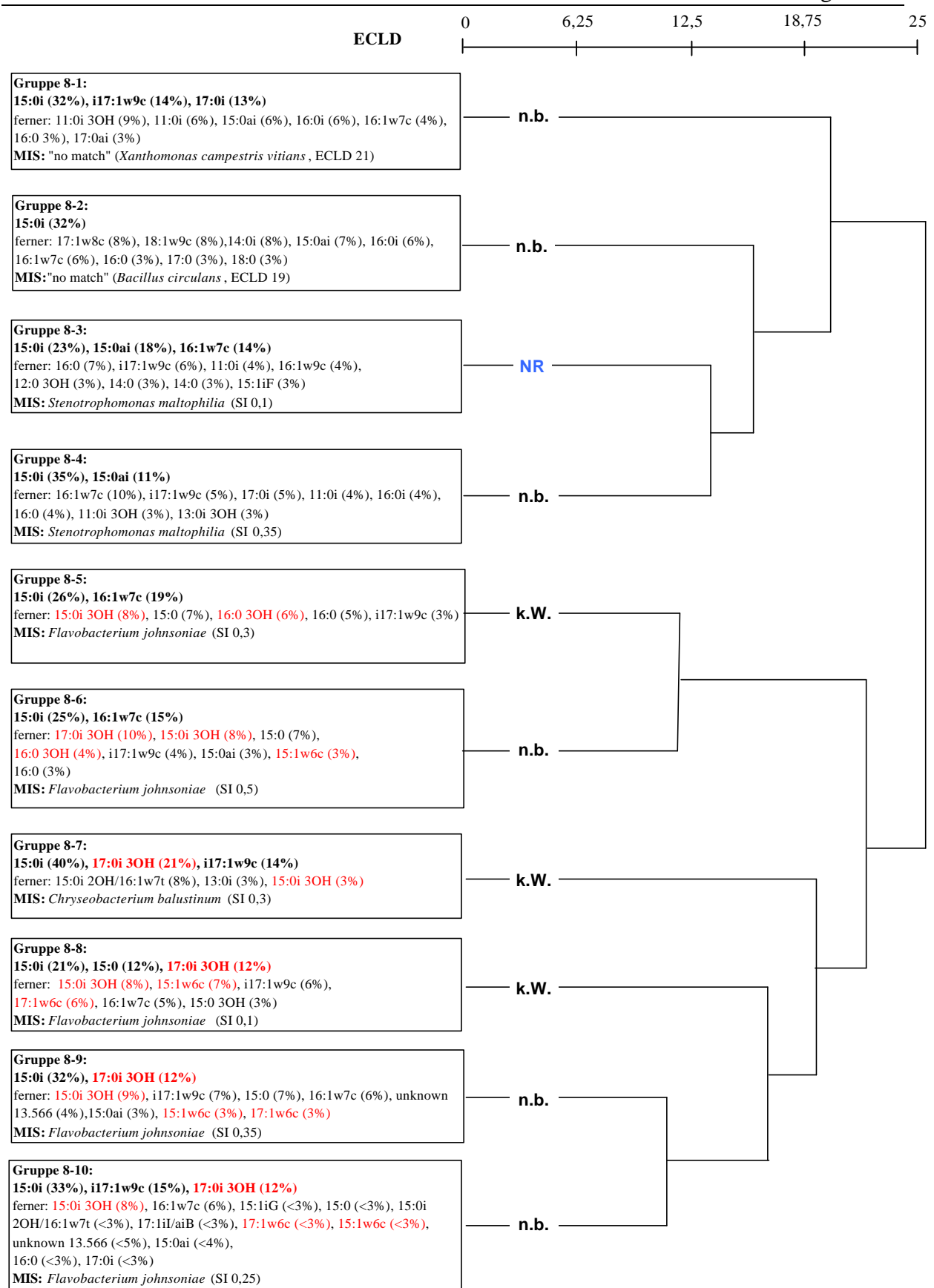


Abb. 19: Fettsäuremuster der Gruppe 8 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 9 (Gram⁺, *Bacillus sphaericus* u.a.):

Isolate dieser Gruppe wurden sämtlich der Gattung *Bacillus* zugeordnet (*Bacillus sphaericus*) (s. Tab. 15 und Abb. 20).

Tab. 15: Bakterienhauptgruppe 9 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
9	1	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. V	0,3	„acceptable match“	C16:1ω7c alcohol
9	2	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. V	0,05-0,5	„no match“- „acceptable match“	C16:1ω7c alcohol
9	3	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. V	0,4	„acceptable match“	C16:1ω7c alcohol
9	4	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. IV	0,2	„no match“	C16:1ω7c alcohol
9	5	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. IV	0,5	„acceptable match“	C16:1ω7c alcohol

Zu dieser Hauptgruppe gehörten Gram⁺ Bakterien, deren sämtliche Untergruppen durch einen sehr hohen Anteil der Fettsäure C16:1ω7c alcohol (14-33%) auffielen. Diese Fettsäure fand sich sporadisch in geringen Anteilen (3-8%) bei einigen Untergruppen verschiedener anderer Hauptgruppen, wie 3-1 („no match“), 6-10 („no match“), und in einigen Untergruppen der Hauptgruppe 7 und 10, hatte jedoch nur bei der Untergruppe 7-20 („no match“) ebenfalls einen höheren Anteil (14%). Desweiteren war die Gruppe 9 gekennzeichnet durch die Hauptfettsäuren C16:0iso (20-40%), C15:0iso (0-40%), sowie C14:0iso (0-14%).

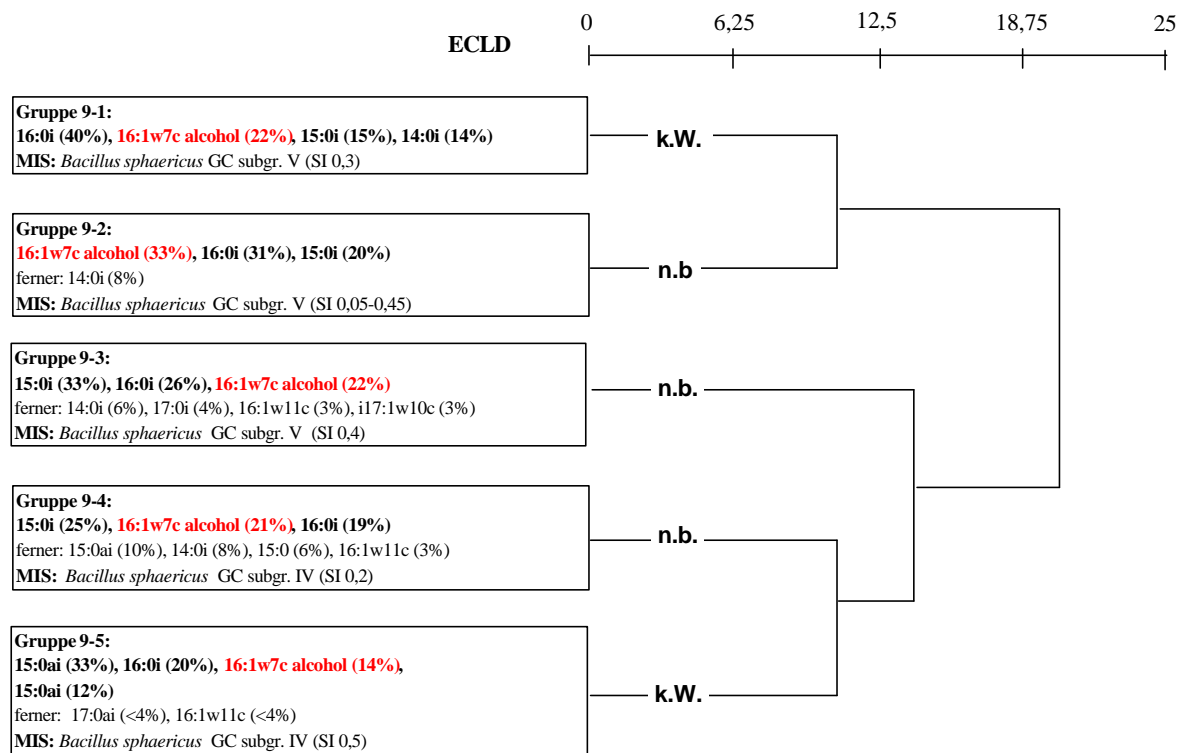


Abb. 20: Fettsäuremuster der Gruppe 9 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Gruppe 10 (Gram⁺, *Bacillus pumilus* u.a.):

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Isolate, die eine große Ähnlichkeit mit dem Fettsäuremuster von *Bacillus pumilus* und verwandten Arten aufweisen (s. Tab. 16 und Abb. 21).

Tab. 16: Bakterienhauptgruppe 10 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI zum „closest match“, (MIS) nach Leff & Brown (1996)

Hauptgr. (ECLD >25)	Untergr. (ECLD >10)	MIS	SI	Beurteilung	Biomarker-Fettsäure
10	1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,5	„acceptable match“	-
10	2	<i>Bacillus licheniformis</i>	0,5	„acceptable match“	-
10	3	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. III <i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,05 0,1	„no match“ „no match“	-
10	4	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,7-0,8	„good match“	-
10	5	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgr. B	0,6	„good match“	-
10	6	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. B	0,9	„excellent match“	-
10	7	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A <i>B. amyloliquefaciens</i>	0,2 0,5	„no match“ „acceptable match“	-
10	8	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	10 (ECLD)	„no match“	-
10	9	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A	0,02	„no match“	-
10	10	<i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. III	10 (ECLD) 12 (ECLD)	„no match“ „no match“	-
10	11	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgr. B	15 (ECLD)	„no match“	-
10	12	<i>Paenibacillus macerans</i> GC subgr. A	0,04	„no match“	-

Es gab keine „Biomarkerfettsäuren“ für Isolate dieser Gruppe.

Die Gram⁺ Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt dieser Hauptgruppe wiesen hohe Anteile der Fettsäuren C15:0iso (23-56%) und anteiso (17-41%) auf. Einzelne Untergruppen besaßen außerdem höhere Anteile verschiedener anderer Fettsäuren, wie zum Beispiel C16:1 ω 11c und C20:0.

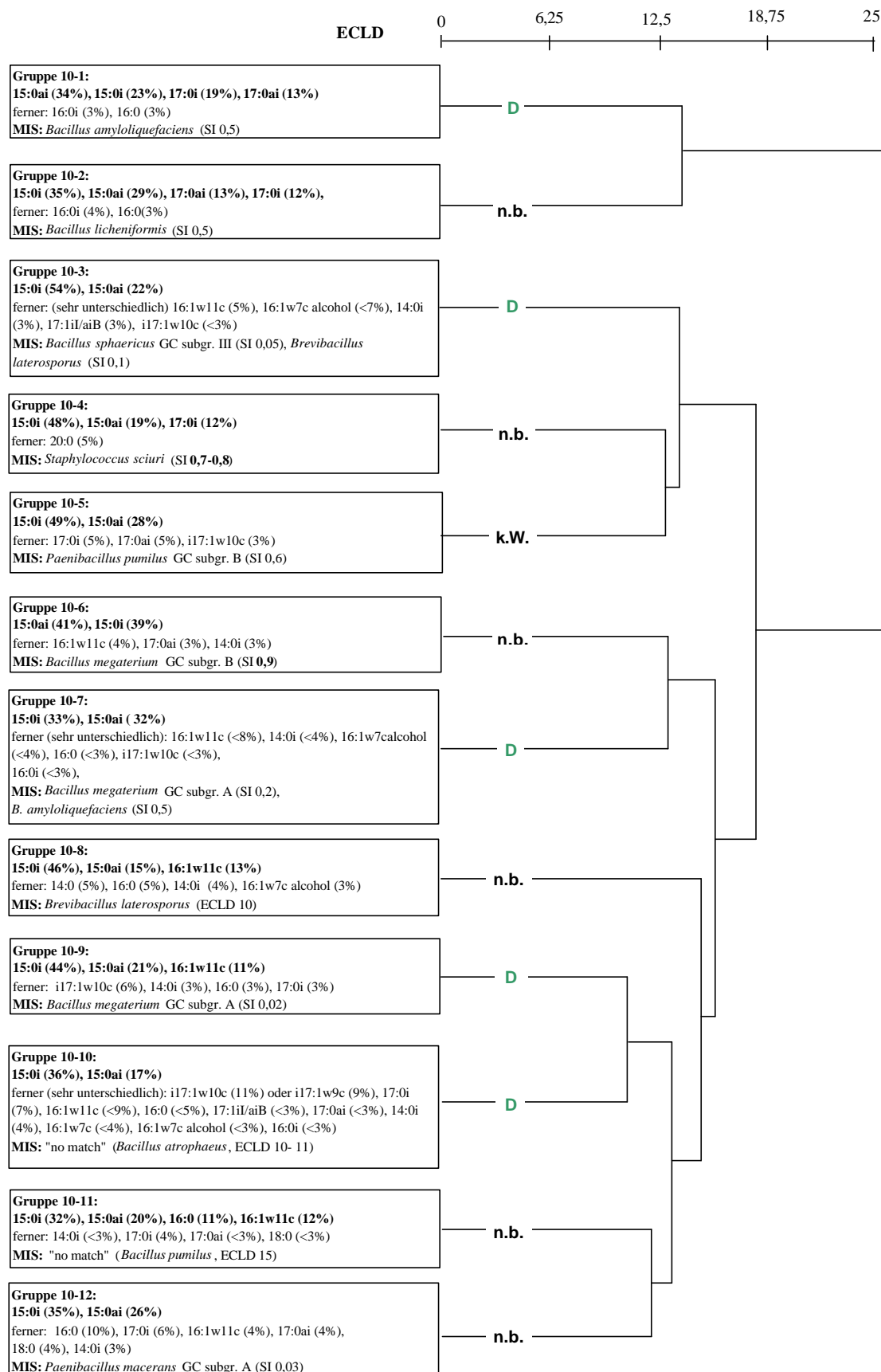


Abb. 21: Fettsäuremuster der Gruppe 10 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10). Aufgeführt sind alle Hauptfettsäuren (Fettdruck), Nebenfettsäuren (Normaldruck) und Biomarkerfettsäuren (rot). Die genannten Gattungen beziehen sich auf den „closest match“ aus der Datenbank des MIS. Denitrifikationstest nach Alef, 1990: **D**=Denitrifikant, **NR**=Nitratreduzierer, **n.b.**=nicht bestimmt, siehe 3.4.1

Die folgenden Bakterienhauptgruppen 11-19 umfassen jeweils nur wenige Isolate, so daß eine weitere Unterteilung in Untergruppen nicht erfolgt. Auch im Dendrogramm der Bakterienhauptgruppen (Abb. 11a) bleiben sie unberücksichtigt.

Gruppe 11 (Gram⁺, Actinomycetales II):

Die Isolate dieser Gruppe wurden als *Corynebacterium* (SI 0,8; „excellent match“), *Aureobacterium*, *Rathayibacter* und *Micrococcus* (SI 0,4-0,6; „acceptable match“ – „good match“) identifiziert.

Diese Gruppe umfaßte Gram⁺, mit den Aktinomyceten verwandte Bakterien mit hohem GC-Gehalt, die mehrheitlich den coryneformen Bakterien zugerechnet wurden. Als Hauptfettsäuren wurden C15:0anteiso (38-47%) und 17:0anteiso (16-31%) detektiert. Desweiteren trat die Fettsäure C16:0iso in höheren Anteilen auf (2-19%). Eine ausschließlich für diese Bakteriengruppe signifikante Fettsäure konnte nicht detektiert werden.

Gruppe 12 (Gram⁺, Actinomycetales IV):

Dies war eine weitere Gruppe Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Das ähnlichste Fettsäuremuster aus der Datenbank des MIS zu Isolaten dieser Gruppe war jenes der Gattung *Micromonospora* (13 ECLD, „no match“). Mit einer Entfernung von 13 euklidischen Distanzen zum Fettsäuremuster dieser Gattung gelten die Isolate dieser Gruppe als nicht identifiziert. Weitere Isolate dieser Gruppe hatten keinen ihrem Fettsäuremuster entsprechenden Eintrag in der Datenbank des MIS („no match“). Bakterien dieser Hauptgruppe waren gekennzeichnet durch die Hauptfettsäuren C17:1 ω 8c (10-23%), C18:1 ω 9c (10-13%), C16:0iso (13-33%), C17:0iso (10%) und C16:0 (10%). Die Anteile der Nebenfettsäuren C17:0, C16:1 ω 7c und C17:0anteiso lagen jeweils zwischen 6 und 9%.

Gruppe 13 (α -Proteobacteria 1):

Diese Gruppe umfaßte Bakterien der α -Proteobacteria. Die Isolate dieser Gruppe wurden als *Pseudomonas diminuta* (SI 0,5; „acceptable match“) identifiziert.

Als Hauptfettsäuren wurden C18:1 ω 7c,9t,12t (51%) und C16:0 (30%) ermittelt. Als weitere wichtige Fettsäuren galten C19:0cyclo ω 8c (4%), 15:0 (3%) und 12:0 3OH (3%). Das

Fettsäuremuster der Gruppe 13 war erwartungsgemäß ähnlich zu dem der Gruppe 1, welche ebenfalls α -Proteobacteria beinhaltet. Die Anteile der verschiedenen Fettsäuren waren jedoch anders gewichtet. Die Biomarkerfettsäure C19:0cyclo ω 8c fand sich auch in Gruppe 13 wieder, allerdings in geringeren Anteilen als bei Isolaten der Gruppe 1.

Gruppe 14 (Gram⁺, Actinomycetales VI):

Es handelte sich nach der Koloniemorphologie dieser Isolate eindeutig um luftmycelbildende Bakterien, und damit um Aktinomyceten. Eine Identifizierung mit dem MIS war nicht erfolgreich (14-18 ECLD; „no match“). Das ähnlichste Fettsäuremuster war jenes der Gattung *Micrococcus*.

Diese Gruppe beinhaltet weitere Isolate mit hohem GC-Gehalt. Als Hauptfettsäuren wurden C16:0 (21%), C16:1 ω 7c (16%) und C16:0iso (15%) ermittelt. Wichtige Nebenfettsäuren waren C17:0anteiso (11%), C15:0anteiso (8%), anteiso C17:1 ω 9c (6%) und isoC17:1 ω 9c (5%).

Gruppe 15 (Gram⁺, Actinomycetales VII):

Auch diese Gruppe gehörte eindeutig zu den Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Das Fettsäuremuster dieser Isolate hatte Ähnlichkeit mit Aktinomyceten der Gattung *Arcanobacterium*, konnte jedoch nicht näher identifiziert werden (20 ECLD; „no match“).

Isolate dieser Gruppe fielen durch die Dominanz der Fettsäure anteisoC18:0/18:2 ω 6,9c („summed feature“, 47%) und C18:1 ω 9c (40%) auf. Die Fettsäure C16:0 hatte einen Anteil von 8%.

Gruppe 16 (Gram⁻, diverse Cocci):

Nach der Gramfärbung und mikroskopischen Untersuchung, handelte es sich bei diesen Isolaten um Gram⁻ Cocci. Eine Zuordnung der Fettsäuremuster dieser Isolate mit dem MIS war nicht erfolgreich („no match“).

Als Hauptfettsäuren galten C16:1 ω 7c (28%), C15:0iso (15%) und C15:0iso2OH/16:1 ω 7t („summed feature“, 15%). Als Nebenfettsäuren wurden C16:0 (11%), C16:1 ω 5c (11%), C17:0iso3OH (6%) sowie C15:0iso3OH und C16:0 3OH mit jeweils 3% nachgewiesen.

Gruppe 17 (Gram⁺, *Staphylococcus* sp.):

In diese Gruppe fielen Isolate mit niedrigem GC-Gehalt, welche eindeutig der Gattung *Staphylococcus* zuzuordnen waren (SI 0,1-0,6; „no match“ – „good match“). Ihre Hauptfettsäuren waren C15:0anteiso (29%), C18:0 (14%) und C15:0iso (12%). Weitere wichtige Fettsäuren waren C17:0iso (8%), C16:0anteiso (6%), C19:0iso (5%) und C16:0 (4%). In Anteilen von bis zu 12% konnte in dieser Gruppe die Biomarkerfettsäure C20:0 (12%) detektiert werden.

Gruppe 18 (b-Proteobacteria 1):

Ein Vergleich der Fettsäuremuster dieser Gruppen mit Einträgen aus der Datenbank des MIS führte zur Identifizierung der Gattung *Burkholderia* (SI 0,2-0,6; „no match“ – „acceptable match“).

Bei dieser Hauptgruppe handelte es sich um β -Proteobacteria mit den Hauptfettsäuren C18:1 ω 7c,9t,12t (39%), C16:0 (19%), C16:1 ω 7c (14%) und C17:0cyclo (11%). Ebenfalls einen höheren Anteil besaßen die Fettsäuren C14:0 3OH/16:1isoI („summed feature“, 5%), C14:0 (4%), C16:0 3OH (4%) und C19:0cyclo ω 8c (3%).

Gruppe 19 (g-Proteobacteria):

Isolate dieser Gruppe wurden als *Acinetobacter* identifiziert (SI 0,4-0,6; „acceptable match“ – „good match“).

In diese Gruppe fielen ausschließlich Bakterien, die in Flüssigkulturen angereichert wurden. Als Hauptfettsäuren dieser Gruppe konnten C18:1 ω 9c (28-31%), C16:1 ω 7c (25-30%), sowie C12:0 3OH ermittelt werden. In geringeren Anteilen von 4-5% wurde auch die Fettsäure C18:1 ω 7c,9t,12t nachgewiesen. Ein Teil der Isolate wies außerdem die Biomarkerfettsäure C14:1 ω 5c,t in Anteilen von ca. 5% auf.

Die Einteilung der isolierten Bakterien in bestimmte Gruppen nach erfolgter Dendrogrammanalyse und der Vergleich ihrer Fettsäuremuster diente dem Ziel, dominante Bakteriengruppen in der Gesamtfettsäureanalyse von Standortmaterial wiederfinden zu können. Für die Gesamtheit der isolierten α -, β - und γ -Proteobacteria konnte im Vergleich zu den verschiedenen Gram⁺ Bakteriengruppen und der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* ein

Komplex von signifikanten Fettsäuren ermittelt werden, welche den anderen Gruppen fehlten. Hierbei handelte es sich um die Fettsäuren C18:1 ω 7c,9t,12t, C19:0cyclo ω 8c, C17:0cyclo, C12:0 3OH, C12:0 2OH, C12:0, C10:0 3OH, C14:1 ω 5c und C16:1isoI/C14:0 iso2OH („summed feature“). Die Fettsäure C16:1 ω 7c machte oft einen beträchtlichen Anteil am Fettsäurespektrum der Proteobacteria aus, sie ist jedoch auch in größeren Anteilen in verschiedenen Gram⁺ Bakteriengruppen zu finden. In Tabelle 17 sind die für verschiedene isolierte Bakterien charakteristischen Fettsäuren aufgelistet.

Tab. 17: „Biomarkerfettsäuren“ isolierter Bakteriengruppen

Fettsäure	Gr. und UG	genetische Zuordnung	MIS (closest match), Gattung
19:0 cyclo ω 8c	1: 2-5, 18	α -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Burkholderia</i>
10:0 3OH	2: 1, 6-10	β - u. γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Achromobacter</i>
12:0	2: 1, 6, 8-10	β - u. γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i>
12:0 2OH	2: 1, 4, 6, 9, 10	β - u. γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i>
17:0 cyclo	2: 2, 3, 5-7, 10	β - u. γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Proteus</i>
16:1 isoI/ 15:0 iso 2OH	1: 2, 3 2: 2-6	α -, β - u. γ -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
18:1 ω 7c,9t,12t	1, 2, 13, 18	α -, β - u. γ -Proteobacteria	<i>Paracoccus</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Burkholderia</i>
11:0 iso	3: 1	Gram ⁺	„no match“ (<i>Bacillus</i>)
11:0 iso 3OH	3: 1, 2	Gram ⁺	„no match“ (<i>Bacillus</i>)
13:0 iso	3: 3-5	Gram ⁺	<i>Bacillus mycoides</i> u. ähnliche Bakterien
iso 17:1 ω 5c	3: 5, 7	Gram ⁺	„no match“ (<i>Bacillus</i>)
TBSA 10Me 18:0	5	Aktinomyceten	„no match“
15:0 iso 3OH	8: 4-10	<i>Cytoph./Flavobact.</i>	<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i>
15:1 ω 6c	8: 6, 8-10	<i>Cytoph./Flavobact.</i>	<i>Cytophaga</i>
16:0 3OH	8: 5, 6	<i>Cytoph./Flavobact.</i>	<i>Cytophaga</i>
17:0 iso 3OH	8: 6-10	<i>Cytoph./Flavobact.</i>	<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i>
17:1 ω 6c	8: 8-10	<i>Cytoph./Flavobact.</i>	<i>Cytophaga</i>
16:1 ω 7c alcohol	9	Gram ⁺	<i>Bacillus sphaericus</i>
16:1 ω 5c	16	Gram ⁻	„no match“, (<i>Flexibacter</i>)
20:0	17	Gram ⁺	<i>Staphylococcus</i>
14:1 ω 5c,t	19	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>

3.2.2 Diversität der Bakteriengruppen (ECLD > 25) im Jahresgang

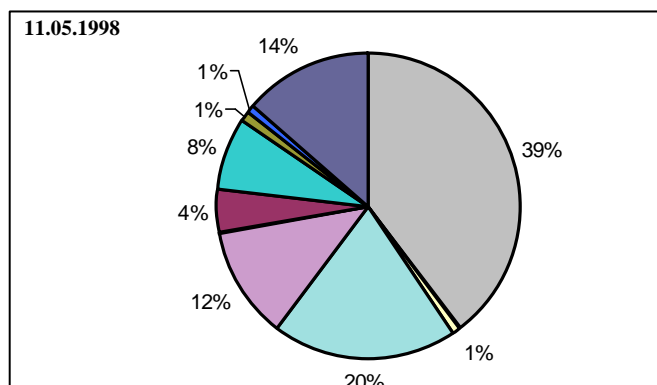
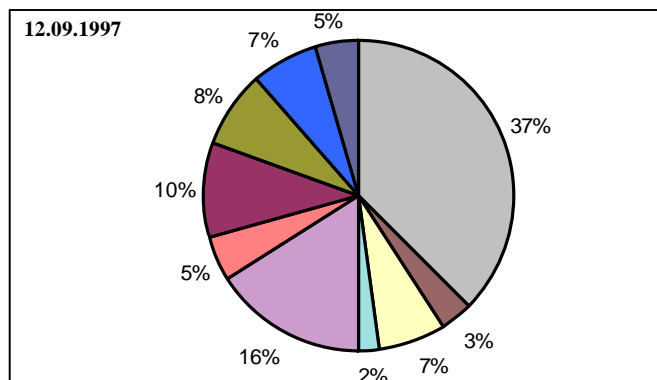
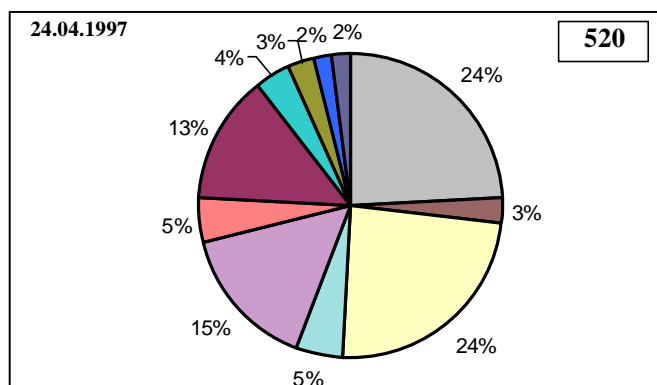
Sämtliche Isolate für die Darstellung eines Jahresganges stammten aus Bodenproben vom 24.04.1997, 12.09.1997 und vom 11.05.1998 der Parzellen 520 und 521. Die Identifizierung der Isolate erfolgte mit Hilfe der Fettsäureanalyse und der umfangreichen Datenbank des Microbial Identification System (MIS), wie bereits beschrieben. Hierbei diente zur Anzucht von Zellmaterial das TSB 30-Medium als Standardmedium. Isolate, welche eher nährstoff-

armen Bedingungen angepaßt waren, oder andere Nährstoffe und Anzuchtbedingungen benötigten, konnten daher mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Hieraus erklärt sich der relativ hohe Anteil von Bakterien, die in Abbildung 22 mit „kein Wachstum auf TSB 30“ bezeichnet wurden. Dieser Anteil machte je nach Probenahme und Parzelle zwischen 8 und 39 % aus. Insgesamt war der Anteil der Isolate, welche nicht auf TSB 30-Medium wuchsen auf Parzelle 520 höher als auf Parzelle 521. Die identifizierten Bakteriengruppen sind in Kreisdiagrammform dargestellt. Gruppen, welche weniger als 2% der Isolate ausmachten wurden in dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

Vertreter der α -Proteobacteria 2 (Hauptgruppe 1), bei denen vor allem die Gattung *Agrobacterium* zu nennen war, wurden 1997 bei beiden Probenahmen auf beiden Parzellen regelmäßig in geringen Abundanzen (3-6%) isoliert. Am 11.05.1998 wurde nur auf Parzelle 521 ein Vertreter dieser Gruppe isoliert. Isolate der Hauptgruppe 2, hier waren in erster Linie Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe zu nennen, machten bei der Probenahme am 24.04.1997 auf beiden Parzellen einen signifikanten Anteil von 19-24 % der Isolate aus. Am 12.09.1997 war der Anteil dieser Bakteriengruppe auf Parzelle 520 auf 7% zurückgegangen, während ihr Anteil auf Parzelle 521 auf 29% gestiegen war. Am 11.05.1998 war der Anteil der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe und verwandter Arten auf beiden Parzellen unbedeutend. Lediglich aus Bodenproben von Parzelle 521 wurde ein Vertreter dieser Gruppe isoliert. *Bacillus mycoides* und ähnliche Isolate (Hauptgruppe 3) dagegen, wurden bei jeder Probenahme auf beiden Parzellen regelmäßig isoliert. Ihr Anteil lag zwischen 5% und 20 %. Während Vertreter dieser Gruppe auf Parzelle 520 am 24.04.97 und 12.09.97 stets einen geringeren Anteil (2-5%) ausmachten, als auf Parzelle 521 (13-17%), war ihr Anteil am 11.05.98 mit 20% auf beiden Parzellen annähernd gleich groß. Die in sich sehr heterogene Hauptgruppe 4, zu der vor allem Vertreter der Gattung *Arthrobacter* und andere Gram⁺ Bakterien mit hohem GC-Gehalt zählten, trugen mit einem konstant hohen Anteil zur isolierten bakteriellen Diversität beider Standorte an allen Probenahmeterminen bei. Die Anteile dieser Gruppe betragen 12-16% auf Parzelle 520 und 14-19% auf Parzelle 521. Zu den Vertretern der Hauptgruppen 5 und 6 zählten Aktinomyzeten und andere Gram⁺ aktinomyzetenähnliche Mikroorganismen mit hohem GC-Gehalt. Isolate der Hauptgruppe 5 (*Nocardia* sp. u.a.) waren in geringen Anteilen 1-5% in den Bodenproben vom 24.04.97 und 12.09.97 nachweisbar, fehlten aber am 11.05.98 völlig. Isolate der Hauptgruppe 6 (*Streptomyces* sp. u.a.) waren dagegen auf beiden Parzellen 1997 und 1998 mit Anteilen von 4-13% vertreten. Die als *Bacillus megaterium* GC subgr. A und andere Vertreter der Gattung *Bacillus* identifizierten Vertreter der Hauptgruppe 7 waren 1997 auf beiden Parzellen in

geringen Abundanzen von 1-4% vorhanden. 1998 stieg ihr Anteil auf beiden Parzellen auf 8 bzw. 12% an. Die Hauptgruppe 10, welche auch Isolate der Gattung *Bacillus* umfaßte, war 1997 ebenfalls wie die Vertreter der Hauptgruppe 7 nur in geringen Anteilen von maximal 6% nachweisbar. 1998 war ihr Anteil auf beiden Parzellen auf 14% bzw. 11% gestiegen. Zusammengefaßt machten die Isolate der Gruppe 7 und 10, und damit Gram⁺ Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, vorwiegend Bacilli, regelmäßig auf beiden Parzellen einen dominanten Anteil der isolierten Bakteriengemeinschaft aus. Die Hauptgruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium*) war am 24.04.97 und 12.09.97 regelmäßig in Bodenproben beider Parzellen mit einem Anteil von 3 bzw. 10% zu finden. 1998 konnten keine Vertreter dieser Gruppe identifiziert werden. Der Anteil der Vertreter der Hauptgruppe 9, *Bacillus sphaericus* machte lediglich am 12.09.97 einen signifikanten Anteil von 5-7% an der Bakteriengemeinschaft aus. An den anderen Probenahmeterminen lag ihr Anteil nur zwischen 1 und 2%.

Die Vertreter der hier nicht aufgeführten Gruppen waren nicht zu den dominanten, isolierten Bakterien der untersuchten Parzellen zu zählen. Ihre Anteile lagen bei < 2 % und wurden nur sehr unregelmäßig bei den verschiedenen Probenahmeterminen isoliert. Aus Bodenproben der Parzelle 508 wurden keine Isolate gewonnen.



- Legende**
- kein Wachstum auf TSB 30
 - Gr. 1:** a-Proteobacteria 2
 - Gr. 2:** b- u. g-Proteobacteria
 - Gr. 3:** Gram⁺ (*B. mycooides* u.a.)
 - Gr. 4:** Gram⁺ (*Arthrobacter* u.a.)
 - Gr. 5:** Gram⁺ (*Nocardia* u.a.)
 - Gr. 6:** Gram⁺ (*Streptomyces* u.a.)
 - Gr. 7:** Gram⁺ (*B. megaterium* u.a.)
 - Gr. 8:** *Cytophaga/Flavobacterium* u.a.
 - Gr. 9:** Gram⁺ (*B. sphaericus* u.a.)
 - Gr. 10:** Gram⁺ (*B. pumilus* u.a.)

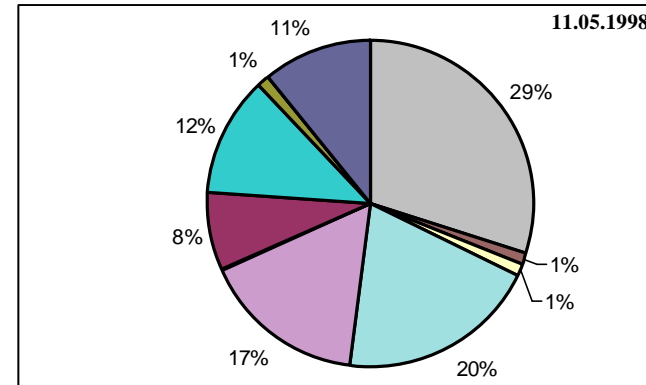
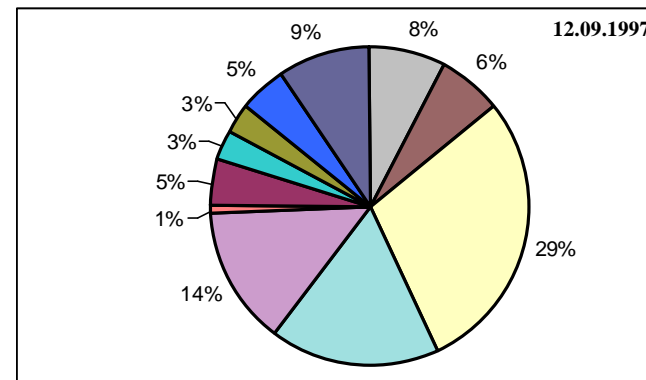
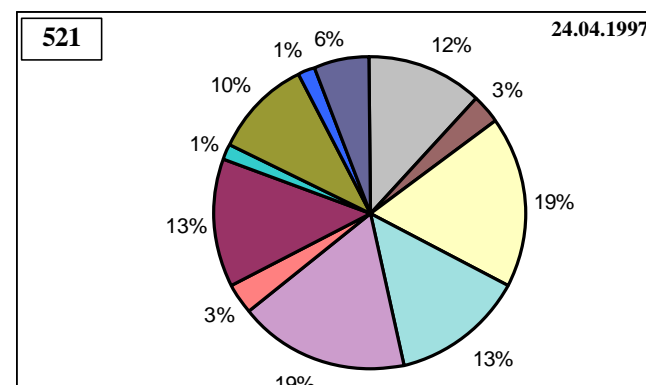


Abb. 22: Diversität isolierter Bakterien (ECLD > 25) der untersuchten Parzellen 520 und 521 im Jahresgang 1997-1998

3.2.3 Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben

Ziel dieser Untersuchungen war, Hinweise auf am Standort dominante Bakteriengruppen zu finden, Unterschiede bezüglich der verschiedenen behandelten Parzellen aufzudecken und eventuelle jahreszeitliche Dynamiken aufzuzeigen. Informationen aus der aktuellen Literatur hinsichtlich der Bedeutung verschiedener Fettsäuren für Eukaryonten und Prokaryonten sind im Anhang in Tabellenform (Tab. 12a,b,c) zusammenfassend dargestellt. Hierauf, sowie auf den Fettsäuremustern isolierter Bakteriengruppen mit ihren Haupt- Neben- und Biomarkerfettsäuren, basiert die Grundlage zur Auswertung der ermittelten Fettsäuremuster aus Bodenproben. Durch einen Vergleich dieser Fettsäuremuster mit den ermittelten charakteristischen Fettsäuremustern der verschiedenen isolierten denitrifizierenden und nitratreduzierenden Bakteriengruppen sollte der Frage einer möglichen Signifikanz dieser Bakteriengruppen für die beprobten Parzellen nachgegangen werden.

Die Gesamtfettsäureanalysen von Bodenproben der Parzellen 508, 520 und 521 ergaben zusammen insgesamt 63 verschiedene Fettsäuren, von denen 22 Fettsäuren als bedeutend für die isolierten Bakteriengruppen galten. Diese 22 Fettsäuren wurden entweder in höheren Anteilen in den Bakteriengruppen detektiert (Haupt- und Nebenfettsäuren) oder waren auf bestimmte isolierte Bakteriengruppen beschränkt („Biomarkerfettsäuren“). Weitere 13 der 63 Fettsäuren wurden in den Bodenproben in Anteilen von $> 1\%$ regelmäßig detektiert, waren aber keine charakteristischen Fettsäuren der Bakterienisolate. Die restlichen 28 Fettsäuren wurden unregelmäßig und in geringen Abundanzen ($< 1\%$) ermittelt, und werden daher in den folgenden Abbildungen (Abb. 23-28) nicht berücksichtigt („andere Fettsäuren“).

Die 63 detektierten Fettsäuren waren nicht zu jedem Probenahmezeitpunkt und nicht auf allen Parzellen vertreten. Insgesamt konnten im Probenahmeverlauf von April 1997 bis März 1999 auf den Parzellen 520 und 521 48 bzw. 55 der 63 Fettsäuren an mindestens einem Probenahmetermin ermittelt werden. Im Zeitraum von März 1998 bis März 1999 konnten in Bodenproben der Parzelle 508, 44 der 63 verschiedenen Fettsäuren mindestens einmal detektiert werden. Damit liegt bei Berücksichtigung aller detektierten Fettsäuren, die Anzahl unterschiedlicher Fettsäuren auf der ungedüngten Parzelle 521 am höchsten und die Anzahl Fettsäuren auf der mit Gülle behandelten Parzelle am niedrigsten.

Dominante Anteile am Fettsäuremuster der verschiedenen Parzellen, d.h. $> 4\%$ an mindestens einem Probenahmetermin auf mindestens einer der Parzellen besaßen die Hydroxyfettsäuren C10:0 3OH, C12:0 2OH, C12:1 3OH, die gesättigten Fettsäuren C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 und C20:0, die verzweigt-kettigen Fettsäuren C14:0iso, C15:0iso und anteiso und C16:0 10methyl,

die einfach ungesättigten Fettsäuren C16:1 ω 5c, C16:1 ω 7c, C18:1 ω 7c,9t,12t, C18:1 ω 9c, C19:0cyclo ω 8c, C20:1 ω 9c sowie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren C18:2 ω 6c und C20:4 ω 6,9,12,15c.

Die Fettsäure C12:0 ist laut Literatur (Parkes & Taylor, 1983) in beträchtlichen Anteilen bei vielen Prokaryonten zu finden. In den Isolaten war sie jedoch ausschließlich in den β - und γ -Proteobacteria der Gruppe 2 vertreten und gilt im Rahmen dieser Untersuchung als Biomarkerfettsäure für diese isolierte Bakteriengruppe. Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von β - und γ -Proteobacteria der Gruppe 2 liefert die Fettsäuren C17:0cyclo, die in geringen Anteilen unregelmäßig ermittelt wurde. Weitere Biomarkerfettsäuren für β - und γ -Proteobacteria, wie die kurzkettigen Hydroxyfettsäuren C10:0 3OH, C12:0 2OH und 12:1 3OH, wurden nur in einem Ausnahmefall nachgewiesen.

Regelmäßig detektiert wurde die für viele Aktinomyzeten (Hauptgruppe 5) charakteristische Biomarkerfettsäure 10Methyl C18:0 (1-3%) (Frostegård *et al.*, 1993; Haack *et al.*, 1994). C18:1 ω 9c, eine regelmäßig in hohen Anteilen bis 15% in Bodenproben ermittelte Fettsäure, wurde außer in Bakterien der Hauptgruppe 5 (Actinomycetales I) auch in Vertretern der Hauptgruppen 12 und 15 (Actinomycetales IV, VII) nachgewiesen und ist laut Haack *et al.* (1994) eine signifikante Fettsäure der Gattung *Corynebacterium*, die ebenfalls zu den Actinomycetales zählt. Sie ist jedoch ebenfalls Bestandteil des Fettsäuremusters von Vertretern der Gruppe 19 (γ -Proteobacteria, *Acinetobacter sp.*), fehlte aber in allen anderen isolierten Proteobacteria.

Die verzweigtkettigen Fettsäuren C15:0iso und anteiso zählten zu den Hauptbestandteilen der Fettsäuremuster und waren ständig nachweisbar (1,5-7,5%). Sie gelten als signifikante Fettsäuren Gram⁺ Bakterien und sind charakteristisch für die Bakteriengattungen *Bacillus*, *Arthrobacter* und *Desulfovibrio*, wobei einige *Arthrobacter*-Arten mehr als 60% dieser Fettsäure aufweisen (Findlay & Dobbs, 1993; Frostegård *et al.*, 1993). Bei einigen Isolaten der Gruppe 4 (Actinomycetales III) lag der Anteil der Fettsäure C15:0anteiso sogar bei >80%. C15:0iso und C15:0anteiso waren in den Umweltproben ungefähr zu gleichen Anteilen vertreten.

Die Fettsäure C14:0iso kam in verschiedenen der Gram⁺ Bakteriengruppen vor, fehlte jedoch in allen Gruppen der Proteobacteria und der Hauptgruppe 5 (Actinomycetales I), sowie in einigen der selten isolierten Bakteriengruppen. C14:0 fehlte dagegen nur bei den α -Proteobacteria der Hauptgruppen 5 und 9 (*Bacillus sphaericus*) und vielen der zahlenmäßig kleinen Bakteriengruppen.

C18:1 ω 7c,9t,12t war eine Hauptfettsäure der Proteobacteria. Bei den α -Proteobacteria lag ihr Anteil mit bis zu 84% besonders hoch.

Die Fettsäure C16:1 ω 5c, die mit wenigen Ausnahmen konstant vertreten war (3-10%), ist nach Frostegård *et al.*, 1997, eine charakteristische Fettsäure der Gattungen *Cytophaga* und *Flexibacter*, kommt jedoch auch bei einigen Mykorrhiza-Pilzen vor. In den Isolaten der Gruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium*) ließ sich C16:1 ω 5c allerdings nicht nachweisen. In der Gruppe 24 (Gram⁻ Cocci, nicht näher identifiziert) betrug ihr Anteil dagegen um 10%. Bei diesen Isolaten könnte es sich um Vertreter der Gattung *Flexibacter* handeln.

Die Fettsäure C16:0 10Methyl ist signifikant für Sulfatreduzierer, insbesondere der Gattung *Desulfobacter* (Findlay & Dobbs, 1993) und war relativ konstant in Anteilen von 1-6% in den Bodenproben vertreten.

Nach Parkes & Taylor (1983) ist C18:0, eine in bedeutenden Anteilen auf allen Parzellen nachgewiesene Fettsäure, die Hauptfettsäure der Gattung *Thiobacillus*. Diese Fettsäure besaß jedoch auch bei der Mehrzahl der isolierten Bakteriengruppen geringe Anteile zwischen 2% und 5% in diversen Untergruppen. In den Gesamtfettsäurespektren von Isolaten der Hauptgruppe 5 (Actinomycetales I) lag ihr Anteil sogar bei bis zu 14%.

Die Fettsäure C20:0 wurde ebenfalls regelmäßig mit schwankenden Anteilen ermittelt und ist nach Frostegård *et al.* (1997) bei vielen mikrobiellen Eukaryonten vertreten, tritt aber auch bei Protozoa der Gattung *Paramecium* als Hauptfettsäure auf. In Isolaten der Gattung *Staphylococcus* (Gruppe 17) war sie mit Anteilen um 12% ebenfalls vertreten.

Die besonderes für die isolierten Vertreter der α -Proteobacteria charakteristische Fettsäure C19:0cyclo ω 8c war ebenfalls eine bedeutende Fettsäure in den Profilen aller Parzellen. Laut Literatur (Findlay & Dobbs, 1993; Rajendran, 1994) ist sie jedoch auch bei einigen Sulfatreduzierern, Enterobakterien, einigen Pseudomonaden, und den Gattungen *Lactobacillus* und *Clostridium* zu finden. Für Isolate der Enterobakterien und Pseudomonaden konnte diese Fettsäure aber nicht nachgewiesen werden. Generell gilt C19:0cyclo ω 8c als Fettsäure Gram⁻ Bakterien und tritt bei einigen Gattungen besonders in der stationären Phase auf (Rajendran, 1994).

Die Fettsäuren C16:0 und C16:1 ω 7c sind sowohl für Mikroeukaryonten, als auch für viele Gram⁺ und Gram⁻ Prokaryonten charakteristisch. C16:0 war je nach Probenahmedatum die

häufigste Fettsäure (bis 27%). C16:1 ω 7c wurde in schwankenden Anteilen von bis zu 23% detektiert.

Nach Findlay & Dobbs (1993) ist die Fettsäure C18:2 ω 6c eukaryontischen Ursprungs. Sie ist eine Biomarkerfettsäure für viele Bodenpilze. C18:0anteiso wurde in keinem der Isolate gefunden. Eine klare Trennung der Fettsäuren C18:2 ω 6c und C18:0anteiso konnte jedoch mit Hilfe der gaschromatographischen Analyse und nachfolgender Identifizierung mit dem MIS nicht erreicht werden. Interessant war, daß die mehrfach ungesättigte Fettsäure C18:3 ω 6c, als auch C18:2 ω 6c/C18:0anteiso, die für mikrobielle Eukaryonten, insbesondere ebenfalls Pilze, signifikant ist, auch Anteile von 7% bzw. 9% in Isolaten der Untergruppe 7-2 (Gram⁺, „no match“, der Gattung *Bacillus* nahestehend) besaßen. In der Hauptgruppe 15 (Actinomycetales VII, *Arcanobacterium*) betrug der Anteil dieser mehrfach ungesättigten Fettsäure sogar 47 %. Die Fettsäure C18:2 ω 6c ist damit sowohl eine signifikante Fettsäure vieler Bodenpilze, als auch für Aktinomyceten der Gattung *Arcanobacterium* und ähnlicher Bakterien charakteristisch. Die in Ausnahmefällen dominante Fettsäure C20:4 ω 6,9,12,15c ist nach Findlay & Dobbs (1993) ebenfalls pilzlichen Ursprungs.

Im Folgenden werden die Fettsäureprofile aus Bodenproben der untersuchten Parzellen nacheinander beschrieben, graphisch dargestellt und erläutert. Berücksichtigt wurden hierbei Fettsäuren, die in Anteilen von >1% nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der Komplexität der Ergebnisse erfolgte pro untersuchter Ackerparzelle auch eine statistische Clusteranalyse („unweighted pair group matching analysis“, UPGMA), ausgedrückt in euklidischen Distanzen mit der Software STATISTICA, Version 5, in Form eines Dendrogramms. Hierbei clustern die ähnlichsten Fettsäuremuster miteinander, so daß jahreszeitlich bedingte Fettsäuremusteränderungen oder eine Konstanz der Fettsäureprofile über einen längeren Zeitraum übersichtlich dargestellt werden können.

Für Parzelle 508 zeigte sich im Jahresgang folgendes Bild:

Von den im Probenahmeverlauf in Bodenproben dieser Parzelle insgesamt detektierten 44 Fettsäuren, waren 27 mit einem Anteil von >1% an mindestens einem Probenahmetermin vertreten. Acht dieser Fettsäuren konnten an jedem Probenahmetermin mit >1% nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die Fettsäuren C15:0 iso und anteiso, C16:0, C16:1 ω 7c,

C18:1 ω 9c, C18:1 ω 7c,9c,12t, C18:0, C18:2 ω 6c/C18:0 anteiso und C20:0, die gleichzeitig auch zu den dominanten Fettsäuren dieser Parzelle zählten. Weitere sechs Fettsäuren wurden an acht der insgesamt neun Probenahmeterminen mit Anteilen von >1% detektiert und zählten damit ebenfalls zu den wichtigen Fettsäuren. Hierzu gehörten die Fettsäuren C16:0iso, 10MethylC18:0, C19:0cyclo ω 8c, C14:0, C16:1 ω 5c und C16:0 10Methyl. 13 weitere Fettsäuren waren in geringeren Anteilen unregelmäßig nachweisbar, und wiesen nur in Ausnahmefällen an einigen Probenahmeterminen erhöhte Anteile auf. Hierzu zählte insbesondere die Fettsäure C12:0, deren Anteile an zwei Probenahmeterminen über 4% lagen. Die übrigen 17 Fettsäuren waren <1% vertreten und wurden in den graphischen Darstellungen als „andere Fettsäuren“ zusammengefaßt betrachtet. Insgesamt ließen sich 18 Fettsäuren aus den Bodenproben (>1%) auch in den isolierten Bakterien wiederfinden. 9 Fettsäuren wurden dagegen nur in den Bodenproben nachgewiesen (>1%). Je nach Probenahmedatum konnten zwischen 13 und 27 verschiedene Fettsäuren ermittelt werden, deren Anteile >1% betragen.

Die Anteile dieser Fettsäuren sind in Abbildung 24 im Jahresgang dargestellt, sowie in Abbildung 23 in einer Clusteranalyse als Dendrogramm statistisch ausgewertet.

