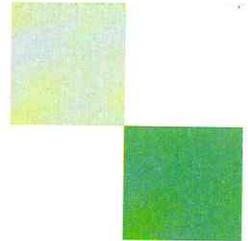




UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH  
in der Helmholtz-Gemeinschaft



*Dissertation 13/2005*

**Zur Wirkung phenolischer Xenobiotika auf die mikrobielle  
Biozönose im Wurzelraum von Helophyten**

Ulrich Soltmann

ISSN 1860-0387

**Zur Wirkung phenolischer Xenobiotika auf die mikrobielle  
Biozönose im Wurzelraum von Helophyten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem Fachbereich 2  
Biologie/Chemie  
der Universität Bremen

von

**Ulrich Soltmann**

März 2005

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 22.06.2005

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Stottmeister  
Prof. Dr. Alexander Nehrkorn

## 1. Einleitung

1.1. Einbindung von Pflanzen in Sanierungskonzepte – Phytoremediation.....	1
1.2. Mikrobiologie der Rhizosphäre – der Rhizosphäreneffekt.....	3
1.2.1. Rhizodeposition.....	4
1.3. Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in überstauten Systemen – Bedeutung für die Schadstoffverwertung.....	5
1.3.1. Sauerstoffeintrag in die Rhizosphäre durch Pflanzen.....	5
1.4. Schadstoffentfernung durch pflanzliche Detoxifikationsmechanismen.....	7
1.5. Literaturübersicht zu einem erhöhten Schadstoffabbau in bepflanzen Systemen..	8
1.5.1. Schadstoffabbau in Constructed Wetlands und natürlichen Feuchtgebieten....	8
1.5.2. Schadstoffabbau in belasteten Böden.....	11
1.6. Beeinflußbarkeit der mikrobiellen Rhizosphärenstruktur durch Schadstoffexposition. Bedeutung der Pflanze und des Bodens.....	13
1.7. Zielstellung.....	15

## 2. Material und Methoden

2.1. Versuchspflanzen.....	17
2.1.1. Pflanzenanzucht.....	17
2.1.2. Bestimmung der Oberfläche bei Wurzeln und Sand.....	18
2.1.3. Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse von Pflanzen.....	19
2.1.4. Färbung pflanzlichen Gewebes.....	19
2.2. Untersuchungssysteme.....	20
2.2.1. Durchflußsysteme – 2,6-Dimethylphenol Versuche.....	20
2.2.2. Durchflußsysteme – 4-Nitrophenol Versuche.....	21
2.3. Schadstoffanalytik.....	22
2.3.1. Photometrische Methoden.....	22
2.3.2. High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) .....	23
2.4. Mikrobiologische Methoden.....	23
2.4.1. Färbung und Mikroskopie von Wurzel- und Sandpräparaten.....	23
2.4.2. Visualisierung physiologisch aktiver Bereiche an Wurzel- und Sandoberflächen.....	24
2.4.3. Gewinnung von Bakterien von der Wurzel- oder Sandoberfläche.....	25
2.4.4. Nitrophenolverwertung durch Suspensionen abgelöster Bakterien.....	26
2.4.5. Gesamtzellzahlbestimmung nach Anfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) .....	26
2.4.6. Quantitative Bestimmung von Mikroorganismen über die KBE (Kolonie-Bildende-Einheiten).....	27
2.4.7. Isolate mit hoher Abundanz.....	28

2.4.8. Charakterisierung und Identifizierung bakterieller Isolate.....	29
2.4.8.1. Morphologische Beschreibung .....	29
2.4.8.2. Färbung nach Gram.....	29
2.4.8.3. Aminopeptidase Test.....	29
2.4.8.4. Cytochrom-Oxidase Test.....	30
2.4.8.5. Bakterien Differenzierung und Identifizierung mit dem BIOLOG®-System.....	30
2.4.8.6. Identifizierung von Bakterien mit dem API-System.....	31
2.4.8.7. Analyse membrangebundener Fettsäuren.....	31
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	31
2.5.1. Typisierung durch PCR-Fingerprinttechniken.....	31
2.5.1.1. Lyse bakterieller Isolate.....	32
2.5.1.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) .....	32
2.5.1.3. Typisierung über Polymorphismen in der 16S-23S Spacer Region.....	34
2.5.1.4. Agarosegelelektrophorese.....	35
2.5.2. Ganzzellhybridisierung mit gruppengerichteten, fluoreszenz- markierten Oligonukleotid-rRNA-Sonden .....	36
2.5.2.1. Fixierung von Bakterien.....	38
2.5.2.2. Präparation der Proben.....	40
2.5.2.3. Hybridisierung.....	41

### 3. Ergebnisse

3.1. Reaktion der Pflanzen auf Schadstoffexposition.....	44
3.1.1. Veränderungen im Erscheinungsbild der Pflanzen bei Schadstoffexposition.....	44
3.1.2. Wasserverbrauch von <i>Carex gracilis</i> , <i>Juncus effusus</i> und <i>Phalaris</i> <i>arundinacea</i> bei Schadstoffexposition.....	44
3.1.3. Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol.....	47
3.2. Schadstoffaufnahme in die Pflanzen.....	49
3.3. Schadstoffabbau in Hydroponiksystemen.....	53
3.4. Bakterielle Besiedlung der Rhizosphäre und deren Charakterisierung.....	55
3.4.1. Untersuchung zur Besiedlung von Wurzel und Sand mittels Fluoreszenzmikroskopie und CLSM .....	55
3.4.2. Visualisierung aktiver Bakterien mit 2,3,5-Triphenyl- tetrazoliumchlorid.....	57
3.4.3. Charakterisierung von Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an der Wurzel bei DMP Belastung.....	58
3.4.3.1. Veränderungen bei <i>Carex gracilis</i> , <i>Juncus effusus</i> und <i>Phalaris arundinacea</i> nach 1monatiger DMP-Exposition.....	58

3.4.3.2. Änderungen im DMP-Abbaupotential und in der Besiedlungsdichte an der Wurzel von <i>Carex gracilis</i> innerhalb 3monatiger DMP-Exposition..	65
3.4.3.3. Entwicklung der Abbauleistung in bepflanzten Sandbettsystemen.....	66
3.4.4. Charakterisierung von Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlungsstruktur von Hydroponik- und Sandbett-Systemen bei Belastung mit 4-Nitrophenol.....	67
3.4.4.1. Mikrobielle Besiedlungsdichten in Sandbett- und Hydroponiksystemen	68
3.4.4.2. Aussagen zur Aktivität der Nitrophenol Verwertung an Sand- und Wurzeloberflächen.....	72
3.4.4.3. Abbauleistung in Sandbettsystemen nach 2monatiger Nitrophenol Belastung.....	73
3.4.4.4. Bakterielle Populationsanalyse an Wurzel- oder Sandoberflächen anhand abundanter, kultivierbarer Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter rRNA gerichteter Oligonucleotid-Sonden.....	75
3.4.5. Identifizierung DMP und NP verwertender Bakterien mit hoher Abundanz....	80
3.4.6. Untersuchungen zur Etablierung des DMP-verwertenden Stammes <i>Mycobacterium fortuitum</i> DMP-20 in einem <i>Carex gracilis</i> Festbettsystem....	82
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Wahl der Untersuchungssysteme.....	84
4.1.1. Hydroponik- und überstaute Sandbettsysteme.....	84
4.1.2. Bepflanzung.....	85
4.1.3. Modellschadstoffe.....	86
4.2. Methoden zur Beschreibung mikrobieller Lebensgemeinschaften.....	87
4.2.1. Kultivierungsmethoden.....	87
4.2.2. Molekular-ökologische Studien.....	88
4.2.2.1. Mikrobielle Strukturanalyse anhand der Gesamt-DNA eines Standortes	88
4.2.2.2. Populationsanalyse über rRNA gerichtete Oligonukleotidsonden.....	90
4.2.3. Eingesetzte Methodik.....	91
4.3. Aussagen zur mikrobiellen Struktur in der Rhizosphäre im Vergleich zu nicht pflanzenbeeinflussten Systemen.....	92
4.4. Schadstoffbedingte Veränderungen der Rhizosphärenbiozönose.....	96
4.5. Direkte Beteiligung der Pflanze an der Schadstoffverwertung.....	100
4.6. Etablierung inokulierter Schadstoff abbauender Bakterien in der Rhizosphäre ....	102
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	104
<b>6. Literatur</b> .....	108

<b>7. Anhang</b> .....	122
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	122
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	123
7.3. Tabellenverzeichnis. ....	124
7.4. Zellzahlen nach 2monatiger Nitrophenolexposition.....	126
7.5. Zusammenstellung übereinstimmender bakterieller Isolate von Wurzeln anhand der RAPD-Analyse und nach morphologischen Gesichtspunkten.....	127

# 1. Einleitung

## 1.1. Einbindung von Pflanzen in Sanierungskonzepte – Phytoremediation.

In den letzten Jahren findet der Einsatz von Pflanzen bei Sanierungskonzepten zunehmend Interesse. Entsprechend der Bedeutung der Pflanzen in solchen Konzepten hat sich international der Begriff Phytoremediation in Abwandlung der allgemeineren Bezeichnung Bioremediation durchgesetzt. Einsatzbereiche liegen bei der Behandlung kontaminierter Wässer, Böden und Schlämme. Die zentrale Bedeutung der Pflanzen bei Phytoremediation-Strategien ergibt sich aus ihrer Funktionsweise und wird im wesentlichen durch folgende Punkte beschrieben:

- (a) Förderung des mikrobiellen Abbaus von Schadstoffen in der Rhizosphäre. Der Wurzelraum wird entscheidend durch Wechselbeziehungen zwischen Pflanze und Mikroorganismen geprägt. Die mikrobielle Rhizosphären-Biozönose wird hierbei z.B. durch Abgabe organischer Verbindungen (Exsudation) oder Sauerstofffreisetzung durch die Pflanzen beeinflusst, was sich in einer hohen mikrobiellen Besiedlungsdichte, hoher Diversität und einem entsprechend hohem biochemischen Potential äußert (Rhizosphäreneffekt).
- (b) Schadstoffaufnahme in die Pflanze. Schadstoffe können via Transpirationsstrom in den Apoplasten oder ggf. auch in den Symplasten der Pflanze aufgenommen werden. Über Akkumulation innerhalb der Pflanze (z.B. durch Anlagerung an Pflanzenstrukturen oder Einlagerung in Vakuolen), Metabolisierung der Schadstoffe durch pflanzeigene Enzymsysteme oder Evaporation des Schadstoffes über die Blätter können Xenobiotika aus dem Wurzelraum entfernt werden.
- (c) Konzentrierung der Schadstoffe durch die Evaporation von Wasser.
- (d) Festlegung von Schadstoffen in der Bodenmatrix. Verringerung der Bioverfügbarkeit durch Wechselwirkung der Kontaminanten mit Wurzelexsudaten, Mucigel oder Bestandteilen abgestorbener Wurzelzellen unter Bildung komplexer organischer Strukturen.

Ein entscheidender Vorteil solcher Sanierungsverfahren liegt in einem i.d.R. geringen Aufwand bei der Umsetzung und beim Betrieb (Anderson & Coats 1994, Watanabe 1997). Der Energieeintrag für das zentrale Funktionselement, die Pflanzen, erfolgt kostenlos über die Sonne und zudem ist eine hohe Akzeptanz u.a. durch die ästhetische Einbindung in die Umgebung gegeben (Shimp et al.1993). Sehr vielversprechend sind Phytoremediations-

konzepte insbesondere bei dezentraler Lage und großer räumlicher Ausdehnung kontaminierter Flächen vor dem Hintergrund der in der Regel sehr begrenzt zur Verfügung stehenden finanziellen Mitteln. Hierbei können solche Verfahren als alleiniger Ansatz zum Einsatz kommen oder anderen Reinigungstechnologien nachfolgen (Cunningham et al. 1995, Schnoor et al. 1995).

Eine erste gezielte Einbindung von Pflanzen in Behandlungsstrategien erfolgte im Bereich der Abwasserreinigung. Hier kam es vor allem infolge der grundlegenden Arbeiten von Seidel in den 60iger und 70iger Jahren zu einer verbreiteten Nutzung von Helophyten (Sumpfpflanzen) in sog. Pflanzenkläranlagen für die Reinigung kommunaler und industrieller Abwässer. Konzepte zur Phytoremediation von kontaminierten Böden und Schlämmen entwickelten sich anfänglich aus Untersuchungen im landwirtschaftlichen Bereich zum Umsatz von Pestiziden im durchwurzelten Boden (Hsu & Bartha 1979, Reddy & Sethunathan 1983, Sandmann & Loos 1984, Lappin et al. 1985). Wegweisend wurde der Einsatz von Pflanzen im Sinne einer Sanierungsstrategie durch Aprill & Sims (1990) im Rahmen von Untersuchungen zur Beeinflussung des PAK Abbaus in belasteten Boden nach Bepflanzung mit verschiedenen Grasarten beschrieben.

Trotz dieser zeitlich vorausgehenden Arbeiten stehen die komplexen biotischen und abiotischen Mechanismen der Schadstoffentfernung (Festlegung, Transformation, Mineralisation) in den Wechselwirkungen zwischen Pflanze, Mikroorganismen und Wasser- bzw. Bodenmatrix erst seit jüngerer Zeit im Mittelpunkt intensiver Forschung. Ursächlich ist die Notwendigkeit eines tieferen Verständnisses dieser Interaktionen bei der Planung von Sanierungsstrategien.

Gegründet aus der starken Altlastenproblematik, insbesondere infolge der industriellen Braunkohlepyrolyse des letzten Jahrhunderts in Sachsen und Sachsen-Anhalt, wird am Umweltforschungszentrum Leipzig seit Mitte der 90iger Jahre intensiv an Phytoremediation Strategien gearbeitet. Ein Ansatz zur Behandlung derartiger Altlasten, die vor allem durch phenolische Verbindungen und PAK gekennzeichnet sind, bietet die Nutzung des hohen mikrobiellen Abbaupotentials der Rhizosphäre. Bei Fokussierung auf staunasse Bedingungen oder belastete Wässer finden Helophyten (Sumpfpflanzen) Verwendung, die durch die pflanzenanatomische Besonderheit der Ausbildung eines Aerenchyms in der Lage sind unter überstauten Bedingungen zu wachsen sowie, ggf. durch die Abgabe von Sauerstoff in die Rhizosphäre aerobe Stoffumsätze zu fördern. Entscheidend für die Nutzung dieser günstigen Bedingungen ist jedoch, daß neben der Exsudatverwertung auch tatsächlich eine Ausrichtung der mikrobiellen Biozönose auf den Schadstoffabbau

stattfindet. Zur Beschreibung schadstoffbedingter Veränderungen in der Rhizosphären-biozönose entstand die vorliegende Arbeit aus einer Projektzusammenarbeit zwischen dem Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie in Leipzig (SIAB) und dem Umweltforschungszentrum Leipzig.

## **1.2. Mikrobiologie der Rhizosphäre – der Rhizosphäreneffekt**

Die Rhizosphäre ist definiert als der die Wurzeln direkt umgebende und von den Wurzeln beeinflusste Bodenbereich (Mahaffee & Kloepper 1997). Üblicherweise findet eine weitergehende begriffliche Unterteilung der Rhizosphäre in Endorhizosphäre, Rhizoplane und Ectorhizosphäre statt (Lynch 1990). Die Endorhizosphäre beschreibt hierbei den Bereich innerhalb der Wurzeln, der von einigen Bakterien besiedelt wird (Gagné et al. 1987, McInroy et al. 1995, Gardner et al. 1982), aber hinsichtlich der mikrobiellen Zellzahl von untergeordneter Bedeutung ist. Als Rhizoplane wird die Oberfläche der Wurzel bezeichnet, die zum Teil eine dichte mikrobielle Besiedlung aufweist. Und die Ectorhizosphäre beschreibt schließlich den die Wurzeln direkt umgebenden Bereich. In der Regel handelt es sich um eine Zone von 1-5 mm, wobei für die Größe dieses Bereichs ausschließlich die Beeinflussung durch die Pflanze (z.B. durch Rhizodeposition) ausschlaggebend ist. So kann beispielsweise im Falle von mycorrhizierten Wurzeln ein beträchtlicher Abstand von den Wurzeln erreicht werden.

Das auffälligste Kennzeichen der Rhizosphäre ist eine erhöhte mikrobielle Besiedlungsdichte – der Rhizosphäreneffekt, der bereits vor 100 Jahren von Hiltner (Hiltner 1904) beschrieben wurde. Es können bis zu 100-fach höhere Zelldichten vorkommen, wobei der Eintrag von Kohlenstoffquellen durch die Rhizodeposition (Abgabe nieder- und hochmolekularer Verbindungen (Exsudate), Mucigele, abgestorbene Pflanzenzellen) im wesentlichen ursächlich für diesen Effekt ist (Anderson et al. 1993, Kuiper et al. 2004). Im Weiteren begünstigt die Rhizodeposition durch die Vielzahl verschiedener chemischer Strukturen (Hale et al. 1971), die so in die Rhizosphäre eingebracht werden, eine diverse und aktive mikrobielle Population, die als Summe ein hohes biochemisches Potential aufweist.

Die sich in der Rhizosphäre ausbildenden Bedingungen werden im Zusammenspiel zwischen Wurzel, Mikroorganismen und Bodenmatrix bestimmt. Hierbei können die Interaktionen von Rhizosphären-Mikroorganismen und Pflanze einen positiven, neutralen oder schädlichen Einfluß auf das Pflanzenwachstum haben. Für viele typische

Rhizosphärenbakterien sind beispielsweise pflanzenwachstumsfördernde Eigenschaften nachgewiesen worden. Kloepper (Kloepper et al. 1980) hat für diese Bakterien den Begriff "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (PGPR) geprägt, der u.a. *Pseudomonas*, *Agrobacterium* oder *Rhizobium* Arten umfaßt. Die wachstumsfördernde Wirkung kann hierbei zum Beispiel durch die Produktion von Phytohormonen (Auxine, Cytokinine, Gibberelline), der Erschließung von Makro- und Mikronährstoffen in pflanzenverfügbarer Form oder dem Schutz vor phytopathogenen Rhizosphärenmikroorganismen (z.B. Produktion von Antibiotika oder Siderophoren) erfolgen (Kloepper et al. 1980, Neilands & Leong 1986, Römheld & Marschner 1986, Lalonde et al. 1989, Höflich 2000).

### **1.2.1. Rhizodeposition**

Die Freisetzung organischer Verbindungen durch die Wurzeln ist grundlegend für die mikrobielle Rhizosphären-Biozönose. Einen wesentlichen Anteil der Rhizodeposition bilden die Wurzelexsudate. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um Aminosäuren, Zucker und organische Säuren, die überwiegend über die Wurzelspitzen abgegeben werden (Shimp et al. 1993, Anderson et al. 1993). Ferner sind Proteine, komplexe Kohlenhydrate, Alkohole, Vitamine, Hormone sowie phenolische Verbindungen (Anderson et al. 1993, Lynch & Whipps 1990, Hegde & Fletcher, 1996) in den Wurzelausscheidungen zu finden. Neben den Exsudaten tragen abgestorbene Wurzelzellen (Lysate, Lignine, Cellulosen etc.) und Mucigel, höhermolekulare organische Verbindungen, die in Form von Schleim an den Wurzelspitzen den Vegetationskegel schützen, zum Kohlenstoffeintrag in die Rhizosphäre bei (Walton et al. 1994). Die Zusammensetzung der Exsudate ist abhängig von der Pflanzenart, vom Pflanzenalter und von der Pflanzenversorgung (Shann & Boyle 1994). Als Größenordnung der Rhizodeposition werden für landwirtschaftliche Nutzpflanzen 10 bis 40% der photosynthetischen Produktion genannt (Helal & Sauerbeck 1989). Am Beispiel von Mais wurde gezeigt, daß fast 80% der Wurzelexsudate durch Rhizosphären-Mikroorganismen zu CO<sub>2</sub> umgesetzt wurden (Helal & Sauerbeck 1989), was den Einfluß auf die mikrobielle Rhizosphärenbiozönose verdeutlicht.

Hinsichtlich eines möglichen Abbaus von Xenobiotika in der Rhizosphäre bewirken die Exsudate oft eine Stimulation des Schadstoffabbaus (Yoshitomi & Shann 2001). Hierbei sind cometabolische Stoffumsätze (Hsu & Bartha 1979, Shann 1995, Crowley et al. 1996, Gilbert & Crowley 1997, Moormann et al. 2002) von Bedeutung.

Vor dem Hintergrund der Reinigung kommunaler Abwässer in sog. Pflanzenkläranlagen sind Arbeiten zur Charakterisierung der Exsudate bei Helophyten interessant (Seidel 1969,

Kaitzis 1970, Seidel 1971, Cardenas & Kickuth 1978), die sich mit einer möglichen bakteriziden Wirkung von Exsudaten beschäftigten. So konnte beispielsweise Kaitzis bei *Scirpus lacustris* bakterizid wirkende Benzenderivate nachweisen.

### **1.3. Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in überstauten Systemen – Bedeutung für die Schadstoffverwertung.**

Unter überstauten Bedingungen ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung in der Regel nur im Oberflächenbereich, in der Luft – Wasser/Boden Kontaktschicht gegeben, so daß die Pflanzen-Mikroorganismen Wechselbeziehung in der Rhizosphäre zusätzlich entscheidend durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff geprägt werden. Durch die geringe Diffusivität von Sauerstoff in Wasser führen sauerstoffzehrende Prozesse schnell zu anoxischen Bedingungen. Sowohl die ablaufenden mikrobiellen Stoffumsätze wie auch die sich ausbildende mikrobielle Struktur werden hierdurch beeinflusst. Neben der Beeinflussung der Rhizosphäre z.B. durch Exsudate ist so die Fähigkeit von Helophyten zur Abgabe von Sauerstoff in die Rhizosphäre von großer Bedeutung. Durch die Sauerstoffabgabe aus dem Aerenchym wird der aerobe Abbau organischer Verbindungen in einer häufig durch Sauerstoffmangel geprägten Umgebung ermöglicht (Brix 1994). So stehen aerobe und anaerobe Prozesse in direkter räumlicher Nähe dem Schadstoffabbau zur Verfügung, was zusätzlich zum Rhizosphärenereffekt den Vorteile solcher Systeme ausmacht (Walton et al. 1994, Schnoor et al. 1995).

#### **1.3.1. Sauerstoffeintrag in die Rhizosphäre durch Pflanzen**

In Anpassung an überstaute Bedingungen besitzen Helophyten ein Gastransportgewebe (Aerenchym), das die Sauerstoffversorgung der Wurzelzellen gewährleistet. Das Aerenchym entsteht aus der Lyse parenchymatischer Rindenzellen und kann bis zu 60% des Wurzelgewebes umfassen (Studer & Brändle 1984). Abbildung 1 zeigt den morphologischen Wurzelbau am Beispiel von *Carex gracilis*. Der Gastransport im Aerenchym erfolgt über konvektive Ströme und Diffusion, wobei für eine Sauerstoffabgabe in die Rhizosphäre eine Diffusion durch das Wurzelgewebe notwendig ist. Mit zunehmender Verkorkung der Wurzelrinde (siehe auch Abbildung 1) infolge der Wurzeldifferenzierung wird die Sauerstoffabgabe erschwert. Ein vergleichsweise hoher Gaseintrag ist deshalb für den Bereich an der Wurzelspitze beschrieben worden (Armstrong

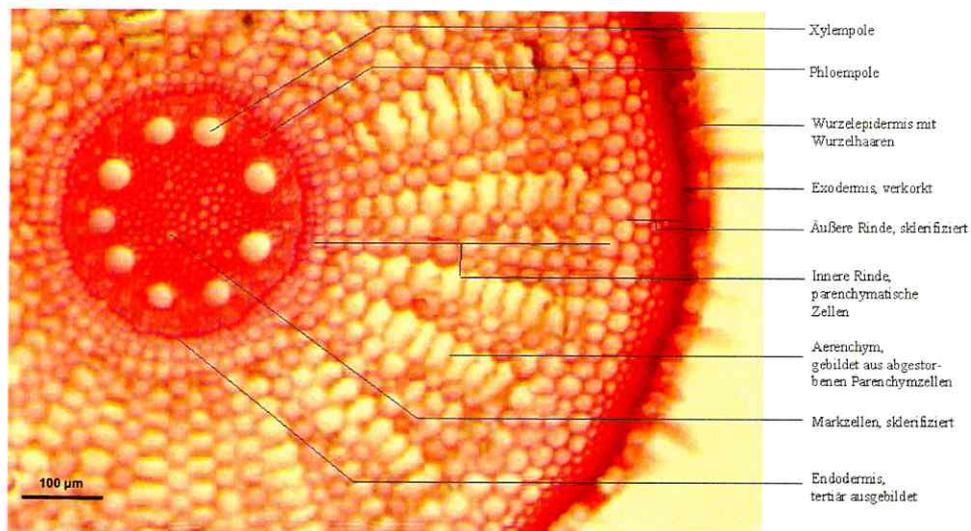


Abbildung 1: Wurzelquerschnitt von *Carex gracilis* ca. 3 cm von der Wurzelspitze entfernt. Angefärbt mit Safraninlösung.

et al. 1991, Armstrong 1979). Ein bedeutender Anteil am Gaseintrag kann auch beschädigten oder abgestorbenen Wurzeln zukommen. Hier ist die Möglichkeit des Gastransports über konvektive Ströme direkt bis in die Rhizosphäre gegeben. Entscheidend für die Geschwindigkeit des Gasaustausches sind im wesentlichen Temperatur- und Dampfdruckdifferenzen zwischen dem Pflanzeninneren und der umgebenden Luft, die Luftströmung über den Blättern als auch das Redoxpotential und der Sauerstoffgehalt in der Rhizosphäre (Brix 1994, Sorrel & Armstrong 1994). Durch diese Abhängigkeiten werden vergleichenden Untersuchungen und eine Kalkulation des in situ Sauerstoffeintrags in die Rhizosphäre schwierig. So führen Untersuchungen zur Sauerstofffreisetzung von Helophytenpezies in unterschiedlichen Versuchssystemen zu verschiedenen Werten (Stengel 1993). Für Phragmites sind beispielsweise Werte für die Sauerstoffabgabe von 0,02  $\text{g/m}^2\text{d}$  (Brix 1990) bis hin zu 12  $\text{g/m}^2\text{d}$  (Armstrong et al. 1990) veröffentlicht. Untersuchungen an *Juncus effusus* (Wießner et al. 2002) zeigten bei starker Abhängigkeit vom Redoxpotential höchste  $\text{O}_2$ -Freisetzungsraten bei einem  $Eh = -200$  mV mit 0,5 mg/h.

#### 1.4. Schadstoffentfernung durch pflanzliche Detoxifikationsmechanismen

Neben der anerkannten Funktion von Mikroorganismen hinsichtlich des Schadstoffabbaus in der Rhizosphäre und der Bedeutung der Pflanzen bei der Förderung dieser mikrobiellen Stoffumsetzungen, sind vielfältige Stoffumsetzungen auch direkt über pflanzliche Enzymsysteme möglich (Hathway 1989, Müller 1986, Harms 1992, McFarlane & Pflieger 1990, Newman et al. 1997, Thompson et al. 1998). Limitationen sind hier im wesentlichen durch die Pflanzenverfügbarkeit des Schadstoffes gegeben. Die im Boden häufig an Ton- oder Humusteilchen sorbierten Stoffe müssen in direkten Kontakt mit der Wurzeloberfläche kommen. Hier ist das Wurzelwachstum, die Durchwurzelung des Bodens, von entscheidender Bedeutung, so die Schadstoffe nicht mit dem Bodenwasser zur Wurzel hin bewegt werden. In der Regel werden kleine polare Verbindungen gut von der Pflanze aufgenommen, lipophile Verbindungen mit hohem Molekulargewicht hingegen kaum (Anderson et al. 1993). Als erster Schritt erfolgt zunächst eine Einlagerung in den Apoplasten der Wurzel, zumeist durch den Wassertransport infolge des Transpirationsstroms begünstigt. Begrenzt wird die freie Verteilung in den Interzellularräumen und den Zellwänden der Wurzel durch den Caspary-Streifen, der in der Endodermis einen apoplastischen Transport in Richtung Zentralzylinder verhindert. Hier ist für einen weiteren Transport die Aufnahme ins Zellinnere notwendig. Der Transport durch die Zellmembran erfolgt überwiegend stoffwechselabhängig durch aktive Transportprozesse, was ursächlich für die selektive Aufnahme von Stoffen ist. Nach einer Aufnahme ins Plasmalemma der Zellen erlauben neben der Plasmaströmung insbesondere die Gefäßbahnen eine schnelle Verteilung in der Pflanze.

Den Detoxifikationsmechanismen von Schadstoffen durch Pflanzen liegen häufig Transformationen der Ursprungsverbindung mit folgender Festlegung innerhalb der Pflanze zugrunde. Oft werden diese Prozesse in drei Phasen unterteilt dargestellt (Sandermann 1992, Schäffner et al. 2002). 1. Transformationen, d.h. Veränderungen in der chemischen Struktur beispielsweise durch Oxidationen über Peroxydasen oder Cytochrom P450 Monooxygenase, Reduktionen durch Dehydrogenasen oder Hydrolysereaktionen z.B. durch Esterasen. Hierbei sind für den oxidativen Schadstoffmetabolismus vor allen die Peroxidasen entscheidend (Stiborova & Anzenbacher 1991, Roy et al. 1992). Diesen enzymatischen Umwandlungen kann 2. eine Anlagerung beispielsweise an Glutathion, Glucose oder Malonat folgen. Enzymatisch werden diese Konjugationen durch die Aktivität von Glutathione-S-Transferase oder Glycosyltransferase katalysiert. Es entstehen so komplexe Verbindungen die meist eine geringe Toxizität aufweisen. 3. Parallel zu den enzymatischen

Reaktionen kann eine Festlegung innerhalb der Pflanze durch Transport in die Vakuolen oder Transport in den Apoplasten, wo eine Bindung an Lignin oder Cellulose möglich ist (Coleman 1997, Sandermann 1992), erfolgen.

Bei leicht flüchtigen Stoffen besteht im Weiteren die Möglichkeit der Entfernung des Schadstoffes durch Phytovolatilisation, d.h. es erfolgt ein Austrag der organischen Verbindungen in die Atmosphäre. In der Regel geschieht dieses über das Gastransportgewebe der Blätter (Nietch et al. 1999, Bederski 2000, Aitchison et al. 2000).

## **1.5. Literaturübersicht zu einem erhöhten Schadstoffabbau in bepflanzt Systemen**

### **1.5.1. Schadstoffabbau in Constructed Wetlands und natürlichen Feuchtgebieten**

Die Entwicklung von Konzepten zur Phytoremediation ist wesentlich durch Untersuchungen bei Pflanzenkläranlagen im Bereich der Abwasserreinigung und durch Untersuchungen im landwirtschaftlichen Bereich, vornehmlich zum Umsatz von Pestiziden im Boden, beschleunigt worden.

Zur Nutzung von Helophyten bei der Abwasserreinigung wurden erste umfangreiche Arbeiten in den 60iger und 70iger Jahren durchgeführt. Wegweisend waren hier die Arbeiten von Seidel, die sich mit Aspekten des Abbaus von Phenolen und der Schadstofftoleranz der Pflanzen (Seidel 1963, 1965, 1973, 1974) bis hin zu ersten mikrobiologischen Betrachtungen hinsichtlich einer bakteriziden Wirkung pflanzlicher Exsudate (Seidel 1969, 1971) befaßten. Die Rhizosphären- und Bodenmikrobiologie findet in den Arbeiten allerdings keine ausreichende Berücksichtigung. Das generelle Konzept der Abwasserreinigung durch solche Systeme wurde aber durch diese Untersuchungen stark aufgewertet und fand folgend zunehmend Verwendung bei der Klärung kommunaler als auch industrieller Abwässer (Thofern 1994). Im deutschsprachigen Raum sind unterschiedliche Begriffe für derartige Systeme in Verwendung, wobei insbesondere der gebräuchlichste Begriff "Pflanzenkläranlage" eine hinsichtlich des Schadstoffabbaus unzutreffende Gewichtung impliziert. Im weiteren sind u.a. Synonyme wie "Sumpfpflanzenkläranlage", "Wurzelaumanlage", "bewachsene Bodenfilter" und "hydrobotanische Kläranlage" gebräuchlich. Neutraler und besser beschreiben aber in diesem Fall die englischen Termini "Treatment Wetland" und "Constructed Wetland" derartige Systeme, wobei letzterer der international gebräuchlichste Begriff ist.

