

Abschlussbericht

Eignung von Bodenproben aus der Umweltprobenbank für mikrobiologische Untersuchungen – Einfluss des aktuellen Klimas (Niederschlag) zum Zeitpunkt der Probenahme auf die Ergebnisse

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
57392 Schmallenberg

Institutsleitung

Prof. Dr. Rainer Fischer

Stellvertretung und Bereichsleitung

Angewandte Oekologie

Prof. Dr. Andreas Schäffer

Projektleitung

Dr. Kerstin Hund-Rinke

Projektbearbeitung

Dr. Markus Simon

Dr. Thomas Lukow

Schmallenberg, Mai 2003

INHALTSVERZEICHNIS		Seite
1	Einleitung	2
2	Experimenteller Ansatz	3
2.1	Untersuchte Böden und deren Aufarbeitung	3
2.1.1	Untersuchte Böden	3
2.1.2	Bodenaufarbeitung	3
	<i>Probenahme</i>	3
	<i>Probeninkubation – Simulation unterschiedlicher Klimabedingungen</i>	3
	<i>Probenlagerung und Reaktivierung – Simulation der UPB</i>	4
	<i>Wassergehalte der Böden im Versuch</i>	4
2.2	Mikrobielle Biozönose	5
2.2.1	Mikrobielle Funktion	5
	<i>Mikrobielle Atmungsaktivität</i>	5
	<i>Potentielle Ammoniumoxidation</i>	6
2.2.2	Mikrobielle Struktur	6
	<i>Phospholipid-Fettsäure-Indikatoren (PLFA-Indikatoren)</i>	6
	<i>Terminaler Restrictionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)</i>	7
3	Ergebnisse	8
3.1	Mikrobielle Funktion	8
	<i>Basalatmung</i>	8
	<i>Substratinduzierte Atmung (SIR)</i>	9
	<i>Aktivierungsquotient (Q_R)</i>	10
	<i>Potentielle Ammoniumoxidation</i>	11
3.2	Mikrobielle Struktur	13
	<i>Phospholipid-Fettsäure-Indikatoren (PLFA-Indikatoren)</i>	13
	<i>Terminaler Restrictionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)</i>	18
4	Diskussion	25
4.1	Einfluss der Bodenfeuchte	25
	<i>Mikrobielle Funktion</i>	25
	<i>Mikrobielle Struktur</i>	26
4.2	Einfluss der Bodenlagerung	28
	<i>Mikrobielle Funktion</i>	28
	<i>Mikrobielle Struktur</i>	28
4.3	Einfluss der Bodeninkubation	28
	<i>Mikrobielle Funktion</i>	28
	<i>Mikrobielle Struktur</i>	29
5	Zusammenfassung	29
6	Absicherung der gewonnenen Ergebnisse	30
7	Literatur	31

1 Einleitung

Die Umweltprobenbank diene im Hinblick auf Bodenproben bisher der Lagerung von Proben für chemische Bestimmungen. In Diskussion ist die Erweiterung auf biologische Fragestellungen. In einem vorangehenden Vorhaben wurden Untersuchungen zu Einfrieren, Lagerung und Reaktivierung der Proben im Hinblick auf die Beantwortung biologischer Fragestellungen durchgeführt. Schwerpunkt wurde dabei auf die Gruppen „Mikroorganismen“ und „Nematoden“ gelegt.

Um retrospektiv Veränderungen in der Bodenbiozönose erkennen zu können, muss sicher gestellt sein, dass Variationen in biologischen Parametern auf anthropogene Veränderungen und nicht auf jahreszeitliche Einflüsse zurückzuführen sind. Die mikrobielle Biozönose zeigt beispielsweise im Jahresverlauf deutliche Schwankungen (GRAYSTON ET AL., 2001; KANDELER & BÖHM, 1996). Diese sind u.a. auf den unterschiedlichen Vorrat an Nährstoffen zurückzuführen. Düngung und Pflanzenwachstum üben diesbezüglich eine entscheidende Rolle aus. Da festgelegt ist, dass die Bodenprobenahme im Rahmen der Umweltprobenbank im Herbst erfolgen soll, sollten Unterschiede in den Proben aufgrund jahreszeitlicher Einflüsse minimiert sein. Einen Einfluss kann jedoch auch das aktuelle Klima ausüben. Sehr deutlich ist dies bei der Mikroflora zu beobachten. So senkt Austrocknen beispielsweise gravierend die mikrobielle Aktivität. Durch Inkubation bei optimalem Wassergehalt und optimaler Temperatur kann diese jedoch innerhalb weniger Tage wieder hergestellt werden (HUND ET AL., 1994).

Philosophie der Umweltprobenbank ist, dass Proben unmittelbar nach der Entnahme eingefroren werden. Essentiell sind daher Informationen, in wie weit aktuelle klimatische Bedingungen zum Zeitpunkt der Probenahme (z.B. hohe oder niedrige Bodenfeuchte) die Resultate biologischer Untersuchungen beeinflussen können. Ziel muss es sein, die Art sowie das Ausmaß dieser Verschiebungen zu kennen, um bei der Aufarbeitung der Proben zu späteren Zeitpunkten retrospektiv zwischen anthropogen bzw. aktuell klimatisch bedingten Veränderungen in der Biozönose sicher differenzieren zu können.

In diesem Zusammenhang ergeben sich mehrere Fragestellungen:

- In welchem Ausmaß beeinflusst der aktuelle Wassergehalt frischer Bodenproben die Biozönose?
- Übt der Wassergehalt beim Einfrieren einen Einfluss auf die Biozönose aus, indem beispielsweise Zellen beim Einfrieren durch Kristallbildung platzen?
- Können durch eine Inkubation unter optimalen Bedingungen nach dem Einfrieren und Auftauen klimatisch bedingte Einflüsse minimiert werden?
- Nach dem aktuellen Stand des Wissens kann die Charakterisierung der mikrobiellen Population durch Aktivitätsbestimmungen, Erfassung spezifischer Zellwandbestandteile (PLFA-Spektrum) und modernen molekularbiologischen Verfahren erfolgen. Es stellt sich die Frage, ob einzelne mikrobiologische Parameter (z.B. Aktivität / Struktur) unterschiedlich stark auf aktuelle klimatische Einflüsse reagieren und somit eine Gewichtung der Methoden im Hinblick auf die Erkennung von anthropogenen Einflüssen möglich ist.

Um die aufgeführten Fragen beantworten zu können wurden exemplarische Untersuchungen zur mikrobiellen Funktion und Struktur an zwei repräsentativen Bodenarten (Lehm; lehmiger Sand) bei unterschiedlicher Bodenfeuchte vor und nach einer viermonatigen Gefrierlagerung durchgeführt.

2 Experimenteller Ansatz

2.1 Untersuchte Böden und deren Aufarbeitung

2.1.1 Untersuchte Böden

Da die Anzahl der untersuchten Bodenarten auf zwei beschränkt war, wurden exemplarisch ein sandiger und ein lehmiger Boden ausgewählt. Es handelt sich dabei um zwei Böden, die schon in einem vorangegangenen Vorhaben (Methodische Weiterentwicklung der Probenrichtlinie für Böden im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes, FKZ 301 02 006) eingesetzt wurden.

Bei dem lehmigen Boden handelt es sich um eine Ackerbraunerde aus Lösslehm auf der Versuchsstation Klostersgut Scheyern, im weiteren Verlauf als "Lehmboden" bezeichnet. Bei dem sandigen Boden handelt es sich um eine Ackerbraunerde aus dem Bereich des Bornhöveder Seengebietes bei Kiel, im weiteren Verlauf als "Sandboden" bezeichnet. Die bodenkundliche Grundcharakteristik der Böden ist in Tabelle 2.2-1 dargestellt. Es wurden bewusst zwei Ackerstandorte gewählt, da solche Agrarflächen sehr homogen sind und somit klimatisch bedingte Einflüsse sehr deutlich hervortreten lassen.

Tab. 2.1-1: Bodenkundliche Grundcharakteristik der verwendeten Böden. Angaben in % Feinboden (Sand, Schluff, Ton, C_{org}) bzw. ml/kg Feinboden (WHK_{max}). * Kennung nach DIN 4220

	Kennung*	Sand	Schluff	Ton	C _{org}	pH
Lehmboden	Lu	23,0	55,8	21,2	1,4	6,1
Sandboden	Sl	83,4	11,4	5,2	1,1	5,0

2.1.2 Bodenaufarbeitung

Probenahme

Die Proben wurden mittels Stechzylinder als ungestörte Kerne aus dem Oberboden entnommen. Die Kerne hatten einen Durchmesser und eine Höhe von 20 cm. Parallel wurden Proben zur Erfassung der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}), des aktuellen Wassergehaltes sowie ausgewählter chemisch-physikalischer Bodenparameter (pH, Korngrößenspektrum, C_{org}-Gehalt) entnommen. Die Probenahmeterminale waren der 13.08.2002 für den Lehmboden (Scheyern) und der 03.10.2002 für den Sandboden (Kiel).

Probeninkubation – Simulation unterschiedlicher Klimabedingungen

Die Probenkerne wurden unmittelbar nach Ankunft im Institut auf einen niedrigen, mittleren und hohen Wassergehalt eingestellt. Dazu wurden Parallelversuche durchgeführt, um die WHK_{max} der gestochenen Böden zu ermitteln. Hatte ein Kern die angestrebte Bodenfeuchte erreicht, so wurde der Stechzylinder mit Alufolie abgedichtet und bei 4 °C gelagert bis alle Kerne die gewünschte Bodenfeuchte erreicht hatten. Danach wurden die Kerne für 14 Tage bei 20 °C inkubiert damit sich die mikrobielle Population den aktuellen Feuchtigkeitsbedingungen anpassen konnte.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Bodenkerne auf < 2 mm gesiebt. Mit dem gesiebten Boden wurde eine WHK_{max}-Bestimmung durchgeführt. Eine Hälfte des gesiebten Probenmaterials wurde sofort über flüssigem Stickstoff eingefroren, die andere Hälfte wurde weiter für die ersten Analysen vorbereitet. Das Testdesign ist in Abbildung 2.1.2-1 dargestellt.

Mit einem Teil des Materials wurden sofort Untersuchungen zur mikrobiellen Struktur und Funktion durchgeführt. Ein anderer Teil wurde auf 50 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens eingestellt und für weitere 14 Tage bei 20 °C inkubiert damit sich die mikrobielle Population den aktuellen Feuchtigkeitsbedingungen anpassen konnte. Danach wurden auch diese Proben auf mikrobielle Struktur und Funktion untersucht. Die Proben zur T-RFLP Analyse wurden alle bis zur Aufarbeitung über flüssigem Stickstoff gelagert.

Probenlagerung und Reaktivierung – Simulation der UPB

Der gefrorene gesiebte Boden wurde für vier Monate über flüssigem Stickstoff gelagert. Danach wurden die Bodenproben für einen Tag im Brutschrank bei 20 ± 2 °C reaktiviert. Mit einem Teil des Materials wurden sofort Untersuchungen zur mikrobiellen Struktur und Funktion durchgeführt. Ein anderer Teil wurde auf 50 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens eingestellt und für weitere 14 Tage bei 20 °C inkubiert. Danach wurden auch diese Proben auf mikrobielle Struktur und Funktion untersucht. Die Proben zur T-RFLP Analyse wurden alle bis zur Aufarbeitung über flüssigem Stickstoff gelagert.

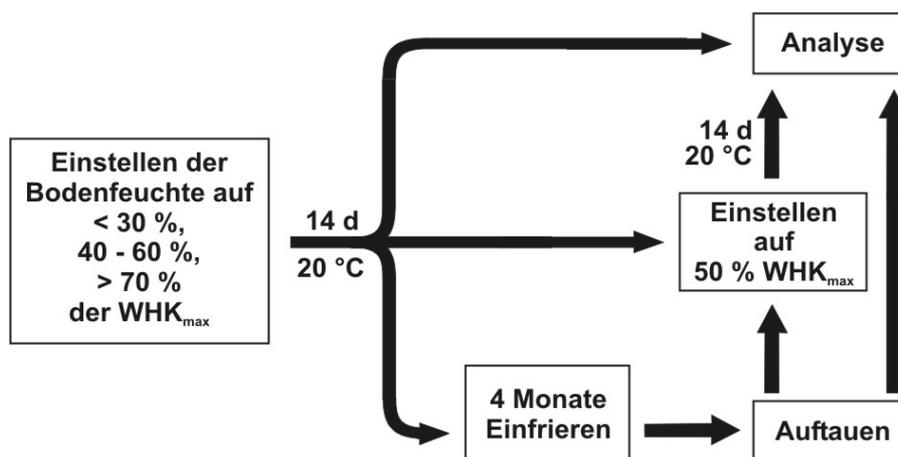


Abb. 2.1.2-1: Schema der Bodenprobenmanipulation zur Simulation unterschiedlicher Klimabedingungen und einer Lagerung in der Umweltprobenbank.

Wassergehalte der Böden im Versuch

Der Lehmboden hatte bei Probenahme 94 % der WHK_{max} des ungestörten Bodens (248 mL/kg). Nach Einstellen der gewünschten Wassergehalte durch Abtrocknen hatten die Kerne 24 %, 62 % bzw. 94 % der WHK_{max} des ungestörten Bodens. Somit repräsentierte die Probe mit 94 % die bei der Probenahme aktuellen Klimabedingungen. Der auf ≤ 2 mm gesiebte Boden hatte eine WHK_{max} von 523 mL/kg. Die Wassergehalte entsprachen somit 9 %, 36 % bzw. 54 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens. Die Werte bestätigten sich bei den eingefrorenen Proben nach dem Auftauen (Tab. 3.1-1). Nach dem Einstellen der Böden auf Laborstandardbedingung (40 – 60 % der WHK_{max}) lagen die Wassergehalte bei 47 – 54 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens.