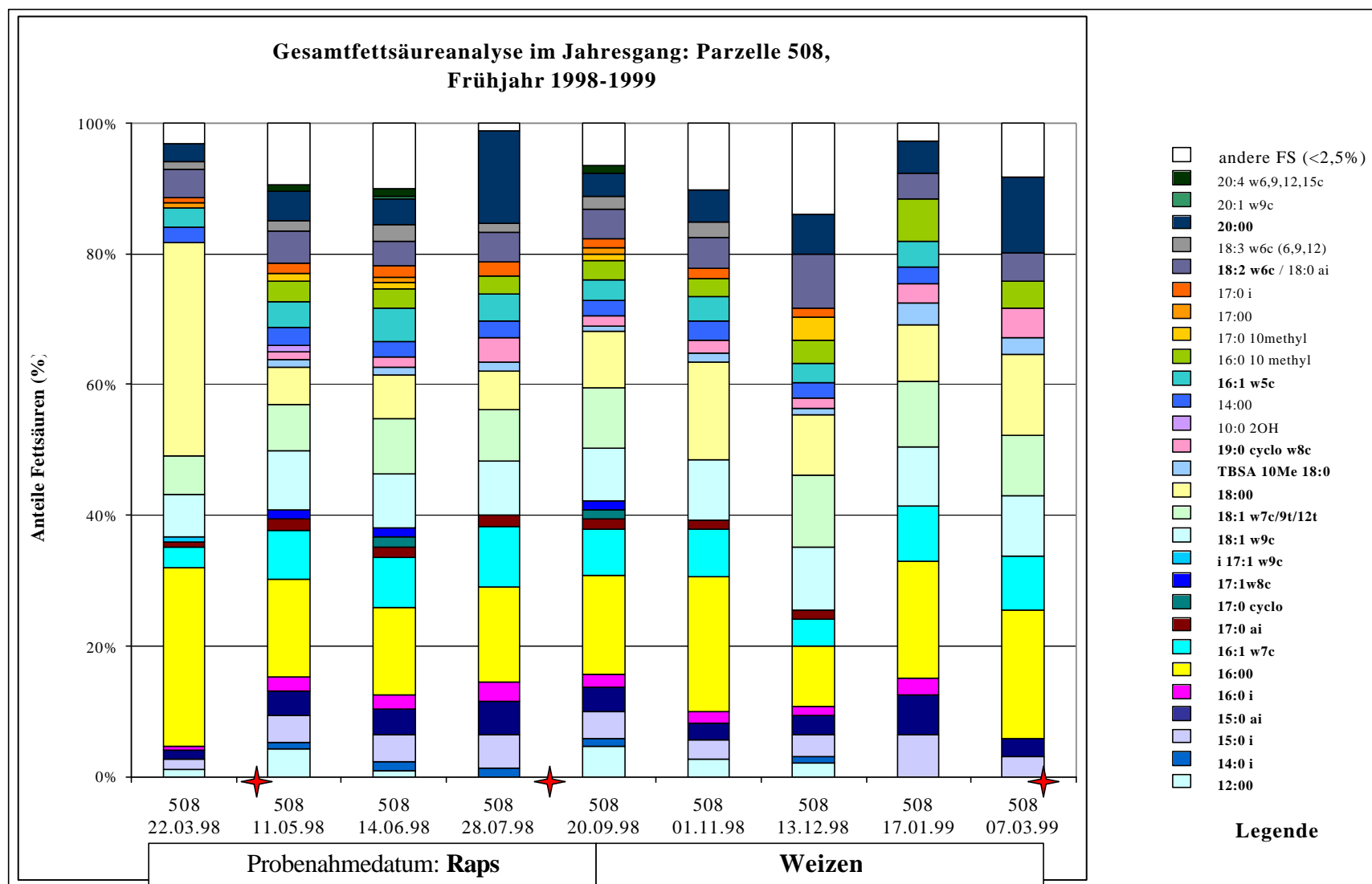


Abb. 24: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 508 im Jahrgang. Legende: **fettgedruckte** Fettsäuren konnten in Isolaten und in Bodenproben nachgewiesen werden, normalgedruckte Fettsäuren wurden nur in Bodenproben detektiert. ★ Düngung mit Gülle (25.03.98, 09.09.98, 16.04.99)

Mit Hilfe der in Tabelle 18 aufgeführten Biomarkerfettsäuren und der Haupt- und Nebenfettsäuren verschiedener Bakteriengruppen, sowie Informationen aus der Literatur (s. Anhang) können im Folgenden Aussagen über die mögliche Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in Bodenproben der Parzelle 508 im Jahresgang getroffen werden. Dominante Anteile am Fettsäuremuster, d.h. > 4% an mindestens einem Probenahmetermin, besaßen die Fettsäuren C12:0, C15:0iso, C15:0anteiso, C16:0, C16:1 ω 5c, C16:1 ω 7c, C16:0 10Methyl, C18:1 ω 9c, C18:1 ω 7c,9t,12t, C18:0, C18:2 ω 6c/18:0anteiso, 19:0cyclo ω 8c und C20:0.

Bei einem Vergleich der Fettsäurespektren der einzelnen Probenahmetermine im Jahresgang vom März 1998 bis März 1999 ergaben sich einige deutliche Veränderungen. Besonders auffällig war das Fettsäuremuster der Probenahme im März 1998. An diesem Probenahmetermin fehlten die ansonsten konstant nachweisbaren Fettsäuren 10Methyl C18:0, C16:0 10Methyl, sowie C19:0cyclo ω 8c, d.h. Biomarkerfettsäuren für Aktinomyceten, Sulfat-reduzierer (*Desulfobacter sp.*) und α -Proteobacteria. Zugleich wurde an diesem Termin eine deutliche Dominanz der Fettsäure C18:0 (>30%) detektiert. Unter den isolierten Bakterien fand sich C18:0 als Nebenfettsäure bei Aktinomyceten der Hauptgruppen 5, 11 und 12. Sie war dagegen in den anderen Gram⁺ Bakterienhauptgruppen nur in einigen Untergruppen zu finden (4-17, 6-1, 6-4, 6-10, 6-15, 7-2, 7-3, 7-4, 8-2), und kam bei Proteobacteria nicht vor. Der hohe Anteil von C18:0 im März 1998 ist damit wahrscheinlich auf nicht isolierte Gram⁺ Bakterien zurückzuführen, wie z.B. Thiobacilli.

Im weiteren Verlauf des Jahres 1998 unterblieben weitere gravierende Schwankungen im Fettsäureprofil der Bodenproben.

Die Probenahme im März 1999 zeigte ebenso wie die bereits beschriebene Probenahme im März 1998 Besonderheiten, jedoch anderer Art, auf. Es fehlten die ansonsten stets vorhandenen Fettsäuren C14:0, C16:0iso und C16:1 ω 5c. Die Fettsäuren C14:0 und C16:0iso sind in vielen Gram⁺ Bakterien vertreten. Das Fehlen dieser Fettsäuren an diesem Probenahmetermin deutet auf Schwankungen innerhalb der Gram⁺ Bakteriengemeinschaft am Standort hin. Gleiches gilt für die Fettsäuren C17:0iso und anteiso, die ab Januar 1999 nicht mehr nachweisbar waren.

Die Fettsäure C16:1 ω 5c war 1998 mit einem Anteil von 3-5% konstant am Standort vertreten. Diese auf Vertreter der Gattungen *Cytophaga* und *Flexibacter* hindeutende Fettsäure wurde in Gram⁻, nicht identifizierten Vertretern der Hauptgruppe 16 ermittelt.

Das Verschwinden der Fettsäure C16:1 ω 5c im März 1999 zeigt möglicherweise einen deutlichen Rückgang dieser Bakteriengruppe an.

Eine weitere wichtige konstant präsente Bakteriengruppe waren die Vertreter der Aktinomyzeten. Hierauf deuten die Fettsäuren C18:0 10methyl (1-3%), C18:1 ω 9c (6,5-10%) und 17:1 ω 8c (gelegentlich nachweisbar um 1%) hin.

Einen hohen Anteil an der Bakteriengemeinschaft machten vermutlich ebenfalls Gram⁺ Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Arthrobacter* und ähnliche Bakterien aus. Der hohe und gleichmäßig ermittelte Anteil der verzweigt-kettigen Fettsäuren C15:0iso (1,5-5%) und anteiso (1,5-6%) deuten darauf hin.

Die im Jahresverlauf relativ hohen Anteile der Fettsäure C18:1 ω 7c,9t,12t (6-11%) und die gleichzeitige Präsenz der Biomarkerfettsäure 19:0cyclo ω 8c (1-4,5%) deutet auf ein konstantes Vorkommen von α -Proteobacteria am Standort hin. C18:1 ω 7c,9t,12t, ist ebenfalls eine Hauptfettsäure der β - und γ -Proteobacteria. Da jedoch in den Fettsäureprofilen der Bodenproben keine Hydroxyfettsäuren (C10:0 3OH, C12:0 2OH, C14:0iso2OH) ermittelt werden konnten, sind vermutlich andere als die isolierten Vertreter dieser Bakteriengruppen Teil der Bakteriengemeinschaft dieser Parzelle. Auch die Fettsäure C12:0 (1-4,5%) weist auf β - und γ -Proteobacteria in den Bodenproben im Jahr 1998 hin.

Die stetig ermittelten Anteile der Fettsäure C18:2 ω 6c deuten auf mycelbildende Organismen, wie Bodenpilze und Vertreter der Hauptgruppe 15 (Actinomycetales VII, *Arcanobacterium* sp. u.a.) hin.

Auch Sulfatreduzierer der Gattung *Desulfobacter* u.a. waren in den Bodenproben der Parzelle 508 konstant vertreten, worauf die Biomarkerfettsäure C16:0 10methyl (3-6%) hinweist.

Stärkere Schwankungen im Jahresgang traten bei der Fettsäure C20:0 (2,5-14%) auf. Als Fettsäure vieler Eukaryonten (u.a. Protozoa), aber auch der Bakteriengattung *Staphylococcus*, weist sie auf mögliche Unterschiede in den Abundanzen dieser Organismen im Jahresverlauf hin. Das gleichzeitige Vorkommen mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Eukaryonten und in einigen Gram⁺ Bakteriengruppen (z.B. Bacilli) verhindert konkrete Aussagen über die Bedeutung dieser Fettsäuren für die beprobte Parzelle.

Insgesamt traten im Jahresverlauf zahlreiche kleinere Veränderungen in den Abundanzen der verschiedenen konstant vertretenen Fettsäuren im Vergleich zueinander auf. Dies weist auf Schwankungen der Bakterienhauptgruppen innerhalb der Gesamtbakteriengemeinschaft hin, die allein anhand von Fettsäuremustern nicht näher präzisiert werden können.

In Abbildung 24 ist die Clusteranalyse (UPGMA) der Gesamtfettsäurespektren in Dendrogrammform dargestellt. Am ähnlichsten sind die Fettsäuremuster der Probenahmen vom 11.05., 14.06. und 20.09.1998 zusammengesetzt. Sie clustern zusammen bei einer euklidischen Distanz von 6. Die Gesamtfettsäurespektren aus den Bodenproben der anderen Probenahmetermine variieren dagegen stärker und bilden ein Cluster bei einer euklidischen Distanz von 16. Die starke Abweichung der Probe vom 22.03.1998 ist auf die Dominanz der Fettsäure C18:0 zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen, sowie auf das Fehlen der ansonsten stets nachweisbaren Fettsäuren C16:0 10Methyl, C19:0cyclo ω 8c und 10Methyl C18:0.

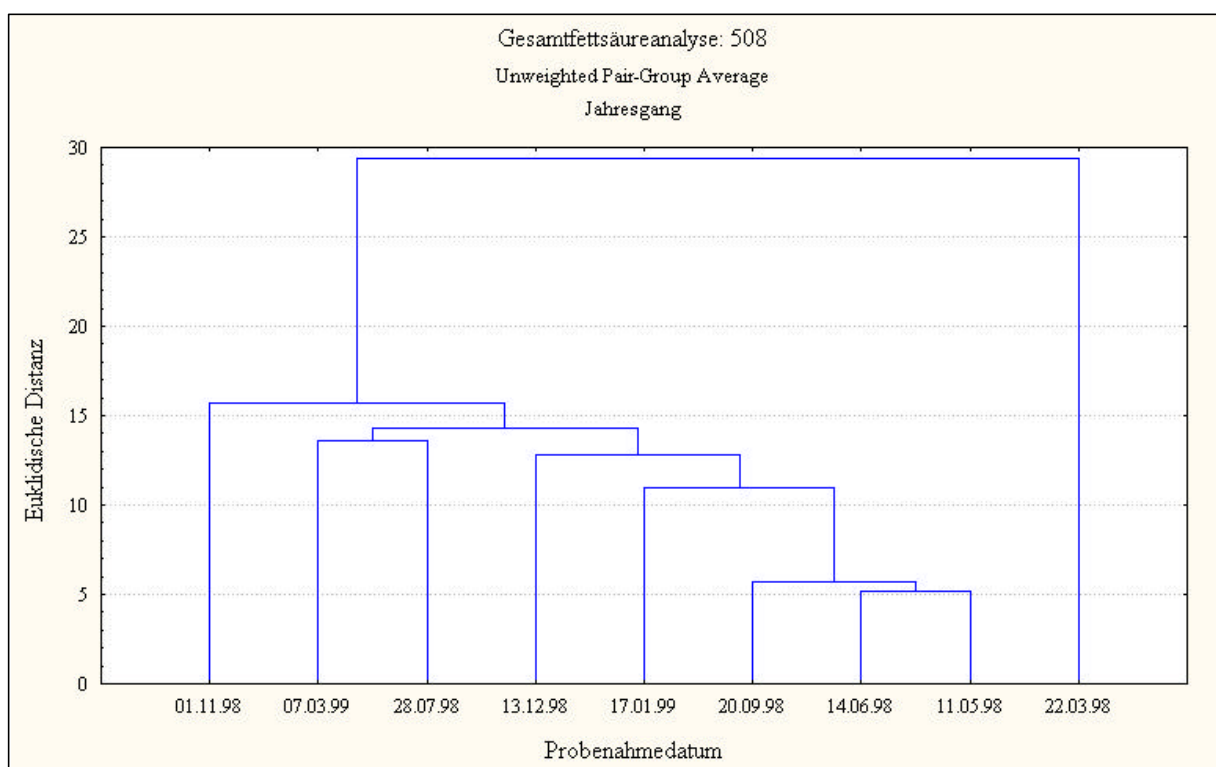


Abb. 23: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 508, (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5)

Nach den Ergebnissen der Fettsäureanalysen aus Bodenproben war die Bakteriengemeinschaft der Parzelle 508 im Jahresverlauf 1998 relativ konstant und zeigte nur kleinere Schwankungen innerhalb der isolierten Bakterienhauptgruppen auf. Eine ausgeprägte Dominanz eukaryontischer Organismen zu bestimmten Probenahmeterminen trat nicht auf. Insbesondere Bakterien der Gattungen *Bacillus sp.* und *Arthrobacter sp.*, sowie Vertreter der Aktinomyzeten und ähnliche Bakterien dominierten die Gram⁺ Bakteriengemeinschaft. Sie machten wahrscheinlich den Hauptteil der nitratreduzierenden Bakteriengemeinschaft am Standort aus. In den Bodenproben konnten ebenfalls konstant Vertreter der α -, β - und γ -

Proteobacteria anhand ihrer Haupt- und Biomarkerfettsäuren sicher nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Gruppen scheint es jedoch größere Schwankungen im Jahresverlauf zu geben. Auch deutet das Fehlen von bestimmten für Isolate dieser Gruppe signifikanten Fettsäuren (z.B. Hydroxyfettsäuren der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe) in den Bodenproben auf eine andere als die isolierte Diversität der α -, β - und γ -Proteobacteria hin. Innerhalb dieser Bakteriengruppe ist mit Sicherheit der Hauptteil der Denitrifikanten zu finden. Einen dominanten Anteil an der Bakteriengemeinschaft machten vermutlich ebenfalls Vertreter der Gattung *Flexibacter* aus, worauf die Fettsäure 16:1 ω 5c hinweist. Einige Vertreter dieser Gattung sind als Denitrifikanten bekannt (Zumft, 1997). Größere Schwankungen innerhalb der identifizierten Bakteriengruppen konnten für die Parzelle 508 in den Wintermonaten März 1998 und Januar/März 1999 beobachtet werden. Im Frühjahr und Sommer handelte es sich dann um eine relativ stabile Bakteriengemeinschaft. Deutliche Auswirkungen von Witterungsbedingungen oder ackerbauliche Maßnahmen, wie Düngung und Wechsel der Feldfrucht auf die langfristige Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft konnten nicht festgestellt werden. Im Vergleich zu den anderen beprobten Parzellen 520 und 521, wurden in Bodenproben der Parzelle 508 deutlich weniger Fettsäuren (>1%) detektiert (d.h. 20% weniger als in Parzelle 521 und 13% weniger als in Parzelle 520), was auf eine geringere Diversität der Bakteriengemeinschaft auf einer regelmäßig mit Gülle behandelten Ackerparzelle hindeuten kann.

Für Parzelle 520 zeigte sich im Jahresgang folgendes Bild:

Insgesamt konnten im Probenahmeverlauf von April 1997 bis März 1999 48 verschiedene Fettsäuren in den Bodenproben dieser Parzelle ermittelt werden, von denen 28 einen Anteil von mehr als 1% am Gesamtfettsäurespektrum aufwiesen. Zusätzlich zu den in Bodenproben der Parzelle 508 ermittelten Fettsäuren konnten für Parzelle 520 zehn weitere Fettsäuren unregelmäßig ermittelt werden, deren Anteile aber nur in einem Ausnahmefall >1% betrug (C16:1 ω 7c alcohol, 23.11.1997).

19 der 48 Fettsäuren wurden auch in den verschiedenen Bakterienisolaten detektiert. 9 weitere Fettsäuren konnten nur in den Bodenproben nachgewiesen werden. Der Anteil der übrigen 20 Fettsäuren lag unter 1%. An den verschiedenen Probenahmeterminen konnten zwischen 7 und 28 verschiedene Fettsäuren (>1%) ermittelt werden. Zu den regelmäßig detektierten Fettsäuren an mindestens 11 der 13 Probenahmetermine zählten die Fettsäuren C15:0iso und anteiso, C16:0, C16:1 ω 7c, C18:1 ω 9c, C18:1 ω 7c,9t,12t, C18:0, C16:1 ω 5c, C16:0 10Methyl, C18:2 ω 6c/C18:0anteiso und C20:0. Die genannten Fettsäuren gehören auch zu den dominanten Fettsäuren mit Anteilen von >4% an mindestens einem Probenahmetermin. Weitere wichtige, aber stärker variierende Fettsäuren mit höheren Anteilen waren in den Bodenproben dieser Parzelle die Fettsäuren C14:0iso, C12:0, C19:0cyclo ω 8c und C18:3 ω 6c. Die Fettsäure C19:0cyclo ω 8c (Biomarkerfettsäure für die Gruppen 1 und 18, α -Proteobacteria) erreichte an keinem Probenahmetermin 4%. Sie fehlte an einigen Probenahmeterminen völlig und betrug ansonsten zwischen 0,5 und 3,5%. Für Parzelle 520 ist in Abbildung 25 ein Jahresgang der Fettsäuremuster graphisch dargestellt und in Abbildung 26 in Form eines Dendrogramms statistisch ausgewertet.

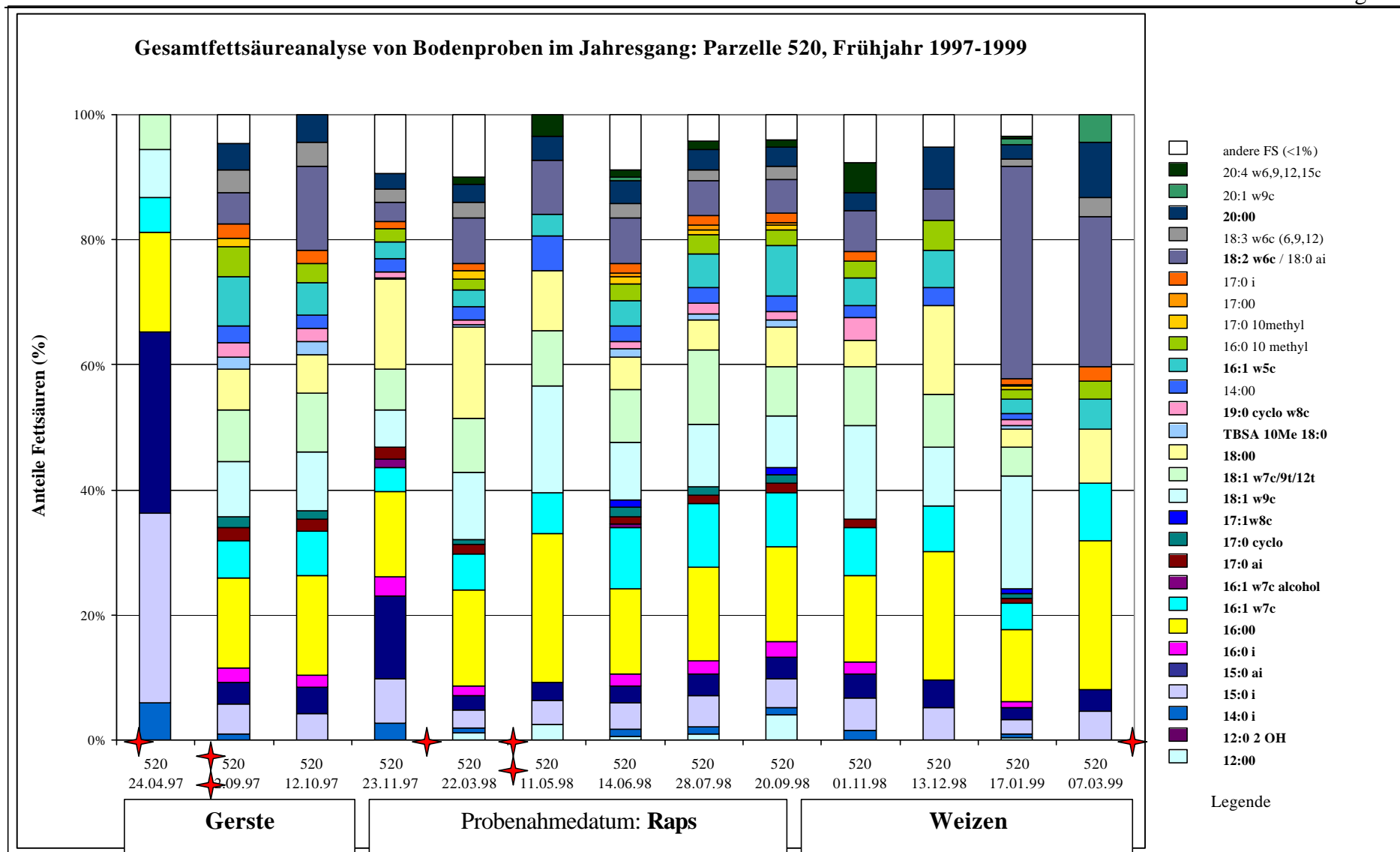


Abb. 25: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 520 im Jahresgang. Legende: **fettgedruckte** Fettsäuren konnten in Isolaten und in Bodenproben nachgewiesen werden, normalgedruckte Fettsäuren wurden nur in Bodenproben detektiert. ★ Düngung mit Ammonium-Nitrat: (07.03.97, 25.04.97, 23.05.97, 26.02.98, 26.03.98, 15.04.98, 10.03.99)

Unter Zuhilfenahme der den verschiedenen isolierten Bakteriengruppen zugeordneten Haupt-, Neben- und Biomarkerfettsäuren, sowie den Informationen aus der Literatur können für die Parzelle 520 folgende Aussagen zur möglichen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Jahresgang getroffen werden.

Mit Ausnahme der Probenahme im April 1997 fanden sich in den Bodenproben der Parzelle 520 ähnliche Fettsäuremuster wie in Proben der Parzelle 508. An diesem Termin lag der Anteil der verzweigt-kettigen Fettsäuren C14:0iso, C15:0iso und anteiso im Vergleich zu den übrigen Probenahmeterminen außergewöhnlich hoch (6%, 30% bzw. 29%). Der Anteil der Fettsäure C14:0iso ist sowohl für Gram⁺, als auch für Gram⁻ Prokaryonten der gewonnenen Isolate eine teilweise wichtige Nebenfettsäure, aber für keine Bakteriengruppe signifikant. Der Anteil von C14:0iso betrug im April 1997 6% am Gesamtfettsäurespektrum und sank im weiteren Verlauf des Jahres 1997 und auch 1998 auf 1% bis knapp 3% ab. Der ebenfalls an diesem Probenahmetermin sehr hohe Anteil der Fettsäuren C15:0iso und anteiso ist mit Sicherheit auf die Präsenz von Gram⁺ Bakterien zurückzuführen, d.h. Gram⁺ Bakterien, wie die Gattungen *Bacillus* und *Arthrobacter*, sowie anaerobe Gram⁻ Bakterien, wie z.B. der Gattung *Desulfovibrio*. Der gleichzeitige Nachweis der Fettsäuren C18:1 ω 9c (7,5%) an diesem Probenahmetermin weist auf Gram⁺ Bakterien der Hauptgruppen 6-10, 11, 12, 15 (Aktinomyceten), sowie auf die Gruppe 8-2 (*Cytophaga/Flavobacterium*) als möglichen gemeinsamen Ursprung dieser Fettsäuren hin. Das gleichzeitige Vorkommen von C18:1 ω 7c,9t,12t (5,5%) im April 1997, zeugt jedoch von ebenfalls vorhandenen Proteobacteria. Durch das Fehlen von C19:0cyclo ω 8c wird die Präsenz von Vertretern isolierter α -Proteobacteria zu diesem Termin ausgeschlossen. Ebenso weist das gleichzeitige Fehlen von Hydroxyfettsäuren, wie C10:0 3OH und C12:0 2OH und das Fehlen der Fettsäuren C12:0 und C17:0cylo auf andere als die isolierten Vertreter der β - und γ -Proteobacteria hin. An diesem Probenahmetermin ist das Spektrum der Bakteriengemeinschaft eindeutig anders und weniger divers zusammengesetzt, als an den folgenden Probenahmeterminen. Innerhalb der Gram⁺ Bakteriengemeinschaft (*Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.* u.a.) befindet sich wahrscheinlich ein bedeutender Anteil der nitratreduzierenden Bakteriengemeinschaft, während zu diesem Zeitpunkt β - und γ -Proteobacteria, aber keine α -Proteobacteria zur denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft beitragen. Die Fettsäuren C15:0iso und anteiso waren an jedem Probenahmetermin nachweisbar. Der hohe Anteil von je 30% am Gesamtfettsäurespektrum sank im weiteren

Verlauf der Probenahmen auf 3-7% ab. Lediglich im November 1997 stieg der Anteil von C15:0anteiso auf 13% an.

Bei einer Betrachtung der prozentualen Anteile der Fettsäure C12:0 (einige β - und γ -Proteobacteria) am Gesamtfettsäurespektrum im Jahresverlauf konnten diverse Veränderungen und teilweise beträchtliche Schwankungen dokumentiert werden. So wurde C12:0 im Jahresverlauf 1997 an keinem Probenahmetermin nachgewiesen. Erst ab März 1998 wurde diese Fettsäure ermittelt, betrug aber lediglich im September 1998 4%, ansonsten lediglich um 1%. Ab November 1998 war sie nicht mehr nachweisbar. Die Ermittlung dieser Fettsäure im Jahr 1998 deutet auf die Präsenz isolierter Vertreter der Hauptgruppe 2 (diverse Pseudomonaden) an diesen Probenahmeterminen hin.

C16:1 ω 5c (*Cytophaga sp.*, *Flexibacter sp.* u./o. Mykorrhiza) war ebenfalls eine dominante Fettsäure, welche ab September 1997 kontinuierlich an allen Probenahmeterminen in Anteilen von 2-8% nachgewiesen werden konnte. Dies deutet auf eine konstante Präsenz nicht isolierter Vertreter dieser Bakteriengruppe in Bodenproben der Parzelle 520 hin.

Mit Ausnahme von April 1997 und Mai 1998 konnte auch die Fettsäure C16:0 10Methyl stetig ermittelt werden (2-5%), was auf ein konstantes Vorkommen von Sulfatreduzierern wie Vertretern der Gattung *Desulfobacter* hinweist.

In beträchtlichen Anteilen von 3-15%, je nach Probenahmetermin, trat die Fettsäure C18:0 (*Thiobacillus sp.* und teilweise Hauptgruppe 5, Aktinomyceten) auf. Im April 1997 fehlte sie dagegen völlig. Ähnliches gilt auch für die Fettsäure C20:0 (*Staphylococcus sp.* u./o. *Paramecium sp.*). Auch sie fehlte im April 1997, war ansonsten im Jahresverlauf 1997 und 1998 mit 3-9% jedoch konstant vertreten.

Die Fettsäuren C16:0 und C16:1 ω 7c waren konstant dominant auftretende Fettsäuren im gesamten Probenahmeverlauf. Die für viele Aktinomyceten signifikante Biomarkerfettsäure 10Methyl C18:0 war an vielen Probenahmeterminen, allerdings in nur geringen Anteilen von maximal 2% nachweisbar. Die für Aktinomyceten charakteristische Fettsäure C18:1 ω 9c (Hauptgruppe 5, Actinomycetales I) war je nach Probenahmetermin in zum Teil hohen Anteilen vertreten (6-17%). Dies läßt auf eine kontinuierliche Präsenz dieser Bakteriengruppe an der Gesamtbakteriengemeinschaft schließen.

Die Fettsäure C18:2 ω 6c/C18:0anteiso war mit Ausnahme des April 1997 dominierend und zeigte zum Teil erhebliche Schwankungen. Während ihr Anteil im Jahresverlauf 1997 und

1998 14% nicht überschritt, stieg er im Januar 1999 auf 34% an. Auch im März 1999 war er noch mit 24% am Gesamtfettsäurespektrum beteiligt. Der hohe Anteil dieser Fettsäure zu bestimmten Probenahmezeitpunkten deutet auf eine sporadische Dominanz unbekannter Eukaryonten, vermutlich Bodenpilze, aber auch auf Vertreter der Aktinomyceten hin (Hauptgruppe 15, *Arcanobacterium sp.* u.a.) an diesen Terminen hin.

Ab März 1998 bis November 1998 ergaben die Gesamtfettsäureanalysen relativ einheitliche Spektren. Im Mai 1998 fehlten jedoch einige ansonsten konstant vertretene Fettsäuren, wie C16:0iso, C17:0anteiso, C19:0cyclo ω 8c, C16:0 10Methyl und C17:0iso. Diese Tatsache weist auf einen Rückgang von Vertretern der α -Proteobacteria, Sulfatreduzierern und aufgrund der Unspezifität der Fettsäuren C16:0iso, C17:0 iso und anteiso auf das mögliche Verschwinden nicht näher zu bezeichnender Bakterien hin. Im Dezember 1998 wurden ebenfalls weniger Fettsäuren detektiert. Ab Januar 1999 stieg vor allem der Anteil eukaryontischer Fettsäuren, vermutlich pilzlichen Ursprungs, an (C20:0, C18:2 ω 6c/C18:0anteiso, C18:3 ω 6c). Im März 1999 ließ sich die für einen Großteil der Gram⁺ Bakterien signifikante Fettsäure C18:1 ω 9c nicht mehr nachweisen, was auf eine gravierende Änderung innerhalb der Gram⁺ Bakteriengemeinschaft hinweist. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil einer Reihe anderer Fettsäuren, wie z.B. C20:1 ω 9c (nicht in Isolaten nachgewiesen), C20:0 (*Staphylococcus sp.*). Ebenfalls nicht mehr nachweisbar war die Fettsäure C18:1 ω 7c zu diesem Zeitpunkt, eine für alle isolierten Proteobacteria (insbesondere α -Proteobacteria) und andere Gram⁻ Bakterien signifikante Fettsäure. Es zeigte sich folglich auch innerhalb der Gram⁻ Bakteriengemeinschaft eine deutliche Veränderung im Bakterienspektrum. Der hohe Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu diesem Probenahmezeitpunkt läßt auf Eukaryonten als Ursache hierfür schließen (selektives "grazing").

Zusammengenommen waren viele kleinere Schwankungen verschiedener Fettsäuren zu verzeichnen, was auf eine anteilmäßige Variation etablierter Bakteriengruppen innerhalb der Gemeinschaft hindeuten kann.

Die statistische Analyse in Dendrogrammform (Abb. 26) verdeutlicht diese Ergebnisse.

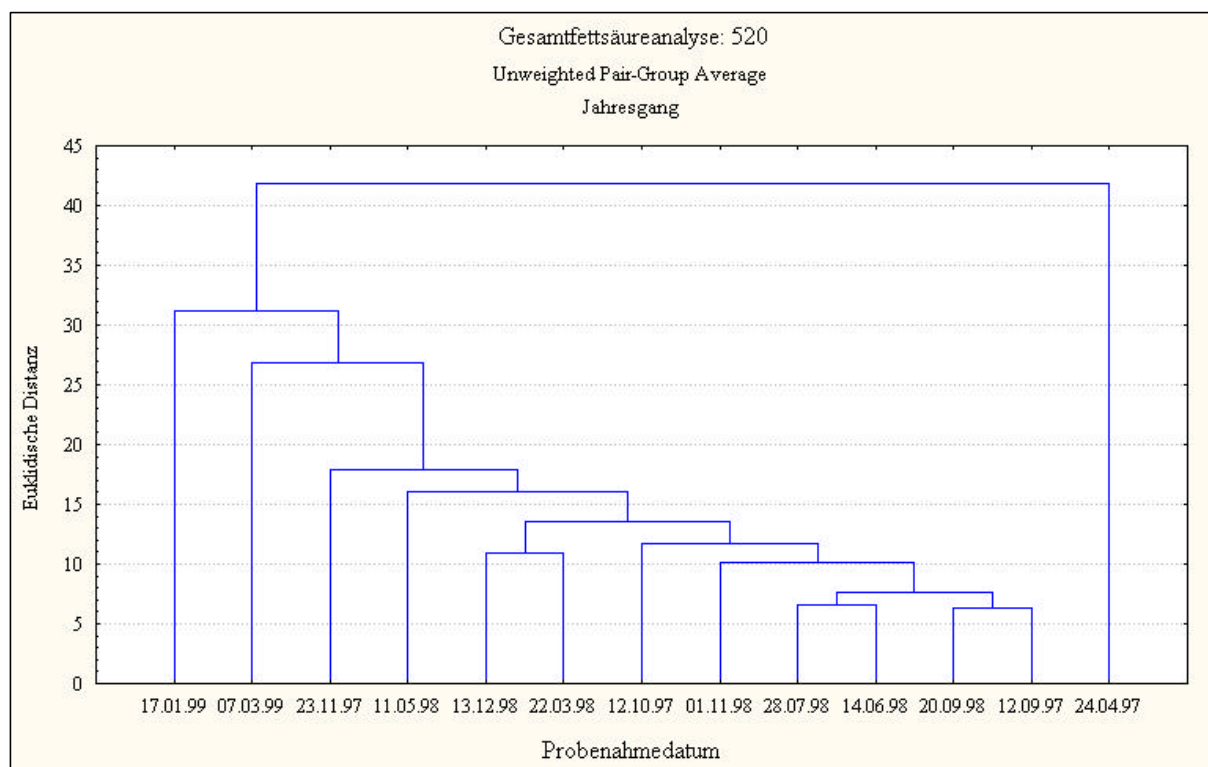


Abb. 26: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 520 (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5)

Klar zu erkennen war die enge Clusterung der Proben sämtlicher Probenahmetermine bei einer euklidischen Distanz von ca. 18 mit drei Ausnahmen. Dies waren zum einen die beiden Probenahmetermine im Januar und März 1999, zum anderen die Probenahme am 24.04.1997. Die Gesamtfettsäurespektren der Proben von 1999 zeichnen sich besonders durch das signifikante Auftreten der Fettsäure C18:2 ω 6c/C18:0anteiso zu diesem Zeitpunkt aus (34 bzw. 24%), wobei das Fettsäuremuster der Probenahme vom März 1999 insgesamt deutlich weniger Fettsäuren aufweist. Im April 1997 ist die Dominanz der Fettsäuren C15:0iso und anteiso ausschlaggebend für das Ergebnis der Clusteranalyse. Die hohen Anteile von jeweils 30% wurden an keinem weiteren Probenahmetermin erreicht. Am ähnlichsten zusammengesetzt waren die Gesamtfettsäuremuster der Probenahmetermine vom Sommer 1998 (14.06., 28.07. und 20.09.1998) und September 1997. Zusammen mit den Gesamtfettsäurespektren der Probenahmen vom Oktober 1997 und Winter 1998 (01.11., 13.12. und 22.03.1998) bilden sie ein Cluster bei einer euklidischen Distanz von 14. Einzelheiten zu Variationen der Gesamtfettsäurespektren im Jahresgang sind Abbildung 25 zu entnehmen.

Für Parzelle 521 zeigte sich im Jahresgang folgendes Bild:

Aus Bodenproben der Parzelle 521 konnten im Verlauf der Jahre 1997 bis Anfang 1999 55 verschiedene Fettsäuren detektiert werden. 34 dieser Fettsäuren machten jeweils mehr als 1% am Gesamtfettsäurespektrum aus. Von den 55 Fettsäuren konnten 22 in den isolierten Bakterien nachgewiesen werden. Der Anteil von 21 Fettsäuren lag bei <1% und wurde unter „andere Fettsäuren“ zusammengefaßt. An den verschiedenen Probenahmeterminen wurden zwischen 6 und 28 verschiedene Fettsäuren ermittelt. Als signifikant für Bodenproben (>4% an mindestens einem Probenahmetermin) dieser Parzelle galten die Fettsäuren C10:03OH, C12:0, C12:02OH, C12:1 3OH, C15:0iso und anteiso, C16:0, C16:1 ω 7c, C18:1 ω 9c, C18:1 ω 7c,9t,12t, C18:0, C16:1 ω 5c, C18:2 ω 6c/C18:0anteiso, C20:1 ω 9c und C20:4 ω 6c. Weitere relativ konstant vorhandene, aber mit geringen Anteilen vertretene Fettsäuren waren C16:0iso, C17:0anteiso, 10Methyl C18:0, C19:0 ω 8c, C14:0 und C17:0iso. Damit war das Spektrum der ermittelten Fettsäuren deutlich breiter, als auf den beiden anderen untersuchten Parzellen 508 und 520. Auch unterlagen die Gesamtfettsäurespektren größeren Schwankungen, was auch in Abbildung 27 deutlich wird.

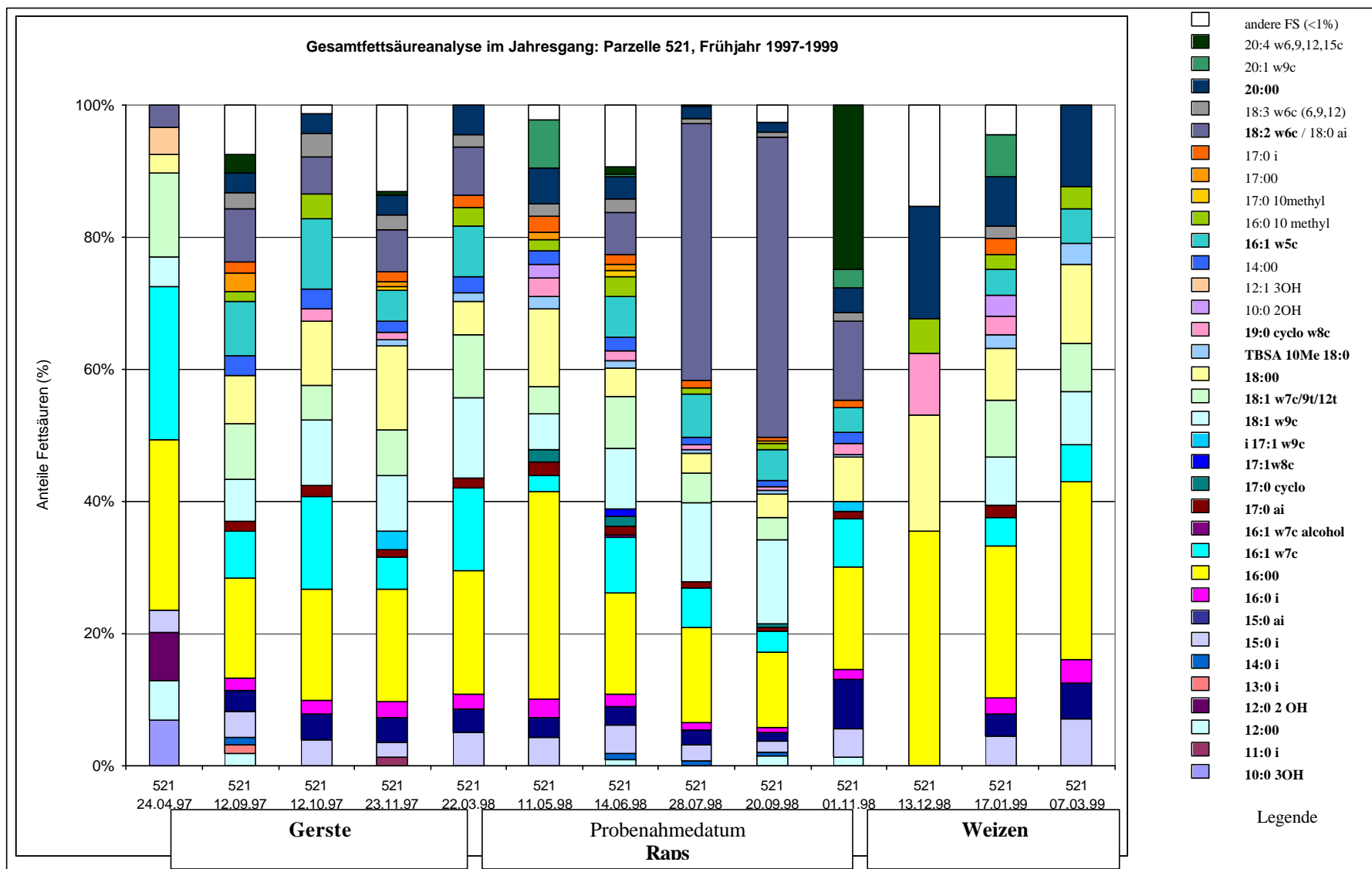


Abb. 27: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 521 im Jahresgang. Legende: **fettgedruckte** Fettsäuren konnten in Isolaten und in Bodenproben nachgewiesen werden, normalgedruckte Fettsäuren wurden nur in Bodenproben detektiert

Wie auch auf Parzelle 520 wich das Gesamtfettsäurespektrum der Parzelle 521 im April 1997 deutlich von den Gesamtfettsäurespektren an den folgenden Probenahmeterminen ab. Die Abweichungen unterschieden sich jedoch deutlich.

Im April 1997 dominierten in Bodenproben der Parzelle 521 die für viele β - und γ -Proteobacteria bedeutsamen Hydroxyfettsäuren C10:0 2OH, C10:0 3OH, C12:0 2OH, C12:1 3OH und die gesättigte Fettsäure C12:0. Mit Ausnahme von C10:0 2OH und C12:0 waren die Hydroxyfettsäuren nur im April 1997 nachweisbar. Dies deutet auf eine sporadische Dominanz bestimmter Vertreter der β - und γ -Proteobacteria, wie z.B. die Gattungen *Pseudomonas* und *Comamonas* hin. Isolierte Vertreter der Gattungen *Achromobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter* und *Burkholderia*, sowie Enterobakterien besaßen keine Hydroxyfettsäuren und zählen damit an diesem Probenahmetermin nicht zu den dominanten Bakterien. Die Fettsäure C12:0 3OH wurde in keinem der Isolate entdeckt, was auf mögliche weitere nicht ermittelte Vertreter der Proteobacteria zu diesem Zeitpunkt hinweist. Gleichzeitig fehlt die für viele Gram⁺ Bakterien charakteristische Fettsäure C15:0 anteiso völlig. Diese Tatsache deutet auf eine positive Entwicklung von diversen Proteobacteria zu Ungunsten von Teilen der Gram⁺ Bakteriengemeinschaft hin. Hierdurch trat möglicherweise auch eine Verschiebung von nitratreduzierenden Bakterien (vorwiegend Bacilli und andere Gram⁺ Bakterien) hin zu denitrifizierenden β - und γ -Proteobacteria auf.

Ab September 1997 bis Juni 1998 traten kleinere Schwankungen in den Gesamtfettsäurespektren auf. Innerhalb dieses Zeitraums waren aber keine ausgeprägten Dominanzen einzelner Fettsäuren zu beobachten. Dies deutet auf eine stabile Bakteriengemeinschaft in diesem Probenahmezeitraum hin.

Von Juli bis November 1998 stieg der Anteil der Fettsäure C18:2 ω 6c/C18:0 anteiso stark an. Im November 1998 war desweiteren eine ausgeprägte Dominanz der mehrfach ungesättigten Fettsäure C20:4 ω 6c zu verzeichnen. Ab Dezember 1998 tendierten diese Anteile dagegen gegen Null. Der Anstieg dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist vermutlich auf höhere Anteile pilzlicher Biomasse und andere Mycelbildner (Aktinomyceten) zurückzuführen, was durch die für viele Bodenpilze und Vertreter der Hauptgruppe 15 (Actinomycetales VII, *Arcanobacterium sp.* u.a.) signifikante Fettsäure C18:2 ω 6c deutlich wird. Auf jeden Fall ist an diesen Probenahmezeitpunkten ein Anstieg dieser Mikroorganismen zu verzeichnen. Im Dezember 1998 war neben dem Fehlen der ansonsten konstant vertretenen Fettsäuren C15:0 iso und anteiso ein Anstieg der für α -Proteobacteria signifikanten Biomarkerfettsäure C19:0 cyclo ω 8c zu verzeichnen.

Desweiteren stieg auch der Anteil der Fettsäure C20:0 stark an und blieb auch bis März 1999 eine dominante Fettsäure im Gesamtfettsäurespektrum dieser Parzelle, was auf eine mögliche Präsenz von Vertretern der Gattung *Staphylococcus* hinweist.

Das Fettsäuremuster der Probenahme vom Dezember 1998 weist auch einen hohen Anteil der Fettsäure C18:0 auf, die im Fettsäuremuster von Vertretern der Gattung *Thiobacillus* in höheren Anteilen zu finden ist. Auch der Anteil von C20:1 ω 9c und C16:0 10Methyl ist mit 6% bzw. 5% vergleichsweise hoch. Während der Ursprung der Fettsäure C20:1 ω 9c unklar ist, da diese Fettsäure nicht in Isolaten gefunden werden konnte, ist C16:0 10Methyl eindeutig auf Sulfatreduzierer zurückzuführen. Da die Fettsäuren C15:0iso und anteiso nicht nachgewiesen werden konnten, fehlen zu diesem Zeitpunkt isolierte Bakterien der Actinomycetales und Bacilli, sowie Vertreter der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe.

Das Fehlen vieler für Proteobacteria, aber auch Aktinomyceten charakteristischen Fettsäuren wie C16:1 ω 7c und C18:1 ω 7c,9t,12t und C18:1 ω 9c deutet auf eine punktuelle Dominanz bestimmter Gram⁺, nicht isolierter Bakterien zu diesem Zeitpunkt hin. Hierzu müssen unter anderem auch Sulfatreduzierer zählen, da C16:0 10Methyl eine der dominanten Fettsäuren an diesem Probenahmezeitpunkt ist.

Das Fehlen der Fettsäure C16:1 ω 5c zu diesem Zeitpunkt unterstreicht das Fehlen jeglicher Vertreter der *Flexibacter/Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe. Die im Vormonat (November 1998) starke Präsenz der eukaryontischen Fettsäure C20:4 ω 6,9,12,15c deutet auf einen vorangegangenen enormen Anstieg eukaryontischer Biomasse hin. Dies kann sich auf die bis dahin relativ stabile Gesamtbakteriengemeinschaft dahingehend ausgewirkt haben, daß sich das Spektrum vormals dominanter Bakteriengruppen verschoben hat. In den ersten Probenahmemonaten des Jahres 1999 scheint sich die ursprünglich etablierte Bakteriengemeinschaft jedoch wieder erholt zu haben, denn die Fettsäuremuster ähneln wiederum stärker den Fettsäuremustern des Frühjahrs 1998. Eukaryontische Fettsäuren fehlen weitestgehend.

Die Fettsäure C18:1 ω 9c (Hauptgruppe 5 und *Corynebacterium sp.*) war mit Ausnahme des Novembers und Dezembers 1998 eine stark dominante Fettsäure mit Anteilen zwischen 4% und 13%. Dies belegt die konstante Präsenz von Aktinomyceten in Frühjahrs-, Sommer- und Herbstbodenproben.

Die punktuell im Dezember 1997 und Dezember 1998 detektierte Fettsäure isoC17:1 ω 9c wurde in Vertretern der Hauptgruppen 6 (Actinomycetales VI) und 8 (*Cytophaga/Flavobac-*

terium-Gruppe) detektiert und deutet auf eine mögliche verstärkte Präsenz dieser Bakteriengruppen zu diesem Zeitpunkt hin.

In Abbildung 28 sind die Gesamtfettsäuremuster der verschiedenen Probenahmetermine statistisch in Dendrogrammform dargestellt.

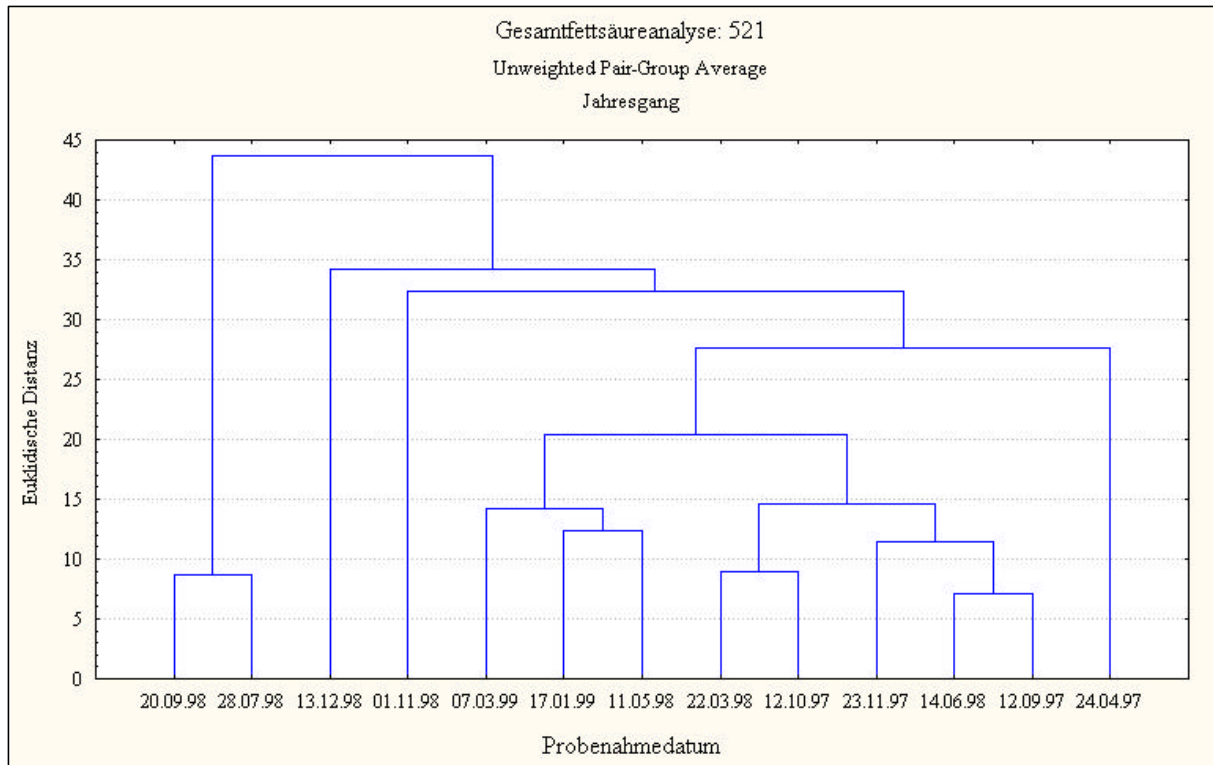


Abb. 28: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 521 (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5)

Die Clusteranalyse der Gesamtfettsäurespektren an den verschiedenen Probenahmeterminen zeigt ein im Vergleich zu den beiden anderen Parzellen 508 und 520 eher heterogenes Bild, d.h. viele Einzelcluster sind zu erkennen. Sehr ähnlich sind sich die Fettsäuremuster der Probenahmen im Juli und September 1998, die bei einer euklidischen Distanz von ca. 9 miteinander clustern. Dies ist auf den an beiden Terminen sehr hohen Anteil der mehrfach ungesättigten, auf Eukaryonten hindeutenden, Fettsäure C18:3 ω 6,9,12c zurückzuführen. Sehr ähnlich waren sich auch die Fettsäuremuster vom Januar und März 1999. Mit diesen Proben clustert jedoch auch die Probe vom Mai 1998, was vermutlich auf die auch bei dieser Probenahme ermittelte Dominanz der Fettsäuren C16:0 bei gleichzeitigem Fehlen der Fettsäure C18:2 ω 6c/C18:0anteiso, die ansonsten konstant in den Fettsäuremustern enthalten war, zurückzuführen ist. Ein weiteres Cluster bei einer euklidischen Distanz von ca. 14 bilden die Probenahmen vom 12.09., 12.10. und 23.11.1997, was auf eine stabile Bakteriengemeinschaft innerhalb dieses Zeitraums hinweist. Die Probenahmen vom 22.03.

und 14.06.1998 clustern ebenfalls zusammen, bedingt durch die ungefähr gleich hohen Anteile dominanter Fettsäuren. Die Fettsäurespektren der Winterproben 1998 (01.11. und 13.12.1998), als auch die Probe vom April 1997 besaßen signifikant abweichende Fettsäurezusammensetzungen. Sie stehen in der Clusteranalyse allein und bilden erst bei einer euklidischen Distanz von 34 ein gemeinsames Cluster mit der Mehrzahl der anderen Proben (Ausnahme 28.07. und 20.09.1998). Das Abweichen der Aprilprobe ist auf die einmalig auftauchenden verschiedenen Hydroxyfettsäuren zurückzuführen, bei gleichzeitigem Fehlen vieler anderer ansonsten charakteristischen Fettsäuren in diesen Bodeproben. Die Winterproben 1998 fallen besonders durch das Fehlen der Fettsäuren C18:1 ω 9c und C18:1 ω 7c,9t,12t auf, die an den übrigen Probenahmeterminen stets dominant waren.