Beim Bau von Constructed Wetlands finden üblicherweise zwei Bautypen Verwendung bei ansonsten großer Bandbreite, was die Wahl der Pflanzen, des Substrates und des Betriebsregimes betrifft (z.B. Steuerung des Wasserstandes, Raumbelastung). Der eine Systemtyp besitzt eine freie, das Substrat überstauende Wasserfläche, wobei der Wasserstand durch die Toleranz der eingesetzten Pflanzen bestimmt wird und in der Regel im Bereich zwischen 10-50 cm liegt (Kadlec 2002). Dem anderen Bautyp fehlt eine freie Wasserfläche. Hier liegt ein wassergesättigtes Substratbett vor (z.B. Kies, Sand, Boden) was durchströmt wird. Da eine freie Wasser / Luft Grenzschicht fehlt ist der Sauerstoffeintrag geringer. Es finden horizontal oder vertikal durchströmte Anlagen Verwendung (Geller 1998, Kadlec 2002).

Beim Verbleib und der Umsetzung von Xenobiotika in Constructed Wetlands kommen verschiedene biotische und abiotische Mechanismen in Frage. Neben der biologischen Transformation oder Mineralisation des Schadstoffes (insbesondere durch Mikroorganismen), sind die Festlegung der Substanzen durch Anlagerung an kolloidale mineralische und organische Substanzen (z.B. Huminsäuren) (Knight et al. 1999), abiotischer Schadstoffabbau z.B. durch photochemische Reaktionen (Gao & Zepp 1998, Bachman & Patterson 1999) oder durch Wechselwirkungen mit Metallen (Eykholt & Davenport 1998) und der Austrag organischer Verbindungen in die Atmosphäre durch Volatilisation (Lohmann et al. 2000,) und Phytovolatilisation (Nietch et al. 1999, Bederski 2000) von Bedeutung. Hierbei ist nach Knight et al. (1999) die Reinigungsleistung von Constructed Wetlands im wesentlichen von der hydraulischen Beladung und der Schadstoffkonzentration abhängig und wird nur in geringerem Maße durch die Wahl der Pflanzen, der Wassertiefe und den hydraulischen Bedingungen in den Pflanzenbeeten bestimmt.

Bei der Reinigung kommunaler Abwässer sind Constructed Wetlands bereits seit einigen Jahren etabliert und finden vor allem dezentral als klein und kleinst Kläranlagen Verwendung. Geller (1998) nennt für Deutschland Mitte der 90iger Jahre ca. 100-200 Anlagen mit mehr als 50 EW und etwa 7000-10000 Anlagen mit weniger als 50 EW. Die Zahl der Veröffentlichungen aus diesem Bereich ist entsprechend groß und wird hier nicht weiter dargestellt. Überwiegend werden in diesen Arbeiten auch nur gängige Abwasserparameter wie BSB5, CSB, TOC, DOC und ggf. die Messung relevanter Schadstoffe im Zulauf und Ablauf beschrieben.

Im Unterschied hierzu liegt vergleichsweise wenig Literatur zur Behandlung industrieller oder Xenobiotika belasteter Abwässer in Constructed Wetlands vor. Im industriellen

Umfeld kommen solche Anlagen insbesondere bei Kohlenwasserstoff belasteten Wässern zum Einsatz. Einen Überblick über die Reinigungsleistung verschiedener Anlagen bei Abwässern der Ölindustrie gibt Knight et al. (1999). Neben der Klärung industrieller Abwässer bieten Constructed Wetlands viel versprechende Möglichkeiten im Rahmen von Sanierungskonzepten bei der Altlasten-Behandlung (Stottmeister et al. 1997a). In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von Machate & Kettrup (1998) interessant, die die Leistungsfähigkeit bei der Reinigung von PAK-kontaminiertem Grundwasser von einem ehemaligen Gaswerksgelände zeigen. Sie nennen bei einer Zulaufkonzentration von etwa 1300 µg/l PAK Ablaufwerte von 1-2 µg/l. Den Abbau von Atrazin untersuchten McKinlay & Kasperek (1999). In Abhängigkeit von der Bepflanzung (*Schoenoplectus lacustris*, *Typha latifolia*, *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis*) wurde die erzielte Abbaugeschwindigkeit betrachtet. Die Bedeutung der gewählten Pflanzenspezies trat mit zunehmender Betriebsdauer in den Hintergrund. Der Atrazin-Abbau wurde in Zusammenhang mit mikrobiellen Umsätzen in der Rhizosphäre diskutiert, bestätigende mikrobiologische Untersuchungen aber nicht beschrieben. Die Bedeutung der Bepflanzung beim Abbau von TNT untersuchten Best et al. (1999). Aus einer Anlage zur Reinigung TNT-belasteten Grundwassers wurde in Testansätzen die Mineralisierung von <sup>14</sup>C markierten TNT unter Hydroponik-Bedingungen mit Pflanzen und / oder Substrat (Sediment und Kies) untersucht. Bei allen Pflanzen-Ansätzen zeigte sich eine vollständige Entfernung von TNT aus dem Wasser. Unbepflanzte Ansätze hingegen zeigten nur eine sehr geringe Abbauleistung. Neben Arbeiten zur Leistungsfähigkeit von Constructed Wetlands beim Abbau industrieller Abwässer bzw. der Wasserreinigung im Rahmen von Sanierungskonzepten bei Altlasten gibt es einige Arbeiten, die sich mit Abbauuntersuchungen in natürlichen Feuchtgebieten beschäftigen.

So untersuchen Federle & Schwab (1989) vergleichend die Mineralisation von Tensiden in Systemen mit *Lemna minor* (Wasserlinse), *Typha latifolia* (Breitblättriger Rohrkolben) und nicht durchwurzelttem Teichsediment, die von einem zuvor unbelasteten und einem belasteten Standort stammen. Ohne nähere mikrobiologische Untersuchungen kommen sie über die beobachtete Abbauleistung zum Ergebnis, daß die Pflanze den entscheidenden Einfluß auf die mikrobielle Besiedlung an ihrer Oberfläche hat und nicht das Vorhandensein von Schadstoff als potentielle C-Quelle.

Bei anderen Arbeiten liegt der Fokus auf Abbauaktivitäten im Boden natürlicher Feuchtgebiete oder im Sediment von Flüssen und Seen. Lorah & Olsen (1999) beschrieben beispielsweise den vollständigen anaeroben Abbau von 1,1,2,2-Tetrachloroethan im

Sediment eines Süßwasser-Feuchtgebiets. Auf die Bedeutung des Bodentyps und die Zuführung anorganischer Nährstoffe z.B. durch Düngung verweisen Lin et al. (1999). Sie beschreiben einen erhöhten Abbau von Alkanen und Aromaten in einem Salzwiesen-Testsystem nach Zugabe von Düngemitteln. Der Bodentyp beeinflusst den Öl-Abbau, wobei generell anorganische Düngung neben einem verstärkten Pflanzenwachstum einen erhöhten Schadstoffabbau bewirkt. Zuvor hatte bereits Jackson et al. (1996) eine erhöhte Mineralisation von Erdöl in Testsystemen mit Boden aus einem Salzwasser-Feuchtgebiet nach Zugabe von anorganischen Stickstoff und Phosphat beschrieben. Bei in-situ-Studien ließ sich dieser Effekt aber nicht eindeutig bestätigen. Den Abbau von Dicamba und Metribuzin untersuchten Pavel et al. (1999) unter anaeroben Bedingungen in einem Testsystem mit Boden von Küsten-Feuchtgebieten unter Nitrat und nicht Nitrat reduzierenden Bedingungen. Es zeigte sich ein geringer und unvollständiger Abbau unter den gewählten Testbedingungen.

### **1.5.2. Schadstoffabbau in belasteten Böden**

Im landwirtschaftlichen Bereich sind erste wichtige Arbeiten zum Abbau von Pestiziden in der Rhizosphäre von Hsu & Bartha (1979) veröffentlicht worden. Hsu & Bartha untersuchten den Abbau von <sup>14</sup>C-markierten Diazon und Parathion in mit Bohnen bepflanzen Boden. Als Vergleich wurden steril gekeimte Pflanzen, wurzelfreier Boden und wurzelfreier Boden bei Zugabe einer künstlichen Wurzelexsudatlösung untersucht. Steril gekeimte Pflanzen zeigten einen deutlich geringeren Abbau, wohingegen Boden mit Exsudatlösung ähnliche Abbauleistungen wie normal bepflanzte Ansätze aufwies. Interpretiert wurde der erhöhte Abbau in der Rhizosphäre mit einem für den Abbau von Xenobiotika günstigen Milieu, wobei insbesondere ein cometabolischer Abbau der Insektizide diskutiert wurde. Einen positiven Zusammenhang zwischen Bepflanzung und beschleunigten Pestizidabbau wiesen auch Zhao et al. (2003) am Beispiel verschiedener Präriegräser für Atrazin und Metolachlor, Piutti et al. (2002) für Atrazin in der Rhizosphäre von Mais und Sun et al. (2004) für Aldicarb bei Bohnen und Mais nach.

Ein etwas differenzierteres Bild zeigten Boyle und Shann (1995) auf. Es wurde der Abbau von 2,4-DCP, 2,4-D, 2,4,5-T sowie Phenol im Rhizosphärenboden von Monocotyledonen, Dicotyledonen und Nichtrhizosphärenboden untersucht. Für 2,4-DCP und Phenol zeigte sich kein Unterschied bei allen drei Böden. Bei den schwerer abbaubaren Herbiziden 2,4-D und 2,4,5-T hingegen, fand eine schnellere Metabolisierung in monokotyledonen

Rhizosphärenboden statt als in dikotyledonen Boden. Nichtrhizosphärenboden zeigt hier schlechtere Werte.

Erste mikrobiologische Untersuchungen wurden mit isolierten Mischkulturen aus der Rhizosphäre durchgeführt. So bestimmten Sandmann & Loos (1984) die MPN für 2,4-D-Abbauer in der Rhizosphäre von Klee und Zuckerrohr im Vergleich zu unbepflanzten Böden. Deutlich höhere MPN's in bepflanzten Böden werden als Indiz für einen schnellen Herbizid-Abbau gesehen und in diesem Zusammenhang die Schutzwirkung der Rhizosphäre vor Herbiziden diskutiert. Den Abbau von Mecoprop durch Mischkulturen und Reinkulturen aus der Weizenrhizosphäre wiesen Lappin et al. (1985) nach. Anderson et al. (1994) beobachteten einen erhöhten Abbau von Atrazin, Metolachlor und Trifluralin in der Rhizosphäre Herbizid toleranter *Kochia* sp.. Einhergehend mit dem schnelleren Abbau in bepflanzten Ansätzen wurde bei Vergleich mit unbewachsenen Boden eine 10 fach höhere KBE in bewachsenen Boden nachgewiesen. Bei Belastung mit Atrazin beschreiben Costa et al. (2000) eine Zunahme bei fluoreszierenden Pseudomonaden, wobei sich im Vergleich zur unbepflanzten Kontrolle ein deutlich schnellerer Abbau zeigt. Detailliertere Betrachtungen zu Veränderungen in der mikrobiellen Struktur als Folge der Belastung mit Atrazin oder Phenanthren führten Fang et al. (2001) bei fünf verschiedenen Grasarten durch. Über Untersuchungen zu den Substratverwertungseigenschaften (BIOLOG) und Fettsäureanalyse zeigten sich Veränderungen in der mikrobiellen Struktur nach Schadstoffbelastung, wobei kein direkter Zusammenhang mit der Stärke der Veränderungen und der Abbauleistung aufgezeigt werden konnte.

Den positiven Ergebnissen hinsichtlich des Pestizidumsatzes in der Rhizosphäre folgten in den 90iger Jahren Veröffentlichungen zum Umsatz verschiedenster Schadstoffe in der Rhizosphäre. Die zielgerichtete Nutzung von Rhizosphärenprozessen im Sinne einer Sanierungsstrategie wurde hierbei erstmals von April und Sims (1990) für die Dekontamination PAK-belasteten Bodens beschrieben. Sie zeigten eine Steigerung des PAK-Abbaus nach Bepflanzung mit verschiedenen Prärie-Gräsern. Eine höhere Abbauaktivität in durchwurzelttem Boden wurde auch von Walton & Anderson (1990) und Knaebel & Vestal (1992) beobachtet. Walton und Anderson untersuchten den Umsatz von <sup>14</sup>C-markierten Trichlorethylen vergleichend für bepflanzten und unbepflanzten Boden anhand von vier unterschiedlichen Pflanzen (*Lespedeza cuneata*, *Pinus tadea*, *Solidago* sp. und *Glycine max.*) und in Abhängigkeit einer vorherigen Schadstoffexposition. Boden, der mit *Lespedeza cuneata*, *Pinus tadea* oder *Glycine max.* bepflanzt war, zeigte eine signifikant höhere <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion. Interessant ist hierbei, daß ein beträchtlicher Teil <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in der

Pflanze festgestellt wurde, bei positiver Korrelation zwischen aufgenommener Wassermenge und  $^{14}\text{C}$  in der Pflanze. Ob  $^{14}\text{CO}_2$  oder Schadstoff von der Pflanze aufgenommen wurde blieb im Rahmen der Untersuchungen aber unbeantwortet. Knaebel & Vestal (1992) betrachteten den Abbau von  $^{14}\text{C}$  markierten Tensiden (LAS, LAE, TAMC) in der Rhizosphäre von Mais und Soja, wobei sich im Vergleich zu unbepflanztem Boden ein schnellerer Abbau zeigte. Die Beobachtung eines erhöhten Schadstoffumsatzes in bepflanzttem Boden wurde durch weitere Untersuchungen zum Umsatz verschiedener Öle (Banks et al. 2003, Chaîneau et al. 2000), Teeröle (Rasmussen und Olsen 2004), einzelner Kohlenwasserstoffe (Gunther et al. 1996), aromatischer (Chen et al. 2003) und polyaromatischer Kohlenwasserstoffe (Muratova et al. 2003) bestätigt.

#### **1.6. Beeinflußbarkeit der mikrobiellen Rhizosphärenstruktur durch Schadstoffexposition. Bedeutung der Pflanze und des Bodens.**

Bei der Planung von Phytoremediation-Strategien ist eine Einschätzung des sich einstellenden mikrobiellen Abbaupotentials in der Rhizosphäre vielfach grundlegend. Von Interesse ist hierbei, ob es infolge der Schadstoffexposition zu Veränderungen in der mikrobiellen Struktur kommt, idealerweise in Richtung eines höheren Schadstoffumsatzes, oder, ob die mikrobielle Besiedlung im wesentlichen durch die Pflanze selbst oder die Bedingungen in der Bodenmatrix determiniert ist. In der Literatur gibt es nur wenige Arbeiten, die Aussagen zu diesem Aspekt erlauben. So untersuchten Sandmann & Loos (1984) die Zahl 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetat) verwertender Bakterien in der Rhizosphäre bei Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) und bei Klee (*Trifolium africanum* L.) nach Schadstoffexposition. Sie beobachteten pflanzenabhängig eine starke Zunahme an 2,4-D-Abbauern bei Zuckerrohr, während sich in der Rhizosphäre von Klee kaum Veränderungen zeigten. Auch Muratova et al. (2003) stellten pflanzenabhängig in PAK-belasteten Bodensystemen Unterschiede in der Besiedlungsdichte der Rhizosphäre und beim Schadstoffabbau fest. Nach Herbizid-Belastung beschrieben Abdel-Nasser et al. (1979) und Gavrilova et al. (1983) (beide zitiert in Anderson et al. 1993) für verschiedene landwirtschaftliche Kulturpflanzen eine zum Teil höhere mikrobielle Besiedlung, ohne daß aber eine Korrelation zu einer Herbizid-Verwertung gegeben wäre. Jüngere, detailliertere Untersuchungen von Fang et al. (2001) bestätigten diese Beobachtungen. Anhand von 5 Grasarten wurden Veränderungen in der mikrobiellen Struktur nach Belastung mit Atrazin und Phenanthren über BIOLOG und Fettsäureanalyse beschrieben, ohne daß ein direkter

Zusammenhang mit der jeweiligen Abbauleistung beobachtet werden konnte. Im Unterschied hierzu wurden bei Untersuchungen von Siciliano et al. (2003) und Allen & Wagner (2000) keine Veränderung in der mikrobiellen Struktur nach Schadstoffbelastung beobachtet. Beide Arbeiten beschrieben aber Änderungen in der physiologischen Aktivität. So untersuchte Siciliano et al. (2003) am Beispiel von Gras (*Festuca arundinacea*) und Klee (*Trifolium hirtum*) die Auswirkungen durch die Belastung mit PAK über molekularbiologische Untersuchungen. Es zeigten sich keine Veränderungen in der 16S-rDNA Zusammensetzung der Rhizosphärenbiozönose. Eine Ausrichtung auf den PAK-Abbau war aber über die Zunahme der Aktivität spezifischer katabolischer Gene zu beobachten. Allen und Wagner (2000) konnten in natürlichen Systemen mit Rohrkolben (*Typha latifolia*) und Sumpfbirse (*Eleocharis tuberculosa*) keine Veränderungen in der mikrobiellen Population durch Belastung mit Öl beobachten. Als Folge der Öl-Verschmutzung war aber die Esteraseaktivität am belasteten Standort geringer.

Insgesamt zeigt sich also kein einheitliches Bild hinsichtlich des Schadstoffeinflusses auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose. So Veränderungen beschrieben werden, müssen diese aber nicht mit einer Veränderung des Schadstoffabbaus einhergehen. Andere Arbeiten weisen eher auf die Pflanze oder die Bodenmatrix als wesentlichen Faktor hin, der die Zusammensetzung der mikrobiellen Rhizosphären-Biozönose bestimmt. So wird nach Arbeiten von Lemanceau et al. (1995) und Mavingui et al. (1992) die Bakterien-Biozönose in der Rhizosphäre und Endorhizosphäre entscheidend durch die Pflanze bestimmt. Verschiedene Arten zeigten bei gleichen Bedingungen eine unterschiedliche mikrobielle Besiedlung. Gleiches beschrieb auch Grayston et al. (1998) für verschiedene Pflanzenspezies, die bei definierten Bodenbedingungen eine unterschiedliche mikrobielle Diversität in der Rhizosphäre bedingten. Auch Miller et al. (1989) kam bei Untersuchungen zur Toleranz von Pflanzen gegen pflanzenpathogene Bakterien zu dem Ergebnis, daß die Zusammensetzung der Rhizosphäre zu einem großen Teil durch die Pflanze bestimmt wird. Eine pflanzencharakteristische Besiedlung wurde von Federle & Schwab (1989) in Zusammenhang mit dem Schadstoffabbau diskutiert. Über Abbaueversuche mit Tensiden kamen sie zu der Bewertung, daß die Pflanze (Wasserlinse und Breitblättriger Rohrkolben) maßgeblich die mikrobielle Biozönose beeinflusst und so das Abbaupotential durch die Pflanze bestimmt ist.

Den relativen Einfluß von Pflanzenspezies (Gras und Klee) und Bodentyp auf den Abbau von 2,4,5-T untersuchten Boyle & Shann (1998). Hierbei zeigte sich, daß der Bodentyp den größeren Einfluß auf das Abbauverhalten in bepflanzt als auch unbepflanzten Ansätzen

hatte. Unabhängig hiervon führte eine Bepflanzung aber generell zu einer Erhöhung des Schadstoffumsatzes. Zur gleichen Beurteilung kommen auch Bachmann & Kinzel (1992). Sie fanden bei Abwägung der Einflußgrößen Pflanze und Boden, daß in der Mehrzahl der Boden den größeren Einfluß auf die sich einstellende mikrobielle Struktur hatte.

Zusammenfassend zeigen bisherige Arbeiten eine wesentliche Bedeutung von Pflanze und je nach System ggf. Boden für die sich in der Rhizosphäre einstellende mikrobielle Struktur auf. Die Bedeutung des Schadstoffes für die mikrobielle Biozönose und resultierend der Abbauleistung wird hingegen unterschiedlich bewertet.

### **1.7. Zielstellung**

Bei der Entwicklung von Phytoremediation-Konzepten für kontaminierte Wässer oder staunasse Böden ist mit der Verwendung von Helophyten ein vielversprechender Ansatz gegeben. Die Fähigkeit unter anoxischen Bedingungen im Wurzelraum zu wachsen, als auch ein möglicher Sauerstoffeintrag in die Rhizosphäre, sind hierbei die entscheidenden Kriterien. Ein generelles Problem bei der Planung von Sanierungskonzepten stellt die Einschätzung der erwarteten Abbauleistung dar. Hierbei ist es von wesentlicher Bedeutung, inwieweit es zu einer Ausrichtung auf Schadstoffabbau in der Rhizosphäre kommt. Einschätzungen hierzu über Literaturdaten sind schwierig, da es nur wenige Arbeiten gibt, die sich detaillierter mit der Bedeutung der Einflußgrößen Pflanze, Boden bzw. Substrat und Schadstoff bei der sich ausbildenden mikrobiellen Struktur in der Rhizosphäre beschäftigen. Unter überstauten Bedingungen werden die Prozesse in der Rhizosphäre zusätzlich zur Exsudation organischer Verbindungen durch die Sauerstoffabgabe beeinflusst. Entsprechend größer ist der Einfluß der Pflanzen auf die sich im Wurzelraum ausbildende mikrobielle Struktur und somit die Bedeutung für Schadstoffumsetzungen in der Rhizosphäre. Für solche Sauerstoff limitierten Systeme liegen noch weniger Kenntnisse vor, anhand derer schadstoffbedingte Veränderungen in der mikrobiellen Biozönose eingeschätzt werden könnten.

An diesen Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Über Untersuchungen in Hydroponik- und überstauten Sandbett-Systemen sollen Aussagen zu schadstoffbedingten Veränderungen in der Rhizosphäre getroffen werden und so der Kenntnisstand zu den Wechselwirkungen in solchen Systemen verbessert werden. Um pflanzenspezifische Unterschiede aufzuzeigen, wird mit drei verschiedenen Pflanzenspezies (*Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea*) gearbeitet. Als Modellschadstoffe finden, vor dem Hintergrund der

Problematik phenolischer Kontaminationen bei vielen Altlasten, 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol in unterschiedlichen Konzentrationen Verwendung.

Die geplanten Arbeiten werden durch die nachfolgenden Punkte skizziert:

- Aussagen zur mikrobiellen Struktur in der Rhizosphäre im Vergleich zu nicht durch Pflanzen beeinflussten Systemen

Die Untersuchungen sollen Aufschluß liefern, in welcher Stärke der Rhizosphäreneffekt bei Helophyten in Hydroponik- und in Sandbett-Systemen ausgeprägt ist. Vergleichend zur mikrobiellen Besiedlung in unbepflanzten Systemen sollen über die Besiedlungsdichte und die Zusammensetzung erste Aussagen zur Bedeutung der Rhizosphären-Mikrobiologie für einen möglichen Schadstoffabbau getroffen werden.

- Schadstoff bedingte Veränderungen der Rhizosphären Biozönose

Entscheidend für einen guten Schadstoffabbau in der Rhizosphäre wäre, daß es direkt an der Wurzel zur Schadstoffverwertung käme und so die Vorteile, wie gute O<sub>2</sub>-Versorgung und ggf. Versorgung mit Cosubstraten, dem Schadstoffabbau zur Verfügung ständen. Im günstigsten Falle käme es in der durch Exsudatverwertung geprägten Rhizosphäre zu einer Ausrichtung auf Schadstoffabbau. Dem entgegen stehen die Ergebnisse einiger Arbeiten (z.B. Federle & Schwab), die eine starke Abhängigkeit der Rhizosphärenbiozönose von der Pflanze aufzeigen, d.h. die Abbauleistung und Abbaufähigkeit von Schadstoffen wird im wesentlichen durch die Pflanze bestimmt, wohingegen die Schadstoffgegenwart keinen Einfluß auf die mikrobielle Struktur hat. In diesem Falle wäre die Wahl der Pflanzenspezies für einen guten Schadstoffumsatz entscheidend.

Hier soll es über Betrachtungen zu Änderungen in der mikrobiellen Struktur nach Schadstoffexposition im Zusammenhang mit dem erzielten Schadstoffabbau und der Dauerhaftigkeit von Veränderungen zu einer Beschreibung abbaurelevanter Vorgänge in den Laborsystemen kommen.

- Bedeutung der Rhizosphäre bei der Schadstoffverwertung

Unter der Voraussetzung, daß es zum Schadstoffabbau in der Rhizosphäre kommt, sind die dort stattfindenden Abbauvorgänge in Relation zur mikrobiellen Struktur und Abbauleistung in nicht pflanzenbeeinflussten Systemen (z.B. wurzelferner Sand, Systeme ohne Pflanzen) zu setzen. Als Bezugsgröße bedarf es hierbei der Abschätzung der jeweiligen gesamten Oberfläche im System.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchspflanzen

Die Untersuchungen wurden mit den Helophyten *Carex gracilis* Curt. (Schlanke-Segge), *Phalaris arundinacea* L. (Rohrglanzgras) und *Juncus effusus* L. (Flutterbinse) durchgeführt.

#### 2.1.1. Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Hydroponikbedingungen im Freiland oder im Gewächshaus. Regelmäßig wurden Ableger von den Pflanzen durch Teilung des Rhizoms vereinzelt, wobei Pflanzen, die für Versuche vorgesehen waren, von der gleichen Ausgangspflanze gewonnen wurden. Die Weiterverwendung für Versuche erfolgte erst nach einer Ruhepause von 4-6 Wochen. Zur Pflanzenanzucht wurden die Pflanzen in einer Universal-Nährlösung (Hakaphos® spezial, Compo GmbH, Münster) kultiviert. Für kleinere Volumina nach Vereinzeln und bei Versuchsdurchführungen wurde eine Nährsalzlösung nach Hoagland (Epstein 1972) in etwas modifizierter Zusammensetzung verwendet.

#### Hakaphos Universal-Nährlösung

Es wurde mit einer Konzentration von 0,5 g/l in Leitungswasser gearbeitet.

Zusammensetzung von Hakaphos® spezial:

Gesamtstickstoff	16	%
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10,5	%
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5,5	%
Phosphat, wasserlöslich	8	%
Kaliumoxid, wasserlöslich	22	%
Magnesiumoxid, wasserlöslich	3	%
Spurenelemente		
B	0,03	%
Cu	0,006	%
Fe	0,15	%
Mn	0,05	%
Zn	0,01	%

### Hoagland Lösung

Es wurde eine 5fach konzentrierte Stammlösung hergestellt, die für eine Endkonzentration von 0,8fach entsprechend verdünnt wurde.

#### Grundmedium

KNO <sub>3</sub>	0,606 g/l
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,241 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,945 g/l
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,115 g/l

Zu 990 ml Hoagland Lösung werden 10 ml Spurenelementlösung hinzugefügt.

#### Spurenelementlösung

EDTA-Na	0,1 g/l
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,17 g/l
CaCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
CuCl <sub>2</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,02 g/l
NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,03 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
Na-Selenit	0,001 g/l

### **2.1.2. Bestimmung der Oberfläche bei Wurzeln und Sand**

Als Bezugsgröße für Daten zur mikrobiellen Besiedlung wurde die Oberfläche gewählt. Da die Wurzellänge und Morphologie der jeweiligen sproßbürtigen Wurzeln recht ähnlich ist, wurde die Gesamtwurzeloberfläche anhand von Durchschnittswerten abgeschätzt.

Andere Methoden, wie eine digitale Erfassung des Wurzelsystems (z.B. Scannen der Wurzeln nach Anfärbung mit Methylviolett), oder ältere optisch mathematische Methoden zur Bestimmung der Gesamtwurzellänge (Newman 1966), sind hier unzureichend, da die Wurzelhaare nicht ausreichend berücksichtigt werden.

Für jede Pflanzengattung (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus*) wurde die Oberfläche anhand von drei typischen Wurzeln bestimmt. Nach der Vermessung der Haupt- und Seitenwurzeln wurden die Wurzeln in 1 cm lange Stücke zerschnitten und

mikroskopisch die Anzahl an Wurzelhaaren abgeschätzt. Dickere Wurzelabschnitte wurden zusätzlich durch Längsschnitte zerteilt. Zur Oberflächenberechnung wurde bei den Wurzelhaaren mit Durchschnittswerten für Länge und Durchmesser gearbeitet. Aus den Ergebnissen wurde für jede Pflanzengattung die durchschnittliche Oberfläche pro cm Wurzel berechnet und anhand dieses Wertes die Gesamtwurzeloberfläche einer Pflanze, je nach Anzahl und Länge der Wurzeln, abgeschätzt.

Bei bepflanzten Sandbettsystemen wurde zusätzlich die Gesamtoberfläche des Sands bestimmt. Hierzu wurde der verwendete, fraktionierte Sand bei 105°C über Nacht getrocknet, 100 mg abgewogen, die Sandkörner gezählt und mit Hilfe einer Stereolupe die durchschnittliche Partikelgröße abgeschätzt. Vereinfachend wurden zur Berechnung der Oberfläche die Sandkörner als Kugeln angenommen. Da die Sandpartikel im Sinne der mikrobiellen Zugänglichkeit bzw. Besiedelbarkeit unporös sind, beschreibt die angenommene Kugelform die gesamte zur Verfügung stehende Oberfläche sehr gut.

### **2.1.3. Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse von Pflanzen**

Bei Pflanzen aus Sandbettsystemen wurde an Wurzeln anhaftender Sand zuvor durch Eintauchen in Wasser entfernt. Zum Abtrocknen der Wurzeln wurde das Wasser durch mäßiges Schütteln weitestgehend abgeschüttelt und folgend die Wurzeln vorsichtig dreimal mit jeweils frischem Fließpapier abgetrocknet. Anschließend wurden die Pflanzen gewogen. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden die Pflanzen kleingeschnitten und bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

### **2.1.4. Färbung pflanzlichen Gewebes**

Zur Beobachtung des zellulären Differenzierungszustandes der Wurzeln wurden Quer- und Längsschnitte angefertigt. Für möglichst dünne Schnitte war es hierbei hilfreich, das Wurzelstück in ein eingeschlitztes Styroporstück zu betten und die Wurzel zusammen mit dem Styropor zu schneiden. Die Quer- oder Längsschnitte wurden in etwas Wasser auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Um die zellulären Strukturen unter dem Mikroskop deutlicher sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Safraninlösung gefärbt. Verwendung fand hier Safraninlösung zur Gram-Färbung (Merck, Gram-color, 2,4g/l), die zwar niedriger konzentriert war als bei Pflanzenpräparaten üblich (i.d.R. 20 g/l), aber eine ausreichende Anfärbung sklerifizierter Zellwände zeigte.

## 2.2. Untersuchungssysteme

Alle Versuche wurden, so nicht anders beschrieben, unter Laborbedingungen bei zusätzlicher Beleuchtung mit einem Licht/Dunkel-Verhältnis von 14/10 Stunden und einer Beleuchtungsstärke von ca.  $80 \mu\text{mol} / \text{s} \cdot \text{m}^2$  durchgeführt.

Versuche zu schadstoffbedingten Beeinflussungen der Pflanzen sowie ein Teil der Versuche zum Schadstoffabbau wurden in abgedunkelten Glasgefäßen durchgeführt. In der Regel wurden 500 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Die Versuchsbedingungen im Einzelnen sind im Ergebnisteil dargestellt.