Tab. 2.1.2-1: WHK_{max} und eingestellte Wassergehalte in Bezug auf die WHK_{max} des Lehmbodens in ungestörtem bzw. gesiebtm Zustand

Konsistenz	WHK_{max}	< 30 %	40 – 60 %	> 70 %
Ungestört	248 mL/kg	24 %	62 %	94 %
Gesiebt	523 mL/kg			
Frisch		9 %	36 %	54 %
Eingestellt		50 %	50 %	54 %
aufgetaut		8 %	37 %	51 %
Eingestellt nach Auftauen		47 %	48 %	51 %

Der Sandboden hatte bei Probenahme 47 % der WHK_{max} des ungestörten Bodens (207 mL/kg). Nach Einstellen der gewünschten Wassergehalte durch Abtrocknen bzw. Anfeuchten hatten die Kerne 22 %, 47 % bzw. 90 % der WHK_{max} des ungestörten Bodens. Somit repräsentierte die Probe mit 47 % die bei der Probenahme aktuellen Klimabedingungen. Der auf ≤ 2 mm gesiebte Boden hatte eine WHK_{max} von 523 mL/kg. Die Wassergehalte entsprachen somit 6 %, 30 % bzw. 82 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens. Die Werte bestätigten sich bei den eingefrorenen Proben nach dem Auftauen mit einer Ausnahme (Tab. 3.1-1). Die Bodenfeuchte der Probe mit dem höchsten Wassergehalt sank von 82 % auf 71 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens. Es handelt sich vermutlich um die Varianz in der Mischprobe. Nach dem Einstellen der Böden auf Laborstandardbedingung lagen die Wassergehalte bei 36 – 52 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens.

Tab. 2.1.2-2: WHK_{max} und eingestellte Wassergehalte in Bezug auf die WHK_{max} des Sandbodens in ungestörtem bzw. gesiebttem Zustand

Konsistenz	WHK_{max}	< 30 %	40 – 60 %	> 70 %
Ungestört	207 mL/kg	22 %	47 %	90 %
Gesiebt	259 mL/kg			
Frisch		6 %	30 %	82 %
Eingestellt		36 %	43 %	50 %
aufgetaut		6 %	31 %	71 %
Eingestellt nach Auftauen		51 %	50 %	52 %

Im Folgenden werden die Proben mit "20", "50" bzw. "90" und gegebenenfalls dem Zusatz "LS" für Laborstandard (eingestellt auf 40 – 60 % der WHK_{max}) bezeichnet.

2.2 Mikrobielle Biozönose

2.2.1 Mikrobielle Funktion

Da im Boden nur ca. 10 % der vorhandenen Mikroorganismen aufgrund der Limitierung an Nährstoffquellen aktiv sind und der übrige Anteil in Ruhestellung vorliegt, liefern Funktionsuntersuchungen Informationen über die unter den herrschenden Bedingungen an Nährstoffkreisläufen tatsächlich beteiligten Mikroorganismen. Als Funktionsparameter werden die sehr häufig angewandten Aktivitätsparameter Atmung und Nitrifikation herangezogen. Über die mikrobielle Atmungsleistung werden die Boden vorliegenden aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen erfasst, die einen Großteil der Mikroflora ausmachen. Bei den Nitrifikanten handelt es sich um eine sehr empfindliche Gruppe, die speziell bei Schadstoffbelastungen frühzeitig Beeinträchtigungen erkennen lässt.

Mikrobielle Atmungsaktivität

Die Atmung wurde nach der Richtlinie ISO/DIS 17155 (2001) im Sapromaten bestimmt. Abweichend von der Richtlinie wurden Basalatmung und substratinduzierte Atmung nicht nacheinander an der selben Probe, sondern parallel an mehreren Aliquots durchgeführt. Dies war notwendig, um den Einfluss der Inkubationsdauer auf die untersuchten Parameter erfassen zu können.

Für die Bestimmung der Basalatmung wurden 100 g der Probe (Frischgewicht) eingewogen und bei 20 °C in einem geschlossenen System (Sapromat: Voith, Heidenheim) für fünf Tage inkubiert. Die Respirationkurve wurde durch die kontinuierliche Messung der O_2 -Aufnahme erstellt.

Parallel zur Messung der Basalatmung wurde die substratinduzierte Atmung bestimmt. Dazu wurden 100 g der Probe (Frischgewicht) gemäß der Richtlinie 1 g eines Glukosegemischs [Glukose-Monohydrat (88 g) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (13 g) + KH_2PO_4 (2 g)] zugesetzt und die O_2 -Aufnahme erfasst, bis eine exponentielle Phase eindeutig erkennbar war. Die exponentielle Phase charakterisiert die Vermehrung der Mikroorganismen.

Für die Auswertung wurde jeweils der lineare Bereich der Sauerstoffaufnahmekurve herangezogen. Die Untersuchungen wurden an je drei Parallelen durchgeführt.

Aus den Ergebnissen beider Atmungsmessungen kann nach ISO/DIS 17155 (2001) der respiratorische Aktivierungsquotient (Q_R) errechnet werden. Dazu wird der Quotient aus Basalatmung zu SIR ermittelt.

Potentielle Ammoniumoxidation

Die potentielle Ammoniumoxidation wurde nach der Richtlinie ISO/ DIS 15685 (2001) bestimmt. Die Methode basiert auf der Bildung von Nitrit aus Ammoniumsulfat, wobei der Zusatz von Natriumchlorat die Weiteroxidation des Nitrits zu Nitrat hemmt.

Es wurden 25 g der Probe (Trockengewicht) in 100 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt, mit 100 ml Substratlösung [Phosphatpuffer (1 mM) + NaClO_3 (5,625 mM) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,5 mM)] versetzt, kurz mit der Hand geschüttelt und anschließend in einem Inkubationsschüttler bei 25 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach zwei und sechs Stunden. Aus der Suspension wurden 10 ml entnommen, diese sofort mit 10 ml Kaliumchlorid-Lösung versetzt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert.

Für die Analyse des Nitrits wurden 5 ml des Filtrats mit 3 ml NH_4Cl -Puffer und 2 ml Farbreagenz versetzt, geschüttelt und die Absorption nach 15 min bei 530 nm am Photometer erfasst.

Als Maß für die potentielle Ammoniumoxidation dient die von einem Gramm Boden abgegebene Menge an $\text{NO}_2\text{-N}$ ($\mu\text{g N} \cdot \text{g TM}^{-1}$), die durch die Differenz des Nitrit-N-Gehalts nach sechs und nach zwei Stunden gebildet und durch die Zeit (4 h) dividiert wurde.

Die Untersuchungen wurden an je vier Parallelen durchgeführt.

2.2.2 Mikrobielle Struktur

Strukturuntersuchungen geben Hinweise auf die Diversität der mikrobiellen Population im Boden.

Phospholipid-Fettsäure-Indikatoren (PLFA-Indikatoren)

Die PLFA-Analyse ist eine Fingerprinting-Technik auf Phospholipid-Ebene. Hierbei werden die aus den Bodenproben extrahierten Phospholipide gaschromatographisch aufgetrennt. Sie ermöglicht halbquantitative Aussagen zum Vorkommen einzelner Mikroorganismengruppen.

50 g (entsprechend TM) einer frischen Bodenprobe wurden nach Dotierung mit 1,2-Distearoyl-D70-3-sn-Glycerophosphatidylcholine (Deuterierter interner Standard) mit einem Gemisch aus 250 ml Methanol, 125 ml Chloroform und 100 ml 0,05 m Phosphat-Puffer pH 7,4 (Verhältnis 2 : 1 : 0,8) für zwei Stunden geschüttelt. Anschließend wurden 125 ml Wasser und 125 ml Chloroform zugegeben um eine Phasentrennung zu erzielen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt. Das Konzentrat wurde auf eine SiO_2 -Festphasensäule gegeben und fraktioniert mit Chloroform, Aceton und Methanol eluiert. Die Methanol-Fraktion, welche die Phospholipide enthält, wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und anschließend im Stickstoffstrom bis nahe zur Trockne eingengt.

Zur Freisetzung der den Fettsäuren entsprechenden Methylester aus den Phospholipiden, wurde eine alkalische Hydrolyse mit Kaliumhydroxid in Methanol durchgeführt. Die Fettsäuremethylester wurden anschließend nach Neutralisation des Reaktionsgemisches mit Essigsäure mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und für die GC-MS Analyse auf ca. 1 ml eingeeengt. Die analytischen Bedingungen für Trennung und Nachweis der Fettsäuremethylester sind in der nachfolgenden Tabelle 6.4 zusammengefasst. Die untersuchten Phospholipid-Fettsäuren waren 17:0 für Bakterien allgemein, 15:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0 und 10Me16:0 als Indikatoren für Gram-positive Bakterien, 16:1 ω 9t, 16:1 ω 9c, 18:1 ω 9t, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 11t, 18:1 ω 11c, cy17:0 und cy19:0 als Indikatoren für Gram-negative Bakterien, 10Me18:0 als Indikator für Actinomyceten und 18:2 ω 6 als Indikator für Pilze (FROSTEGARD ET AL. 1993, DICKENS & ANDERSON 1999, GRAYSTON ET AL. 2001).

Tab. 2.2.2-1: Analytische Bedingungen für Trennung und Nachweis der Fettsäuremethylester

Gaschromatograph:	HP 5890 Serie II plus
Injektor-Temperatur:	280°C
Trennsäule:	CP WAX 52 CB, 15 m x 0,32 mm, 0,15 μ m Filmdicke
Trärgas:	Wasserstoff
Temperaturprogramm:	Start 80°C, mit 4° pro min. auf 160°C
Massenspektrometer:	VG 70-250SE (VG Analytical)
Quantifizierung:	Fläche der detektierten Peaks relativ zur Peakfläche des internen Standards (D35 Octadecansäuremethylester)

Terminaler Restrictionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)

Die T-RFLP-Analyse ist eine weitere Fingerprinting-Technik, mit der unterschiedliche Proben schnell miteinander verglichen werden können. Die Untersuchungen basieren auf der Amplifikation ribosomaler Nukleinsäuren (DNA und RNA) als Markermolekül.

Wie bei der schon seit langem zur Differenzierung von Reinkulturen eingesetzten RFLP-Methode wird bei der T-RFLP-Analyse aus der zu untersuchenden Bodenprobe die genomische DNA extrahiert, die 16S rRNA Gene amplifiziert, das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen verdaut und anschließend elektrophoretisch getrennt. Alternativ wurde die Gesamt-RNA extrahiert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Das Besondere an der T-RFLP-Methode ist, dass ein PCR-Primer Fluoreszenzmarkiert ist, und bei der elektrophoretischen Trennung (nach Länge der Fragmente) ausschließlich fluoreszierende Fragmente – die terminalen Fragmente – mittels Laser detektiert werden. Jedes 16S rRNA Gen ergibt somit nach dem Verdau nur ein Fragment bei der Detektion. Die dadurch gegebene starke Reduzierung der Fragmentanzahl ermöglicht, dass mit dieser Methode Bodenproben – in denen eine sehr hohe Diversität an unterschiedlichen Mikroorganismen existiert – untersucht werden können. Eine direkte Korrelation der Fragmente zu einzelnen Bakterienarten ist aber nicht möglich, da unterschiedliche Arten gleiche Fragmentgrößen zeigen können.

Es wurden jeweils ca. 1 g Boden abgewogen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die genomische DNA wurde mit dem UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Dionova) nach dem Herstellerprotokoll extrahiert und anschließend mit destilliertem Wasser 1:100 verdünnt (in der unverdünnten Lösung waren noch inhibierende Substanzen).

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde der Boden in RNA-Extraktionspuffer (3 Vol. 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH = 7,0, 1 Vol. 10 % SDS, 1 Vol. Phenol) aufgenommen, mit Zirconica/Silicaperlen versetzt und 20 sec in der Zelmühle bearbeitet. Nach dreimaliger Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Ausschüttung (25:24:1) wurde die RNA mit 3 M Natriumacetat und 99 %igem Ethanol präzipitiert, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die gesamten Arbeiten fanden bei 4°C statt. Unter Verwendung des Primers BAC1378 wurde die reverse Transkription durchgeführt.

Zur PCR wurde 1 µl verdünnte DNA-Lösung bzw. nach reverser Transkription in einen 100 µl PCR-Ansatz gegeben. Die PCR lief anschließend mit 30 Zyklen. Als Primer wurden Bacteria-spezifische Oligonukleotide verwendet:

BAC27F 5'-GAG TTT GAT C(A/C)T GGC TCA G-3'; 5'-FAM-markiert

BAC1378R 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'

Die Annealing-Temperatur betrug 48 °C.

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym MspI für 3 Stunden bei 37 °C verdaut und anschließend mit dem MinElute PCR-Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die Proben auf dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzierer) mit der GeneScan Analysis Software analysiert. Die Bestimmung der Fragmentlänge erfolgte mittels internem Längenstandard (GeneScan Rox-1000). Dadurch ist der Vergleich auch unterschiedlicher T-RFLP-Muster möglich.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrobielle Funktion

Basalatmung

Generell ist die Basalatmung beider untersuchter Böden mit Werten unter 0,13 mg O₂ / (100g TM * h) sehr niedrig. Abweichungen sollten daher nicht überbewertet werden. Kleine Unterschiede in den Absolutwerten führen zu großen relativen (%) Unterschieden. Die genauen Werte sind in Tabelle 3.1-1 dargestellt.

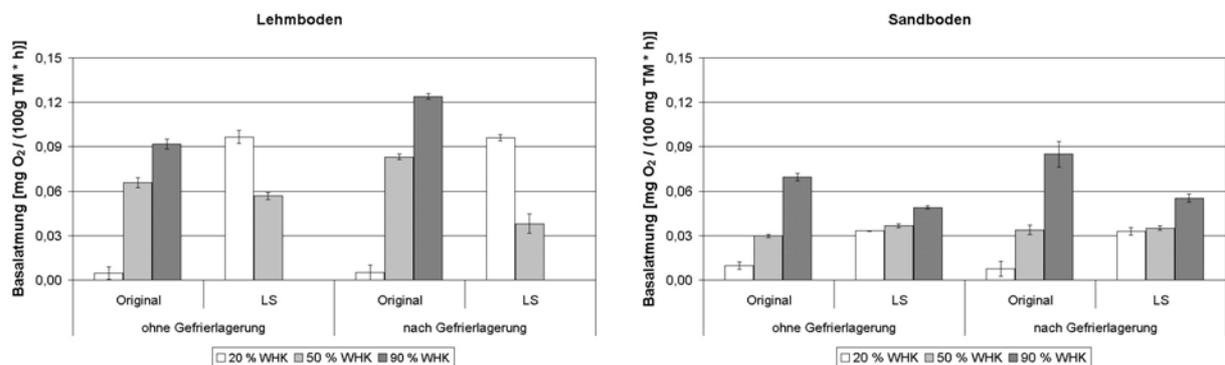


Abb. 3.1-1: *Basalrespiration der untersuchten Böden [mg O₂ / (100g TM * h)] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Beim Lehmboden konnten deutliche Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die Basalrespiration festgestellt werden (Abb. 3.1-1). Bei frischen Proben wurden Atmungsaktivitäten von < 0,01 (20 % WHK_{max}) bis 0,09 (90 % WHK_{max}) mg O₂ / (100g TM * h) gemessen. Wurden die Proben gefrierengelagert, so fand man die selben Tendenzen, erhielt aber bei den Proben "50 %" und "90 %" höhere Werte.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "90 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die ungelagerten Proben.