Um detaillierte, vergleichende Informationen über die Gesamtfettsäurespektren der verschieden behandelten Ackerparzellen zu erhalten, sind in den folgenden Abbildung 29 und 30 (Clusteranalyse) die Gesamtfettsäurespektren der einzelnen Probenahmetermine nebeneinander dargestellt.

Insgesamt zeichnet sich bei den Fettsäuremustern aus Bodenproben der ungedüngten Parzelle 521 im Vergleich zu der mit Gülle bzw. Ammonium-Nitrat behandelten Parzellen 508 und 520 eine deutlich erhöhte Varianz im Jahresgang ab. Während Parzelle 508 im Jahresgang 1998 wenig signifikante Änderungen im Fettsäuremuster aufweisen konnte, waren in den Bodenproben der Parzellen 520 und 521 zu bestimmten Probenahmezeitpunkten eukaryontische Mikroorganismen ein wichtiger Teil der Bodenorganismen. Diese können durch "selektives grazing" die vormals stabile Gesamtbakteriengemeinschaft aus Gram⁺ Bakterien und Proteobacteria zugunsten bereits etablierter Bakterienpopulationen verschieben oder zur kurzfristigen Vermehrung anderer Bakteriengruppen führen. Die Dominanz Gram⁺ Bakterien gegenüber Gram⁻ Bakterien, sowie das Aufkommen von β - und γ -Proteobacteria (vermutlich Pseudomonaden) zu vereinzelt Probenahmezeitpunkten konnte für die Parzellen 520 und 521 gezeigt werden. Generell scheint jedoch auf allen beprobten Parzellen eine stabile Bakteriengemeinschaft zu bestehen, die durch ein charakteristisches Fettsäuremuster geprägt ist, das sich nach gewisser Zeit wieder einstellt und auf eine langfristige Stabilität der Bakteriengemeinschaft hindeutet. Diese im allgemeinen stabile Bakteriengemeinschaft reagiert jedoch auf Umwelteinflüsse, was unterschiedliche Anteile der regelmäßig detektierten Fettsäuren an den verschiedenen Probenahmezeitpunkten signalisieren. Aufgrund der relativ langen Zeiträume zwischen den einzelnen

Probenahmeterminen (4-6 Wochen) sind kurzfristige Änderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft als Reaktion auf ackerbauliche Maßnahmen (unterschiedliche Düngung) und auf Witterungseinflüsse nicht detektierbar. Auch ein Wechsel der Feldfrucht scheint nach den Ergebnissen der Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben zu keinen gravierenden und langfristigen Änderungen in der Zusammensetzung der Gesamtbakteriengemeinschaft zu führen. Eine Vielzahl möglicher Umweltfaktoren und deren unterschiedlichste Kombinationen können Ursache für die beobachteten Schwankungen in den Fettsäuremustern sein. Die in Bodenproben der ungedüngten Parzelle 521 tendenziell höhere bakterielle Diversität läßt auch einen größeren Spielraum für Reaktionen auf diverse Umweltbedingungen zu, was zu teilweise gravierenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft, besonders in Bodenproben der Parzelle 521, geführt hat.

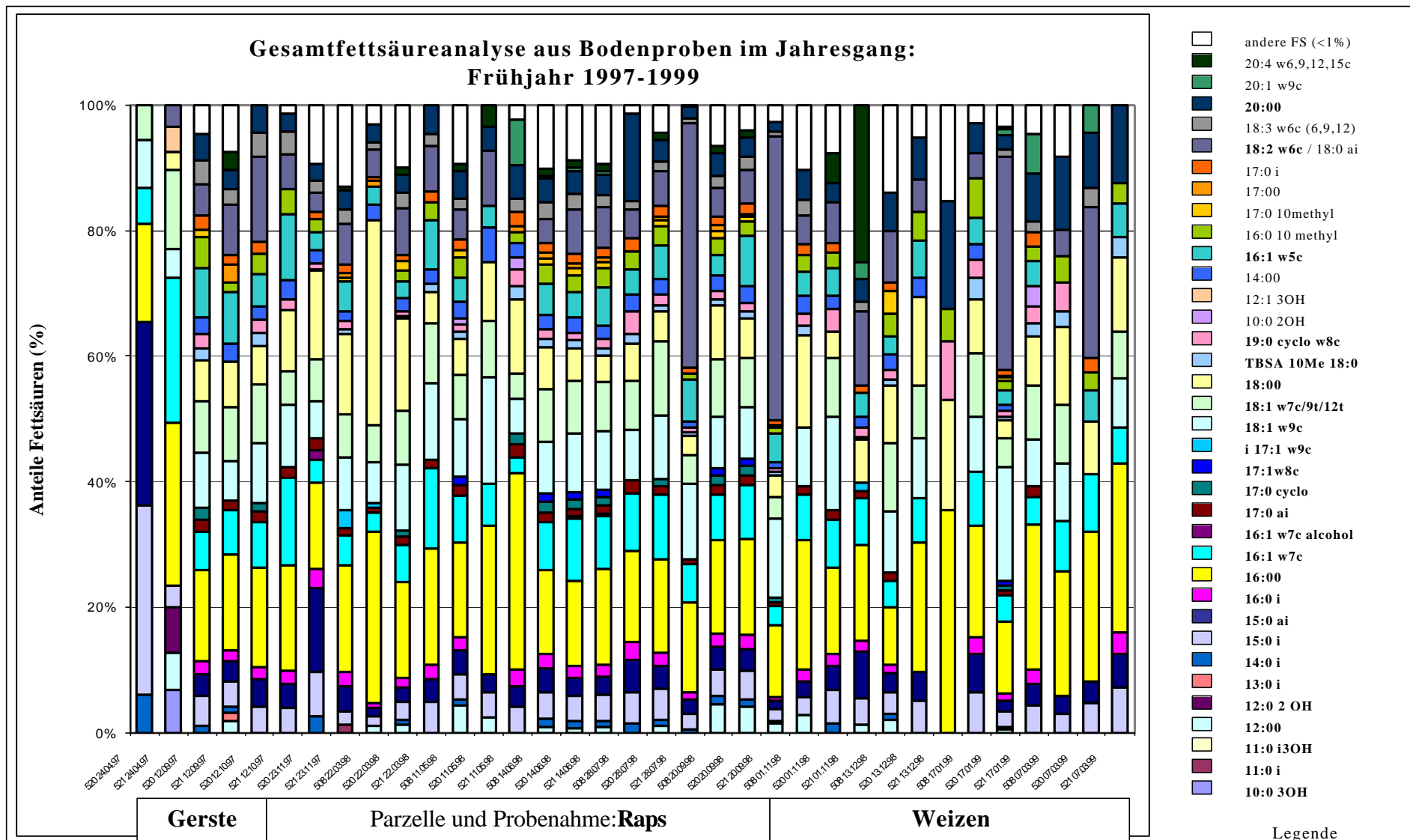


Abb. 29: Vergleichende Darstellung der Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben der Parzelle 508, 520 und 521 im Jahresgang. Legende: fettgedruckte Fettsäuren konnten in Isolaten und in Bodenproben nachgewiesen werden, normalgedruckte Fettsäuren wurden nur in Bodenproben detektiert

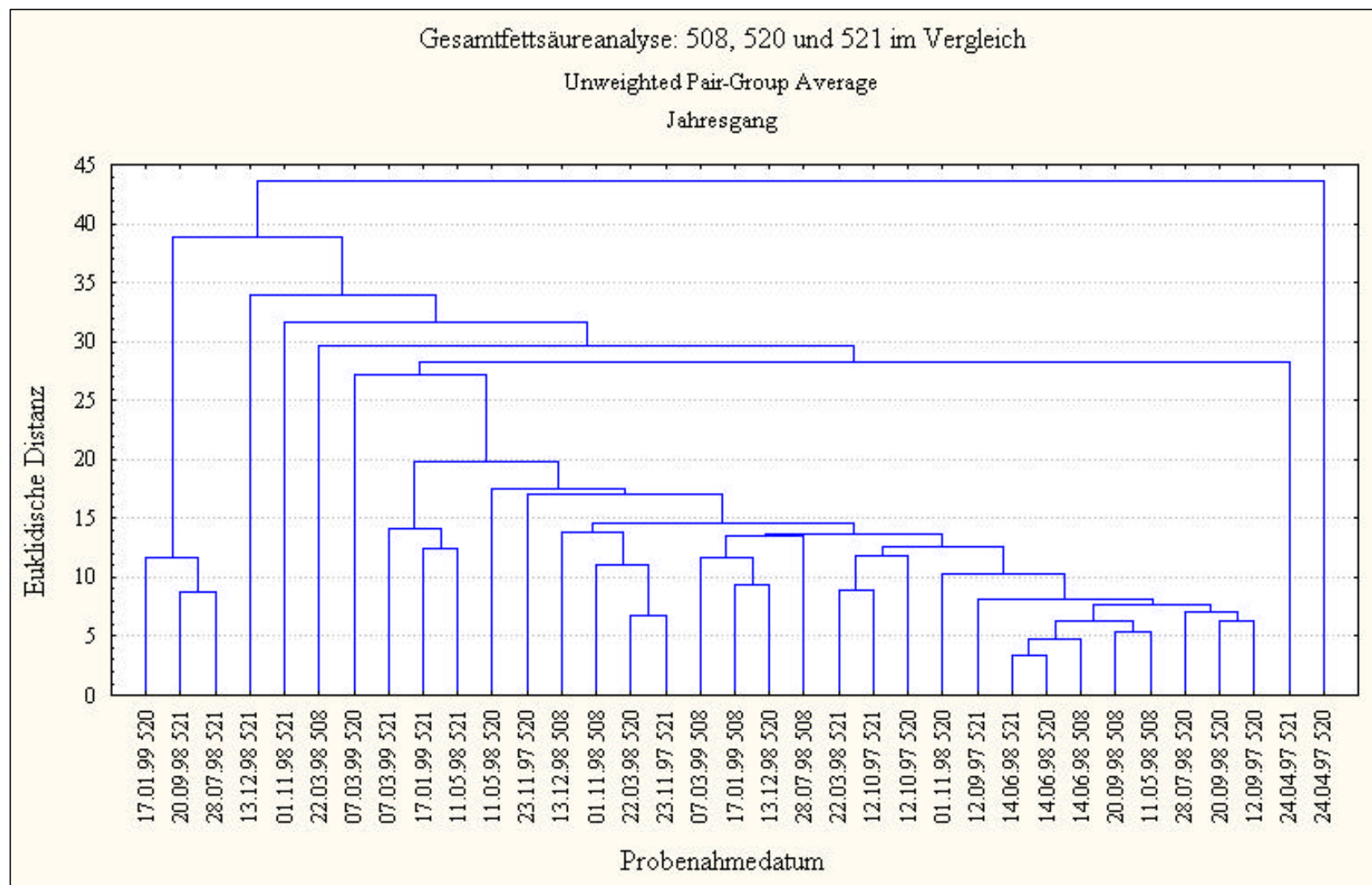


Abb. 30: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 508, 520 und 521. Unweighted Pair Group Matching Analysis (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTICA, Version 5.0)

Tendenziell wird deutlich, daß sich die Mehrzahl der Gesamtfettsäuremuster aller untersuchten Parzellen an den verschiedenen Probenahmeterminen nicht mehr als ca. 20 euklidische Distanzen voneinander unterscheiden. Auffällige Ausnahme war die Probenahme am 24.04.1997 (520 u. 521), sowie weitere Probenahmen am 22.03.1998 (508), 07.03.1998 und 17.01.1999 (520), sowie 28.07., 20.09., 01.11., 13.12.1998 (521), wobei sich die Fettsäurespektren der Proben vom 28.07. und 20.09.1998 der Parzelle 521 und das Fettsäurespektrum der Probe vom 17.01.1999 der Parzelle 520 am ähnlichsten waren. Sie bildeten ein Cluster bei einer euklidischen Distanz von ca. 11. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, daß die Sommerproben der Parzellen 520 und 508 ein gemeinsames Cluster bilden, in das auch einige Sommerproben der Parzelle 521 fallen. Sie clustern bei einer euklidischen Distanz von ca. 8 miteinander. Eine Ausnahme bildet lediglich die Probe vom 28.07.1998 der Parzelle 508. Die Sommerproben der Parzelle 521 weisen jedoch mehr Varianz in den Fettsäurespektren auf und lassenen sich nicht in einem einheitlichen Cluster zusammenfassen. Im Vergleich zu den Sommerproben zeigen die Herbst- und Winterproben dagegen stärkere Unterschiede zueinander, was zu einer eher uneinheitlichen Clusterung führt.

3.2.4 Charakteristische Biomarkerfettsäuren verschiedener Bakteriengruppen im Jahresgang

In den Fettsäuremustern vieler der isolierten Bakteriengruppen ließen sich sogenannte Biomarkerfettsäuren nachweisen, die jeweils nur in einer dieser Gruppen vorkamen, und sie dadurch von anderen Bakteriengruppen signifikant unterschied. Für die Gruppe der isolierten Proteobacteria waren dies eine Reihe von Fettsäuren, die auch in den Gesamtfettsäureanalysen der Bodenproben regelmäßig detektiert wurden. Das Vorhandensein von Vertretern dieser Bakteriengruppe ist damit für die Böden aller untersuchten Parzellen sehr wahrscheinlich. Im Jahresgang führte eine Zusammenfassung dieser ausgewählten Fettsäuren für die verschiedenen Parzellen zu folgendem in Abbildung 31 dargestelltem Ergebnis.

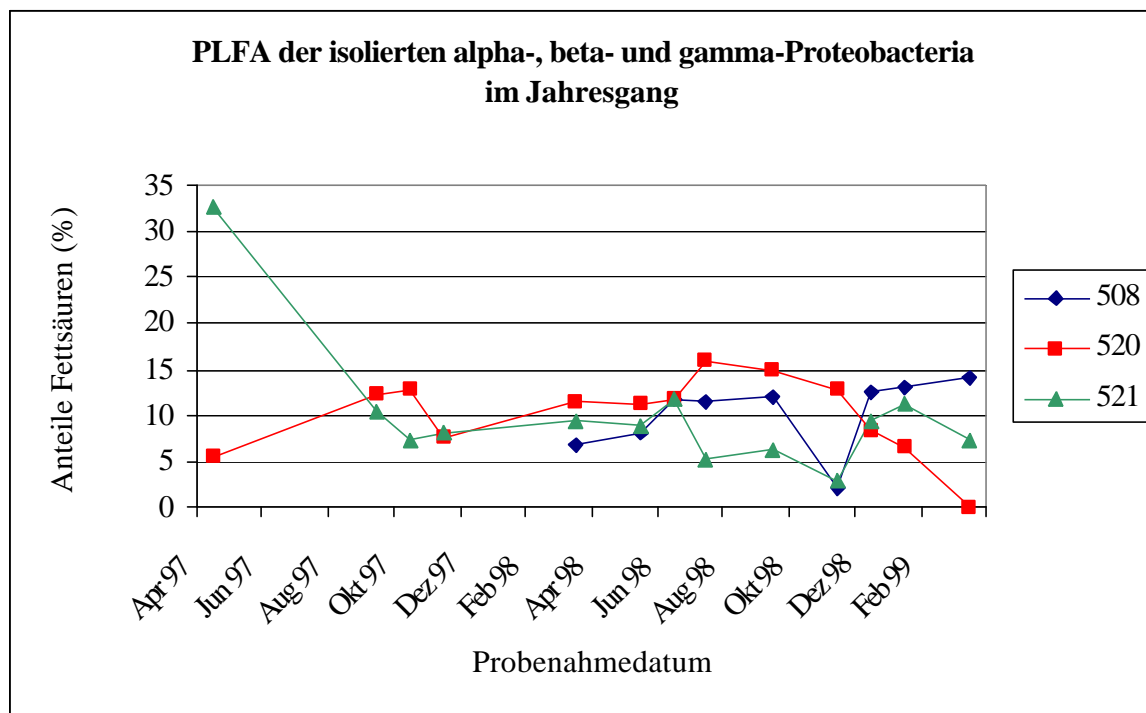


Abb. 31: Zusammenfassung der Anteile für isolierte α -, β - und γ -Proteobacteria signifikanten Fettsäuren (C18:1 ω 7c,9t,12t, C19:0cyclo ω 8c, C12:0, C12:0 2OH und C10:0 3OH), die in den Umweltproben detektiert wurden, im Jahresgang

Die Fettsäure 18:1 ω 7c,9t,12t war eine Hauptfettsäure aller isolierten α - und β -Proteobacteria mit Anteilen von teilweise >80% bzw. fast 40% und wurde in keiner anderen isolierten Bakteriengruppe in vergleichbarer Dominanz nachgewiesen. Nach Findlay & Dobbs (1993), handelt es sich um eine vorwiegend bei Gram⁻ Bakterien dominante Fettsäure. In γ -Proteobacteria trat sie ebenfalls, aber in deutlich geringeren Anteilen (8-21%) auf. Wie bereits erwähnt galt die Fettsäure C19:0cyclo ω 8c als Biomarkerfettsäure isolierter α -Proteobacteria.

Zusammen mit den Hydroxyfettsäuren C10:0 3OH und C12:0 2OH, sowie der Fettsäure C12:0 kann dieser Komplex verschiedener Fettsäuren als charakteristisch für die isolierten Proteobacteria gelten. In den Bodenproben der verschiedenen Parzellen machten diese Fettsäuren Anteile zwischen 5% und 15% am Gesamtfettsäurespektrum aus. Im April 1997 lag ihr Anteil in Bodenproben der Parzelle 521 jedoch deutlich höher (>30%). In den Wintermonaten nahm ihr Anteil auf allen Parzellen ab. Im allgemeinen war in den Bodenproben der Parzelle 520 der Anteil dieser Fettsäuren am höchsten und in Proben der Parzelle 521 am niedrigsten. Dies änderte sich jedoch zu Beginn des Jahres 1999. Ab diesem Zeitpunkt lagen die Anteile dieser Fettsäuren in Bodenproben der Parzelle 508 am höchsten, während die Anteile bzgl. Parzelle 521 geringer waren und in Proben der Parzelle 520 eine deutlich abnehmende Tendenz aufwiesen. Einige der in isolierten Proteobacteria ermittelten Fettsäuren wie C12:0 3OH und C14:1 ω 5c, sowie C16:1isoI/C14:0iso2OH konnten in den Bodenproben nicht nachgewiesen werden, waren in einigen Isolaten aber durchaus mit Anteilen zwischen 5% und 10% vertreten. C12:0 3OH war eine charakteristische Fettsäure einiger Untergruppen (ECLD>10) der Hauptgruppe 2 (2-1, 2-6, 2-9 und 2-10; diverse Pseudomonaden). Die Fettsäure C14:1 ω 5c wurde in der Untergruppe 2-3 (Enterobakterien), sowie in Gruppe 15 (*Acinetobacter* sp.) nachgewiesen und betrug ca. 5%. C16:1isoI/C14:0iso2OH war in vielen Untergruppen der isolierten Bakteriengruppen 1, 2 (diverse α -, β - und γ -Proteobacteria) und 18 (*Burkholderia* sp.) vorhanden. Da diese Fettsäuren zu keinem Zeitpunkt der Probenahme in Anteilen von >1% ermittelt werden konnten, ist anzunehmen, daß diese Vertreter der Proteobacteria auf den beprobten Ackerparzellen möglicherweise nur eine untergeordnete oder keine Rolle spielen. Die im April 1997 in Bodenproben der Parzelle 521 vermehrt auftretenden Fettsäuren C10:0 3OH, C12:0 2OH, C12:1 3OH und C12:0 und das gleichzeitige Fehlen der in vielen Isolaten in höheren Anteilen vorhandenen Fettsäure C17:0cyclo, ließen auf eine Dominanz von Vertretern der Untergruppen 2-8, 2-9 und 2-10 schließen. In diesen Untergruppen der Gruppe 2 fanden sich die Gattungen *Comamonas*, *Variovorax* und vor allem Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe. In letztere fielen auch die meisten isolierten Vertreter der Gruppe 2. Damit wären β - und γ -Proteobacteria der Gattungen *Achromobacter*, *Proteus*, *Serratia*, diverse Enterobakterien, *Acinetobacter*, *Burkholderia* u.a. vermutlich in Bodenproben der untersuchten Ackerparzellen keine dominanten Vertreter. Aufgrund des Fehlens der für α -Proteobacteria signifikanten Fettsäure C19:0cyclo ω 8c an diesem Probenahmetermin war diese Bakteriengruppe hier vermutlich ebenfalls nicht von großer Bedeutung.

Eine weitere größere Bakteriengruppe mit einer charakteristischen Fettsäurezusammensetzung war die Bakteriengruppe 5 (Actinomycetales I). In Abbildung 32 sind die für diese Gruppe signifikanten Haupt- und Biomarkerfettsäuren im Jahresgang für die drei untersuchten Parzellen im Jahresgang dargestellt

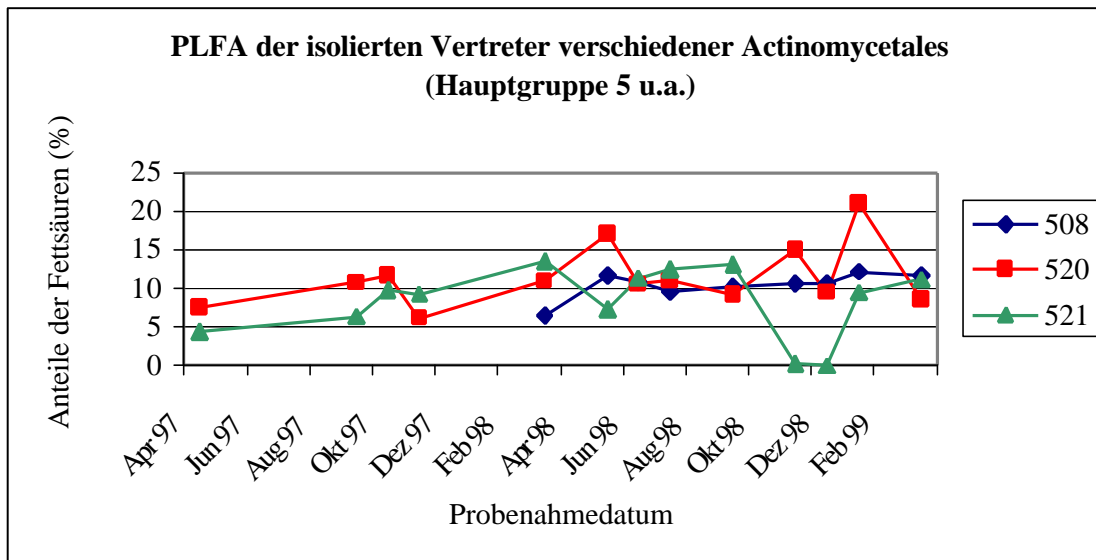


Abb. 32: Zusammenfassung der Anteile für isolierte Actinomycetales der Hauptgruppe 5 und weiterer den Actinomycetales angehörenden Hauptgruppen (12, 15, 16, 19) signifikanten Fettsäuren (C18:1 ω 9c, 10Methyl C18:0, C17:1 ω 8c), die in den Umweltproben detektiert wurden, im Jahresgang

Die Fettsäure C18:1 ω 9c war eine Hauptfettsäure dieser Gruppe (*Nocardia sp.* und andere) und ist laut Literatur auch eine signifikante Fettsäure der Gattung *Corynebacterium* (Haack *et al.* (1994), ebenfalls eine zu den Actinomycetales zählende Bakteriengattung. Diese Fettsäure kam jedoch auch als Hauptfettsäure der Gattung *Acinetobacter* vor (Gruppe 15), die zu den γ -Proteobacteria zählen. Ansonsten fand sich diese Fettsäure außer in den Gruppen 12, 15, 16 und 19, bei denen es sich ebenfalls um diverse Actinomycetales handelte, in keiner anderen isolierten Bakteriengruppe. Die Fettsäure 10Methyl C18:0, die als signifikante Fettsäure für viele Aktinomyceten gilt, war nur in der Gruppe 5 konstant vertreten. In vielen der isolierten Actinomycetales fand sich auch die Fettsäure C17:1 ω 8c. Sie war außer in den Bakteriengruppen 1-2 und 1-3 (*Agrobacterium sp.*) mit einem Anteil von <4% noch in der Gruppe 8-2 („no match“) mit 8% vertreten, ansonsten aber nur mit Anteilen zwischen 4% und 11% in Isolaten der Gruppe 5 zu finden. Diese drei Fettsäuren wurden zusammengefaßt, um eine mögliche Dynamik dieser Gruppe im Jahresgang aufzuzeigen und Unterschiede in den Anteilen dieser Fettsäuren am Gesamtfettsäurespektrum der verschiedenen Parzellen sichtbar zu machen.

Die Anteile der ausgewählten Fettsäuren am Gesamtfettsäurespektrum lagen im Mittel bei ca. 10% je nach Probenahmetermin und untersuchter Parzelle. Bezüglich der verschiedenen Ackerparzellen und Probenahmetermine zeigte sich für die Parzelle 508 ein gleichmäßiger Verlauf, während die Anteile in Bezug auf Parzelle 520 und 521 1998 stark variierten. Auffällig war der Rückgang dieser Fettsäuren im Dezember 1998 auf Parzelle 521, während die Anteile in Bodenproben der anderen Parzellen in diesem Zeitraum relativ konstant blieben (508) oder anstiegen (520).

Die weiteren Gram⁺ Bakteriengruppen mit Ausnahme der Gruppe 5 wiesen dominante Anteile verzweigt-kettige Fettsäuren wie C15:0iso und anteiso, C16:0iso, C17:0iso, sowie anteiso auf. Hierbei handelte es sich um die Bakteriengruppen 3 (*Bacillus mycoides* u.a.), 4 (*Arthrobacter sp.* u.a.), 6 (*Streptomyces sp.* u.a.), 7 (*Bacillus megaterium* GC subgr. A u.a.), 8 (*Cytophaga sp./Flavobacterium sp.*), sowie weitere vor allem diverse Bacilli und Actinomycetales beinhaltende Gruppen. Ein Jahresgang dieser zusammengefaßten Fettsäuren ist in Abbildung 33 für die verschiedenen Parzellen graphisch dargestellt.

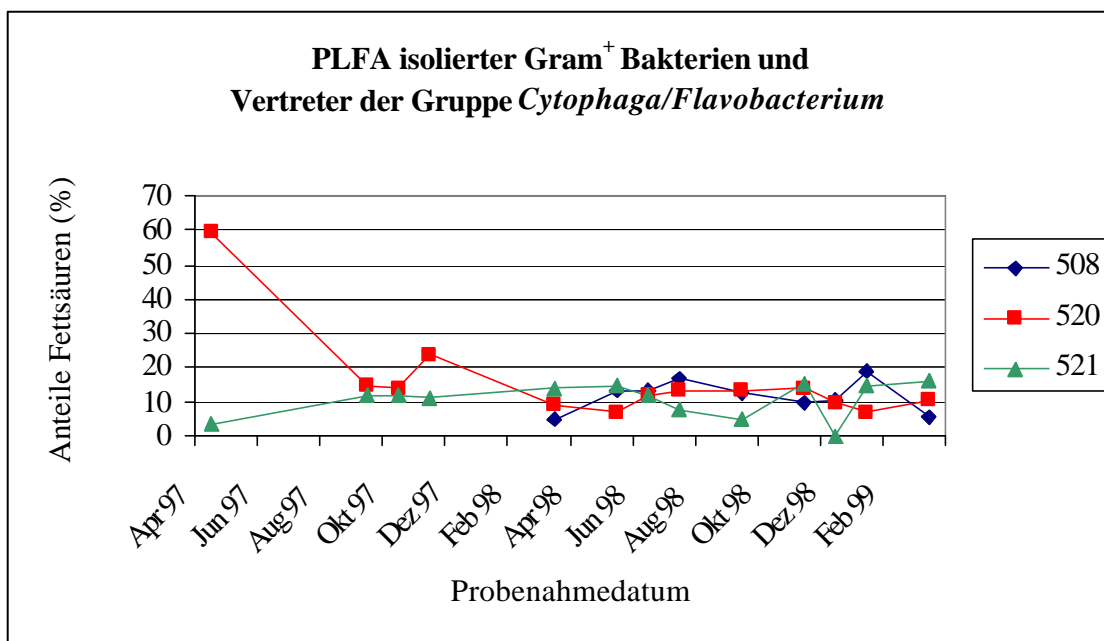


Abb. 33: Zusammenfassung der Anteile für isolierte Gram⁺ Bakterien und für Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* signifikanten Fettsäuren (C15:0iso und anteiso, C16:0iso, C17:0iso und anteiso), die in den Umweltpollen detektiert wurden im Jahresgang

Generell gelten verzweigt-kettige Fettsäuren im Bereich von C14-C16 vor allem für Gram⁺ Bakterien, aber auch für diverse anaerobe Bakterien als charakteristisch (Rajendran *et al.*, 1994; Frostegård *et al.*, 1992). Auffällig war hier wiederum die Probenahme im April 1997. Dominante Anteile dieser Fettsäuren traten jedoch nur in Bodenproben der Parzelle 520 auf und waren in Bodenproben der Parzelle 521 vergleichsweise gering. Wahrscheinlich traten auf Parzelle 521 zu diesem Zeitpunkt vor allem verschiedene Proteobacteria in hohen Abundanzen auf. Im Verlauf des Jahres 1997 blieb der Anteil der überwiegend Gram⁺ Bakteriengruppen in Bodenproben der Parzelle 520 im Vergleich zur Parzelle 521 stets etwas höher. Dies änderte sich zu Beginn des Jahres 1998 kurzzeitig. Im Sommer 1998 waren die Anteile von charakteristischen Fettsäuren dieser Bakteriengruppen auf Parzelle 520 und auch auf Parzelle 508 deutlich höher als auf Parzelle 521. Während die für diese Fettsäuren stehenden Bakteriengruppen der Parzelle 508 und 520 auch im Winter 1998 relativ stabil blieben, war bezüglich Parzelle 521 im Dezember 1998 ein kurzer Einbruch dieser Bakterienpopulationen auffällig. Der Rückgang dieser Fettsäuren am Gesamtfettsäurespektrum zum Zeitpunkt dieser Probenahme fiel zusammen mit dem gleichzeitigen massiven Auftreten der für verschiedene andere Bakteriengruppen signifikanten Fettsäuren, wie C19:0cyclo ω 8c (α -Proteobacteria), C18:0 (*Thiobacillus sp.*) und C20:0 (*Staphylococcus sp.* u./o. *Paramecium sp.*). Auch die erhöhte Anwesenheit von Vertretern der Gruppe der Sulfatreduzierer (*Desulfobacter sp. u.a.*) wurde durch den gestiegenen Anteil der Fettsäure C16:0 10Methyl zu diesem Probenahmezeitpunkt angezeigt. Im Verlauf der Jahre 1997 und 1998 lagen die durchschnittlichen Anteile der für diese vor allem Gram⁺ Bakterien charakteristischen Fettsäuren, mit Ausnahme der Probenahmen im April 1997 und Dezember 1998, auf den beprobten Parzellen zwischen 5% und 22%.

In der folgenden Abbildung 34 sind die signifikanten Fettsäuren verschiedener isolierter Bakteriengruppen im Jahresgang vergleichend für die Parzellen 508, 520 und 521 graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt für alle drei beprobten Parzellen relativ übereinstimmende Anteile von Fettsäuren isolierter α -, β - und γ -Proteobacteria im Jahresgang. An einzelnen Probenahmeterminen dominierten jedoch die isolierten Proteobacteria (April 1997, 521) und isolierten Gram⁺ Bakterien (April 1997, 520) sehr stark gegenüber den anderen dargestellten Bakteriengruppen. Die isolierten Vertreter der Actinomycetales zeigten besonders in Bodenproben der Parzelle 508 eine konstante Präsenz im gesamten Jahresgang 1998, während sie auf den Parzellen 520 und 521 stärker in ihren Anteilen variierten. Dies wurde bereits bei den Gesamtfettsäureanalysen detailliert beschrieben und wird in dieser Graphik nochmals deutlich. An verschiedenen anderen Probenahmeterminen war auf allen Parzellen ein erhöhter

Anteil der Gram⁺ Bakterien festzustellen, bei gleichzeitiger Abnahme der anderen untersuchten Bakteriengruppen. Durch die relativ kleine Auswahl der für die untersuchten Bakteriengruppen signifikanten Fettsäuren, wurden in dieser Graphik nur die Anteile der isolierten Proteobacteria, Actinomycetales und andere Gram⁺ Bakterien berücksichtigt.

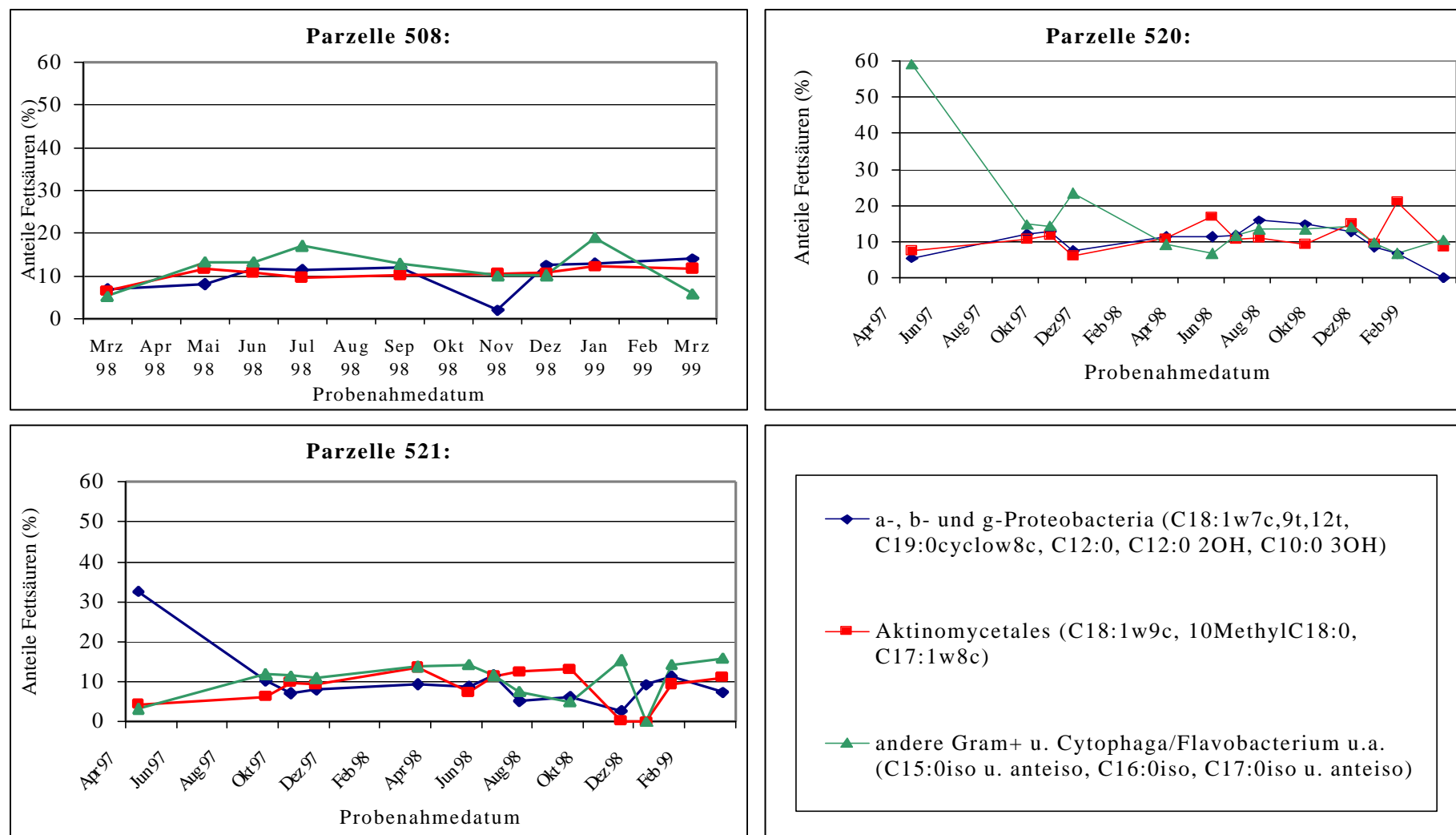


Abb. 34: Signifikante Fettsäuregruppen für verschiedene isolierte Bakteriengruppen im Jahresgang in Bodenproben der Parzellen 508, 520 und 521

In den Bodenproben aller Parzellen ließ sich regelmäßig im Jahresgang die Fettsäure C16:1 ω 5c nachweisen. Laut Literatur ist sie eine für die Gattung *Flexibacter* signifikante Fettsäure, die sich aber auch in Mykorrhiza der Gattung *Glomus* finden läßt (Guckert *et al.*, 1985; Frostegård *et al.*, 1997). In den isolierten Bakteriengattungen war diese Fettsäure beschränkt auf die Gruppe 16 und trat hier in Anteilen von ca. 10% des Gesamtfettsäurespektrums auf. In den nahe verwandten Gattungen *Cytophaga/Flavobacterium* (Hauptgruppe 8) war diese Fettsäure nicht vertreten. Der Ursprung dieser Fettsäure ist daher fraglich. Da jedoch auch andere auf Bodenpilze und Mykorrhiza zurückzuführende Fettsäuren in den Bodenproben in teilweise sehr hohen Anteilen gefunden wurden, ist es möglich, daß diese Fettsäure nicht prokaryontischen Ursprungs ist. Dafür spricht, daß es sich bei den Isolaten der Gruppe 16 um sehr wenige sporadisch isolierte Vertreter handelte.

Findlay *et al.* (1990) bildeten zur quantitativen und qualitativen Beschreibung mikrobieller Gemeinschaften am Beispiel eines marinen Sedimentes aus verschiedenen Fettsäuren sogenannte funktionelle Cluster, die einen Einblick in Dynamiken und Verteilungen prokaryontischer gegenüber eukaryontischen, sowie aerober gegenüber anaeroben Organismen gewähren sollen. Die verschiedenen funktionellen Cluster wurden auf der Basis der bis dahin aktuellen Literatur ermittelt. In diesen Clustern befinden sich wichtige Hauptfettsäuren und Biomarkerfettsäuren von Prokaryonten und Eukaryonten. Durch die breite phylogenetische Verteilung der Mehrzahl der Fettsäuren in Eukaryonten und Prokaryonten können solche Analysen nur einen groben Einblick in die Populationen am Standort geben. Diese funktionellen Cluster können dennoch signifikante Änderungen in der Gesamtstruktur einer Bakteriengemeinschaft in einem Jahresgang aufzeigen und Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft verschiedene Standorte deutlich machen. In Tabelle 18 sind die vier funktionellen Cluster mit ihren Fettsäuren aufgeführt.

Tab.18: Zuordnung von Fettsäuren zu funktionellen Clustern nach Findlay *et al.* (1990), verändert

Cluster I	Cluster II	Cluster III	Cluster IV
Eukaryonten	aerobe Prokaryonten	Gram⁺ und anaerobe Prokaryonten	anaerobe Prokaryonten, Sulfatreduzierer
mehrfach ungesättigte Fettsäuren	einfach ungesättigte Fettsäuren	verzweigt-kettige Fettsäuren C14-C16	verzweigt-kettige Fettsäuren C17-C19, Methylgruppen u. cyclische Fettsäuren
18:2 ω 6c	14:1 ω 5c	14:0iso	17:0iso
18:3 ω 6c	16:1 ω 5c	15:0iso	17:0anteiso
20:2 ω 6,9c	16:1 ω 7c	15:0anteiso	17:0cyclo
20:3 ω 6,9,12c	17:1 ω 8c	16:0iso	19:0cyclo
20:4 ω 6,9,12,15c	18:1 ω 9c	16:0anteiso	10Methyl 17:0
	18:1 ω 7c,9t,12t		10Methyl 16:0
	20:1 ω 9c		
	20:1 ω 9t		

In Abbildung 35 wurden pro untersuchter Parzelle alle vier Cluster in einer Graphik gemeinsam dargestellt. In Abbildung 36 wurden die einzelnen funktionellen Cluster zusätzlich für die verschiedenen Parzellen im Jahresgang gemeinsam dargestellt. Auf diese Weise ist ein übersichtlicher Vergleich der Gruppendynamiken an verschiedenen Probenahmezeitpunkten auf den Parzellen möglich.

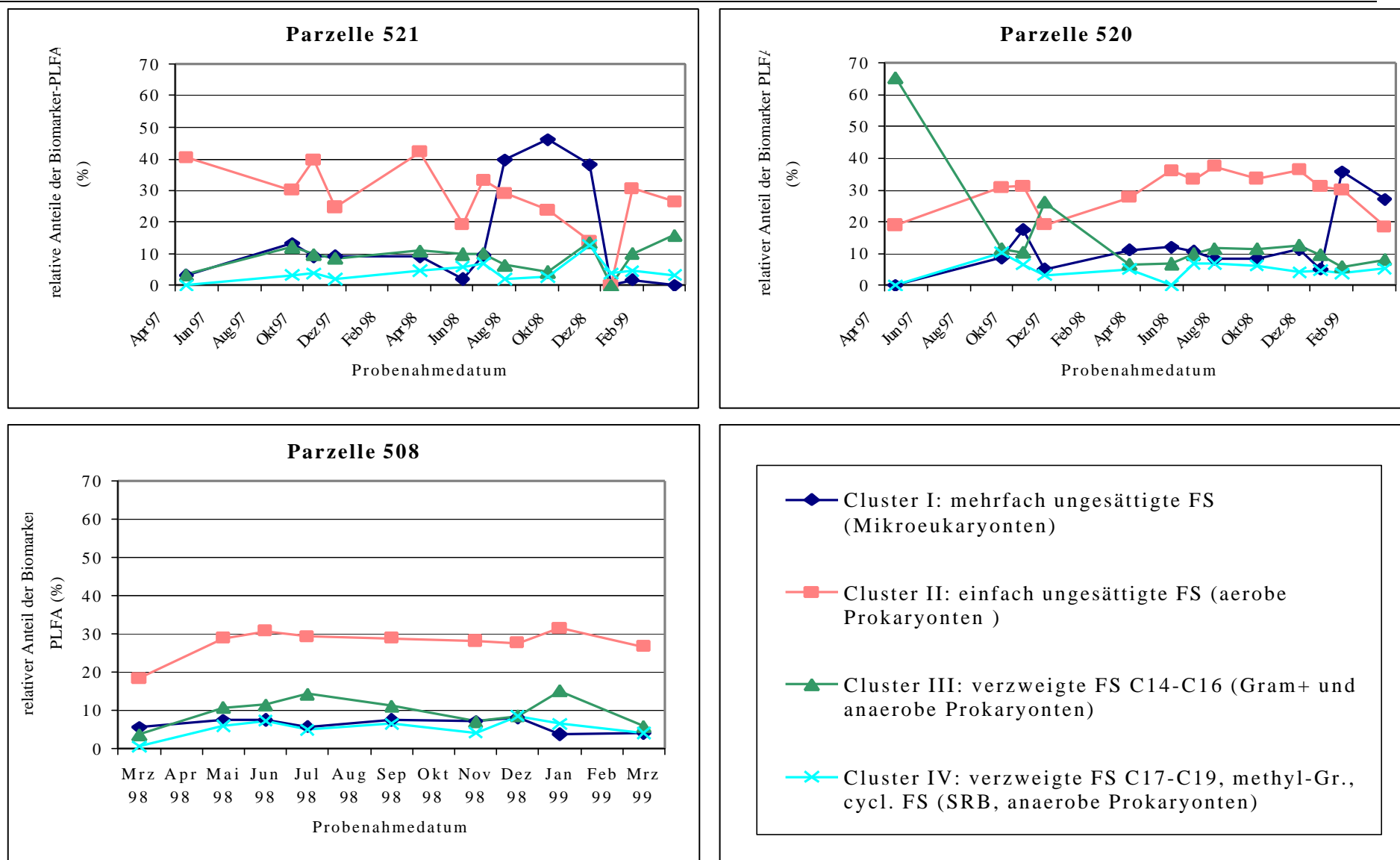


Abb. 35: Bildung distinkter funktioneller Fettsäuregruppen nach Findlay *et al.* (1990). Dargestellt sind pro untersuchter Parzelle alle vier funktionellen Gruppen

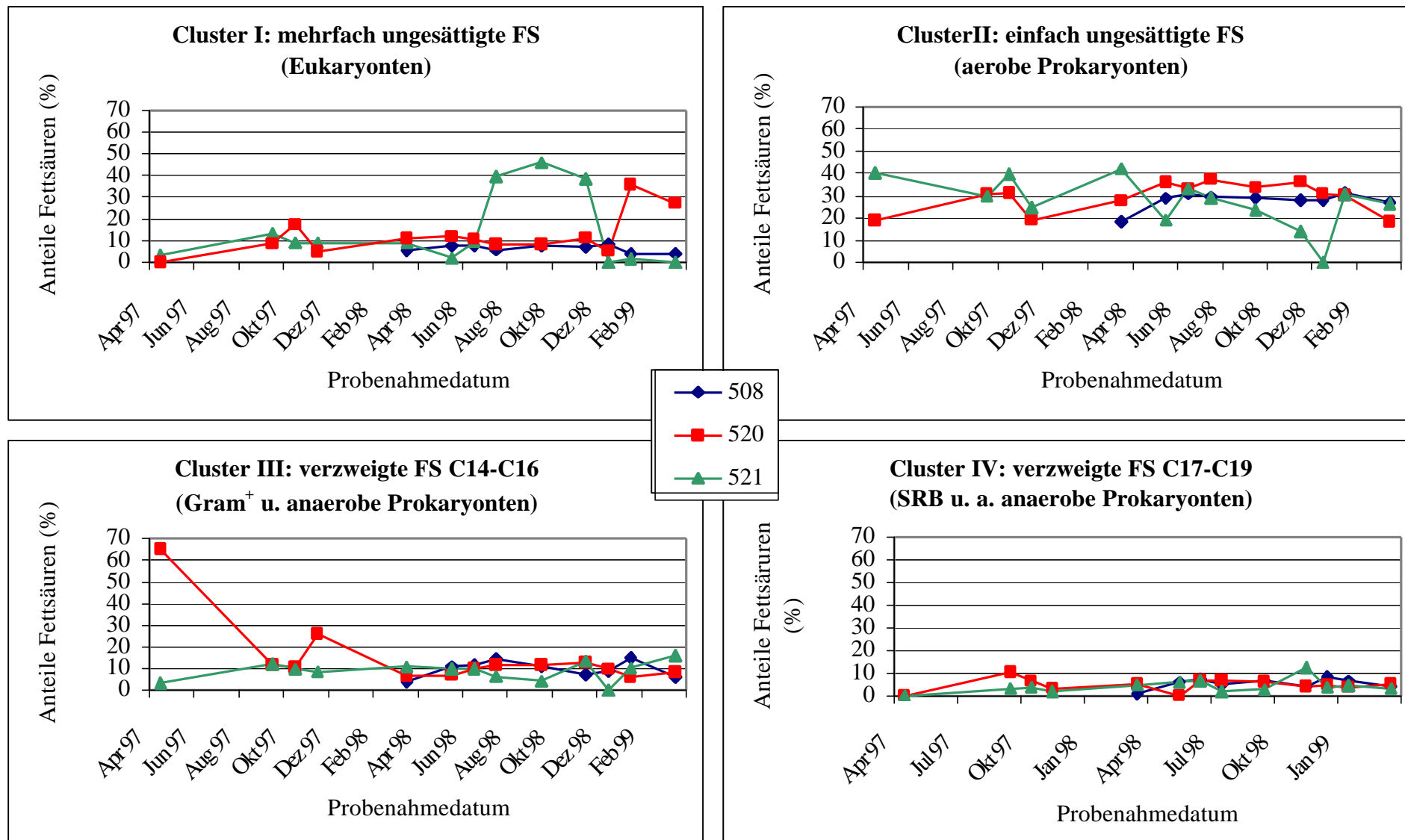


Abb. 36: Bildung distinkter funktioneller Fettsäuregruppen nach Findlay *et al.* (1990). Vergleichende Darstellung jeweils einer dieser vier funktionellen Gruppen im Jahresgang der drei untersuchten Parzellen.

Für die untersuchten Ackerparzellen im Jahresgang ergab sich nach Auswertung der Gesamtfettsäurespektren und Zuordnung zu den funktionellen Clustern folgendes Bild.

Die Graphik bzgl. Parzelle 508 zeigt für alle vier funktionellen Cluster im Jahresgang von März 1998 bis März 1999 ein relativ konstantes Bild mit nur leichten Schwankungen der Anteile der einzelnen Cluster. Es dominierte das funktionelle Cluster II, das für aerobe Prokaryonten steht. Seine Fettsäuren lagen im Jahresgang zwischen 20 und 35% des Gesamtfettsäureanteils. Die Anteile der anderen drei Cluster lagen jeweils bei ca. 10% im Jahresgang. Die einzelnen funktionellen Cluster der Parzellen 520 und 521 wiesen im Jahresgang von April 1997 bis März 1999 gegenüber Parzelle 508 im gleichen Zeitraum stärkere Schwankungen auf.

Bei Parzelle 520 lag der Anteil des funktionellen Clusters II mit 18-38% im gleichen Bereich wie bei Parzelle 508. In den Wintermonaten waren Abnahmen dieser Fettsäuren (einfach ungesättigte Fettsäuren) zu verzeichnen, während ihr Anteil in den Sommermonaten relativ konstant blieb. Die Anteile der mehrfach ungesättigten Fettsäuren des funktionellen Clusters I (Mikroökaryonten) zeigten einen umgekehrten Trend. Bei ihnen war eine leichte Zunahme in den Wintermonaten der Jahre 1998 und 1999 zu verzeichnen. Im Jahresdurchschnitt lag ihr Anteil zwischen 0 und 35%. Von Frühjahr bis Herbst 1998 konnte ihr Anteil konstant mit ca. 10% nachgewiesen werden. Die für Gram⁺ und auch anaerobe Prokaryonten bedeutenden verzweigten Fettsäuren im Bereich C14-C16 (funktionelles Cluster III) zeigten im April 1997 ein Maximum von 65%. Im weiteren Verlauf der Jahre 1997 und 1998 sank ihr Anteil jedoch auf ca. 10% ab, mit Ausnahme des Dezembers 1997. Zu diesem Zeitpunkt stieg ihr Anteil wieder kurzfristig auf 25%. Die für das funktionelle Cluster IV stehenden verzweigten Fettsäuren im Bereich C17-C19 (Sulfatreduzierer und andere anaerobe Prokaryonten) lagen im Jahresgang zwischen 5 und 10%, sanken an einigen Probenahmeterminen jedoch auf nahezu Null ab (April 1997 und Juni 1998).