### 2.2.1. Durchflußsysteme – 2,6-Dimethylphenol Versuche

#### Reaktor für Hydroponikversuche

Versuche unter Hydroponikbedingungen wurden in einem geschwärzten Glasreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 750 ml durchgeführt (Abbildung 2). Mit Hilfe einer Kolbenpumpe wurde Nährlösung (0,4 x Hoagland) und 2,6-Dimethylphenol (50 mg/l) zugeführt. Wegen der eingeschränkten Regelungsmöglichkeit der Kolbenpumpe im unteren Dosierbereich erfolgte die Zuführung von Nährlösung und Substratlösung bei Durchflußge-

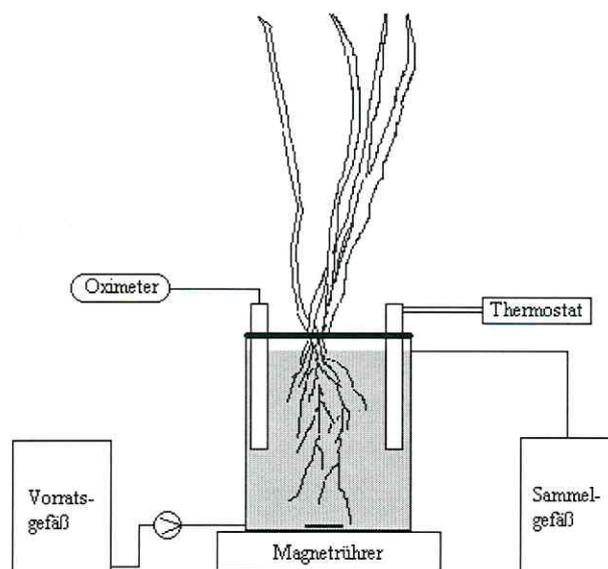


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung bei 2,6-Dimethylphenol belasteten Hydroponiksystemen.

schwindigkeiten unter 50 ml/h diskontinuierlich über Zeitschaltuhrregelung. Die Durchmischung erfolgte mittels Magnetrührer. Über einen Kühlfinger wurde eine konstante Temperatur von 20°C gewährleistet. Der Sauerstoffgehalt wurde per Oximeter der Firma WTW (OXI 196, WTW GmbH, Weilheim) bestimmt.

#### Festbettreaktoren

Für Untersuchungen im Festbett fand der gleiche Glasreaktorentyp Verwendung, wie auch bei den Hydroponikuntersuchungen, wobei aber als Bodenplatte eine poröse Glassinterplatte eingefügt wurde. Als Festbett wurde Sand mit einer Korngröße von 200-630µm eingesetzt, der zuvor gewaschen und anschließend bei 150°C getrocknet wurde. Eine Beeinflussung des Systems beispielsweise durch Einbringen von Nährstoffen oder durch eine bereits vorhandene mikrobielle Besiedlung des Sandes sollte so ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden 720 g Sand als Festbettmaterial für den Reaktor verwendet, was in etwa einer Gesamtoberfläche von 4,2 m<sup>2</sup> entsprach. Das Flüssigkeitsvolumen (Zwischenkornvolumen) des Reaktorfestbettes betrug ca. 200 ml. Die Substrat- bzw. Nährsalzlösung (s.o.) wurde mittels einer Taumelkolbenpumpe oberhalb des Festbettes zugeführt und das Festbett vertikal nach unten durchströmt. Das Flüssigkeitsniveau wurde über eine Niveauregulierung außerhalb des Festbettes reguliert.

#### **2.2.2. Durchflußsysteme – 4-Nitrophenol Versuche**

Jeder Ansatz bestand aus einem Kunststoffversuchsgefäß mit je 6 Pflanzen (Abbildung 3). Für die Versuche im Sandbett fand klassierter, gewaschener und bei 150°C getrockneter Sand mit einem Durchmesser von 400 – 630 µm Verwendung. Der Sand hatte eine äußere Oberfläche von ca. 0,0052 m<sup>2</sup>/g, was bei der eingesetzten Sandmenge einer Gesamtoberfläche von ca. 29,5 m<sup>2</sup> entsprach. Die Schadstoffmineralsalzlösung wurde diskontinuierlich (18 mal pro Tag je 15 min) bei einem Volumenstrom von 710 ml/d zudosiert. Um den mikrobiellen NP-Abbau vor der Applikation zu minimieren, wurden Schadstoff- und Mineralsalzlösung getrennt angesetzt und erst kurz vor der Zudosierung über eine Peristaltikpumpe zusammengeführt. In die Gefäße für die Sandansätze wurden durchlöchernte, mit Gaze umwickelte Kunststoffröhrchen eingebracht, um den Sauerstoffgehalt im Medium bestimmen zu können. Das Flüssigkeitsvolumen (Zwischenkornvolumen) des Reaktorfestbettes betrug 1,3 Liter, das der Hydroponikansätze 3,2 Liter.

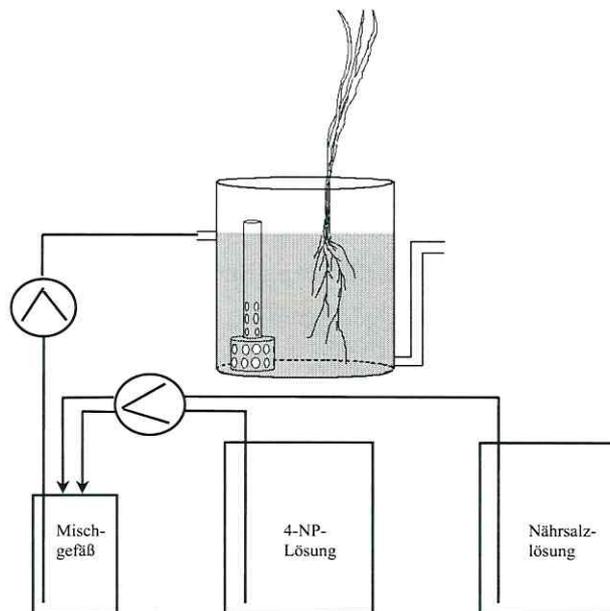


Abbildung 3: Schema zum Versuchsaufbau bei 4-Nitrophenol belasteten Systemen.

## 2.3. Schadstoffanalytik

### 2.3.1. Photometrische Methoden

Die schnelle, regelmäßige Bestimmung der DMP- bzw. NP- Konzentration erfolgte photometrisch per UV/VIS Spektralphotometer (UV4, ATI Unicam Ltd., England). Bei bepflanzt Systemen wurde vor der Probenahme das Flüssigkeitsvolumen mit Wasser auf das Ausgangsniveau gebracht. Die Proben wurden für 5 min. bei  $9000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand gegen eine Probe eines nicht Schadstoff exponierten Kontrollansatzes bzw. gegen destilliertes Wasser gemessen. Bei 4-Nitrophenol-Proben wurde vor der Messung ein pH-Wert von 11 durch Zugabe von NaOH eingestellt. 2,6-Dimethylphenol wurde bei 269,8 nm und 4-Nitrophenol bei 398 nm bestimmt.

### 2.3.2. High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die Proben wurden vor der Messung durch einen 0,22 µm Polycarbonatfilter filtriert. Die Messungen wurden mit einem Beckmann System und einem Detektor von Shimadzu (RF-551 Spectrofluorometric Detector) durchgeführt. Als stationäre Phase fand für die Bestimmung von 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol eine reversed-phase-Säule mit chemisch gebundenen Octadecylsilan (ODS) Verwendung. Die Kalibrierung erfolgte für beide Substanzen bis zu einer Konzentration von 10 mg/l. Proben mit vermutlich höherer Konzentration wurden vor der Bestimmung entsprechend verdünnt.

#### 2,6-Dimethylphenol

Säule: Beckmann ODS, dp5, 4,6mm x 15 cm

Mobile Phase: Wasser / Methanol 50:50, isokratisch

Fluß 1 ml/min, Temperatur 20°C, Druck ca. 2000 psi

Injektionsvolumen 20 µl

Detektion bei 220 nm

Retentionszeit: 11,17 min

#### 4-Nitrophenol

Säule: Beckmann ODS, dp5, 4,6mm x 15 cm

Mobile Phase: Methanol / Wasser / Essigsäure (700:300:1)

Fluß 1 ml/min, Temperatur 20°C, Druck ca. 2000 psi

Injektionsvolumen 20µl

Detektion bei 254 nm

Retentionszeit: 2,75 min

## 2.4. Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1. Färbung und Mikroskopie von Wurzel- und Sandpräparaten

Zur mikroskopischen Untersuchung der mikrobiellen Besiedlung wurden Präparate verschiedener Wurzelbereiche hergestellt. Bei sehr starker bakterieller Besiedlung war die Betrachtung im Phasenkontrast oft ausreichend. Sonst wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) oder

SYTO 9 (MOLECULAR PROBES, Leiden, Niederlande) untersucht. Bei dicken Wurzeln wurde der Rindenbereich durch einen vorsichtigen Längsschnitt abgetrennt und auf einen Objektträger mit etwas Wasser gebracht. Dünne Wurzeln konnten ohne Längsschnitt direkt aufgebracht werden. DAPI Lösung (5 µg/ml) bzw. SYTO 9 Lösung (1,5 µl der 1,67mM SYTO9 Stammlösung pro ml) wurden mit Hilfe von Filterpapier unter das Deckglas gespült. DAPI wurde nach 8 min durch Nachspülen mit Wasser wieder entfernt. Sandproben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Volumen von 1 ml physiologischer NaCl unter Zugabe von 10 µl DAPI Lösung (1 mg/ml) bzw. 1,5 µl SYTO 9 für 8 min bzw. 3 min gefärbt. Mikroskopiert wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss (Zeiss, Oberkochen), bei 100-, 400- und 1000facher Vergrößerung. Für DAPI wurde der Filtersatz 01 und für SYTO 9 der Filtersatz 09 von Zeiss eingesetzt. Ergänzend wurden Aufnahmen mit einem Konfokalen Laser Scannig Mikroskop (CLSM) der Sektion Expositionsforschung und Epidemiologie des UFZ Leipzig durchgeführt.

#### **2.4.2. Visualisierung physiologisch aktiver Bereiche an Wurzel- und Sandoberflächen**

Als Indikatoren oxidativer, mit Elektronenabgabe verbundener Stoffumsätze, bieten Tetrazoliumsalze eine gute Möglichkeit, metabolisch aktive Bereiche z.B. an der Wurzel oder Sandoberfläche sichtbar zu machen. Tetrazoliumsalze dienen hierbei als Elektronenakzeptoren, die bei Elektronenaufnahme zu den entsprechenden Formazanen reduziert werden. Zur Untersuchung von Wurzeln oder Sand wurden diese in tryptischen Soja-Agar, dem Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, Sigma) zugesetzt war, eingebettet. Hierzu wurden zu 30 ml autoklavierten und auf ca. 40°C temperierten Soja-Agar (40g/l) 200 mg TTC gegeben. Etwa die Hälfte der Agarmenge wurde dann in eine Petrischale gegossen. Nach dem Gelieren wurden die Wurzel- oder Sandproben auf der Agarschicht platziert und mit der restlichen Agarmenge übergossen. Die Platten wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und täglich auf eine Farbstoffbildung hin überprüft. Bereiche, in denen es zu einer Reduktion des TTC gekommen ist, werden durch eine intensive Rotfärbung sichtbar.

### 2.4.3. Gewinnung von Bakterien von der Wurzel- oder Sandoberfläche

Zur Bestimmung der GZZ oder KBE ist eine möglichst vollständige Ablösung Oberflächen adhärierter Bakterien notwendig. Gute Ergebnisse wurden durch abwechselnde Ultraschallbehandlung und starkes Schütteln erzielt. Es zeigte sich so auch bei Wurzelstücken mit vielen Seitenwurzeln und dichter mikrobieller Besiedlung eine gute Ablöserate. In Vorversuchen wurde überprüft, inwieweit es durch die Ultraschallbehandlung zu einer Beeinträchtigung der Mikroorganismen kommt. Verwendet wurde ein Ultraschallprozessor (Dr. Hielscher GmbH, Stahnsdorf) mit einer Sonotrode (2 mm Ø, max. Amplitude 260 µm) mit sehr hoher Energiedichte (600 W/cm<sup>2</sup>) und entsprechend hoher Kavitationsintensität. Beste Resultate wurden bei 20 % der maximalen Amplitude erzielt.

Wurzeln wurden in der Regel in einer Länge von 8 cm von der Pflanze abgetrennt und im weiteren unter sterilen Bedingungen behandelt.

Bei den Versuchen zur mikrobiellen Besiedlungsstruktur DMP belasteter Systeme wurden Bakterien von je 2 Wurzeln pro Pflanze gewonnen. Die Wurzeln wurden in kleine Stücke geschnitten, jeweils in ein 2 ml Eppendorftube mit 1,5 ml 0,1% Na-Pyrophosphatlösung (sterilfiltriert) überführt und 1 min. bei Amplitude 20% und Cycle 0,5 ultraschallbehandelt. Im Anschluß wurden die Wurzelstücke mit einer Pinzette in ein weiteres mit 1,5 ml 0,1% Na-Pyrophosphatlösung gefülltes Reaktionsgefäß gebracht und 1 min stark geschüttelt (Vortex). Ultraschall- und Vortexbehandlung wurden in jeweils neuen Reaktionsgefäßen 2 × wiederholt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend bei 11000 × g 3 min zentrifugiert, die Pellets vereinigt und mit physiologischer NaCl-Lösung auf insgesamt 1,5 ml gebracht.

Bei den Untersuchungen Nitrophenol belasteter Systeme wurden von den 6 Pflanzen pro System jeweils 4 Wurzeln pro Pflanze als Ausgangsmaterial verwendet, insgesamt also eine Gesamtwurzellänge von 192 cm pro System. Die Wurzeln wurden auf zwei 50 ml Röhrchen mit je 45 ml 0,1% Na-Pyrophosphatlösung aufgeteilt und die Bakterien durch 6 × abwechselnd Ultraschall und starkes Schütteln abgelöst. Im Anschluß wurden die Wurzeln entfernt und die Bakterien durch 5minütige Zentrifugation bei 9000 g pelletiert. Sandproben wurden in 10 ml Röhrchen mit 3 ml 0,1% Na-Pyrophosphatlösung überschichtet, ebenfalls 6 × abwechselnd mit Ultraschall und starkem Schütteln behandelt, wobei nach jedem Durchgang die überstehende Bakteriensuspension entfernt und durch neue 0,1% Na-Pyrophosphatlösung ersetzt wurde. Die Bakterienpellets von den Wurzeln wurden für jedes System in 16 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert, Sandproben in jeweils 6 ml. Vom Sand und den Wurzeln wurde im Anschluß das Trockengewicht bestimmt.

#### **2.4.4. Nitrophenolverwertung durch Suspensionen abgelöster Bakterien**

Zur Bestimmung der 4-Nitrophenol-Verwertungsaktivität von Bakteriensuspensionen, die zuvor von Wurzeln oder Sand gewonnen wurden, sind Versuche mit kleinen Mengen des Probematerials in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt worden. Über die Dauer bis zum einsetzenden 4-NP-Abbau können vergleichend Aussagen zur Aktivität der Nitrophenol-Verwertung am jeweiligen Probenahmeort getroffen werden.

Nährsalzstammlösung Hakaphos 2 g/l

NP Stammlösung 40 mg/l

Reaktionsansatz:

250 µl Bakteriensuspension von den Wurzeln bzw. 125 µl Bakteriensuspension vom Sand wurde mit sterilem Leitungswasser auf 500 µl aufgefüllt.

+ 250 µl Nährsalzstammlösung

+ 250 µl NP Stammlösung

Der Reaktionsansatz wurde in 2 ml Eppendorftubes bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Zur Bestimmung der NP-Konzentration wurden 50 µl entnommen, 5 µl 1 M NaOH hinzugefügt und die Probe photometrisch bei 398 nm in einer Mikroküvette vermessen. Von jeder Bakteriensuspension wurden parallel 4 Ansätze bestimmt. Die Probenahme wurde im Bereich des einsetzenden NP-Abbaus stündlich vorgenommen. Aus dem jeweiligen Kurvenverlauf erfolgte die Bestimmung der Zeitdauer bis zum beginnenden Abbau. Als Wert wurde die Zeit genommen, bei der sich mit einsetzendem Abbau die Ausgangskonzentration um 10% verringert hatte.

#### **2.4.5. Gesamtzellzahlbestimmung nach Anfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Auszählung nach Färbung der Bakterien. Grundlage ist die Bindung von DAPI an die DNA, hier insbesondere an AT-reiche Regionen (Porter und Feig 1980). Bei einer Anregung von 365 nm wird Licht einer Wellenlänge von 418 nm emittiert.

Es wurden 1 ml Bakterienprobe in passender Verdünnung (i.d.R. 50 µl Bakteriensuspension + 950 µl Wasser) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl DAPI-Lösung (1mg/ml H<sub>2</sub>O)

versetzt und 15 min bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Hilfe eines Vakuumfiltrationsgeräts (Schleicher & Schüll, Dassel) durch ein Nucleopore PC Filter (0,22 µm Porendurchmesser; 25 mm Ø, zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz dunkel eingefärbt) filtriert. Das Filter wurde auf einem Objektträger in Immersionsöl eingebettet, mit einem Deckglas abgedeckt und überflüssiges Öl vorsichtig mit Filterpapier abgedrückt. Mikroskopiert und ausgezählt wurden die blau fluoreszierenden Zellen mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Filtersatz 01) bei 1000facher Vergrößerung mit Hilfe eines Okularzählrasters. In Abhängigkeit von der Zellverteilung auf dem Filter wurden 20-50 Zählungen durchgeführt. Die Gesamtzellzahl (GZZ) ergibt sich aus dem Verdünnungsfaktor und dem Verhältnis effektive Filterfläche zu Okularrasterfläche.

$$\begin{array}{l} \text{Effektive Filterfläche:} \\ \text{Okularrasterfläche bei 100er Objektiv:} \end{array} \quad \begin{array}{l} 346 \text{ mm}^2 \\ 0,01 \text{ mm}^2 \end{array} = 34600$$

Somit ergibt sich für die Berechnung der GZZ:

$$\text{GZZ / ml} = \frac{34600 \times n \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{eingesetztes Volumen}}$$

n = Mittelwert der Zellzählungen

#### **2.4.6. Quantitative Bestimmung von Mikroorganismen über die KBE (Kolonie bildende Einheiten)**

Aerobe und fakultativ anaerobe heterotrophe Mikroorganismen wurden durch Kultivierung auf verschiedenen Nähragarplatten (R<sub>2</sub>A-Agar, Pseudomonas-Agar-F, DMP-Agar, NP-Agar, Malz-Agar) über Verdünnungsausstriche quantifiziert. Von der zu bestimmenden Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer NaCl-Lösung bis 10<sup>-7</sup> angelegt und von 4 Verdünnungsstufen, die um den Bereich der vermuteten KBE lagen, jeweils 100 µl der verdünnten Bakteriensuspension in 3 Parallelansätzen ausplattiert. Die beimpften Platten wurden bei 20 °C im Dunkeln inkubiert.

- R<sub>2</sub>A-Agar, ein nährstoffarmer komplexer Nährboden, und Pseudomonas-Agar-F, ein Agar zur Kultivierung fluoreszierender Pseudomonaden bei gleichzeitiger Hemmung

der Pyocyaninbildung durch *Pseudomonas aeruginosa*, wurden als Fertigmedien von DIFCO (DIFCO Laboratories GmbH, Augsburg) bezogen.

▪ DMP-Agar

DMP 2 mM	244 mg
20 × M9 Lösung	50 ml
Spurenelemente Lösung	2,5 ml
Bidest	950 ml

Die Lösung wurde ohne 2,6-Dimethylphenol autoklaviert, auf ca. 50°C abgekühlt und dann 2,6-Dimethylphenol hinzugegeben. Spurenelemente siehe unter 2.1.1..

M9 Nährsalzlösung:		20 ×
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0 g	140 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g	60 g
NaCl	0,5 g	10 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g	20 g
Bidest	1 l	1 l

▪ NP-Agar

4-Nitrophenol	40 mg
20 × M9 Lösung	50 ml
Spurenelemente Lösung	2,5 ml
Bidest	950 ml

Die Lösung wurde ohne 4-Nitrophenol autoklaviert, auf ca. 50°C abgekühlt und dann 4-Nitrophenol hinzugegeben.

▪ Malzagar

Malzextrakt	30 g
Pepton	3 g
Agar	15 g
Bidest	1000 ml

#### 2.4.7. Isolate mit hoher Abundanz

Zur Erfassung von Bakterien mit hoher Abundanz im System wurden Verdünnungsausstriche auf R2A-Agar oder selektiven DMP- oder NP-Agar angelegt.

Isolate wurden aus der höchsten Verdünnungsstufe entnommen, bei der sich auf den Platten noch zwischen 90-130 Kolonien befanden. Hiervon wurden in der Regel 30 Isolate pro Ansatz willkürlich ausgewählt und durch mehrfaches Überimpfen als Reinkultur gewonnen. Zur Stammhaltung wurden die Bakterienstämme auf R2A oder selektiven Agarplatten bei 4°C aufbewahrt und alle 4-8 Wochen auf neue Agarplatten als Verdünnungsausstrich überimpft.

## **2.4.8. Charakterisierung und Identifizierung bakterieller Isolate**

### **2.4.8.1. Morphologische Beschreibung**

Die Isolate wurden anhand ihrer Kolonieeigenschaften (Farbe, optische Struktur, Konsistenz, Umriß, Profil) sowie mikroskopisch nach ihrer Zellform beschrieben. Zur Bestimmung wurden die Isolate auf unselektiven R2A-Agar ausgestrichen und i.d.R. 1 Woche nach Koloniebildung untersucht.

### **2.4.8.2. Färbung nach Gram**

Die Methode basiert auf der Färbung von Bakterien mit Trimethylmethan-Farbstoffen (hier Kristallviolett), die durch Behandlung mit Jodlösungen in einen wasserunlöslichen Farblack überführt werden. Gram-positive Bakterien halten diesen Farbstoffkomplex bei anschließender Behandlung mit Ethanol zurück, während Gram-negative Bakterien entfärbt werden.

- Hitze-fixierter Bakterienausstrich
- 2 Minuten Färben mit Kristallviolett
- Spülen mit Wasser
- Objektträger 3 Minuten mit Lugolscher-Lösung überschichten
- Spülen mit Wasser
- Spülen mit 96% Ethanol
- Spülen mit Wasser
- Gegenfärben mit Safranin für 1 Minute

### **2.4.8.3. Aminopeptidase Test**

Bei nicht eindeutigen Resultaten bei der Bestimmung nach Gram wurden die Isolate ergänzend hinsichtlich ihrer L-Alanin-Aminopeptidase-Aktivität untersucht. Eine relevante

Aktivität des in der Zellhülle lokalisierten Enzyms zeigen nur Gram-negative Bakterien. Die Bestimmung erfolgte mit dem Fertigtestsystem Bactident® Aminopeptidase der Firma Merck (Merck, Darmstadt) gemäß den Herstellerangaben.

#### **2.4.8.4. Cytochrom-Oxidase Test**

Zur weiteren Beschreibung der bakteriellen Isolate wurde das Vorhandensein aktiver Cytochromoxidasen in der Atmungskette der Mikroorganismen mit dem Testsystem Bactident® Oxidase (Merck, Darmstadt) nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **2.4.8.5. Bakterien Differenzierung und Identifizierung mit dem BIOLOG®-System**

Biolog MicroPlates (BIOLOG Inc., Hayward California, USA) sind Mikrotiterplatten mit 96 Wells, die mit 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen befüllt sind, zur Typisierung, Differenzierung und Identifizierung von bakteriellen Reinkulturen anhand ihres Substrat-Verwertungsspektrums ("Metabolic Fingerprint") (Bochner & Savageau 1977). Der Nachweis der Substratverwertung erfolgt über einen Tetratzoliumfarbstoff, der bei Stoffwechselaktivität von farblos nach blauviolett umschlägt. Die Färbung in den Wells wird in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Identifizierung erfolgt dann über die MicroLog™ Software von Biolog durch Vergleich der Daten mit denen in entsprechenden Datenbanken.

Das Biolog-System kann zur Identifizierung von Human-pathogenen, Tier-pathogenen und Pflanzen-pathogenen Mikroorganismen sowie einer Vielzahl von Umweltisolaten herangezogen werden. Gegenwärtig stehen 4 verschiedene Biolog MicoPlates zur Verfügung. Hier fanden GN-Platten für Gram-negative aerobe Bakterien und GP-Platten für Gram-positive aerobe Bakterien Verwendung.

Zu identifizierende Isolate wurden in steriler physiologischer NaCl-Lösung suspendiert, wobei für Gram-negative Isolate eine optische Dichte von 0,18 – 0,22 und für Gram-positive Isolate eine Dichte von 0,15 – 0,18 (Wellenlänge 590 nm, Schichtdicke 1 cm) eingestellt wurde. Jeweils 150 µl der Suspension wurden in die Wells der BIOLOG-Platten pipettiert, die Platten bei 28 – 35°C für 4 – 24 h inkubiert und dann ausgewertet.

#### **2.4.8.6. Identifizierung von Bakterien mit dem API-System**

Beim API-System (API = Analytical Profil Index, BIOMÉRIEUX,) werden Isolate anhand eines Spektrums physiologischer Tests charakterisiert und ggf. identifiziert. Die Tests werden in vorgefertigten, miniaturisierten Reaktionsgefäßen, die die entsprechenden Substrate und Reagenzien für die jeweiligen Tests enthalten, durchgeführt. Nach Beimpfen mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension werden die biochemischen Reaktionen anhand von Farbumschlägen entweder spontan oder nach Zugabe von Mediatoren abgelesen. Verwendet wurden API-20-NE Streifen für Non-Enterobacteriaceen, Oxidase positive und/oder Glucose nicht fermentativ verwertende Bakterien, und API-Staph zur Identifizierung von Staphylokokken und Mikrokokken. Die Tests wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.4.8.7. Analyse membrangebundener Fettsäuren**

Grundlage ist die Methode nach Sasser (1990). Hiernach werden Bakterien nach Kultivierung unter standardisierten Bedingungen, Extraktion der Fettsäuren und Überführung in Fettsäuremethylester anhand des durch Gaschromatographie bestimmten Fettsäuremusters identifiziert. Durch Vergleich mit entsprechenden Datenbanken ist eine Identifizierung auf Gattungs- bis hin zur Subspeziesebene möglich. Die Bestimmungen wurden an der Sektion Umweltmikrobiologie des Umweltforschungszentrums Leipzig/Halle durch Dr. C. Härtig durchgeführt.

### **2.5. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.5.1. Typisierung durch PCR-Fingerprinttechniken**

PCR-Fingerprinttechniken bieten die Möglichkeit zur schnellen Typisierung größerer Mengen an Bakterienisolaten. Grundlage ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona 1987, Saiki et al. 1988) über die DNA-Fragmente amplifiziert werden können. Die Typisierung einzelner Bakterien beruht hierbei auf Polymorphismen zwischen den Primer-Bindungsstellen. Methodisch gibt es verschiedene Herangehensweisen, um charakteristische Bandenmuster zu erhalten. Eine Möglichkeit stellt die RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dar. Hierbei werden ohne Kenntnis der DNA-Sequenz durch den Einsatz kurzer Primer mit willkürlicher Sequenz bei niedrigen Annealing-Temperaturen

und der Gesamt-DNA als Template charakteristische Bandenmuster erhalten. Eine andere Möglichkeit basiert auf Grundlage der von Sequenzdatenbanken, z.B. durch die Nutzung von Primern für repetitive Sequenzen, die in einer Gruppe von Bakterien vorkommen, oder der Verwendung von Primern die in konservierten Bereiche z.B. der 16S und 23S rDNA binden. Letzteres wurde hier zur Amplifikation des variablen 16S-23S Spacer-Bereichs genutzt.

#### **2.5.1.1. Lyse bakterieller Isolate**

##### Zellyse in alkalischer SDS Lösung

Lyselösung: 0,05 M NaOH  
0,25% SDS

Mit einem autoklaviertem Glasstäbchen wurde etwas von einer Bakterienkolonie abgenommen und in 50 µl Lyselösung in einem 1,5 ml Eppendorf Tube suspendiert. Die Lösung wurde nachfolgend 15 min in einem Thermoschüttler auf 95 °C erhitzt, wobei sich bildendes Kondensat am Deckel zwischenzeitlich durch kurzes Anzentrifugieren entfernt wurde. Nach dem Erhitzen wurde 450 µl Bidec zugegeben. Die Lysate sind im Kühlschrank für mehrere Wochen haltbar. Vor der Probeentnahme wurde die Lösung für 5 Minuten bei 11000 × g zentrifugiert.

##### Zellaufschluß bei Gram-positiven Bakterien

Da bei Gram-positiven Bakterien eine Lyse mit alkalischer SDS häufig nicht ausreichend war, wurden Gram-positive Isolate mit dem Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems Inc. MN 55447 USA) gemäß dem Protokoll für Gram-positive Bakterien aufgeschlossen.

#### **2.5.1.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Bei der RAPD wird ohne Kenntnis spezifischer Sequenzdaten durch Verwendung eines einzelnen, kurzen Primers eine PCR-Amplifikation mit der Gesamt-DNA eines Organismus als Template durchgeführt. Hieraus resultieren für untersuchte Stämme charakteristische Fingerprints (Bandenmuster), die mit sehr hoher Auflösung Unterscheidungen hinsichtlich der Identität der Stämme ermöglichen. Der Primer kann im Prinzip beliebiger Sequenz sein, wobei in der Regel Primer mit einer Länge von 8-12 Basen Verwendung finden und mit weniger stringenten Bedingungen gearbeitet wird. Bei der anschließenden PCR-Amplifikation kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der Bereiche, die sich

zwischen solchen zufälligen Primer-Bindungsstellen befinden, insoweit die Bindungsstellen nah genug beieinander auf den komplementären Strängen der DNA liegen. Durch die methodischen Bedingungen können allerdings Probleme bei der Reproduzierbarkeit entstehen, so daß die Bedingungen bei der Lyse der Bakterien zur DNA-Gewinnung und die PCR-Bedingungen (z.B. Heiz- und Kühlrate des verwendeten Thermozyklers) identisch sein sollten. Entsprechend wurden für vergleichende Analysen die Versuchsbedingungen vorab festgelegt.

In ersten Veröffentlichungen zu dieser Methodik finden sich mit RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams et al. 1990), AP-PCR (Arbitrary Primed PCR, Welsh & McClelland, 1990) und AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism, Caetano-Anollés et al. 1991) verschiedene Begriffe, die bis heute Verwendung finden, wobei RAPD am häufigsten als Akronym benutzt wird.

Zur genotypischen Unterscheidung gewonnener Isolate mit hoher Abundanz an der Wurzel- oder Sandoberfläche wurde der Primer Z8 5'-CTGGCGGCTG-3' (Dr. Wand, Sächsisches Institut für angewandte Biotechnologie, Leipzig) eingesetzt.

#### RAPD-PCR Reaktionsansatz

- 5 µl Puffer (10× PCR-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 40 µl Wasser
- 1 µl Nucleotidgemisch
- 1 µl Z 8 Primer (0,02 nmol/µl)
- 2 µl Lysat
- 1 µl Taq-Polymerase 1U (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen)

Der Reaktionsansatz wurde bis auf die Taq-Polymerase angesetzt und mit Öl überschichtet. Um unspezifische PCR-Produkte zu minimieren wurde die PCR als "Hot Start"-PCR durchgeführt, d.h. es wurde erst eine initiale Denaturierung bei 95°C vorgenommen und dann die Polymerase zugegeben.

#### RAPD-PCR Temperaturprogramm

- 95°C, 3 min
- 72°C, Pause, Hinzufügen der Polymerase
- 35 Zyklen: 93°C, 1 min
- 35°C, 1 min
- 72°C, 2 min, bei der letzten Elongation 10 min
- 4°C, Warteposition

Das Amplifikat wurde bei -20°C gelagert.

### 2.5.1.3. Typisierung über Polymorphismen in der 16S-23S Spacer Region

Die Region im Bereich zwischen 16S und 23S rDNA zeigt Längen- und Sequenz-Polymorphismen anhand derer Unterscheidungen bis in den Spezies-Bereich möglich sind (Barry et al. 1991, Jensen et al. 1993). Viele Bakterien haben zudem mehrere Kopien des rRNA-Operons im Genom, die zum Teil ebenfalls Längen- und Sequenzunterschiede aufweisen. Zur PCR-Amplifikation der Spacer Region finden Primer Verwendung, die in den flankierenden, konservierten Bereichen der 16S und 23S rDNA binden. Die Länge der Spacer Region wird neben der Variabilität des "intergenic" Spacer Bereichs durch t-RNA Gene beeinflusst. Insbesondere Gram-negative Bakterien enthalten in diesem Bereich t-RNA Gene und weisen entsprechend längere Spacer auf, wohingegen Gram-positiven Bakterien oft keine t-RNA Gene enthalten (Gürtler & Stanisich 1996). Trotz der Variabilität der 16S-23S Spacer Region können die Einzelstränge z.B. bei verschiedenen Arten einer Gattung gleich lang sein. Unterscheidungen sind dann aber über die Sequenz beispielsweise durch eine Restriktionsanalyse möglich.