Auch beim Sandboden konnten deutliche Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die Basalatmung festgestellt werden (Abb. 3.1-2). Bei frischen Proben wurden Atmungsaktivitäten von 0,01 (20 % WHK_{max}) bis 0,07 (90 % WHK_{max}) mg O₂ / (100g TM * h) gemessen. Wurden die Proben gefrierengelagert, so konnten vergleichbare Werte gefunden werden.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Bei Probe "90 %" sank die Basalatmung leicht im Vergleich zur Originalprobe. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die ungelagerten Proben.

Tab. 3.1-1: Basalatmung [mg O₂ / (100g TM * h)] der untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Original: Wassergelate 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; Laborstandard: eingestellt auf 40 – 60 % WHK_{max} gesiebt;

	Ohne Gefrierlagerung		Mit Gefrierlagerung	
	Original	Laborstandard	Original	Laborstandard
Lehmboden				
20 % WHK _{max}	0,005 ± 0,004	0,097 ± 0,004	0,005 ± 0,005	0,096 ± 0,002
50 % WHK _{max}	0,065 ± 0,003	0,057 ± 0,002	0,083 ± 0,002	0,038 ± 0,006
90 % WHK _{max}	0,092 ± 0,003	*	0,124 ± 0,002	*
Sandboden				
20 % WHK _{max}	0,010 ± 0,002	0,033 ± 0,000	0,008 ± 0,005	0,033 ± 0,003
50 % WHK _{max}	0,030 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,034 ± 0,003	0,035 ± 0,001
90 % WHK _{max}	0,069 ± 0,002	0,049 ± 0,001	0,085 ± 0,009	0,056 ± 0,003

* Da die Probe im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach, wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.

Substratinduzierte Atmung (SIR)

Im Gegensatz zur Basalatmung unterschied sich die SIR der beiden untersuchten Böden mit Werten bis 0,35 mg O₂ / (100g TM * h) im Sandboden und bis 2,04 mg O₂ / (100g TM * h) im Lehmboden deutlich. Die genauen Werte sind in Tabelle 3.1-2 dargestellt.

Beim Lehmboden konnten deutliche Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die SIR festgestellt werden (Abb. 3.1-2). Bei frischen Proben wurden potentielle Atmungsaktivitäten von 0,03 (20 % WHK_{max}) bis 1,89 (90 % WHK_{max}) mg O₂ / (100g TM * h) gemessen. Wurden die Proben gefrierengelagert, so fand man vergleichbare Werte.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten die gleiche Tendenz aber im Vergleich zu den ungelagerten Proben eine leicht stimulierte potentielle Atmungsaktivität.

Auch beim Sandboden konnten deutliche Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die SIR festgestellt werden (Abb. 3.1-2). Bei frischen Proben wurden Atmungsaktivitäten von 0,01 (20 % WHK_{max}) bis 0,23 (50 % WHK_{max}) mg O₂ / (100g TM * h) gemessen. Wurden die Proben gefrierengelagert, so fand man vergleichbare Werte.

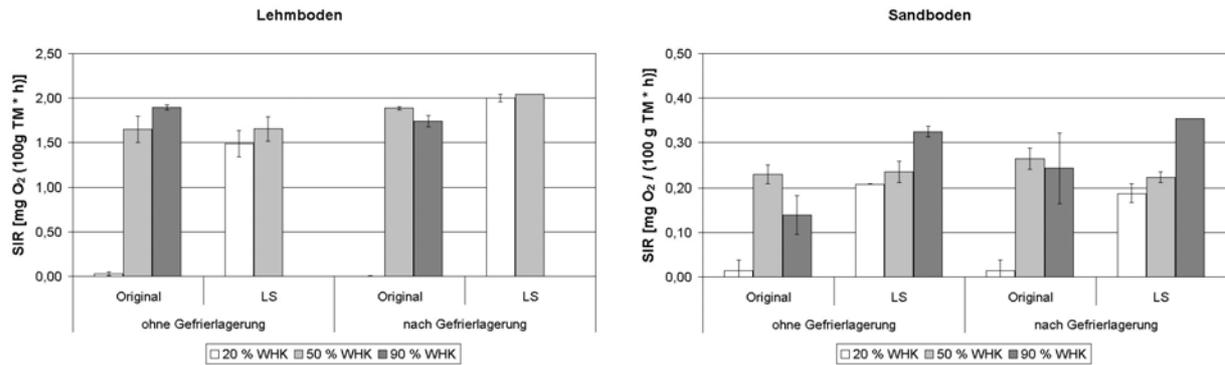


Abb. 3.1-2: *Substratinduzierte Atmung der untersuchten Böden [mg O₂ / (100g TM * h)] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Bei Probe "90 %" stieg die SIR leicht im Vergleich zur Originalprobe. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten vergleichbare Werte zu den ungelagerten Proben.

Tab. 3.1-2: *Substratinduzierte Atmung [mg O₂ / (100g TM * h)] der untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; Laborstandard: eingestellt auf 40 – 60 % WHK_{max} gesiebt;*

	Ohne Gefrierlagerung		Mit Gefrierlagerung	
	Original	Laborstandard	Original	Laborstandard
Lehmboden				
20 % WHK _{max}	0,028 ± 0,024	1,487 ± 0,146	0,003 ± 0,006	1,998 ± 0,042
50 % WHK _{max}	1,646 ± 0,148	1,653 ± 0,139	1,885 ± 0,018	2,042 ± 0,000
90 % WHK _{max}	1,894 ± 0,026	*	1,742 ± 0,063	*
Sandboden				
20 % WHK _{max}	0,014 ± 0,024	0,207 ± 0,001	0,014 ± 0,024	0,187 ± 0,021
50 % WHK _{max}	0,229 ± 0,021	0,235 ± 0,024	0,264 ± 0,024	0,222 ± 0,012
90 % WHK _{max}	0,139 ± 0,043	0,325 ± 0,012	0,243 ± 0,079	0,354 ± 0,000

* Da die Probe im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach, wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.

Respiratorischer Aktivierungsquotient (Q_R)

In beiden untersuchten Böden konnte eine eindeutige Abhängigkeit des respiratorischen Aktivierungsquotienten von der Bodenfeuchte nachgewiesen werden (Abb. 3.1-3). Die genauen Daten sind in Tabelle 3.1-3 dargestellt.

Bei frischen Proben lag der Q_R im Lehmboden bei 20 % WHK_{max} bei 0,17. Bei 50 % und 90 % WHK_{max} lag er bei ≤ 0,05. Wurden die Proben gefriergelagert, so fand man bei 50 % und 90 % WHK_{max} vergleichbare Werte, bei 20 % WHK_{max} erhöhte sich der Q_R auf 0,48.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei allen untersuchten Lehmpoden zu Q_R-Werten von ≤ 0,06. Dies entsprach dem Wert der Probe mit Originalwassergehalt bei Probenahme (90 % WHK_{max}).

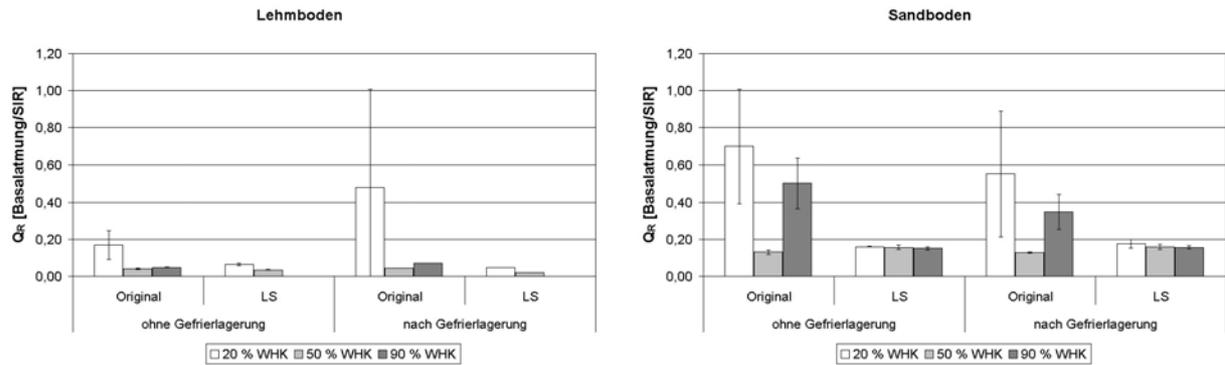


Abb. 3.1-3: *Respiratorischer Aktivierungsquotient (Q_R) der untersuchten Böden [Basalatemung/SIR] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Bei frischen Sandproben lag der Q_R bei 20 % WHK_{max} bei 0,70, bei 50 % WHK_{max} bei 0,13 und bei 90 % WHK_{max} bei 0,50. Wurden die Proben gefriergelagert, so fand man die selben Tendenzen, auch wenn die die Quotienten bei 20 % und 90 % WHK_{max} etwas niedriger als bei den frischen Proben waren (Tab. 3.1-3).

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte mit Quotienten von $\leq 0,18$, wie beim Lehmboden, bei allen untersuchten Sandproben zu Q_R -Werten vergleichbar mit dem Wert der Probe mit Originalwassergehalt bei Probenahme (50 % WHK_{max}).

Tab. 3.1-3: *Aktivierungsquotient (Q_R) der untersuchten Böden [Basalatemung/SIR] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; Laborstandard: eingestellt auf 40 – 60 % WHK_{max} gesiebt;*

	Ohne Gefrierlagerung		Mit Gefrierlagerung	
	Original	Laborstandard	Original	Laborstandard
Lehmboden				
20 % WHK_{max}	0,17 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,48 ± 0,53	0,05 ± 0,00
50 % WHK_{max}	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
90 % WHK_{max}	0,05 ± 0,00	*	0,07 ± 0,00	*
Sandboden				
20 % WHK_{max}	0,70 ± 0,31	0,16 ± 0,00	0,55 ± 0,34	0,18 ± 0,02
50 % WHK_{max}	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,16 ± 0,01
90 % WHK_{max}	0,50 ± 0,14	0,15 ± 0,01	0,35 ± 0,10	0,16 ± 0,01

* Da die Probe im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.

Potentielle Ammoniumoxidation

Noch deutlicher als bei der SIR unterschied sich die potentielle Ammoniumoxidation der beiden untersuchten Böden. Während im Lehmboden Aktivitäten von bis zu 20 ng NO_2-N / (g TM * min) gemessen wurden konnte eine Ammoniumoxidation im Sandboden mit maximal 0,26 ng NO_2-N / (g TM * min) kaum nachgewiesen werden. Die genauen Werte sind in Tabelle 3.1-3 dargestellt.

Beim Lehmboden konnten kaum Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die potentielle Ammoniumoxidation festgestellt werden (Abb. 3.1-3). Bei frischen Proben wurden Werte von 15,3 bis 18,7 ng NO_2-N / (g TM * min) gemessen. Wurden die Proben gefriergelagert, so fand man leicht gesenkte Werte.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten eine vergleichbare potentielle Ammoniumoxidation wie die ungelagerten Proben.

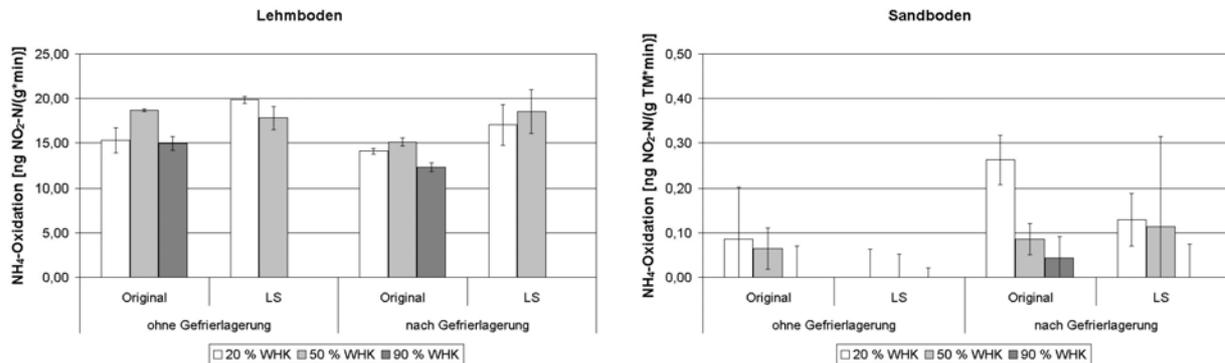


Abb. 3.1-3: *Potentielle Ammoniumoxidation der untersuchten Böden [ng NO₂-N / (100g TM * h)] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergelate 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Beim Sandboden konnten keine eindeutigen Tendenzen in den Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die potentielle Ammoniumoxidation festgestellt werden (Abb. 3.1-3). Bei fünf der untersuchten Varianten konnte im Mittel keine Ammoniumoxidation nachgewiesen werden (Tab. 3.1-3). Bei drei weiteren Varianten zeigte mindestens eine Parallele keine Aktivität ("20 %" ohne Gefrierlagerung, "90 %" und "60 % LS" nach Gefrierlagerung – Rohdaten nicht dargestellt).

Tab. 3.1-3: *Potentielle Ammoniumoxidation [ng NO₂-N / (g TM * min)] der untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Original: Wassergelate 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; Laborstandard: eingestellt auf 40 – 60 % WHK_{max} gesiebt;*

	Ohne Gefrierlagerung		Mit Gefrierlagerung	
	Original	Laborstandard	Original	Laborstandard
Lehmboden				
20 % WHK_{max}	15,34 ± 1,40	19,84 ± 0,41	14,10 ± 0,32	17,05 ± 2,29
50 % WHK_{max}	18,68 ± 0,13	17,80 ± 1,33	15,11 ± 0,46	18,54 ± 2,48
90 % WHK_{max}	14,97 ± 0,78	*	12,28 ± 0,52	*
Sandboden				
20 % WHK_{max}	0,09 ± 0,12	0,00 ± 0,11	0,26 ± 0,06	0,13 ± 0,06
50 % WHK_{max}	0,06 ± 0,05	0,00 ± 0,10	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,20
90 % WHK_{max}	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,03	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,13

3.2 Mikrobielle Struktur

Phospholipid-Fettsäure-Indikatoren (PLFA-Indikatoren)

Generell unterschieden sich die beiden untersuchten Böden deutlich sowohl in der Summe als auch der Zusammensetzung der erfassten Phospholipidsäuren. Der Lehmboden zeigte im Vergleich zum Sandboden eine weit größere Menge erfasster PLFAs und ein engeres Verhältnis der iso- zu anteiso-Formen verzweigter Fettsäuren und der *trans* zu den *cis* Isomeren der ungesättigten Fettsäuren (Tab. 3.2-1 – 3.2-3). Trotzdem waren die Verhältnisse zwischen Gram + und Gram - Bakterien nahezu identisch.