Einige funktionelle Cluster der Parzelle 521 zeigten ebenfalls einen stark schwankenden Verlauf im Jahresgang. Auffällig war besonders der starke Anstieg des Clusters I (Mikroökaryonten) ab Juli 1998 bis November 1998. An diesen Probenahmeterminen lag der Anteil dieses Clusters bei maximal 55%, während er im sonstigen Jahresverlauf eher einen geringen Anteil zwischen 0 und 12% aufwies. Die in dem funktionellen Cluster II enthaltenen Anteile einfach ungesättigter Fettsäuren (aerobe Prokaryonten) dominierten an allen Probenahmeterminen, außer zum Zeitpunkt des plötzlichen starken Auftretens der Fettsäuren des Clusters I (Mikroökaryonten) ab Sommer bis Winter 1998. Im Jahresgang lag der Anteil

des funktionellen Clusters II zwischen 15 und 45%. Lediglich im Dezember 1998 tendierte er gegen Null. Die Anteile des Clusters III (Gram⁺ und anaerobe Prokaryonten) lagen im Jahrgang 1997 um 10%. Im Dezember des Jahres 1998 sanken sie bis auf 0% ab, konnten aber am nächsten Probenahmetermin (Januar 1999) wiederum mit 10% nachgewiesen werden, und stiegen im März 1999 sogar auf 15% an. Die Anteile verzweigter Fettsäuren (Cluster IV) waren im Jahrgang gering und lagen bei durchschnittlich 8%.

3.3. Molekularbiologische Untersuchungen

3.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Umweltproben, Anreicherungskulturen und Reinkulturen konnte mit den ausgewählten DNA-Extraktionsmethoden erfolgreich durchgeführt werden, so daß die Extrakte nach erfolgter Aufreinigung für die molekularbiologischen Untersuchungen in guter Qualität und in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Dies wurde in einem 1%igen Agarosegel überprüft (Abb. 37). Anhand der Intensität der Banden im Gel wurde die extrahierte DNA verdünnt und die in der PCR jeweils einzusetzende DNA-Menge abgeschätzt.

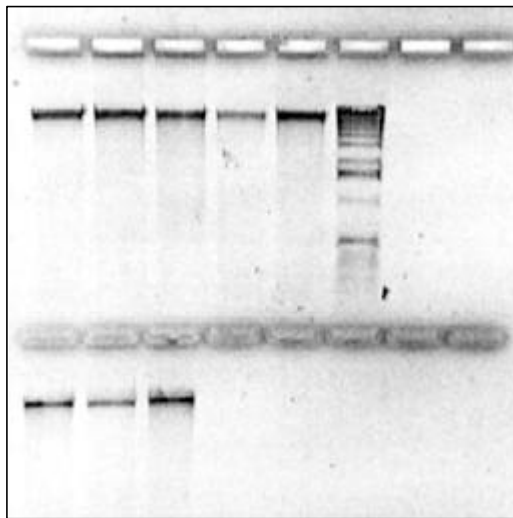


Abb. 37: Agarose Gelelektrophorese (1% Agarose; Laufzeit: 15 min; Spannung: 100 V) von aufgereinigten DNA-Extrakten aus Umweltproben.

Obere Reihe von links nach rechts: DNA-Extrakte aus Umweltproben der Parzelle 508: 22.03.98, 11.05.98, 14.06.98, 28.07.98, 20.09.98, Größenstandard (L1, Boehringer)

Untere Reihe von links nach rechts: DNA-Extrakte aus Umweltproben der Parzelle 520: 22.03.98, 11.05.98, 14.06.98

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit den in Tabelle 4 aufgelisteten Primern wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gearbeitet. Mit den Primern 5'-372 + GC und 3'- 534 konnten Eubacteria-spezifische DNA-Fragmente aus der V3-Region der 16S rDNA in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Die Spezifität der für bestimmte Bakteriengruppen ausgewählten Primer (*Bacillus sp.*, *Cytophaga sp./Flavobacterium sp.* und *Pseudomonas sp.*) wurde an Isolaten der entsprechenden Gruppe und an Bakterien anderer Gruppen getestet, bevor sie zur

Amplifikation von 16S rDNA aus Umweltproben und Anreicherungskulturen eingesetzt wurden. Hierzu dienten zum einen verschiedene Referenz-Stämme (DSMZ), sowie Reinkulturen gewonnener Isolate die nach der Fettsäureanalyse ein „excellent match“ von > 0,7 bzgl. eines Datenbank-Fettsäuremusters des „Microbial Identification System“ (MIS) ergeben hatten. Die Amplifikation von primerspezifischen 16S rDNA-Fragmenten konnte mit Hilfe des entsprechenden PCR-Programms erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 38).

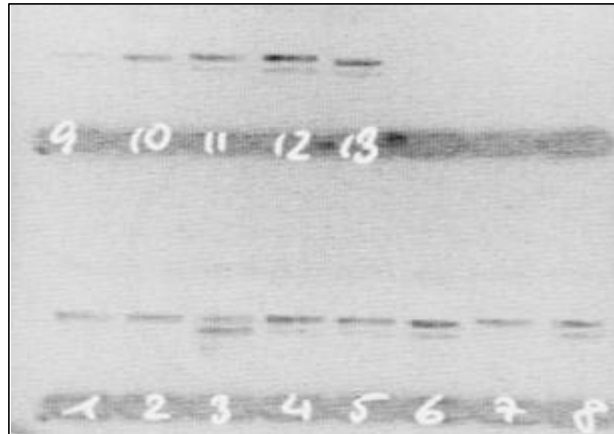
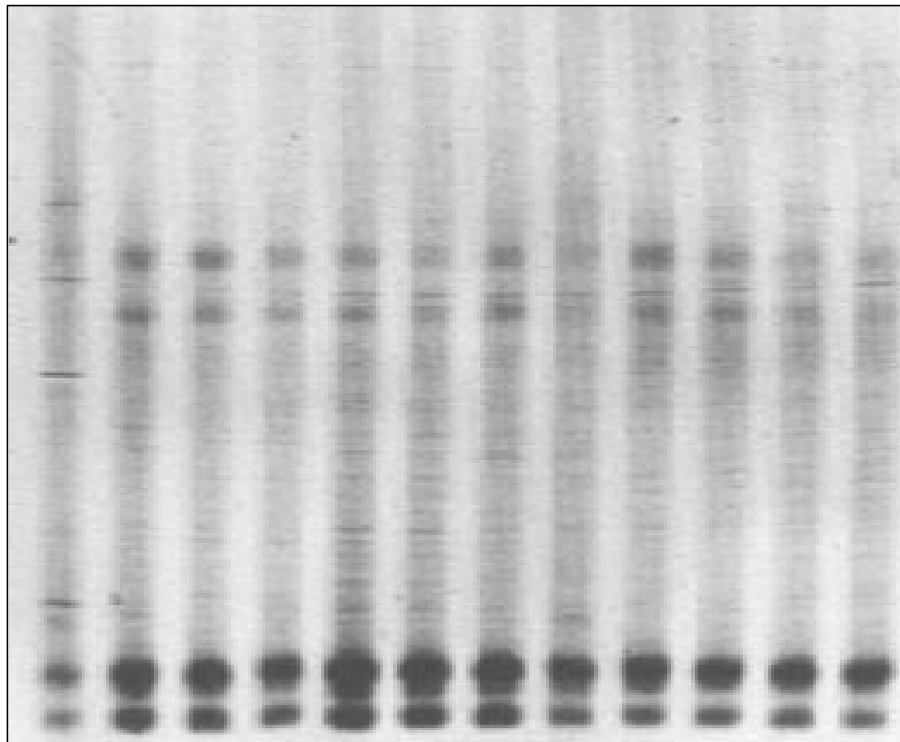


Abb. 38: Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose; Laufzeit: 15 min; Spannung: 100 V) amplifizierter DNA (Primer 5' Start und 3'-1020, spezifisch für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*) eines ca. 1000 bp großen Bereiches der 16S rDNA aus Umweltproben
 Proben 1-13: 16S rDNA-Amplifikate aus Umweltproben der Parzelle 520: 24.04.97, 12.09.97, 12.10.97, 23.11.97, 22.03.98, 11.05.98, 14.06.98, 28.07.98, 20.09.98, 01.11.98, 13.12.98, 17.01.99, 07.03.99

3.3.3 Molekularbiologische Untersuchungen zur prokaryontischen Diversität

Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen mittels DGGE war, potentielle Unterschiede in der Zusammensetzung der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft im Jahresgang aufzuzeigen. Von besonderem Interesse hierbei waren die Auswirkungen ackerbaulicher Maßnahmen wie Düngung, und der Einfluß der angebauten Pflanzenarten, durch einen Vergleich unterschiedlich behandelter Ackerparzellen, zu untersuchen.

Aufgrund der hohen Diversität unterschiedlichster Bakterienarten in den Bodenproben aller untersuchten Parzellen, ergab sich nach Amplifikation von 16S rDNA aus Umweltproben mit Primern für die V3-Region der Eubacteria (5'- 372 + GC und 3'-534) in der Auftrennung amplifizierter 16S rDNA- Fragmente mittels DGGE ein unübersichtliches, nicht auswertbares Bandenmuster (Abb. 39).



520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521
24.04.		12.09.		12.10.		23.11.		22.03.		11.05.	
1997 Gerste								1998 Raps			

Abb. 39: DGGE von eubakteriellen Fragmenten der 16S rDNA.

Dargestellt sind von links nach rechts die Auftrennungen von Amplifikaten der Probenahmen vom 24.04.97, 12.09.97, 12.10.97, 23.11.97 (jeweils Parzelle 520 und 521 nebeneinander)

Daraufhin wurde die PCR auf bestimmte, für die beprobten Parzellen nach den Ergebnissen der Kultivierung möglicherweise dominanter, Bakteriengruppen begrenzt. Es wurden Primer für die Gruppen *Bacillus sp.*, *Cytophaga sp./Flavobacterium sp.* und *Pseudomonas sp.* ausgewählt. Nach erfolgreicher Amplifikation von 16S rDNA-Fragmenten mit diesen Primerpaaren (s. Tab. 4, Abschnitt 2.6.2), die eine ausreichende Spezifität in der Abgrenzung der Zielorganismen von anderen Standortvertretern garantieren, erfolgte eine sog. „nested“ PCR mit den DGGE-Primern 5'-372+GC und 3'-534. Das aus diesen Ansprüchen heraus entwickelte PCR-Programm ist in der Tabelle 4 (s. Abschnitt 2.6.2) aufgeführt.

Auf der Basis von 16S rDNA Analysen mit DNA, die aus Bodenproben isoliert wurde, konnte 1998 ein Jahresgang der Diversität ausgewählter Bakteriengruppen aufgenommen werden. Insgesamt wurden bzgl. Parzelle 520 und 521 Bodenproben von April 1997 bis Januar 1999 untersucht, während Parzelle 508 erst zu Beginn des Jahres 1998 beprobt wurde. Bei der molekularbiologischen Untersuchung wurden Bakteriengruppen ausgewählt, die anhand der Kulturisolate des Standortes wichtige Gruppen der Nitratreduzierer bzw. Denitrifizierer

repräsentierten. Neben den DGGE-Profilen der Umweltproben aufgetragene Amplifikate verschiedener Isolate sollten zeigen, ob Isolate der Gruppen *Cytophaga/Flavobacterium* und *Bacillus* mit den am Standort *in situ* dominanten Vertretern übereinstimmen. Diese Isolate werden in den folgenden Abschnitten 3.3.3.1, Tab. 19 und Abb. 46, sowie 3.3.3.3, Tab. 20 und Abb. 59 dargestellt.

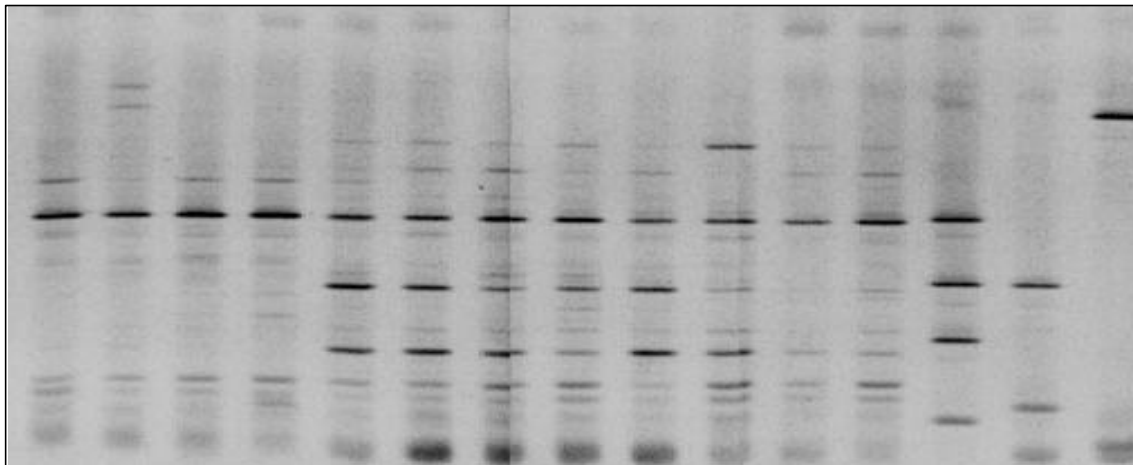
Zur besseren Interpretation und Veranschaulichung der DGGE-Profile sind die Ergebnisse außerdem in Dendrogrammform dargestellt. Die statistische Auswertung und Darstellung der Clusteranalyse erfolgte hierbei mit der Software „STATISTICA 5“ als euklidische Distanz nach dem „Unweighted Pair Group Matching (UPGM)“.

3.3.3.1 Diversität der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang

Eine der Bakteriengruppen, die im Spektrum der Isolate einen signifikanten Anteil hatte, war die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*. Diese Gruppe wurde im Jahresgang vom Frühjahr 1997 bis Winter 1998/99 anhand von 16S rDNA Sequenzen spezifisch aus Standort-DNA der Parzellen amplifiziert und mittels DGGE aufgetrennt. Bei allen Parzellen führte die Amplifikation von 16S rDNA dieser Bakteriengruppe zu einer überschaubaren Anzahl von Amplifikaten, die übersichtlich aufgetrennt werden konnten. Die Ergebnisse für Parzelle 520 sind den Abbildungen 40 und 41 zu entnehmen. Insgesamt konnten 3 sehr stark dominante und mehrere stärkere bis schwache Banden detektiert werden. Es ist klar zu erkennen, daß sich die Diversität innerhalb der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahre 1997 deutlich von der Diversität im Jahr 1998 unterschied.

Im Dendrogramm der statistischen Analyse clustern sie zusammen bei einer euklidischen Distanz von 1,7. Während 1997 nur eine stark dominante Bande auftrat, waren ab März 1998 zwei zusätzliche dominante Banden auszumachen. Im Dezember 1998 und Januar 1999 verringerte sich die Bandenanzahl wieder. Innerhalb eines Jahres war die euklidische Distanz zu den verschiedenen Probenahmeterminen sehr gering und betrug 1997, als auch 1998 lediglich ca. 0,45. Außerdem war eine Clusterung der Frühjahr/Sommerproben und der Herbst/Winterproben 1998 erkennbar. Eine Zuordnung von einigen Isolaten zu bestimmten Banden in den Profilen der Umweltproben war möglich. Das 16S rDNA-Amplifikat von Isolat 335 (*Chryseobacterium balustinum*, SI 0,3) traf eine der dominanten Banden im Profil der Umweltproben, während die Isolate 322 (*Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,25) und 577

(*Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,1) mit einer schwachen Umweltbande im Juni/Juli 1998 konform liefen. Isolat 642 ("no match") lag auf gleicher Höhe mit einer schwachen Bande aller Umweltproben von 1998. Die anderen Isolate 903 (*Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,1), 336 (*Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,57) und 767 (*Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,3) waren keiner Umweltbande zuzuordnen.



Probenahmetermin (Monat)											Isolate		
4	9	10	11	3	5	6	7	9	11	12	1		
1997 Gerste			1998 Raps								1999	335	767
											Weizen	322	577
												903	642
												336	

Abb. 40 : Diversität von: *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 520. Dargestellt sind DGGE-Profile verschiedener Probenahmetermine der Jahre 1997 und 1998, sowie aufgetrennte Amplifikate ausgewählter Isolate dieser Bakteriengruppe

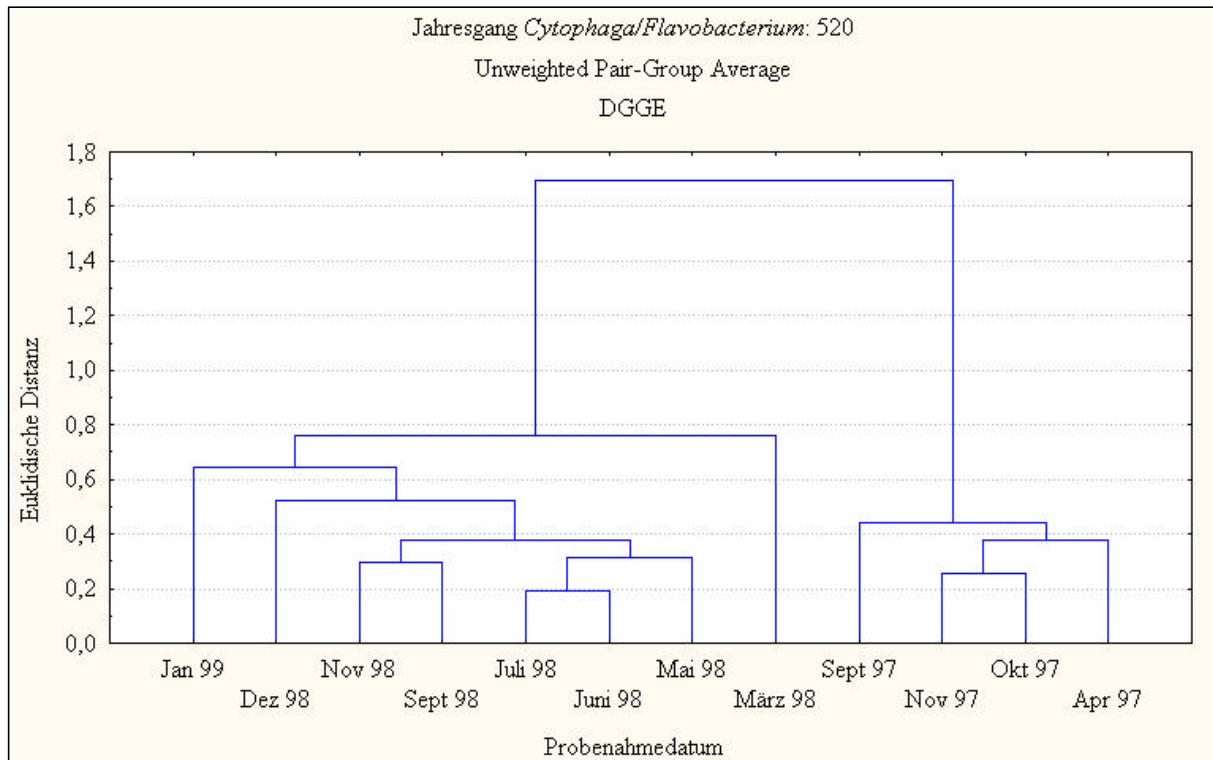
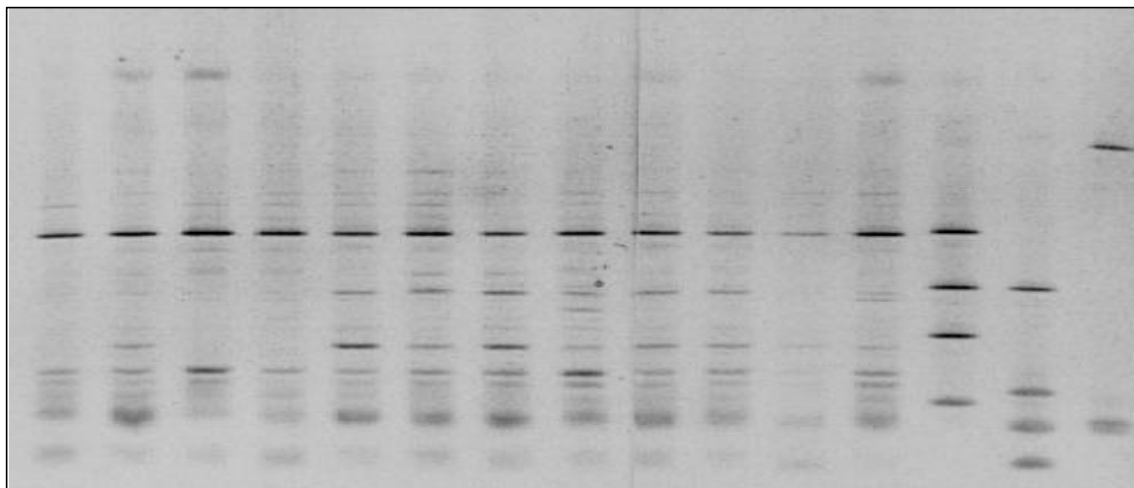


Abb. 41: Diversität von: *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 520. Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 40.

Für Parzelle 521 ergab sich ein sehr ähnliches Bild. Auch hier war in den Abbildungen 42 und 43 ein Unterschied zwischen den Jahren 1997 und 1998 bei einer sehr ähnlichen Bandenanzahl erkennbar. Der Unterschied fiel jedoch geringer aus, als im Vergleich zur Parzelle 520. Das 1997er und 1998er Cluster clustern bei einer euklidischen Distanz von 0,95 miteinander. 1997 waren ebenfalls, wie bezüglich Parzelle 520, weniger Banden erkennbar, als im Jahresverlauf 1998. Wie auch für Proben der Parzelle 520 gezeigt werden konnte, verringerte sich die Bandenanzahl im Winter 1998/1999 wieder. Ebenfalls war eine Clusterung der Frühjahr/Sommerproben und der Herbst/Winterproben 1998 auszumachen. Sie bilden ein gemeinsames Cluster bei einer euklidischen Distanz von 0,45. Ein Vergleich der Banden von Isolaten mit Umweltbanden führte zu dem gleichen Ergebnis wie es bereits für Parzelle 520 beschrieben wurde. Die niedrige euklidische Distanz der Cluster belegen die Ähnlichkeit der DGGE-Bandenmuster innerhalb der Proben 1997 und 1998. Von den ausgewählten Isolaten ließen sich die gleichen Vertreter, wie schon für Parzelle 520 gezeigt werden konnte, mit einigen Banden der Umweltproben in Beziehung setzen.



Probenahmetermin (Monat)												Isolate		
4	9	10	11	3	5	6	7	9	11	12	1	335	767	
1997 Gerste				1998 Raps								1999 Weizen	322	577
												903	642	
												336		

Abb. 42: Diversität von *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 521. Dargestellt sind DGGE-Profile verschiedener Probenahmetermine der Jahre 1997 und 1998, sowie aufgetrennte Amplifikate ausgewählter Isolate dieser Bakteriengruppe

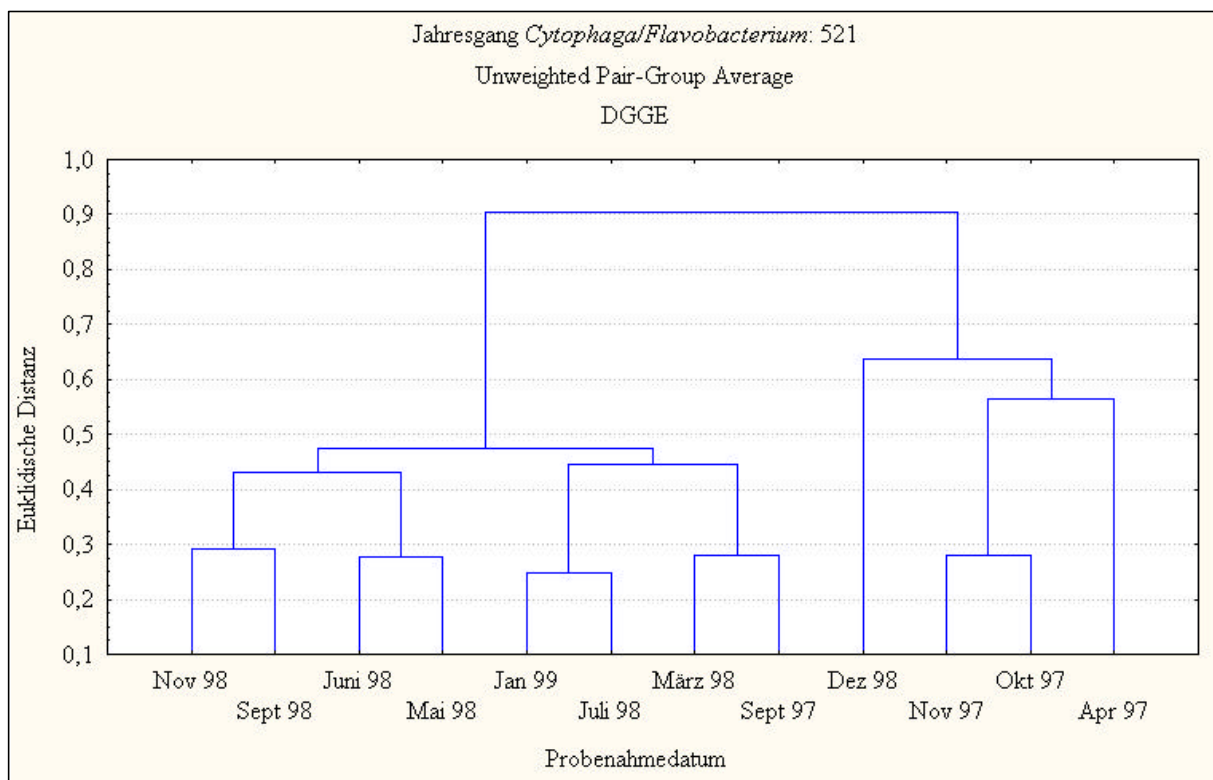
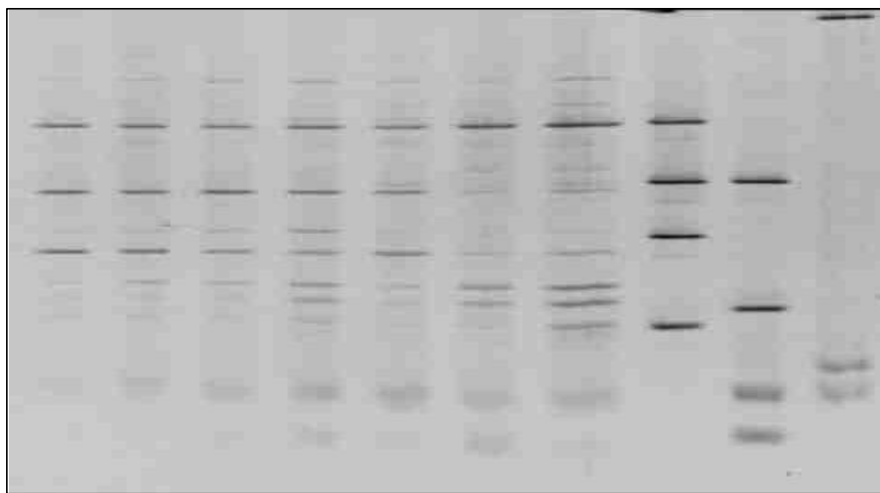


Abb. 43: Diversität von *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 521. Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster (UPGMA) aus Abbildung 42

Auch bezüglich Parzelle 508 war eine Trennung von Frühjahr/Sommer und Winterproben anhand der DGGE-Bandenmuster 1998 zu ersehen (Abb. 44 und 45).

Parzelle 508 zeigte mit den Parzellen 520 und 521 nahezu übereinstimmende Bandenmuster. Innerhalb des Jahres 1998 war kaum eine Veränderung im DGGE-Bandenmuster der verschiedenen Probenahmeterminen zu erkennen. Im Dezember 1998 und Januar 1999 ließ sich eine der vorher stark dominanten Banden nur noch schwach nachweisen. Auch zu den Umweltbanden der Parzelle 508 ließen sich einige der ausgewählten Isolate wie bereits beschrieben zuordnen.



Probenahmetermin (Monat)							Isolate	
3	5	6	7	9	11	12		767
1998 Raps							335	
							322	577
							903	
								642
							336	

Abb. 44: Diversität von *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 508. Dargestellt sind DGGE-Profile verschiedener Probenahmeterminen des Jahres 1998, sowie aufgetrennte Amplifikate ausgewählter Isolate dieser Bakteriengruppe

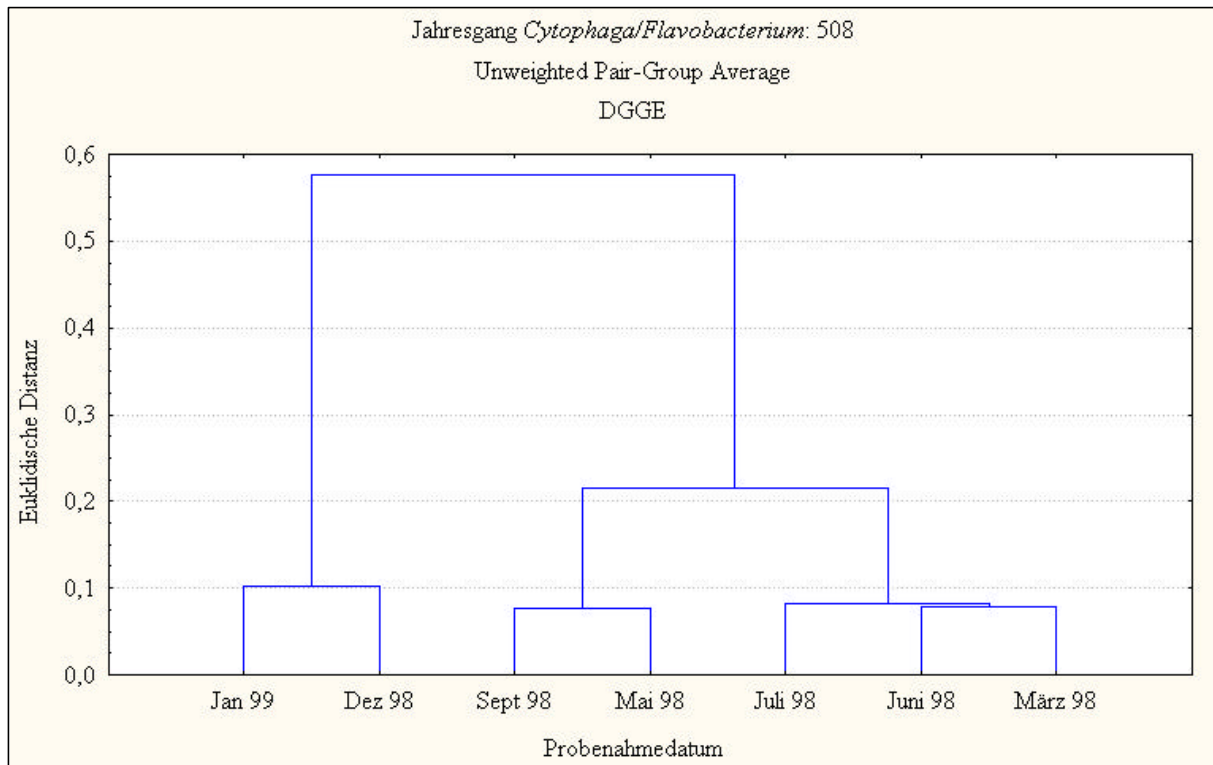


Abb. 45: Diversität von *Cytophaga/Flavobacterium* im Jahresgang in Parzelle 508. Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster (UPGMA) aus Abbildung 44.

Ebenfalls amplifizierte und mittels DGGE aufgetrennte 16S rDNA von Isolaten der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* sollte zeigen, ob sich Banden isolierter Vertreter dieser Gruppe einzelnen Banden in den Bandenmustern der DGGE-Profile aus Umweltproben zuordnen lassen. Ausgewählt hierfür wurden die in Tabelle 19 aufgelisteten Isolate, welche sämtlich nach Amplifikation mit den Primern 5'- Start und 3'- 1020 ein Produkt lieferten. Einige dieser Vertreter wurden in den Graphiken der Jahresgänge bereits berücksichtigt. Als zusätzliche Informationen zu den Isolaten sind außer der Identifizierung mit dem Microbial Identification System („closest match“ und Similaritätsindex), der Isolationszeitpunkt, die Koloniemorphologie, das Isolationsmedium und die Parzelle aus der das jeweilige Isolat stammt, angegeben. Auch diejenigen Isolate, welche nach der Fettsäureanalyse („closest match“) nicht den Gattungen *Cytophaga* oder *Flavobacterium* zuzuordnen waren, aber innerhalb von 25 euklidischen Distanzen mit dieser Gruppe im Dendrogramm clusterten und bei einer Amplifikation mit den spezifischen Primern ein Produkt lieferten, wurden ausgewählt. Mit wenigen Ausnahmen handelt es sich bei den Isolaten dieser Gruppe nach Beurteilung der Fettsäureanalyse und Zuordnung zu Datenbankeinträgen des MIS um "no matches" (Leff & Brown, 1996).

Tab. 19 : Ausgewählte Isolate der Gruppe 8: *Cytophaga/Flavobacterium* u.a.(n.b.= nicht bestimmt, SI= Similaritätsindex)

Isolat-Nr.	MIS ("closest match")	SI	Parzelle	Koloniemorphologie	Datum	Medium
322	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,259	520	dottergelb, klar, rund	11.05.1998	Maltose
324	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	0,100	520	n.b.	11.05.1998	Maltose
335	<i>Flavobacterium balustinum</i>	0,322	520	dottergelb, klar, rund	11.05.1998	Maltose
336	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,573	520	dottergelb, klar, rund	11.05.1998	Maltose
458B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,100	521	hellgelb-klar, rund	11.05.1998	Maltose
504	<i>Rhodococcus fascians</i> GC subgr. B	0,634	520	gelb-orange, rund, glatt, weich-zäh	24.04.1997	TSB30
508	<i>Arthrobacter aurescens</i>	0,489	520	hellgelb, rund, glänzend, sehr weich	24.04.1997	TSB30
546	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,450	520	gelb-klar, granuliert, wuchernd, flach, weich	24.04.1997	D
561	n. b.		520	gelb-klar, wuchernd, flach, weich, rund	24.04.1997	Doligo
563	n. b.		520	gelb-klar, flach, wuchernd, weich	24.04.1997	Doligo
577	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,094	520	dottergelb, klar, rund	24.04.1997	Doligo
587	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,281	521	gelb-klar, rundlich, Rand klar, weich	24.04.1997	Doligo
603	n. b.		520	orange, rund, klein, trüb, glatt, weich	24.04.1997	TSB3
609	n. b.		520	gelb, rund, glänzend, weich	24.04.1997	TSB3
618	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,221	520	gelb, Rand milchig	24.04.1997	TSB3
619	n. b.		521	beige-braun, Mitte dunkler	24.04.1997	TSB3
629	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,300	521	gelb-orange, Rand heller mit Ausbucht-ungen	24.04.1997	TSB3
642	„no match“		521	gelb-klar, wuchernd, flach, weich / gelb-klar, rund	24.04.1997	TSB3
674	<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,024	520	beige-gelb, klar, rund	24.04.1997	Doligo
685C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,300	520	n.b.	24.04.1997	Doligo
751	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,159	521	beige-klar, grünlich schimmernd, riesig, flach	12.09.1997	C-Mix
753	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,227	521	orange, rund, glänzend	12.09.1997	LB
761	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,413	520	hellorange, rund, glatt	12.09.1997	TSB3
767	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,300	520	gelb-klar, Plaque	12.09.1997	TSB3
780	n. b.		520	bläulich-beige, rund, klein	12.09.1997	C-Mix
782	n.b.		520	beige, rund, winzig	12.09.1997	C-Mix
813	„no match“		520	beige, rund, gewölbt, granuliert, trüb, fest	12.09.1997	TSB30
844	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. V	0,287	520	klar, Plaque	12.09.1997	Maltose
866B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,174	521	beige, rund, glatt, innen dunkler	12.09.1997	Maltose
892B	n. b.		521	beige-klar, rund	12.09.1997	BM+C-Mix
903	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,108	521	dottergelb, klar, rund	12.09.1997	TSB3

Viele der Isolate wiesen Übereinstimmungen in der Kolonimorphologie, aber unterschiedliche Fettsäuremuster mit niedrigen Similaritätsindizes auf. Amplifikate sämtlicher Isolate aus obiger Tabelle wurden mittels DGGE aufgetrennt. Die Ergebnisse verschiedener Gele sind in Abbildung 46, zwecks Zuordnung dieser Isolate zu einer Umweltbande, zusammengefaßt. In der Mitte der Abbildung ist das DGGE-Profil einer Umweltprobe dargestellt. Aufgrund der fast identischen Bandenmuster der Umweltproben aller untersuchten Parzellen im Jahresgang, war das DGGE-Profil einer Umweltprobe ausreichend für diesen Vergleich (22.03.1998, Parzelle 508).

Die Banden der Isolate wurden mit den DGGE-Bandenmuster dieser Umweltprobe verglichen, um Hinweise auf potentiell dominante Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* unter den Isolaten zu erhalten. Für die Mehrzahl der 16S rDNA-Amplifikate von den 31 hier untersuchten Isolaten fand sich keine adäquate Bande in der Umweltprobe. Dies zeigte der Vergleich der Lauflänge dieser ca. 200 bp langen Fragmente im DGGE-Gel unter gleichen Elektrophoresebedingungen. Bei einigen Isolaten konnte jedoch eine Übereinstimmung nachgewiesen werden.

Die Auswertung des Laufverhaltens der Amplifikate zeigte, daß es sich bei den 31 getesteten Isolaten um mindestens 20 verschiedene Sequenzen handelt. Ca. 50 % der Isolate wurden demnach nur einmal isoliert, während weitere 50% vier häufiger vertretenen Sequenzen zuzuordnen sind, vorausgesetzt es handelt sich um die gleiche Sequenzabfolge, welches jedoch nicht mittels Sequenzierung überprüft wurde. Hierbei handelte es zum einen um die Isolate 322, 561, 563, 577, 587, 618 und 629, welche als *Flavobacterium johnsoniae* (MIS; SI 0,1-0,3) identifiziert wurden, und deren Banden leicht über der zweiten Umweltbande lagen. Zum anderen um die Isolate 751, 753 und 844, deren „closest match“ nach dem MIS ebenfalls *Flavobacterium johnsoniae* (SI ca. 0,2) war, und die mit der dritten Umweltbande die gleiche Lauflänge im Gel besaßen. Desweiteren die Isolate 619 und 685C, welche als *Xanthomonas maltophilia* mit sehr niedrigem Similaritätsindex identifiziert wurden und mit keiner Umweltbande übereinstimmten. Die Amplifikate weiterer drei Isolate, 504, 603 und 782, lagen ebenfalls auf gleicher Höhe, eine Fettsäureanalyse zur Identifizierung wurde jedoch nicht durchgeführt. Diese Isolate waren ebenfalls mit keiner Umweltbande zu assoziieren. Das Isolat 335 (*Chryseobacterium sp.*; SI 0,322) lief mit der ersten Umweltbande gleich.

Aufgrund der mehrheitlich übereinstimmenden Kolonimorphologie und Lauflänge im Gel, handelte es sich bei den auf gleicher Höhe im Gel befindlichen Isolate mit großer Wahrscheinlichkeit um Isolate der gleichen Art. Es gab aber auch leichte Unterschiede in der

Koloniemorphologie, so daß aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft des relativ kurzen 16S rDNA-Fragmentes eher von noch mehr Arten ausgegangen werden muß.

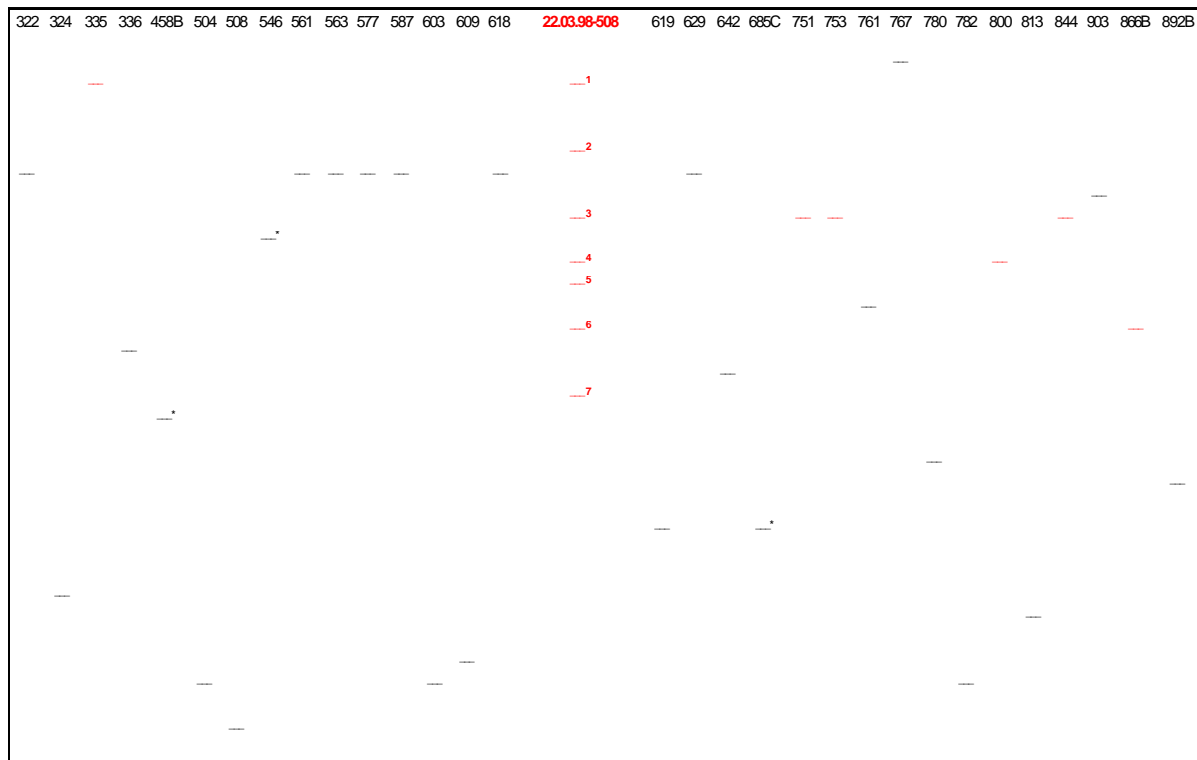


Abb. 46: Lauflänge von Amplifikaten ausgewählter Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* im DGGE-Gel. Zusammenfassung verschiedener DGGE-Gele. Mitte: Umweltprobe vom 22.03.1998, Parzelle 508; rot markiert: mit Umwelbändern gleichlaufende 16S rDNA-Amplifikate von Isolaten

3.3.3.2 Diversität der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* in Anreicherungskulturen

Diese Versuche sollten zeigen, inwieweit die gewählten nährstoffreichen und nährstoffarmen Medien die Standortdiversität der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* repräsentieren. In den folgenden Abbildungen zeigen DGGE-Profile die angereicherte bakterielle Diversität dieser Bakteriengruppe in verschiedenen Medien im Vergleich zu DGGE-Bandenmustern von Umweltproben der Ackerparzellen, sowie die Banden einzelner ausgewählter Isolate. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Bodenproben vom 11.05.98 und 28.07.98. Die Inkubation erfolgte 14 Tage bei 15° C.

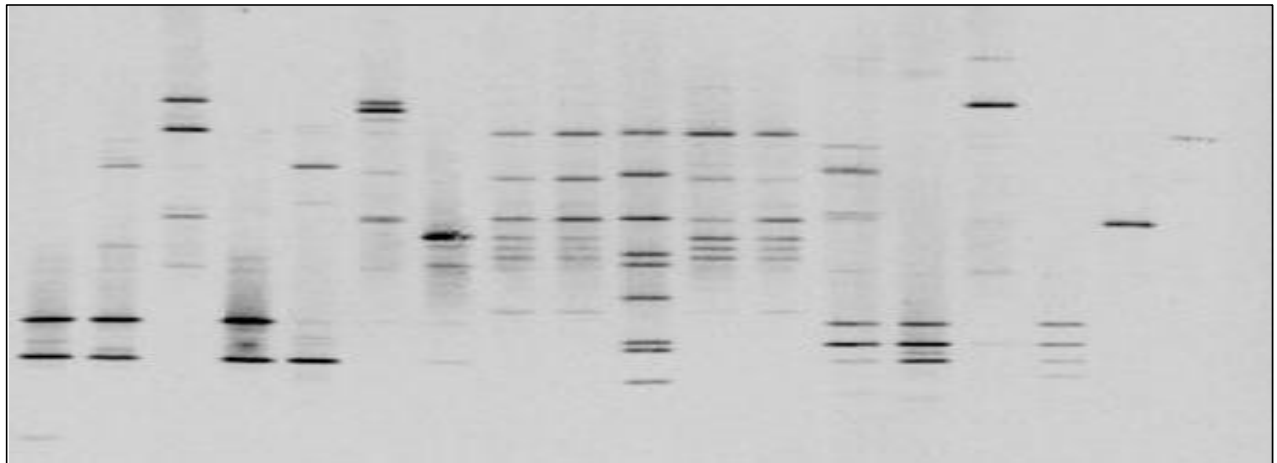
Abbildung 47 zeigt die DGGE-Bandenmuster der Anreicherungskulturen vom 28.07.98 vergleichend mit Umweltproben und einigen Isolaten der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* für die Parzellen 508 und 521.

Pro Medium waren ein bis drei starke dominante Banden und diverse schwächere Banden nachweisbar. Insgesamt ließen sich 42 verschiedene Banden für die diversen Medien

detektieren. In den Umweltproben waren 12-14 Banden (dominante und schwache Banden) deutlich zu erkennen. Es ließ sich keine Übereinstimmung im Bandenmuster der nährstoffreichen Medien wie TSB 30, TSB3 , LB und D mit den DGGE-Profilen der nährstoffarmen Medien Doligo und TSB 0,3 feststellen. Fast keine Bande in den Profilen der nährstoffarmen Medien trat in den Profilen nährstoffreicher Medien auf und umgekehrt. Die dargestellten Isolate wurden fast sämtlich auf nährstoffarmen Medien gewonnen. Drei der Isolate ließen sich im Bandenmuster des Mediums Doligo (Parzelle 508) wiederfinden. Hierbei handelt es sich um die Isolate Nr. 335 (*Chryseobacterium spec.*), 561 (keine Fettsäureanalyse erfolgt) und 751 (*Flavobacterium spec.*). Zwei von ihnen fanden sich, wie bereits erwähnt, auch im Bandenmuster der Umweltproben wieder.

Unterschiede wurden auch bei einem Vergleich der DGGE-Profile von Parzelle 508 und 521 sichtbar. In den Anreicherungskulturen der Medien der Parzelle 521 fanden sich Banden, die in den gleichen Anreicherungen der Parzelle 508 nicht oder nur sehr schwach zu finden waren und umgekehrt. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Bandenmustern der nährstoffreichen und nährstoffarmen Medien. Die Unterschiede innerhalb der nährstoffreichen und nährstoffarmen Medien waren dagegen weniger auffällig. Diese Ergebnisse wurden in der statistischen Auswertung der Bandenmuster als Clusteranalyse ausgedrückt als euklidische Distanz deutlich (Abb. 48).

Die Umweltproben der beiden Parzellen stammten fast völlig überein und bildeten dabei ein eigenes Cluster bei einer euklidischen Distanz von nur 0,4. Die eher nährstoffarmen Medien bildeten mit den ausgewählten Isolaten ein weiteres Cluster (ECLD 1,35), das jedoch in sich Unterschiede aufweist. Eine Ausnahme bildete hier nur das Bandenmuster des Mediums D (521), das mehr Ähnlichkeiten zu den nährstoffarmen, als zu den nährstoffreichen Medien zeigt. Die nährstoffreichen Medien bilden ebenfalls ein eigenes Cluster. Die Anreicherungskultur D ist in beiden Clustern zu finden. Während sich die mit einer Probe der ungedüngten Parzelle 521 beim pflanzlichen Anreicherungsmedium im Cluster der nährstoffarmen Medien wiederfindet, clustert die entsprechende Anreicherung der Parzelle 508 bei den nährstoffreichen Medien.



508							UP '98		Is.	UP '98		521					
Medien							Mai	Mrz	335	Mai	Mrz	Medien					
TSB 30	TSB 3	TSB 0,3	LB	D	Doli	D (M)	508		561	521		TSB 30	TSB 3	TSB 0,3	LB	D	Doli
									751								
									761								
									336								
									642								
									780								
									892B								
									619								

Abb. 47: DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1020 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* aus Umweltproben, Isolaten und Anreicherungskultur-en der Parzelle 508 und 521 im Vergleich (Inkubation anaerob, 14 Tage bei 15° C

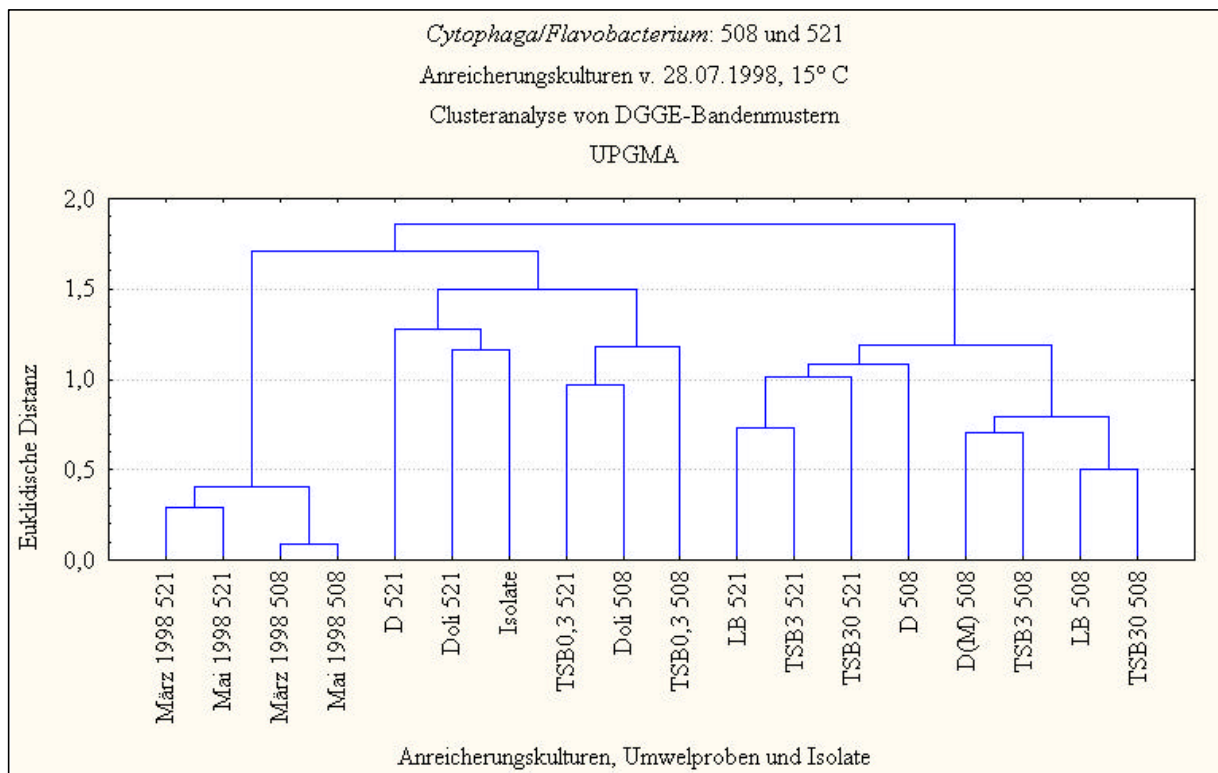
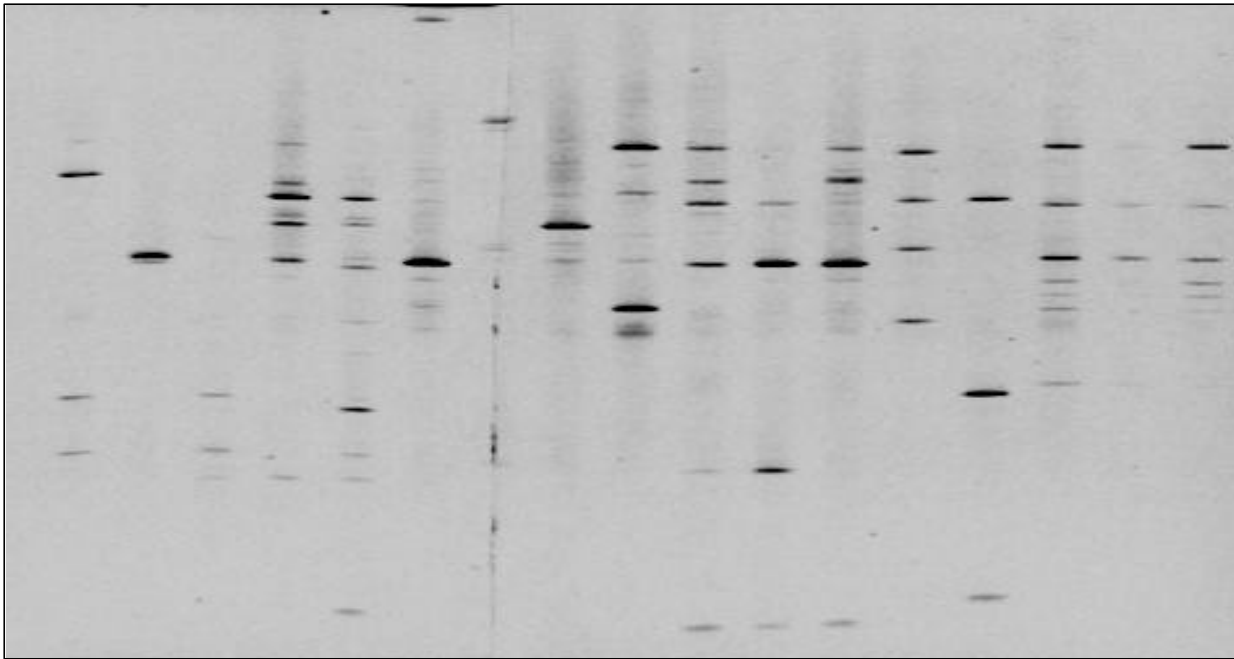


Abb. 48: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 47

Mit Bodenproben der Parzellen 508, 520 und 521 vom 28.07.98 wurden weitere Anreicherungskulturen bei 4°C angesetzt. Nach einer Amplifikation mit für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* spezifischen Primern, wurden die erhaltenen 16S rDNA-Fragmente ebenfalls mittels DGGE aufgetrennt und miteinander verglichen (Abb. 49 und 50). Insgesamt ließen sich 38 verschiedene Banden detektieren. Pro Medium waren jeweils 1-4 stark dominante und diverse schwache Banden zu erkennen. Im Vergleich zur Inkubation bei 15°C zeigte sich ein deutlich verändertes Bandenmuster. Viele Banden, die bei 15°C im stärker denaturierenden Bereich des Gels auftauchten, fehlten bei 4°C. Dafür waren im schwächer denaturierenden Gelbereich diverse Banden dazugekommen. Dies ließ sich deutlich erkennen, wenn man die Bandenmuster der Medien unterschiedlicher Inkubationstemperatur mit denen der Umweltproben vergleicht, die in beiden Gelen aufgetragen sind. Desweiteren waren ebenfalls bei einer Inkubation von 4°C signifikante Unterschiede in den DGGE-Profilen nährstoffarmer Medien im Vergleich zu nährstoffreichen Medien zu verzeichnen. Auch waren deutliche Unterschiede bei einem Vergleich zwischen Bandenmustern der verschiedenen Parzellen zu erkennen. Eine Übereinstimmung von Banden aus Anreicherungskulturen mit einigen schwachen Banden aus Umweltproben war ebenfalls erkennbar.