Primer wurden für die Position 1481f (5'-GGCTGGATCACCTCCTTCT-3') auf der 16S und 208r (5'-GGTACTGAGATGTTTCACTTC-3') auf der 23S eingesetzt. Dem PCR-Ansatz wurde DMSO zugesetzt, um auch bei schwer auflösbaren Sekundärstrukturen der DNA eine weitgehende Denaturierung zu gewährleisten. Als Restriktionsendonukleasen fanden *Pal* I, *Alu* I und *Taq* I Verwendung.

#### Spacer-PCR Reaktionsansatz

- 32 µl Wasser
- 5 µl Puffer (10× PCR-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 5 µl DMSO
- 1 µl Nucleotidgemisch
- 1 µl Primergemisch (50:50, 1 pMol, MWG)
- 5 µl Lysat
- 1 µl Taq-Polymerase 1U (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen)

#### Spacer-PCR Temperaturprogramm

94°C, 5 min  
80°C, Pause, Hinzufügen der Polymerase  
35 Zyklen: 93°C, 1 min  
55°C, 4 min  
72°C, 1 min, bei der letzten Elongation 10 min.  
4°C, Warteposition

#### Spacer-Restriktion

5 µl PCR-Probe  
2 µl Puffer (universal)  
12,6 µl H<sub>2</sub>O  
0,4 µl *Pal* I = 5,6 U (Stratagene)  
Temperatur 37°C

#### **2.5.1.4. Agarosegelelektrophorese**

DNA-Fragmente können durch Anlegen eines elektrischen Feldes im Agarosegel nach Größe aufgetrennt werden, wobei die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode wandern. Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte durch Ethidiumbromid, welches sich in die DNA einlagert und so einen Komplex bildet, der bei Anregung im UV-Bereich stark fluoresziert. 1,5% Agarose in 0,5fach TBE Puffer wurden in der Mikrowelle bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose aufgekocht, anschließend auf 55°C abgekühlt und 2 µl Ethidiumbromid (1%ig w/v) zu 50 ml Agaroselösung gegeben. Zur Elektrophorese wurde das fertige Gel mit 0,5fach TBE Puffer überschichtet, die Proben zusammen mit dem Auftragspuffer in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V gestartet. Über die Bromphenolblau-Lauffront ist abschätzbar, wie weit die DNA-Fragmente im Gel gelaufen sind. Bromphenolblau besitzt bei den beschriebenen Bedingungen eine elektrophoretische Beweglichkeit, die ungefähr der von 300 bp DNA-Fragmenten entspricht [Sambrook *et al.*, 1989]. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Dokumentation via Transilluminator und Polaroidkamera.

#### TBE-Puffer 10 fach

TRIS-Base	900 mM
Borat	900 mM
EDTA	20 mM

#### Auftragpuffer

5 ml Glycerol
5 ml 0,5 fach TBE
5 mg Bromphenolblau

#### Molekulargewichtsmarker

20 µl Marker (100 Base-Pair Ladder, 1 µg/µl, Pharmacia Biotech)
50 µl Bromphenolblau Lösung

#### Proben Vorbereitung

1 µl Auftragpuffer	
PCR-Amplifikat	(5 µl bei RAPD, 3 µl bei Spacer bzw. 10 µl des Spacer-Restriktionsansatzes)
auf Parafilm mischen	

### **2.5.2. Ganzzellhybridisierung mit gruppengerichteten, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-rRNA-Sonden**

Ribosomale RNA-Sequenzdaten liefern die Grundlage phylogenetischer Stammbäume und sind heute die Grundlage für die Klassifizierung neuer Isolate. Anhand der Daten der 16S und 23S rRNA ist die Domäne *Bacteria* aktuell in 15 Hauptgruppen unterteilt, wobei die meisten klassischen Gram-negativen Mikroorganismen in der Klasse *Proteobacteria* (Stackebrandt et al. 1988) bzw. als ältere Bezeichnung der Purpurbakterien (Woese, 1987) eingeordnet sind. Die Klasse ist in die Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Gruppe unterteilt (Woese, 1987). Aus Sicht der mikrobiellen Analyse von Wurzelraumsystemen gehören weitere interessante Bakterien der Bacteroides-Flavobacterium-Gruppe an. Gram-positive Bakterien werden in Gram-positive mit hohem bzw. niedrigem G+C Gehalt der DNA eingeteilt. Aufgrund der rRNA-Sequenzdaten lassen sich nun gruppenspezifische Oligonukleotide herstellen, die zu charakteristischen Sequenzregionen sog. Signatures

phylogenetischer Gruppen komplementär sind, und hierdurch eine schnelle Zuordnung unbekannter Isolate ermöglichen (Amann et al. 1990a).

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Isolate von der Wurzel- oder Sandoberfläche wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch sind für alle Eubakterien, für die Alpha-, Beta- oder Gamma-Gruppe der Proteobakterien, für Cytophaga-Flexibacter, Xanthomonas oder für Gram-positive mit hohem GC Gehalt, eingesetzt.

Die Sonde für Eubakterien, EUB 338, diente hierbei als Kontrolle zur generellen Hybridisierbarkeit des untersuchten Isolats. EUB 338 wurde von Amann (Amann et al. 1990b) beschrieben und bindet an die 16S rRNA, Position 338 bis 355 (Numerierung nach Position in *E.coli* 16S rRNA). Ergänzend wurde die Sonde NON 338 (Wallner 1993), die keine komplementäre Sequenz zur Bakterien rRNA aufweist, als negative Kontrolle eingesetzt, um ggf. eine unspezifische Bindung der Sonden nachzuweisen.

Für Alpha-Proteobakterien wurde die Sonde ALF 1b nach Manz et al. (1992) eingesetzt. Signatures für die Alpha-Gruppe sind nahe am 5'Ende der 16 rRNA (ALF 1b) und bei Helix 73 der 23S rRNA (ALF 73a). Durch ALF 73a wird aber nur ein Teil der Bakterien der Alpha-Gruppe erfaßt. Die verwendete ALF 1b Sonde hingegen ist nicht so spezifisch und erfaßt u.a. auch einige Spezies der delta-Gruppe.

Bei Beta- und Gamma-Proteobakterien ist die Signature-Region für beide Gruppen im gleichen Bereich der 23S rRNA lokalisiert (Helix 42). Manz et al. (1992) beschreibt mit den Sonden BET 42a und GAM 42a Oligonukleotide, die sich nur durch eine Base unterscheiden. Um eine unspezifische Markierung von Bakterien des anderen Typs zu verhindern sind sehr stringente Bedingungen notwendig. Ausreichende Selektivität zeigte sich bei einer Formamidkonzentration von 45% und einer Hybridisierungstemperatur von 46°C. Durch diese stringenten Bedingungen ist aber die Sensitivität sehr gering, so daß nach Manz et al. (1992) mit einer Formamidkonzentration von 35% gearbeitet wurde, dem Ansatz aber als Competitor eine nicht markierte Sonde (50pmol) für die andere Gruppe zugesetzt wurde.

Zum Nachweis Gram-positiver Bakterien mit hohem G+C Gehalt der DNA (GPHGC) (Woese 1987), nach Stackebrandt auch als Actinomycetes Zweig (Stackebrandt 1991) bezeichnet, fand hier eine 23 rRNA gerichtete "HGC Sonde" nach Roller Verwendung. Roller beschreibt für diese phylogenetische Gruppe eine Oligonukleotid-Sonde, die an gruppenspezifische Sequenzen bei Helix 69 der Domäne IV der 23S rRNA bindet (Roller et al. 1994).

Bakterien der Gattung *Flavobacterium* und *Cytophaga*, als typische Wasser und Boden Bakterien, wurden über die 16S rRNA gerichtete Sonde CF 319 nach Manz et al. (1996) nachgewiesen.

Zur Detektierung Pflanzen-pathogener Bakterien fand schließlich noch die 16S rRNA Sonde XAN 818 (Friedrich et al. 1999) Verwendung, die die Xanthomonas Gruppe als monophyletische Gruppe nahe der gamma Proteobacteria selektiv detektiert.

Zum Nachweis waren die beschriebenen Sonden am 5'-Ende mit CY3 (Indocarbocyanine), Fluorescein oder Rhodamin als Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Synthetisiert wurden die Sonden bei MWG (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und Biometra (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland). Mikroskopiert wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss (Zeiss, Oberkochen). Als Objektive wurden Neofluar Objektive mit 10-, 40- und 100-facher Vergrößerung und die Filtersätze 01 (BP365 /12; 395; LP 397 u.a. für DAPI), 09 (BP 450-490; 510; LP 515 u.a. für Fluorescein, SYTO9, Arcidinorange) und 15 (BP 546/12; 580; LP 590 u.a. für Rhodamin) von Zeiss sowie ein für CY3 optimierter Filtersatz von Chroma (Filter 41007: 545/30; 565LP; 610/75 Chroma Technology Corp., Brattleboro, USA) verwendet.

Als Kontrolle wurden bei den Hybridisierungen je nach Sonde Referenzstämme, wie folgend aufgelistet, mitgeführt.

Alpha-Proteobacteria:	<i>Brevundimonas diminuta</i>
Beta-Proteobacteria:	<i>Delftia acidovorans</i> UFZ B 437
Gamma-Proteobacteria:	<i>Pseudomonas spec.</i> mt2
GPHGC:	<i>Nocardia carnea</i> UFZ B 334
GPHGC:	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> UFZ B 266
Cytophaga / Flavoabacteria:	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UFZ B 372

### 2.5.2.1. Fixierung von Bakterien

Für gute Resultate bei der Ganzzellhybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden ist eine Fixierung der Bakterienzellen notwendig. Nach einer Fixierung sind die meisten Mikroorganismen permeabel für die Sonden. Im weiteren ist die Fixierung vorteilhaft für die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und die Minimierung der Eigenfluoreszenz der Zellen. Für Gram-negative Zellen wurde als Fixativ eine 4%ige Paraformaldehydlösung in PBS (Amann et al. 1990b) eingesetzt. Gram-positive Zellen sind

in 50% Ethanol (Roller et al. 1994) fixiert worden. Die Bakterien wurden als frische Kolonien von Agarplatten gewonnen und dann in 100µl 1 × PBS suspendiert.

### Lösungen

PBS (Phosphate Buffer Saline)

1 × PBS

2,579 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12H<sub>2</sub>O ( 7,2 mM)

0,386 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O ( 2,79mM)

7,597 g NaCl ( 130 mM)

auf 1 Liter, pH 7,2

3 × PBS

1,934 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12H<sub>2</sub>O (21,6 mM)

0,290 g NaH<sub>2</sub>P<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (8,39 mM)

5,695 g NaCl (390 mM)

auf 250 ml, pH 7,2

### Zubereitung des Paraformaldehydfixativs

1. 65 ml H<sub>2</sub>O bidest auf 60°C erhitzen
2. 4 g Paraformaldehyd zugeben
3. 1 Tropfen 2M NaOH Lösung zugeben und rühren bis die Lösung klar ist (ca. 1-2 min)
4. 33 ml 3 x PBS zugeben
5. pH 7,2 mit HCl einstellen
6. Noch vorhandene Kristalle durch Sterilfiltration entfernen
7. Im Eis abkühlen, bei 4°C bis zur Verwendung (innerhalb von 24 h) aufbewahren.

### Fixierung Gram-negativer Bakterien

1. Drei Volumina Paraformaldehydfixativ zu einem Volumen Bakteriensuspension geben und 1-3 h bei 4°C lagern.
2. Fixierte Zellen durch Zentrifugation bei 5000 × g pelletierten und das Fixativ entfernen.
3. Zellen mit 1 × PBS waschen und in 1 × PBS resuspendieren.
4. Ein Volumen eisgekühltes Ethanol zugeben (Endkonzentration 50%).
5. Die fixierten Zellen können bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

### Fixierung Gram-positiver Bakterien

1. Bakteriensuspension in 1 × PBS waschen
2. Zentrifugieren bei 5000 × g und in Hälfte des Ausgangsvolumen mit 1 × PBS resuspendieren. Zugabe von eisgekühlten 98% Ethanol auf eine Endkonzentration von 50%. Über Nacht bei 4°C lagern
3. Fixierte Zellen können bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

### **2.5.2.2. Präparation der Proben**

Zur Hybridisierung wurden einzelne Isolate entweder auf Gelatine beschichtete Objektträger gebracht (Amann et al. 1990a) oder punktuell auf ein schwarzes Nucleopore PC Filter (0,22µm Porenweite) aufgetragen.

#### Vorbehandlung der Objektträger

Es wurden hydrophob beschichtete Objektträger mit einem Achtglasfenster (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) verwendet. Die hydrophobe Oberfläche verhindert die Vermischung der Sonden auf dem Objektträger.

1. Reinigen des Objektträgers in heißer Seifenlösung (Pril, 1h)
2. Beschichtung der Träger mit einer 0,1% Gelatine-, 0,01% Chromkaliumsulfat-Lösung durch Eintauchen der Träger in die ca. 70°C warme Lösung.
3. Trocknung in vertikaler Position

#### Auftragen von fixierten Bakterien auf die Objektträger

1. 3 µl fixierte Zellsuspension auf den beschichteten Objektträger auftragen
2. An der Luft trocknen
3. Präparate in -20°C kalter Ethanolreihe entwässern, je 3 min.
4. Objektträger können bei Raumtemperatur über Monate gelagert werden.

#### Auftragen von fixierten Bakterien auf das Filter

Pro Filter können 20 Stämme und entsprechende Referenzstämme untersucht werden. Es werden je 1,5 µl fixierte Zellsuspension auf ein dunkles Polycarbonatfilter (Nucleopore, 0,22 µm Porendurchmesser, 25 mm Ø) unter Anlegen eines leichten Vakuums (Wasserstrahlpumpe) aufgetragen. Die fixierten Bakterien werden so punktförmig auf das Filter aufgebracht, wobei der in der fixierten Bakteriensuspension enthaltene Alkohol eine punktuelle Entfärbung des Filters bewirkt und so die Auftragstellen deutlich zu sehen sind. Nach Auftrag der Bakteriensuspensionen und Trocknung wird das Filter am Rand als Markierung eingeschnitten, ein Deckglas aufgelegt und hierauf der Umriß des Filters mit Filzstift nachgezeichnet und die Lage der aufgetragenen Bakterienstämme markiert. Nach der Hybridisierung, und Einbettung in Citifluor (Citifluor Ltd.; London, UK), sind bei passgenauer Auflage des Deckglases die aufgetragenen Bakterienstämme beim Mikroskopieren schnell zu finden und richtig zuzuordnen.

### 2.5.2.3. Hybridisierung

Für eine spezifische Hybridisierung mit den komplementären RNA-Strängen der fixierten Bakterien sind je nach Sonde unterschiedlich stringente Bedingungen notwendig. Durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer kann für verschiedene Sonden bei identischer Hybridisierungstemperatur unterschiedliche Stringenz gewährleistet werden. Formamid beeinflusst die Wasserstoffbrückenbindungen und wirkt so denaturierend. Die Zugabe von 1 % Formamid senkt dabei die Dissoziationstemperatur des Hybrids um ca. 0,5°C. Die Hybridisierungsstringenz beeinflusst direkt die Spezifität und Sensitivität der Hybridisierung. Die Hybridisierung muß in einem gut verschlossenen, Luftfeuchtigkeit gesättigtem Gefäß durchgeführt werden, um eine Verdunstung der Hybridisierungslösung zu vermeiden. Eine hohe Verdunstung führt zu einer unspezifischen Bindung der Sonde an die Zellen. In Tabelle 1 sind die eingesetzten Sonden und die verwendete Formamidkonzentration aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotidsonden.

Sonde	Gruppe Position	Sequenz	Stringenz Formamid -konz. %	Quelle
EUB 338	Bacteria 16 S, 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	10	Amann, 1990b
ALF 1b	alpha Subklasse der Proteobacteria, einige Vertreter der delta Subklasse, viele Spirochaeten 16 S, 19-35	CGT TCG (C/T)TC TGA GCC AG	20	Manz, 1992
BET 42a	beta-Subklasse der Proteobacteria 23 S, 1027-1043	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	Manz, 1992
GAM 42a	gamma-Subklasse der Proteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	Manz, 1992
HGC 69a	Gram-positive mit hohem G+C Gehalt 23 S, 1901-1918	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	35	Roller, 1994
CF 319a	Cytophaga-Flexibacter-Subphylum 16 S, 319-336	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	35	Manz, 1996
XAN 818	Xanthomonas Zweig 16 S, 818-835	CAA CAT CCA GTT CGC ATC	10	Friedrich, 1999
NON 338	Negative Kontrolle	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	10	Wallner, 1993

#### Hybridisierungspuffer

0,9 M	Natriumchlorid
0,01%	Natriumdodecylsulfat (SDS)
20 mM	Tris/HCL pH 7,2
x %	Formamid

#### Pipettierschema für 2 ml Hybridisierungspuffer mit x % Formamid

369 µl	5M NaCl
2 µl	10 % SDS
40 µl	1M Tris/HCl
x ml	Formamid
y ml	H <sub>2</sub> O

#### Waschpuffer

Beim Waschpuffer wird die Stringenz über die NaCl-Konzentration kontrolliert. Die Stringenz des Waschschrittes kann durch Herabsetzen der NaCl-Konzentration erhöht werden. In Abhängigkeit von der im Hybridisierungspuffer verwendeten Formamidkonzentration wird die NaCl-Konzentration im Waschpuffer (x M NaCl, 0,01 % SDS, 20 mM Tris/HCl pH 7,2) eingestellt, wie folgend aufgeführt:

%Formamid (v/v) im Hybridisierungspuffer	mM NaCl im Waschpuffer
0	900
10	450
20	225
35	80

#### Hybridisierung von Bakterien auf Objektträgern

1. Ein Streifen Filterpapier in Hybridisierungspuffer einweichen und in ein 50 ml Polypropylenröhrchen legen.
2. Röhrchen verschließen und für mehrere Minuten bei der Hybridisierungstemperatur von 46°C inkubieren.
3. 8µl Hybridisierungspuffer mit 1µl Oligonukleotidsonde (25-50 ng) mischen. Bei Beta- und Gamma-Sonden 250 ng unmarkierte Sonde des jeweils anderen Typs als Competitor zugeben.
4. Jeweils 9 µl Hybridisierungsgemisch auf die fixierten Zellen auftragen.
5. Den Objektträger in das vorgewärmte Röhrchen geben und 1-2 Stunden hybridisieren.

6. Objektträger aus dem Röhrchen nehmen und die Hybridisierung durch Abspülen mit auf 48°C vorgewärmtem Waschlösungspuffer stoppen.
7. Objektträger 20 min. in 50 ml Waschlösungspuffer bei 48°C inkubieren.
8. Durch kurzes Eintauchen in H<sub>2</sub>O bidest. Salze entfernen, Wasser abschütteln und lufttrocknen.
9. Objektträger in Citifluor einbetten (Citifluor Ltd., Canterbury, UK) und mit Epifluoreszenzmikroskop mikroskopieren.

Gleichzeitige DAPI-Färbung: (nach Møller '96)

- 7a. Nach 7. s.o. 10 µl DAPI-Lösung auftragen. 0,1M Tris/HCl pH 7,2  
0,9 M NaCl  
6,25µM DAPI

3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

- 7b. Dann 15 min. in Waschlösung 0,1M Tris/HCl pH 7,2  
0,9M NaCl bei 37 °C waschen.

8. s.o.

9. s.o.

#### Hybridisierung von Bakterien auf Polycarbonatfiltern

1. Verschließbare Kunststoffbox mit in Hybridisierungspuffer getränktem Filterpapier für mehrere Minuten bei 46°C inkubieren.
2. Filter in ein Uhrglas legen und mit 80 µl Hybridisierungspuffer mit einer Sondenkonzentration von 250 ng/80 µl und ggf. unmarkierter Sonde 2,5 µg/80 µl überschichten. Uhrglas in die vorgewärmte Kunststoffbox stellen und bei 46°C für 90 min inkubieren.
3. Filter mit 48°C warmen Waschlösungspuffer vorsichtig abspülen, in größeres Uhrglas legen und mit Waschlösungspuffer überschichten. 20 min in Waschlösungspuffer bei 48°C inkubieren.
4. Waschlösungspuffer vorsichtig abgießen und Filter mit DAPI-Lösung (180 µl NaCl, 100 µl Tris HCl, 720 µl Bidest, 5 µg DAPI) überschichten. 8 min im Dunkeln inkubieren.
5. Kurz mit Wasser abspülen, Filter im Dunkeln lufttrocknen, auf Objektträger in Citifluor (Citifluor Ltd., Canterbury, UK) einbetten, markiertes Deckglas passend auflegen und mit Epifluoreszenzmikroskop mikroskopieren.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Reaktion der Pflanzen auf Schadstoffexposition**

Zur Einschätzung der Schadstoff-Wirkung auf die in den Versuchssystemen zum Einsatz kommenden Pflanzen *Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* wurden konzentrationsabhängig Untersuchungen zu Veränderungen im Erscheinungsbild, zum Wasserverbrauch und zum Pflanzenwachstum bei Schadstoffexposition durchgeführt. Beeinträchtigungen der Pflanzen in den untersuchten Konzentrationsbereichen wären bei der Beurteilung der mikrobiellen Populationsanalyse zu berücksichtigen.

##### **3.1.1. Veränderungen im Erscheinungsbild der Pflanzen bei Schadstoffexposition**

*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Juncus effusus* Pflanzen wurden mit 2,6-Dimethylphenol in Konzentrationen bis zu 75 mg/l belastet. Bei *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* waren bis zu dieser Konzentration keine Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild zu beobachten. *Carex gracilis* Pflanzen zeigten hingegen teilweise die Ausbildung eines dichteren Wurzelwerkes ab Konzentrationen von 50 mg/l (siehe 3.1.3.). Für 4-Nitrophenol sind Konzentrationen von 2, 20 und 50 mg/l bei *Carex gracilis* und *Juncus effusus* getestet worden. Belastungen bis zu 20 mg/l wurden von beiden Pflanzenarten ohne sichtbare Schäden toleriert. Bei Exposition mit 50 mg/l zeigten sich dann aber bei beiden Pflanzen Schädigungen. Bei *Carex gracilis* in Form einer Gelbverfärbung der Blätter, während bei *Juncus effusus* Nekrosen der Blattspitzen auftraten.

##### **3.1.2. Wasserverbrauch von *Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* bei Schadstoffexposition**

Bei *Carex gracilis* und *Juncus effusus* wurden Untersuchungen zur Wasseraufnahme bei unterschiedlichen Schadstoffbelastungen (DMP: 2, 20, 50, 75 mg/l; NP: 2, 20, 50 mg/l) in einem Hydroponiksystem durchgeführt. Für jede Schadstoffkonzentration wurde eine Gruppe von 4 Pflanzen der jeweiligen Spezies untersucht. Die Kontrollgruppe bestand aus je 6 Pflanzen. Die Pflanzenanzucht erfolgte über vegetative Vermehrung. Es wurden junge Pflanzen mit ungefähr gleicher Größe ausgesucht. Trotz der Wahl möglichst ähnlich großer Pflanzen waren beim Wasserverbrauch der einzelnen Pflanzen deutliche Unterschiede vorhanden. Um nun eine aussagekräftige Auswertung zu ermöglichen, wurde für alle

Pflanzen während der ersten 12 Tage des Versuchszeitraums der Wasserverbrauch ohne Schadstoff bestimmt. Von der Kontrollgruppe wurde aus dieser Zeit der mittlere Wasserverbrauch berechnet und für die einzelnen Pflanzen der anderen Gruppen ein Faktor bestimmt, der den Unterschied zu diesem Mittelwert beschrieb. Nach Schadstoffexposition wurden die Meßwerte mit dem jeweiligen pflanzeigenen Faktor multipliziert und somit ein relativer Vergleich zur Kontrolle ermöglicht.

Für *Phalaris arundinacea* wurde bei prinzipiell gleichem Versuchsaufbau nur eine DMP-Belastung von 50 mg/l untersucht. Die Gruppe mit belasteten Pflanzen und die Kontrollgruppe bestand jeweils aus 5 Pflanzen. Vor Schadstoffexposition wurde der Wasserverbrauch über 10 Tage bestimmt.

In den Tabellen 2, 3 und 4 sind als Ergebnisse die Mittelwerte des Wasserverbrauchs der jeweiligen Gruppen bei Bezug auf die Kontrollgruppe prozentual dargestellt. Grau hinterlegt sind Messungen mit einem signifikant niedrigeren Wasserverbrauch (hellgrau = signifikant mit  $\alpha = 0,05$ , dunkelgrau = signifikant mit  $\alpha = 0,01$ ). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des U-Tests nach Mann und Whitney.

Tabelle 2: *Carex gracilis*.

Mittlerer Wasserverbrauch der Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der DMP oder NP Konzentration.

Zeit [d]	DMP				NP		
	2 mg/l	20 mg/l	50 mg/l	75 mg/l	2 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Mittlerer Wasserverbrauch [%]							
1-12 ohne Schadstoff	100	100	100	100	100	100	100
13	107,4	102,8	108,5	89,7	91,8	94,5	78,6
15	110,5	107,9	109,1	85,0	94,9	89,9	81,3
17	104,4	99,8	92,8	83,7	107,2	100,2	87,0
20	99,2	102,2	97,9	90,1	102,0	92,8	86,7
22	108,9	94,5	93,7	88,8	112,2	90,0	91,2
24	110,0	105,1	102,0	95,1	114,8	104,1	80,4
26	112,3	103,8	105,8	92,2	106,2	101,8	76,8
29	114,4	98,1	104,9	97,5	109,0	105,6	74,6

Tabelle 3: *Juncus effusus*.

Mittlerer Wasserverbrauch der Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der DMP oder NP Konzentration.

Zeit [d]	DMP				NP		
	2 mg/l	20 mg/l	50 mg/l	75 mg/l	2 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Mittlerer Wasserverbrauch [%]							
1-12 ohne Schadstoff	100	100	100	100	100	100	100
13	101,8	104,2	102,0	96,4	101,7	102,0	79,9
15	102,3	102,2	103,6	97,2	103,9	103,9	80,8
17	98,1	100,1	103,1	87,8	98,3	96,3	53,4
20	99,2	103,6	99,6	85,4	99,8	98,2	49,8
22	94,9	98,4	95,3	81,5	101,6	96,0	46,3
24	95,3	98,8	96,0	80,2	106,1	94,8	50,0
26	101,7	102,0	91,7	76,3	105,5	100,5	46,3
29	98,8	99,7	92,5	78,9	101,9	99,4	44,1

Tabelle 4: *Phalaris arundinacea*.

Mittlerer Wasserverbrauch bei Exposition mit 50 mg/l 2,6-Dimethylphenol.

Zeit [d]	DMP 50 mg/l Mittlerer Wasserverbrauch [%]
1-10 ohne Schadstoff	100
11	98,7
12	100,5
14	102,1
17	96,3
19	95,0
21	98,9
24	97,2

Für alle drei Pflanzengattungen war übereinstimmend keine Veränderungen in der Wasseraufnahme bei Exposition mit bis zu 50 mg/l bei DMP und 20 mg/l bei NP zu beobachten. Bei höherer DMP Belastung (75 mg/l) zeigte sich bei *Juncus effusus* dann aber eine signifikante Verringerung nach 10-tägiger Exposition. Bei *Carex gracilis* war bei dieser Konzentration noch keine signifikante Veränderung zu beobachten, wenn auch die Meßwerte eine beginnende Verringerung der Wasseraufnahme vermuten lassen. Bei 4-Nitrophenol kam es bei den gewählten Konzentrationsstufen ab 50 mg/l zu einer deutlichen Verringerung der Wasseraufnahme, die bereits nach 1-tägiger Belastung signifikant war.

### 3.1.3. Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol

Veränderungen in der Frisch- und Trockenmassezunahme wurden bei *Carex gracilis* (Tabelle 5) und *Juncus effusus* (Tabelle 6) nach DMP- oder NP-Belastung und für *Phalaris arundinacea* (Tabelle 7) ausschließlich bei DMP-Exposition untersucht. Der Massezuwachs wurde hierbei über einen Zeitraum von 41 Tagen bestimmt. Als Schadstoffkonzentration fanden für 2,6-Dimethylphenol mit 50 mg/l beziehungsweise 20 mg/l bei 4-Nitrophenol die Konzentrationen Verwendung, bei denen sich in den vorherigen Versuchen keine Pflanzenschädigung zeigte. Als Kontrolle wurde von einer Pflanzengruppe zu Beginn des Versuchs das Frischmasse / Trockenmasse Verhältnis bestimmt und von einer zweiten Kontrollgruppe die Entwicklung der Pflanzenfrischmasse über den Versuchszeitraum verfolgt. Zu Ende des Versuchs ist dann von dieser zweiten Kontrollgruppe und den exponierten Ansätzen ebenfalls das Frischmasse / Trockenmasse Verhältnis ermittelt worden.

Tabelle 5: Massezuwachs bei *Carex gracilis* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen die mit NP bzw. DMP exponiert wurden. Unterschiede in der Massezunahme wurden mittels Welch-Test auf Signifikanz getestet.

<i>Carex gracilis</i>	Pflanzenmasse am Anfang		Frischmassezunahme in %			
	FM	FM:TM	15. Tag FM	25. Tag FM	41. Tag FM FM:TM	
Kontrolle 1 n = 7	6,5 g $\sigma$ 3,3 g	4,7 : 1 $\sigma$ 0,5				
Kontrolle 2 n = 10	8,7 g $\sigma$ 6,7 g		21,7 % $\sigma$ 8,2	38,4 % $\sigma$ 11,5	62,9 % $\sigma$ 18,3	4,7 : 1 $\sigma$ 0,3
NP exponiert 20 mg/l n = 9	6,8 g $\sigma$ 3,5 g		22,5 % $\sigma$ 7,7 o	39,1 % $\sigma$ 13,5 o	65,4 % $\sigma$ 21,7 o	4,6 : 1 $\sigma$ 0,3
DMP exponiert 50 mg/l n = 9	7,8 g $\sigma$ 3,0 g		25,1 % $\sigma$ 6,3 o	46,5 % $\sigma$ 12,8 +	75,1 % $\sigma$ 17,6 +	4,8 : 1 $\sigma$ 0,4

Angaben in der Tabelle als Mittelwert aus n = Probenumfang,  $\sigma$  = Standardabweichung, FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse, o = nicht signifikant, + = signifikant mit  $\alpha$  0.1

Tabelle 6: Massezuwachs bei *Juncus effusus* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen die mit NP bzw. DMP exponiert wurden. Unterschiede in der Massezunahme wurden mittels Welch-Test auf Signifikanz getestet.

<b><i>Juncus effusus</i></b>	Pflanzenmasse am Anfang		Frischmassezunahme in %			
	FM	FM:TM	15. Tag FM	25. Tag FM	41. Tag FM FM:TM	
Kontrolle 1 n = 7	10,6 g $\sigma$ 3,6 g	4,9 : 1 $\sigma$ 0,5				
Kontrolle 2 n = 10	9,9 g $\sigma$ 2,3 g		39,1 % $\sigma$ 9,4	67,0 % $\sigma$ 14,5	111,3 % $\sigma$ 24,7	4,9 : 1 $\sigma$ 0,4
NP exponiert 20 mg/l n = 9	11,9 g $\sigma$ 2,2 g		33,9 % $\sigma$ 8,9 o	58,8 % $\sigma$ 14,2 o	97,5 % $\sigma$ 23,3 o	4,9 : 1 $\sigma$ 0,4
DMP exponiert 50 mg/l n = 8	10,5 g $\sigma$ 4,0 g		37,3 % $\sigma$ 9,3 o	66,0 % $\sigma$ 14,8 o	105,6 % $\sigma$ 23,3 o	4,8 : 1 $\sigma$ 0,3

Angaben in der Tabelle als Mittelwert aus n = Probenumfang,  $\sigma$  = Standardabweichung, FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse, o = nicht signifikant, + = signifikant mit  $\alpha$  0.1

Tabelle 7: Massezuwachs bei *Phalaris arundinacea* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen die mit DMP exponiert wurden. Unterschiede in der Massezunahme wurden mittels Welch-Test auf Signifikanz getestet.