Beim Lehmboden konnten keine deutlichen Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die Summe der erfassten PLFAs festgestellt werden (Abb. 3.2-1). Wurden die Proben gefrierlagert, so fand man vergleichbare Werte.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Probe "50 %" zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten untereinander ebenfalls vergleichbare Ergebnisse, im Verhältnis zu den ungelagerten Proben aber deutlich höhere Werte.

Beim Sandboden wurden ebenfalls keine eindeutigen Auswirkungen der Bodenfeuchte auf die Summe der erfassten PLFAs festgestellt (Abb. 3.2-1). Im Gegensatz zum Lehmboden, der unter Laborstandard nach einer Gefrierlagerung stark erhöhte Werte aufwies, stellte man beim Sandboden eine Erhöhung der Werte unter Laborstandard bei nicht gefrierlagerten Proben fest.

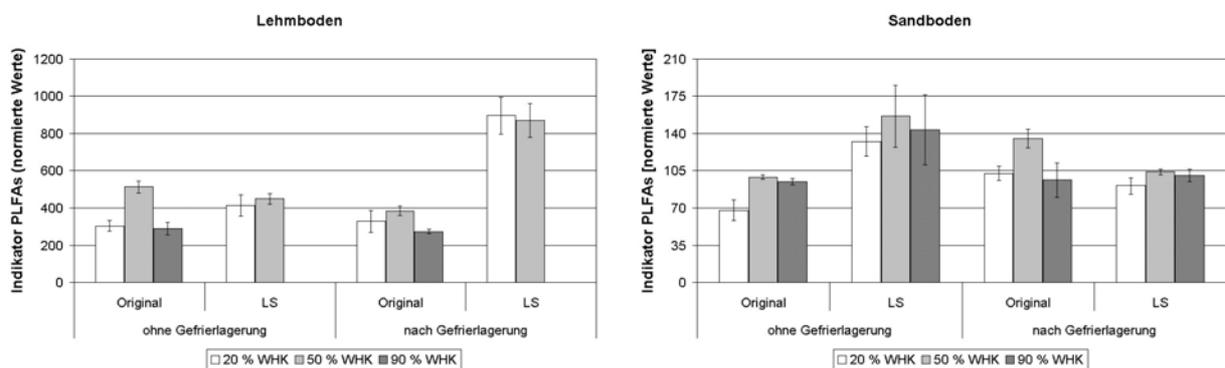


Abb. 3.2-1: *Summe der erfassten Indikator-PLFAs in den untersuchten Böden [normierte Werte] ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergelohate 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

In keinem der Böden konnten deutliche Veränderungen im relativen Anteil einzelner PLFA-Indikatoren in Abhängigkeit zur Bodenfeuchte oder Gefrierlagerung festgestellt werden. Vergleicht man des Verhältnis der Indikatoren für Gram + und Gram – Bakterien, so erkennt man in beiden Böden eine Abhängigkeit von der Bodenfeuchte (Abb. 3.2-2). Des weiteren sind die Quotienten beider Böden nahezu identisch (Tab. 3.2-1).

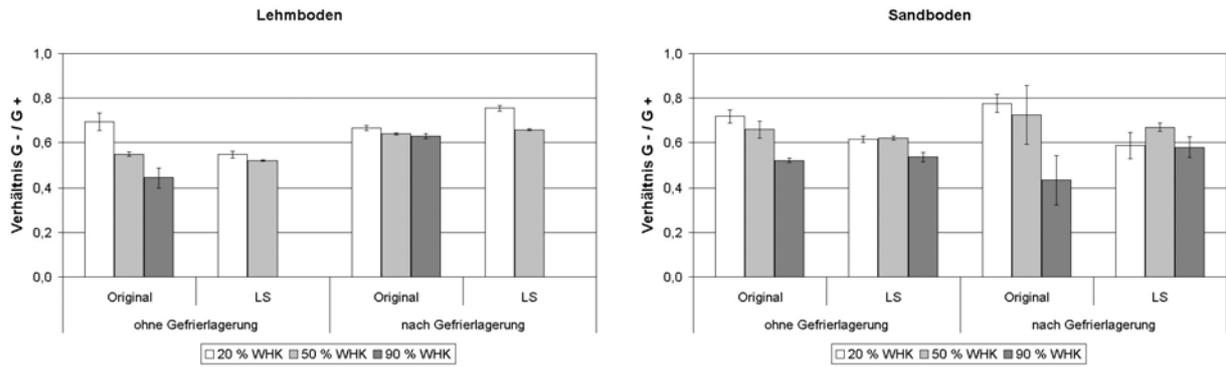


Abb. 3.2-2: Verhältnis von erfassten Gram-negativen (G-) zu Gram-positiven (G+) Indikator-PLFAs in den untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergelhalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.

Die G+ / G- Verhältnisse frischer Proben wurden mit 0,7 (20 % WHK_{max}) bis 0,4 (90 % WHK_{max}) mit zunehmender Bodenfeuchte enger. Nach Gefrierlagerung fand man vergleichbare Werte.

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard von 40 – 60 % WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei der Probe "20 %" zu vergleichbaren Werten wie bei Probe "50 %". Die Proben "50 %" und "90 %" zeigten keine signifikanten Veränderungen durch die Feuchtigkeitsmanipulation. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden zeigten vergleichbare Tendenzen wie die ungelagerten Proben, auch wenn die "LS"-Proben des Lehmbodens nach der Gefrierlagerung einen größeren Quotienten als ohne Gefrierlagerung aufwiesen.

Die Verhältnisse zwischen den iso- und anteiso-Formen der verzweigten PLFAs und den *trans*- und *cis*-Isomeren ungesättigter PLFAs gelten als Stress-Indikatoren (PETERSEN & KLUG 1994, KIEFT ET AL. 1997). In beiden Böden konnten keine Einflüsse der Bodenfeuchte auf diese Stressindikatoren festgestellt werden. Alle Unterschiede zwischen den frischen Originalproben bleiben auch nach dem Einstellen der Laborbedingungen oder einer Gefrierlagerung bestehen (Abb. 3.2-3).

Tab. 3.2-1: Stressindikatoren in der PLFA-Struktur der untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Original: Wassergelhalte 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; Laborstandard: eingestellt auf 40 – 60 % WHK_{max} gesiebt;

	Ohne Gefrierlagerung					Nach Gefrierlagerung						
	Original			LS		Original			LS			
Lehmboden	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %		
G - / G + Stabw	0,7 0,1	0,5 0,1	0,4 0,1	0,5 0,1	0,5 0,0	0,7 0,0	0,6 0,0	0,6 0,0	0,8 0,1	0,7 0,0		
iso / anteiso Stabw	2,7 0,1	2,3 0,1	2,2 0,3	3,0 0,1	2,5 0,1	2,6 0,1	2,3 0,0	2,3 0,1	2,0 0,8	1,7 0,1		
<i>trans</i> / <i>cis</i> Stabw	0,8 0,0	0,9 0,0	0,9 0,0	0,8 0,1	0,9 0,0	1,0 0,0	1,0 0,0	0,9 0,0	0,8 0,3	0,6 0,1		
	Ohne Gefrierlagerung					Nach Gefrierlagerung						
	Original			LS		Original			LS			
Sandboden	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	
G - / G + Stabw	0,7 0,0	0,7 0,0	0,5 0,0	0,6 0,0	0,6 0,0	0,5 0,0	0,8 0,0	0,7 0,1	0,4 0,1	0,6 0,1	0,7 0,0	0,6 0,0
iso / anteiso Stabw	4,4 0,3	4,8 0,1	3,9 0,1	5,1 0,2	5,6 0,4	4,6 0,1	5,4 0,1	5,8 0,4	4,4 0,6	4,6 0,2	4,8 0,1	4,3 0,1
<i>trans</i> / <i>cis</i> Stabw	1,5 0,1	1,4 0,1	1,1 0,0	1,5 0,0	1,3 0,0	1,1 0,1	1,6 0,0	1,5 0,1	1,3 0,2	1,5 0,0	1,5 0,0	1,1 0,0

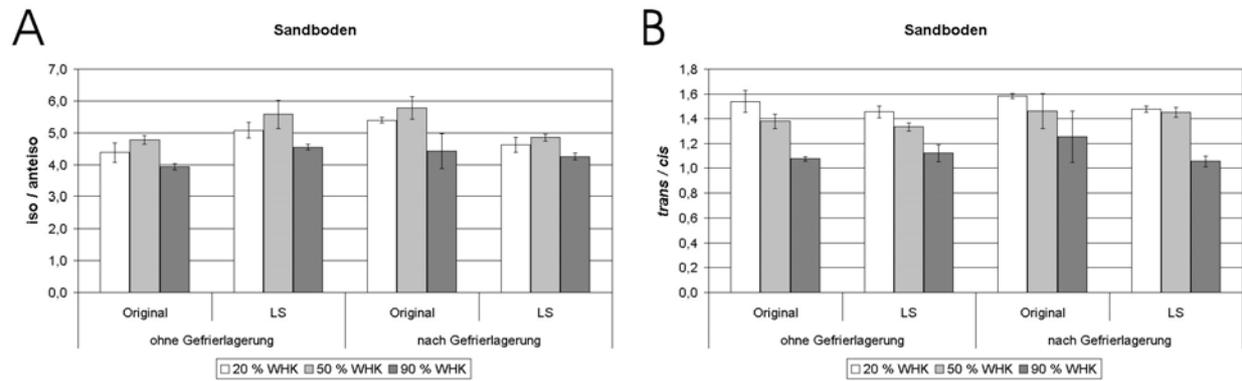


Abb. 3.2-3: Verhältnis der A) verzweigten PLFAs iso- zu anteiso-Formen und B) ungesättigten trans- zu cis-Isomeren in den untersuchten Böden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergelate 20, 50 und 90 % der WHK_{max} ungesiebt; LS: Laborstandard (40 - 60 % WHK_{max} gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHK_{max} gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.

Tab. 3.2-2: *Summe [normierte Werte] und Anteil [%] der erfassten Indikator-PLFAs im Lehm Boden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergelate 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHKmax gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

PLFAs	Ohne Gefrierlagerung					Nach Gefrierlagerung				
	Original			LS		Original			LS	
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %
Summe	305	513	290	414	451	329	385	274	896	870
Stabw	29	30	33	57	28	13	25	12	99	92
Bakterien										
17:0	0,85 0,04	0,61 0,08	0,59 0,15	0,68 0,27	0,67 0,02	0,94 0,02	0,78 0,07	0,78 0,05	0,49 0,08	0,33 0,04
Gram +										
15:0	0,86 0,09	0,70 0,07	0,76 0,11	0,89 0,17	0,69 0,04	1,07 0,05	0,84 0,08	0,93 0,05	0,52 0,08	0,36 0,06
i15:0	20,4 2,0	23,4 2,7	25,1 3,7	25,1 5,1	23,6 1,7	24,0 1,5	23,3 1,3	24,0 0,6	19,0 6,6	21,8 3,8
a15:0	6,8 0,8	10,4 1,1	11,4 1,4	7,6 1,3	9,6 0,9	7,6 0,4	8,9 0,6	8,7 0,3	9,5 1,8	12,9 1,8
i16:0	5,1 0,5	4,9 0,6	5,1 0,6	5,0 0,7	4,7 0,2	5,7 0,3	5,8 0,5	5,8 0,1	3,9 1,2	2,9 0,2
i17:0	6,7 1,0	6,6 0,5	6,4 1,7	7,4 1,1	7,3 0,3	4,5 0,1	4,2 0,3	4,0 0,2	4,4 1,4	3,1 0,4
a17:0	3,2 0,4	2,5 0,2	3,0 0,7	3,1 0,3	3,0 0,2	3,3 0,2	3,2 0,1	3,4 0,1	2,7 0,7	1,8 0,2
10Me16:0	10,2 1,0	10,5 0,8	12,2 1,6	10,1 1,2	12,4 0,7	8,2 0,8	9,4 0,5	9,4 0,4	8,5 1,9	10,0 1,0
Gram -										
16:1ω9t	3,7 0,2	4,2 0,2	4,2 0,6	4,0 0,7	3,5 0,3	3,0 0,2	3,0 0,2	3,0 0,1	6,6 1,5	4,4 0,7
16:1ω9c	1,9 0,2	2,4 0,1	2,4 0,7	2,4 0,4	2,2 0,3	1,4 0,1	1,5 0,1	1,4 0,1	2,8 0,9	1,8 0,2
18:1ω9t	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,01 0,02	0,03 0,02	0,05 0,00	0,05 0,01	0,06 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00
18:1ω9c	4,8 0,8	4,5 0,3	4,8 0,7	4,8 0,6	3,6 0,2	3,6 0,2	3,5 0,4	3,7 0,2	11,5 2,3	10,5 1,1
18:1ω11t	2,2 0,2	2,0 0,1	2,0 0,4	1,9 0,2	1,8 0,1	2,1 0,1	1,9 0,2	1,9 0,1	4,7 1,6	3,2 0,4
18:1ω11c	0,15 0,04	0,11 0,02	0,13 0,02	0,11 0,01	0,11 0,01	0,13 0,00	0,13 0,01	0,14 0,01	0,08 0,01	0,06 0,01
cy17:0	9,1 1,1	10,0 0,5	8,8 1,0	10,5 1,2	9,7 0,7	9,7 0,1	10,3 0,2	9,4 0,6	10,1 2,3	9,2 0,7
cy19:0	20,0 5,1	13,6 2,1	13,7 2,7	13,1 1,6	14,5 1,4	20,0 1,1	18,7 2,1	19,7 1,8	12,4 3,0	16,1 2,9
Actinomyceten										
10Me18:0	1,90 0,48	1,44 0,21	1,24 0,21	1,42 0,10	1,41 0,08	2,32 0,03	2,54 0,09	2,46 0,02	1,28 0,29	1,06 0,14
Pilze										
18:2ω6	2,08 0,44	2,17 0,18	0,92 0,48	2,16 0,27	1,36 0,03	2,34 0,17	1,97 0,18	1,32 0,11	1,56 0,45	0,63 0,09

Tab. 3.2-3: Summe [normierte Werte] und Anteil [%] der erfassten Indikator-PLFAs im Sandboden ohne und nach Gefrierlagerung. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt).