Die statistische Auswertung in Dendrogrammform zeigt ein vergleichbares Bild zu dem der Anreicherungen bei 15°C. Auch hier bilden die Umweltproben ein eigenes Cluster bei einer euklidischen Distanz von nur 0,25. Die Gesamtheit der ausgewählten Isolate war weder mit den Umweltproben, noch mit den Anreicherungskulturen annähernd vergleichbar. Die einzelnen Medien bilden jeweils eigene Cluster. Eine Ausnahme war die Anreicherung des Mediums TSB 0,3, das mit einer Bodenprobe der Parzelle 508 beimpft wurde. Es clustert mit den Anreicherungen des nährstoffreichen Mediums TSB 30. Abgesehen von dieser Ausnahme waren deutliche Subcluster der einzelnen Medien zu erkennen.



Medien												Isolate		UP		
TSB 30	TSB 30	TSB 30	TSB 3	TSB 3	TSB 3	TSB 0,3	TSB 0,3	TSB 0,3	D	D	D	903	458B	508	520	521
508	520	521	508	520	521	508	520	521	508	520	521	322	577	28.07.1998		
												335	324			
												336				

Abb. 49: DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1020 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* aus Umweltproben (28.07.1998), Isolaten und Anreicherungskulturen (4° C) der Parzelle 508, 520 und 521 im Vergleich

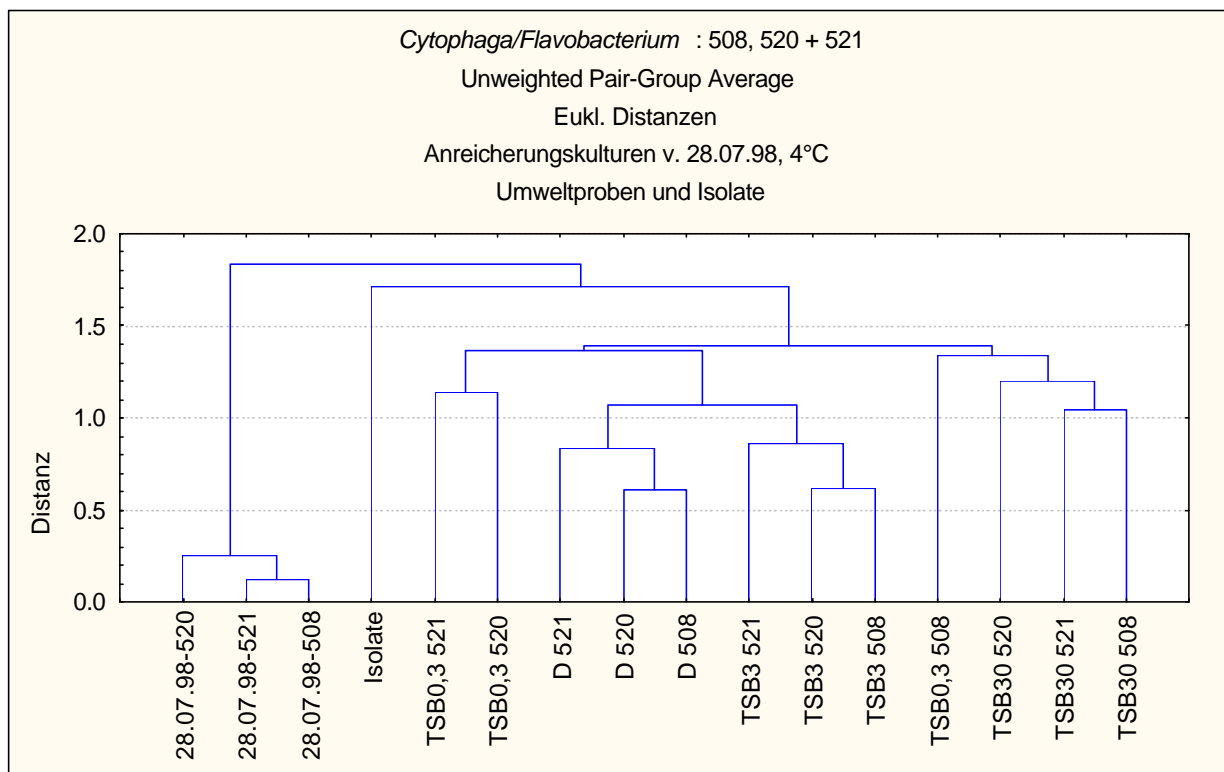
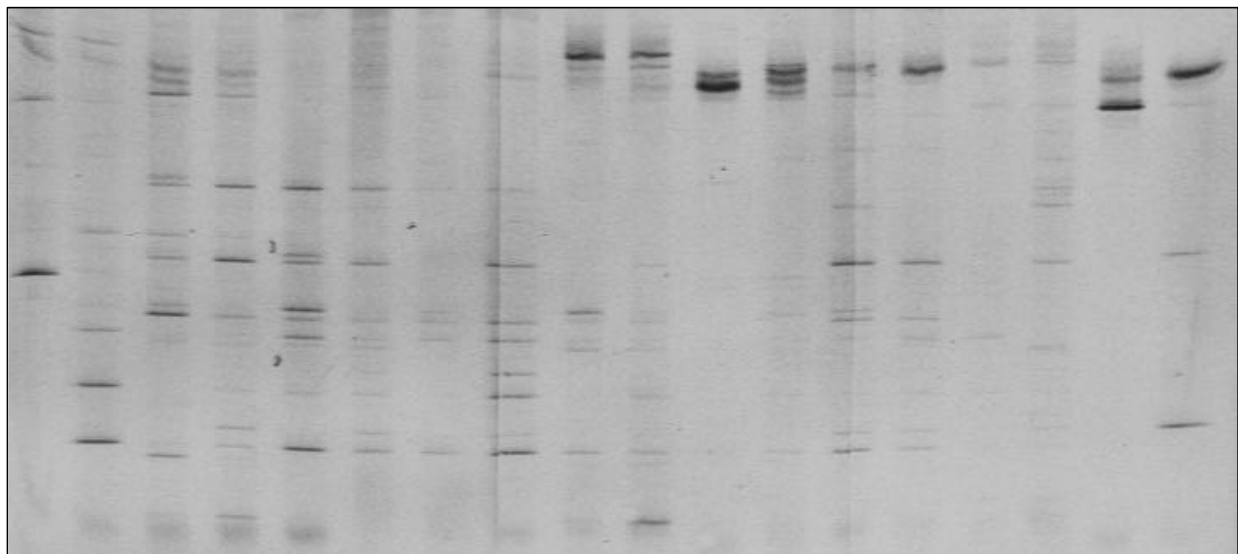


Abb. 50: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 49

Mit Bodenproben der Parzellen 520 und 521 vom 11.05.98 wurden ebenfalls Anreicherungskulturen bei 15°C angesetzt. Insgesamt konnten 30 Banden nachgewiesen werden. Damit konnten eindeutig mehr Banden detektiert werden, als bei der Probenahme im Juli desselben Jahres (Abb. 51). Die einzelnen Bandenmuster der verschiedenen Anreicherungen wiesen zwischen 4 und 13 schwache und dominante Banden auf. Zwischen den Anreicherungen gleicher Medien von Parzelle 520 und 521 waren eindeutige Unterschiede im Bandenmuster erkennbar. Ein Vergleich der DGGE-Profile zeigte ebenfalls gravierende Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien. Die Unterschiede zwischen nährstoffarmen und nährstoffreichen Medien fielen wiederum besonders auf. Die statistische Auswertung (s. Abb. 52) zeigte eine jeweilige Clusterung gleicher Medien beider untersuchten Parzellen. Lediglich Medium LB der Parzelle 521 clustert mit dem TSB 0,3 Medium.



Anreicherungen																Isolate	
TSB 30	TSB 30	TSB 3	TSB 3	TSB 0,3	TSB 0,3	LB	LB	D	D	D oli	D oli	D (M)	D (M)	C-Mix	C-Mix		
520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	322	335
																	458B
																	324

Abb. 51: DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1020 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* aus Anreicherungskulturen vom 11.05.98 (15° C) und Isolaten der Parzellen 520 und 521 im Vergleich

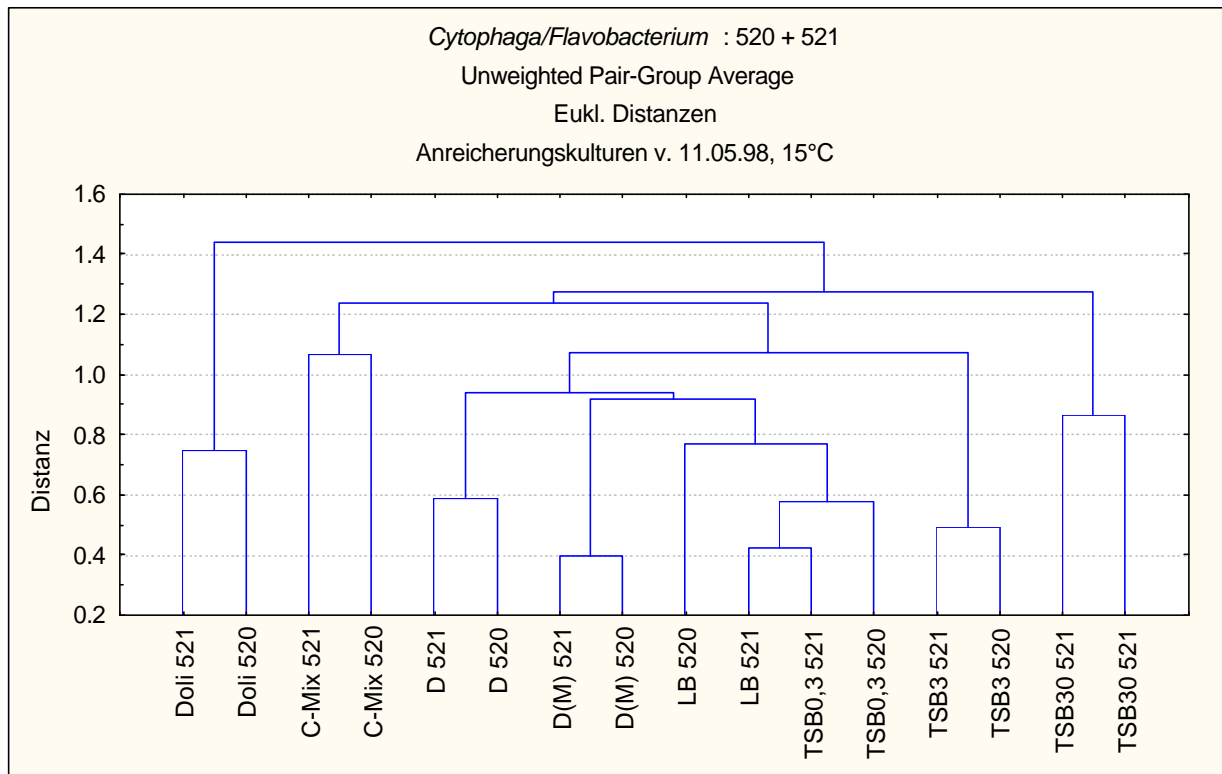


Abb. 52: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 51.

Die DGGE-Profile der Anreicherungskulturen vom 11.05.98 verglichen mit den Kulturen vom 28.07.98 bei 15°C Inkubationstemperatur zeigten sehr große Übereinstimmungen.

3.3.3.3 Diversität der Gruppe *Bacillus* im Jahrgang

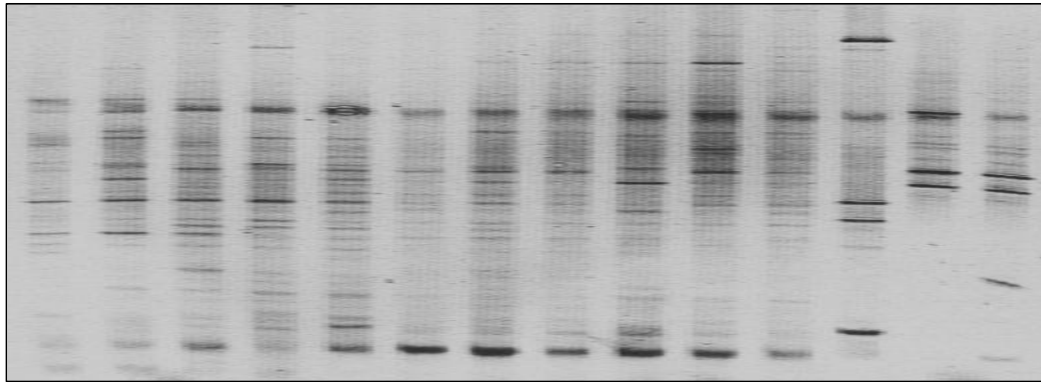
Eine dominierende Bakteriengruppe unter den Isolaten waren die Bacilli. Die DGGE-Gele, welche die Diversität dieser Gruppe darstellten, enthielten überaus zahlreiche Banden und zeigten außerordentlich diverse Bandenmuster. Signifikante Unterschiede im Bandenmuster mit Wechsel der angebauten Pflanzenart (Vergleich zwischen 1997 und 1998) ließen sich beim Betrachten der DGGE-Profile aufgrund der Vielzahl der Banden nicht erkennen. Auf den ersten Blick zeigten sich im Jahrgang 1997 und 1998 keine großen Veränderungen. Bei genauerer Betrachtung und statistischer Analyse ließen sich jedoch einige Unterschiede in den DGGE-Profilen an verschiedenen Probenahmedaten ausmachen. Einige 16S rDNA-Amplifikate von Isolaten wurden ebenfalls auf die Gele aufgetragen und ihre Lauflänge mit Banden aus Umweltproben verglichen. Informationen zu diesen Isolaten sind Tabelle 20 und Abbildung 59 zu entnehmen.

In den folgenden Abbildungen 53-58 ist die Diversität der Bacilli im Jahresgang Herbst 1996 – Winter 1998/99 für die Parzellen 508, 520 und 521 dargestellt. Die mit den für diese Gruppe spezifischen Primern 5'-Start und 3'-1080 amplifizierten und über die DGGE aufgetrennten 16S rDNA-Fragmente zeigten ein sehr komplexes Bandenmuster an allen Probenahmeterminen an. Insgesamt traten pro Spur mindestens 20 - 40 deutliche Banden auf.

Die einzelnen Bandenmuster der verschiedenen Probenahmeterminen erschienen generell sehr ähnlich, lediglich in der Dicke einzelner Banden waren Unterschiede festzustellen. Ein Fehlen oder das Auftreten zusätzlicher Banden an diversen Probenahmeterminen war aufgrund der Komplexität der Bandenmuster sehr schwierig. Auch ein Ausschneiden und Sequenzieren einzelner Banden war nicht möglich, da die Wahrscheinlichkeit, daß sich hinter einer Bande oder eng daneben noch weitere Banden befinden, nicht auszuschließen ist. Die Lauflänge einzelner Isolate verschiedener Arten im DGGE-Gel konnte, wie in den Abbildungen zu sehen ist, das gleiche Laufverhalten zeigen.

Die Auswertung der DGGE-Profile der Bacilli bzgl. Parzelle 520 (Abb. 53) wird klarer bei Betrachtung des Dendrogramms der Clusteranalyse in Abbildung 54.

Diese statistische Auswertung ließ eine klare Abgrenzung der Amplifikate in zwei Cluster und mehrere Subcluster erkennen. Hierbei handelt es sich um die Amplifikate der Jahre 1997 und 1998, welche mit Ausnahme des Amplifikates vom November 1997 eindeutig voneinander getrennt clustern. Innerhalb dieser beiden Cluster waren die Frühjahr- und Sommeramplifikate des Jahres 1998 noch einmal eindeutig voneinander getrennt. Während das Amplifikat vom Oktober 1996 mit den April- und Oktoberamplifikaten von 1997 clustert, zeigen die Amplifikate vom Januar 1999 und Oktober 1997 Übereinstimmungen auf. Aufgrund der Vielzahl der Banden, wurden die Isolate in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.



Probenahmetermin (Monat)											Isolate	
10	4	9	10	11	3	5	6	7	9	1	387A	
1996	1997			1998				1999			306	
Weizen	Gerste			Raps				Weizen			83	282
											71	49
											855A	
											DSM3	
												880B2
											338A	

Abb. 53: Diversität der Bacilli im Jahrgang in Parzelle 520. DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534)

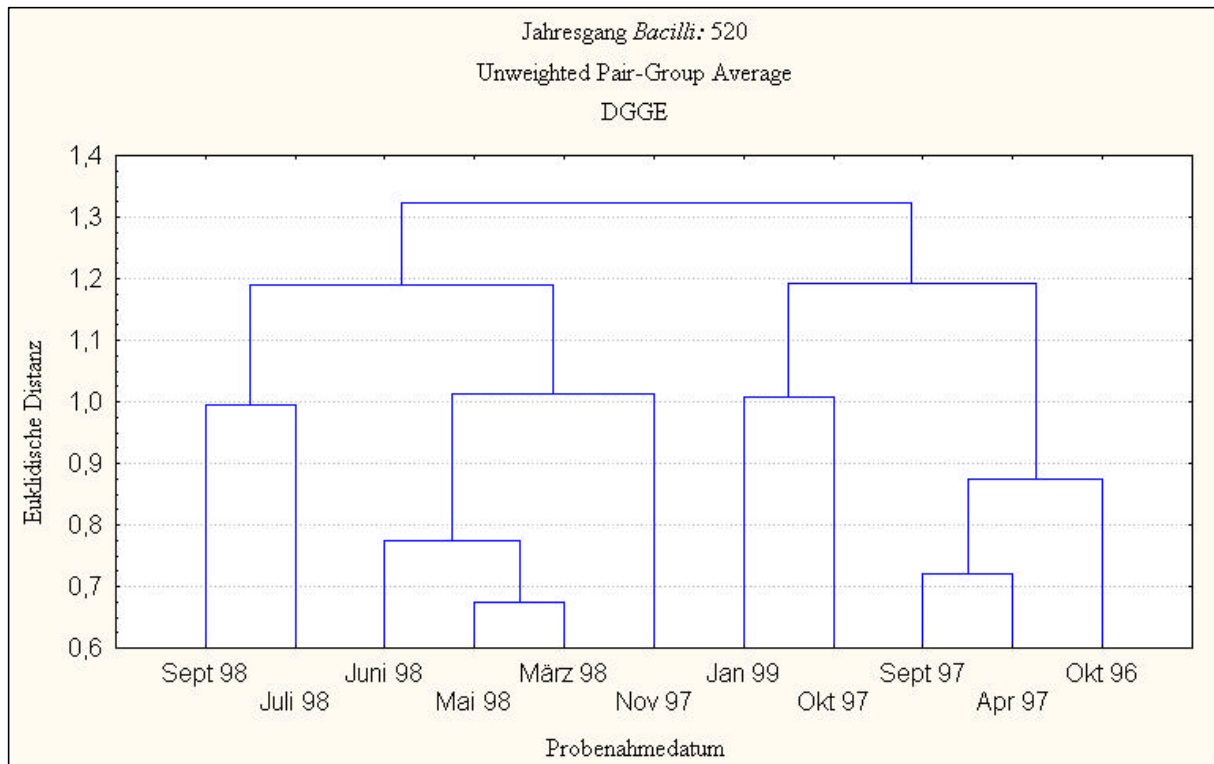
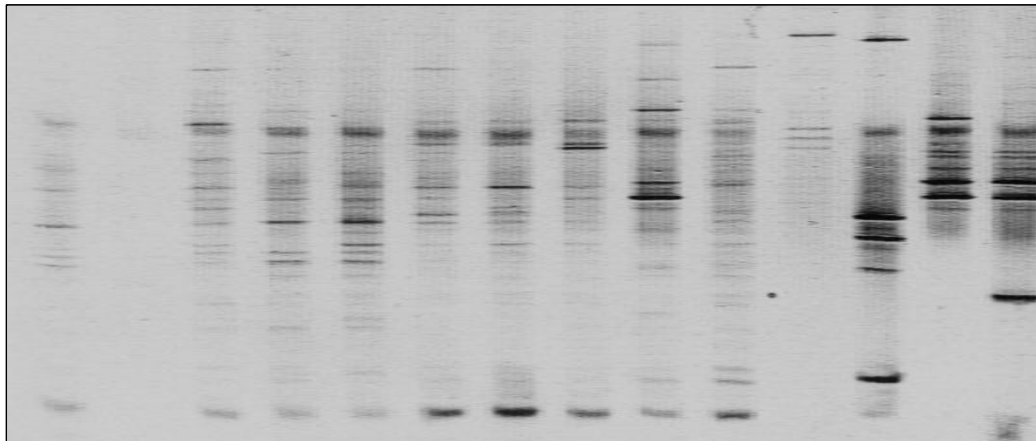


Abb. 54: Diversität der Bacilli im Jahrgang in Parzelle 520. Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster (UPGMA) aus Abbildung 54

Eine Vielzahl von Banden und damit eine hohe Diversität innerhalb der Gruppe der Bacilli konnte auch für die Parzelle 521 nachgewiesen werden (Abb. 55). Die statistische Auswertung in Abbildung 56 zeigt im Dendrogramm eine Subclusterung der Amplifikate von 1996, 1997, 1998 und 1999, wobei die Oktober- und Novemberamplifikate von 1997, die Frühjahrsamplifikate 1998 und die Sommer- Herbstamplifikate 1998 miteinander clustern.



Probenahmetermin (Monat)											Isolate		
10	4	9	10	11	3	5	6	7	9	1	387A		
1996		1997			1998				1999			306	
Weizen		Gerste			Raps				Weizen			83	282
												71	49
												855A	
												DSM3	
													880B2
												338A	

Abb. 55: Diversität der Bacilli im Jahrgang in Parzelle 521. DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534)

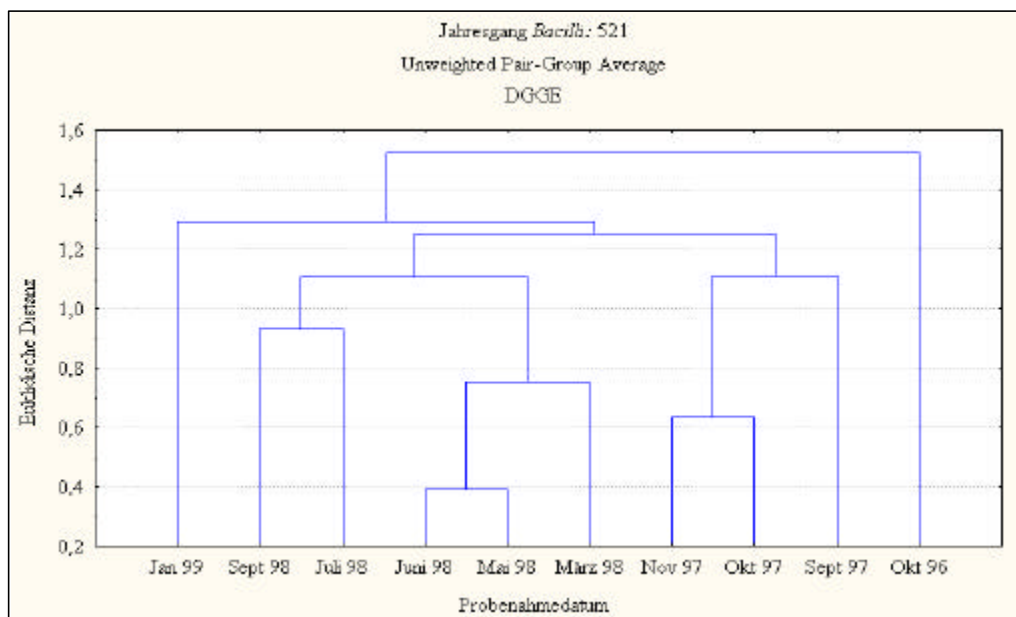
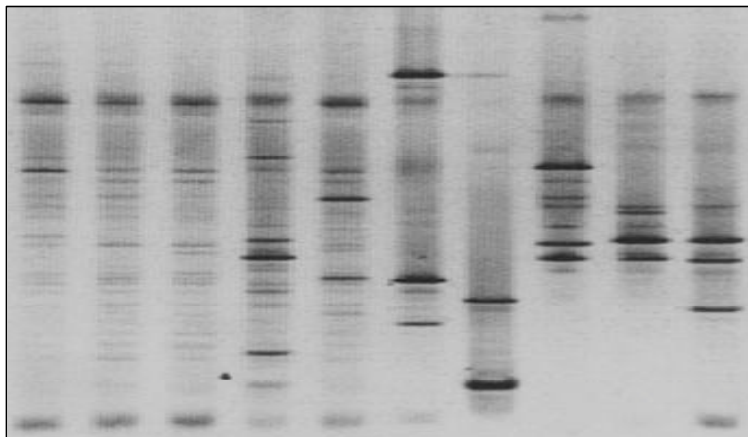


Abb. 56: Diversität der: Bacilli im Jahrgang in Parzelle 521. Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 55

Für die im März 1998 zum ersten Mal beprobte Parzelle 508 ließen sich ebenfalls Übereinstimmungen in den Bandenmustern feststellen. Auch auf dieser Parzelle war eine sehr hohe Diversität der Bacilli zu erkennen (Abb. 57). Sehr ähnlich waren sich die Amplifikate von März, Mai, Juni und September 1998 (ECLD 0,65), während das Juli-Amplifikat mehrheitlich andere dominante Banden aufwies. Gemeinsam bilden sie ein Cluster bei einer euklidischen Distanz von 1,25 (Abb. 58).



Probenahmetermin (Monat)					Isolate				
3	5	6	7	9	387A				
1998									
Raps									
							306		
					855A		83	83	282
						DSM3	71	49	71
						338A			983B

Abb. 57: Diversität der Bacilli im Jahresgang in Parzelle 508. DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534)

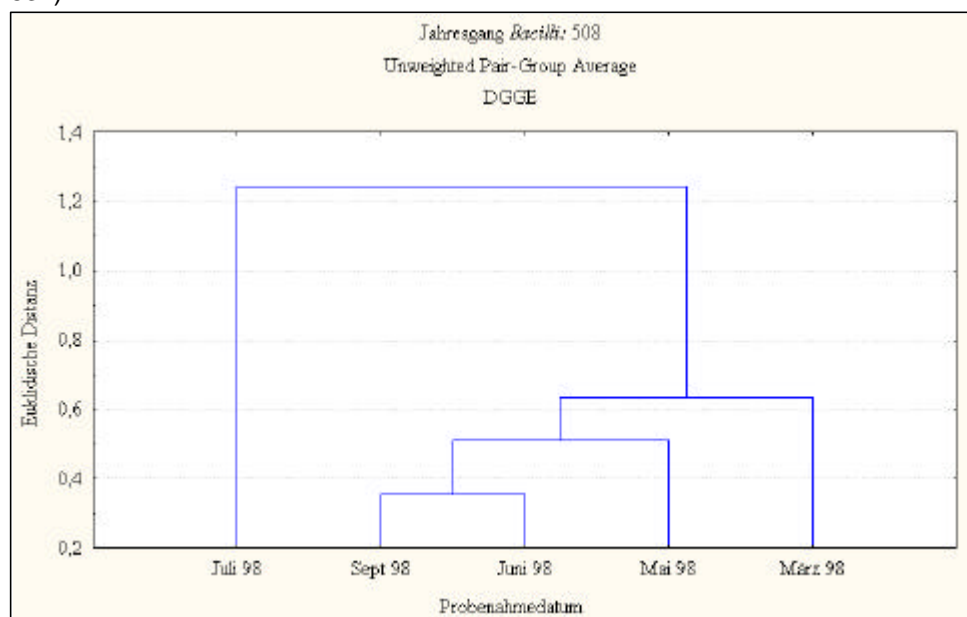


Abb. 58: Diversität der Bacilli im Jahresgang in Parzelle 508. Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 57.

Eine Auswahl der folgenden Isolate aus verschiedenen Gram⁺ Bakterienhauptgruppen, deren "closest match" (MIS) verschiedenen Arten der Gattung *Bacillus* waren, wurden in der folgenden Tabelle 20 näher charakterisiert. Die aufgeführten Bakterienarten wurden häufig isoliert. Ein Vergleich mit dem Laufverhalten von DGGE-Banden aus Umweltproben mit denjenigen der Isolate sollte Hinweise auf eine potentielle Signifikanz dieser Bakterienarten für die untersuchten Ackerparzellen liefern. Die Vielzahl der Banden in den Umweltproben erschwerte jedoch konkrete Aussagen hierzu.

Tab. 20: Ausgewählte Isolate der Gattung *Bacillus*

Isolat-Nr.	MIS	SI	Parzelle	Koloniemorphologie	Medium	Datum
387A	kein MIS		521	n.b.	Doligo	11.05.98
306	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. A / <i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,836 / 0,589	520	n.b.	D(M)	11.05.98
83	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgr. B	0,828	520	n.b.	TSB3	11.05.98
71	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgr. B	0,042	520	mycelartig	D	11.05.98
880B2	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgr. B / <i>B. licheniformis</i>	0,683 / 0,398	521	hellbeige, trüb, feiner gelappter Rand, tiefe Innenkreisrinne	TSB30	12.09.97
49	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgr. A	0,570	520	mycelartig	D	11.05.98
244	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgr. B	0,031	521	n.b.	D	11.05.98
851	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgr. III / IV	0,920 / 0,772	521	beige-bläulich, rund, glatt	BM+C	12.09.97
855A	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>B. atrophaeus</i>	0,892 / 0,584	521	beige-klar, rund, schmaler flacher Rand	C-Mix	12.09.97
338A	<i>Bacillus chitinosporus</i>	0,758	521	beige-klar, rund, Rand körnig	LB	11.05.98
282	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgr. A	0,344	521	n.b.	D(M)	11.05.98
DSM3	<i>Bacillus psychrophilus</i>		-	n.b.	-	

Ebenso wie für Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* wurden auch 16S rDNA-Fragmente verschiedener Isolate der Gattung *Bacillus* mittels DGGE aufgetrennt (Abb. 59). Hierbei zeigte sich am Beispiel der Isolate 282 (*Bacillus mycoides* GC subgr. A, SI 0,35) und 83 (*Bacillus megaterium* GC subgr. B, SI 0,8), die auf gleicher Höhe im DGGE-Gel lagen, die begrenzte Aussagekraft von 16S rDNA-Fragmenten verschiedener Isolate im Hinblick auf die Unterscheidung von Arten. Eine unterschiedliche Basenzusammensetzung führt nicht zwangsläufig zu unterschiedlichem Laufverhalten von 16S rDNA-Fragmenten im Gel. Die Isolate 49 (*Bacillus mycoides* GC subgr. A, SI 0,57) und 71 (*Bacillus mycoides* GC subgr. B, SI 0,04), deren 16S rDNA-Fragmente ebenfalls auf gleicher Höhe im DGGE-lagen, wurde zwar ein einheitlicher "closest match" (aber unterschiedliche GC subgroups) zugeordnet, die

unterschiedlichen Similaritätsindices zum Datenbankeintrag des MIS ließen jedoch auf atypische Stämme oder sogar Unterarten schließen. Anhand ihrer übereinstimmenden mycelartigen Koloniemorphologie wurden jedoch beide Isolate eindeutig als *Bacillus mycoides* identifiziert. Die 16S rDNA-Fragmente der übrigen ausgewählten Isolate (Ausnahme: Isolate 387A und 851) lagen auf unterschiedlicher Höhe im DGGE-Gel. Auch ihre Fettsäuremuster und Koloniemorphologien waren uneinheitlich. Bei ihnen handelt es sich mit Sicherheit um unterschiedliche Arten.

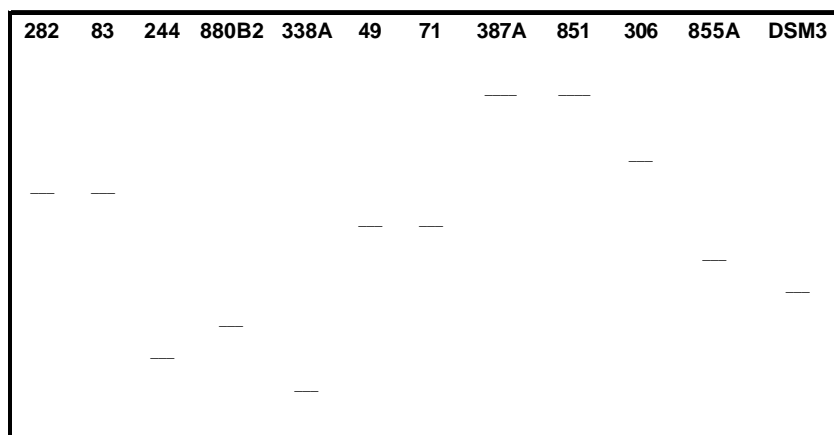
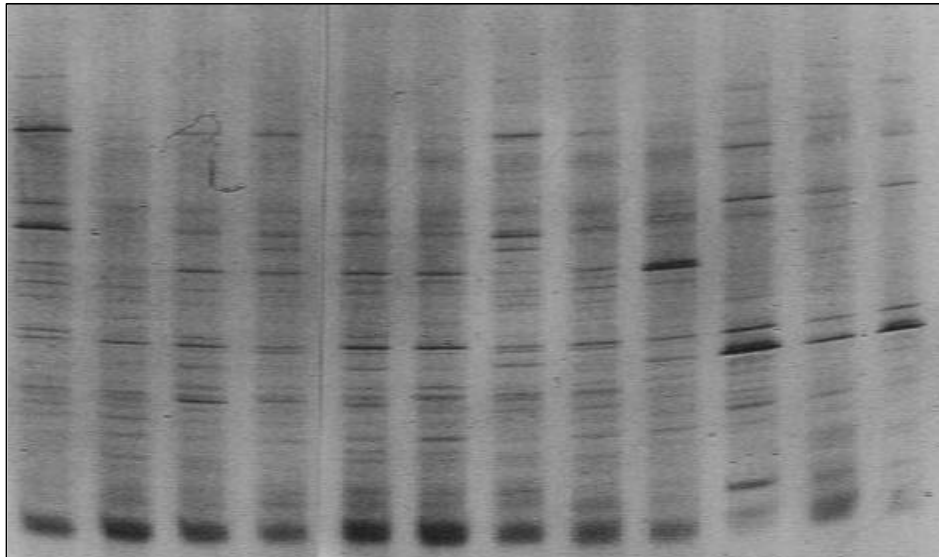


Abb. 59: 16S rDNA-Amplifikate ausgewählter Isolate der Bacilli.

Für einen Vergleich der DGGE-Profile der Parzellen 508, 520 und 521 zu bestimmten Probenahmeterminen untereinander wurden in Abbildung 60 und 61 die Proben von März bis Juli 1998 nebeneinander dargestellt. Während einzelne Banden nur zu bestimmten Jahreszeiten bei den verschiedenen Parzellen auftraten oder dominant erschienen, war bei einer Vielzahl von Banden eine Übereinstimmung im Jahrgang 1998 zu entdecken. Einzelne Amplifikate von Isolaten wurden hier nicht aufgetragen.



Parzellen und Probenahmetermin (Monat)											
508	520	521	508	520	521	508	520	521	508	520	521
22.03.98			11.05.98			14.06.98			28.07.98		
Raps											

Abb. 60: Parzelle 508, 520 und 521 im Vergleich: DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) prokaryontischer rDNA (Gruppe: *Bacillus*) aus Umweltproben.

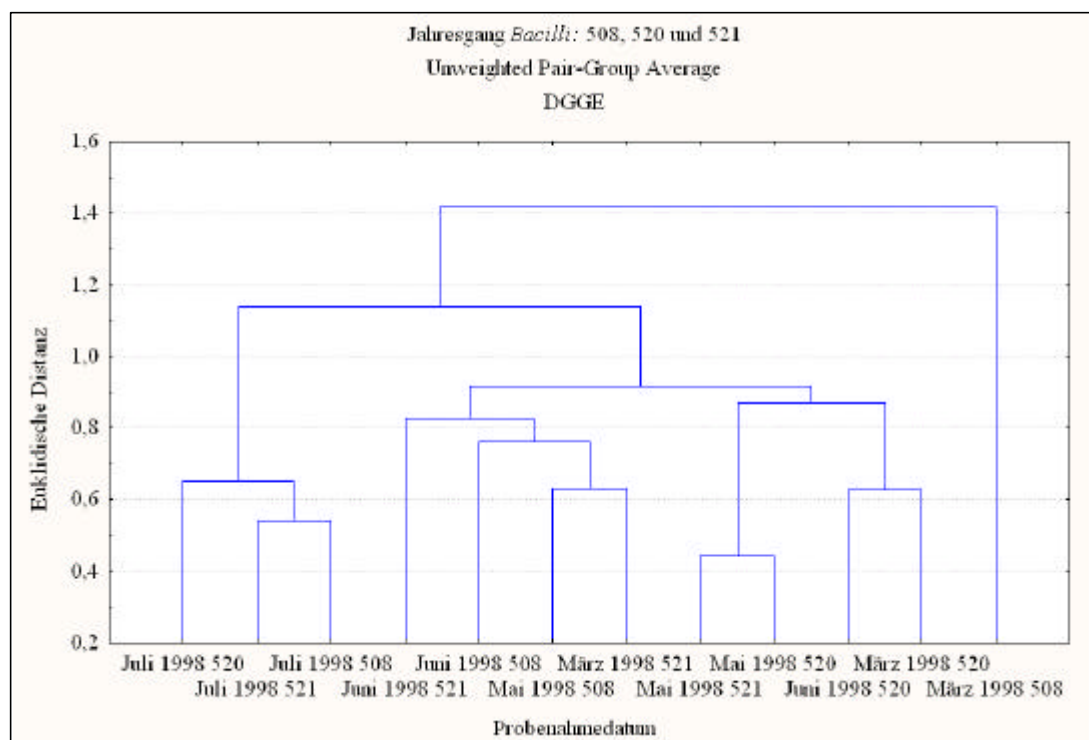


Abb. 61: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 60

In Abbildung 62 sind die DGGE-Profile der 16S rDNA-Amplifikate aus Bodenproben der Parzellen 520 und 521 von September 1997 bis September 1998 vergleichend dargestellt. Die Bandenmuster zeigten zu jedem Probenahmetermin eine hohe Diversität dieser Bakteriengruppe an. Qualitative Unterschiede im Jahresgang waren erkennbar und wurden in der Clusteranalyse besonders deutlich (Abb. 63). An den jeweiligen Probenahmeterminen waren sich die DGGE-Profile beider Parzellen sehr ähnlich und clustern stets zusammen. Im Verlauf des Jahresganges von 1997 und 1998 waren jedoch Änderungen im Bandenmuster zu verzeichnen. Die September und Oktoberproben bilden ein eigenes Cluster bei einer euklidischen Distanz von 0,75. Ebenso bilden die Proben vom Juli und September 1998 ein eigenes Cluster bei 0,9 euklidischen Distanzen. Die übrigen Proben des Jahres 1998 clustern mit den Novemberproben 1997. Bei einer euklidischen Distanz von nur 1,2 bilden alle Proben ein gemeinsames Cluster.

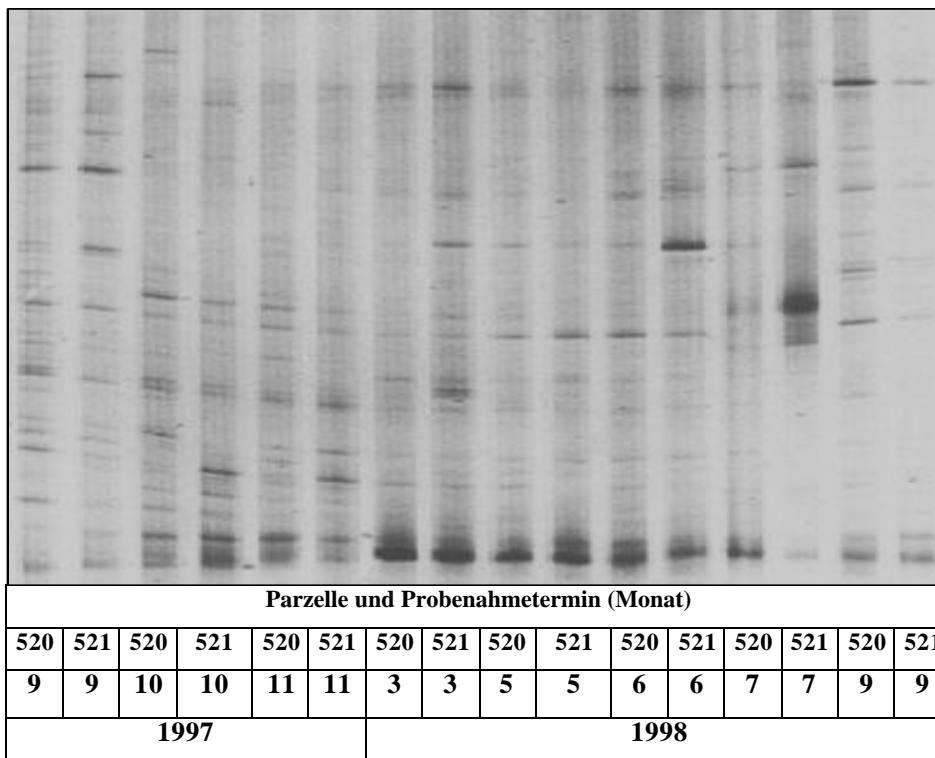


Abb. 62: Parzelle 520 + 521: Diversität der Bacilli im Jahresgang 1997-1998
DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) prokaryontischer rDNA (Gruppe: *Bacillus*) aus Umweltproben.

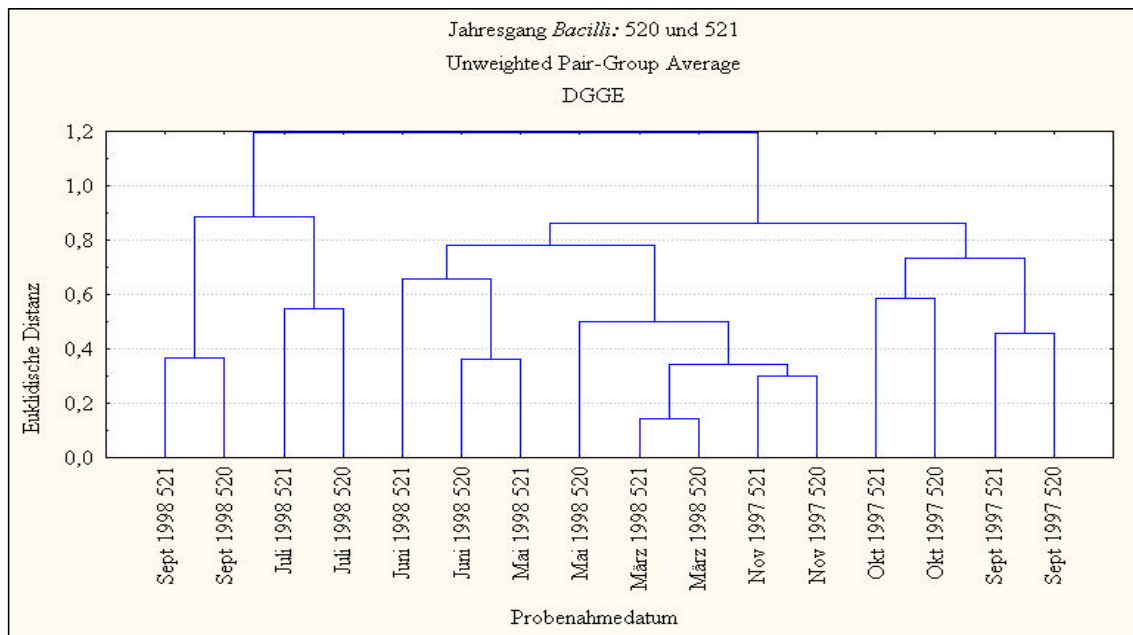
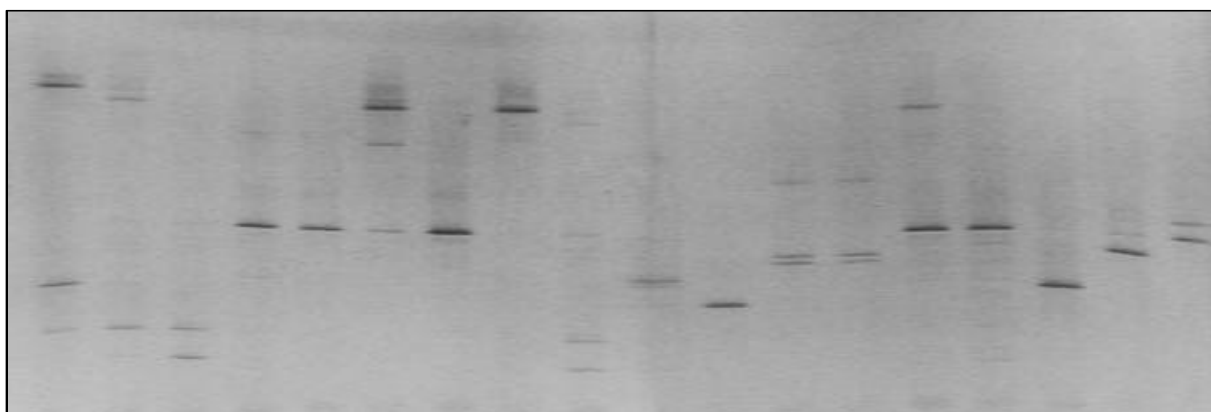


Abb. 63: Diversität der *Bacilli* im Jahresgang in Parzelle 520 und 521. Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abb. 62

3.3.3.4 Diversität der *Bacilli* in Anreicherungskulturen

In Abbildung 64 und 65 ist die bei 15°C aus Bodenproben vom 11.05.98 angereicherte Diversität diverser *Bacilli* für die Parzellen 520 und 521 dargestellt. Pro DGGE-Spur waren zwischen einer und drei Banden erkennbar. Insgesamt ließen sich 14 verschiedene Banden detektieren. In der Clusteranalyse sind zwei deutliche Sub-Cluster zu erkennen.



Is.	TSB 30	TSB 30	TSB 3	TSB 3	TSB 0,3	TSB 0,3	B	I	LB	D	D	Doli	Doli	D (M)	D (M)	M	M	Is.
387A	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	520	521	282+83	
352																	71	
338A																		

Abb. 64: Parzelle 520 und 521: Diversität der *Bacilli* in Anreicherungskulturen vom 11.05.98, 15°C + einige Isolate dieser Bakteriengruppe. DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 1080 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) prokaryontischer rDNA (Gruppe: *Bacillus*)

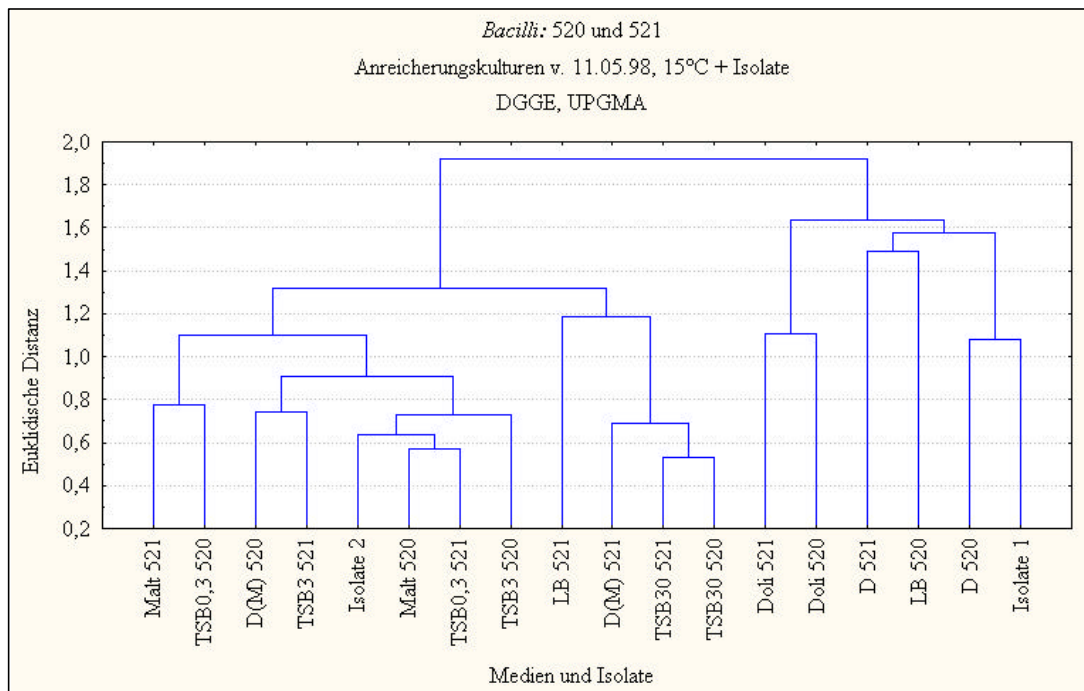
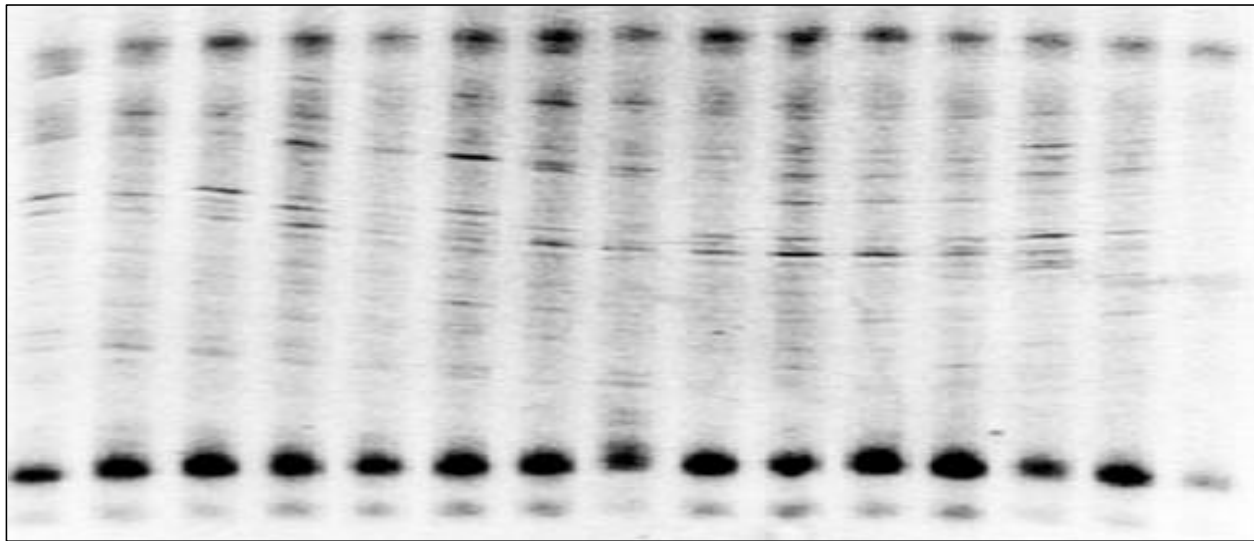


Abb. 65: Diversität der Bacilli in Anreicherungskulturen der Parzellen 520 und 521 (11.05.98., 15°C). Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abbildung 64.