<b><i>Phalaris arundinacea</i></b>	Pflanzenmasse am Anfang		Frischmassezunahme in %			
	FM	FM:TM	15. Tag FM	25. Tag FM	41. Tag FM FM:TM	
Kontrolle 1 n = 5	13,4 g $\sigma$ 5,8 g	4,2 : 1 $\sigma$ 0,3				
Kontrolle 2 n = 7	15,8 g $\sigma$ 6,3 g		13,1 % $\sigma$ 4,4	29,7 % $\sigma$ 9,2	43,2 % $\sigma$ 12,2	4,3 : 1 $\sigma$ 0,4
DMP exponiert 50 mg/l n = 7	13,7 g $\sigma$ 4,9 g		15,4 % $\sigma$ 3,9 o	30,5 % $\sigma$ 6,7 o	46,1 % $\sigma$ 10,3 o	4,4 : 1 $\sigma$ 0,3

Angaben in der Tabelle als Mittelwert aus n = Probenumfang,  $\sigma$  = Standardabweichung, FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse, o = nicht signifikant, + = signifikant mit  $\alpha$  0.1

Für *Carex gracilis* zeigten sich signifikante Veränderungen in der Frischmassezunahme bei DMP-Exposition. Bis zum 41. Versuchstag ergab sich eine um 12 % höhere Frischmassezunahme im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen das Frischmasse / Trockenmasse Verhältnis unverändert blieb. Es lag für Kontrollen und exponierten Pflanzen bei 4,7 : 1. Bei *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* waren hingegen keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Das erhöhte Wachstum von *Carex gracilis* bei Exposition mit 50 mg/l DMP ging bei vielen Pflanzen mit einer stärkeren Ausbildung des Wurzelsystems einher. Während bei nicht exponierten Pflanzen vergleichsweise wenig

Seitenwurzeln ausgebildet wurden und es zumeist bei Seitenwurzeln 1. Ordnung blieb, die zudem noch recht kurz waren (einige Millimeter bis wenige Zentimeter), lag nach Exposition mit DMP bei den Pflanzen ein wesentlich dichteres Wurzelwerk vor (Abb.4). Es waren mehr Seitenwurzeln vorhanden, die zum Teil bis zur 3. Ordnung ausgebildet waren. Die Länge der Seitenwurzeln lag meist im Zentimeterbereich (2-7 cm). Der Eindruck eines stärkeren, schnelleren Wurzelwachstums zeigte sich auch bei Wurzelquerschnitten. Es war eine im Vergleich zu unbelasteten Pflanzen später einsetzende (Entfernung von der Wurzelspitze) Ausbildung der Verkorkung der Exodermis und der Verholzung der darunter liegenden Zellagen zu beobachten. Gleiches zeigte sich bei der Ausbildung der Sekundärendodermis.



Abbildung 4: *Carex gracilis* nach 10-wöchiger Exposition mit 50 mg/l 2,6-Dimethylphenol. Links: unbelasteten Pflanze. Rechts: exponierte Pflanze.

### 3.2. Schadstoffaufnahme in die Pflanzen

Um abschätzen zu können, inwieweit 2,6-Dimethylphenol bzw. 4-Nitrophenol von den Pflanzen aufgenommen wird, wurden zuvor unbelastete *Carex gracilis*, *Juncus effusus* oder

*Phalaris arundinacea* Pflanzen in Schadstofflösung (DMP = 50 mg/l oder NP = 20 mg/l) gebracht. Aufgrund einer sehr langen lag-Phase beim Schadstoffabbau findet innerhalb der ersten Tage keine nennenswerte mikrobielle Verwertung der phenolischen Xenobiotika statt. Für die Versuche wurden kräftige, größere Pflanzen ausgewählt, um während der Versuchszeit von 24 h eine deutliche Flüssigkeitsaufnahme zu erreichen. Die Versuche wurden bei 22°C in einem Lichtthermostaten (Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) mit einem Tag/Nachtrhythmus von 16/8 Stunden bei einer Lichtintensität von ca. 320  $\mu\text{mol} / \text{s} \cdot \text{m}^2$  durchgeführt. Vor Versuchsstart wurden die Wurzeln vorsichtig in autoklaviertem Leitungswasser gewaschen und die Pflanzen dann in Erlenmeyerkolben mit autoklavierter Hoagland-Lösung gebracht. Das eingesetzte Volumen richtete sich, je nach Größe der Pflanze, nach der ungefähr zu erwartenden Wasseraufnahme. Als Kontrollen dienten Pflanzen, bei denen zuvor der Sproß abgeschnitten wurde. 30 Minuten nach Einbringen der Pflanzen bzw. der Wurzeln in die Gefäße wurden Referenzproben genommen und dann der Schadstoff zugegeben. Nachfolgend wurde über 24 h die Schadstoffkonzentration in der verbleibenden Lösung gemessen und zum Ende des Versuchs der Flüssigkeitsverbrauch bestimmt. In den Tabellen 8 – 10 sind die Ergebnisse zur DMP-Aufnahme durch *Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* aufgeführt und unter Tabelle 11 und 12 die Werte für Nitrophenol.

Tabelle 8: Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Carex gracilis*.

<i>Carex gracilis</i>	Pflanze 1		Pflanze 2		Wurzel 1 (Sproß abgeschnitten)		Wurzel 2 (Sproß abgeschnitten)	
	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen
Zeit in h								
0	46,50	1000 ml	47,43	1000 ml	48,66	1000 ml	49,21	1000 ml
1,8	45,13		47,40		45,97		47,66	
19	50,08		48,82		45,26		47,60	
22,4	50,89		49,25		45,36		47,23	
25,5	51,27	765 ml	49,40	836 ml	45,45	990 ml	47,48	991 ml
Veränderungen nach 25,5 h	+4,77mg/l +10,3 %	235 ml Verbrauch 23,5 %	+1,97mg/l +4,2 %	164 ml Verbrauch 16,4 %	-3,21 mg/l - 6,6 %	10 ml Verbrauch 1,0 %	-1,73 mg/l - 3,5 %	9 ml Verbrauch 0,9 %

Tabelle 9: Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Juncus effusus*.

<i>Juncus effusus</i>	Pflanze 1		Pflanze 2		Wurzel 1 (Sproß abgeschnitten)		Wurzel 2 (Sproß abgeschnitten)	
	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen	DMP mg/l	Lösungs- volumen
Zeit in h								
0	47,03	500 ml	47,09	500 ml	48,26	500 ml	47,52	500 ml
2	46,67		46,51		47,17		46,98	
5,5	47,45		47,07		46,94		47,00	
18	51,04		49,85		46,99		46,90	
23,5	52,49	347 ml	50,53	361 ml	46,91	497 ml	46,98	496 ml
Veränderungen nach 23,5 h	+5,46mg/l +11,6 %	153 ml Verbrauch 30,6 %	+3,44mg/l +7,3 %	139 ml Verbrauch 27,8 %	-1,35 mg/l - 2,8 %	3 ml Verbrauch 0,6 %	-0,54 mg/l - 1,1 %	4 ml Verbrauch 0,8 %

Tabelle 10: Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Phalaris arundinacea*.

<i>Phalaris arundinacea</i>		
Zeit in h	DMP mg/l	Lösungs- volumen
0	48,99	500 ml
1,5	49,01	
3,75	49,14	
7	49,44	
19,25	50,40	
22,5	50,42	
26,75	50,59	445 ml
Veränderungen nach 26,75 h	+ 1,6 mg/l +3,3 %	55 ml Verbrauch 11,0 %

Für DMP war bei allen drei Pflanzengattungen eine eindeutige Zunahme der Konzentration des Schadstoffes in der verbleibenden Lösung zu beobachten. Der gelöste Schadstoff wurde also langsamer von der Pflanze über den Transpirationsstrom aufgenommen als das Wasser als Lösungsmittel. Bei der weiteren Auswertung der Ergebnisse ist ein direkter Bezug der Meßwerte aufeinander trotz der Auswahl ähnlich großer Pflanzen problematisch. Ungeachtet dessen wurde aber mit dem Mittelwert der 2 parallelen Pflanzenansätze und der Kontrollen gerechnet. Hierbei wurde die bestimmte Konzentrationsveränderung (Meßwert - Kontrolle) als Prozentwert auf die maximal mögliche Konzentrationsveränderung (resultierend aus der im verbrauchten Flüssigkeitsvolumen enthaltenen Schadstoffmenge)

bezogen. Es ergaben sich so folgende Werte: Bei *Carex gracilis* wurde nur 38 % des gelösten DMP von der Pflanze aufgenommen; für *Juncus effusus* ergab sich aus den Meßwerten eine Aufnahme von 21 % und bei *Phalaris arundinacea* lag der Wert bei 41 %. Da bei den Versuchen mit Phalaris kein Parallelansatz mit einer abgeschnittenen Wurzel durchgeführt wurde, wurde das Ergebnis folglich nicht um die Anlagerung des Schadstoffes an die Wurzelmatrix korrigiert, so daß der Wert niedriger anzunehmen ist.

Im Unterschied zu DMP zeigte sich bei den Untersuchungen zur Nitrophenol-Aufnahme, daß die Konzentration der im Gefäß verbleibenden Lösung trotz deutlichen Flüssigkeitsverbrauchs durch die Pflanzen konstant blieb. Nitrophenol wurde also von *Carex gracilis* und *Juncus effusus* unselektiv mit dem Transpirationsstrom in die Pflanze aufgenommen.

Tabelle 11: Veränderung der NP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Carex gracilis*.

<i>Carex gracilis</i>	Pflanze 1		Pflanze 2		Wurzel (Sproß abgeschnitten)	
	NP mg/l	Lösungs- volumen	NP mg/l	Lösungs- volumen	NP mg/l	Lösungs- volumen
Zeit in h						
0	18,55	800 ml	18,45	800 ml	18,47	800 ml
5,25	18,01		18,32		18,19	
16,5	17,89	711 ml	18,36	728 ml	18,21	
18,5	18,08		18,32		18,23	
21,25	18,15		17,28		18,19	
23,25	18,03	645 ml	18,32	688 ml	18,17	796 ml
Veränderungen nach 23,25 h	- 0,52mg/l - 2,8 %	155 ml Verbrauch 19,4 %	- 0,13mg/l - 0,7 %	112 ml Verbrauch 14,0 %	- 0,3mg/l - 1,6 %	4 ml Verbrauch 0,5 %

Tabelle 12: Veränderung der NP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Juncus effusus*.

<i>Juncus effusus</i>	Pflanze 1		Wurzel (Sproß abgeschnitten)	
	NP mg/l	Lösungs- volumen	NP mg/l	Lösungs- volumen
Zeit in h				
0	19,17	800 ml	18,34	800 ml
5,25	18,69		17,89	
16,5	18,54	701 ml	18,02	
18,5	18,61		17,69	
21,25	18,49		17,85	
23,25	18,57	659 ml	17,90	797 ml
Veränderungen nach 23,25 h	-0,6mg/l -3,1 %	141 ml Verbrauch 17,6 %	-0,44mg/l -2,4 %	3 ml Verbrauch 0,4 %

### 3.3. Schadstoffabbau in Hydroponiksystemen

Für einen ersten Eindruck zum Einfluß Wurzel adhärierter Bakterien auf den Schadstoffabbau wurden Untersuchungen mit 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol in Hydroponiksystemen unter Batch-Bedingungen durchgeführt. Vergleichend wurde die Abbaugeschwindigkeit (Konzentrationsabnahme der Ausgangsverbindung) in Systemen mit *Carex gracilis*, *Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea* und der ohnehin in unbepflanzten, unsteril angesetzten Nährsalzlösungen stattfindende Abbau betrachtet. Für NP wurden Konzentrationen von 2 mg/l und 20 mg/l und für DMP von 50 mg/l untersucht. Abbildung 5 zeigt beispielhaft den typischen Verlauf für DMP bei Vergleich bepflanzter mit unbepflanzten Ansätzen. In den bepflanzten Systemen zeigte sich eine lag-Phase von ca. 3 Tagen gegenüber ca. 8 Tagen in unbepflanzten Ansätzen. Nach einsetzendem Abbau wurde der Schadstoff innerhalb von 4-5 Tagen umgesetzt.

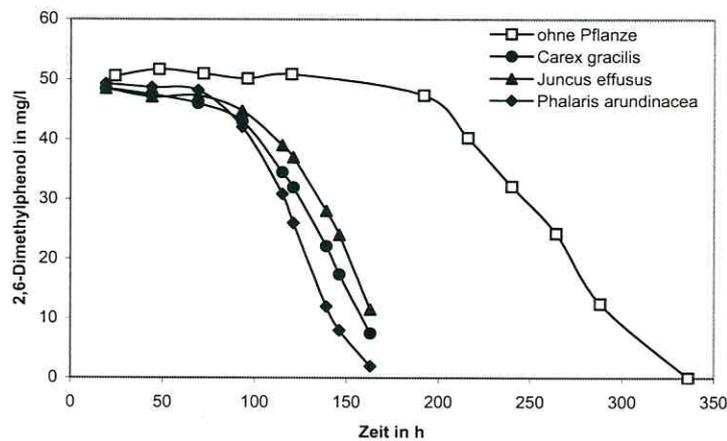


Abbildung 5: Batchversuch zur Verringerung der DMP-Konzentration in Hydroponiksystemen mit und ohne Pflanze.

Abbildungen 6 und 7 zeigen den Verlauf bei Nitrophenolkonzentrationen von 2,2 und 18 mg/l. Bei einer Ausgangskonzentration von 2,2 mg/l setzte der Abbau in *Carex gracilis* und *Juncus effusus* Systemen nach 2-2,5 Tagen ein. Bei unbepflanzten Ansätzen war in der Regel innerhalb von 5 Tagen kein einsetzender Abbau zu beobachten. Bei 18 mg/l Ausgangsbelastung betrug die lag-Phase in den bepflanzten Systemen ca. 3 Tage. Auch hier zeigte sich bei unbepflanzten Ansätzen kein einsetzender Nitrophenolabbau innerhalb von 5 Tagen.

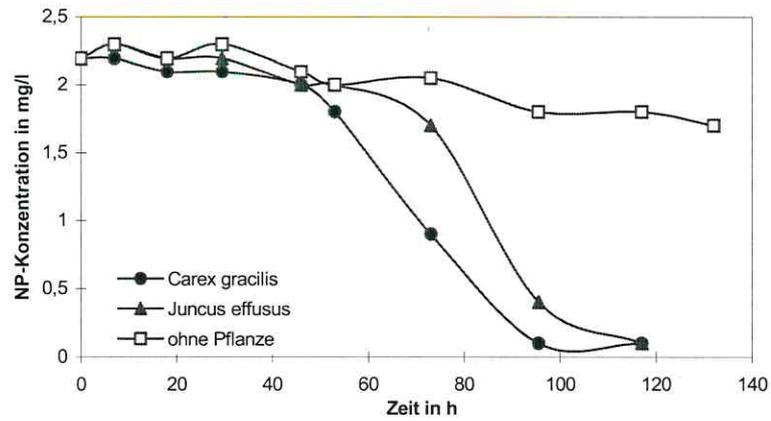


Abbildung 6: Batchversuch mit zuvor nicht exponierten *Carex* und *Juncus* Pflanzen zum 4-Nitrophenol Abbau unter Hydroponikbedingungen. Startkonzentration 2,2 mg/l.

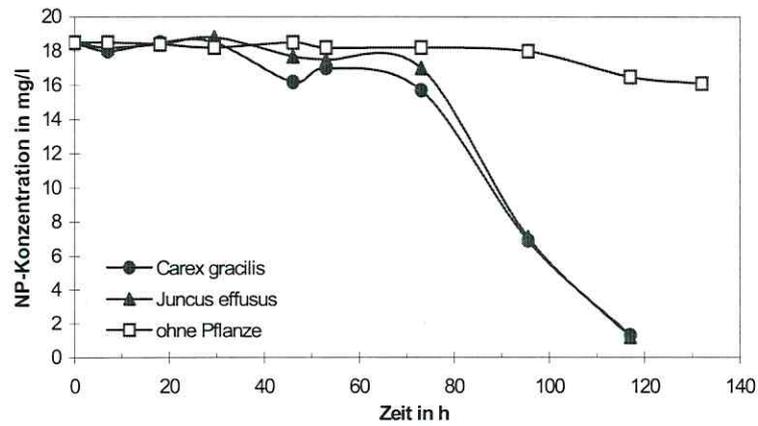


Abbildung 7: Batchversuch mit zuvor nicht exponierten *Carex* und *Juncus* Pflanzen zum 4-Nitrophenol Abbau unter Hydroponikbedingungen. Startkonzentration 18,5 mg/l.

### 3.4. Bakterielle Besiedlung der Rhizosphäre und deren Charakterisierung

#### 3.4.1. Untersuchung zur Besiedlung von Wurzel und Sand mittels Fluoreszenzmikroskopie und CLSM

Alle Versuche wurden regelmäßig von mikroskopischen Untersuchungen zur Besiedlungsverteilung begleitet. Als sehr geeignet erwies sich die Anfärbung der Bakterien mit dem Nukleinsäure-Farbstoff SYTO 9 von Molecular Probes. Kennzeichnend war bei diesen Untersuchungen die Beobachtung einer erhöhten Besiedlungsdichte im Wurzelhaarbereich. Abbildung 8 zeigt ein typisches Wurzelhaar von *Carex gracilis*. Ergänzend hierzu und beispielhaft für die höhere Besiedlungsdichte an der Wurzel im Vergleich zum Sand ist in Abbildung 9 ein auf einem Sandkorn aufliegendes Wurzelhaar gezeigt. Im weiteren war insbesondere bei jungen Wurzelbereichen bei direkter Fokussierung auf die Rhizoplane ein verstärktes Auftreten von Bakterien im Zellgrenzbereich der Rhizodermiszellen zu beobachten (siehe hierzu Abbildung 18). Die weitere Besiedlung an den Wurzeln war häufig durch punktuelle Bereiche mit verstärkter Besiedlung geprägt, ohne daß eine charakteristische Zuordnung zu bestimmten Wurzelregionen gemacht werden konnte. Insbesondere bei Wurzeln, die längerer Schadstoffexposition oder hohen Raumbel-

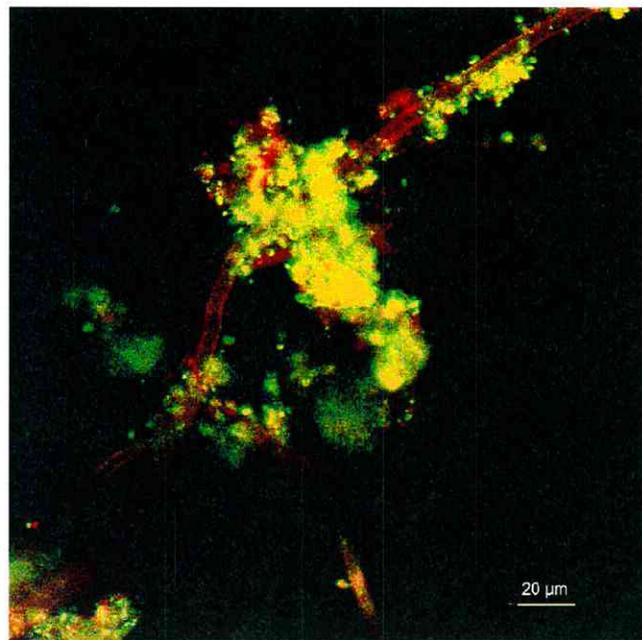


Abbildung 8: Bakterielle Besiedlung (grün-gelb) an Wurzelhaaren von *Carex gracilis*. Anfärbung mit SYTO 9.

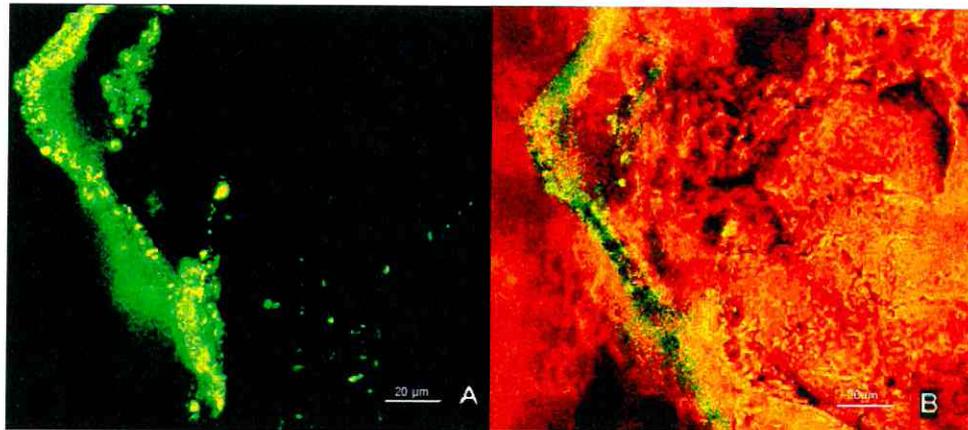


Abbildung 9: Bakterienbesiedlung (grün) eines auf einem Sandkorn aufliegenden Wurzelhaares. A, Sandkorn ausgeblendet; B, mit Sandkorn. Fluoreszenzmarkierung mit SYTO 9.

lastungen ausgesetzt waren, zeigten sich im allgemeinen vergleichend höhere Besiedlungsdichten. An der Oberfläche von Sandpartikeln war die Ausprägung des Biofilms maßgeblich durch die räumliche Entfernung zur Wurzel gekennzeichnet. Rhizosphärenbeeinflusster Sand zeigte in der Regel eine höhere Besiedlungsdichte als wurzelferner Sand. Abbildung 10 zeigt hierzu eine CLSM-Aufnahme eines Sandpartikels aus dem Wurzelbereich von *Carex gracilis*.

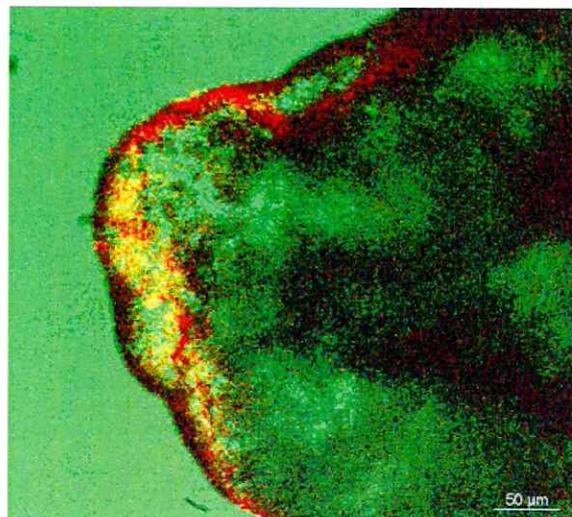


Abbildung 10: CLSM-Aufnahme eines Biofilms an einem Sandpartikel aus dem Wurzelbereich von *Carex gracilis*. Anfärbung mit SYTO 9. Rot = Biofilm.

### 3.4.2. Visualisierung aktiver Bakterien mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Für eine Einschätzung zur physiologischen Aktivität an der Wurzeloberfläche wurden Wurzeln oder Sand in tryptischen Sojaagar eingebettet, der zum Nachweis oxidativer Stoffumsätze den Reduktionsindikator 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid enthielt. Nach 1-3 Tagen indizierte rotes Formazan aktive Bereiche. Bei Wurzeln war häufig an den Wurzelspitzen eine ausgeprägte Farbstoffbildung zu beobachten. Ansonsten fiel auf, daß die Farbstoffbildung nur selten die gesamte Oberfläche umfaßte, vielmehr fand sich eine inselartige Verteilung, ohne daß Aussagen zu Orten verstärkter Aktivität gemacht werden konnten. Ältere Wurzelteile zeigten hierbei aber kaum Farbstoffbildung. Ein typisches Erscheinungsbild ist in Abbildung 11 am Beispiel einer *Carex gracilis* Wurzel zu sehen.



Abbildung 11: *Carex gracilis* Wurzeln nach Einbettung in Sojaagar, dem 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zugesetzt wurde.

Bei Sand wurden Unterschiede zum einen in Abhängigkeit von der Wurzelnähe und zum anderen bei Schadstoffexposition sichtbar. Wurzelnaher Sand zeigte hierbei eine deutlich stärkere Farbstoffbildung als wurzelferner Sand. Bei Sand aus schadstoffexponierten Systemen war generell eine höhere Aktivität zu beobachten. Abbildung 12 zeigt vergleichend Sandkörner aus einem belasteten und einem nicht schadstoffbelasteten System.

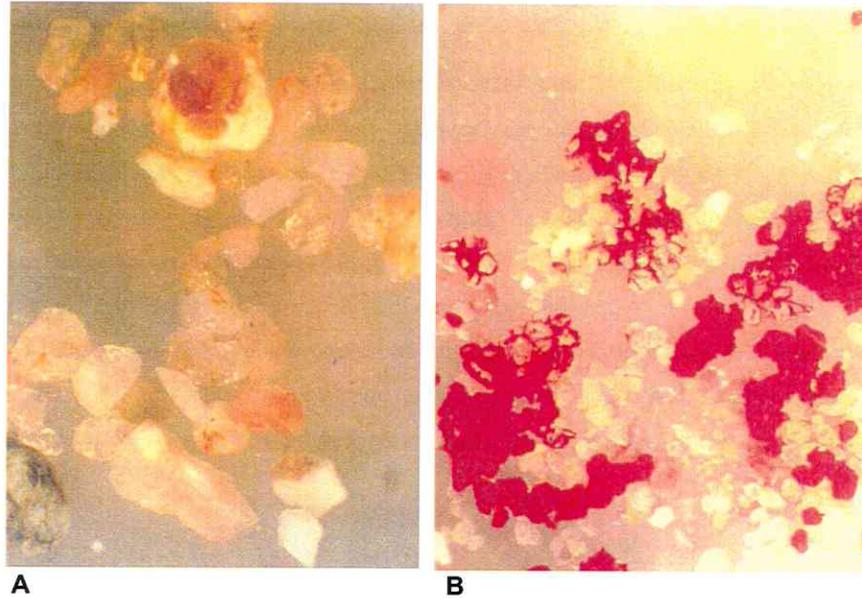


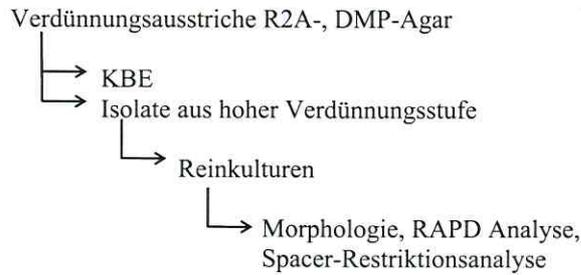
Abbildung 12: Sand aus einem DMP belasteten Ansatz (B) und aus einem nicht belasteten Kontrollansatz (A) nach Einbettung in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid -Agar.

### 3.4.3. Charakterisierung von Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an der Wurzel bei DMP Belastung

In Hydroponik- und Sandbettsystemen wurden Untersuchungen zu Veränderungen der Besiedlungsdichte, der Aktivität (DMP-Abbau) und der mikrobiellen Diversität nach Schadstoffexposition bei unterschiedlichen Raumbelastungen durchgeführt. Aussagen zur Diversität wurden anhand bakterieller Isolate mit hoher Abundanz über PCR-Fingerprinttechniken getroffen. Die Schadstoffkonzentration betrug bei allen Versuchen 50 mg/l.

#### 3.4.3.1. Veränderungen bei *Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea* nach 1monatiger DMP-Exposition

Große, gut entwickelte Pflanzen wurden für den Kontrollansatz und den DMP-Ansatz in gleich große Teile zerteilt. Die Pflanzen wurden in je 500 ml Hoagland-Lösung kultiviert. Bei schadstoffexponierten Ansätzen betrug die DMP-Konzentration 50 mg/l. Die Lösung wurde alle 3 Tage ausgetauscht, entsprechend einer Raumbelastung von 8,3 mg/l d. Nach 4 Wochen wurden von den exponierten Pflanzen und aus Kontrollansätzen Bakterien von der Rhizoplane gewonnen und folgende Bestimmungen durchgeführt:



Für einen ersten Eindruck zur mikrobiellen Besiedlungsstruktur wurden zur Zellzahlbestimmung Verdünnungsausstriche auf unselektivem R2A-Agar und auf selektivem DMP-Agar durchgeführt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Bei *Phalaris* und *Juncus* war bei den exponierten Pflanzen eine 25 bis 35fach höhere KBE auf R2A-Agar zu beobachten. Bei *Carex* zeigten die exponierten Wurzeln hingegen etwas niedrigere Zellzahlen (R2A-KBE) als die Kontrolle.

Tabelle 13: Besiedlungsdichte (KBE auf R2A- und DMP-Agar) an den Wurzeln von *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Juncus effusus* Pflanzen nach 1monatiger DMP Exposition und bei nicht belasteten Kontrollen.

	KBE / cm <sup>2</sup> (R2A-Agar)	KBE / cm <sup>2</sup> (DMP-Agar)	% Anteil an DMP- Verwertern bei Bezug auf die R2A- KBE
<i>Carex gracilis</i>			
Kontrolle	1,0 × 10 <sup>6</sup>	4,1 × 10 <sup>3</sup>	0,4
Exponierte Pflanze	3,6 × 10 <sup>5</sup>	7,7 × 10 <sup>3</sup>	2,1
<i>Phalaris arundinacea</i>			
Kontrolle	2,3 × 10 <sup>5</sup>	1,7 × 10 <sup>2</sup>	0,07
Exponierte Pflanze	5,8 × 10 <sup>6</sup>	2,1 × 10 <sup>4</sup>	0,4
<i>Juncus effusus</i>			
Kontrolle	2,5 × 10 <sup>4</sup>	1,1 × 10 <sup>1</sup>	0,04
Exponierte Pflanze	8,5 × 10 <sup>5</sup>	4,5 × 10 <sup>3</sup>	0,5

Beim Betrachten der selektiven DMP-KBE zeigt sich ein ähnlicher Trend. Während bei *Carex* die Werte im gleichen Größenbereich lagen, waren bei *Juncus* und *Phalaris* höhere Zellzahlen bei den exponierten Pflanzen zu beobachten. Besser werden Veränderungen an

der Wurzel aber beim Betrachten des prozentualen Anteils der DMP-KBE an der Gesamt (R2A) KBE sichtbar. Bei allen drei Gattungen zeigten die belasteten Wurzeln einen 5-13fach höheren Anteil an Bakterien, die auf DMP-Agar zu wachsen vermochten. Hierbei wies *Carex gracilis* bei der Kontrolle und der exponierten Pflanze prozentual den höchsten Anteil an kultivierbaren DMP-Verwertern auf.

Weitergehende Untersuchungen sind mit Isolaten aus den KBE-Ansätzen durchgeführt worden. Die Isolate wurden zur Erfassung von Bakterien mit hoher Abundanz im System aus möglichst hoher Verdünnungsstufe gewonnen, wobei die Bedingungen so gewählt wurden, daß sich zwischen 90-130 Kolonien auf den Platten befanden. Hiervon wurden in der Regel 30 Isolate pro Ansatz ausgewählt und durch mehrfaches Überimpfen als Reinkultur gewonnen. Zum Vergleich der Isolate wurden PCR-Fingerprinttechniken eingesetzt. Hierbei wurde im ersten Schritt neben der Beschreibung von morphologischen Merkmalen eine RAPD-Analyse (Random Amplified Polymorphic DNA) durchgeführt, um übereinstimmende Isolate zu bestimmen. Die RAPD-Analyse liefert sehr spezifische Muster, so daß in der Regel Unterscheidungen auf Stammebene möglich sind. Die Anzahl unterschiedlicher Isolate hatte sich so auf ca. die Hälfte verringert. In Abbildung 14, 15, Tabelle 14 und im Anhang in Tabelle 31 sind die Ergebnisse dargestellt.