PLFAs	Ohne Gefrierlagerung						Nach Gefrierlagerung					
	Original			LS			Original			LS		
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %
Summe Stabw	68 10	99 2	94 3	132 14	156 29	143 33	102 7	135 9	96 16	91 7	104 3	100 6
Bakterien												
17:0	0,80 0,07	0,78 0,04	1,23 0,35	0,87 0,09	0,79 0,17	0,91 0,20	0,56 0,05	0,48 0,02	0,67 0,11	0,92 0,02	0,88 0,01	1,01 0,02
Gram +												
15:0	1,68 0,21	1,32 0,04	1,53 0,10	1,54 0,16	1,35 0,31	1,40 0,29	1,19 0,12	0,96 0,10	1,32 0,53	1,71 0,14	1,48 0,09	1,62 0,07
i15:0	29,1 5,2	31,8 0,7	32,3 1,6	31,1 3,0	34,1 6,6	35,0 8,5	33,4 1,5	34,4 4,8	40,9 5,4	30,3 4,0	28,0 0,8	29,4 1,5
a15:0	5,3 0,6	5,5 0,0	6,9 0,5	4,8 0,4	5,1 1,3	6,4 1,6	5,1 0,3	4,9 0,6	8,4 2,1	5,4 0,7	4,8 0,2	5,8 0,4
i16:0	7,6 0,9	6,4 0,4	7,1 0,3	8,4 1,1	6,1 1,0	6,1 1,4	5,3 0,9	5,1 0,4	5,2 1,5	9,4 1,0	7,9 0,5	7,7 0,5
i17:0	4,2 0,6	4,5 0,0	4,7 0,2	4,8 0,5	5,0 0,7	4,7 0,8	3,0 0,1	4,0 0,5	4,3 1,1	5,5 0,7	6,8 0,3	6,9 0,3
a17:0	2,2 0,2	2,1 0,0	2,5 0,1	2,2 0,2	2,0 0,4	2,3 0,5	1,6 0,2	1,7 0,0	2,1 0,5	2,4 0,2	2,4 0,1	2,7 0,1
10Me16:0	5,4 1,0	5,7 0,2	5,6 0,3	6,0 0,4	5,4 0,9	5,4 1,0	4,6 0,4	4,6 0,6	4,6 1,2	5,7 0,9	5,9 0,2	5,5 0,3
Gram -												
16:1ω9t	1,18 0,21	1,33 0,11	1,81 0,06	1,08 0,12	1,19 0,19	1,74 0,46	1,27 0,11	1,46 0,25	2,06 0,41	0,92 0,09	1,07 0,03	1,37 0,09
16:1ω9c	0,58 0,08	0,68 0,04	1,04 0,14	0,46 0,05	0,62 0,13	0,93 0,25	0,56 0,05	0,61 0,05	0,92 0,18	0,44 0,05	0,53 0,02	0,75 0,07
18:1ω9t	0,03 0,01	0,03 0,01	0,04 0,01	0,03 0,01	0,02 0,00	0,03 0,01	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00
18:1ω9c	0,96 0,17	1,07 0,15	2,03 0,22	1,05 0,11	1,02 0,12	1,62 0,25	0,97 0,05	1,29 0,23	1,76 1,08	0,94 0,06	0,94 0,05	1,71 0,04
18:1ω11t	1,24 0,21	1,10 0,07	1,52 0,04	1,16 0,19	1,04 0,20	1,16 0,25	1,19 0,05	1,33 0,14	1,16 0,50	1,17 0,08	1,12 0,04	1,25 0,07
18:1ω11c	0,05 0,01	0,04 0,01	0,07 0,01	0,04 0,01	0,04 0,01	0,04 0,01	0,03 0,00	0,03 0,01	0,03 0,02	0,03 0,00	0,03 0,00	0,04 0,00
cy17:0	9,1 1,2	8,5 0,2	7,1 0,5	9,7 0,8	8,2 2,2	8,5 2,6	7,9 0,6	7,2 0,5	7,0 0,8	11,3 0,8	10,0 0,2	9,4 0,4
cy19:0	27,7 3,4	26,2 1,7	20,2 0,6	23,8 3,2	25,5 4,3	20,6 4,4	31,3 3,1	29,2 3,7	17,3 6,1	21,4 3,4	25,5 0,4	21,8 3,4
Actinomyceten												
10Me18:0	1,40 0,18	1,12 0,15	1,41 0,11	1,32 0,11	0,99 0,09	1,10 0,15	0,84 0,05	0,84 0,08	0,76 0,28	1,37 0,19	1,10 0,09	1,24 0,11
Pilze												
18:2ω6	1,40 0,08	1,82 0,07	3,14 0,24	1,67 0,39	1,59 0,21	1,93 0,37	0,99 0,06	1,79 0,10	1,56 0,64	1,24 0,38	1,68 0,08	1,85 0,46

Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)

Die T-RFLP-Methode ist eine genetische Fingerprinting-Technik, die einen Vergleich der Struktur bakterieller Lebensgemeinschaften zwischen unterschiedlichen Proben ermöglicht. Eine direkte Zuordnung der erhobenen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zu definierten bakteriellen Populationen ist nicht möglich. Verglichen wird die Anzahl der T-RFs und ihre prozentuale Verteilung, eine quantitative Aussage wird nicht getroffen. Die Ergebnisse, die hier gezeigt werden, basieren auf Einzelmessungen und geben somit ausschließlich einen möglichen Trend an. Als deutlich unterschiedlich wurden Daten gewertet, die in ihren Prozentwerten um den Faktor 3 voneinander abgewichen sind.

Generell kann gesagt werden, dass die erfassten T-RFs der extrahierten DNA und ihre prozentuale Verteilung im Lehmboden und Sandboden der sehr ähnlich waren. Die Daten basierend auf der extrahierten RNA beider Bodentypen hingegen unterschieden sich sowohl hinsichtlich der erfassten T-RFs als auch besonders hinsichtlich ihrer prozentualen Verteilung.

Basierend auf den Untersuchungen der extrahierten DNA konnten bei den Original-Proben des Lehmbodens keine deutlichen Auswirkungen der Bodenfeuchte hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs noch ihrer prozentualen Verteilung festgestellt werden. Wurden die Proben gefriergelagert, so fand man vergleichbare Werte (Abb. 3.2-4).

Auch das Einstellen der Proben auf den Laborstandard führte zu keinen deutlichen Auswirkungen hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs und ihrer prozentualen Verteilung. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden, zeigten untereinander nur leichte Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der Fragmente (Tab. 3.2-4).

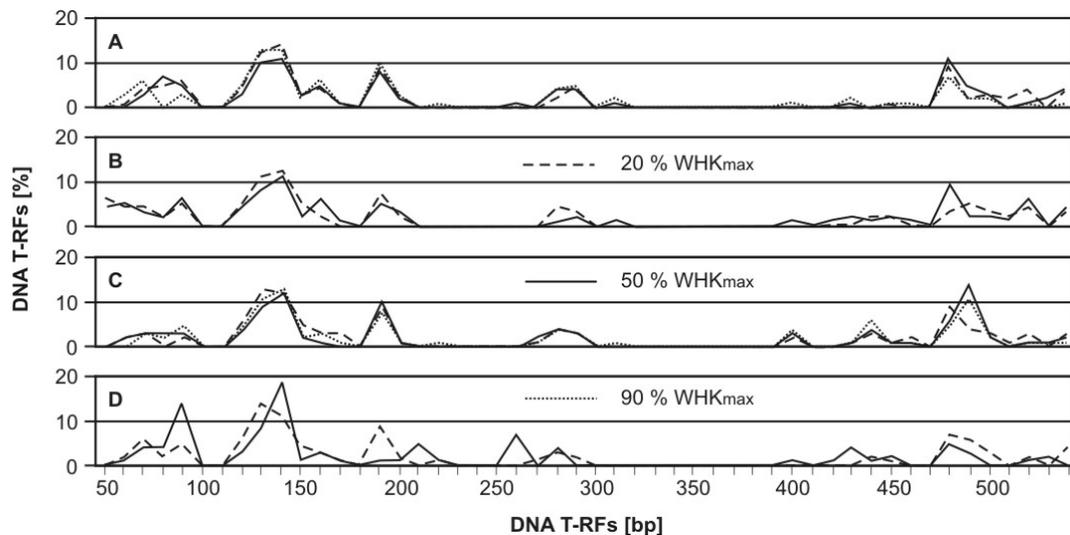


Abb. 3.2-4: *Terminale DNA-Restriktionsfragmente (T-RFs) im Lehmboden in Abhängigkeit zur Bodenmanipulation. Dargestellt sind die relativen Anteile der Fragmente [%] in Bezug auf ihre Länge in Basenpaaren (in Klassen von 10 bp). A: Original, ungelagert; B: Laborstandard, ungelagert; C: Original, gefriergelagert; D: Laborstandard, gefriergelagert.*

Basierend auf den Untersuchungen der extrahierten RNA konnten bei den Original-Proben des Lehmbodens leichte Verschiebungen der relativen Anteile der Fragmente gemessen werden (Tab. 3.2-5). Es konnte aber kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Wurden die Proben gefriergelagert, kam es zu einer deutlichen Abnahme an längeren (> 180 bp) T-RFs (Abb. 3.2-5).

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard führte untereinander zu keinen deutlichen Auswirkungen hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs und ihrer prozentualen Verteilung. Im Vergleich zu den Original-Daten zeigten sich aber besonders bei dem auf Laborstandard eingestellten Ansatz "20 % WHK_{max}" Unterschiede bezüglich der prozentualen Verteilung der T-RFs. Die Gefrierlagerung hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse, wenn die Ansätze auf Laborstandard eingestellt wurden.

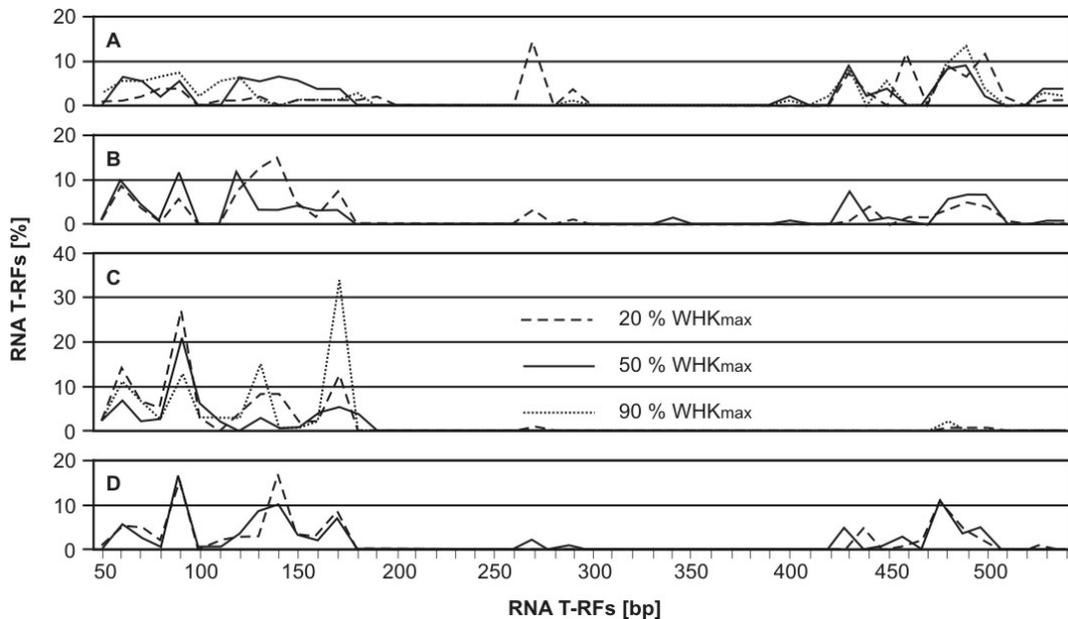


Abb. 3.2-5: *Terminale RNA-Restriktionsfragmente (T-RFs) im Lehm Boden in Abhängigkeit zur Bodenmanipulation. Dargestellt sind die relativen Anteile der Fragmente [%] in Bezug auf ihre Länge in Basenpaaren (in Klassen von 10 bp). A: Original, ungelagert; B: Laborstandard, ungelagert; C: Original, gefriergelagert; D: Laborstandard, gefriergelagert.*

Basierend auf der extrahierten DNA aus dem Sandboden konnten – ähnlich wie beim Lehm Boden – bei den Original-Proben keine deutlichen Auswirkungen der Bodenfeuchte hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs noch ihrer prozentualen Verteilung festgestellt werden. Nach der Gefrierlagerung zeigten die Daten nur geringe Verschiebungen in der prozentualen Verteilung untereinander (Abb. 3.2-6).

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard führte zu keinen deutlichen Auswirkungen hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs und ihrer prozentualen Verteilung (Tab. 3.2-6). Das Einstellen der Proben nach der Gefrierlagerung hingegen führte zu Verschiebungen in der prozentualen Verteilung (Abb. 3.2-6). Dies wirkte sich auch auf den Vergleich zu den ungelagerten Proben aus (LS mit 20 % WHK_{max} war ähnlicher zu Originaldaten als LS mit 50 % und 90 %).

Basierend auf den Untersuchungen der extrahierten RNA konnten bei den Original-Proben des Sandbodens keine deutlichen Auswirkungen der Bodenfeuchte hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs festgestellt werden, bei der prozentualen Verteilung wurden leichte Verschiebungen sichtbar. Es konnte aber kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Nach der Gefrierlagerung waren die Daten hinsichtlich der prozentualen Verteilung deutlich homogener (Abb. 3.2-7).