3.3.3.5 Diversität der Gruppe *Pseudomonas* im Jahrgang

Aus der Gruppe der γ -Proteobacteria wurde die *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe detailliert untersucht. Mit spezifischen Primern wurden Fragmente der 16S rDNA von Pseudomonaden aus Umweltproben des Frühjahrs und Sommers 1998 amplifiziert und mit Hilfe der DGGE aufgetrennt. Die Ergebnisse zeigten ähnlich wie bei der Gruppe der Bacilli eine im Jahrgang sehr hohe Diversität. Unterschiede im Bandenmuster waren aufgrund der hohen Bandenzahl kaum auszumachen. Es ließen sich jedoch Unterschiede in der Dominanz einzelner Banden erkennen (Abb. 66 und 67). Die Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster verdeutlichte die Ergebnisse. Ein Gesamtcluster aller Proben lag bei einer euklidischen Distanz von eins. Mit Ausnahme der Probe vom Juni 1998 bilden sich aus den sonstigen Proben zwei distinkte Cluster bei einer euklidischen Distanz von jeweils 0,4 bzw. 0,45. Hierbei handelt es sich zum einen um die Proben vom März und Mai 1998, zum anderen um die Proben vom Juli und September 1998. Während die Probe der Parzelle 508 im März/Mai-Cluster liegt, fällt die Probe der Parzelle 521 in das Juli/September-Cluster. Lediglich die Juni-Probe der Parzelle 520 clustert mit keiner anderen Probe. Sie unterscheidet sich nach der

Clusteranalyse um eine euklidische Distanz von 0,3 von allen anderen Proben. Insgesamt zeigte sich eine eher einheitliche Diversität über den beprobten Zeitraum.



Probenahmetermin (Monat) und Parzelle														
508	520	521	508	520	521	508	520	521	508	520	521	508	520	521
22.03.1998			11.05.1998			14.06.1998			28.07.1998			20.09.1998		
Raps														

Abb. 66: Diversität der Gruppe *Pseudomonas* im Jahresgang in Parzelle 508, 520 und 521. DGGE-Profile von 16S rDNA-Amplifikaten (Primer 5'- Start und 3'- 660 + Primer 5'372 + GC und 3'- 534) prokaryontischer rDNA (Gruppe: *Pseudomonas*) aus Umweltproben der Parzelle 508, 520 und 521 im Vergleich

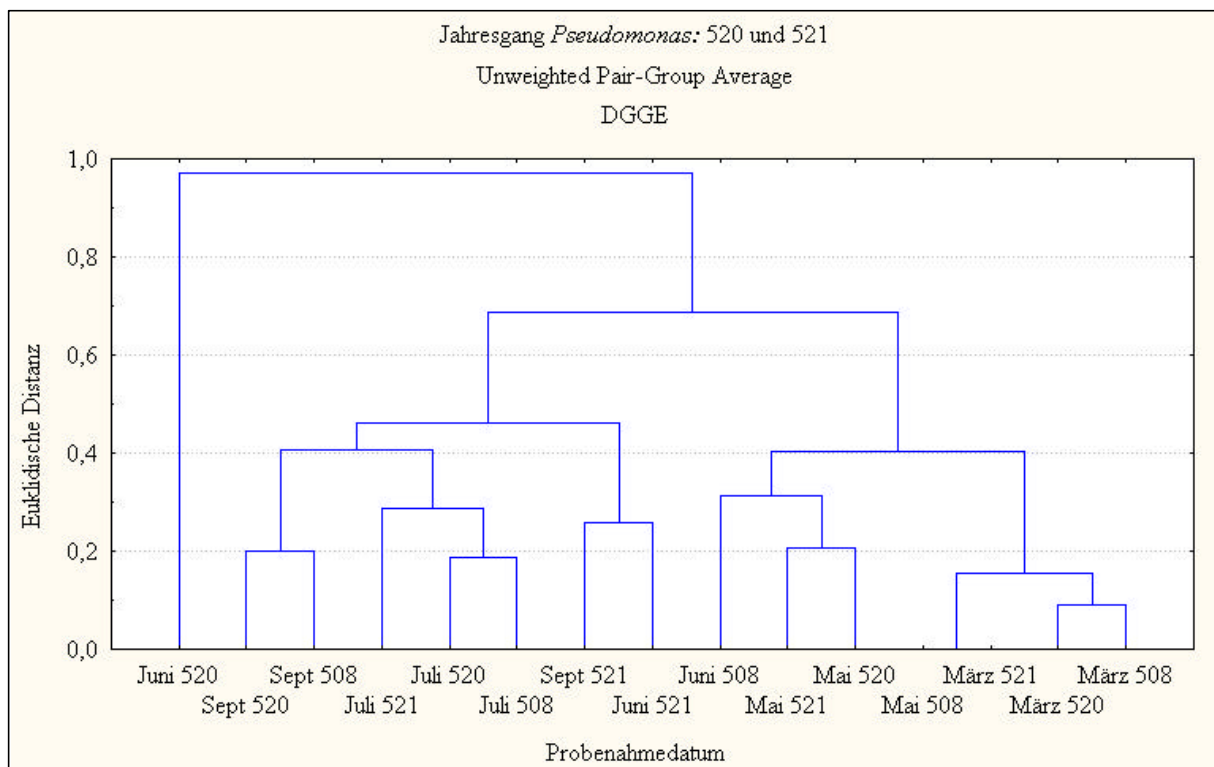


Abb. 67: Diversität der Gruppe *Pseudomonas* im Jahresgang in Parzelle 520 und 521. Clusteranalyse (UPGMA) von DGGE-Bandenmustern eines DGGE-Gels (kein Gelphoto)

Anreicherungskulturen wurden nicht auf Vertreter der Gruppe *Pseudomonas* untersucht.

3.3.4 Untersuchungen des genetischen Potentials zur Reduktion von N-Verbindungen durch Isolate der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe

Während viele Pseudomonaden seit langem als dominante Denitrifikanten und Bacilli als Nitratreduzierer bekannt sind, ist über die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* im Hinblick auf ihr Denitrifikationspotential nicht viel bekannt

Die in der folgenden Tabelle 21 aufgelisteten Isolate fielen nach Auswertung der Fettsäureanalyse sämtlich in die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*. Diese Isolate wurden auf ihr genetisches Potential zur Nitrat-, Nitrit und N₂O-Reduktion getestet. Hierzu dienten die Primer *nirS* und *nosZ* aus der Literatur (Braker *et al.*, 1998; Scala & Kerkhof, 1999), sowie das von Herrn Dr. Petri entwickelte *narH*-Primer-Paar (Petri, 2000).

Tab. 21: Genetisches Potential zur NO₃⁻-, NO₂⁻- und N₂O-Reduktion von Isolaten der Gruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium*)

Isolat-Nr.	MIS ("closest match")	SI	<i>narH</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>
235	<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,303	x	-	-
322	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,259	-	-	-
324	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	0,038	-	x	x
335	<i>Chryseobacterium balustinum</i>	0,322	x	-	x
336	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,573	-	-	x
421	no match		x	-	-
458B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,371	-	-	x
508	<i>Arthrobacter aurescens</i>	0,489	-	x	x
546	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,450	x	-	x
561	n.b.		-	-	-
563	n.b.		x	-	-
577	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,094	-	-	-
587	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,281	-	-	x
595	n.b.		-	-	x
609	n.b.		x	-	-
618	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,377	-	-	-
619	n.b.		-	-	x
629	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,319	-	-	-
684A	n.b.		-	-	x (-)
685C	n.b.		-	-	x
751	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,319	x	-	-
753	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>		x	-	-
761	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,377	-	-	x
767	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,335	-	-	-
771B1	no match		x	-	-
780	n.b.		-	-	-
806	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,377	x	-	-
813	no match		-	-	x (-)
866B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,126	x	-	
903	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,108	-	-	x (-)

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen waren unter den 30 getesteten Isolaten Nitratreduzierer, N₂O-Reduzierer, Nitrat- + N₂O-Reduzierer und Nitrit- + N₂O-Reduzierer aber auch einige, welche wahrscheinlich keine enzymatische Ausstattung in dieser Hinsicht aufweisen. Der Anteil der Nitratreduzierer und N₂O-Reduzierer betrug jeweils ca. 30%. Die Anteile der Nitrit- und N₂O-Reduzierer, sowie der Nitrat- und N₂O-Reduzierer betragen jeweils 7%. Der Anteil der Isolate ohne mit den gewählten Primerpaaren nachweisbare Reduktasen des Denitrifikations-prozesses betrug 23% (s. Abb. 68).

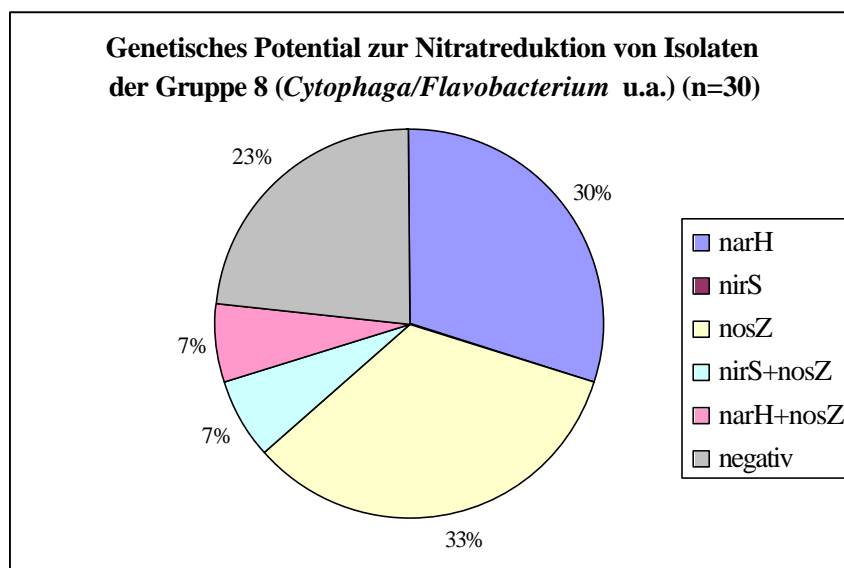


Abb. 68: Ergebnisse der Amplifikation mit spezifischen Primern für Nitrat-, Nitrit- und N₂O-Reduktase an 30 Isolaten der Gruppe 8 (*Cytophaga/Flavobacterium* u.a.)

3.4 Nachweis der Nitratreduktion/Denitrifikation von Bakterienisolaten unter Laborbedingungen

3.4.1 Denitrifikationstest nach Alef, 1991

Insgesamt wurden 625 Isolate auf ihre Fähigkeit zur Denitrifikation unter den gewählten Kultivierungsbedingungen (s. 2.8.1) getestet. Da sich in den Gruppen 2, 3 und 4 prozentual die meisten Isolate befanden, wurden entsprechend mehr Isolate dieser Gruppen untersucht. Als Denitrifikationsnachweis (D) galt der Nachweis von Nitrit, sowie eine Gasblase im Durhamröhrchen und ein reduzierter Nitratanteil im Medium. Als Nitratreduzierer (NR)

wurden Isolate bezeichnet, bei denen der Nitratgehalt im Medium reduziert worden war, aber nur Nitrit nachgewiesen werden konnte. Mit einem Fragezeichen (?) wurden diejenigen Isolate versehen, bei denen eindeutig ein Wachstum zu verzeichnen war, aber innerhalb des Inkubationszeitraumes weder Nitrat verbraucht, Nitrit produziert, oder eine Gasblase im Durhamröhrchen sichtbar war. Ob es sich bei ihnen um langsam wachsende Gärer, Nitratreduzierer oder Denitrifikanten handelte ist daher ungewiß. Auf diese mit einem Fragezeichen in der Abbildung 69 versehenen Anteile der Isolate wird im Text nicht näher eingegangen. Bei einem großen Teil der Isolate konnte kein Wachstum im Denitrifikanten-Medium (k.W.) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bezüglich der einzelnen Bakteriengruppen sind auch in den Abbildungen 12-21 mit angegeben. Die Zuordnung der Isolate zu verschiedenen Gattungen bezieht sich auf die Ergebnisse der Fettsäureanalyse ("closest match"). Prozentual an der Gesamtheit der getesteten Isolate besaßen die Gruppen 2 (β - und γ -Proteobacteria) und 7 (*Bacillus megaterium* GC subgr. A u.a.) den größten Anteil an Denitrifikanten. Die Gruppen 3 und 4 besaßen dagegen die größten Anteile an Nitratreduzierern. Aufgrund der Vielzahl der Isolate konnten nur ca. 70% getestet werden. Insgesamt gestalteten sich die Ergebnisse des Denitrifikationstests für die einzelnen Bakteriengruppen folgendermaßen:

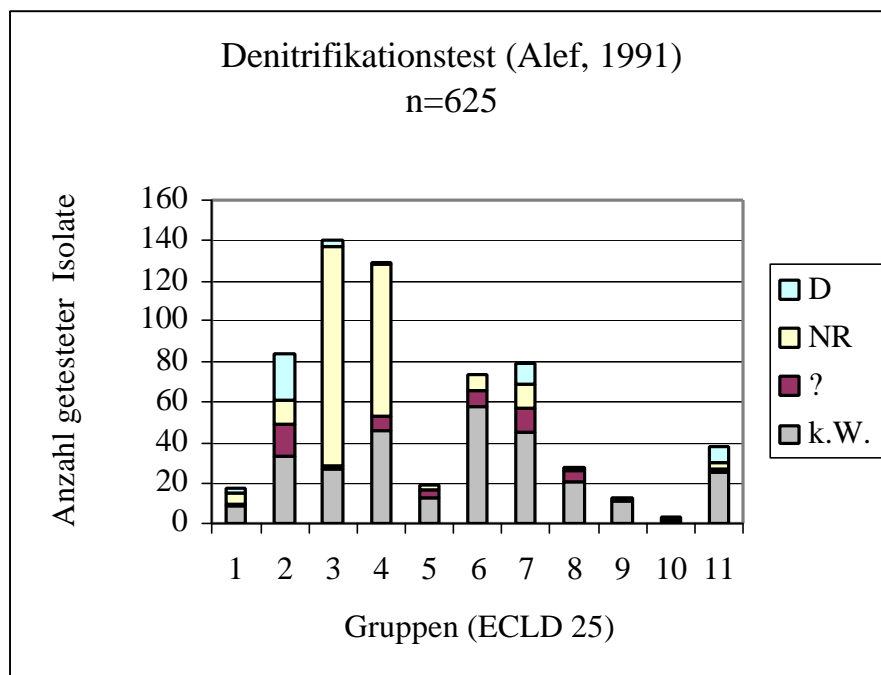


Abb. 69: Ergebnisse des Denitrifikationstest nach Alef. Insgesamt wurden 625 Vertreter aus den verschiedenen Bakteriengruppen (ECLD 25) getestet. D (=Denitrifikant), NR (=Nitratreduzierer), ? (=Ergebnis nicht eindeutig), k.W. (=kein Wachstum beobachtet)

Hauptgruppe 1: Von den innerhalb dieser Gruppe zusammengefaßten Vertreter der α -Proteobacteria besaßen die Untergruppen 1-2 und 1-3 die Fähigkeit zur Denitrifikation. Bei diesen beiden Untergruppen handelte es sich um Vertreter der Art *Agrobacterium radiobacter* und andere Vertreter der Gattung *Agrobacterium*. Nitrat reduzieren konnten die Untergruppen 1-1 und 1-4. Vertreter dieser Gruppen wurden nach der Fettsäureanalyse ("closest match") den Gattungen "no match", *Paracoccus sp.* und *Ochrobactrum sp.* zugeordnet. Vertreter der Gruppe 1-5 (*Phyllobacterium sp.*) wurden nicht getestet.

Hauptgruppe 2: Innerhalb der Gruppe 2 besaßen die diversen Pseudomonaden den größten Anteil. Laut Literatur (Bergey's Manual for Numerical Taxonomy, 1996) konnte innerhalb der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe für die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Arten *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* GC subgr. B, C und F die Fähigkeit zur Denitrifikation unter Laborbedingungen nachgewiesen werden. Vertreter dieser Bakterienarten fanden sich in den Untergruppen 2-6, 2-9 und 2-10. Getestete Vertreter dieser Gruppen zeigten auch im Denitrifikationstest N_2O -Bildung an. Ebenfalls denitrifizieren konnten Isolate der Untergruppe 2-1 („no match“). Ihr Fettsäuremuster hatte Ähnlichkeit mit dem Datenbankeintrag von *Pseudomonas fluorescens* GC subgr. F mit einem Similaritätsindex von jedoch nur knapp 0,1. Die Fähigkeit zur Nitratreduktion zeigten die Untergruppen 2-2 (*Proteus sp.*, *Providencia sp.*), 2-3 und 2-4 (*Achromobacter sp.*) und 2-5 (*Enterobacter sp.*, *Erwinia sp.*). Nicht näher untersucht wurden die Untergruppen 2-7 und 2-8 in denen sich verschiedenen *Comamonas*-Arten nachweisen ließen.

Hauptgruppe 3: Der Großteil der Isolate dieser Gruppe wurde als *Bacillus mycoides* identifiziert. Diese Art kann laut Literatur (Bergey's Manual for Numerical Taxonomy, 1996) Nitrat reduzieren. Die Untergruppen 3-2, 3-4, 3-6 und 3-7 zeigten dies auch im Denitrifikationstest eindeutig an. Die Untergruppe 3-1 wurde nicht getestet und Vertreter der Untergruppe 3-5 zeigte kein Wachstum im Denitrifikanten-Medium.

Hauptgruppe 4: Keine der in diese Gruppe fallenden Isolate konnte denitrifizieren. Die vornehmlich den Gattungen *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* und *Bacillus* zuzuordnenden Bakterien einer Vielzahl von Untergruppen konnten jedoch eindeutig Nitrat reduzieren. Hierbei handelte es sich um die Untergruppen 4-4, 4-9, 4-11 und 4-13 bis 4-17. Vertreter der restlichen Untergruppen wurden nicht untersucht.

Hauptgruppe 5: In dieser Gruppe konnte eine Nitratreduktion für Isolate der Untergruppe 5-4 (*Nocardia sp.*) gezeigt werden, während Vertreter der Untergruppen 5-5 und 5-6 im

Denitrifikanten-Medium nicht wuchsen. Die Untergruppen 5-1, 5-2 und 5-3 wurden nicht untersucht.

Hauptgruppe 6: In dieser ebenfalls viele Aktinomyceten beinhaltenden Bakteriengruppe konnte für einige Untergruppen ebenfalls die Fähigkeit zur Nitratreduktion gezeigt werden. Im einzelnen waren dies die Untergruppen 6-1 (*Paenibacillus sp.*), 6-2 („no match“), 6-3 („no match“), 6-7 („no match“), und 6-15 (*Streptomyces sp.*). Vertreter der Untergruppen 6-8 und 6-20 zeigten kein Wachstum im Denitrifikanten-Medium. Die restlichen Untergruppen wurden nicht getestet.

Hauptgruppe 7: Innerhalb dieser Gruppe konnten sowohl Denitrifikanten, als auch Nitratreduzierer ermittelt werden. Denitrifizieren konnten Vertreter der Untergruppe 7-2 („no match“), 7-6 (*Bacillus subtilis*), 7-9 (*Bacillus sp.*) und 7-16 (*Bacillus sp.*). Zur Nitratreduktion waren Isolate der Untergruppen 7-3 („no match“), 7-4 (*Paenibacillus sp.*) und 7-17 (*Bacillus sp.*) in der Lage. Isolate zweier Untergruppen zeigten kein Wachstum im Denitrifikanten-Medium (7-7 und 7-12). Die verbleibenden Untergruppen wurden nicht untersucht.

Hauptgruppe 8: Die getesteten Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* konnten unter den gewählten Laborbedingungen nicht denitrifizieren. In der Untergruppe 8-3 („no match“), die eine Ähnlichkeit zum Fettsäuremuster der Gattung *Stenotrophomonas* aufwies (SI 0,1) konnte aber Nitrat reduziert werden. Drei Untergruppen wuchsen nicht in Denitrifikanten-Medium (8-7, *Chryseobacterium balustinum*, SI 0,3; 8-5 und 8-8, *Flavobacterium johnsoniae*, SI 0,1-0,3) und weitere 6 Untergruppen wurden nicht untersucht.

Hauptgruppe 9: In dieser Gruppe konnte weder Denitrifikation noch Nitratreduktion nachgewiesen werden. Von insgesamt 5 Untergruppen wuchsen zwei nicht in Denitrifikanten-Medium und drei wurden nicht untersucht.

Hauptgruppe 10: Innerhalb dieser Bakteriengruppe konnten Isolate aus insgesamt fünf Untergruppen denitrifizieren. Hierbei handelte es sich um die Untergruppen 10-1, 10-3, 10-7, 10-9 und 10-10. Die Fettsäuremuster sämtlicher Isolate zeigten die größte Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen (MIS) der Gattungen *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* und *Staphylococcus* an. Die Untergruppe 10-5 zeigte kein Wachstum im Denitrifikanten-Medium und weitere sechs Untergruppen wurden nicht getestet.

3.4.2 N₂O-Produktion von Bakteriengemeinschaften unter Laborbedingungen

Zum Denitrifikationspotential der Bakteriengemeinschaften aus Bodenproben der verschiedenen Parzellen wurden Proben von März bis Dezember 1998 mit nitrathaltigem Denitrifikanten-Medium versetzt und inkubiert (s.2.8.2). Nach der Inkubation wurden Proben (1 ml) aus der Atmosphäre der Kulturfläschchen entnommen, gaschromatographisch gemessen und der Anteil des gebildeten N₂O in der Atmosphäre berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 70 dargestellt.

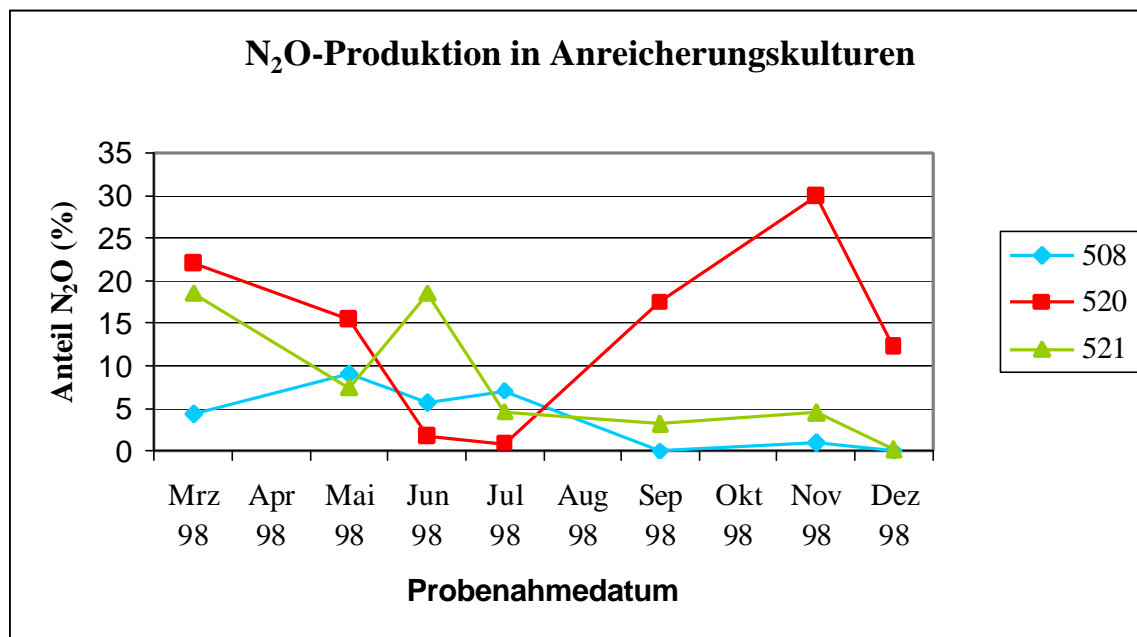


Abb. 70: N₂O Produktion in Anreicherungskulturen von 1g Bodentrockensubstanz und 7 ml Denitrifikantenmedium in 100 ml Kulturfläschchen. Analysiert wurde 1 ml aus der Atmosphäre der Kulturen

Auffällig war, daß die N₂O-Werte aus der Atmosphäre der Kulturfläschchen der Parzelle 520 (Düngung: Ammonium-Nitrat-Gemisch) mit Ausnahme des Juni und Juli 1998 stets höher waren, als vergleichbare Proben der Parzellen 508 (Düngung: Gülle) und 521 (ungedüngt). Im November 1998 war der prozentuale Anteil des N₂O an der Gesamtatmosphäre besonders hoch und betrug 30%. Die kultivierte Bakteriengemeinschaft aus Bodenproben der Parzelle 508 und 521 produzierte dagegen zum gleichen Termin keine 5% N₂O. Generell waren die ermittelten N₂O-Mengen aus Proben der Parzelle 508 fast immer am geringsten (Ausnahme Mai und Juli 1998). Sie lagen niemals höher als knapp 10% (Mai 1998). Ab September und bis Dezember 1998 tendieren sie sogar gegen Null. Vergleichbare Proben der Parzelle 521 lagen häufig höher und erreichten im März und Juni 1998 N₂O-Werte um 20%. Im Juni 1998 war der Anteil des gebildeten N₂O der kultivierten Bakteriengemeinschaft der Parzelle 521

sogar höher als die der Kultur aus Bodenproben der Parzelle 520 zum gleichen Termin. Während für die Parzellen 508 und 521 tendenziell höhere Anteile an gebildetem N_2O in den Proben von Frühjahr und Sommer 1998 beobachtet werden konnten, war der umgekehrte Fall für die Proben der Parzelle 520 zu beobachten. Hier konnten in den Sommermonaten nur geringe Anteile N_2O gebildet werden, während ausgesprochen hohe Anteile im Frühjahr und Herbst/Winter 1998 gemessen wurden.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit kamen mehrere Methoden zum Einsatz die Diversität der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft unterschiedlich behandelter Ackerparzellen im Jahrgang vergleichend zu untersuchen. Bei den untersuchten Standorten handelte es sich um eine ungedüngte Ackerparzelle (521), eine regelmäßig mit einem Ammonium-Nitratgemisch behandelte Parzelle (520) und eine mit Schweinegülle gedüngte Parzelle (508) eines Ackerbodens des Versuchsgutes Hohenschulen südwestlich von Kiel. Nitratreduzierende und denitrifizierende Bakterien wurden aufgrund ihrer Bedeutung für das Ökosystem Ackerboden ausgewählt.

Ziel der Untersuchungen war, eine Vielzahl verschiedener nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien mit einer Auswahl geeigneter nitrathaltiger Medien zu isolieren, und die erhaltenen Reinkulturen anhand von Fettsäuremustern mit Hilfe des "Microbial Identification System" zu identifizieren bzw. einzugruppieren. Die Dynamik ausgewählter Bakteriengruppen, in denen Nitratreduzierer und Denitrifizierer ermittelt werden konnten, wurde im Jahrgang anhand von 16S rDNA-Fragmenten mittels PCR/DGGE untersucht.

Die Kombination unterschiedlicher Methoden hat hierbei verlässliche und sich ergänzende Ergebnisse zur Diversität und Dynamik nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien an den untersuchten Standorten geliefert. Die Isolierung einer Vielzahl möglichst diverser nitratreduzierender und denitrifizierender Bakterien sollte zu ersten Informationen über Zusammensetzung und potentielle Dominanz einzelner Bakteriengruppen führen. Die Auswahl unterschiedlich behandelter Ackerparzellen als Probenahmestandorte brachte hierbei den Aspekt möglicher Einflüsse ackerbaulicher Maßnahmen (insbesondere Düngung und Wechsel der Feldfrucht) auf die Etablierung und Zusammensetzung einer Bakteriengemeinschaft ins Spiel. Aufgrund der Abstände der einzelnen Probenahmeterminen (4-6 Wochen) konnten keine kurzfristigen, sondern nur langfristige Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft untersucht werden.

Zur Charakterisierung der gesamten bakteriellen Diversität am Standort zu allen Probenahmeterminen wurde die Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben ausgewählt. Hierbei gaben insbesondere Hauptfettsäuren und Biomarkerfettsäuren verschiedener isolierter Bakteriengruppen, sowie zahlreiche zusammengestellte Informationen aus der Literatur (s. Anhang) über die Bedeutung verschiedener Fettsäuren für unterschiedliche Bakteriengruppen, wertvolle Hilfe für die Identifizierung von Bakterien.

Aufgrund der Ergebnisse der Isolierung wurden drei Bakteriengruppen ausgewählt, deren Vertreter häufig isoliert wurden, und deren Bedeutung für die Nitratreduktion bzw. Denitrifikation bereits bekannt oder von besonderem Interesse war. Bei diesen Gruppen handelte es sich um Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Pseudomonas*, sowie um Bakterien der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe. Während viele Bacilli als Nitratreduzierer bekannt sind und für einige Arten auch Denitrifikation nachgewiesen werden konnte, sind Vertreter der Pseudomonaden in vielen Ökosystemen als die dominierenden Denitrifikanten bekannt. Über Nitratreduktion und Denitrifikation in der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* ist demgegenüber noch nicht viel bekannt.

Nach erfolgreicher DNA-Extraktion aus Bodenproben der untersuchten Ackerparzellen wurden 16S rDNA-Fragmente dieser Bakteriengruppen mit spezifischen Primerpaaren amplifiziert und mittels DGGE aufgetrennt, um qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Bakteriengruppen im Jahresgang aufzuzeigen. Desweiteren sollten die verschieden behandelten Ackerparzellen miteinander verglichen werden, um mögliche Auswirkungen ackerbaulicher Maßnahmen auf die Diversität dieser Bakteriengruppen aufzuzeigen.

In einer Reihe von Artikeln wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Zusammensetzung und Dynamik einer Bakteriengemeinschaft mittels Fettsäureanalysen untersucht (Bolton *et al.*, 1985; Fraser *et al.*, 1988; Bossio *et al.*, 1997). Hierbei wurden Parameter wie Bodentyp, Jahreszeit, und verschiedene landwirtschaftliche Einflüsse, wie z.B. Düngung, Bodenbehandlung und Pestizideinsatz analysiert. Es wurde der Versuch unternommen, eine Reihenfolge in der Einflußnahme dieser Umweltfaktoren auf die Struktur einer Bakteriengemeinschaft aufzustellen. Die Ergebnisse waren nicht einheitlich, jedoch gaben die meisten Autoren dem Bodentyp, der jeweils angebauten Pflanzenart und der Menge und Art der Düngung eine größere Bedeutung, als anderen Parametern, wie z.B. der Jahreszeit, Bodenwassergehalt und Bodentemperatur. In einer Untersuchung von Latour *et al.* (1996), hatte die angebaute Pflanzenart und nicht diverse Bodenfaktoren einen hauptsächlichen Einfluß auf die Populationen der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe.

Um quantitative Aussagen zur Struktur einer Bakteriengemeinschaft treffen zu können, bieten sich bis heute nur zwei Methoden an. Dies ist zum einen die Analyse ribosomaler RNA (oder rDNA), zum anderen die Fettsäureanalyse. Die Gewinnung von Isolaten aus Standortmaterial erleichtert hierbei die Zuordnung bestimmter Fettsäuren zu diversen Bakteriengruppen, und damit die Interpretation von Gesamtfettsäureprofilen. Für die Charakterisierung komplexer

Bakteriengemeinschaften können die verschiedenen Fettsäuren und Fettsäuregruppen wertvolle Hinweise liefern.

Im folgenden werden die einzelnen Aspekte dieser Arbeit diskutiert.

4.1 Signifikanz der ausgewählten Medien für die isolierten Bakteriengruppen

Zur Untersuchung der Diversität denitrifizierender und nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften unterschiedlich behandelter Ackerparzellen wurden im Verlauf dieser Arbeit mit Hilfe verschiedener nährstoffreicher und nährstoffarmer nitrathaltiger Medien an verschiedenen Probenahmeterminen (1996-1998) insgesamt über 1000 Isolate aus Bodenproben der Parzellen 520 und 521 in Reinkultur gewonnen.

Das Spektrum der isolierten Bakterien erwies sich dabei als signifikant medienspezifisch. Während mit Mineralmedien hauptsächlich denitrifizierende Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe isoliert werden konnten, wuchsen auf den verschiedenen Komplexmedien vor allem Nitratreduzierer verschiedener Gram⁺ Bakteriengruppen. Zu den isolierten Gram⁺ Bakterien gehörten zu einem überwiegenden Teil Vertreter der Actinomycetales und der Gattung *Bacillus*, sowie diesen nahestehende Bakterien. Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* wuchsen dagegen fast ausschließlich auf den nährstoffarmen Medien TSB 3 und Doligo, Anreicherungskulturen verschiedener Medien führten zur Isolierung weiterer Bakteriengruppen, wie z.B. verschiedener Enterobakterien, und weiteren γ -Proteobacteria.

Die Identifizierung und Eingruppierung der Isolate erfolgte mit einem standardisierten Verfahren zur Fettsäureanalyse und nachfolgender Clusteranalyse (UPGMA) in Dendrogrammform. Die Isolierung der ca. 1000 Reinkulturen aus Bodenproben der Parzellen 520 und 521 und ihre Identifizierung bzw. Eingruppierung mittels Fettsäureanalyse auf der Basis euklidischer Distanzen führte zur Bildung von 18 Bakterienhauptgruppen (ECLD >25). (s. hierzu 4.3).

Im Vergleich zu der enormen bakteriellen Diversität eines fruchtbaren Ackerbodens wurde sicher nur ein geringer Bruchteil der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft isoliert. Auch selektierte die begrenzte Medienpalette und die gewählten Inkubationsbedingungen für bestimmte Bakterien, und damit gleichzeitig gegen andere. Insbesondere langsam wachsende Vertreter der denitrifizierenden und

nitratreduzierenden Bakteriengemeinschaft, sowie an bestimmte C-Quellen, Mikrohabitate oder spezielle physiologische Bedingungen gebundene Spezialisten (K-Strategen, s.u.) unter den Bakterien wurden daher nicht isoliert. Die mit den ausgewählten Medien isolierbaren identifizierten und eingruppierten Bakterienarten repräsentieren demzufolge einen Ausschnitt der nitratreduzierenden bzw. denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft unbekannter Größe.

Die Mehrzahl der Bodenbakterien (99,5 – 99,9%), die mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden können, sind bisher nicht kultiviert oder isoliert worden. Isolate repräsentieren daher nur einen winzigen Teil der Bakteriengemeinschaft eines Bodens, während der dominante Teil unentdeckt bleibt (Amann *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1990). Torsvik *et al.* (1990) fanden bei der Analyse bakterieller Diversität anhand von DNA-Reassoziationsuntersuchungen eine 200 x höhere genetische Diversität in Bodenproben, als in Isolaten des untersuchten Standortes. Ergebnisse dieser Art stützen die Theorie, daß es sich bei auf Festmedien/Platten wachsenden und isolierbaren Bakterienarten um sogenannte r-Strategen handelt, die eine hohen Wachstumsrate bei hohen Nährstoffkonzentrationen besitzen. Bei der Mehrheit nicht isolierter Bakterienarten handelt es sich nach dieser Theorie dagegen um hoch spezialisierte K-Strategen mit häufig niedrigen Wachstumsraten. Insgesamt ist die Bakteriengemeinschaft in Böden als außerordentlich divers anzusehen und beinhaltet eine unermeßliche Vielzahl noch vollständig unbekannter Bakterien. Diese Theorie ist sicher zu undifferenziert um allgemeingültig zu sein, und muß im Einzelfall diskutiert werden.

Eine begrenzte Auswahl verschiedener Medien und Inkubationsbedingungen selektieren und favorisieren stets bestimmte Vertreter innerhalb dieser Bakteriengruppen.

4.2 Diversität isolierter denitrifizierender und nitratreduzierender heterotropher Bakterien

Allein auf der Basis der isolierten und eingruppierten Reinkulturen konnten Unterschiede in der Zusammensetzung eines Teils der denitrifizierenden und nitratreduzierenden Bakteriengemeinschaft vor Ort im Frühjahr und Herbst 1997 und im Frühjahr 1998 aufgezeigt werden. Trotz der begrenzten Anzahl an Isolaten war es möglich, bedeutende Unterschiede in der Zusammensetzung von kleinen Teilen dieser Bakteriengemeinschaft aufzudecken.

Von den im Verlauf der Probenahmen insgesamt ermittelten 18 Bakterienhauptgruppen (ECLD >25) zeigten einige der im Frühjahr und Herbst 1997 und im Frühjahr 1998 aus

Bodenproben der Parzellen 520 und 521 isolierten Bakteriengruppen eine konstante Präsenz am jeweiligen Standort und gaben damit Hinweise auf eine potentielle Dominanz.

Bei alleiniger Betrachtung der isolierten bakteriellen Diversität waren in erster Linie verschiedene Arten der Gattung *Bacillus*, gefolgt von anderen Gram⁺ Bakterienarten mit hohem GC-Gehalt der Bakterienhauptgruppen 4, 5 und 6, als dominante autochthone Vertreter der Ackerparzellen zu nennen. Vor allem verschiedene Vertreter der Actinomyceten gehörten zu den dominanten isolierten Bakterien. Vertreter der α -Proteobacteria (Hauptgruppe 1) und der *Cytophaga/Flavobacterium*-Gruppe (Hauptgruppe 8) waren ebenfalls, aber in geringen Abundanzen zu den regelmäßig vertretenen Bakterien zu zählen. Die *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe und andere γ -Proteobacteria (Hauptgruppe 2) waren dagegen eher zu den zymogenen Bakterien zu rechnen und traten sporadisch in hohen Abundanzen auf.

Unterschiede in der isolierten bakteriellen Diversität der Parzellen 520 und 521 im Vergleich konnten je nach Probenahmetermin und Parzelle anhand der Isolate gezeigt werden. Auffällig war die Abnahme der mittels Fettsäureanalyse (s. 4.3) identifizierten Diversität im Frühjahr 1998 im Vergleich zum Frühjahr 1997. Im Frühjahr 1997 hatte die zu den γ -Proteobacteria zählende *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe auf beiden untersuchten Parzellen einen hohen Anteil von 24% (520) bzw. 19% (521) an der isolierten Bakteriengemeinschaft. Auch im Herbst 1997 war diese Bakteriengruppe in Bodenproben beider Parzellen vertreten. Während ihr Anteil auf Parzelle 520 zu diesem Zeitpunkt jedoch auf 7% gesunken war, stieg der Anteil dieser Bakteriengruppe auf Parzelle 521 auf 29% an. Dies deutet stark auf einen eher zymogenen Charakter dieser Bakteriengruppe hin, deren sporadisches massenhaftes Auftreten nach besonderen Ereignissen jederzeit möglich ist, und für die *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe im April 1997 in Bodenproben der Parzelle 521 auch mittels Gesamtfettsäureanalysen der Bodenproben aufgezeigt werden konnte (s.4.4.1). Auch die Gewinnung zahlreicher Isolate in diesem Zeitraum belegt die hohe Abundanz dieser Bakteriengruppe im Frühjahr 1997. 1998 wurden auf beiden Parzellen fast ausschließlich Gram⁺ Bakterien isoliert, während die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* zu diesem Probenahmezeitpunkt nicht nachgewiesen werden konnte. Auch stieg der Anteil nicht identifizierter Bakterien (kein Wachstum auf TSB 30-Medium) im Frühjahr 1998 auf beiden Parzellen an. Das sporadische Auftreten der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe konnte nicht mit der Bodenbehandlung (Düngung) oder Fruchtfolge auf den Ackerparzellen direkt korreliert werden. Nach Smalla *et al.* (1998), gehören viele γ -Proteobacteria zu den schnell wachsenden bei besonderen Ereignissen, wie bestimmten hohen Substratkonzentrationen aufkommenden Bakterien. Die *Pseudomonas*

fluorescens-Gruppe ist für Ackerböden von besonderem Interesse, da viele ihrer Vertreter (z.B. *Pseudomonas fluorescens* und *P. putida*) seit langem für ihre fördernde Wirkung auf die Bildung pflanzlicher Wachstumsregulatoren und Siderophoren bekannt ist. Sie werden daher auch als "plant-growth-promoting rhizobacteria" bezeichnet (Fritsche, 1990).

Ob ein Großteil der Gram⁻ Bakterien, anders als viele Gram⁺ Sporenbildner, die Fähigkeit besitzen, als „Hungerformen“ für sie ungünstige Perioden zu überwinden und bei entsprechenden günstigen Umweltbedingungen wieder zu wachsen, oder ob dem massenhaften Auftreten auch eine schnelle Vermehrung zu Grunde liegt ist bisher unklar.

Ein nicht zu vernachlässigender Teil der isolierten Bakterien konnte aufgrund ihrer spezifischen Ansprüche an Medium und Inkubationsbedingungen zwar isoliert aber nicht mittels Fettsäureanalyse identifiziert werden. Die Diversität dieser Isolate wurde nicht erfasst (s. 4.3).

Innerhalb der verschiedenen isolierten Gram⁺ Bakteriengruppen gab es sowohl im Frühjahr, als auch im Herbst 1997 große Unterschiede in Präsenz und Dominanz. Besonders der Anteil der zur Gruppe *Bacillus mycoides* u.a. (Hauptgruppe 3) gehörenden Isolate lag in Bodenproben der Parzelle 521 meist deutlich höher, als im Vergleich zur Parzelle 520. Dagegen war der Anteil der Aktinomycetengruppe *Nocardia sp.* u.a. (Gruppe 5) auf Parzelle 520 höher als auf Parzelle 521. Vertreter der Gruppe 5 waren im Frühjahr 1998 nicht mehr unter den Isolaten zu finden.

Die Untersuchung eines Jahresganges der am jeweiligen Probenahmestandort etablierten Bakteriengemeinschaft ist durch die selektive Isolierung jedoch nur für bestimmte Bakteriengruppen möglich und in ihrer Aussagekraft stark eingeschränkt. Die Isolierung und Identifizierung einer möglichst großen Anzahl verschiedener Bakterien ist jedoch für Aussagen von gleichzeitig ermittelten Gesamtfettsäurespektren von entscheidender Bedeutung (s. 4.4).

4.3 Fettsäureanalysen zur Identifizierung von Reinkulturen

Fettsäuren im Bereich C12 bis C19 finden sich in höheren Konzentrationen nur bei Bakterien und gelten als charakteristisch für diese (Rajendran *et al.*, 1992). Längerkettige und mehrfach ungesättigte Fettsäuren finden sich dagegen fast ausschließlich in Eukaryonten. Das

Vorhandensein einfach ungesättigter Fettsäuren in Probenmaterial zeigt die Dominanz Gram⁻ prokaryontischer Organismen an. Im allgemeinen zeigen ungesättigte Fettsäuren im Bereich von C12-C19 Gram⁻ Bakterien an. Während geradkettige Fettsäuren generell das geringste taxonomische Potential bei Bakterien besitzen, gelten verzweigt-kettige, sowie einfach ungesättigte Fettsäuren als bedeutend für die Bakterientaxonomie (Lechevalier, 1977). Fettsäuren wie Palmitinsäure (C16:0) finden sich bei nahezu allen Bakterien und können daher als gute Indikatoren für bakterielle Biomasse gelten (Zelles *et al.*, 1992), nicht aber als sogenannte Biomarker. Diese allgemeinen Informationen aus der Literatur konnten im Rahmen dieser Arbeit für die Beurteilung von Fettsäuremustern aus Bodenproben herangezogen werden. In den Tabellen 12a, b und c im Anhang sind Informationen über Fettsäuren und ihre Funktion als Biomarker aus der aktuellen Literatur zusammengetragen.

Durch die standardisierte Methode zur Fettsäureanalyse und nachfolgender Identifizierung mit der Datenbank TSBA 40 (Aerobe, Environmental) des „Microbial Identification System“, konnten viele der gewonnenen Isolate identifiziert werden. Es war jedoch aufgrund der standardisierten Anzuchtbedingungen zur Gewinnung von Zellmaterial bei Anwendung dieser Methode nicht möglich Isolate, die andere Wachstumsbedingungen benötigten anhand von Fettsäuremustern aus der Datenbank TSBA 40 zu identifizieren. Desweiteren ist die Datenbank mit ca. 400 Einträgen begrenzt, so daß oftmals zwar eine Eingruppierung unbekannter Isolate in bestimmte Bakteriengruppen sicher erfolgen konnte, aber eine Identifizierung unsicher war, oder als nicht erfolgt angesehen werden mußte. Insgesamt konnten 18 Bakterienhauptgruppen auf der Basis einer euklidischen Distanzen von > 25 sicher voneinander unterschieden werden. Die jeweiligen Bakterienhauptgruppen lassen sich dabei in unterschiedlich viele Untergruppen auf der Basis einer euklidischen Distanz von > 10 aufspalten, in die wiederum mehrere Bakteriengattungen mit diversen Arten fielen. Neben α -, β - und γ -Proteobacteria wurden viele Aktinomycetengruppen und andere Gram⁺ Bakteriengruppen mit *Bacillus*-ähnlichen Bakterien isoliert und identifiziert. Die Unterteilung der Bakterienhauptgruppen in Untergruppen (ECLD < 10) machte die Diversität der spezifischen bakteriellen Fettsäuremuster unterschiedlicher Bakteriengattungen und -arten deutlich. Die nach dem Vertreiber des Microbial Identification System mögliche Abgrenzung verschiedener Bakteriengattungen, Arten, Unterarten und Stämmen auf der Basis einer ECLD von > 25 , > 10 , > 6 und > 2 (MIS-Handbook, 1996) kann nicht als allgemeingültig akzeptiert werden. Selbst bei einer begrenzten Auswahl an Datenbankfettsäuremustern von mehreren Hundert (TSBA 40), ist das System bei einigen Bakteriengruppen, wie z.B. der *Pseudomonas*

fluorescens-Gruppe bei der korrekten Identifizierung und Abgrenzung gegenüber nahe verwandten Arten nicht verlässlich genug. Bei der in einem fruchtbaren Ackerboden zu erwartenden außerordentlich hohen bakteriellen Diversität unbekannter Bakterien mit einer ebenfalls immens hohen Anzahl verschiedenster Fettsäuremuster ist eine umfassende Identifizierung gewonnener Isolate mittels MIS kaum möglich. Eine Eingruppierung unbekannter Isolate in Bakterienhauptgruppen und -untergruppen (ECLD > 25 und >10) mit bekannten Fettsäuremustern verschiedener Bakteriengattungen kann das System jedoch effizient bieten. Dieses primäre Ziel konnte für eine Vielzahl der gewonnenen Reinkulturen erreicht, und die isolierte bakterielle Diversität und Dynamik damit wiedergespiegelt werden.

Die gaschromatographisch analysierten Fettsäuremuster der einzelnen Bakteriengruppen besaßen unterschiedliche Haupt- und Nebenfettsäuren, sowie teilweise Biomarkerfettsäuren. Nur eine geringe Anzahl von Bakterien weist jedoch im allgemeinen ungewöhnliche Fettsäuren auf, wobei besonders die Bildung verzweigtkettiger Fettsäuren durch Wachstumsbedingungen beeinflusst wird (Kaneda, 1991). Eine Identifizierung von Reinkulturen anhand ihrer Fettsäuremuster ist daher nur auf der Basis standardisierter Inkubationsbedingungen zur Zellmaterialgewinnung, wie sie im Verlauf dieser Arbeit angewendet wurden, möglich.

4.4 Gesamtfettsäureanalysen von Bodenproben zur Erfassung der bakteriellen Diversität im Jahresgang

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Fettsäuremuster der Bakteriengruppen zur Interpretation von Gesamtfettsäurespektren aus Bodenproben herangezogen. Die aus Gesamtfettsäureanalysen von Bodenproben ermittelten Haupt- und Biomarkerfettsäuren bestimmter isolierter Bakteriengruppen oder Gattungen konnten hierbei Hinweise auf dominante Vertreter dieser Spezies am jeweiligen Probenahmestandort und Probenahmetermin geben. Desweiteren konnte durch das Fehlen bestimmter Fettsäuren in Bodenproben bestimmter Standorte auf ein Fehlen oder eine Unterrepräsentanz bestimmter Bakteriengruppen hingewiesen werden. Mit Hilfe der Gesamtfettsäureanalyse konnten daher Informationen über die Struktur einer aktiven Bakteriengemeinschaft erhalten werden (Vestal *et al.*, 1989). Spezifische Fettsäuren dienen hierbei oft als Indikatoren für taxonomische und funktionelle Bakteriengruppen (Parkes, 1987). Da PLFA (phospholipid fatty acids)

abgestorbener Zellen schnell abgebaut werden, repräsentieren sie qualitativ und quantitativ die gegenwärtige, lebende Bakteriengemeinschaft eines Standortes (Vestal & White, 1989). Zur genauen Untersuchung von Bakteriengemeinschaften und korrekten Interpretation der gewonnenen Ergebnisse, ist es jedoch erforderlich, Informationen über die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit dieser Methode zu besitzen.