Weitergehend erfolgte eine Typisierung der verbleibenden unterschiedlichen Isolate über die Amplifikation der 16S-23S rDNA Spacer-Region. Die Länge des PCR-Produkts ermöglicht vergleichend eine erste Beurteilung von Veränderungen. Es zeigte sich, daß das Amplifikat bei den Isolaten von den DMP-belasteten Pflanzen überwiegend deutlich kürzer ist. Kurze Spacer können ein Hinweis für Gram-positive Bakterien sein, da im Unterschied zu Gram-negativen Bakterien die Mehrzahl der Gram-positiven in diesen Bereich keine tRNA-Gene enthalten. Die Ergebnisse der Gram-Bestimmung bestätigten die erzielten Resultate. Es zeigte sich bei allen drei Pflanzengattungen eine Verschiebung in Richtung Gram-positiver Bakterien nach Schadstoffexposition. Interessant ist, daß ca. 2/3 der kultivierbaren DMP-Verwerter Gram-positiv waren (Tabelle 31 im Anhang). Die so erfaßten DMP verwertenden Bakterien können aber aufgrund des vergleichsweise geringen Anteils an der Biozönose (in der Größenordnung  $10^3$ - $10^4$  cm<sup>2</sup>, die Gesamt-KBE liegt bei  $10^5$ - $10^6$  cm<sup>2</sup>) nicht ursächlich für den Anstieg bei den Isolaten mit hoher Abundanz sein.

Ergänzend und diese Untersuchungen abschließend, wurde für die Isolate von *Carex gracilis* und *Phalaris arundinacea* eine Spacer-Restriktionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der RAPD-Analyse wurden so auf einem aussagekräftigeren Niveau (Spezies bis

Genus Bereich) verifiziert. Beispielhaft zeigt Abbildung 13 anhand des Kontrollansatzes von *Phalaris arundinacea* resultierende Bandenmuster im Agarosegel nach RAPD- und Spacer-Analyse.

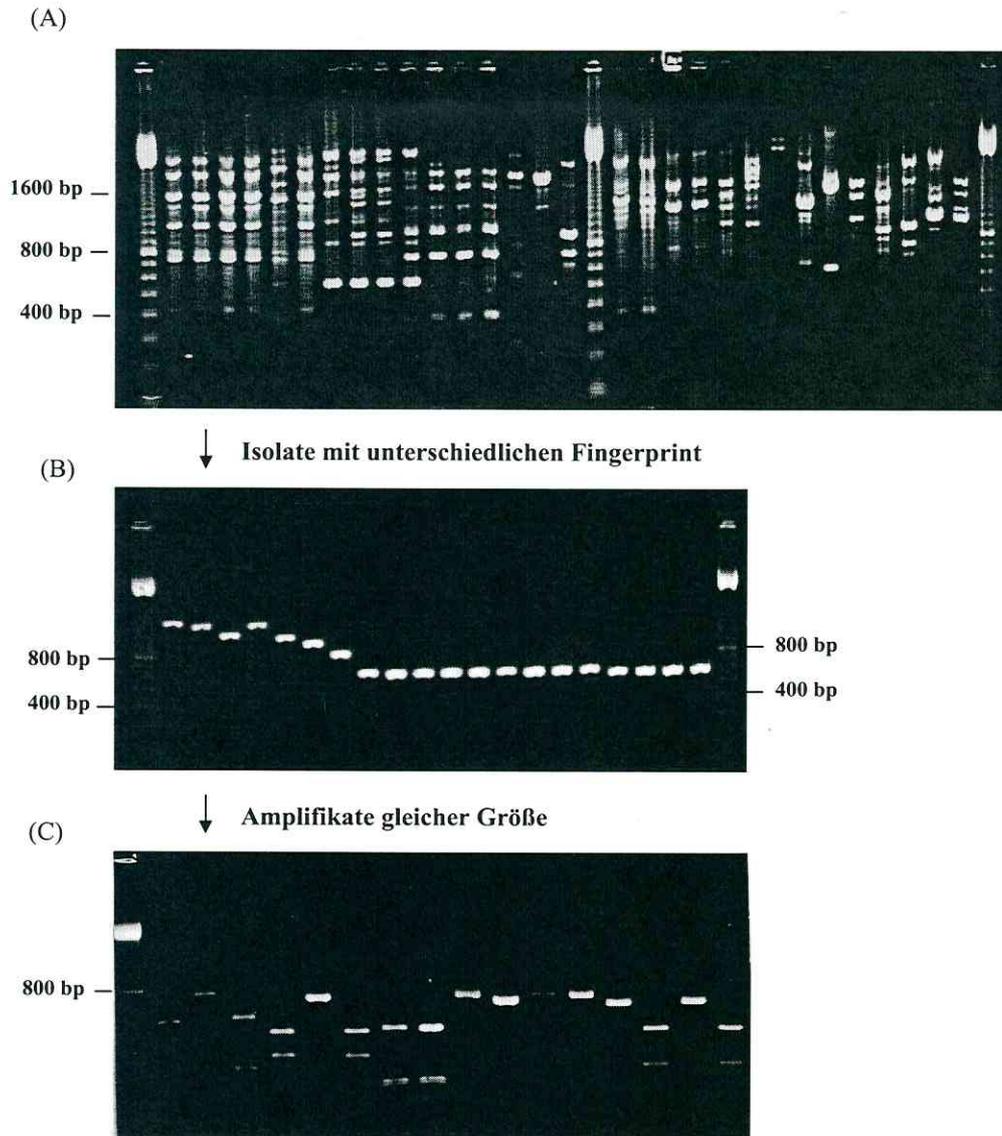


Abbildung 13: RAPD- (A), Spacer- (B) und Spacer-Restriktions-Analyse (C) für Isolate mit hoher Abundanz von der Rhizoplane von *Phalaris arundinacea* aus einem nicht DMP-exponierten System.

Für *Carex gracilis* und *Phalaris arundinacea* sind die Resultate beider Analysen in den Abbildungen 14 und 15 detailliert dargestellt. Es ist vergleichend die Kontrolle den DMP-exponierten Ansätzen gegenübergestellt. Die Isolate sind jeweils von 1-30 durchnummeriert, wobei die Ziffern bei Gram-positiven Isolaten grau hinterlegt sind. Isolate, die nach der jeweiligen Analyse (RAPD oder Spacer-Restriktion) identisch sind, sind in Kästchen zusammengefaßt. In der Mitte der Grafik sind Isolate aufgetragen, die bei Vergleich der Bandenmuster zwischen Kontrolle und exponiertem Ansatz identisch sind.

Für *Phalaris arundinacea* zeigten sich nun folgende Ergebnisse. Nach der RAPD-Analyse waren bei der Kontrolle 21 unterschiedliche Stämme und beim exponierten Ansatz 12 Stämme vorhanden. Ein Stamm kam sowohl bei der Kontrolle, als auch beim exponierten Ansatz vor. Bei der anschließenden Spacer-Restriktionsanalyse, zeigte sich eine deutlich geringere Diversität bei Schadstoffbelastung. Während bei der Kontrolle nach dieser Analyse 13 unterschiedliche Stämme vorlagen waren es beim exponierten Ansatz nur 7. Weiterhin zeigte sich auch auf diesem Niveau nur ein Stamm der in beiden Ansätzen zu finden war. Der Schadstoffeinfluß bedingt also starke Veränderungen in der mikrobiellen Struktur.

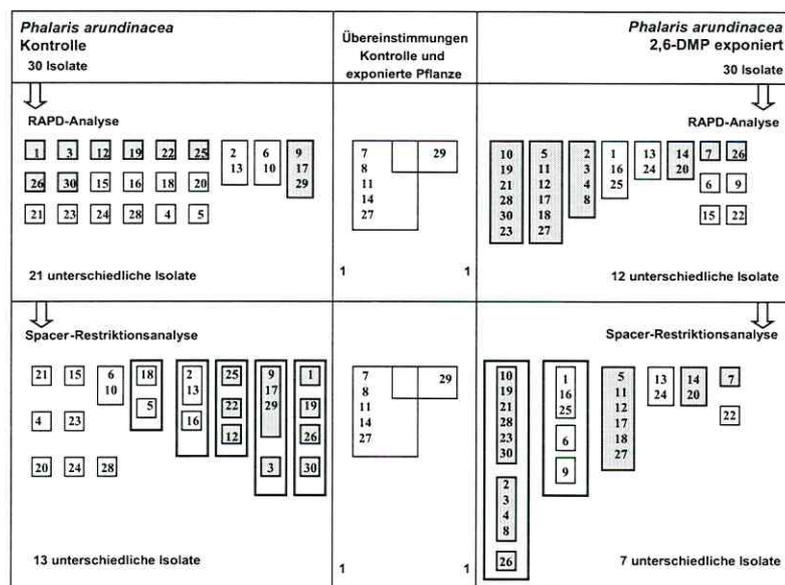


Abbildung 14: Untersuchungen abundanter Isolate von der Rhizoplane von *Phalaris arundinacea* über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse. Übereinstimmende Isolate sind in Kästchen zusammengefaßt. Grau hinterlegt = Gram-positive Isolate.

Für *Carex gracilis* sind die Ergebnisse noch etwas deutlicher. Bei Vergleich der RAPD-Bandenmuster waren keine Übereinstimmungen zu beobachten. Bei Schadstoffbelastung lagen deutlich mehr Gram-positive Bakterien mit hoher Abundanz vor. Hierdurch wird trotz ähnlicher Diversität bei Betrachtung der RAPD-Analyse bereits die grundlegende Veränderung in der mikrobiellen Struktur nach Schadstoffbelastung sichtbar. Die Länge der Spacer-Amplifikate ging mit den Ergebnissen der Gram-Färbung überein. Die Auswertung der Spacer-Restriktionsanalyse zeigte, wie auch bei *Phalaris*, eine um die Hälfte geringere Diversität bei den DMP-exponierten Pflanzen. Übereinstimmungen zwischen Kontrolle und exponierter Pflanze waren auch auf dem Niveau der Spacer-Restriktionsanalyse nicht zu beobachten.

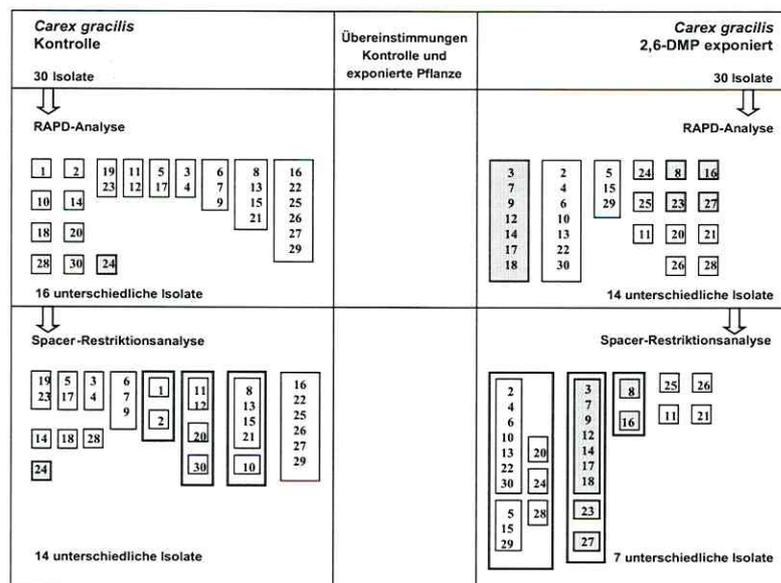


Abbildung 15: Untersuchungen abundanter Isolate von der Rhizoplane von *Carex gracilis* über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse. Übereinstimmende Isolate sind in Kästchen zusammengefasst. Grau hinterlegt = Gram-positive Isolate.

Für *Juncus effusus* sind die Ergebnisse der RAPD-Analyse und der morphologischen Charakterisierung in Tabelle 14 bzw. in Tabelle 31 im Anhang dargestellt. Die Anzahl unterschiedlicher Isolate ist nach Schadstoffexposition geringer, wobei strukturelle Veränderungen durch die Zahl Gram-positiver Isolate (Kontrolle = 4, exponierte Pflanze = 15) sichtbar werden. Ein Stamm ist sowohl bei der Kontrolle als auch beim exponierten

Ansatz zu finden. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse für alle drei Gattungen zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 14: Anzahl unterschiedlicher Isolate nach RAPD bzw. Spacer-Restriktionsanalyse.

		Kontrolle	Exponierte Pflanze
<i>Carex gracilis</i>	RAPD	16	14
	Spacer	14	7
<i>Phalaris arundinacea</i>	RAPD	21	12
	Spacer	13	7
<i>Juncus effusus</i>	RAPD	16	10
	Spacer	-	-

In Tabelle 31 im Anhang sind auch für DMP-verwertende Isolate, die auf DMP-Agar kultiviert wurden, die Ergebnisse nach RAPD-Analyse und morphologischer Charakterisierung dargestellt. Neben der Zunahme DMP-verwertender Bakterien infolge der Schadstoffexposition kommt es zumindest bei *Carex gracilis* auch zu Veränderungen in der mikrobiellen Struktur auf Grundlage der DMP-Isolate mit hoher Abundanz. Bei *Carex gracilis* werden Änderungen, bei gleicher Diversität nach der RAPD-Analyse, durch die Gram-Zusammensetzung sichtbar. Während Isolate aus dem Kontrollansatz zu 2/3 Gram-negativ sind, liegen nach Schadstoffexposition ausschließlich Gram-positiv Isolate vor. Bei *Phalaris arundinacea* gab es bei allen Isolaten des schadstoffexponierten Ansatzes Probleme bei der Zellyse, bei methodischer Begrenzung auf die Lyse in alkalischer SDS-Lösung als Standardprotokoll. Morphologisch sind aber nur 5 Typen zu unterscheiden. Bei der Kontrolle traten hingegen bei den ebenfalls überwiegend Gram-positiven Isolaten keine Probleme bei der Gewinnung eines PCR-Produktes auf, so daß auf Grundlage der RAPD Profile und morphologischer Gesichtspunkte 13 verschiedene Stämme bestimmt wurden. Für *Juncus effusus* sind keine vergleichenden Aussagen möglich. Aus der ohnehin nur sehr niedrigen Anzahl DMP-verwertender Bakterien beim Kontrollansatz, konnten nur 10 Isolate als Reinkulturen gewonnen werden. 20 Isolate zeigten nach mehreren Impfpassagen kein Wachstum mehr.

### 3.4.3.2. Änderungen im DMP-Abbaupotential und in der Besiedlungsdichte an der Wurzel von *Carex gracilis* innerhalb 3monatiger DMP-Exposition

Der Ansatz sollte über einen längeren Zeitraum die Entwicklung des Systems Pflanze-Mikroorganismen unter DMP-Einfluß aufzeigen. Untersucht wurden die Abbauleistung und die Entwicklung der Besiedlungsdichte an der Wurzel. Eine *Carex gracilis* Pflanze wurde hierbei in einem Reaktorgefäß über die Versuchszeit von 13 Wochen mit einer DMP-Konzentration von 50 mg/l bei einer Raumbelastung von 53 mg DMP/l d belastet. Um das vorhandene Abbaupotential zu bestimmen, wurde aber zeitweilig die Zulaufmenge schrittweise erhöht, bis kein vollständiger Abbau mehr stattfand. Die nächst geringere Raumbelastung, bei der noch eine 80 %ige Abnahme der DMP Konzentration gemessen wurde, wurde als maximale Abbauleistung definiert und vermerkt. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse dargestellt. Die letzte Messung fand nach 13 Wochen Betriebszeit statt, wobei es zwischen der 4. und 13. Woche zu einer Verdopplung der max. Abbauleistung auf 113 mg DMP pro l Reaktorvolumen und Tag kam.

Tabelle 15: Entwicklung der bakteriellen Besiedlungsdichte an den Wurzeln von *Carex gracilis* und der Abbauleistung bei Exposition mit 50 mg/l DMP.

Versuchszeit	maximale Abbauleistung mg DMP / l d	R2A-Agar KBE/cm <sup>2</sup> Wurzel	DMP-Agar KBE/cm <sup>2</sup> Wurzel
4 Wochen	55	7,8×10 <sup>6</sup>	3,5×10 <sup>5</sup>
6 Wochen	73		
10 Wochen		1,9×10 <sup>7</sup>	2,3×10 <sup>5</sup>
13 Wochen	113	3,6×10 <sup>7</sup>	4,4×10 <sup>5</sup>
Kontrolle nicht exponiert		6,6×10 <sup>5</sup>	5,7×10 <sup>2</sup>

Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlung der Wurzeln wurden nach Ablösen der Bakterien von der Wurzeloberfläche durch Bestimmung der KBE bei exponierten und vergleichend bei nicht exponierten Pflanzen untersucht. Als Medien für die KBE wurde unselektiver R2A-Agar und ein selektiver Agar mit DMP als alleinige C-Quelle eingesetzt. Es wurden nach 4, 10 und 13 Wochen Bestimmungen durchgeführt. DMP-exponierte Wurzeln zeigten hierbei eine hohe bakterielle Besiedlung, die vereinzelt auch ohne Mikroskop als flockige Auflagerung im Wurzelhaarbereich zu erkennen war. Im

Unterschied zu den unter 3.4.3.1. beschriebenen Ergebnissen für *Carex gracilis* ergab sich eine bis zu 55fach höhere Besiedlungsdichte bei den schadstoffexponierten Wurzeln für die R2A-KBE Werte. Für DMP-verwertende Bakterien waren bis zu 770fach höhere Zellzahlen zu beobachten. Durch die starke Zunahme der Gesamtbesiedlungsdichte stellte sich der relative Anteil der über DMP-Agar bestimmten Bakterien an der R2A-KBE allerdings nicht so ausgeprägt dar. Nach 13 Wochen betrug er beim exponierten Ansatz 1,2 %, der Kontrollansatz enthielt 0,09 %.

Bei gleichem Versuchsaufbau ohne Variation der Raumbelastung sind mehrere Wiederholungen mit jeweils zuvor unbelasteten Pflanzen durchgeführt worden bei Versuchszeiten bis zu 6 Monaten. Die Ergebnisse gingen im Trend mit den hier dargestellten überein. Alle Ansätze zeigten eine eindeutige Zunahme in der Gesamtbesiedlungsdichte, sowie eine Zunahme von Gram-positiven Bakterien bei Isolaten mit hoher Abundanz.

#### **3.4.3.3. Entwicklung der Abbauleistung in bepflanzen Sandbettsystemen**

Ergänzend zu den Hydroponiksystemen wurden Untersuchungen in mit *Carex gracilis* bepflanzen Sandbettsystemen durchgeführt. Neben der Rhizoplane mit einer Oberfläche im Bereich von ca. 0,1 m<sup>2</sup> pro Pflanze stand als Aufwuchsfläche die wesentlich höhere Oberfläche des Sandes (ca. 4,2 m<sup>2</sup>) zur Verfügung. DMP wurde in einer Konzentration von 50 mg/l bei einer Raumbelastung von 67 mg/1000 cm<sup>3</sup> d zugeführt. Abbildung 16 zeigt die Entwicklung der Abbauleistung des Systems. Es stellte sich innerhalb der ersten 12 Wochen eine Abbauleistung von ca. 59 mg/1000 cm<sup>3</sup> d ein. Um einen Eindruck über die Bedeutung der Rhizosphäre hinsichtlich des DMP Abbaus zu bekommen, wurde die Pflanze nach 12 Wochen aus dem Sandbettsystem entfernt. Die Abbauleistung sank daraufhin auf ca. 26 mg/1000 cm<sup>3</sup> d ab und blieb während der verbleibenden 4wöchigen Versuchszeit auf diesem Niveau. Die Bedeutung der Pflanze für die Abbauleistung wird deutlich. Bestätigt wurde dieses durch ergänzende Untersuchungen zur Besiedlungsdichte bei Sand aus dem Wurzelbereich eines bepflanzen Systems verglichen mit der Zellzahl am Sand eines unbepflanzen Systems. Sand aus dem bepflanzen System zeigte nach 8wöchiger DMP Belastung mit  $2,4 \times 10^7$  Bakterien (KBE auf R2A-Agar) pro Gramm Sand eine 24fach höhere Besiedlungsdichte als das unbepflanzen System mit einer KBE von  $9,8 \times 10^5$  / g. Für DMP verwertende Bakterien stellte sich mit  $3,6 \times 10^6$  / g eine 63fach höhere Besiedlungsdichte beim bepflanzen System ein.

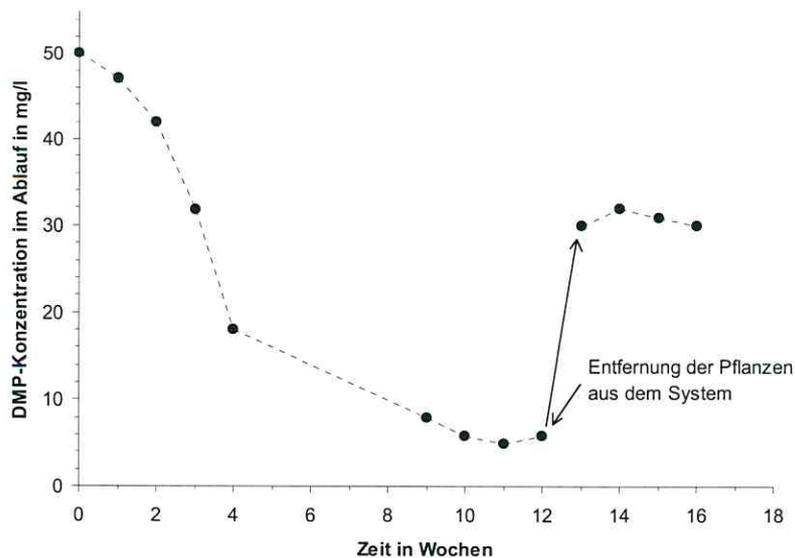


Abbildung 16: Entwicklung der DMP Abbauleistung in einem *Carex gracilis* Sandbett-system bei einer Raumbelastung von  $67\text{mg}/1000\text{cm}^3$  d.

#### 3.4.4. Charakterisierung von Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlungsstruktur von Hydroponik- und Sandbett-Systemen bei Belastung mit 4-Nitrophenol

Sandbett- und Hydroponik-Systeme mit *Carex gracilis* oder *Juncus effusus* bzw. unbepflanzte Systeme wurden hinsichtlich Veränderungen bei Belastung mit 2 und 20 mg/l 4-Nitrophenol untersucht. Hierbei wurden Änderungen in den Zellzahlen, der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönosen und der Aktivität Nitrophenol-verwertender Bakterien an der Wurzel- bzw. Sandoberfläche sowie die sich in den Systemen einstellende Abbauleistung betrachtet.

Jeder Ansatz bestand aus einem Versuchsgefäß mit je 6 Pflanzen. Für die Versuche im Sandbett fand gewaschener Sand mit einem Durchmesser von 0,4-0,63 mm Verwendung. Das entsprach bei der eingesetzten Sandmenge einer Sandoberfläche von ca.  $29,5\text{ m}^2$ . Um einen Vergleich zur Oberfläche an den Wurzeln vornehmen zu können, wurden für jede Gattung jeweils mehrere Wurzeln hinsichtlich Länge, Zunahme der Dicke, Anzahl an Seitenwurzeln mit Durchmesser und Länge sowie Anzahl, Länge und Durchmesser der Wurzelhaare bestimmt. Aus der sich ergebenden durchschnittlichen Oberfläche wurde dann

je nach Anzahl der Wurzeln bei den verwendeten Pflanzen die insgesamt vorhandene Oberfläche abgeschätzt. Hieraus ergab sich für das *Carex gracilis* Sandbettssystem eine Wurzeloberfläche von ca. 0,6 m<sup>2</sup> im Unterschied zu der mit 29,5 m<sup>2</sup> deutlich höheren Sandoberfläche. Für das *Juncus effusus* Sandbettssystem betrug die Wurzeloberfläche ca. 1 m<sup>2</sup>. Neben unbelasteten Kontrollsystemen wurden unterschiedliche Schadstoffbelastungen untersucht. Sandbettssysteme (bepflanzt mit *Carex gracilis* oder *Juncus effusus* sowie unbepflanzte Systeme) wurden mit 2 mg/l und 20 mg/l 4-Nitrophenol über 2 Monate belastet. Die mit 20 mg/l exponierten Systeme sind folgend für weitere 2 Monate mit 2 mg/l beschickt worden. Hydroponiksysteme wurden hingegen nur mit einer Nitrophenolkonzentration von 20 mg/l exponiert. Der Schadstoff wurde diskontinuierlich (18x pro Tag je 15 min) in Nährlösung bei einem Volumenstrom von 710 ml/d dosiert.

#### **3.4.4.1. Mikrobielle Besiedlungsdichten in Sandbett- und Hydroponiksystemen**

Am Ende der jeweiligen Belastungszeiträume wurden die Zellzahlen an den Wurzeln und am Sand über die KBE bestimmt. Neben der KBE auf R2A-Agar zur Einschätzung der mikrobiellen Besiedlungsdichte, wurden Nitrophenol verwertende Bakterien über NP-Agar sowie Pilze und fluoreszierende Pseudomonaden über Malzagar bzw. Pseudomonaden-Agar bestimmt. Pilze und fluoreszierende Pseudomonaden spielten zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle. Die Werte hierfür sind im Anhang unter Tabelle 30 aufgeführt. In den Tabellen 16 – 22 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Zellzahlen wurden jeweils auf die Oberfläche bezogen (KBE /cm<sup>2</sup>).

Zusammengefaßt zeigte sich an den Wurzeln, unabhängig von einer Schadstoffexposition, eine höhere Besiedlungsdichte im Vergleich zu wurzelnahe Sand. *Carex gracilis* sowie *Juncus effusus* wiesen direkt an der Wurzel eine um Faktor 5-10 höhere Besiedlungsdichte auf als der umgebende Sand. Gleiches zeigte sich auch für die kultivierbaren NP-Verwerter. Auch hier war an den Wurzeln bei allen Ansätzen, auch bei den nicht exponierten Kontrollen, eine 5-14fach höhere Besiedlungsdichte zu beobachten. Bei Vergleich dieser Ergebnisse von den bepflanzten Systemen mit den Zellzahlen am Sand von unbepflanzten Systemen, wird der Einfluß der Pflanzen auf die sich am Sand einstellende Besiedlungsdichte deutlich. Die Besiedlungsdichte am Sand der bepflanzten Systeme war nach der KBE für R2A-Agar 10–35fach höher und für NP-Verwerter 7-30fach höher als am Sand unbepflanzter Systeme.

Bei Bezug der Zellzahlen auf die geschätzte Gesamtoberfläche im System zeigten die *Juncus effusus* Systeme die höchste Anzahl an NP-Verwertern. Die geschätzte

Gesamtanzahl an NP-Verwertern lag 1,6 – 2,9fach höher als in den Carex-Systemen. Die niedrigsten Gesamtzellzahlen an NP-Verwertern wiesen die unbepflanzten Systeme auf. Bei Vergleich mit Carex-Systemen zeigten sich 7-12fach niedrigere Werte und bei Vergleich mit Juncus-Systemen 22-31fach geringere Zellzahlen.

Trotz der höheren Besiedlungsdichte an den Wurzeln führte die deutlich höhere Sandoberfläche (ca. 29,5 m<sup>2</sup>/System, die Wurzeloberfläche liegt hingegen bei ca. 0,6 - 1 m<sup>2</sup>/System) dazu, daß im Gesamtsystem mehr NP-Verwerter am Sand lokalisiert waren, als direkt an der Wurzel. Bei beiden Pflanzen-Systemen lagen hierdurch die NP-Verwerter Zahlen, die an der Sandoberfläche lokalisiert waren, 2,4-10fach höher als an den Wurzeln.

Mit zunehmender Schadstoffbelastung zeigte sich eine Zunahme des Anteils der NP-Verwerter an der Gesamtzellzahl bei Wurzeln und Sand. Bei einer nachfolgenden Verringerung der Nitrophenolkonzentration (von 20 mg/l auf 2 mg/l) bleibt der prozentuale Anteil an NP-Verwertern aber in dem Bereich, der sich nach 2monatiger Belastung mit 20 mg/l zeigte. Im Unterschied zu den NP-Verwertern waren bei der Gesamtbesiedlungsdichte an den Wurzeln- und Sandoberflächen keine eindeutigen Veränderungen durch die Schadstoffexposition zu beobachten.

Tabelle 16: Zellzahlen nach 2 Monaten in *Carex gracilis* Hydroponiksystemen bei Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.

<i>Carex gracilis</i> Hydroponik		R2A-Agar KBE	NP-Agar KBE	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	1,7 × 10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup>	1,8% 3,0×10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup>	1,8 × 10 <sup>7</sup>
	Wasser	2,0 × 10 <sup>4</sup> / ml	3,1% 6,1×10 <sup>2</sup> /ml	2,1 × 10 <sup>6</sup>
				2,0 × 10 <sup>7</sup> /Reaktor
NP- exponiert 20 mg/l	Wurzel	2,2 × 10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup>	15% 3,4×10 <sup>4</sup> /cm <sup>2</sup>	2,0 × 10 <sup>8</sup>
	Wasser	3,7 × 10 <sup>4</sup> /ml	14% 5,3 × 10 <sup>3</sup> /ml	1,8 × 10 <sup>7</sup>
				2,2 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor

Tabelle 17: Zellzahlen nach 2 Monaten in *Carex gracilis* Sandbettssystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.

<i>Carex gracilis</i> Sandbett		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	2,3 × 10 <sup>5</sup>	1,5% 3,4 × 10 <sup>3</sup>	2,0 × 10 <sup>7</sup>
	Sand	4,6 × 10 <sup>4</sup>	1% 4,8 × 10 <sup>2</sup>	1,4 × 10 <sup>8</sup>
				1,6 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor
NP- exponiert 2 mg/l	Wurzel	2,0 × 10 <sup>5</sup>	8,6% 1,7 × 10 <sup>4</sup>	1,0 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	3,6 × 10 <sup>4</sup>	9,1% 3,3 × 10 <sup>3</sup>	1,0 × 10 <sup>9</sup>
				1,1 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor
NP- exponiert 20 mg/l	Wurzel	4,1 × 10 <sup>5</sup>	15% 6,3 × 10 <sup>4</sup>	3,7 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	4,1 × 10 <sup>4</sup>	11% 4,3 × 10 <sup>3</sup>	1,3 × 10 <sup>9</sup>
				1,7 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor

Tabelle 18: Zellzahlen in *Carex gracilis* Sandbettssystemen nach 2monatiger Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol gefolgt von einer 2monatigen Belastung mit 2 mg/l bzw. nach 4 Monaten bei der unbelasteten Kontrolle.

<i>Carex gracilis</i> Sandbett		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	6,2 × 10 <sup>5</sup>	1,2% 7,4 × 10 <sup>3</sup>	4,4 × 10 <sup>7</sup>
	Sand	7,9 × 10 <sup>4</sup>	1,1% 8,6 × 10 <sup>2</sup>	2,5 × 10 <sup>8</sup>
				2,9 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor
NP- exponiert	Wurzel	5,5 × 10 <sup>5</sup>	18% 9,8 × 10 <sup>4</sup>	5,8 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	6,8 × 10 <sup>4</sup>	13% 8,9 × 10 <sup>3</sup>	2,8 × 10 <sup>9</sup>
				3,4 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor

Tabelle 19: Zellzahlen nach 2 Monaten in *Juncus effusus* Hydroponiksystemen bei Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.

<i>Juncus effusus</i> Hydroponik		R2A-Agar KBE	NP-Agar KBE	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	2,7 × 10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup>	0,8% 2,1 × 10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup>	2,0 × 10 <sup>7</sup>
	Wasser	1,2 × 10 <sup>4</sup> /ml	0,8% 1,0 × 10 <sup>2</sup> /ml	3,5 × 10 <sup>5</sup>
				2,0 × 10 <sup>7</sup> /Reaktor
NP- exponiert 20 mg/l	Wurzel	3,2 × 10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup>	6,6% 2,1 × 10 <sup>4</sup> /cm <sup>2</sup>	2,0 × 10 <sup>8</sup>
	Wasser	3,4 × 10 <sup>4</sup> /ml	4% 1,4 × 10 <sup>3</sup> /ml	4,8 × 10 <sup>6</sup>
				2,0 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor

Tabelle 20: Zellzahlen nach 2 Monaten in *Juncus effusus* Sandbettsystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.