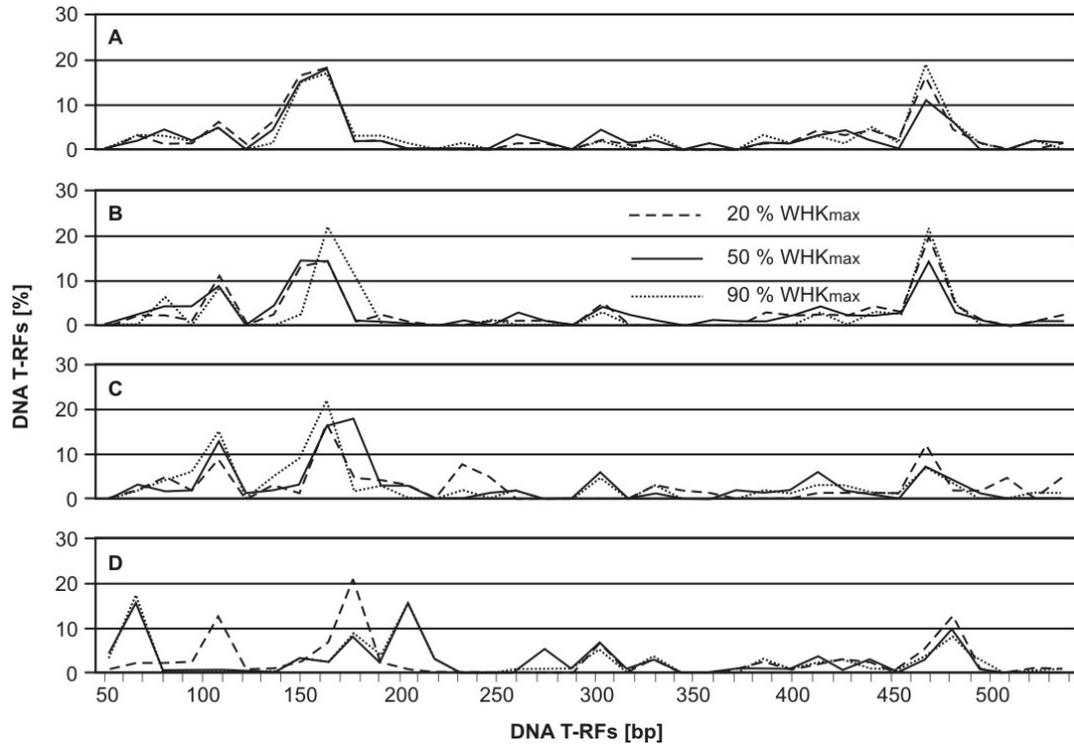


Abb. 3.2-6: *Terminale DNA-Restriktionsfragmente (T-RFs) im Sandboden in Abhängigkeit zur Bodenmanipulation. Dargestellt sind die relativen Anteile der Fragmente [%] in Bezug auf ihre Länge in Basenpaaren (in Klassen von 10 bp). A: Original, ungelagert; B: Laborstandard, ungelagert; C: Original, gefrierlagert; D: Laborstandard, gefrierlagert.*

Das Einstellen der Proben auf den Laborstandard führte zu keinen deutlichen Auswirkungen hinsichtlich der Anzahl der erfassten T-RFs und ihrer prozentualen Verteilung. Die Proben, die nach der Gefrierlagerung auf den Laborstandard eingestellt wurden, zeigten untereinander ebenfalls vergleichbare Ergebnisse, im Verhältnis zu den ungelagerten Proben aber leichte Verschiebungen hinsichtlich der prozentualen Verteilung (Tab. 3.2-7).

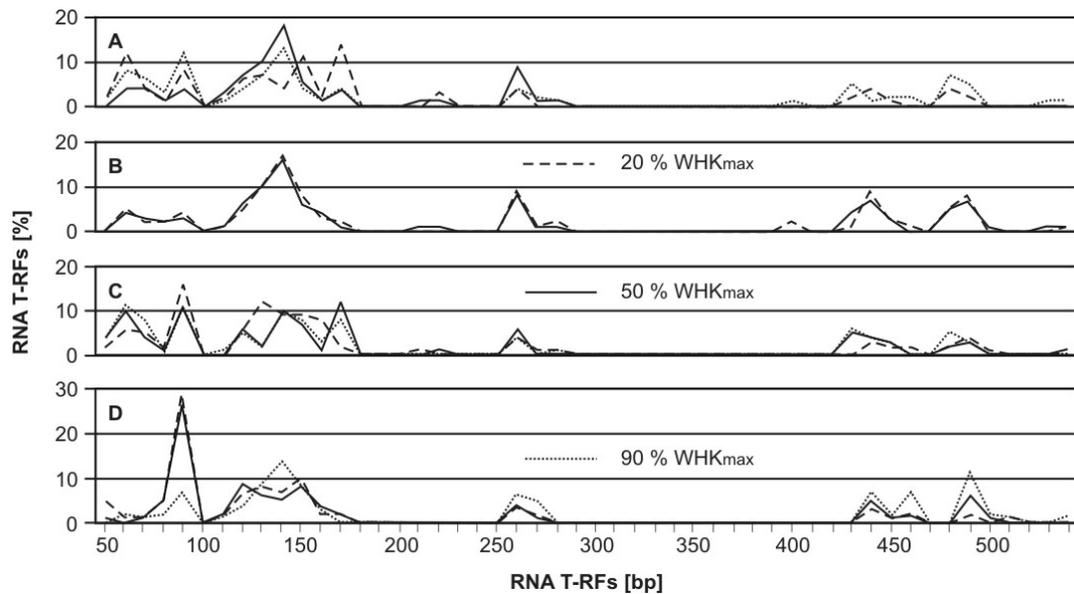


Abb. 3.2-7: *Terminale RNA-Restriktionsfragmente (T-RFs) im Sandboden in Abhängigkeit zur Bodenmanipulation. Dargestellt sind die relativen Anteile der Fragmente [%] in Bezug auf ihre Länge in Basenpaaren (in Klassen von 10 bp). A: Original, ungelagert; B: Laborstandard, ungelagert; C: Original, gefrierlagert; D: Laborstandard, gefrierlagert.*

Tab. 3.2-4: *Prozentualer Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zwischen 50 und 540 Basenpaare (in Klassen von 10 bp) basierend auf der extrahierten genomischen DNA im Lehm Boden ohne und nach Gefrierlagerung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHKmax gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Lehm Boden DNA T-RF (bp)	Ohne Gefrierlagerung					Nach Gefrierlagerung				
	Original			LS		Original			LS	
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %
50	0	0	0	6	4	0	0	0	0	0
60	1	0	3	4	5	2	0	0	2	1
70	4	3	6	4	3	3	3	3	6	4
80	5	7	0	2	2	0	3	2	2	4
90	6	5	3	5	6	2	3	5	5	14
120	4	3	5	5	4	6	4	5	6	3
130	12	10	13	11	8	13	9	11	14	8
140	14	11	13	12	11	12	12	13	11	19
150	3	3	2	5	2	5	2	2	4	1
160	4	5	6	2	6	3	1	3	3	3
170	1	1	1	0	1	3	0	1	1	1
190	9	8	10	7	5	9	10	8	9	1
200	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
220	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
260	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7
270	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0
280	2	4	4	4	1	4	4	4	3	4
290	5	4	5	3	2	3	3	3	2	0
310	0	1	2	0	1	1	1	1	0	0
400	1	1	1	1	1	2	3	4	1	1
420	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
430	2	1	2	0	2	1	1	1	0	4
440	0	0	0	2	1	3	4	6	2	1
450	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2
460	0	1	1	0	1	2	1	1	0	0
480	9	11	7	3	9	9	6	5	7	5
490	2	5	2	5	2	4	14	11	6	3
500	3	3	2	3	2	3	2	2	3	0
510	2	0	0	2	1	1	0	0	0	0
520	4	1	1	4	6	3	1	1	2	1
530	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2
540	4	4	1	3	4	3	2	1	4	0

Tab. 3.2-5: *Prozentualer Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zwischen 50 und 540 Basenpaare (in Klassen von 10 bp) basierend auf der extrahierten Gesamt-RNA im Lehm Boden ohne und nach Gefrierlagerung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt). Da die Probe "90 % LS" im Original 54 % der WHKmax gesiebt entsprach wurde sie nicht mehr eingestellt und gemessen.*

Lehmboden RNA	Ohne Gefrierlagerung					Nach Gefrierlagerung				
	Original			LS		Original			LS	
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %
50	1	0	3	0	1	2	3	2	1	0
60	1	6	5	9	10	14	7	11	5	6
70	2	5	5	4	5	7	2	7	5	3
80	4	2	6	1	1	5	3	3	2	1
90	4	5	7	6	12	27	21	13	15	17
100	0	0	2	0	0	3	6	3	0	1
110	1	0	5	0	0	0	2	3	2	1
120	1	6	6	8	12	4	0	3	3	4
130	2	5	1	13	3	8	3	15	3	9
140	0	6	0	15	3	8	1	1	17	10
150	1	5	1	5	4	2	1	1	4	4
160	1	4	1	2	3	2	4	2	3	2
170	1	4	1	8	3	13	5	34	9	7
180	1	0	3	0	0	0	4	0	0	0
190	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	14	0	0	3	0	1	0	0	2	2
290	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1
340	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
400	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
420	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
430	7	9	8	1	8	0	0	0	0	5
440	3	2	0	4	1	0	0	0	5	0
450	0	4	5	0	2	0	0	0	0	1
460	12	0	0	2	1	0	0	0	1	3
470	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0
480	9	8	9	3	6	1	0	2	11	11
490	6	9	13	5	7	1	0	0	5	4
500	12	2	4	4	7	1	0	0	3	5
510	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
530	1	4	3	1	1	0	0	0	1	0
540	1	4	2	0	1	0	0	0	0	1

Tab. 3.2-6: *Prozentualer Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zwischen 50 und 540 Basenpaaren (in Klassen von 10 bp) basierend auf der extrahierten genomischen DNA im Sandboden ohne und nach Gefrierlagerung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt)..*

Sandboden DNA	Ohne Gefrierlagerung						Nach Gefrierlagerung					
	Original			LS			Original			LS		
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %
T-RF												
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	3
60	3	2	3	2	2	0	2	3	2	2	16	17
70	1	4	3	2	4	6	5	2	4	2	0	0
80	1	2	2	1	4	0	2	2	6	2	0	0
90	6	5	5	11	9	8	9	13	15	13	0	0
110	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
120	6	4	1	2	4	0	3	2	5	1	0	0
130	16	15	15	13	14	2	1	3	9	2	3	3
140	18	18	17	14	14	22	17	16	22	7	2	2
150	2	2	3	1	1	10	5	18	2	21	8	9
160	2	2	3	2	1	0	4	3	3	2	2	4
170	0	0	1	1	0	0	3	3	0	1	16	16
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
190	1	1	1	0	1	0	8	0	2	0	0	0
200	0	0	0	1	0	1	5	1	0	0	0	0
210	1	3	0	1	3	0	0	2	2	1	1	1
220	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	5	1
230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
260	2	4	2	5	4	3	0	6	5	7	7	5
270	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
280	0	2	3	0	1	0	3	1	3	3	3	4
290	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
300	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
390	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0
400	1	1	3	3	1	0	0	1	2	2	1	3
420	1	1	1	2	2	0	0	2	1	1	1	1
430	4	3	3	2	4	3	1	6	3	2	4	2
440	3	4	1	2	2	0	1	2	3	3	1	3
450	4	2	5	4	2	3	1	1	1	2	3	1
460	2	0	1	3	3	2	1	0	1	0	0	1
480	16	11	19	20	14	22	12	7	7	5	3	4
490	4	6	6	4	3	5	2	4	3	13	10	8
500	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	3
520	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
530	0	2	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0
540	1	1	0	2	1	0	5	0	1	1	1	1

Tab. 3.2-7: *Prozentualer Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zwischen 50 und 540 Basenpaaren (in Klassen von 10 bp) basierend auf der extrahierten Gesamt-RNA im Sandboden ohne und nach Gefrierlagerung. Original: Wassergehalte 20, 50 und 90 % der WHKmax ungesiebt; LS: Laborstandard (40 – 60 % WHKmax gesiebt). Aus der Probe LS, 90 %, ohne Gefrierlagerung, konnte keine RNA extrahiert werden, deshalb liegen auch keine T-RFLP-Analysen vor.*

Sandboden RNA	Ohne Gefrierlagerung						Nach Gefrierlagerung					
	Original			LS			Original			LS		
	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %	20 %	50 %	90 %
50	2	0	2	0	0	-	2	4	4	5	1	0
60	12	4	8	5	4	-	6	10	11	1	0	2
70	4	4	6	2	3	-	5	4	8	1	1	1
80	1	1	3	2	2	-	2	1	1	5	5	2
90	8	4	12	4	3	-	16	11	11	29	26	7
110	2	3	1	1	1	-	0	0	1	1	2	1
120	6	7	4	5	6	-	6	6	5	6	9	4
130	7	10	7	10	10	-	12	2	2	8	6	9
140	4	18	13	17	16	-	9	10	10	7	5	14
150	11	5	4	8	6	-	9	7	8	10	8	8
160	2	1	1	3	4	-	8	1	3	2	4	3
170	14	4	4	2	1	-	2	12	8	2	2	0
210	0	1	0	1	1	-	1	0	0	0	0	0
220	3	1	0	1	1	-	0	1	0	0	0	0
260	4	9	4	9	8	-	4	6	4	3	4	6
270	0	1	2	1	1	-	1	0	0	2	1	5
280	0	1	1	2	1	-	1	1	1	0	0	0
400	0	0	1	2	0	-	0	0	0	0	0	0
430	2	0	5	1	4	-	0	5	6	0	0	0
440	4	0	1	9	7	-	3	4	4	3	5	7
450	1	0	2	3	3	-	2	3	3	1	1	2
460	0	0	2	0	0	-	2	0	0	2	1	7
480	4	0	7	5	5	-	2	2	5	0	0	0
490	2	0	5	8	7	-	4	3	3	2	6	11
500	0	0	0	0	1	-	1	0	0	0	1	2
510	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	0	1
530	0	0	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0
540	0	0	1	1	1	-	1	1	0	1	1	1

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Bodenfeuchte

Mikrobielle Funktion

Die mikrobielle Funktion spiegelt die Aktivität und somit den aktuellen physiologischen Zustand der Mikroorganismen wider. Bodenmikroorganismen leben im Porenwasser des Bodens und sind auf einen ausgeglichenen Wasserhaushalt angewiesen (GEMESI & TOPP 1992, HUIH ET AL. 1985). Es finden sich häufig lineare Abhängigkeiten zwischen der mikrobiellen Atmungsaktivität und der Bodenfeuchte. Dabei handelt es sich meist um die Basalatmung der Böden (SIMON 2001, ORCHARD ET AL. 1992). Auch die Funktion der Nährstoffkreisläufe hängt von der Bodenfeuchte ab. Dies konnte speziell für den Stickstoffkreislauf von Huish und Mitarbeitern (1985) gezeigt werden.

Wie erwartet korrelierte die Atmungsaktivität der Böden mit der Bodenfeuchte. Allerdings unterschied sich dabei die Basalatmung von der SIR in ihrem Optimumbereich. Bei der Basalatmung konnte bei beiden Böden eine lineare Abhängigkeit von der Bodenfeuchte nachgewiesen werden (Lehmboden: $r_P = 0,961$, $p \leq 0,01$; Sandboden: $r_P = 0,963$, $p \leq 0,001$). Dies galt beim Sandboden sogar bis zu der maximal eingestellten Bodenfeuchte von 70 – 80 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens. Somit wurden die oben beschriebenen Abhängigkeiten bestätigt.