Besonders schwierig ist es, Dynamiken von Bakteriengemeinschaften anhand von Fettsäuremustern zu untersuchen (Frostegård *et al.*, 1992). Haack *et al.* (1994), untersuchten die Präzision, Reproduzierbarkeit und Interpretation von Fettsäureprofilen aus Bakteriengemeinschaften (Anreicherungskulturen), deren Zusammensetzung bekannt war. Nach ihren Angaben und den Ergebnissen anderer Autoren (Ratledge & Wilkinson, 1988) variieren Fettsäuremuster einzelner Taxa je nach Wachstumsbedingungen quantitativ und bis zu einem gewissen Grad auch qualitativ. Im allgemeinen bleiben gattungsspezifische Fettsäuremuster jedoch klar voneinander unterscheidbar. Besonders für bestimmte Gattungen signifikante Fettsäuren verbleiben auf einem konstanten Level. Verschiedene Anzuchtbedingungen können damit einen unterschiedlichen Einfluß auf die Fettsäuremuster verschiedener Bakterienarten haben. Desweiteren kann der Ertrag verschiedener Fettsäuren bei der Extraktion bis zu 5-fach variieren, was zu Fehlinterpretationen bei der Beurteilung der Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften anhand von Fettsäureprofilen führen kann. Auch ist es möglich, daß Bakterien, die keine signifikanten Fettsäuren aufweisen in den Fettsäuremustern oft nicht ermittelt werden, oder anteilmäßige als zu gering eingeschätzt werden (Haack *et al.*, 1994). Die Verhältnisse einiger Fettsäuren und Fettsäuregruppen zueinander können Auskunft über den physiologischen Status einer Bakteriengemeinschaft geben, den Anteil Gram⁺ gegenüber Gram⁻ Bakterien anzeigen (Rajendran *et al.*, 1992), sowie Hinweise auf einen Wechsel von aeroben zu eher anaeroben Stoffwechsel liefern (Gillian & Hogg, 1984). Bei Fettsäuren, die durch wechselnde Umweltbedingungen besonders betroffen sind, handelt es sich vor allem um C17:0cyclo und C19:0cyclo und ihre Vorläufer 16:1 ω 7c und 18:1 ω 7c, sowie cis- und trans-Isomeren bei verschiedenen Fettsäuren. Verschiebungen von cis- zu trans-Isomeren bei Fettsäuren erfolgen vor allem bei physiologischem Streß. Das Verhältnis von cis- zu trans-Isomeren kann daher ein wichtiger Indikator für den physiologischen Status einer Bakteriengemeinschaft sein. Eine sichere Bestimmung diese Isomeren war mittels gaschromatographischer Analyse allein jedoch nicht möglich.

Für die Aussagekraft und Interpretation von Gesamtfettsäuremustern zur Analyse von Bakteriengemeinschaften müssen daher diese Einflüsse bekannt sein und berücksichtigt werden.

Bei einer Vielzahl von zunächst unbekanntem Isolaten ist es sinnvoll aufgrund einer relativ schnellen (wenn Autosampler verfügbar) und im Vergleich zu Methoden der Molekularbiologie eher kostengünstigen Anwendung eine Gruppierung von mehreren Hundert unbekanntem Bakterienarten mittels Fettsäuremuster durchzuführen. Zur Bestätigung bzw. Überprüfung der Identifizierung können dann andere Methoden, wie zum Beispiel physiologische Tests (BIOLOG; API), Sequenzierung der 16S rDNA oder auch die Kolonimorphologie bei einer kleineren Auswahl von Isolaten herangezogen werden.

Zur Identifizierung von Aktinomyceten existiert eine eigene Datenbank des „Microbial Identification System“, die bei einer detaillierten Untersuchung dieser Gruppe von Mikroorganismen herangezogen werden kann (ACTIN 1). Eine gemeinsame Darstellung auf der Basis verschiedener Datenbanken identifizierter Isolate in einem gemeinsamen Dendrogramm ist aber nicht möglich. Da viele Aktinomycetenarten auch in der TSBA 40 Datenbank enthalten waren, wurde die Datenbank ACTIN 1 im Verlauf dieser Arbeit nicht benutzt, böte sich aber für zukünftige Untersuchungen dieser interessanten Bakteriengruppe an.

Mit der Bildung distinkter funktioneller Fettsäurecluster nach Findlay *et al.* (1990) konnten Informationen über die Zusammensetzung der Mikroorganismen am jeweiligen Standort vergleichend und anschaulich dargestellt werden. Hiernach dominierten erwartungsgemäß auf allen Parzellen im allgemeinen aerobe Prokaryonten unter denen sich auch ein Großteil der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakterienarten befindet, da Denitrifikation als fakultatives Merkmal, vieler ansonsten aerober Bakterien gilt, bei denen diese Fähigkeit bei Sauerstoffmangel induziert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der unterschiedlich behandelten Ackerparzellen im Jahresgang (Frühjahr 1997- Frühjahr 1999) erfolgreich durchgeführt, und der Versuch eines Nachweises bestimmter Bakteriengruppen anhand von signifikanten Fettsäurekombinationen und Biomarkerfettsäuren für diverse Bakteriengruppen unternommen. Die Ergebnisse dieser Analysen lieferten Informationen über den Anteil isolierter Bakteriengruppen an der Bakteriengemeinschaft der verschiedenen Ackerparzellen zum Zeitpunkt der Probenahmen.

Im Jahresgang zeigte sich, daß die meisten Hauptfettsäuren regelmäßig auftraten, sich aber die Verhältnisse verschiedener Fettsäuren zueinander änderten. Bei einem Vergleich der Gesamtfettsäureanalysen aus den Bodenproben mit den Fettsäuremustern der 18 verschiedenen isolierten Bakterienhauptgruppen konnten einige Bakteriengruppen in den Bodenproben sicher nachgewiesen werden, andere hingegen nicht. Hierdurch wurden

Informationen erhalten, welche isolierten Bakteriengruppen am Standort möglicherweise dominieren.

Für die Gesamtheit der isolierten α -, β - und γ -Proteobacteria, für Aktinomyceten und Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* u.a. konnten anhand der ermittelten Haupt- und Biomarkerfettsäuren für diese Bakteriengruppen signifikante Fettsäuren ermittelt werden, die zusammengefaßt Informationen über die Präsenz dieser Bakteriengruppen in den Bodenproben der untersuchten Parzellen im Jahresgang lieferten.

Nach Auswertung der Ergebnisse konnten fundierte Aussagen zur Präsenz und Dominanz verschiedener Proteobacteria, Gram⁺ Bakterien und anderer Bakteriengruppen gemacht werden, in denen nitratreduzierende und denitrifizierende Bakterienarten nachgewiesen wurden.

4.4.1 Nachweis von α -, β - und γ -Proteobacteria in Bodenproben mittels Gesamtfettsäureanalysen

Für die isolierten α -, β - und γ -Proteobacteria, welche einen Großteil der denitrifizierenden Isolate beinhaltete, konnte eine Gruppe von bestimmten Fettsäuren als signifikant ermittelt werden, die in Gram⁺ Bakterien völlig fehlten. In welchem Umfang diese Fettsäuren in nicht isolierten Proteobacteria (δ und ϵ -Proteobacteria) und weiterer Gram⁻ Bakterien eine Rolle spielen, ist im Verlauf dieser Arbeit nicht untersucht worden. Viele dieser Fettsäuren wurden auch in den Gesamtfettsäureanalysen der Bodenproben aller untersuchten Parzellen regelmäßig nachgewiesen. Ihre Anteile variierten jedoch je nach beprobter Parzelle und Probenahmetermin. Durchschnittlich machten diese signifikanten Fettsäuren Anteile zwischen 5% und 15% am jeweiligen Gesamtfettsäurespektrum aus. Eine Zusammenfassung dieser für die isolierten Proteobacteria signifikanten Fettsäuren im Jahresgang deutet einen höheren Anteil dieser Bakteriengruppen in Bodenproben der Parzelle 520 im Vergleich zu den Parzellen 508 und 521 im Jahresgang 1998 an.

Vergleiche zwischen Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben und signifikanten Fettsäuren der isolierten Proteobacteria deuten daraufhin, daß auf den beprobten Parzellen wahrscheinlich Bakterien der Gattungen *Comamonas*, *Variovorax* und vor allem Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe und Bakterien mit ähnlichen Fettsäuremustern im allgemeinen zwar präsent, aber nicht dominant in der Bakteriengemeinschaft vertreten waren. β - und γ -Proteobacteria der Gattungen *Achromobacter*, *Proteus*, *Serratia*, diverse

Enterobakterien, *Acinetobacter*, *Burkholderia* und andere verwandte Bakteriengattungen spielten vermutlich in Bodenproben der untersuchten Ackerparzellen eine eher untergeordnete Rolle, da charakteristische Fettsäuren dieser Bakterien unregelmäßig, in niedrigen Anteilen oder überhaupt nicht ermittelt wurden. Die *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe, als vermutliche Vertreter der zymogenen Bakterien scheint sporadisch hohe Anteile an der Bakteriengemeinschaft zu besitzen, wie es nach den Ergebnissen der Gesamtfettsäureanalysen für den Probenahmezeitpunkt April 1997 (Parzelle 521) zuzutreffen scheint. Die Fettsäuremuster vieler *Pseudomonas* species sind bisher eingehend untersucht worden. Besonders die Hydroxyfettsäuren spielen bei der Identifizierung dieser Bakterien eine wichtige Rolle (Gavini *et al.*, 1989).

Durch den regelmäßigen Nachweis einer nur für isolierte α -Proteobacteria signifikanten Fettsäure (19:0cyclo ω 8c) auch in den Bodenproben, scheint diese unter den Isolaten eher kleine Gruppe in den Bodenproben aller untersuchter Parzellen, im Gegensatz zu Vertretern der β - und γ -Proteobacteria, konstant und dominant in der Bakteriengemeinschaft vertreten zu sein. Anteil und Diversität der α -Proteobacteria an der Gesamtbakteriengemeinschaft der untersuchten Böden wird demnach bei alleiniger Betrachtung der gewonnenen Isolate dieser Gruppe vermutlich unterschätzt.

Eine weitere Differenzierung der Vertreter der Proteobacteria anhand von Gesamtfettsäureanalysen wäre spekulativ. Eine Änderung der für die verschiedenen Proteobacteria signifikanten Fettsäuren nach erfolgter Düngungsmaßnahmen oder Änderung der Feldfrucht spiegelte sich langfristig in den Fettsäuremustern der Bodenproben nicht wieder.

In den Gesamtfettsäurespektren fanden sich auch Fettsäuren in höheren Anteilen, die nur in vereinzelt Isolaten der verschiedenen Proteobacteria nachgewiesen werden konnten und darauf hindeuten, daß bestimmte Teile der Bakteriengemeinschaft von der isolierten bakteriellen Diversität allein nur ungenügend wieder gespiegelt werden. Hierbei handelte es sich um die Hydroxyfettsäuren C10:0 2OH und C12:1 3OH.

Die Fettsäure C12:1 3OH wurde nur am 24.04.1997 auf Parzelle 521 detektiert und ist charakteristisch für einige Vertreter der γ -Proteobacteria (einige Pseudomonaden). C10:0 2OH, ebenfalls charakteristisch für einige Pseudomonaden wurde in geringen Abundanzen auf Parzelle 521 an verschiedenen Probenahmeterminen nachgewiesen. Auch weisen die Hydroxyfettsäuren C10:0 2OH und C12:1 3OH in den Bodenproben auf hohe Anteile nicht isolierter Vertreter der Gattung *Pseudomonas* an bestimmten Probenahmeterminen hin. Um verlässliche Aussagen zur Signifikanz bestimmter Bakteriengruppen in Bodenproben treffen

zu können, müssen daher weitere in diesen Bakteriengruppen enthaltenen Fettsäuren betrachtet werden (siehe unten).

Viele 2- und 3-Hydroxyfettsäuren im Bereich C8 - C16 sind charakteristisch für viele Pseudomonaden. Oyaizu & Komagata (1982), untersuchten verschiedene *Pseudomonas*-Arten auf in ihnen enthaltene Fettsäuren. Die untersuchten Arten konnten aufgrund ihrer heterogenen Fettsäuremuster in neun Gruppen eingeteilt werden. Von besonderer Signifikanz waren hierbei die 3-Hydroxyfettsäuren. Nach den Ergebnissen ihrer Untersuchungen kam die Fettsäure C12:1 3OH lediglich in sehr geringen Anteilen bei *Pseudomonas diminuta* vor. *P. diminuta* ist im Gegensatz zu vielen Vertretern der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe nicht zur Denitrifikation befähigt (Zumft, 1997). In der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe fand sich C12:1 3OH nicht. Da nur ein Isolat der Art *P. diminuta* aus Bodenproben der Parzelle 520 isoliert werden konnte, ist es eher unwahrscheinlich, daß die Fettsäure C12:1 3OH allein von Vertretern dieser Bakterienart stammte. Es ist eher davon auszugehen, daß diese Fettsäure vermutlich auf eine nicht isolierte Bakteriengruppe zurückzuführen ist. Eine andere Erklärung wäre, daß sie in höheren Anteilen bei Verfügbarkeit bestimmter C-Quellen auftritt, oder ihre Präsenz auf Umweltparameter zurückzuführen ist, die eine Bildung dieser Fettsäure bedingen.

Nach Oyaizu & Komagata (1982), sind die Fettsäuren C10:0 3OH und C12:0 2OH in signifikanten Anteilen in sechs der neun untersuchten *Pseudomonas*-Gruppen vorhanden, können also generell als für diese Gattung bedeutsam gelten. Zusammen kommen sie jedoch nur in einer Gruppe vor, der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe. Auch die Fettsäure C12:0 2OH ist von Oyaizu & Komagata, sowie im Rahmen dieser Arbeit, in Isolaten der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe nachgewiesen worden. Alle drei genannten Fettsäuren wurden in den Bodenproben der Ackerparzelle 521 nur zu einem Termin, nämlich im April 1997, nachgewiesen. Damit gab es deutliche Hinweise darauf, daß die Vertreter dieser *Pseudomonas*-Gruppe nur an einem einzigen Probenahmetermin dominante Vertreter der Bakteriengemeinschaft in Bodenproben der untersuchten Parzelle 521 waren. Da die Fettsäuren C10:0 3OH und C12:0 2OH in Bodenproben der Parzelle 508 und 520 zu keinem späteren Zeitpunkt mehr detektiert werden konnten, ist es unwahrscheinlich, daß diese Bakteriengruppe an der Bakteriengemeinschaft dieser Parzellen im Probenahmeverlauf einen konstant bedeutenden Anteil hatte. Anteile der Fettsäure C12:0, die ebenfalls eine signifikante Fettsäure der isolierten Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe war, traten in geringen Abundanzen allerdings in Bodenproben der Parzelle 508 und 520 von März bis September 1998 auf. Dies könnte als Indiz gewertet werden, daß diese Bakteriengruppe, auch wenn andere für sie bedeutsame Biomarkerfettsäuren nicht detektiert wurden, im Verlauf der

Probenahmen 1998 auf Parzelle 520 vorhanden war. Es ist aber ebenso möglich, daß C12:0 von anderen nicht isolierten, möglicherweise zu den γ -Proteobacteria gehörenden Bakterienarten stammt.

Einige der ermittelten Fettsäuren wie C12:0 2OH und C14:1 ω 5c, sowie C16:1isoI/C14:0iso2OH konnten in den Bodenproben der untersuchten Parzellen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden, waren in einigen isolierten Proteobacteria aber durchaus mit Anteilen zwischen 5% und 10% vertreten. C12:0 2OH war eine charakteristische Fettsäure einiger Untergruppen (ECLD >10) der Hauptgruppe 2 (2-1, 2-6, 2-9 und 2-10, diverse Pseudomonaden). Die Fettsäure C14:1 ω 5c wurde in der Untergruppe 2-3 (Enterobakterien), sowie in Gruppe 15 (*Acinetobacter sp.*) nachgewiesen und betrug ca. 5%. C16:1isoI/C14:0iso2OH war in vielen Untergruppen der isolierten Bakterienhauptgruppen 1 (1-2, 1-3, *Agrobacterium sp.*), 2 (2-2 bis 2-5, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Achromobacter sp.*) und 18 (*Burkholderia sp.*) vorhanden. Da diese Fettsäuren zu keinem Zeitpunkt der Probenahme in Anteilen von >1% ermittelt werden konnten, ist anzunehmen, daß Vertreter der α -Proteobacteria *Agrobacterium radiobacter* und andere Vertreter dieser Bakteriengruppen auf den beprobten Ackerparzellen nur eine untergeordnete oder keine Rolle spielen. Nach den Ergebnissen der Fettsäureanalyse ist eher zu vermuten, daß Bakterien der Untergruppen 1-1 (*Paracoccus sp.* u.a.), 1-4 (*Ochrobactrum sp.* u.a.) und 1-5 (*Phyllobacterium sp.* u.a.) am Standort innerhalb der Gruppe der α -Proteobacteria dominieren.

Die in höheren Anteilen in den Bodenproben ermittelte Fettsäure C14:0 fand sich nur in Isolaten der Untergruppen 2-2 (*Proteus sp.*, *Providencia sp.*) in Anteilen von ca. 10%, 2-3 und 2-4 (*Enterobacter sp.*, *Achromobacter sp.*) (ca. 5%) aber auch in einigen Untergruppen der Gram⁺ Hauptgruppen 3 (*Bacillus mycoides* u.a.) und 4 (*Arthrobacter sp.* u.a.) in geringen Anteilen. Dies könnte auf einen zymogenen Charakter dieser Bakteriengruppen hindeuten. Der relativ geringe Anteil von isolierten Bakterien, die diese Fettsäuren, an der gesamten isolierten bakteriellen Diversität verzerrt daher vermutlich deren tatsächliche Präsenz am Standort. C14:0 ist jedoch eine generell in vielen Gram⁺ und auch Gram⁻ Prokaryonten vorkommende Fettsäure mit daher geringem taxonomischen Potential.

Die geradkettigen Fettsäuren C14:0, C17:0 und C20:0, die verzweigt-kettige Fettsäure C17:0iso, sowie die einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren C16:1 ω 5c, C20:1 ω 9c, C18:3 ω 6c (6,9,12) und C20:4 ω 6,9,12,15c, konnten ebenfalls nur einigen Isolaten verschiedener Bakteriengruppen zugeordnet werden

4.4.2 Nachweis von Gram⁺ und anderen Bakteriengruppen in Bodenproben mittels Gesamtfettsäureanalysen

Kaneda (1996), untersuchte die Fettsäuremuster diverser Bacilli und wies auf die verzweigt-kettigen Fettsäuren als Hauptfettsäuren dieser Bakteriengattung hin. Die für die isolierten Gram⁺ Bakterien charakteristischen Hauptfettsäuren iso und anteiso C15:0, die in den Hauptgruppen 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 dominieren (teilweise > 50%), machten in den Gesamtfettsäureanalysen der Bodenproben nur ca. 10% und weniger aus. Die für viele Untergruppen der Gruppe 3 (*Bacillus mycoides* u.a.) spezifische Fettsäure C13:0iso wurde lediglich auf Parzelle 521 am 23.11.1997 in eher geringer Abundanz erfaßt. Andere Fettsäuren, vor allem 10Methyl C18:0, der Aktinomycetales I (Gruppe 5) wurden sehr häufig in höheren Anteilen detektiert. Dies deutet daraufhin, daß diese Bakteriengruppe auf allen drei Parzellen als eine der dominanten Bakteriengruppen gelten kann. Für die Gruppe der Aktinomyceten wurde bisher nur eine Biomarker-Fettsäure ermittelt, 10Methyl C18:0, Tuberkulostearinsäure (Kroppenstedt, 1985). Die Zusammenfassung einiger für Aktinomycetales charakteristischer Fettsäuren zeigte für die Bodenproben der untersuchten Parzellen teilweise sehr starke Schwankungen an, was möglicherweise auf die Empfindlichkeit dieser Bakteriengruppe auf bestimmte Umwelteinflüsse hindeutet.

Auch die Hauptgruppe 9 (*Bacillus sphaericus* u. ähnliche Bakterien) für die die Fettsäure C16:1 ω 7c alcohol bedeutend war, schien am Standort keine Rolle zu spielen. Die Gram⁺ Bakterienhauptgruppen 4, 6, 7 und 11 besaßen keine für sie spezifischen Fettsäuren. Ihre Hauptfettsäuren fanden sich regelmäßig im Gesamtfettsäurespektrum wieder. Eine Dynamik dieser Bakteriengruppen im Jahresgang kann daher nicht detailliert, sondern nur zusammenhängend betrachtet werden. Vermutlich handelte es sich bei diesen Bakteriengruppen um dominante Vertreter der Gram⁺ Bakterienpopulationen auf den beprobten Ackerparzellen. Die Ergebnisse der Gesamtfettsäureanalysen lassen daher darauf schließen, daß auf allen beprobten Parzellen eher Gram⁻ nicht isolierte Bakterien, als Gram⁺ Bakterien dominierten.

Als signifikante Fettsäure für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* und *Flexibacter/Bacteroides* wird in der Literatur C16:1 ω 5c genannt. Diese Fettsäure wurde in den Bodenproben aller Parzellen mit Ausnahme weniger Probenahmeterminen, regelmäßig nachgewiesen. In Isolaten der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* konnte diese Fettsäure aber niemals nachgewiesen werden. C16:1 ω 5c wurde dagegen in Isolaten der Gruppe 16 mit Anteilen von ca. 10% nachgewiesen. Bei diesen mittels Fettsäureanalyse nicht identifizierten.

Isolaten könnte es sich um Vertreter der Gattung *Flexibacter* handeln. Der relativ konstant hohe Anteil der Fettsäure C16:1 ω 5c am Gesamtfettsäurespektrum (bis 5% und mehr) in den Bodenproben aller untersuchten Parzellen läßt eine konstante Präsenz und Dominanz von Vertretern der Gattung *Flexibacter* vermuten. Eine weitere Erklärung für die Herkunft dieser Fettsäure ist ein eukaryontischer Ursprung. Da C16:1 ω 5c jedoch auch in beträchtlichen Anteilen detektiert wurde, wenn andere eukaryontische Fettsäuren nur in sehr geringen Anteilen nachgewiesen werden konnten, ist ein eukaryontischer Ursprung dieser Fettsäure eher unwahrscheinlich. Die Anteile der Fettsäure C16:1 ω 5c waren in Bodenproben der Parzelle 508 durchschnittlich ca. 25% niedriger als in Bodenproben der Parzellen 520 und 521, aber ebenfalls konstant vertreten. Dies deutet auf einen hohen und relativ konstanten Anteil der *Flexibacter*-Vertreter an der Bakteriengemeinschaft sämtlicher untersuchter Ackerparzellen hin.

Die spezifischen Fettsäuren für viele Untergruppen der Hauptgruppe 8 (*Cytophaga* /*Flavobacterium* u.a.), C17:1 ω 6c,9c, C15:0iso3OH, C17:0iso3OH, C15:1 ω 6c und C16:0 3OH ließen sich in den Gesamtfettsäurespektren nicht wieder finden. Die isolierten Vertreter dieser Gruppe spielen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit am Standort keine bedeutende Rolle, oder sie weisen ein sehr flexibles Fettsäuremuster auf, was ihren Nachweis in Bodenproben erschwert.

Auch die Fettsäure C16:0 10 methyl, charakteristisch für Sulfatreduzierer (*Desulfobacter* u.a.) war im Jahresgang auf den verschiedenen Parzellen kontinuierlich nachweisbar (bis ca. 5%), was auf einen hohen Anteil dieser Bakteriengruppe in Bodenproben der obersten 10 cm aller untersuchten Parzellen hindeutet.

Ein Vergleich der Gesamtfettsäurespektren der unterschiedlich gedüngten Parzellen im Jahresgang zeigt mit Ausnahme der teilweise sehr hohen Anteile eukaryontischer Fettsäuren an bestimmten Probenahmeterminen auf den ersten Blick keine markanten Unterschiede. Es dominierten wahrscheinlich Gram⁻ Bakterien mit den Hauptfettsäuren C16:0, C16:1 ω 7c, C18:0, C18:1 ω 7c/9t/12t wie sie für Vertreter der Gruppe 2 (β - und γ -Proteobacteria) charakteristisch sind auf allen Parzellen. Durch das Fehlen kurzkettiger Hydroxyfettsäuren in den Gesamtfettsäurespektren der Bodenproben wird eine konstante Dominanz von *Pseudomonas*-Arten, insbesondere der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe, jedoch ausgeschlossen. Eine Ausnahme bildete die Probenahme am 24.04.1997 (Parzelle 521). Einen weiteren dominanten Anteil an der gesamten bakteriellen Diversität besaßen diverse Gram⁺ Bakteriengruppen der Bacilli und Aktinomyceten. Eine unter den Isolaten nicht vertretene,

aber für die untersuchten Parzellen bedeutende Bakteriengruppe konnte anhand der Fettsäure 16:1 ω 5c nachgewiesen werden, die auf Bakterien der Gattung *Flexibacter* hindeutet.

Federle (1986), stellte in 47 Arten von Bodenpilzen die Fettsäure C18:2 ω 6c fest, die durchschnittlich 43% der Gesamt-PLFA ausmachte. Geringe Mengen dieser Fettsäure wurden jedoch auch in *Flexibacter polymorphus* nachgewiesen (Johns & Perry, 1977) und in Nadeln norwegischer Fichten (Wellburn *et al.*, 1994). Das Vorkommen dieser Fettsäure in hohen Anteilen an bestimmten Probenahmeterminen ist daher vermutlich auf eine massive Vermehrung pilzlicher Biomasse zurückzuführen. 18:2 ω 6c konnte jedoch auch in einigen isolierten Aktinomyceten in hohen Anteilen nachgewiesen werden und ist daher nicht nur für Pilze eine bedeutende Fettsäure.

Es konnte gezeigt werden, daß die Verhältnisse bestimmter Fettsäuregruppen zueinander wertvolle Hinweise auf die Dominanz bestimmter Bakteriengruppen im Jahresgang liefern können. Zu einer übersichtlichen Darstellung der sehr umfangreichen Fettsäuremuster im Jahresgang empfiehlt sich die Clusteranalyse in Dendrogrammform. Auch McNaughton *et al.* (1999), stellten die Ergebnisse ihrer Gesamtfettsäureanalysen aus Bakteriengemeinschaften eines Sandbodens auf diese Art und Weise informativ dar.

Die Gesamtfettsäureanalysen zeigten, daß es sich bei den Bakteriengemeinschaften in den beprobten Parzellen um stabile Bakterienpopulationen handelte, deren dominante Vertreter im allgemeinen konstant im Jahresgang vertreten waren, und lediglich in ihren Abundanzen an den verschiedenen Probenahmeterminen schwankten. Diese Schwankungen konnten jedoch nicht direkt mit Düngungsmaßnahmen unterschiedlicher Art korreliert werden. Auch das teilweise dominante Auftreten eukaryontischer Fettsäuren auf der ungedüngten Parzelle 521 muß auf andere Umwelteinflüsse zurückgehen. Ein Fruchtwechsel schlug sich ebenfalls nicht langfristig in den Fettsäuremustern der untersuchten Parzellen nieder. Falls es kurzfristige Reaktionen der Bakteriengemeinschaft auf Düngungsereignisse gegeben hat, so ist die Methode der Gesamtfettsäureanalyse, aufgrund der geringen Zahl echter Biomarkerfettsäuren, nicht empfindlich genug diese im einzelnen für verschiedene Bakteriengruppen aufzuzeigen.

4.5 Ermittlung der Diversität ausgewählter Bakteriengruppen mittels DGGE

Unter den isolierten und identifizierten Bakteriengruppen waren einige besonders dominant, was auf eine potentielle Signifikanz dieser Bakterien für die untersuchten Ackerparzellen hindeutet. Dies war zum einen die Gruppe der Bacilli, die Gruppe der Pseudomonaden, und diverse Actinomycetales, sowie Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*. Die jahreszeitliche Dynamik der Bacilli, Pseudomonaden und der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* wurde auf der Basis von 16S rDNA-Fragmenten mittels DGGE untersucht. Hierfür wurden ausgewählte, spezifische Primerpaare verwendet. Die Ergebnisse der DGGE-Profile wurden ebenfalls als Clusteranalyse in Dendrogrammform übersichtlich dargestellt und interpretiert. Clusteranalysen in Dendrogrammform zur Auswertung von PCR-DGGE-Profilen wurden unter anderem auch in der Arbeit von Duineveld *et al.* (1998) erfolgreich angewandt.

Die DGGE-Profile der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* waren unter dem Aspekt eines Jahresganges am aussagestärksten. Es ließ sich eine deutlich erkennbare Änderung im Bandenmuster mit dem Wechsel der angebauten Pflanzenart nachweisen. Auch die im Vergleich zu den anderen untersuchten Bakteriengruppen überschaubare Bandenanzahl im Gel führte zu einer sicheren Interpretation der DGGE-Profile.

Die DGGE-Bandenmuster der untersuchten Parzellen ließen deutliche Unterschiede zwischen den Probenahmen 1997 und 1998 erkennen, die einhergingen mit einem Wechsel der angebauten Pflanzenart von Gerste 1997 auf Raps 1998. Dies zeigte sich im DGGE-Profil durch zwei zusätzlich auftretende dominante Banden ab März 1998. Insgesamt konnten mindestens fünf dominante Banden und mehr als zehn schwache Banden im aufgezeigten Jahresgang von 1997 bis 1998 detektiert werden. Die Diversität der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* verzeichnete im DGGE-Profil des Jahres 1998 im Vergleich zu 1997 eine deutliche Zunahme. Im Verlauf des Jahres 1998 sind signifikante Veränderungen innerhalb dieser Gruppe nicht zu erkennen. Dies galt sowohl für Parzelle 508, als auch für Parzelle 520 und 521.

Ein Vergleich der DGGE-Profile der verschiedenen Parzellen zeigte keine auffälligen Unterschiede. Im Gegenteil, die Bandenmuster stimmten im Hinblick auf die dominanten Banden im Jahresgang weitestgehend überein und zeigten im Hinblick auf schwächere Banden nur sehr geringe Unterschiede.

Die Diversität der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* in Anreicherungskulturen nährstoffarmer und nährstoffreicher Medien und ihre Analyse mittels DGGE führte ebenfalls

zu einem interessanten Ergebnis. Insgesamt wurde deutlich, daß die Auftrennung von amplifizierten 16S rDNA-Fragmenten aus Anreicherungskulturen zu einem, verglichen mit den Amplifikaten aus Umweltproben, reichhaltigeren Bandenmuster führte. Dies deutet auf eine hohe Diversität innerhalb dieser Bakteriengruppe hin, von der ein Großteil bei der DNA-Extraktion aus Bodenproben nicht erfaßt, in einem zu geringen Prozentsatz (<1%) vorlag, oder durch Amplifikationspräferenzen bei der PCR unberücksichtigt blieb. Das Spektrum dieser Bakteriengruppe ist damit auf jeden Fall größer, als es nach den DGGE-Bandenmustern aus Umwelt-DNA allein erscheint.

Die Ergebnisse der Auswertung von DGGE-Profilen von Anreicherungskulturen nährstoffarmer und nährstoffreicher Medien zeigten, daß sowohl die Zusammensetzung eines Mediums, als auch die gewählte Inkubationstemperatur, sowie der Zeitpunkt der Bodenprobenahme zu signifikant unterschiedlichen Bandenmustern führten, deren Diversität verglichen mit 16S rDNA Amplifikaten aus Umweltproben deutlich höher lag. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Medienzusammensetzungen bietet jedes ausgewählte Medium bestimmten Bakterienarten mit unterschiedlichsten Ansprüchen Wachstumsmöglichkeiten, die je nach Inkubationstemperatur variieren. Prinzipiell zeigten Anreicherungskulturen des Mediums TSB 3 die höchste Anzahl an Banden im Vergleich von DGGE-Profilen der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Diversität der Bacilli und Pseudomonaden führten zu konstant umfangreichen DGGE-Bandenmustern im Jahresgang. Dies läßt auf eine sehr hohe Diversität innerhalb dieser Gruppen am Standort schließen. Zu dem diversen Bandenmuster trugen wahrscheinlich vor allem nicht isolierte Bacilli und Pseudomonaden bei. Aufgrund dieser enormen Diversität ist eine konkrete Aussage zur Jahresdynamik dieser Bakteriengruppen, sowie eine verlässliche Zuordnung von Isolaten zu einzelnen Banden in den DGGE-Profilen der Umweltproben schwierig. Generell bedingt ein gleiches Laufverhalten von Banden im Gel keine Übereinstimmung der Sequenzinformation und damit eine Identifizierung. Ergebnisse dieser Art können nur als Hinweise gedeutet werden, die mittels Bandensequenzierung überprüft werden muß. Desweiteren muß die Anzahl und Intensität von Banden nicht zwingend die Anzahl und Häufigkeit von Arten einer Bakteriengemeinschaft repräsentieren, da Sequenzheterogenitäten in ribosomalen Genen von Bakterien, durchaus zu mehr als einer DGGE- oder TGGE-Bande führen können (Nübel *et al.*, 1996). Auch ist es nicht immer möglich 16S rDNA-Fragmente mit einer bestimmten Anzahl von Sequenzvariationen exakt zu trennen (Vallaeys *et al.*, 1997). Diese Tatsache fiel bei einigen

Reinkulturen dieser Gruppen auf, wobei bei der Amplifikation mittels PCR stets neben einer dominanten Bande ein bis drei schwächere Banden auftraten.

Die Auswertung der Clusteranalysen deutet mit Ausnahme weniger Probenahmeterminen aufgrund der niedrigen euklidischen Distanz der Cluster (1,2) auf eine konstante Präsenz der untersuchten Bakteriengruppen in den Bodenproben aller Parzellen an den verschiedenen Probenahmeterminen hin, wobei für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* eine deutliche Zunahme der Diversität mit Wechsel der Fruchtfolge von 1997 auf 1998 ermittelt werden konnte.

Die Auswertung der Gruppe der Bacilli in Anreicherungskulturen ergab deutlich weniger Banden, als in den Umweltproben auftraten. Es scheint, daß die überwiegende Mehrzahl dieser hoch diversen Bakteriengruppe mit den ausgewählten Medien und Inkubationsbedingungen nicht zu isolieren war. Wahrscheinlich ist der nicht isolierte Teil dieser Bakteriengruppe unter den aeroben heterotrophen Bakterien zu finden. Eine andere Möglichkeit wäre ein hoher Gehalt von Sporen in den Bodenproben, die bei der DNA-Extraktion mit erfaßt, aber deren Vertreter mit der begrenzten Medienpalette nicht isoliert werden konnten.

Da die Diversität der Pseudomonaden in den Anreicherungskulturen nicht erfaßt wurden, kann ein Vergleich der Diversität in Umweltproben mit der angereicherten Diversität hier nicht erfolgen. Die Ergebnisse der Isolierung haben jedoch gezeigt, daß mit Ausnahme von *Pseudomonas diminuta* ausschließlich Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe vornehmlich auf Mineralmedien isoliert werden konnten. Nach den molekularbiologischen Untersuchungen scheinen Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, wie auch die Bacilli am Standort stets in hoher Diversität präsent zu sein.

Für mögliche weiterführende Untersuchungen wäre zu empfehlen die Gruppe der Bacilli und der Pseudomonaden bei Untersuchungen mittels DGGE noch weiter zu differenzieren und für verschiedene Untergruppen Primerpaare zu entwickeln, die ein Fragment amplifizieren, das für den Einsatz in der DGGE geeignet ist. Auch eine Analyse der Gruppe *Flexibacter/Bacteroides* mit spezifischen Primerpaaren und nachfolgender Auftrennung der 16S rDNA-Amplifikate mittels DGGE, böte sich aufgrund der Ergebnisse der Gesamtfettsäureanalysen an, die bereits auf die Präsenz und Dominanz dieser Bakteriengruppen hinwiesen.

Die Diversität der Aktinomyceten wurde molekularbiologisch nicht untersucht, wäre aber aufgrund der Vielzahl isolierter Vertreter dieser Gruppe, von denen für einige der Nachweis der Nitratreduktion erbracht werden konnte, durchaus sinnvoll.

4.6 Untersuchungen zur Nitratreduktion/Denitrifikation der kultivierten Bakteriengemeinschaft

In diesen letzten Teil der Diskussion fallen sowohl die Ergebnisse des Denitrifikationstests nach Alef (1990), als auch die N₂O-Produktion von Anreicherungskulturen, sowie die Ergebnisse zum genetischen Potential der Denitrifikation ausgewählter Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*.

Mittels Denitrifikationstest konnten Ergebnisse von einer Vielzahl von Isolaten gewonnen werden, die im D-Medium Wachstum zeigten. Diese Tatsache schränkt die Beurteilung einzelner Bakteriengruppen hinsichtlich ihres Denitrifikationspotentials unter Laborbedingungen ein. Den höchsten Anteil denitrifizierender Isolate fanden sich in der Gruppe 2 (γ -Proteobacteria), so daß diese Bakteriengruppe vorrangig als isolierbare denitrifizierende Bakteriengemeinschaft bezeichnet werden kann. Aber auch in einigen Untergruppen der anderen isolierten Bakterienhauptgruppen konnte Denitrifikation nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Isolate in den Untergruppen dieser Bakteriengruppen waren jedoch Nitratreduzierer. Besonders hoch war der Anteil der Nitratreduzierer bei Isolaten der Gruppen 3 (*Bacillus mycoides* u.a.) und 4 (Gram⁺, Actinomycetales III). Hirofumi *et al.* (1998), konnten auch unter verschiedenen Actinomycetales bereits die Fähigkeit zur Denitrifikation nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für einige der Gattung *Nocardia* nahestehenden Isolate Nitratreduktion im D-Medium eindeutig demonstriert werden.

Für die mit einem „?“ und dem Zusatz „k.W.“ (kein Wachstum) versehenen Isolate gilt keineswegs, daß sie nicht in der Lage sind Nitrat zu reduzieren, sondern, daß sie unter den gewählten Laborbedingungen dazu nicht oder nicht mehr in der Lage waren. Das genetische Potential zur Denitrifikation bei diesen Isolaten kann mit Hilfe der entwickelten Primerpaare für diverse Reduktasen ermittelt werden, wie es für einen Großteil der Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse bezüglich des genetischen Potentials zur Denitrifikation dieser Bakteriengruppe zeigte interessante Ergebnisse auf. Aus der Literatur ist wenig zur Denitrifikation von Vertretern der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* bekannt. Lediglich bei einigen Stämmen von *Chryseobacterium johnsoniae* (vormals *Cytophaga johnsonae*) und *Flavobacterium sp.* ließ sich Denitrifikation unter Laborbedingungen physiologisch nachweisen (Jeter & Ingraham, 1989). Neben dem Nachweis der Nitratreduktase-Gene und der N₂O-Reduktase-Gene in jeweils ca. 30% der Isolate, wiesen 7% gleichzeitig die N₂O-Reduktase-Gene und Nitratreduktase-Gene oder die N₂O-Reduktase-Gene und die Nitrit-Reduktase-Gene auf. Bei weiteren 23% der Isolate waren die Ergebnisse zum genetischen

Denitrifikationspotential negativ. Bei ihnen handelt es sich möglicherweise um Mikroaerobier. Der Nachweis einer Genausstattung für verschiedene Reduktasen des Denitrifikationsweges bedeutet jedoch nicht, daß diese Fähigkeit *in situ* oder unter Laborbedingungen auch exprimiert wird. Man kann Vertreter mit nachgewiesener genetischer Ausstattung zur Denitrifikation nur als potentiell für die Denitrifikation bedeutende Mikroorganismen bezeichnen. Für Vertreter dieser Bakteriengruppe konnte eine Denitrifikation unter Laborbedingungen (Denitrifikationstest nach Alef) nicht gezeigt werden. Die Mehrheit der Isolate wuchs nicht in dem für diesen Test vorgeschriebene D-Medium.

Unter Laborbedingungen wurde die Fähigkeit zur Denitrifikation, gemessen als gebildetes N_2O , quantitativ ermittelt. Hierzu wurden Bakteriengemeinschaften aus Bodenproben der drei untersuchten Parzellen vergleichend untersucht. Da die Nitratgehalte im Boden der Parzelle 520 ungefähr doppelt so hoch waren, wie im Boden der Parzelle 521, ist erwartungsgemäß der Anteil gebildeten N_2O in mit Nitrat supplementierten Anreicherungskulturen 1998 deutlich höher. Dies bezeugt, daß die in der untersuchten, regelmäßig mit einem Ammonium-Nitratgemisch gedüngten Ackerparzelle 520 etablierten Bakterienpopulationen, deren Gemeinschaft ähnlich zusammengesetzt war, wie die der vergleichend untersuchten Parzellen 508 und 521, verstärkt ihr Potential zur Denitrifikation nutzen und sich bei Bedarf schnell und effektiv der angebotenen terminalen Elektronenakzeptoren als Alternative zum Sauerstoff bedienen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden ca. 1000 Isolate mittels nährstoffreicher und nährstoffarmer, nitrathaltiger Medien unter anoxischen Bedingungen gewonnen. Desweiteren wurden zwei Methoden miteinander kombiniert, die es ermöglichten bakterielle Diversität im Jahressgang bis zu einem gewissen Grad qualitativ und quantitativ zu erfassen. Hierbei handelte es sich um die Fettsäureanalyse aus Bodenproben und um die Amplifikation von 16S rDNA aus DNA-Extrakten der untersuchten Böden und deren Auftrennung mittels DGGE. Im Vordergrund stand hierbei die Diversität einer ökologisch bedeutenden Bakteriengruppe, der Denitrifikanten/Nitratreduzierer. Daß die Fähigkeit zur Denitrifikation in fast allen heute bekannten Bakteriengruppen nachgewiesen wurde, macht sie zu einem wichtigen ökologischen Faktor. Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob eine unterschiedliche Bodenbehandlung (Düngung) über einen Zeitraum von mehreren Jahren zur Etablierung einer speziell angepassten Bakteriengemeinschaft denitrifizierender und nitratreduzierender Bakterienpopulationen an einem regelmäßig mit Nitrat gedüngten Standort führt. Verglichen wurden dabei zwei unterschiedlich gedüngte und eine ungedüngte Ackerparzelle.

Nach den Ergebnissen der Isolierung waren neben dem sporadischen massenhaften Auftreten von denitrifizierenden Vertretern der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe vor allem nitratreduzierende Gram⁺ Bakterien, insbesondere Bacilli und Aktinomyceten, auf allen beprobten Parzellen konstant dominant. Die Gesamtfettsäureanalysen aus Bodenproben ergaben für die gesamte bakterielle Diversität jedoch eine eindeutige Dominanz Gram⁻ Bakteriengruppen. Die Auswertung der Gesamtfettsäureanalysen anhand von Biomarkerfettsäuren und Hauptfettsäuren verschiedener Bakteriengruppen machte deutlich, daß andere als die isolierten *Pseudomonas*-Arten für die untersuchten Ackerparzellen bedeutend zu sein scheinen.

Unter den Isolaten der γ -Proteobacteria trugen Vertreter der Gattungen *Comamonas*, *Variovorax* und *Pseudomonas*, aber nicht die Vertreter der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe, zu einem konstanten aber nicht dominanten Anteil der Bakteriengemeinschaft bei, was durch bestimmte Hydroxyfettsäuren in den Gesamtfettsäuremustern der Böden und Isolate belegt werden konnte. Isolierte Vertreter der Gattungen *Achromobacter*, *Proteus*, *Serratia*, diverser Enterobakterien, *Acinetobacter* und *Burkholderia* gehörten dagegen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu den bedeutenden Vertretern der Bakteriengemeinschaft. Die unter den Isolaten eher kleine Gruppe der α -Proteobacteria mit den Gattungen *Paracoccus*, *Ochrobactrum* und *Phyllobacterium*, machte dagegen einen eindeutig konstant und

dominanten Anteil an der Bakteriengemeinschaft aus, worauf die regelmäßige Detektion der Fettsäure C19:0cyclo ω 8c hinwies. Viele in den Gesamtfettsäurespektren detektierten, aber in den Isolaten nicht detektierten Fettsäuren ließen auf diverse nicht isolierte Bakteriengruppen schließen. Ebenso wiesen hohe Anteile bestimmter Fettsäuren in Isolaten, die in Bodenproben nicht ermittelt werden konnten, auf eine potentielle Unterrepräsentanz dieser Bakteriengruppen am Standort hin. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Gesamtfettsäureanalysen auf deutlich weniger Gram⁺ als Gram⁻ Bakterien in den Bodenproben hin, als es nach den Ergebnissen der Isolierung den Anschein hatte. Durch einen konstanten Nachweis der für viele Aktinomyceten charakteristischen Biomarkerfettsäure 10MethylC18:0 gelten jedoch Vertreter dieser Bakteriengruppe in Bodenproben aller Standorte als dominant.

Auswirkungen von Jahreszeit, Düngung und Wechsel der angebauten Pflanzenart auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ließen sich in den Gesamtfettsäurespektren nicht nachweisen. Abgesehen von leichten Schwankungen in den Fettsäurespektren im Jahresgang sind lediglich die gelegentlich hohen Anteile eukaryontischer Fettsäuren, vermutlich von Bodenpilzen/Mykorrhiza, bedeutend für die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Parzelle 521. Auf die Dominanz von Vertretern der *Flexibacter/Bacteroides*-Gruppe wies die regelmäßig in hohen Abundanzen detektierte Fettsäure C16:1 ω 5c hin. Über Diversität und Bedeutung dieser in den untersuchten Böden dominanten Bakteriengruppe ist auch im Hinblick auf Nitratreduktion und Denitrifikation bisher nicht viel bekannt. Für einige Vertreter dieser Gruppe konnte Denitrifikation nachgewiesen werden (Zumft, 1997). Signifikante Fettsäuren isolierter Vertreter der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* konnten dagegen in Bodenproben nicht ermittelt werden, obwohl Bakterien dieser Gruppe isoliert werden konnten.

Da es unter den Fettsäuren keine Biomarkerfettsäuren für Denitrifikanten/Nitratreduzierer aufgrund ihrer weiten Verbreitung in unterschiedlichsten Bakteriengruppen gibt (im Gegensatz zur Gruppe der Sulfatreduzierer: C16:0 10Methyl), kann die Gesamtfettsäureanalyse keine Hinweise auf Dynamiken denitrifizierender oder nitratreduzierender Bakterien geben. Sie kann aber durchaus bei einer korrekten Interpretation, die Präsenz und Dominanz bestimmter Bakteriengruppen anhand von Haupt- und Biomarkerfettsäuren, wie es im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, aufzeigen. Für die Analyse nitratreduzierender bzw. denitrifizierender Bakteriengemeinschaften böten sich für zukünftige Untersuchungen auf der Basis verschiedener Reduktasen (*narH*, *nirS* und *nosZ*) entwickelter Primerpaare (Petri, 2000; Braker *et al.*, 1999 u.a.) an, deren mittels DGGE

aufgetrennte Amplifikate einen Vergleich des zur Nitratreduktion (mit Primerpaaren auf der Basis von *narH*) befähigten Teils einer Bakteriengemeinschaft verschieden behandelter Ackerstandorte ermöglichen kann.

Um Jahresgänge für, nach den Ergebnissen der Isolierung, potentiell bedeutende Bakteriengruppen aufzuzeichnen, wurden mittels spezifischer Primerpaare erhaltene 16S rDNA-Amplifikate mehrerer Bakteriengruppen mittels DGGE aufgetrennt und vergleichend analysiert. Ausgewählt hierfür wurde die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*, die Gruppe der Bacilli, sowie die Gruppe der Pseudomonaden. Unter den isolierten Vertretern der Pseudomonaden und Bacilli wurde die Fähigkeit zur Denitrifikation und Nitratreduktion bei vielen Isolaten mittels Denitrifikationstest nachgewiesen. Innerhalb der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* wurde bei vielen Reinkulturen das Vorhandensein von NO_3^- , NO_2^- - und N_2O -Reduktase nachgewiesen, so daß diese Bakteriengruppen möglicherweise einen bedeutenden Anteil der denitrifizierenden/nitratreduzierenden Bakteriengemeinschaft in Böden der untersuchten Ackerparzellen ausmachen. Während für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* eine eindeutige Änderung der Diversität mit Wechsel der angebauten Pflanzenart detektiert werden konnte, ließ sich für die Gruppe der Bacilli und der Pseudomonaden aufgrund der enormen Diversität innerhalb dieser Gruppen anhand der DGGE-Bandenmuster keine Änderung feststellen. Auch Dynamiken innerhalb eines Jahresganges ließen sich für die untersuchten Bakteriengruppen, aufgrund der Vielzahl der Banden, mittels DGGE nicht nachweisen. Eher scheint es, daß die untersuchten Bakteriengruppen im Jahresgang sehr stabil sind. Zumindest für die Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium* konnte jedoch ein Einfluß der angebauten Pflanzenart auf die bakterielle Diversität belegt werden, während weitere im Jahresverlauf eintretende Umwelteinflüsse, wie Klima, Bodenfeuchte, aber auch Düngung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Die Ergebnisse höherer N_2O -Messungen in Anreicherungskulturen aus Bodenproben der Parzelle 520 könnten darauf hindeuten, daß Diversitätsunterschiede innerhalb der Bakteriengemeinschaften der drei untersuchten Ackerparzellen eher im Bereich der Varianz physiologischer Fähigkeiten zu suchen sind, als in der Phylogenie. D.h. die Bakteriengemeinschaften sind möglicherweise phylogenetisch ähnlich zusammengesetzt, aber in den Böden der verschieden behandelten Ackerparzellen dahingehend angepaßt, auf große Mengen bestimmter Substanzen, wie zum Beispiel Nitrat, schnell zu reagieren und diese umzusetzen. Die Hypothese einer verstärkten Etablierung phylogenetisch diverser nitratreduzierender und denitrifizierender Bakteriengemeinschaften in Böden, als Reaktion

auf eine langfristige Nitrat-Düngung, konnte nicht bestätigt werden. Die bakterielle Diversität aller untersuchten Ackerparzellen wurde insgesamt als hoch divers eingestuft. Die isolierten, dominanten Bakteriengruppen stimmten dabei weitestgehend überein. Die Struktur der detektierten Bakteriengruppen konnten mit den gewählten Methoden jedoch nicht bis auf Artebene ermittelt werden, um diese Hypothese glaubhaft zu beweisen oder zu widerlegen.

6. Literatur:

Amann R. I., Krumholt L., Stahl D. A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bact.* 172.: 762-770.

Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.

Alef K. 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. ecomed. Landsberg/Lech. 284 S.

Bakken L.R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Env. Microbiol.* 49: 1482-1487.

Bergey D.H. 1984-1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Holt J.G. (Ed.) Williams & Wilkins. Baltimore. Bd. 1-4.

Bligh E.G. & Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

Bobbie F.J. & White D.C. 1980. Characterization of benthic microbial community structure by High-Resolution Gas Chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Env. Microbiol.* 39: 1212-1222.

Bollag J.M., Orcutt M.L., Bollag B. 1970. Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Science (Soc. Amer. Proc.)*. 34: 875-879.

Bolton J., Elliot L.F., Papendick P.R., Bezdicsek D.F. 1985. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities; effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 17: 297-302

Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J. 1997. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecol.* 36:1-12.

Braker G., Fesefeldt A., Witzel K.-P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *NirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 3769-3775.

Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1998. *Biology of Microorganisms*, VIIth Edition. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey 07632. USA

Brown B.J., Leff L.G. 1996. Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 2183-2185.

Carpenter-Boggs L., Kennedy A.C., Reganold J.P. 1998. Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 4062-4064.

Cremonesi L., Firpo S., Ferrari M., Righetti P.G., Gelfi C. 1997. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques*. 22:326-330.

Dobbs F. C., Findlay R. H. 1993. Analysis of microbial lipids to determine biomass and detect the response of sedimentary microorganisms to disturbance. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp. P. F. (Ed) Chapter 40: 347-358.