<i>Juncus effusus</i> Sandbett		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	4,1 × 10 <sup>5</sup>	2,1% 8,5 × 10 <sup>3</sup>	8,3 × 10 <sup>7</sup>
	Sand	5,7 × 10 <sup>4</sup>	2,1% 1,2 × 10 <sup>3</sup>	3,5 × 10 <sup>8</sup>
				4,3 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor
NP- exponiert 2 mg/l	Wurzel	5,3 × 10 <sup>5</sup>	8,5% 4,5 × 10 <sup>4</sup>	4,4 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	6,0 × 10 <sup>4</sup>	14% 8,2 × 10 <sup>3</sup>	2,4 × 10 <sup>9</sup>
				2,8 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor
NP- exponiert 20 mg/l	Wurzel	4,7 × 10 <sup>5</sup>	19% 8,7 × 10 <sup>4</sup>	5,2 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	1 × 10 <sup>5</sup>	16% 1,6 × 10 <sup>4</sup>	4,5 × 10 <sup>9</sup>
				5,0 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor

Tabelle 21: Zellzahlen in *Juncus effusus* Sandbettsystemen nach 2monatiger Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol gefolgt von einer 2monatigen Belastung mit 2 mg/l bzw. nach 4 Monaten bei der unbelasteten Kontrolle.

<i>Juncus effusus</i> Sandbett		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Wurzel	5,8 × 10 <sup>5</sup>	2,4% 1,4 × 10 <sup>4</sup>	1,4 × 10 <sup>8</sup>
	Sand	3,9 × 10 <sup>4</sup>	2,8% 1,1 × 10 <sup>3</sup>	3,3 × 10 <sup>8</sup>
				4,7 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor
NP- exponiert	Wurzel	5,5 × 10 <sup>5</sup>	21% 1,2 × 10 <sup>5</sup>	1,1 × 10 <sup>9</sup>
	Sand	1,3 × 10 <sup>5</sup>	16% 2,1 × 10 <sup>4</sup>	6,3 × 10 <sup>9</sup>
				7,4 × 10 <sup>9</sup> /Reaktor

Tabelle 22: Zellzahlen nach 2 Monaten in unbepflanzten Sandbettsystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.

Sand unbepflanz		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	Geschätzte Gesamtzahl an NP- Verwertern
Kontrolle	Sand	2,4 × 10 <sup>3</sup>	2,8% 6,6 × 10 <sup>1</sup>	2,0 × 10 <sup>7</sup> /Reaktor
NP-exponiert 2 mg/l	Sand	3,7 × 10 <sup>3</sup>	8,4% 3,1 × 10 <sup>2</sup>	9,3 × 10 <sup>7</sup> /Reaktor
NP-exponiert 20 mg/l	Sand	2,8 × 10 <sup>3</sup>	19% 5,3 × 10 <sup>2</sup>	1,6 × 10 <sup>8</sup> /Reaktor

### 3.4.4.2. Aussagen zur Aktivität der Nitrophenol Verwertung an Sand- und Wurzeloberflächen

Zur besseren Beurteilung der Zellzahlen der Nitrophenol verwertenden Bakterien wurden ergänzend zu den vorherigen Untersuchungen Abbauuntersuchungen mit dem gleichen Ausgangsmaterial (die von den Wurzeln bzw. Sand gewonnenen Bakteriensuspensionen) kurz nach Probegewinnung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Das Wachstum auf dem Nitrophenolagar spiegelt nur das Potential der aufgebrauchten Bakterien wieder, unter diesen selektiven Bedingungen zu wachsen, erlaubt aber keine Aussage über die tatsächliche Aktivität der Bakterien vor Ort. Hierfür wurde mit geringen Mengen des Probematerials in 1 ml Reaktionsvolumen die Zeit bis zum einsetzenden Nitrophenol Abbau in jeweils 4 Parallelansätzen bestimmt. Die Dauer bis zum einsetzenden Nitrophenolabbau erlaubt hierbei eine vergleichende Aussage (z.B. Wurzeloberfläche vs. Sandoberfläche) zur Aktivität der Nitrophenol Verwertung am jeweiligen Probenahmeort. Die Zeitdauer wurde aus dem Kurvenverlauf des Abbaus bestimmt, wobei als Wert die Zeit genommen wurde, bei der sich mit einsetzendem Abbau die Ausgangskonzentration um 10 % verringert hatte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt. Bei bepflanztten Ansätzen zeigten die von den Wurzeln gewonnenen Bakteriensuspensionen eine schneller einsetzende Nitrophenolverwertung als die Proben von wurzelnahe Sand, bei vergleichbaren Zellzahlen in den zugrundeliegenden Bakteriensuspensionen. Bei den nicht exponierten Kontrollansätzen setzte der Abbau erst nach 5-7 Tagen ein. Mit einsetzendem Abbau war dann aber bei allen Ansätzen innerhalb von ca. 8-10 h ein vollständiger Umsatz des vorhandenen Nitrophenols zu beobachten. Ausgeprägte Unterschiede zur Aktivität am Sand adhärerter Bakterien zeigten sich bei Vergleich des unbepflanzten Systems mit den bepflanztten Sandbettansätzen.

Tabelle 23: Dauer bis zum einsetzenden Nitrophenolabbau in 1 ml Testansätzen. ( $\pm$  Standardabweichung, n = 4)

		Zeit in h bis zum beginnenden Nitrophenolabbau
<i>Carex gracilis</i>	Wurzel	7,5 ( $\pm$ 0,11)
	Sand	9,5 ( $\pm$ 0,14)
<i>Juncus effusus</i>	Wurzel	2,6 ( $\pm$ 0,45)
	Sand	4,5 ( $\pm$ 0,22)
Unbepflanztes Sandbett	Sand	23 ( $\pm$ 0,54)

Die bepflanzten Systeme enthielten hiernach, zusätzlich zu den höheren Zellzahlen (s.o.), einen höheren Anteil physiologisch aktiver Bakterien (hinsichtlich NP-Verwertung und Teilungsaktivität der NP-Verwerter). Es lag also insgesamt eine stärkere Ausrichtung auf Nitrophenolverwertung vor.

### 3.4.4.3. Abbauleistung in Systemen nach 2monatiger Nitrophenol-Belastung

Nach 2 Monaten Betriebszeit wurden, neben den Bestimmungen zur Besiedlungsdichte und der Aktivität der NP-Verwerter, Untersuchungen zur NP-Abbauleistung bei den mit 20 mg/l belasteten Systemen durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die Entwicklung der Nitrophenol-Verwertung in den Systemen innerhalb der ersten 2 Monate. Bei allen Systemen hatte sich ein stabiles Niveau bei der Abbauleistung eingestellt, wobei die bepflanzten Systeme einen nahezu vollständigen Abbau zeigten und das unbepflanzte Sandbettssystem eine ca. 80%ige Abbauleistung aufwies.

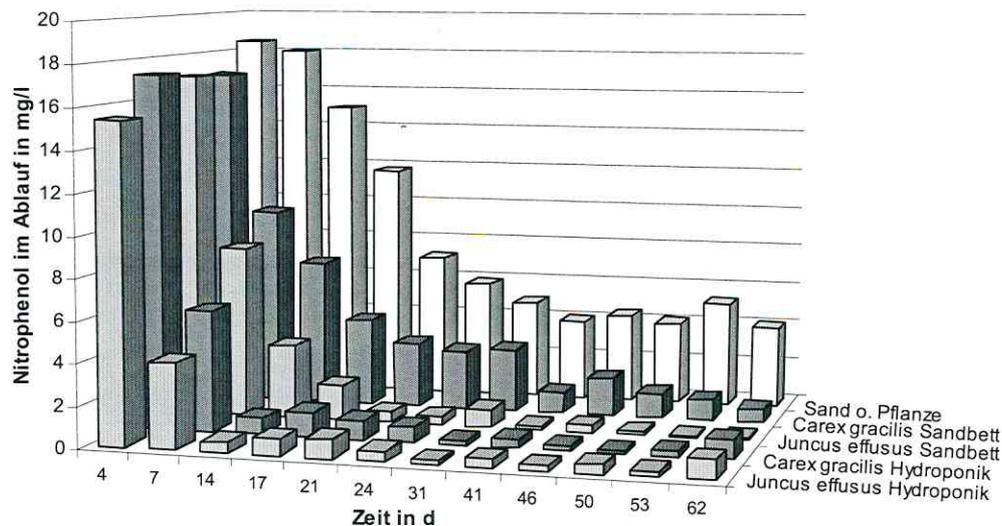


Abbildung 17: Entwicklung der NP-Konzentration im Ablauf innerhalb der ersten 2 Monate nach Inbetriebnahme. Zulaufkonzentration 20 mg/l, Zulaufmenge 711 ml/d Gefäß.

Zum Bestimmen der maximalen Abbauleistung wurde nun die Zulaufmenge schrittweise erhöht. Die maximale Abbauleistung wurde definiert als Raumbelastung, bei der im Auslauf ein noch 80% Abbau (Konzentrationsabnahme der Ausgangsverbindung) festgestellt werden kann. Um Hydroponik- und Sandbett-Systeme hinsichtlich ihrer Abbauleistung bei

gleicher Verweilzeit im System beurteilen zu können, ist als Bezugsgröße für die Raumbelastung Liter Flüssigkeitsvolumen (in Sandbett Systemen = Zwischenkornvolumen) gewählt worden. Da die Pflanzen Nitrophenol unselektiv mit dem Transpirationsstrom aufnehmen (siehe 3.2.), wurde aus dem Wasserverbrauch der Pflanzen die aufgenommene NP-Menge (bei 20% NP-Restkonzentration im Gefäß) abgeschätzt. Der Wert lag für Carex und Juncus bei ca. 1 mg/d Gefäß. Die maximale Abbauleistung wurde um diese Werte korrigiert. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, daß das Abbaupotential in den bepflanzten Ansätzen 2,5 – 3fach höher war, als beim unbepflanzten Ansatz.

Tabelle 24: Maximale Abbauleistung verschiedener Systeme nach 2monatiger Nitrophenol-Exposition.

System	Carex Hydroponik	Juncus Hydroponik	Carex Sandbett	Juncus Sandbett	Sandbett ohne Pflanzen
Maximale Abbauleistung mg / l d	15,6	15,4	12,5	14,9	5,0

In den Tabellen 16 – 22 s.o. ist die Anzahl Nitrophenol verwertender Bakterien in den Systemen vor Beginn der Bestimmung der Abbauleistung dargestellt. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit den höheren Abbauraten der bepflanzten Systeme eine ca. 11fach (*Carex gracilis* System) bzw. 31fach (*Juncus effusus* System) höhere geschätzte Gesamtzellzahl an NP-Verwertern, als in den unbepflanzten Sandbettsystemen. Bei den Hydroponiksystemen waren hingegen trotz der hohen Abbauleistung nur Zellzahlen wie auch in den unbepflanzten Sandbettsystemen zu finden. Noch deutlicher war dieses bei Vergleich der bepflanzten Hydroponiksysteme mit den bepflanzten Sandbettsystemen. Bei Juncus waren ca. 25fach geringere Zellzahlen im Hydroponiksystem bei Vergleich mit den bepflanzten Sandbettsystemen vorhanden. Ursächlich für die höhere Abbauleistung in den Hydroponiksystemen bei Bezug auf die Zahl NP-verwertender Bakterien und der fehlenden Parallelität zwischen Zellzahl und Abbauleistung bei den Sandbettsystemen dürfte die Sauerstoffversorgung in den Systemen sein. Während unter Hydroponikbedingungen die Sauerstoffkonzentration auch bei höherer Raumbelastung nicht für aerobe Prozesse limitierend war, sank die O<sub>2</sub>-Konzentration im Festbettreaktor bei erhöhter Raumbelastung auf 0 % ab. Sauerstoff wurde zum limitierenden Faktor. Interessant ist in diesen Zusammenhang die Beobachtung einer höheren Besiedlungsdichte entlang der Zellwandlinien an der Wurzeloberfläche, die ihre Ursache in dem in diesen Bereichen

verstärkt austretenden Sauerstoff haben könnte. Abbildung 18 zeigt eine CLSM Aufnahme einer *Carex gracilis* Wurzel. Zusammen mit den Werten zur physiologischen Aktivität beim Vergleich Wurzeloberfläche vs. Sandoberfläche in bepflanzten Systemen weist dieses auf die Bedeutung der Sauerstofffreisetzung durch die Wurzeln für den Schadstoffabbau hin. Zusammengefaßt spiegeln die Ergebnisse insbesondere bei Vergleich bepflanzter mit unbepflanzten Systemen die Bedeutung des Rhizosphäreneffekts für die Nitrophenolverwertung wider. Es sind in bepflanzten Systemen insgesamt mehr NP-verwertende Bakterien vorhanden, diese sind hinsichtlich des NP-Abbaus physiologisch aktiver und es werden höhere Abbauraten erreicht.

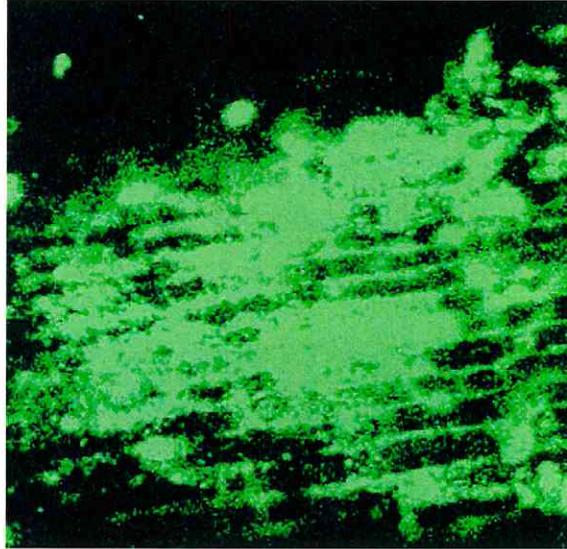


Abbildung 18: CLSM-Aufnahme der Oberfläche einer *Carex gracilis* Wurzel. Färbung mit SYTO 9.

#### **3.4.4.4. Bakterielle Populationsanalyse an Wurzel- oder Sandoberflächen anhand abundanter, kultivierbarer Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter rRNA-gerichteter Oligonucleotid-Sonden**

Nach zwei Monaten Belastung mit Nitrophenol wurden zusammen mit den KBE-Ansätzen zur Zellzahlbestimmung (siehe 3.4.4.1) von den unterschiedlichen Ansätzen jeweils 30 Isolate aus hoher Verdünnungsstufe gewonnen. Verwendung fanden Agarplatten mit komplexem R2A-Medium. Die Verdünnungsstufen wurden hierbei so gewählt, daß sich bei der höchst möglichen Verdünnungsstufe 90-130 Kolonien auf den Agarplatten befanden. Hiervon wurden als Repräsentanten mit hoher Abundanz an der Wurzel oder am Sand

willkürlich jeweils 30 Isolate ausgewählt und durch mehrfaches Überimpfen als Reinkultur gewonnen.

Für die Analyse der so insgesamt 570 erhaltenen Isolate wurden gruppenspezifische fluoreszenzmarkierte rRNA-gerichtete Oligonucleotid-Sonden als schnelles Verfahren zur Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit eingesetzt, um Veränderungen in der mikrobiellen Struktur aufzuzeigen. Verwendung fanden Sonden für die Alpha-, Beta- und Gamma-Gruppe der Proteobakterien, Sonden für Cytophaga-Flexibacter, Xanthomonas und Gram-positive mit hohem GC Gehalt. In den Tabellen 25 – 27 sind die Ergebnisse der verschiedenen Systeme nach Exposition mit 2 mg/l NP, 20 mg/l NP bzw. bei unbelasteten Kontrollen dargestellt.

Bei *Carex gracilis* waren starke Veränderungen in der mikrobiellen Struktur nach Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol zu beobachten. Im Vergleich zur Besiedlung der Wurzeloberfläche beim nicht belasteten Kontrollansatz zeigte sich eine starke Verschiebung zu Beta-Proteobakterien, wohingegen Alpha- und Gamma-Proteobakterien in ihrem Anteil abnahmen. An der Sandoberfläche ergaben sich ähnliche Veränderungen, wenn auch nicht so ausgeprägt.

Tabelle 25: Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Wurzel- oder Sandoberfläche in *Carex gracilis* Systemen ohne Nitrophenol Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.

<i>Carex gracilis</i>		Alpha	Beta	Gamma	XAN	CF	Gram +	HGC	Kein Ergebnis	
Sandbett	Wurzel	Kontrolle	39,3	0	39,3	3,6	7,1	3,6	3,6	7,1
		2 mg/l	40	10	23,3	0	0	6,7	6,7	20
		20 mg/l	13,8	51,7	10,3	3,4	0	13,8	10,3	6,9
	Sand	Kontrolle	36,7	6,7	16,7	3,3	0	23,3	20	13,3
		2 mg/l	40	13,3	20	0	0	16,7	10	10
		20 mg/l	17,2	41,4	6,9	0	3,4	17,3	10,3	13,8
Hydro- ponik	Wurzel	Kontrolle	27,6	10,3	27,6	0	10,3	10,3	3,4	13,8
		20 mg/l	22,2	37,0	0	3,7	7,4	14,8	7,4	14,8

Tabelle 26: Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Wurzel- oder Sandoberfläche in *Juncus effusus* Systemen ohne Nitrophenol-Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.

<i>Juncus effusus</i>		Alpha	Beta	Gamma	XAN	CF	Gram +	HGC	Kein Ergebnis	
Sandbett	Wurzel	Kontrolle	26,7	10,0	23,3	0	0	13,3	10,0	26,7
		2 mg/l	33,3	13,3	16,7	0	0	20,0	13,3	16,7
		20 mg/l	6,7	53,3	6,7	3,3	0	23,3	23,3	6,7
	Sand	Kontrolle	27,6	3,4	34,5	0	0	13,8	13,8	20,7
		2 mg/l	23,3	10,0	33,3	0	0	13,3	13,3	20,0
		20 mg/l	20,7	27,6	10,3	3,4	0	20,7	20,7	17,2
Hydroponik	Wurzel	Kontrolle	40,0	13,3	23,3	0	0	10,0	3,3	13,3
		20 mg/l	22,2	44,4	7,4	0	3,7	7,4	7,4	14,8

Tabelle 27: Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Sandoberfläche in unbepflanzten Systemen ohne Nitrophenol-Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.

Sandbett ohne Pflanzen		Alpha	Beta	Gamma	XAN	CF	Gram +	HGC	Kein Ergebnis	
Sandbett	Sand	Kontrolle	30,0	43,3	6,7	0	0	6,7	0	13,3
		2 mg/l	36,7	30,0	13,3	0	0	6,7	3,3	13,3
		20 mg/l	10,3	37,9	13,8	0	3,4	24,1	20,7	10,3

Deutliche Unterschiede waren bei Vergleich der Struktur an beiden Oberflächen, Wurzel und Sand, bei den nicht schadstoffbeeinflussten Kontrollen zu beobachten. Anhand dieser Analysen waren an der Sandoberfläche wesentlich mehr Gram-positive Bakterien und weniger Gamma-Proteobakterien vorhanden. Bei Schadstoffexposition nahmen die Unterschiede an beiden Oberflächen aber ab.

An der Wurzel von *Carex gracilis* nahm nach Schadstoffexposition der Anteil Gram-positiver Bakterien leicht zu, wobei aber generell die Systeme durch Gram-negative Bakterien dominiert blieben.

Die mit 2 mg/l belasteten Systeme ähnelten in ihrer bakteriellen Zusammensetzung eher den Kontrollansätzen, als den mit 20 mg/l exponierten Systemen. Bei den Hydroponiksystemen waren Veränderungen in der Besiedlungsstruktur an der Wurzel nach Schadstoffexposition durch eine Zunahme bei den Beta-Proteobakterien und Abnahme bei den Gamma-Proteobakterien gekennzeichnet. Um die Unterschiede und Ähnlichkeiten in den jeweiligen Systemen und Oberflächen darzustellen, sind die Daten der Analyseergebnisse in Abbildung 19 als Clusterhierarchie in Form eines Dendrogramms nach dem Verfahren von WARD aufgetragen. Es zeigen sich mit den 20 mg/l belasteten Systemen zum einen und den 2 mg/l exponierten Systemen zusammen mit den Kontrollen zum anderen zwei sehr unterschiedliche Hauptgruppen, die die starken Veränderungen nach Schadstoffbelastung mit 20 mg/l widerspiegeln.

Bei *Juncus effusus* waren bei den mit 20 mg/l Nitrophenol belasteten Systemen, wie auch bei *Carex gracilis*, Verschiebungen in Richtung Beta-Proteobakterien bei Abnahme der Alpha- und Gamma-Proteobakterien zu sehen (Tabelle 26). Die mit 2 mg/l belasteten Systeme ähnelten eher den Kontrollen, als den höher belasteten Ansätzen, wobei im Trend eine beginnende Verschiebung, wie nach Exposition mit einer Nitrophenolkonzentration von 20 mg/l, zu beobachten war. Auch hier sind in Abbildung 20 die Ergebnisse als Clusterhierarchie nach WARD aufgetragen. Die Sandbettsysteme, belastet mit 2 mg/l Nitrophenol, und Kontrolle liegen beieinander, wobei die Besiedlungsstruktur am Sand des Kontrollansatzes und am Sand des mit 2 mg/l exponierten Systems die höchste Übereinstimmung aufweist. Die mit 20 mg/l exponierten Ansätze liegen ebenfalls beieinander, wobei die relativierte Distanz zu den mit 2 mg/l exponierten Ansätzen geringer ist als bei *Carex gracilis*.

Im Gegensatz zu den im Trend recht ähnlichen Resultaten der Populationsanalyse bei den bepflanzten Systemen zeigten sich die Ergebnisse beim unbepflanzten Sandbett. Interessant ist der Vergleich des Kontrollansatzes mit den Ergebnissen am Sand bei den Kontrollen der bepflanzten Systeme, mit dem der Einfluß der Pflanzen auf die sich am Sand ausbildende Besiedlungsstruktur deutlich wird. Im Unterschied zur mikrobiellen Struktur an der Sandoberfläche bei den bepflanzten Systemen, zeigte sich beim unbepflanzten System eine starke Dominanz der Beta-Proteobakterien, wohingegen die Gamma-Proteobakterien und Gram-positive Bakterien einen vergleichsweise geringen Anteil aufwiesen. Bei Nitrophenol

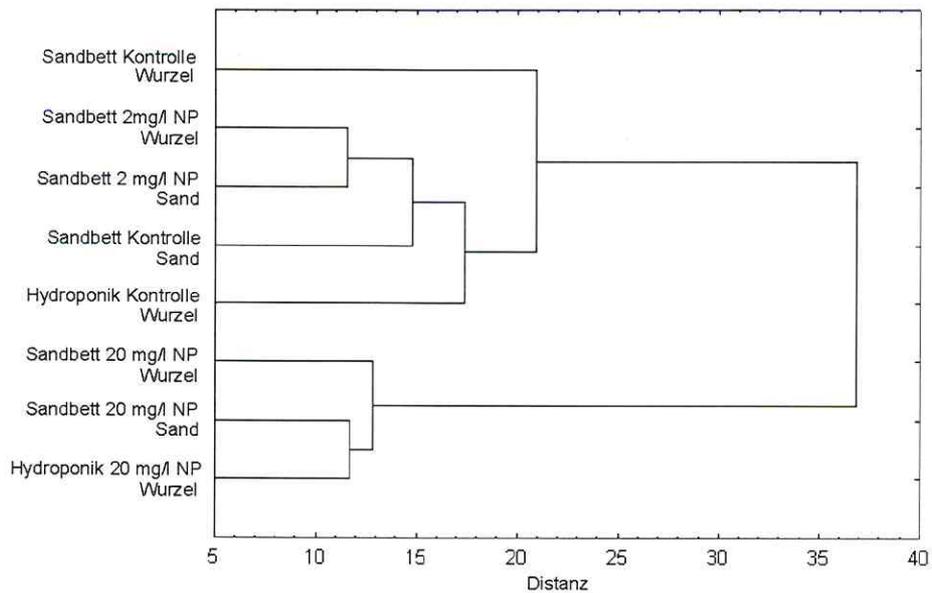


Abbildung 19: Ähnlichkeiten der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an Wurzel oder Sand in Systemen mit *Carex gracilis*. Dendrogramm nach dem Verfahren von WARD. Datengrundlage sind die Ergebnisse zur Gruppenzusammensetzung zufällig ausgewählter Isolate mit hoher Abundanz. Distanzmaß ist die quadrierte Euklidische Distanz.

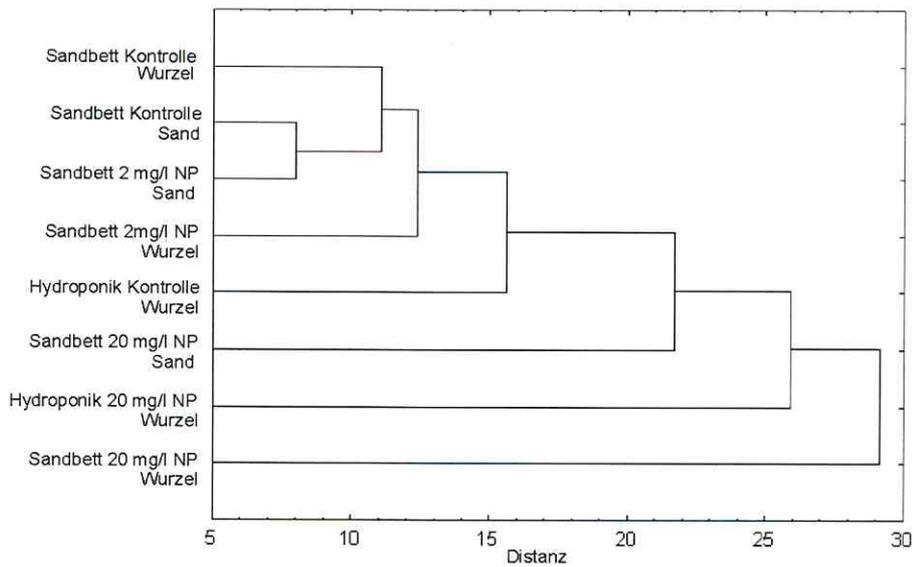


Abbildung 20: Ähnlichkeiten der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an Wurzel oder Sand in Systemen mit *Juncus effusus*. Dendrogramm nach dem Verfahren von WARD. Datengrundlage sind die Ergebnisse zur Gruppenzusammensetzung zufällig ausgewählter Isolate mit hoher Abundanz. Distanzmaß ist die quadrierte Euklidische Distanz.

Belastung mit 20 mg/l blieb der ohnehin sehr hohe Anteil an Beta-Proteobakterien auf dem gleichen Niveau. Hier resultierte aus der Schadstoffbelastung vor allem eine Zunahme der Gram-positiven Bakterien, die Alpha-Proteobakterien nehmen zu und die Gamma-Proteobakterien leicht ab. Die Besiedlungsstruktur am Sand nach einer Belastung mit 2 mg/l ähnelte allerdings auch hier eher der Kontrolle als dem höher belasteten Ansatz.

### 3.4.5. Identifizierung DMP und NP verwertender Bakterien mit hoher Abundanz

Aus verschiedenen Versuchsansätzen mit *Carex gracilis* wurden nach Langzeitexposition abundante, Schadstoff verwertende Isolate identifiziert, die gutes Wachstum auf selektiven Nähragar zeigten. Die Bestimmung der Mikroorganismen erfolgte über physiologische Testsysteme wie BIOLOG oder API, oder über die Bestimmung des Fettsäurespektrums.

Bei Nitrophenol belasteten Systemen waren nach 8 wöchiger Expositionszeit ca. 60% der auf selektiven NP-Agar isolierten Bakterien Gram-positiv. In Tabelle 28 sind 3 Isolate beschrieben, die sich durch hohe Abundanz und gutes Wachstum auszeichneten.

Tabelle 28: 4-Nitrophenol verwertende Bakterien mit hoher Abundanz. Isoliert von Wurzeln von *Carex gracilis* in Sandbett Systemen.

Herkunft des Isolats	Bez. Isolate	Gram	Wachstum auf NP	Fettsäurespektrum
<i>Carex gr.</i> Sandbett Wurzel	NP1	+	+++	<i>Arthrobact.</i>
	NPTA	+	+++	<i>Microbact. spec.</i>
	NP13	+	+++	<i>Kocuria spec.</i>

DMP-Systeme zeigten, wie bisher dargestellt, mit zunehmender Belastungsdauer eine deutliche Zunahme Gram-positiver, schadstoffverwertender Bakterien. Bei der Identifizierung abundanter Isolate zeigt Tabelle 29, daß insbesondere nocardiaforme (*Rhodococcus sp.*) Bakterien nach Expositionszeiten > 12 Wochen stark vertreten sind.

Bei zwei unterschiedlichen Ansätzen mit *Carex gracilis* unter Hydroponikbedingungen wurde nach einer Expositionsdauer von 3 bzw. 5 Monaten jeweils ein Gram-positives Bakterium mit sehr gutem Wachstum auf DMP-Agar isoliert, das bei Wachstum auf R2A-Agar eine starke Fluoreszenz zeigte (Abbildung 21). Durch die auffällige Fluoreszenz und

Tabelle 29: 2,6-Dimethylphenol verwertende Bakterien mit hoher Abundanz. Isoliert aus *Carex gracilis* Hydroponik und Sandbett Systemen nach Langzeitbelastung.

Herkunft des Isolats	Bez. Isolate	Koloniefarbe-/morphologie	Zellform	Gram	Wachstum auf DMP	Identifizierung BIOLOG	Identifizierung API bzw. Fettsäurespektrum (F)
Kontrolle DMP-Abbau ohne Pflanze	C1	gelblich	Stäb.	+	+++	<i>Clavibacter</i> ?	n.d.
	C2	farbl./schleimig	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. fasc.</i>	n.d.
	C6	farblos	Stäb.	-	++	<i>Pseudom. put.</i>	<i>Pseudom. put.</i>
<i>Carex gr.</i> Hydroponik Wasser	A4	rötlich	Kokken	-	+	<i>Acinetob. spec.</i>	<i>Acinetob. spec.</i>
	A6	schimmernd	Kokken	-	+	<i>Acinetob. spec.</i>	<i>Acinetob. spec.</i>
	A8	farblos	Stäb.	+	++	<i>Bacillus brevis</i>	n.d.
<i>Carex gr.</i> Hydroponik Wurzel	B1	gelb	Stäb.	-	++	<i>Xanthom. oryzae</i>	<i>Xanthom. malto.</i>
	B6	farblos	Kokken	-	+	<i>Acinetob. spec.</i>	<i>Acinetob. spec.</i>
	B7	farbl./schleimig	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. fasc.</i>	n.d.
	B14	farblos	Stäb.	-	++	<i>Agrob. rhizog.</i>	<i>Agrob. radiob.</i>
	B17	farbl./schleimig	Kokken	+	+++	<i>Rhodoc. fasc.</i>	n.d.
	D1	farblos	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. spec.</i>	<i>Rhodoc. spec.</i> F
	G1	farblos	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. erythr.</i>	<i>Rhodoc. erythr.</i> F
	DMP2	gelblich	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. spec.</i>	<i>Rhodoc. spec.</i> F
	DMP20	creme/weiß	Stäb.	+	+++	<i>Mycobac. spec.</i>	n.d.
	DMP12	farblos	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. spec.</i>	<i>Rhodoc. spec.</i> F
	DMPI/1	gelblich	Stäb.	-	++	<i>Flavobact. spec.</i>	<i>Flavobact. spec.</i> F
	DMPI/10	orange	Stäb.	+	+++	n.d.	<i>Gordona terrae</i> F
	DMPI/13	gelb	Stäb.	+	++	n.d.	<i>Curtobact. spec.</i> F
	DMP11/1	farblos	Stäb.	-	+	n.d.	<i>Ochrobact. spec.</i> F
DMP11/11	creme	Stäb.	+	+++	<i>Rhodoc. spec.</i>	<i>Nocardia spec.</i> F	
<i>Carex gr.</i> Sandbett Rhizosphärensand	SA1	gelb, schleimig	Kokken	+	+++	n.d.	<i>Clavibacter mi.</i>
	SA2	bräunl. schleim.	Stäb.	+	+++	n.d.	<i>Bacillus coag.</i>
	SA3	weiß, wachst.	Stäb.	+	++	n.d.	<i>Nocardia glob.</i>
	SA7	gelblich	Stäb.	-	++	n.d.	<i>Xanthobact. flavus</i>
	RS1	farblos	Stäb.	+	++	<i>Rhodoc. erythr.</i>	n.d.
	RS2	farblos	Kokken	+	+	<i>Staphyloc. spec.</i>	n.d.
	RS3	gelb	Kokken	+	+	<i>Microbact. arbo.</i>	n.d.
	RS4	orange	Kokken	+	++	<i>Coryneb. nitro.</i>	n.d.

die sehr guten Abbaueigenschaften schien das Isolat sehr vielversprechend für Etablierungsversuche (siehe 3.4.6.). Neben dem guten Wachstum auf DMP zeigte sich weiterhin Wachstum auf Phenol, 4-Chlorphenol, Naphthalin und Phenanthren. Der Gram-positive und Katalase negative Stamm verwertete weiterhin Maltose, D-Galaktose, D-Mannitol und Sorbose und zeigte kein Wachstum auf Glucose. Eine weitergehende Charakterisierung erfolgte an der DSMZ, Prof. Kroppenstedt, und resultierte in der Zuordnung zur Gattung *Mycobacterium*. Die Untersuchungen betrafen

1. den Nachweis von D,L-Diaminopimelinsäure,
2. den Nachweis von MK9 (H<sub>2</sub>), eines Polysioprenoid 1,4-Naphthochinons,

3. ein für alle Spezies der Gattung *Mycobacterium* charakteristisches Fettsäuremuster, wobei sich DMP 20 von nahezu allen anderen Mycobakterien durch den geringen Anteil an Tuberkulostearinsäure unterschied,
4. die Pyrolyse-Gaschromatographie der Mycolsäuren,
5. die Ergebnisse der 16 S rDNA Sequenzierung.