Bei der substratinduzierten Atmungsaktivität (SIR), auch potentielle Atmungsaktivität genannt, konnte eindeutig ein Optimumbereich von 40 – 60 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens festgestellt werden. Unabhängig vom Boden war bei den Ansätzen "20 % WHK_{max} ", also tatsächlich 6 – 9 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens, fast keine potentielle Atmungsaktivität nachweisbar. Bei den Ansätzen "50 % WHK_{max} " und "90 % WHK_{max} " waren deutlich höhere Aktivitäten messbar. Dabei wurden die höchsten Werte im Lehmboden im Ansatz "90 % WHK_{max} ", also tatsächlich 54 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens, und im Sandboden im Ansatz "50 % WHK_{max} ", also tatsächlich 30 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens, gemessen. Ein Wassergehalt von 70 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens (Ansatz "90 % WHK_{max} " des Sandbodens) liegt außerhalb des Optimumbereichs für die SIR und hemmt die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen. Der Unterschied in den Optimumbereichen der Basalatmung und der SIR kann durch den gesteigerten Sauerstoffbedarf der physiologisch aktiveren Mikroorganismen bei Nährstoffzugabe erklärt werden. Bei einer Bodenfeuchte von 70 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens kann der erhöhte Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen vermutlich nicht mehr ausreichend gedeckt werden.

Die Qualität der Umgebungsbedingungen lassen sich besonders deutlich am Respiratorischen Aktivierungsquotienten ablesen. Der Respiratorische Aktivierungsquotient (Q_R) wird normalerweise zur Beurteilung belasteter Böden herangezogen. Ein Wert über 0,3 gilt als gestörter Boden. Aber auch bei dieser Fragestellung ist er ein gutes Maß zur Beurteilung der Qualität der Umgebungsbedingungen. Der Q_R ist bei unbelasteten Böden mit dem Metabolischen Quotienten (qCO_2), auch spezifische Bodenatmung genannt, korreliert. Dieser setzt die Basalatmung zum mikrobiellen Kohlenstoff (Biomasse) in Beziehung (ANDERSON & DOMSCH 1990, 1993), den man nach DIN ISO 14240-1 bei unbelasteten Böden aus der SIR errechnen kann. Dies ermöglicht den Vergleich der mikrobiellen Aktivität von Böden, die durch eine quantitativ und qualitativ unterschiedliche mikrobielle Biomasse gekennzeichnet sind (ANDERSON & DOMSCH 1990, 1993). Eine hohe spezifische Bodenatmung wird häufig als mikrobieller Stress interpretiert (WARDLE & GHANI 1995), da die Mikroorganismen einen großen Teil ihrer Stoffwechselaktivität auf den Erhalt der Vitalfunktionen und nicht auf einen Biomassezugewinn verwenden (KAUTZ 1999). In dieser Studie zeigten alle frischen Proben, die eine Bodenfeuchte von < 30 % bzw. > 70 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens aufwiesen Q_R -Werte > 0,17 (meist > 0,3). Proben, deren Bodenfeuchte in der Nähe oder im Optimumbereich von 40 – 60 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens lagen hatten dagegen Q_R -Werte < 0,13.

Bei den Ergebnissen der potentiellen Ammoniumoxidation nach Richtlinie ISO/DIS 15685 (2001) konnte kein Einfluss der Bodenfeuchte festgestellt werden. Natürlich ist auch die Nitrifikationsaktivität im Boden abhängig vom Wassergehalt des Bodens (HUISSH ET AL. 1985). Da bei der gewählten Methode aber eine Bodensuspension hergestellt wird, liegt der Wassergehalt der Proben während der Inkubation von sechs Stunden immer über 100 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens. Bei dieser Methode kommt es im Gegensatz zur SIR nicht zu einem Sauerstoffmangel, da die Suspension während der Inkubation geschüttelt wird und somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet wird.

Mikrobielle Struktur

Bei den Parametern der mikrobiellen Funktion wirken sich, wie gezeigt, kurzfristige Änderungen der Umgebung meist auf die Ergebnisse aus. Dies liegt daran, dass nur die Stoffwechselleistung der aktiven oder kurzfristig aktivierbaren Mikroorganismen erfasst wird. Strukturparameter dagegen erfassen alle extrahierbaren Bodenmikroorganismen, unabhängig von ihrem physiologischen Zustand. Somit müssen sich kurzfristige Änderungen der Umgebung nicht zwangsläufig auf die Ergebnisse auswirken. So werden Mikroorganismen, die sich in Ruhestadien befinden ebenso erfasst wie aktive Formen. Anders als bei Kultivierungsversuchen, die nur ca. 10 % der Bodenmikroorganismen darstellen und somit den größten Teil der Diversität aussparen (TORSVIK ET AL. 1990), werden bei einer Analyse von Strukturelementen wie z.B. der DNA oder den Phospholipiden der Zellmembran alle extrahierten Mikroorganismen dargestellt (WIDMER ET AL. 2001). Laut Zelles & Bay (1994) werden Phospholipide nur aus intakten Zellen - oder besser deren cytoplasmatischen Membranen -, also nur aus lebenden Organismen erfasst. Zur Persistenz von Strukturelementen (DNA, Phospholipide) abgestorbener Individuen im Boden liegen allerdings bisher keine eindeutigen Aussagen vor (NWOSU 2001). So schwanken die Angaben zwischen Stunden (NIELSEN ET AL. 1997) und Wochen bis Monate (LORENZ & WACKERNAGEL 1994).

Tatsächlich konnte kein Einfluss der Bodenfeuchte auf den Gesamtgehalt der untersuchten PLFAs gefunden werden. Da es sich bei der PLFA-Analyse um eine halbquantitative Methode handelt, können die Summenwerte aber auch nur bedingt zur Auswertung herangezogen werden. Trennsäule und Trägergas des Analysegerätes wirken sich auf die Höhe der Werte aus. Es können nur Daten von Analysen an einer GC-MS Gerätekombination mit gleicher Trennsäule und gleichem internen Standard miteinander verglichen werden. Die Extrahierbarkeit der PLFAs hängt von der Bodenbeschaffenheit ab. Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden ob die Extraktion quantitativ ist. Somit sollten Ergebnisse unterschiedlicher Böden nur qualitativ verglichen werden. Somit ist die Untersuchung des Gesamtgehalts von PLFAs für Proben der Umweltprobenbank nur eingeschränkt geeignet. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass bis auf eine Ausnahme keine offensichtlichen Auswirkungen der Probenmanipulation auf den Gesamtgehalt der untersuchten PLFAs gefunden wurden, wird auf eine weitere Bewertung der Gesamtgehalte verzichtet. Die Verdopplung des Gesamtgehalts in den auf 50 % WHK_{max} des gesiebten Bodens eingestellten Proben des Lehmbodens nach Gefrierlagerung ist nicht zu erklären, da sich das Phänomen weder im Sandboden, noch in Funktionsmessungen bestätigt. Bei einem Biomasseanstieg müssten ebenfalls gesteigerte Aktivitäten (Respiration, Ammoniumoxidation) festgestellt werden. Dies war aber nicht der Fall.

Auch wenn sich bei den relativen Anteilen der einzelnen erfassten PLFAs keine Auswirkungen der Bodenfeuchte erkennen lassen, zeigt sich beim Verhältnis der Anteile Gram-negativer (G-) zu Gram-positiver (G+) Bakterien doch eine Abhängigkeit. Unabhängig vom Boden werden die Verhältnisse mit steigendem Wassergehalt enger. Eigentlich gelten G+ Bakterien im Vergleich zu G- Bakterien als Stress-toleranter (ZELLES ET AL. 1997, DICKENS & ANDERSON 1999). In diesen Studien wurde allerdings der Einfluss von Chemikalien auf die mikrobielle Population untersucht. Bei Trockenstress könnten G-Bakterien aber aufgrund ihrer dickeren Zellmembran mit Lipopolysacchariden einen Vorteil besitzen und besser gegen Austrocknung geschützt sein.

Typische Stress-Indikatoren sind die Verhältnisse der iso- zu anteiso-Formen einfach verzweigter PLFAs und das Verhältnis von *trans* zu *cis* Isomeren einfach ungesättigter PLFAs (KIEFT ET AL. 1997, PETERSEN & KLUG 1994). Dabei gilt ein Anstieg der Quotienten als Stress. In dieser Studie wurde kein Einfluss der Bodenfeuchte auf die untersuchten Indikatoren festgestellt. Somit wäre trotz einer Verschiebung der Anteile G– und G+ Bakterien für die vorhandenen Organismen kein physiologischer Stress nachweisbar, der zu einer Umgestaltung der Phospholipide in der mikrobiellen Zellmembran führt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass eventuelle Verschiebungen in den jeweiligen Verhältnissen vermutlich relativ gering sind und durch Varianzen der komplexen mikrobiellen Populationen in den einzelnen Extrakten eventuell verdeckt werden. Untersuchungen zu Stressindikatoren wurden bisher nur an Reinkulturen durchgeführt (DRIJBER ET AL. 2000, DICKENS & ANDERSON 1999, KIEFT ET AL. 1997, 1994, PETERSEN & KLUG 1994). Aber unabhängig davon, ob die Bodenfeuchte keinen entsprechenden Stress ausübt, oder dieser so gering ist, dass er nicht erfasst werden kann, für die Belange der Umweltprobenbank bedeutet dies, dass das Strukturmerkmal PLFA relativ unempfindlich gegen Schwankungen der Bodenfeuchte ist. Auch wenn White (1983) in Reinkulturen noch nachwies, dass jede Lagerung, Vorbehandlung oder Konservierung von Proben (Trocknung, Kühlen, Tiefkühlen, ...) zu Veränderungen in der PLFA Zusammensetzung führt, so gilt doch, dass für das Artenspektrum einer Probe am Ende einer Zeitreihe das Spektrum des Originalbodens wichtiger als die Behandlung ist (DICKENS & ANDERSON 1999). Besonders deutlich ist das am *trans/cis*-Verhältnis der Proben im Sandboden nachzuweisen. Egal welcher Behandlung die Proben unterzogen wurden, die Quotienten der Ansätze "20 % WHK_{max}", "50 % WHK_{max}" und "90 % WHK_{max}" blieben konstant und unterschieden sich nur zwischen den drei Ansätzen.

Bei den T-RFLP-Analysen wurde zwischen DNA-basierenden und RNA-basierenden Ansätzen unterschieden. Bei den DNA-Analysen werden – wie oben beschrieben – auch tote Organismen erfasst. Des Weiteren liegt die genetische Information, die für das hier untersuchte 16S rRNA-Gen codiert, 1 – 12 x (für jede Bakterienart spezifisch, FARRELLY ET AL. 1995) vor. Bei den RNA-Analysen werden besonders Stoffwechsel-aktive Organismen erfasst, da die RNA nur eine sehr kurze Zeit in der Zelle existiert und außerhalb dieser deutlich schneller als DNA abgebaut wird. Bei Stoffwechsel-aktiven Organismen können 10.000 – 100.000 Kopien der untersuchten RNA-Moleküle vorkommen.

Da T-RFLP-Analysen auf der Amplifikation von DNA (bzw. cDNA) mittels PCR beruhen, ist eine quantitative Aussage kaum möglich. Es ist bekannt, dass bei Amplifikation eines Gemisches an unterschiedlichen Gensequenzen (in diesem Fall 16S rRNA-Genen) diese nicht gleichmäßig vervielfältigt werden (WAGNER ET AL. 1994, ZEHNG ET AL. 1996). Deshalb werden die Gene, die nach der PCR am häufigsten sind, nicht zwangsläufig auch in der ursprünglichen Probe am häufigsten vorkommen. Dennoch ist die PCR und die anschließende T-RFLP-Analyse reproduzierbar. Das bedeutet, Verschiebungen in den prozentualen Verhältnissen der einzelnen terminalen Restriktionsfragmente in einem Muster werden ihre Ursachen in einer Verschiebung der Organismenhäufigkeit in der ursprünglichen Probe haben. An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass mit der PCR zwar ein deutlich größerer Anteil an bakterieller Diversität erfasst wird als mit den klassischen – auf Kultivierung basierenden Methoden – aber – basierend auf der „Universalität“ der eingesetzten Primer – bei Weitem nicht die ganze Vielfalt an Organismen abgedeckt werden kann.

Bei den T-RFLP-Analysen basierend auf der genomischen DNA war sowohl beim Lehmboden als auch beim Sandboden kein Einfluss durch die Bodenfeuchte erkennbar. Bei den T-RFLP-Analysen basierend auf Gesamt-RNA hingegen zeigten sich sowohl für den Lehmboden als auch für den Sandboden Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der T-RFs.

4.2 Einfluss der Bodenlagerung

Schon in einem vorangegangenen Vorhaben (Methodische Weiterentwicklung der Probenrichtlinie für Böden im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes, FKZ 301 02 006) konnte gezeigt werden, dass die Gefrierlagerung und ein schnelles Auftauen der Proben nur vernachlässigbare Einflüsse auf die meisten Bodenparameter hat. In dieser Studie sollte weitergehend untersucht werden, ob sich der Wassergehalt des Bodens bei der Gefrierlagerung auf die untersuchten Parameter auswirkt.

Mikrobielle Funktion

Unabhängig von der Bodenfeuchte hatte ein Gefrierlagerung mit anschließender schneller Reaktivierung keine Auswirkungen auf die gemessenen Bodenfunktionen. Bei der SIR und dem Respiratorischen Aktivierungsquotient wurden in frischen und gelagerten Proben identische Werte ermittelt. Das Selbe galt für die Basalatmung und die potentielle Ammoniumoxidation im Sandboden. Auch wenn im Lehmboden bei diesen beiden Parametern leichte Veränderungen festgestellt wurden, sind die absoluten Unterschiede zu vernachlässigen. Somit ist eine sichere Beurteilung der Proben gewährleistet.

Mikrobielle Struktur

Unabhängig von der Bodenfeuchte hatte ein Gefrierlagerung mit anschließender schneller Reaktivierung keine messbaren Auswirkungen auf die erfassten PLFAs.

Bei den T-RFLP-Analysen basierend auf der genomischen DNA traten nur beim Sandboden nach der Gefrierlagerung leichte Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der T-RFs auf. Bei den T-RFLP-Analysen basierend auf Gesamt-RNA zeigte sich nach der Gefrierlagerung beim Lehmboden eine deutliche Reduktion der Anzahl und dadurch auch eine starke Verschiebung in der prozentualen Verteilung der T-RFs. Beim Sandboden zeigte sich nur ein geringer Einfluss durch die Bodenlagerung.