- Don R.H., Cox P.T., Wainright B.J., Baker K., Mattick J.S.** 1991. „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Research*. 19: 4008.
- Duineveld B.M., Rosado A.S., van Elsas J.D., van Veen J.A.** 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64. No 12: 4950-4957
- Ecological Systematics (Eco Sys.) Beiträge zur Ökosystemforschung. 1996 Bd. 15. Christian-Albrechts-Universität-Kiel, Kiel.
- Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W.** 1970. The continuous culture of microorganisms. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 2. Norris J.R. & Ribbons D.W (Edts.). Academic Press. London: 277-327.
- Federle T.W.** 1986. Microbial distribution in soil – new techniques. In: *Perspectives in microbial ecology*. Megusar F., Gantar M. (eds) Slovene Society for Microbiology. Ljubljana: 493-498.
- Fedorova R.I., Milekhina E. I., Ilyukhina N.I.** 1973. On the possibilities of the „gas exchange“ method for the detection of extraterrestrial life: Identification of nitrogen-fixing microorganisms. *Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Biol.* 6:797-806.
- Findlay R. H., Trexler M. B., Guckert J. B., White D. C.** 1990. Laboratory study of disturbance in marine sediments: Response of a Microbial Community. *Marine Ecology Progress Series*. 62: 121-133.
- Findlay R. H., Dobbs F. C.** 1993. Quantitative description of microbial communities using lipid analysis. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp P. F. Chapter 32: 271-284.
- Fisher S.G., Lerman L.S.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.
- Fraser D.G., Doran J.W., Sahs W.W., Lesoing G.W.** 1988. Soil microbial populations and activities under conventional and organic management. *J. Env. Qual.* 17: 585-590.
- Fritsche W.** 1990. *Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag. Jena
- Frostegård A., Tunlid A., Baath E.** 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 3605-3617.
- Frostegård A., Petersen S. O., Baath E., Nielsen T. H.** 1997. Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 2224-2231.
- Gamble T.N., Betlach M.R., Tiedje J.M.** 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Env. Microbiol.* 33: 926-939.
- Gavini F., Holmes B., Izard D., Beji A., Bernigaud A. Jakubczak E.** 1989. Numerical taxonomy of *Pseudomonas alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, and related bacteria. *I. J. Syst. Bacteriol.* 39: 135-144.
- Guckert J. B., Antworth C. P., Nicols P. D., White D. C.** 1985. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 147-158.

- Haack S. K., Garchow H., Odelson D. A., Forney L. J., Klug M. J.** 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 2483-2493.
- Hirofumi S., Mitsuyoshi K., Ikuko B., Naoki T., Masaru M.** 1998. Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *J. Bact.* 180: 4413-4415.
- Jeter R.M., Ingraham J.L.** 1986. The Denitrifying Prokaryotes. In: *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin. 1986.
- Johns R.B., Perry G.J.** 1977. Lipids of the marine bacterium *Flexibacter polymorphus*. *Arch. Microbiol.* 114: 267-271.
- Kandeler E., Schinner F., Öhlinger R., Margesin R.** 1993. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden* (Hrsg.). 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin.
- Kaneda T.** 1966. Fatty acids in the genus *Bacillus*. *Journal of Bacteriology*. .vol. 93. No 3: 894-903
- Kaneda T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. *Microbiol. Rev.* 55: 288-302.
- Knowles R.** 1990. Acetylene inhibition technique: development, advantages and potential problems. In: *Denitrification in Soil and Sediment*. Revsbech N.P. Sørensen J. (Eds). FEMS symposium Vol 56. Plenum Press New York.
- Knowles R.** 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46: 43-70.
- Koebbemann & Thiele.** 1994. *Bodenkarte, Versuchsgut Hohenschulen. AG Bodenkunde. Christian-Albrechts-Universität, Kiel* (unveröff.).
- Kroppenstedt R.M.** 1985. Fatty acids and menaquinone analyses of actinomycetes and related organisms. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Goodfellow M., Minnikin D.E. (eds):173-199. Academic Press. London.
- Kuenen G., Robertson L. A.** 1994. Combined Nitrification-Denitrification Processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 109-117.
- Landesvermessungsamt Schleswig-Holstein.** 1998. *Topographische Karte:1625, Flehmude, 1:25000.*
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F., Lemanceau P.** 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations (wird noch vervollständigt)
- Le Chevalier M.P.** 1977. Lipids in bacterial taxonomy – a taxonomists view. *Crit. Rev. Microbiol.* 5: 109-210.
- Le Chevalier H., Le Chevalier M.P.** 1988. Chemotaxonomic use of lipids – an overview. In: *Microbial Lipids. Vol. 1*. Ratledge C., Wilkinson S.G. (eds). Chapter 12: 869-902. Academic Press, London. United Kingdom.
- Lerman L.S., Fisher S.G., Hurley I., Silverstein K., Lumelsky N.** 1984. Sequence-determined DNA separations. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13: 193-202.

- Microbial Identification Inc.** 1996. Microbial Identification-Handbuch. Newark. Delaware. USA.
- McGarity J.W.** 1961. Denitrification studies on some south australian soils. *Plant and Soil*. 14: 1-21.
- McNaughton S.J., Stephen J.R., Vonosa A.D., Davis G.A., Chang Y-J., White D.C.** 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 3566-3574.
- Moreno-Vivián C., Cabello P., Martínez-Luque M., Blasco R., Castillo F.** 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases - Minireview. *J. Bact.* 181: 6573-6584.
- Mullis K.B. & Faloona F.A.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-351.
- Muyzer G., De Waal E., 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. Env. Microbiol.* 59: 695-700.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C. O., Jannasch H.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165-172.
- 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: 127-141.
- Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 155: 501-527.
- Newton C.R. & Graham A.** 1994. PCR. BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford: 208.
- Nichols P.D, Stulp B.K., Jones J.G., White D.C.** 1986. Comparison of fatty acid content and DNA homology of the filamentous gliding bacteria *Vitreoscilla*, *Flexibacter* and *Filibacter*. *Arch. Microbiol.* 146: 1-6.
- Nordby H., Nemeč S., Nagy S.** 1981. Fatty acids and sterols associated with citrus root mycorrhizae. *J. Agr. Food Chem.* 29: 396-401.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snajdr L., Amann R., Ludwig W., Backhaus H.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by TGGE. *J. Bact.* 178: 5626-5643.
- Parkes R. J., Taylor J.** 1983. The Relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 16:173-189.
- Parkes R.J.** 1987. Analysis of microbial communities within sediments using biomarker. In: Fletcher M., Gray T.P.G., Jones J.G. (eds) *Ecology of Microbial Communities*. Cambridge Univ. Press. London: 147-178.
- Petersen S.O., Henriksen K., Blackburn T.H.** 1991. Coupled nitrification-denitrification associated with low input manure in a gel-stabilized model system. *Biol. Fertil. Soils*. 12: 19-27.

- Petri R.** 1999. Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der respiratorischen Nitratreduktase. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Abteilung Marine Mikrobiologie. Prof. Dr. J.F. Imhoff.
- Petri R., Imhoff J.F.** 2000. The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and the congruent phylogeny of *narH* and 16S rDNA based on pure culture studies and analyses of environmental DNA. *Xyst. Appl. Microbiol.*, 23: 47-57
- Petri R., Imhoff J.F.** 2000. The development of phototrophic purple sulfur bacteria in Baltic Sea ice cover detected by analysis of environmental DNA and application of an improved double gradient method of denaturing gradient gel electrophoresis. *Polar Bio.* (akzeptiert)
- Rajendran N., Matsuda O., Urushigawa Y., Simidu U.** 1994. Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan, by phospholipid fatty acid analysis. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 248-257.
- Ratledge C. & Wilkinson S.G.** 1988. An overview of microbial lipids. In: *Microbial Lipids*. Vol. 1. Chapter 1: 4-22. Academic Press. London. UK.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
- Scala D. J., Kerkhof L. J.** 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 1681-1687.
- Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M.** 1989. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Nation. Acad. Sc.* 86: 232-236.
- Skinner F.A.** (1968). The anaerobic bacteria of the soil. In: *Ecology of soil bacteria. An international symposium*: 572-591.
- Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W.-T., Forney L.** 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 1220-1225.
- Stahl D.A., Flesher B., Mansfield H.R., Montgomery L.** 1988. Use of phylogenetically based hybridisation probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Env. Microbiol.* 54: 1079-1084.
- Tearle P.V., Richard K.J.** 1987. Ecophysiological grouping of antarctic environmental bacteria by API 20 NE and fatty acid finger prints. *J. Appl. Bact.* 63: 497-503.
- Thauer R.K., Jungermann K., Decker K.** 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Rev.* 41: 100-180.
- Tiedje J. M., Sexstone A. J., Myrold D. D., Robinson J. A.** 1982. Denitrification: Ecological Niche, Competition and Survival. *Antonie van Leeuwenhoek.* 48: 569-583.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L.** 1989. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 56: 782-787.
- Vallaëys T., Topp E., Muyzer G., Macheret B., Laguerre G., Rigaud A., Soulas G.** 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 279-285.

- White D.C., Davies W.M., Nickels J., King J.D., Bobbie R.J.** 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*. 40: 51-62.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O.I., Krichevsky M.I. Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Trüper H.G. et al.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. I. *J. Bact. Syst.* 37: 463-464.
- Vestal J.R., White D.C.** 1989. Lipid analysis in microbial ecology. Quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*. 39: 535-541.
- Wellburn A.R., Robinson D.C., Thomson A., Leith I.D.** 1994. Influence of episodes of summer O₃ on Δ^5 and Δ^9 fatty acids in autumnal lipids of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *New Phytology*. 127: 355-361.
- Zumft W.G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 553-616.
- Zhou J., Palumbo A. V., Tiedje J. M.** 1997. Sensitive detection of toluene-degrading denitrifiers, *Azoarcus toluolyticus*, with small-subunit rRNA primers and probes. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 2384-2390.

7. Abkürzungsverzeichnis:

ai	anteiso
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
c	cis
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DGGE	denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ECLD	euklidische Distanz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FID	Flammenionisationsdetektor
i	iso
Ki	Kiel
MIDI	Microbial Identification Incorporation
MIS	Microbial Identification System
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	Similaritätsindex
t	trans
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCD	Temperature Conductivity Density
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TS	Trockensubstanz
TSB	Trypticase-Soy-Broth
UG	Untergruppe
UPGM	unweighted pair group matching
UPGMA	unweighted pair group matching analysis

8. Abbildungsverzeichnis:	Seite
Abb. 1: Schema der assimilatorischen und dissimilatorischen Nitratreduktion (Brock <i>et al.</i> , 1998, verändert)	6
Abb. 2: Struktur der Cytoplasmamembran. Aufbau einer Doppelschicht („fatty acid bilayer“) aus Phospholipiden mit hydrophoben Gruppen (innen) und hydrophilen Gruppen (außen) und Transmembranproteinen Die Grundstruktur der Cytoplasmamembran ist bei Prokaryoten und Eukaryoten ähnlich aufgebaut (Brock <i>et al.</i> , 1998, verändert)	7
Abb. 3: Geographische Lage des Untersuchungsgebietes. Das Versuchsgut Hohenschulen ist mit einem roten Pfeil markiert. (Topographische Karte: 1625, Flemhude, Landesvermessungsamt Schleswig-Holstein, 1:25000)	8
Abb. 4: Bodenkarte von Schlag III des Versuchsguts Hohenschulen (SFB 192) mit eingezeichneten Probenahmeparzellen (Koebbemann & Thiele, 1994)	9
Abb. 5: Ausschnitt aus Schlag III mit Parzelle 520 im Vordergrund am 11.05.1998	11
Abb. 6: Ausschnitt aus Schlag III mit Parzelle 520 im Vordergrund am 13.12.1998	12
Abb. 7: Anaerobe Inkubation von Agarplatten verschiedener Medien bei Raumtemperatur in einem Anaerobenbehälter (Eigenbau AG Marine Mikrobiologie, Hans Sell).....	18
Abb. 8: Untersuchung eines Isolates (Ki-55) auf Variation der Membranfettsäurezusammensetzung bei unterschiedlicher Vorkultivierung (siehe Text)	23
Abb. 9: Spezifität verschiedener Festmedien für distinkte Bakteriengruppen, 1996	35
Abb. 10: Spezifität verschiedener Festmedien für distinkte Bakteriengruppen, 1997-1998 ...	37
Abb. 11a: Clusteranalyse (UPGMA) der 19 Bakterienhauptgruppen auf der Basis von euklidischen Distanzen >25 in Dendrogrammform	43
Abb. 12: Fettsäuremuster der Gruppe 1 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	45
Abb. 13: Fettsäuremuster der Gruppe 2 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	47
Abb. 14: Fettsäuremuster der Gruppe 3 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	49
Abb. 15: Fettsäuremuster der Gruppe 4 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	52
Abb. 16: Fettsäuremuster der Gruppe 5 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	54
Abb. 17: Fettsäuremuster der Gruppe 6 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	57
Abb. 18: Fettsäuremuster der Gruppe 7 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	60
Abb. 19: Fettsäuremuster der Gruppe 8 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	62

Abb. 20: Fettsäuremuster der Gruppe 9 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	63
Abb. 21: Fettsäuremuster der Gruppe 10 (ECLD 25) mit allen Untergruppen (ECLD 10)	65
Abb. 22: Diversität isolierter Bakterien (ECLD 25) der untersuchten Parzellen 520 und 521 im Jahrgang 1997-1998.....	72
Abb. 23: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 508, (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5).....	81
Abb. 24: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 508 im Jahrgang.....	78
Abb. 25: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 520 im Jahrgang.....	84
Abb. 26: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 520, (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5).....	88
Abb. 27: Gesamtfettsäureanalyse aus Bodenproben der Parzelle 521 im Jahrgang.....	90
Abb. 28: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 521, (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5).....	93
Abb. 29: Gesamtfettsäurespektren der Parzellen 508, 520 und 521 im Vergleich (Jahrgang).....	96
Abb. 30: Statistische Analyse der Gesamtfettsäurespektren von Parzelle 508, 520 und 521, (UPGMA), Ähnlichkeit ausgedrückt in euklidischen Distanzen (STATISTCA, Version 5)	97
Abb. 31: Zusammenfassung der Anteile für isolierte α -, β - und γ -Proteobacteria signifikanten Fettsäuren	99
Abb. 32: Zusammenfassung der Anteile für isolierte Actinomycetales signifikanten Fettsäuren (Hauptgruppe 5 u.a.)	101
Abb. 33: Zusammenfassung der Anteile für isolierte Gram ⁺ Bakterien und Vertreter der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> signifikanten Fettsäuren	102
Abb. 34: Signifikante Fettsäuregruppen für verschiedene isolierte Bakteriengruppen im Jahrgang in Bodenproben der Parzellen 508, 520 und 521.....	105
Abb. 35: Bildung distinkter funktioneller Fettsäuregruppen nach Findlay <i>et al.</i> (1990) Darstellung der funktionellen Cluster I-IV für die einzelnen Parzellen.....	108
Abb. 36: Bildung distinkter funktioneller Fettsäuregruppen nach Findlay <i>et al.</i> (1990). Vergleichende Darstellung jeweils einer der vier funktionellen Cluster für die drei untersuchten Parzellen.....	109
Abb. 37: Agarose Gelelektrophorese von DNA-Extrakten aus Umweltproben.....	112

Abb. 38: Agarose-Gelelektrophorese von 16S rDNA-Amplifikaten der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> aus Umweltproben	113
Abb. 39: DGGE von eubakteriellen 16S rDNA-Fragmenten der 16S rDNA aus Umweltproben	114
Abb. 40 : Diversität von <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> im Jahresgang in Parzelle 520	116
Abb. 41: Clusteranalyse der DGGE-Profile (UPGMA) aus Abbildung 40.....	117
Abb. 42: Diversität von <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> im Jahresgang in Parzelle 521	118
Abb. 43: Clusteranalyse der DGGE-Profile (UPGMA) aus Abbildung 42.....	118
Abb. 44: Diversität von <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> im Jahresgang in Parzelle 508	119
Abb. 45: Clusteranalyse der DGGE-Profile (UPGMA) aus Abbildung 44	120
Abb. 46: Lauflänge von Amplifikaten ausgewählter Isolate der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> im DGGE-Gel	123
Abb. 47: DGGE-Profile von PCR-Amplifikaten der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> aus Umweltproben und Anreicherungskulturen der Parzelle 508 und 521 im Vergleich	125
Abb. 48: Clusteranalyse der DGGE-Profile (UPGMA) aus Abbildung 47.	125
Abb. 49: DGGE-Profile von PCR-Amplifikaten der Gruppe: <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> aus Umweltproben und Anreicherungskulturen der Parzelle 508, 520 und 521 im Vergleich.....	127
Abb. 50: Clusteranalyse der DGGE- Profile (UPGMA) aus Abbildung 49	127
Abb. 51: DGGE-Profile von PCR-Amplifikaten der Gruppe: <i>Cytophaga/Flavobacterium</i> aus Anreicherungskulturen vom der Parzellen 520 und 521 im Vergleich.....	128
Abb. 52: Clusteranalyse der DGGE- Profile (UPGMA) aus Abbildung 51.	129
Abb. 53: Parzelle 520: Diversität der Bacilli im Jahresgang.....	131
Abb. 54: Clusteranalyse der DGGE- Profile (UPGMA) aus Abbildung 53.....	131
Abb. 55: Parzelle 521: Diversität der Bacilli im Jahresgang.....	132
Abb. 56: Clusteranalyse der DGGE- Profile (UPGMA) aus Abbildung 55.....	132
Abb. 57: Parzelle 508: Diversität der Bacilli im Jahresgang.....	133
Abb. 58: Clusteranalyse der DGGE- Profile (UPGMA) aus Abbildung 57.....	133

Abb. 59: 16S rDNA-Amplifikate ausgewählter Isolate der Bacilli	135
Abb. 60: Diversität der Bacilli 1998: Parzelle 508, 520 und 521 (1998) im Vergleich	136
Abb. 61: Parzelle 508, 520 und 521: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Profile aus Abbildung 60.....	136
Abb. 62: Diversität der Bacilli im Jahrgang 1997-1998: Parzelle 520 + 521	137
Abb. 63: Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenmuster aus Abb. 62.....	138
Abb. 64: Parzelle 520 und 521: Diversität der Bacilli in Anreicherungskulturen	138
Abb. 65: Clusteranalyse der DGGE-Profile (UPGMA) aus Abbildung 64.	139
Abb. 66: DGGE-Profile von PCR-Amplifikaten der Gruppe: <i>Pseudomonas</i> aus Umweltproben der Parzelle 508, 520 und 521 im Vergleich.....	140
Abb. 67: Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster (UPGMA) aus Abbildung 66.....	140
Abb. 68: Ergebnisse der Amplifikation mit spezifischen Primern für Nitrat-, Nitrit- und N ₂ O-Reduktase an 31 Isolaten der Gruppe <i>Cytophaga/Flavobacterium</i>	142
Abb. 69: Ergebnisse des Denitrifikationstest nach Alef,1991	143
Abb. 70: N ₂ O Produktion in Anreicherungskulturen	146

9. Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Metabolische Diversität denitrifizierender Bakteriengattungen 4

Tab. 2 : Düngergaben und Pflanzenschutz zum Schlag III
(Angaben 1996-1999 von Dr. R. Ströh, Versuchsgut Hohenschulen) 10

Tab. 3: Sequenzen verwendeter Primerpaare 29

Tab. 4: Die PCR folgte dem hier dargestelltem Temperaturprogramm 29

Tab. 5: Stammlösungen für DGGE-Gele 32

Tab. 6: Isolierte Bakterienhauptgruppen (ECLD >25..... 42

Tab. 7: Bakterienhauptgruppe 1 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996)..... 44

Tab. 8: Bakterienhauptgruppe 2 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996).....46

Tab. 9: Bakterienhauptgruppe 3 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996)..... 48

Tab. 10: Bakterienhauptgruppe 4 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996).....50

Tab. 11: Bakterienhauptgruppe 5 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 53

Tab. 12: Bakterienhauptgruppe 6 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 55

Tab. 13: Bakterienhauptgruppe 7 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 58

Tab. 14: Bakterienhauptgruppe 8 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 61

Tab. 15: Bakterienhauptgruppe 9 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 63

Tab. 16: Bakterienhauptgruppe 10 mit Untergruppen (MIS). Beurteilung der SI 64
zum „closest match „ (MIS) nach Leff & Brown (1996) 64

Tab. 17: „Biomarkerfettsäuren“ isolierter Bakteriengruppen. 69

Tab.18: Zuordnung von Fettsäuren zu funktionellen Clustern nach
Findlay *et al.* (1990), verändert..... 107

Tab. 19 : Ausgewählte Isolate der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*..... 121

Tab. 20: Ausgewählte Isolate der Gruppe der Bacilli.....134

Tab. 21: Phylogenetisches Potential zur NO_3^- , NO_2^- und N_2O -Reduktion
 von Isolaten der Gruppe *Cytophaga/Flavobacterium*..... 141

10. Anhang

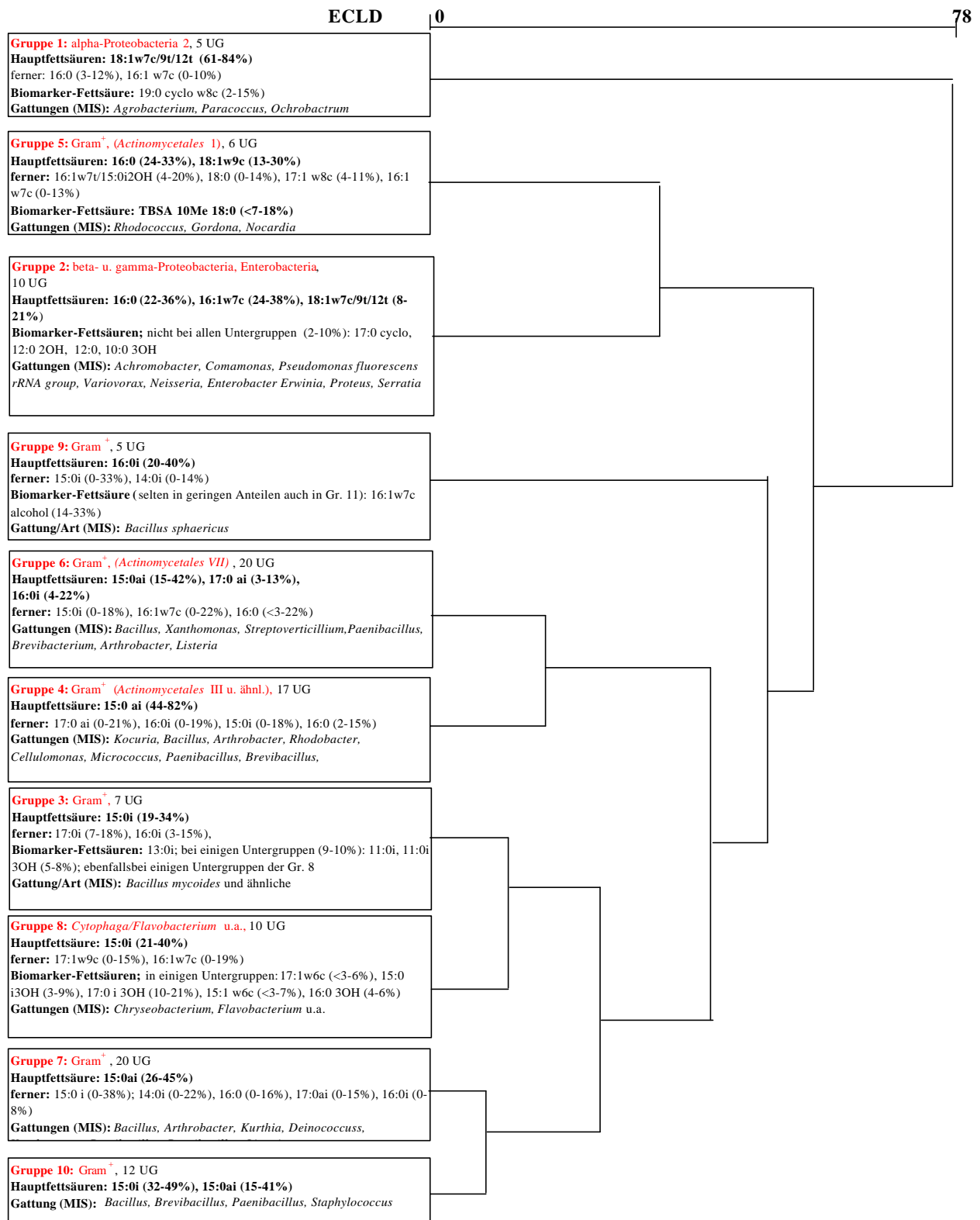


Abb. 11b: Detailliertes Dendrogramm (UPGM) isolierter Bakteriengruppen (ECLD >25) mit Angabe ihrer charakteristischen Haupt-, Neben- und Biomarkerfettsäuren, sowie der Anzahl Untergruppen (UG, ECLD >10) und den ähnlichsten Gattungen (MIS, "closest match")

Tab. 12a: Charakteristische eukaryontische Fettsäuren

Eukaryonten: (besitzen zu 50% mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Findlay & Watling, 1997))						
Fettsäuren	Phylogenie	Metabolismus	Tax. / Funktionelle Gruppe	Gattung/Art	Bemerkung	Literatur
C20-30	Mikroekaryont		Mikroekaryonten allgemein		terr. org. Input	Parkes & Taylor (1983), Rajendran <i>et al.</i> (1992)
Einfach ungesättigte FS	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryonten allgemein			Rajendran <i>et al.</i> (1994)
Einfach ungesättigte Fettsäuren (monoenoic)						
16:1 ω 5	Mikroekaryont	aerob	Fungi, Mikroekaryonten	<i>Glomus spec.</i> (Mycorrhiza)		Frostegeård <i>et al.</i> (1993), Guckert <i>et al.</i> (1985), Findlay <i>et al.</i> (1990)
16:1 ω 7c	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryont			Findlay <i>et al.</i> (1990)
16:1 ω 9	Mikroekaryont	photoautotroph, aerob	Mikroalgen			Findlay & Dobbs (1993)
16:1 ω 13t	Mikroekaryont	photoautotroph, aerob	Mikroalgen			Findlay <i>et al.</i> (1990)
17:1 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryont			Findlay <i>et al.</i> (1990)
17:1 ω 9	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryont			Findlay <i>et al.</i> (1990)
18:1 ω 3	Mikroekaryont	aerob	Hefen, höhere Fungi, Algen			Bobbie & White (1980)
18:1 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Protozoa, Tiere			Bobbie & White (1980)
18:1 ω 7	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryont			Findlay <i>et al.</i> (1990)
18:1 ω 9	Mikroekaryont	photoautotroph, aerob	Mikroalgen			Findlay & Dobbs (1993)
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyenoic)						
16:3	Mikroekaryont	aerob	Mikroekaryont			Findlay & Dobbs (1993)
16:4 ω 1	Mikroekaryont	aerob	Diatomee			Findlay & Dobbs (1993)
18:2 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Fungi			Findlay & Dobbs (1993), Vestal & White (196)
18:3 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Fungi			Findlay & Dobbs (1993)
18:3 ω 3	Mikroekaryont	photoautotroph, aerob	Mikroalgen			Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
18:4 ω 3	Mikroekaryont	aerob	pflanzlich			Findlay & Dobbs (1993)
20:3 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Fungi			Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
20:4 ω 6	Mikroekaryont	aerob	Fungi			Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
20:5 ω 3	Mikroekaryont	photoautotroph, aerob	Algae		Hauptfettsäure	Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990), Findlay & Watling (1998)
22:5 ω 6	Mikroekaryont	aerob	tierisch			Findlay & Dobbs (1993)
Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite						

22:6 ω 3	Mikroeukaryont	aerob	pflanzlich			Findlay & Dobbs (1993)
18:3, 20:3, 20:4, 16:1 ω 5c	Mycorrhiza		Fungi			Nordby <i>et al.</i> (1982)
Gesättigte Fettsäuren						
20:0	Mikroeukaryot	aerob	Protozoa	<i>Paramecium</i>	Hauptfettsäure	Frostegård <i>et al.</i> (1997)
Verzweigtkettige und cyclische Fettsäuren						
C13-21 i u. ai verzweigt., cy	Mikroeukaryot	aerob	Protozoa, Fungi		wenn ausreichend Precursors vorhanden, sonst selten	Bobbie & White (1980)
cycl. FS	Mikroeukaryot	aerob	Protozoa, einige terrestrische Pflanzen		in Kinetosomen	Bobbie & White (1980), Parkes & Taylor (1983)

Tab. 12b: Charakteristische prokaryontische Fettsäuren

Prokaryonten: C12-C19 in höheren Konzentrationen nur bei Bakterien (Rajendran <i>et al.</i> , 1992, Kates, 1977), einfach ungesättigte FS dominieren (Rajendran <i>et al.</i> , 1992, Gillian & Hogg, 1984), i und ai verzweigte FS und cycl. FS, Paare gesättigter FS mit 2 C-Atomen Differenz häufig (z.B. ai 15:0, ai 17:0)						
Fettsäuren	Phylogenie	Metabolismus	Tax. / Funktionelle Gruppe	Gattung/Art	Bemerkung	Literatur
Einfach ungesättigte Fettsäuren (monoenoic)						
Kurze verzweigte FS:	Prokaryont		Prokaryont		bakterielle Biomassebestimmung	Bobbie & White (1980)
15:1	Prokaryont			SRB, <i>Desulfobacter sp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i>		Rajendran <i>et al.</i> (1994)
16:1 (allg.)	Prokaryont		TypI-methanotroph			Bowman <i>et al.</i> (1993), Makula (1978)
16:1 ω 5	Prokaryont (+Euk.)	aerob	Prokaryont	<i>Flexibacter</i> , <i>Cytophaga</i>		Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
16:1 ω 7c	Prokaryont (+Euk.)	aerob	Prokaryont			Carpenter-Boggs <i>et al.</i> (1998), Findlay <i>et al.</i> (1990), Findlay & Dobbs (1993)
16:1 ω 7t	Prokaryont		Prokaryont			Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993)
16:1 ω 9	Prokaryont		Prokaryont			Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993)
16:1 ω 11c	Prokaryont			<i>Bacillus</i>		
Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite						

17:1ω6c	Prokaryont (+Euk.)	aerob	Prokaryont	SRB, <i>Desulfobacter</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Desulfobulbus</i>		Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990), Rajendran <i>et al.</i> (1994), Parkes & Calde (1985), Taylor & Parkes (1983)
17:1ω7	Prokaryont			<i>D. desulfuricans</i>	Hauptfettsäure (ca. 43%)	
17:1ω9	Prokaryont (+Euk.)		Prokaryont			Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
18:1ω7c	Prokaryont (+Euk.)	(facultativ) aerob	Gram ⁻ Bakterien		dominante FS bei aeroben Prokaryonten, auch SRB, Gram ⁻ , anaerobic desaturase-Weg	Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
18:1 ω8c	Prokaryont	anaerob	TypII-methanotroph			Bowman <i>et al.</i> (1993), Makula (1978), Nichols <i>et al.</i> (1985)
18:1ω9c	Prokaryont			<i>Corynebacterium</i>	hoher Anteil	Haack <i>et al.</i> (1994)
Einfach ungesättigte, verzweigte Fettsäuren (monoenoic): wie auch cyclische und Hydroxy-Fettsäuren finden sich vor allem in Gram ⁻ Bakterien (Frostegård <i>et al.</i> , 1992)						
i17:1 ω7	Prokaryont	anaerob	Prokaryont	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfovibrio</i>		Scheuerbrandt & Bloch (1962)
i17:1ω8	Prokaryont		Prokaryont			Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993)
16:1ω7c alcohol	Prokaryont			<i>Bacillus</i>		
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyenoic)						
18:1ω9c	Prokaryont (+Euk.)	aerob	Gram ⁺ Bakterien			Findlay & Dobbs (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990), Frostegård <i>et al.</i> (1993)
18:2ω6	Prokaryont (+Euk.)	aerob	Prokaryont			Findlay <i>et al.</i> (1990)
Gesättigte Fettsäuren: diese Fettsäuren, wie auch verzweigt-kettige Fettsäuren finden sich vermehrt Gram ⁺ und anaeroben Bakterien (Rajendran, 1994.), im Bereich C16-19 vor allem bei SF (Findlay)						
12:0	Prokaryont	anaerob			beträchtl. Anteile	Parkes & Taylor (1983)
14:0	Prokaryont	anaerob	Gram ⁺ u.a. anaerobe Gram ⁻ Bakterien			
15:0	Prokaryont	anaerob	Prokaryont			Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993)
18:0	Prokaryont	aerob		<i>Thiobacillus</i> sp.	Hauptfettsäure	Parkes & Taylor (1983)
Verzweigt-kettige und cyclische Fettsäuren: im Bereich C14-16 finden sich in hohen Anteilen vor allem in Gram ⁺ und anaeroben Bakterien (Rajendran <i>et al.</i> , 1994, Frostegård <i>et al.</i> , 1993)						
i- u. ai, Me FS	Prokaryont		bei den meisten <i>Actinomyceten</i> , Gram ⁺ Bakterien			Harwood & Russel (1984)
i 15:0	Prokaryont	anaerob	Gram ⁺ u.a. anaerobe Gram ⁻ Bakterien	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i>	bei <i>Arthrobacter</i> >60%	Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994)
Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite						

ai 15:0	Prokaryont	anaerob	Gram ⁺ u.a. anaerobe Gram ⁻ Bakterien	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i>	Bei <i>Arthrobacter</i> hoher Anteil	Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994)
i 16:0	Prokaryont	anaerob	Gram ⁺ u.a. anaerobe Gram ⁻ Bakterien	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Bacillus</i>		Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
i 17:0	Prokaryont		Gram ⁺ Bakterien	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Bacillus</i>		Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990)
ai 17:0	Prokaryont		Prokaryont	<i>Arthrobacter</i>	hoher Anteil	Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994)
cy17:0 (ω7,8)	Prokaryont	aerob, anaerob	Viele Gram ⁻ , auch in Gram ⁺ Bakterien	<i>Desulfobacter</i> ssp., <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacilli</i> , einige SRB, einige <i>Enterobacteriaceae</i> , einige <i>Pseudomonaden</i>	Bei hohen Anteilen cyclischer Fettsäuren sind die Anteile ihrer precursors dagegen niedrig	Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994), Rajendran <i>et al.</i> (1994), Guckert <i>et al.</i> (1985)
cy19:0 (ω7,8)	Prokaryont	aerob, anaerob	viele Gram ⁻ Bakterien, bei einigen Arten in stationärer Phase	<i>Desulfobacter</i> ssp., <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacilli</i> , einige SRB, einige <i>Enterobacteriaceae</i> , einige <i>Pseudomonaden</i>		Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994), Rajendran <i>et al.</i> (1994)
10Me 16:0	Prokaryont		Gram ⁺ Bakterien	SRB u.a. anaerobe Bakterien, <i>Desulfobacter</i>		Findlay & Dobbs (1993), Frostegård <i>et al.</i> (1993), Findlay <i>et al.</i> (1990), Dowling <i>et al.</i> (1986)
10Me18:0	Prokaryont		<i>Actinomyceten</i> , <i>Corynebacterium</i>			Frostegård <i>et al.</i> (1993), Haack <i>et al.</i> (1994), Kroppenstedt (1985)
Hydroxy FS	Prokaryont		in bestimmten Gram ⁻ Bakterien	<i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , einige <i>Bacteroides</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Myxococcus</i> , einige <i>Flavobacteria</i> , einige <i>Flexibacter</i>		Kaneda (1991)

Tab. 12c: Verhältnisse von Fettsäuren und Fettsäuregruppen zueinander und ihre Bedeutung

Verhältnisse von Fettsäuren und Fettsäuregruppen zueinander:		
Ratio	Bedeutung	Literatur
trans/cis	physiologischer Stress, Anoxia, Starvation	Rajendran <i>et al.</i> (1994), Frostegård <i>et al.</i> (1997), Bossio & Scow (1998)
br 15:0/cy17:0	Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechsel	Parkes & Taylor (1983)
br 15:0/15:0	höherer eukaryontischer Anteil	Parkes & Taylor (1983)
16:1 ω 7t/16:1 ω 7c		Frostegård <i>et al.</i> (1997)
ungesättigt/gesättigt (z.B. 16:1 ω 7c/16:0)		Parkes & Taylor (1983)
br/monoenoic	relativer Anteil Gram ⁺ zu Gram ⁻ Bakterien	Rajendran <i>et al.</i> (1992), Rajendran <i>et al.</i> (1994)
cy/precursor (cy17:0/16:1 ω 7c, cy19:0/18:1 ω 7c)	Anstieg, wenn gewisse Gram ⁻ Bakterien in die stationäre Phase übergehen, stress indicator, hoch bei sauren Bedingungen, niedrigem O ₂ -Gehalt, hohen Temperaturen	Frostegård <i>et al.</i> (1997), Bossio & Scow (1998)
ai + i 15:0/16:0		Rajendran <i>et al.</i> (1994)

Tab. 22 : Darstellung der Fettsäuremuster sämtlicher Untergruppen (ECLD 10) der verschiedenen Hauptgruppen (ECLD 25), mit ihren signifikanten Haupt- **rot**, Neben- **orange** und Biomarkerfettsäuren **grün**)

	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	
10:0 3OH	<3					7					3	6	5	5	5									
11:0 i																6								
11:0 i3OH																8	5							
unknown 11.789	<3																							
12:00						3					3		4	4	3									
12:0 i																							5	
12:0 2 OH						4			3		5			3	4									
12:0 3OH						10					5			6	5									
12:1 3OH														3										
13:0 i																		9	9	9				10
13:0 ai																								3
13:0i 3OH																		<4						
13:3 3OH/15:1 iI/H																								
unknown 13.566																								
14:00							11	4	5	3		4							3	4				
14:0 i																		4	3					
14:0 2OH													2											
14:0 3OH/16:1 iI																								
14:1 w5c,t																								
15:00								6																
15:0 i																	34	19	18	25	31		29	22
15:0 ai																								3
15:0 3OH																								
15:0 i3OH																								
15:1 w6c																								
15:1 iF																								
15:1 iG																								
15:1ai A																	4							
16:0 i																	8	15	11	8	5		6	3
16:00	3	5	8	3	12	23	36	22	28	28	32	29	28	30	29		<3	12	8			4	5	
16:0 3OH					4																			
16:1 w5c																								
16:1 w7c		5	5	2	10	26	26	32	35	28	24	30	38	33	33	3	<3							
16:1 w9c																								
16:1 w11c																								
16:1 w7c alcohol																								
16:1 w7t/15:0i 2OH																		<3	7	11		12	14	
16:1 w7c alcohol																								
16:1 iI /14:0i 2OH		6	6				7	15	8	7														
16:1 iH																								
17:00																								
17:0 i	<4	<2	4														13	<13	10	7	10		18	13
17:0 ai																								
17:0 i3OH																								
17:0 cyclo					3		5	4		11	10	5			2									
17:0 10methyl																								
17:1 w6c	<4	<2																<8						
17:1w8c	<4	<3																						
i17:1 w5c																						5	12	7
i17:1 w9c																	15	21						
i17:1 w10c																			7	8	6		4	
ai 17:1 w9c																								
17:1 iI/ai B																								
18:00																								
18:0i																								
18:1 w9c																								
18:1 w7c/9t/12t	84	83	74	63	61	8	12	15	13	13	11	21	17	9	13									
18:1 2OH				2																				
18:2 w6c/18:0 ai																								
18:3 w6,9,12c																		<3						
TBSA 10Me 18:0																								
19:0 i																								
19:0 cyclo w8c		8	5	15	6																			
20:00																								
20:0 w6,9c																								
andere FS (<1%)																								

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	4-6	4-7	4-8	4-9	4-10	4-11	4-12	4-13	4-14	4-15	4-16	4-17
10:0 3OH																	
11:0 i																	
11:0 i3OH																	
unknown 11.789																	
12:00																	
12:0 i																	
12:0 2 OH																	
12:0 3OH																	
12:1 3OH																	
13:0 i																	
13:0 ai																	
13:0i 3OH																	
13:3 3OH/15:1 iI/H																	
unknown 13.566																	
14:00								3	5	4	5					3	4
14:0 i			8		4			<3		8	4		5	<5	4	12	
14:0 2OH																	
14:0 3OH/16:1 iI																	
14:1 w5c,t																	
15:00											<4					<6	
15:0 i		3	8	4	8		18	11	7	5	7	8	7	15	10	6	7
15:0 ai	61	82	73	71	49	54	52	54	53	58	55	60	63	55	53	44	51
15:0 3OH																	
15:0 i3OH																	
15:1 w6c																	
15:1 iF																	
15:1 iG																	
15:1ai A																	
16:0 i	9	3	5	4	19	14	<6		6	10	5	6	4	3	7		7
16:00	7	3		4	8		<3	15	8	10	9	<4	7	5		10	
16:0 3OH																	
16:1 w5c																	
16:1 w7c							<5										
16:1 w9c																	
16:1 w11c								<6	<8	3	6	<6	4	5			8
16:1 w7c alcohol																	
16:1 w7t/15:0i 2OH																	
16:1 w7c alcohol														2	<4		
16:1 iI/14:0i 2OH																	
16:1 iH																	
17:00																	
17:0 i						3											<3
17:0 ai	21	6	2	8	4	11	9	<3	<5	<3	<5	7			8		
17:0 i3OH																	
17:0 cyclo																	
17:0 10methyl																	
17:1 w6c																	
17:1w8c																	
i17:1 w5c																	
i 17:1 w9c																	
i17:1 w10c																	
ai 17:1 w9c												<5					
17:1 iI/ai B															<3		
18:00																5	
18:0i																	
18:1 w9c																	
18:1 w7c/9t/12t																	
18:1 2OH																	
18:2 w6c/18:0 ai																	
18:3 w6,9,12c																	
TBSA 10Me 18:0																	
19:0 i																	
19:0 cyclo w8c																	
20:00																	
20:0 w6,9c																	
andere FS (<1%)																	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite

	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	6-6	6-7	6-8	6-9	6-10	6-11	6-12	6-13	6-14	6-15	6-16	6-	
10:0 3OH																								
11:0 i																								
11:0 i3OH																								
unknown 11.789																								
12:00																								
12:0 i																								
12:0 2 OH																								
12:0 3OH																								
12:1 3OH																								
13:0 i																								
13:0 ai																								
13:0i 3OH																								
13:3 3OH/15:1 iI/H																								
unknown 13.566																								
14:00							14	<3			<3	<3				3								
14:0 i							9	3			<4	3					<3	3	4	4	4	<7		
14:0 2OH																								
14:0 3OH/16:1 iI																								
14:1 w5c,t																								
15:00			<5	6			3	<3			<5	5		<3			4			3	<3			
15:0 i							6	10	6	7	18	8	13	14	9	11	10	12	5	9	8	<7		1
15:0 ai							27	16	25	17	16	24	18	25	24	34	25	31	42	35	29	36		1
15:0 3OH																								
15:0 i3OH																								
15:1 w6c																								
15:1 iF																								
15:1 iG																								
15:1ai A																								
16:0 i							13	<13	9	7	11	12	13	12	10	4	13	12	11	12	13	17	2	
16:00	28	30	27	33	28	24	15	20	10	15	19	22	<3	13	16	12	15	<5	11	11	13	7	1	
16:0 3OH																								
16:1 w5c																								
16:1 w7c	13	10	8	7	7																			
16:1 w9c																								
16:1 w11c																								
16:1 w7c alcohol																								
16:1 w7t/15:0i 2OH	6	6	4	5	9	20																		
16:1 w7c alcohol																	3							
16:1 iI/14:0i 2OH																								
16:1 iH																								<4
17:00			10	9		4																		
17:0 i								<4			3		7	4			6	5		<4		<3		
17:0 ai							3	5	9	9	5	8	11	6	8	10	12	13	11	11	9	12		
17:0 i3OH																								
17:0 cyclo																								<8
17:0 10methyl																								
17:1 w6c																								
17:1w8c	7	5	8	11	<11	4																		
i17:1 w5c																								
i17:1 w9c								4		5	<3		6	4	<3						<3			
i17:1 w10c																								
ai 17:1 w9c								<3	7	6			3	<3	<3						4			
17:1 iI/ai B																								
18:00	4	5	<4	7	14		4			<4														
18:0i																								
18:1 w9c	23	30	13	18	22	14																		
18:1 w7c/9t/12t																								
18:1 2OH																								
18:2 w6c/18:0 ai																								
18:3 w6,9,12c																								
TBSA 10Me 18:0	8	6	<7	7	12	18																		
19:0 i																								
19:0 cyclo w8c																								
20:00																								
20:0 w6,9c						3																		
andere FS (<1%)																								

	6-18	6-19	6-20	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	7-6	7-7	7-8	7-9	7-10	7-11	7-12	7-13	7-14	7-15	7-16	7-17	7-18	
10:0 3OH																						
11:0 i																						
11:0 i3OH							4															
unknown 11.789																						
12:00																						
12:0 i																						
12:0 2 OH																						
12:0 3OH																						
12:1 3OH																						
13:0 i																						
13:0 ai																						
13:0i 3OH																						
13:3 3OH/15:1 iI/H																						
unknown 13.566																						
14:00							4										3	4	<3	5	<3	
14:0 i	6	5	5	3	7	4				7		5		7	6	6	6	11	<3	5	8	
14:0 2OH																						
14:0 3OH/16:1 iI																						
14:1 w5c,t																						
15:00	4		<3			4													<3		<4	
15:0 i		8	9	6	11	16	6	30	21	34	31	35	38	30	35	14	20	24	17	15	18	
15:0 ai	25	26	30	26	26	36	44	32	39	32	26	32	41	44	41	41	42	36	34	45	44	
15:0 3OH																						
15:0 i3OH																						
15:1 w6c																						
15:1 iF																						
15:1 iG																						
15:1ai A																						
16:0 i	18	22	17	8		4		3	3	4	4		3	<3	<3	5	7	8	<5		3	
16:00	10	3	9	16	6	11	10	3	3	5		4		5				3	<12	8	4	
16:0 3OH																						
16:1 w5c																						
16:1 w7c	9	3	6	17							4						6		<13			
16:1 w9c																						
16:1 w11c					9	6				3	4	9		<3	<5				<8	10	8	
16:1 w7c alcohol					4	3										8			<6		5	
16:1 w7t/15:0i 2OH																						
16:1 w7c alcohol																						
16:1 iI/14:0i 2OH																						
16:1 iH		7	<3														3					
17:00																						
17:0 i		3						11	12	5					<3				<4		<3	
17:0 ai	7	10	8	10	6			15	14	6	6		9	4	<5	9		4	<6		<3	
17:0 i3OH																						
17:0 cyclo																						
17:0 10methyl																						
17:1 w6c																						
17:1w8c																						
i17:1 w5c																						
i17:1 w9c		4																			<4	
i17:1 w10c																						
ai 17:1 w9c	3	5	<3	4																	<3	
17:1 iI/ai B					5						4					9					<5	
18:00					3	6	5															
18:0i																						
18:1 w9c																						
18:1 w7c/9t/12t																						
18:1 2OH																						
18:2 w6c/18:0 ai								9														
18:3 w6,9,12c								7														
TBSA 10Me 18:0																						
19:0 i																						
19:0 cyclo w8c																						
20:00																						
20:0 w6,9c																						
andere FS (<1%)																						

	7-19	7-20	8-1	8-2	8-3	8-4	8-5	8-6	8-7	8-8	8-9	8-10	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	11-1	11-2	11-3	11-4
10:0 3OH																					
11:0 i			6		4	4															
11:0 i3OH			9			3															
unknown 11.789																					
12:00																					
12:0 i																					
12:0 2 OH																					
12:0 3OH						3															
12:1 3OH																					
13:0 i											3										
13:0 ai																					
13:0i 3OH								3													
13:3 3OH/15:1 i/H												4	<5								
unknown 13.566																					
14:00	6					3															
14:0 i	22	7		8									14	8	6	8		3			3
14:0 2OH																					
14:0 3OH/16:1 iH																					
14:1 w5c,t																					
15:00							7	7		12	7	<3				6					
15:0 i		27	32	32	23	35	26	25	40	21	32	33	15	20	33	25		54	48	49	39
15:0 ai	34	27	6	7	18	11		3			3	<4				10	12	22	19	28	41
15:0 3OH											3										
15:0 i3OH							8	8	3	8	9	8									
15:1 w6c								3		7	3	<3									
15:1 iF					3																
15:1 iG																					
15:1ai A																					
16:0 i	6	<6	6	6		4							40	31	26	19	20				
16:00	3		3	3	7	4	5	3													
16:0 3OH							6	4													
16:1 w5c																					
16:1 w7c			4	6	14	10	19	15		5	6	6									
16:1 w9c					4																
16:1 w11c	3														3	3	<4	5			4
16:1 w7c alcohol	4	14											22	33	22	21	14	<7			
16:1 w7t/15:0i 2OH									8												
16:1 w7c alcohol																					
16:1 iH/14:0i 2OH																					
16:1 iH																					
17:00				3																	
17:0 i			13			5									4				12	5	
17:0 ai			3																	5	3
17:0 i3OH								10	21	12	12	12									
17:0 cyclo																					
17:0 10methyl																					
17:1 w6c										6	3	<3									
17:1w8c				8																	
i17:1 w5c																					
i 17:1 w9c			14		6	5	3	4	14	6	7	15									
i17:1 w10c															3			<3		3	
ai 17:1 w9c																					
17:1 iH/ai B		5																3			
18:00				3																	
18:0i																					
18:1 w9c				8																	
18:1 w7c/9t/12t																					
18:1 2OH																					
18:2 w6c/18:0 ai																					
18:3 w6,9,12c																					
TBSA 10Me 18:0																					
19:0 i																					
19:0 cyclo w8c																					
20:00																					
20:0 w6,9c																				5	
andere FS (<1%)																					

	11-5	11-6	11-7	11-8	11-9	11-10	21-1	21-2	21-3	21-4	11	19	12a	12b	15	16	17	18
10:0 3OH																		
11:0 i																		
11:0 i3OH																		
unknown 11.789																		
12:00													<8					
12:0 i																		
12:0 2 OH																		
12:0 3OH													6					
12:1 3OH																		
13:0 i																		
13:0 ai																		
13:0i 3OH																		
13:3 3OH/15:1 iI/H																		
unknown 13.566																5		
14:00		5					12		7	5								4
14:0 i	<4	4	3	4	<3	3	7		4	5				<9				
14:0 2OH																		
14:0 3OH/16:1 iI																		5
14:1 w5c,t													<6					
15:00																		
15:0 i	33	46	44	36	32	35	24	31	33	26	<6			5		15	12	
15:0 ai	32	15	21	17	20	26	8	26	10	16	44			<16			29	
15:0 3OH																		
15:0 i3OH																	3	
15:1 w6c																		
15:1 iF																		
15:1 iG																		
15:1ai A																		
16:0 i	<3			<3				4		<3	<18			33				
16:00	<3	5	3	<5	11	10	9	4	14	13	5		10	<6		8	3	19
16:0 3OH																		4
16:1 w5c																		
16:1 w7c				<4														
16:1 w9c													28	8		28		14
16:1 w11c	<8	13	11	<9	12	4	31	4	19	17								
16:1 w7c alcohol	<4	3		<3				4										
16:1 w7t/15:0i 2OH																		15
16:1 w7c alcohol																		
16:1 iI/14:0i 2OH																		
16:1 iH															<8			
17:00														9	<4			
17:0 i			3	7	4	6					<6		10	<17			8	
17:0 ai				<3	<3	4		6			21		6	<5			6	
17:0 i3OH																6		
17:0 cyclo															<4			11
17:0 10methyl															<4			
17:1 w6c																		
17:1w8c															23	<15		
i17:1 w5c																		
i 17:1 w9c																		
i17:1 w10c	<3		6	10						<3								
ai 17:1 w9c															<3			
17:1 iI/ai B				<3				4										
18:00											<7							14
18:0i											<5				<3			
18:1 w9c							4						29	13	<10	40		
18:1 w7c/9t/12t													5					39
18:1 2OH					<3	4												
18:2 w6c/18:0 ai																47		
18:3 w6,9,12c																		
TBSA 10Me 18:0																		
19:0 i																	5	
19:0 cyclo w8c																		3
20:00																		12
20:0 w6,9c																		
andere FS (<1%)																		

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.F. Imhoff für seine Betreuung und Beratung im Verlauf meiner Arbeit, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. P. Schönheit danke ich für seine Bereitschaft, das Korreferat für meine Arbeit zu übernehmen.

Außerdem danke ich Sylvia Walter und Regine Wicher für ihren Einsatz und ihre Unterstützung bei den Untersuchungen zur Fettsäureanalyse und Nitratreduktion einer Vielzahl von Isolaten. Auch möchte ich Dr. Rolf Schmaljohann für seine Hilfe bei den gaschromatographischen N₂O- Messungen danken.

Desweiteren denke ich gerne an die Zusammenarbeit mit Silke Nissen bei den molekularbiologischen Analysen zurück, die stets produktiv und motivierend war. Auch den weiteren jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Ökologie danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die sich positiv auf das Gelingen dieser Arbeit ausgewirkt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbstständig angefertigt und außer den hier angegebenen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Kiel, den