4.3 Einfluss der Bodeninkubation

Das Einstellen von Bodenproben auf einen Wassergehalt von 40 – 60 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens und einer Inkubation bei 20 °C soll bei der Messung von Bodenfunktionen zu reproduzierbaren Ergebnissen führen und die potentiell mögliche Aktivität stimulieren. Je nach Länge der Inkubation kann es aber zu einer Verschiebung innerhalb der mikrobiellen Population der Probe kommen, da sich die Umweltbedingungen im Verhältnis zur Probenahme stark unterscheiden können. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich der Wassergehalt des Bodens zum Zeitpunkt der Probenahme oder eine Gefrierlagerung auf die untersuchten Parameter in auf Laborstandard eingestellte Bodenproben auswirkt.

Mikrobielle Funktion

Unabhängig ob die Ansätze frisch oder gelagert waren, das Einstellen der Proben auf 40 – 60 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens führte zu einheitlichen Ergebnissen in den Funktionsmessungen. Die ursprüngliche Bodenfeuchte hatte keine nennenswerten Auswirkungen auf die ermittelten Werte. Auftretende Varianzen in den Respirationsmessungen zwischen den eingestellten Proben lassen sich anhand der sehr niedrigen Absolutwerte, speziell in der Basalatmung, erklären. Der Respiratorische Aktivierungsquotient zeigte bei allen Proben identische Werte.

Mikrobielle Struktur

Unabhängig ob die Ansätze frisch oder gelagert waren, das Einstellen der Proben auf 40 – 60 % der WHK_{max} des gesiebten Bodens führte ebenfalls zu einheitlichen Ergebnissen bei den erfassten PLFAs. Die ursprüngliche Bodenfeuchte hatte keine Auswirkungen auf die ermittelten Werte. Auftretende Unterschiede zwischen den Ansätzen sind, wie oben bereits erwähnt, durch die natürliche Varianz in der Zusammensetzung der mikrobiellen Population der einzelnen Bodenkerne zu erklären.

Das Einstellen der Proben ohne Gefrierlagerung auf den Laborstandard zeigte bei den T-RFLP-Analysen basierend auf der genomischen DNA sowohl beim Lehmboden als auch beim Sandboden keinen Einfluss. Nach der Gefrierlagerung kam es nur beim Sandboden zu Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der T-RFs. Diese beschränken sich allerdings auf zwei kurze Fragmente. Bei den T-RFLP-Analysen basierend auf der Gesamt-RNA kam es beim Lehmboden im Vergleich zu den Original-Daten zu deutlichen Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der T-RFs, beim Sandboden waren diese Veränderungen geringer.

5 Zusammenfassung

Bei den Messungen der mikrobiellen Funktion wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Wie erwartet hatte die aktuell Bodenfeuchte einen starken Einfluss auf die mikrobielle Atmungsaktivität. Dies galt für die Basalatmung, die substratinduzierte Atmung und den Respiratorischen Quotienten. Bei der gewählten Methode zur Messung der potentiellen Ammoniumoxidation (ISO/DIS 15685 (2001)) war dies hingegen nicht der Fall, da die Probeninkubation in einer wässrigen Suspension stattfindet.

Das Einstellen der Proben auf 40 – 60 % ihrer WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei allen untersuchten mikrobiellen Funktionen zu vergleichbaren Werten. Die original Bodenfeuchte hatte somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Die Gefrierlagerung hatte keinen Einfluss auf die untersuchten mikrobiellen Funktionen.

Die Ergebnisse zur mikrobiellen Struktur sind kaum von der Bodenfeuchte abhängig. Das liegt daran, dass bei den Strukturmessungen nicht nur aktive Mikroorganismen, sondern auch inaktive (PLFA) oder sogar tote Mikroorganismen (T-RFLP) erfasst werden. Somit werden kurzfristige umweltbedingte Änderungen (z.B. bedingt durch das aktuelle Wetter) in der mikrobiellen Population mit den gewählten Methoden nicht erfasst. Langfristige Umweltveränderungen sollten aber detektierbar sein.

Bei den relativen Anteilen der einzelnen erfassten PLFAs wurden keine Auswirkungen der Bodenfeuchte festgestellt. Trotzdem korrelierte das Verhältnis von Gram positiven und negativen Bakterien mit der Bodenfeuchte. Die als Stress-Indikatoren geltenden Verhältnisse der iso- zu anteiso-Formen einfach verzweigter PLFAs und von *trans* zu *cis* Isomeren einfach ungesättigter PLFAs wurden nicht durch die Bodenfeuchte beeinflusst. Das Einstellen der Proben auf 40 – 60 % ihrer WHK_{max} des gesiebten Bodens führte bei den untersuchten PLFAs zu vergleichbaren Werten. Die original Bodenfeuchte hatte somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Die Gefrierlagerung hatte keinen Einfluss auf die untersuchten PLFAs.

Die T-RFLP-Analysen zeigten für genomische DNA und RNA unterschiedliche Trends auf. Das T-RFLP-Muster der genomischen DNA als Strukturindikator wurde weder durch Bodenfeuchte, Bodenlagerung noch durch das Einstellen der Böden auf Laborstandard gravierend beeinflusst. Wurden Änderungen in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft detektiert, so waren sie gering und traten ausschließlich beim Sandboden auf. Dies ist durch die deutlich geringere mikrobielle Populationsdichte im Sandboden im Vergleich zum Lehmboden zu erklären. Kleine absolute Änderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft haben große relative Veränderungen zur Folge. Im Gegensatz zur genomischen DNA war das T-RFLP-Muster der RNA als

Funktionsindikator deutlich heterogener, wobei keine Korrelation mit der Bodenfeuchte festgestellt werden konnte. Die deutlichen Änderungen bei den T-RFLP-Analysen haben wahrscheinlich ihre Ursache darin, dass mit der RNA besonders die Stoffwechsel-aktiven Bakterien erfasst werden. Hier wird somit nicht nur die Struktur – wie bei der DNA – untersucht, sondern auch die Funktion. Ein weiterer Grund könnten aber auch die geringere Stabilität und dadurch die deutlich erschwerte Handhabung der RNA sein. Eine Gefrierlagerung kann sich je nach Bodenart gravierend auf das T-RFLP-Muster der RNA auswirken.

Im Hinblick auf die Einlagerung von Bodenproben für mikrobiologische Fragestellungen in die Umweltprobenbank können somit folgende Aussagen getroffen werden:

Einfluss der aktuellen Witterung (Wassergehalt des Bodens) zum Zeitpunkt der Bodenprobenahme auf Struktur- und Funktionsparameter:

Der Wassergehalt kann sich bei Funktionsmessungen deutlich auf die Ergebnisse auswirken. Gehalte, die deutlich unterhalb bzw. oberhalb des für Mikroorganismen optimalen Bereichs von $50 \% \pm 10 \%$ der maximalen Wasserhaltekapazität liegen können zu einer reduzierten Aktivität führen. Bei Strukturuntersuchungen sind die Einflüsse auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse geringer ausgeprägt

Einfluss des aktuellen Wassergehaltes während der Lagerung

Ein Einfluss des aktuellen Wassergehaltes während der Lagerung konnte weder auf die mikrobielle Funktion noch auf die Struktur festgestellt werden. Eine Lagerung der Proben bei den zum Zeitpunkt der Bodenprobenahme herrschenden Bedingungen kann somit vorgenommen werden.

Minimierung der aktuellen Witterungseinflüsse durch eine Vorinkubation vor der Messung

Durch eine Vorinkubation (z.B. 14 d bei $50 \% \pm 10 \% \text{ WHK}_{\text{max}}$) kann speziell bei den mikrobiellen Funktionsuntersuchungen der Einfluss der aktuellen Witterung zum Zeitpunkt der Bodenprobenahme minimiert werden. Dies trifft zumindest auf die "klassischen" funktionellen Methoden zu. Die RNA-Bestimmung über molekularbiologische Verfahren ist möglicherweise noch zu optimieren.

Bodenproben, die im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes gesiebt und originalfeucht tiefgefroren gelagert werden, können somit zur Messung der mikrobiellen Funktion und Struktur des Bodens zum Zeitpunkt der Probenahme herangezogen werden. Zur Minimierung des Einflusses der Witterung zum Zeitpunkt der Probenahme sollte jedoch zumindest für die Erfassung der mikrobiellen Funktion die Probe bei einem Wassergehalt von $50 \% \pm 10 \%$ der maximalen Wasserhaltekapazität bei $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ vorinkubiert werden (z.B. für 14 d).

6 Absicherung der gewonnenen Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden erzielt, indem Bodenkerne durch Abtrocknen bzw. Anfeuchten auf unterschiedliche Feuchten eingestellt und für 14 Tage bei dem jeweiligen Wassergehalt und 20 °C im Labor inkubiert wurden. Zur Absicherung der gewonnenen Ergebnisse wäre es wünschenswert, die Untersuchungen zu wiederholen, indem Proben bei unterschiedlicher Witterung direkt gewonnen werden. Um keine zu großen jahreszeitlichen Einflüsse einfließen zu lassen, sollten die Proben möglichst innerhalb eines engen Zeitfensters entnommen werden. Um dies zu erzielen und unnötige, weite Fahrten zu vermeiden, wäre es empfehlenswert, dies exemplarisch an einem Standort in unmittelbarer Institutsnähe durchzuführen, auch wenn dieser nicht explizit zu einer bereits ausgewiesenen Probenahmefläche für die Umweltprobenbank gehört. Dadurch wäre es gewährleistet, dass auf der Basis der aktuellen Witterung rasch entschieden werden könnte, wann eine Probenahme erfolgen soll. Im Rahmen dieser Versuchsanstellung könnten auch noch Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Vorinkubationsphase integriert werden.

7 Literatur

- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K.H. (1990):
Anwendung ökophysiologischer Parameter zur Charakterisierung mikrobieller Biomasse im Boden. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie 19: 324-329.
- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K.H. (1993):
The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effect of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Soil Biology and Biochemistry 25: 393-395.
- DICKENS, H.E.; ANDERSON, J.M. (1999):
Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. Soil Biology and Biochemistry 31: 2049-2058.
- DRIJBER, R.A., DORAN, J.W., PARKHURST, A.M., LYON, D.J. (2000):
Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. Soil Biology and Biochemistry 32: 1419-1430.
- DIN ISO 14240-1 (1999):
Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden. Teil 1: Substrat-induziertes Respirationsverfahren.
- FARRELLY, V., RAINEY, F.A., STACKEBRANDT, E. (1995):
Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2798-2801.
- FROSTEGARD, A.; BAATH, E.; TUNLID, A. (1993):
Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. Soil Biology and Biochemistry 25: 723-730.
- GEMESI, O.; TOPP, W. (1992):
Adaption of Terrestrial Bryophaenocladus cf. Inconstans (Dipt., Chironomidae) to Survive in an Extreme Environment. Proceedings of the 4th ECE/XIII. SIEEC, Gödöllő 91: 720-722.
- GRAYSTON, S.J.; GRIFFITH, G.S.; MAWDSLEY, J.L.; CAMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D. (2001):
Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 33: 533-551.
- HUIISH, S.; LEONARD, M. A.; ANDERSON, J. M. (1985):
Wetting and drying effects on animal/microbial mediated nitrogen mineralization and mineral element losses from deciduous forest litter and raw humus. Pedobiologia 28: 177-183.
- HUND ET AL. (1994):
Regeneration mikrobieller Aktivität in Böden nach natürlichen Streßsituationen – Bewertungskriterium für die Bodenqualität. BioEngineering 6/94: 38-41.
- ISO/DIS 15685 (2001):
Soil Quality – Determination potential nitrification – Rapid test by ammonium oxidation.
- ISO/DIS 17155 (2001):
Soil Quality – Determination of abundance and activity of the soil microflora using respiration curves.
- KAUTZ, G. (1999):
Die Bedeutung der saprophagen Bodenfauna für eine Verbesserung der Bodenqualität. Cuvillier Verlag, Göttingen, 162 pp.
- KANDELER, E. & BÖHM, K.E. (1996):
Temporal dynamics of microbial biomass, xylanase activity, N-mineralisation and potential nitrification in different tillage systems. Applied Soil Ecology 4: 181-191.
- KIEFT, T.L., RINGELBERG, D.B., WHITE, D.C. (1994):
Changes in Ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. Applied and Environmental Microbiology 60: 3292-3299.
- KIEFT, T.L.; WILCH, E.; O'CONNOR, K.; RINGELBERG, D.B.; WHITE, D.C. (1997):
Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. Applied and Environmental Microbiology 63: 1531-1542.
- LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. (1994):
Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews 58: 563-602.

- NIELSEN, K.M.; BONES, A.M.; VAN ELSAS, J.D. (1997):
Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3972-3977.
- ORCHARD, V.A.; COOK, F. J.; CORDEROY, D. M. (1992):
Field and laboratory studies on the relationships between respiration and moisture for two soils of contrasting fertility status. *Pedobiologia* 36: 21-33.
- PETERSEN, S.O.; KLUG, M.J. (1994):
Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2421-2430.
- SIMON, M. (2001):
Influence of a new reclamation technique on soil properties. Investigations in the lignite open-cast mine district of the Rhineland. Cuvillier Verlag, Göttingen, 185 pp.
- TORSVIK, V., GOKSOYR, J., DAAE, F.L. (1990):
High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 782-787.
- WAGNER, A., BLACKSTONE, N., CARTWRIGHT, P., DICK, M., MISOF, B., SNOW, P., WAGNER, G.P., BARTELS, J., MURTHA, M., PENDLETON, J. (1994):
Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Syst. Biol.* 43: 250-261.
- WARDLE, D.A.; GHANI, A. (1995):
A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1601-1610.
- WHITE, D.C. (1983):
Analysis of microorganismes in terms of quantity and activity in natural environments. In: Slater, J.H. (Hrsg.): *Microbes in their natural environments* Thirty-fourth Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, 37-66.
- WIDMER, F.; FLIEßBACH, A.; LACZKÓ, E.; SCHULZE-AURICH, J.; ZEYER, J. (2001):
Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog(TM)-analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1029-1036.
- ZELLES, L.; BAY, Q.Y. (1994):
Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharids in environmental samples. *Chemosphere* 28: 391-411.
- ZELLES, L., PALOJÄRVI, A., KANDELER, E., VON LÜTZOW, M., WINTER, K., BAI, Q.Y. 1997:
Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1325-1336.
- ZHENG, D., ALM, E.W., STAHL, D.A., RASKIN, L. (1996):
Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4504-4513.