Letztere ergab eine Korrelation von 99,5 % zu *Mycobacterium fortuitum*. Da es zudem deutliche Unterschiede im Mycolsäure-HPLC-Muster von DMP-20 bei Vergleich mit dem Muster des Typusstammes *Mycobacterium fortuitum* (DSM 46621) gab, wurde weiterführend eine Gesamt-DNA-Hybridisierung durchgeführt. Diese Ergebnisse führten dann aber letztendlich doch zu einer Zuordnung zu *Mycobacterium fortuitum* (Prof. R. Kroppenstedt). Der GC-Gehalt wurde mit 67,24% ermittelt; er liegt damit im Bereich des für Mycobakterien angegebenen hohen Gehalts von 65-71%.

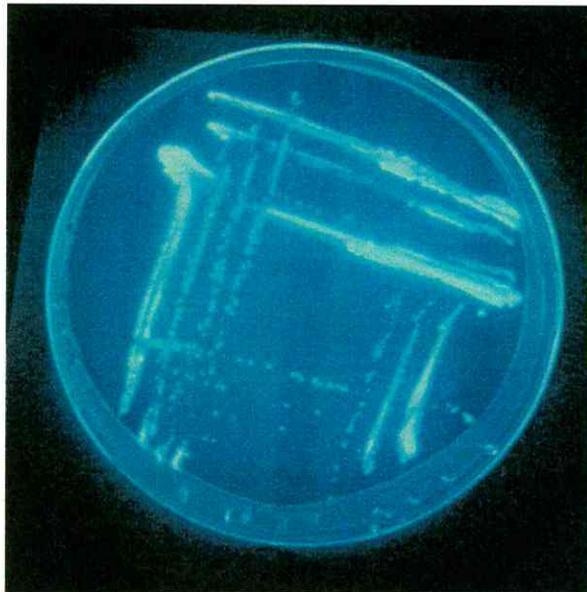


Abbildung 21: *Mycobacterium fortuitum* DMP20 auf R2A-Agar.

#### **3.4.6. Untersuchungen zur Etablierung des DMP-verwertenden Stammes *Mycobacterium fortuitum* DMP-20 in einem *Carex gracilis* Festbettsystem**

Der von *Carex gracilis* nach Langzeitexposition isolierte Stamm *Mycobacterium fortuitum* DMP-20 wurde wegen seiner guten Abbaueigenschaften für DMP und seiner die Wiederfindung erleichternden Fluoreszenz für die Untersuchungen ausgewählt. Untersucht

wurde ein zuvor nicht exponiertes *Carex gracilis* Sandbettsystem, in dem der Stamm DMP 20 nicht nachgewiesen werden konnte. Zu Versuchsbeginn wurden 500 ml einer Zellsuspension von *Mycobacterium fortuitum* DMP-20 mit einer optischen Dichte von 1,0 (590 nm) über einen Zeitraum von 24 h auf das System gepumpt. Nachfolgend wurde das bepflanzte Sandbett kontinuierlich mit 50 mg/l DMP beschickt. Nach 2 bzw. 10 Wochen wurden Proben von der Wurzel, von Rhizosphärensand und von wurzelfernem Sand entnommen und nach Kultivierung auf R2A-Agar über die charakteristische Fluoreszenz und Morphologie von *Mycobacterium fortuitum* DMP-20 dessen Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich, daß der Stamm bei der Probenahme nach 2 und 10 Wochen mit hoher Abundanz an der Wurzel (über 90% Anteil an der Gesamtkoloniezahl) nachgewiesen werden konnte und mit geringer Abundanz am Rhizosphärensand. Bei wurzelfernem Sand waren nach 2 Wochen keine DMP-20 Kolonien nachweisbar und nach 10 Wochen nur mit geringer Abundanz.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Wahl der Untersuchungssysteme**

#### **4.1.1. Hydroponik- und überstaute Sandbettsysteme**

Als Untersuchungssysteme kamen sowohl Hydroponik- als auch überstaute Sandbettsysteme zum Einsatz. Hydroponiksysteme bieten als vergleichsweise einfaches System den Vorteil, daß die mikrobielle Besiedlung im wesentlichen durch die Pflanze bestimmt wird. Es können so beispielsweise pflanzenspezifische Unterschiede oder Veränderungen infolge von Schadstoffexposition sicherer beurteilt werden. In der Literatur finden Hydroponiksysteme vor allem bei Untersuchungen zum Schadstoffabbau oder zu schadstoffbedingten Veränderungen der mikrobiellen Rhizosphärenbiozönose Verwendung (Hsu & Bartha 1979, Federle & Schwab 1989, Van Zwieten et al. 1995, Best et al. 1999, Chaineau et al. 2000, Aitchison et al. 2000), um Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix auszuschließen. Eine Bewertung von Ergebnissen aus Hydroponikversuchen ist aber problematisch wenn ein Bezug auf „normale“ Bodensysteme angestrebt wird. Der Boden beeinflußt stark und je nach Bodentyp und den Bedingungen, wie z.B. der Feuchtigkeit, in unterschiedlicher Weise die Rhizosphären-Mikrobiologie. Andererseits ist eine verallgemeinernde Interpretation von Ergebnissen aus Feldversuchen bei natürlichen Systemen aufgrund dieser variablen Bedingungen im Boden ebenfalls kompliziert.

Bei Fokus auf Helophyten und Constructed Wetlands bieten Hydroponikbedingungen hingegen einen guten Ansatz und können aussagefähige Ergebnisse zu pflanzenspezifischen Unterschieden und Schadstoffwirkung liefern.

Ergänzend wurde mit überstaute Sandbettsystemen gearbeitet, um vergleichend zur Wurzeloberfläche die Bedeutung der Biofilmbildung an einer großen anorganischen Oberfläche für den Schadstoffumsatz beurteilen zu können. Durch einen geringeren Sauerstoffeintrag über die Luft – Wasser/Sand Grenzschicht sind die Sandbettsysteme im Unterschied zu den Hydroponiksystemen bei hoher Raumbelastung durch anoxische Bedingungen gekennzeichnet. Diese Limitierung aerober Abbauvorgänge spiegelte sich auch in der erzielten maximalen Abbauleistung wider.

#### 4.1.2. Bepflanzung

Die Versuche wurden vergleichend mit unterschiedlichen Helophyten durchgeführt, um pflanzenspezifische Unterschiede aufzuzeigen. Für die Wahl der Pflanzen (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus*) waren im wesentlichen Gründe wie Eignung für Hydroponikversuche, gute Kultivierbarkeit unter Labor- und Gewächshausbedingungen, Toleranz gegenüber den applizierten Schadstoffen 2,6-DMP und 4-NP, vorhandener Kenntnisstand und Relevanz hinsichtlich des Einsatzes in Phytoremediation-Systemen ausschlaggebend.

Generell sind Gräser mit ihren Wurzelsystemen, die durch ein starkes Horizontalwachstum der Rhizome und einen hohen Feinwurzelanteil gekennzeichnet sind, sehr gut für Sanierungszwecke geeignet (Aprill & Sims 1990). Über das dichte Wurzelwerk kann eine flächendeckende Durchdringung des Bodens erreicht werden, womit gleichzeitig ein vergleichsweise homogener Eintrag von Wurzelexsudaten verbunden ist. Entsprechend groß ist die Bedeutung der Rhizosphären-Mikrobiologie in diesen Systemen.

Die Vorversuche zur Schadstoffwirkung auf die Pflanzen resultierten in maximal applizierten Konzentrationen von 50 mg/l bei 2,6-DMP und 20 mg/l bei 4-NP. Bei *Phalaris arundinacea* und *Juncus effusus* zeigten sich bis zu diesen Konzentrationen weder im Erscheinungsbild noch beim Wasserverbrauch oder beim Pflanzenwachstum Veränderungen. Auch bei *Carex gracilis* zeigten sich keine Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild, die auf eine Schädigung der Pflanze hinweisen würden. Bei Belastung mit 50 mg/l 2,6-DMP trat allerdings ein verstärktes Wurzelwachstum auf, was sich in einer erhöhten Frischmasse widerspiegelte. Da aber das Frischmasse/Trockenmasse-Verhältnis unverändert blieb und sich auch bei der Wasseraufnahme keine Veränderungen zeigten, wird dieser Effekt nicht im Sinne einer Beeinträchtigung der Pflanze interpretiert. Im Falle einer 2,6-DMP-bedingten Schädigung der Pflanze könnte es ansonsten indirekt über die Pflanze, zum Beispiel über eine veränderte Exsudatfreisetzung, zu Auswirkungen auf die mikrobielle Rhizosphärenstruktur kommen.

Ursächlich für das verstärkte Wachstum nach 2,6-DMP Exposition könnte eine direkte Schadstoffwirkung auf die mikrobielle Rhizosphärenstruktur sein. Denkbar wäre, daß es infolge von schadstoffbedingten Veränderungen in der Rhizosphärenbiozönose zu einer Abnahme pflanzenschädigender Bakterien kommt oder aber wachstumsfördernde PGPR-Bakterien stärker zum Tragen kommen. Campbell und Greaves (1990) verdeutlichten die enorme Bedeutung der mikrobiellen Rhizosphärenstruktur für das Pflanzenwachstum in einem Experiment, in dem sie 150 fluoreszierende Pseudomonaden aus der Rhizosphäre von

Weizen isolierten und anschließend Weizenkeimlinge einzeln mit je einem Stamm beimpften. Als Resultat bewirkten 40% der Stämme eine Stimulation des Wurzelwachstums, 40% eine Hemmung und 20 % zeigten kein Effekt.

Andererseits könnte es aber eventuell auch zu einer direkten Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch 2,6-DMP kommen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Pingel (1976) interessant, der den Einfluß phenolischer Verbindungen auf die Adventivbewurzelung untersuchte. Verschiedene Phenolcarbonsäuren führten über eine Beeinflussung der Indolelessigsäure-Oxydase Aktivität zu einer Stimulierung der Adventivwurzelbildung.

#### **4.1.3. Modellschadstoffe**

Entscheidend für die Auswahl der Modellschadstoffe 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol waren Kriterien wie Vorkommen und ökotoxikologische Bedeutung bei Altlasten, bereits vorhandene Kenntnisse aus Untersuchungen in vergleichbaren Systemen und Unterschiede in den Stoffeigenschaften.

Insbesondere in Mitteldeutschland liegen viele Altlasten mit phenolischen und polyaromatischen Verbindungen vor. Ursächlich ist insbesondere die im letzten Jahrhundert im großen Maßstab stattfindende Braunkohlepyrolyse. 2,6-Dimethylphenol ist hierbei ein relevanter Vertreter in diesen komplexen Substanzgemischen (Wießner et al. 1993, Stottmeister et al. 1997b, Pörschmann et al. 1996). Im weiteren liegen für 2,6-DMP bereits einige Kenntnisse in vergleichbaren Systemen für Helophyten hinsichtlich der Aufnahme in die Pflanze (Plugge 2001), der Phytovolatilisation (Bederski 2000) sowie der Bedeutung der Exsudate für den Abbau (Moormann et al. 2002) vor.

Ergänzend zu 2,6-DMP wurde 4-Nitrophenol als polarere Verbindung eingesetzt. Nitroaromatische Verbindungen werden durch eine Vielzahl weit verbreiteter Farbstoffe, Pestizide, Weichmacher, Medikamente, Sprengstoffe und Lösungsmittel in die Umwelt eingebracht (Spain & Gibson 1991, Heitkamp et al. 1990, BUA 1992). Entsprechend häufig sind Umweltkontaminationen mit Nitroaromaten. Allein für 4-Nitrophenol wird für das Jahr 1983 eine Produktionsmenge von 20500 t genannt (BUA 1992), wobei 4-Nitrophenol von der amerikanischen EPA (Environmental Protection Agency) als „priority pollutant“ geführt wird (Heitkamp 1990). Als Modellsubstanz wurde 4-NP beispielsweise zur Beschreibung von Abbauvorgängen in der Reiserhizosphäre (Reddy & Sethunathan 2004) oder zur Charakterisierung des Abbaupotentials in Bodenproben aus den Everglades (Laha & Petrova

1997) eingesetzt. Durch den geringen Dampfdruck ist zudem eine gute Handhabbarkeit bei Laborversuchen gegeben.

## **4.2. Methoden zur Beschreibung mikrobieller Lebensgemeinschaften**

### **4.2.1. Kultivierungsmethoden**

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von Isolaten mit hoher Abundanz Aussagen zu schadstoffbedingten Veränderungen getroffen. Bei dieser Herangehensweise müssen bei der Bewertung der Ergebnisse, die in der Methodik liegenden Begrenzungen in der Aussagefähigkeit beachtet werden. Zwar basiert ein Großteil der heutigen Kenntnisse über Mikroorganismen auf den "klassischen" mikrobiologischen Kultivierungsmethoden, dennoch erlauben diese Methoden, insbesondere in natürlichen Habitaten, nur eine unvollständige Erfassung der vorhandenen Mikroorganismen. Ursächlich ist hier die Problematik, für alle Mikroorganismen eines Habitates die geeigneten Kultivierungsparameter, wie z.B. Energiequelle, Kohlenstoffquelle, Wachstumsfaktoren, Red/Ox-Potential, Salinität etc., zu gewährleisten. Besonders schwierig wird eine Kultivierung bei einer Vergesellschaftung von Mikroorganismen, z.B. bei der syntrophischen Verwertung von Nährstoffen, oder bei symbiontischen Beziehungen mit eukaryotischen Organismen. Vor allen in diesen Fällen kann der Komplexität der Wechselwirkungen vor Ort in der Regel nicht Rechnung getragen werden.

Zukünftig könnte es aber durch die im Augenblick sehr aktuellen Untersuchungen zur Kommunikation zwischen Bakterien über Signalmoleküle (z.B. N-Acyl-Homoserinlactone Peptide, Furanosylboratdiester) zu Fortschritten bei der Kultivierbarkeit von Mikroorganismen kommen. Unter den Überbegriff "Quorum sensing" wird zunehmend die immense Bedeutung solcher Signalmoleküle für das Wachstums und das physiologische Verhalten von Mikroorganismen deutlich (Fuqua et al. 1996, Eberl 1999, Dunny & Leonard 1997, Bassler 1999, Chen et al. 2002). Hier könnte eventuell auch der Grund für die sogenannten Vereinsamungseffekte liegen, d.h. daß es bei sehr geringen Zelldichten (z.B. bei hohen Verdünnungsstufen) teilweise nicht gelingt eine Vermehrung dieser vereinzelt Mikroorganismen zu erreichen.

Trotz der generellen methodischen Einschränkungen bei Kultivierungsansätzen können diese natürlich in vielen Fällen relevante Aussagen zu Veränderungen bei mikrobiellen Lebensgemeinschaften liefern. Insbesondere über Isolate aus hoher Verdünnungsstufe sind

abundante Vertreter der Biozönose zu erfassen. Chin et al. (1999) beschrieben beispielsweise für anoxischen Boden aus einem Reisfeld, daß allein durch 9 Isolate aus einer hohen Verdünnungsstufe ca. 5% der über DAPI Färbung bestimmten Gesamtzellzahl erfaßt wurden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich in Vorversuchen mit Bakterien von der Wurzeloberfläche, daß bei Beschränkung auf heterotrophe aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien bei KBE-Ansätzen mit R2A-Agar 10-50% der über DNA-Färbemethoden gezählten Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, was einen vergleichsweise hohen Wert darstellt. Hierbei muß beachtet werden, daß die mikroskopisch bestimmte Gesamtzellzahl häufig zu einer Überbestimmung führt, da auch tote Bakterien angefärbt werden und es Probleme mit unspezifischer Farbstoffanlagerung geben kann. Beispielsweise nennen Bone & Balkwill (1988) für Böden Werte von oft nur 1-10% lebender Zellen. Im Unterschied zu den sehr inhomogenen und häufig wechselnden Bedingungen in natürlichen Bodensystemen sind in den hier untersuchten Systemen durch gleichbleibende Umgebungsbedingungen und die gute Versorgung direkt an der Wurzel natürlich wesentlich günstigere Bedingungen geben, so daß der Anteil toter Bakterien vergleichsweise gering sein dürfte.

#### **4.2.2. Molekular-ökologische Studien**

##### **4.2.2.1. Mikrobielle Strukturanalyse anhand der Gesamt-DNA eines Standortes**

Als Alternative zu Kultivierungsansätzen werden in den letzten 15 Jahren bei der Analyse mikrobieller Populationen zunehmend molekularbiologische Methoden eingesetzt, wobei insbesondere zwei methodische Strategien zum Einsatz kommen, die sehr umfassende Aussagen liefern können. Bei der einen Herangehensweise erfolgt eine Analyse auf Basis der Gewinnung der Gesamt-DNA, während die andere über Gensonden eine Detektierung von Bakterien vor Ort ermöglicht.

Bei Techniken, die auf Analyse der Gesamt-DNA eines Standortes basieren, erfolgt nach der DNA-Isolierung eine Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Zur Charakterisierung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften wird in der Regel mit der 16S rDNA als ubiquitäres Gen gearbeitet, wobei die amplifizierten unterschiedlichen Sequenztypen die Diversität des untersuchten Probenahmeortes widerspiegeln.

Eine Möglichkeit besteht nun darin, die aus der Amplifikation resultierenden DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufzutrennen, und so über das entstehende Bandenmuster

Aussagen zur mikrobiellen Struktur zu erhalten. Bei Analysen auf Basis der 16S rDNA entstehen zumeist DNA-Fragmente fast gleicher Größe. Eine Auftrennung ist methodisch entsprechend schwierig und erfolgt beispielsweise unter Nutzung eines denaturierenden Gradientengels (denaturierende Gradientengelelektrophorese, DGGE) auf Grundlage des unterschiedlichen Schmelzverhaltens der 16S rDNA-Stränge. Erste Arbeiten zur Nutzung der DGGE bei der Analyse mikrobieller Populationsstrukturen wurden von Muyzer et al. (1993) durchgeführt. Eine weitergehende Analyse der Banden kann anschließend durch Hybridisierungsreaktionen mit Sonden bzw. durch Sequenzierung erfolgen.

Eine andere Möglichkeit zur Analyse der amplifizierten Sequenzen stellt deren Klonierung in *E. coli* mit anschließender Sequenzierung und Datenbankvergleich dar. Über diesen Weg wird ein sehr umfangreiches Bild über den Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen erhalten. Über den Datenbankvergleich der Sequenzen mit denen von bekannten Organismen ergibt sich zudem eine Vorstellung über mögliche Stoffwechselleistungen.

Aktuell stellen solche Untersuchungen auf Basis der 16S rDNA die erfolgreichste Technik dar, wenn es darum geht Standorte, die durch eine geringe Kultivierbarkeit gekennzeichnet sind, zu charakterisieren. In den letzten Jahren hat dieses zu einem immensen Kenntniszuwachs hinsichtlich der Diversität in solchen Habitaten geführt, wobei auf phylogenetischer Basis viele neue mikrobielle Sparten beschrieben wurden (Pace 1997, Pedersen et al. 1996, Dojka et al. 2000, Hugenholz et al. 1998a+b, Ka et al. 2001). Gleichzeitig werden parallel zu der großen Anzahl neu beschriebener bakterieller Gruppen verstärkte Anstrengungen zur Kultivierung dieser bisher nur phylogenetisch bekannten Mikroorganismen unternommen (Liu et al. 1997, Kato et al. 1998, Takai et al. 2001, Janssen et al. 2002, Michaud et al. 2004, Cho & Giovannoni 2004, Bruns et al. 2003).

Bei der Bewertung solcher molekular ökologischer Studien müssen allerdings auch einige methodisch bedingte Limitationen berücksichtigt werden. Bei allen Herangehensweisen, die über die Isolierung von DNA Aussagen zur mikrobiellen Struktur eines Standortes treffen, ergeben sich Begrenzungen in der Aussagefähigkeit durch die Notwendigkeit der vorherigen DNA-Isolierung. Je nach Probe (z.B. Wasser oder Boden) stellt sich diese unterschiedlich schwierig dar, beinhaltet im Verfahrensablauf aber generell die Lyse der Zellen sowie Reinigungs- und Konzentrationsschritte. Neben Problemen bei der Isolierung und Reinigung von DNA beispielsweise aus Boden ist insbesondere die Zell-Lyse ein kritischer Schritt bei der quantitativen DNA-Isolierung. Vor allem Gram-positive Bakterien, Sporen und Archea sind ausgesprochen schwierig zu lysieren und bleiben deshalb häufig

unterrepräsentiert. Zu harsche Lysemethoden andererseits lassen sich nicht mit der Zielstellung der Isolation hochmolekularer DNA verbinden.

Nach der Isolation der DNA schließt sich eine PCR-Amplifikation spezifischer Bereiche der DNA an. Quantitative Aussagen über die Zusammensetzung eines Habitates anhand des PCR-Produktes sind allerdings problematisch, da es zu einer präferentiellen Amplifikation der DNA einiger Vertreter vor der DNA anderer Mikroorganismen kommen kann (Reysenbach et al. 1992). Ursächlich hierfür ist eine unterschiedliche Amplifikationseffizienz, die zum einen vom Primersystem (Suzuki & Giovannoni 1996) als auch von der Kopienzahl der Zielsequenz (z.B. der 16S rDNA) und der Genomgröße abhängt (Farrelly et al. 1995).

Bei der weiteren Analyse der Amplifikate über eine DGGE können sich Begrenzungen durch sehr komplexe Bandenmuster bei einer hohen mikrobiellen Diversität ergeben. Zudem kann es zum Auftreten mehrerer Banden pro Stamm kommen (Führ et al. 1996, Smalla et al. 1998). Der Grund hierfür sind Mikroheterogenitäten, das heißt, daß im Genom eines Stammes mehrere Kopien der 16S rDNA mit leicht unterschiedlicher Sequenz vorliegen können (Garcia-Pichel et al. 1996, Rosado et al. 1998). Als Resultat kann es zu einer Überschätzung der Diversität kommen.

Zusammenfassend kann es also durch die methodischen Verfahrensschritte wie Zell-Lyse, DNA Isolierung, Amplifikation, Analyse der Fragmente im Ergebnis zu einer falschen Gewichtung bei der Zusammensetzung der Biozönose kommen. Zudem ist über einen rein molekularbiologischen Ansatz die Zuweisung eines Phänotypes zum untersuchten Mikroorganismus schwierig, vor allem wenn der nächste bekannte isolierte Verwandte des Stammes zu einer Gruppe mit sehr diversen Phänotypen gehört.

#### **4.2.2.2. Populationsanalyse über rRNA gerichtete Oligonukleotidsonden**

Bei Strategien, die über Gensonden eine Analyse der mikrobiellen Besiedlung anstreben, werden in der Regel r-RNA gerichtete fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die hohe Kopienzahl ribosomaler RNA in der Zelle gewährleistet eine erfolgreiche Detektierung der Fluoreszenz. Hierdurch ist die Möglichkeit gegeben die räumliche Verteilung verschiedener Mikroorganismengruppen in situ zu untersuchen. Neben gruppen- oder spezies-spezifischen Sonden (z.B. Amann et al. 1990a+b, Manz et al. 1992, Møller et al. 1996) können auch Gensonden zum Nachweis physiologischer Eigenschaften, wie z.B. die Fähigkeit zum 2,4-D Abbau (Holben et al. 1988), Verwendung finden.

Insbesondere bei Standorten mit hoher physiologischer Aktivität erlauben fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden gute Aussagen zur Zusammensetzung und zur räumlichen Verteilung der mikrobiellen Besiedlung. Diesem Vorteil steht allerdings die generelle Einschränkung gegenüber, daß im Vorfeld durch die Wahl der Sonden bestimmt wird, was später im Mikroskop zu sehen ist. Da die Sonden auf bekannten Sequenzdaten basieren, ist als Resultat maximal eine Reflektion dieses Wissenstandes zu erreichen. Zudem werden immer nur Gruppen von Bakterien oder einzelne Spezies markiert, was zusammen mit kleinen Probemengen bzw. den mikroskopisch untersuchten Bereichen direkt an der Probe quantitative Aussagen nur bedingt zuläßt. Methodisch ergeben sich Probleme bei der Wahl der richtigen Stringenz und der eingesetzten Fixierungsmethode. Die Spezifität der Sondenbindung ist stark von den Reaktionsbedingungen abhängig und ist zudem nur anhand einer Gruppe bekannter Bakterien getestet worden. Bei unbekanntem Habitaten ist deshalb die Spezifität der Sondenbindung vor Ort nur schwer zu beurteilen. Die FISH-Technik erlaubt eine gute Detektion insbesondere stoffwechselaktiver Zellen. Problematischer wird es, wenn Zellen mit geringer Aktivität vorliegen. Hier entstehen sehr schwache Fluoreszenzsignale, die nur schwer zu detektieren sind und deshalb oft unberücksichtigt bleiben. Bei entsprechend guter mikroskopischer Technik, der Verwendung sehr photostabiler, stark fluoreszierender Farbstoffe wie CY3 (Indocarbocyanine) und gleichmäßig schwacher Aktivität im System (kein Überstrahlen) lassen sich Bakterien auch in Habitaten mit geringer physiologischer Aktivität nachweisen. Alfreider et al. (1996) beschrieben beispielsweise für Schneeproben einen Nachweis von 40-81% der über DAPI gefärbten Zellen über rRNA gerichtete Sonden. Glöckner et al. (1996) erfaßten bei Proben aus meso- und oligotrophen Seen 29-64% der Gesamtzellzahl (DAPI) mit EUB oder gruppenspezifischen Sonden. Diese Werte liegen dabei in einer Größenordnung, wie sie auch für nährstoffreichere Systeme beschrieben wurden (Neef et al. 1996, Zarda et al. 1997, Stoffels et al. 1998, Friedrich et al. 1999, Brümmer et al. 2000).

#### **4.2.3. Eingesetzte Methodik**

Generell gibt es bei Untersuchungen zur mikrobiellen Populationsstruktur keine universell verwendbare Standardmethodik, sondern alle methodischen Ansätze sind in ihrer Eignung je nach Habitat und den zeitlichen, den gerätetechnischen und nicht zuletzt finanziellen Möglichkeiten zu wählen. Die Bedingungen in der Rhizosphäre bei den untersuchten Helophyten erlauben mit einfachen Kultivierungsmethoden die Erfassung von bis zu 50% der über DAPI gezählten Bakterien. Bei Fokussierung auf Bakterien mit hoher Abundanz

(Isolate aus hoher Verdünnungsstufe) werden somit in der Rhizosphäre relevante Bakterien beschrieben, und es ist eine ausreichende Aussagefähigkeit für vergleichende Betrachtungen (schadstoffbedingte Änderungen) gegeben. Über die Verwendung selektiver Medien können zudem einfach Aussagen zu Veränderungen bei schadstoffverwertenden Bakterien erzielt werden.

Kultivierungsverfahren zur Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung von Pflanzenwurzeln werden auch in vielen anderen Arbeiten als methodischer Ansatz genutzt (z.B. Gardner et al. 1982, Lalande et al. 1989, Miller et al. 1989, Gilbert et al. 1993, McNroy et al. 1995, Lemanceau et al. 1995, Mahaffee & Kloepper 1997). Der hier gewählte Probenumfang von je 30 Isolaten aus hoher Abundanz pro Probenahmeort liegt dabei ähnlich wie auch in Arbeiten von Lalande et al. 1989, Van Peer et al. 1990 und Lemanceau et al. 1995.

Angesichts der Zielstellung der Arbeit, könnte mit allen hier dargestellten methodischen Ansätzen eine ausreichende Charakterisierung der schadstoffbedingten Veränderungen erreicht werden. Hierbei bieten aber Kultivierungsmethoden den methodisch einfachsten und kostengünstigsten Ansatz, und erlauben über selektive Nährmedien vor allem eine schnelle und gute Beschreibung abbaurelevanter Veränderungen im System.

#### **4.3. Aussagen zur mikrobiellen Struktur in der Rhizosphäre im Vergleich zu nicht pflanzenbeeinflussten Systemen**

Die Funktion der Pflanzen bei Phytoremediation-Konzepten liegt im wesentlichen in der Förderung mikrobieller Abbauprozesse über eine hohe, aktive und diverse Mikroorganismenpopulation in der Rhizosphäre. Die Beobachtung einer erhöhten mikrobiellen Besiedlung – der Rhizosphäreneffekt – ist bereits seit vielen Jahren bekannt, wobei sich die überwiegende Zahl der Arbeiten hierzu mit landwirtschaftlichen Kulturpflanzen in normalen Bodensystemen befaßt. Unter diesen Bedingungen wird der Rhizosphäreneffekt in der Regel als Verhältnis der Zellzahl im Rhizosphärenboden zur Zellzahl in Nichtrhizosphärenboden dargestellt (R/S Wert). Zumeist werden Werte im Bereich einer 5-20fach höheren Besiedlungsdichte beschrieben, teilweise aber auch Werte über 100 genannt (Lynch 1990, Anderson et al. 1993, Anderson & Coats 1994). Wesentlich weniger Kenntnisse liegen allerdings hinsichtlich der Unterschiede in der mikrobiellen Struktur zwischen Rhizosphären- und Nichtrhizosphärenboden vor (Mahaffee & Kloepper 1996). Auch für Hydroponiksysteme oder überstaute Bedingungen gibt es kaum Aussagen,

inwieweit es durch diese Bedingungen zu Auswirkungen auf die mikrobielle Besiedlungsdichte kommt. Zudem gibt es nur wenige Arbeiten mit Helophyten, die sich mit Aspekten der mikrobiellen Rhizosphärenbesiedlung beschäftigen.

Eine der Zielstellungen dieser Arbeit lag deshalb in der Beschreibung des Rhizosphäreneffektes bei drei unterschiedlichen Helophytengattungen unter Hydroponikbedingungen als auch in überstauten Sandbettansätzen. Im Vergleich zu unbepflanzten Systemen sollten über die Besiedlungsdichte, die Aktivität und die Diversität Aussagen zur Ausprägung des Rhizosphäreneffektes getroffen werden.

Erste Ergebnisse hierzu lieferten bereits die mikroskopischen Untersuchungen. Zusammengefaßt zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Besiedlungsdichte von der Bepflanzung generell und von der Entfernung zur Wurzel. Bei allen drei Helophyten-Spezies war an der Wurzeloberfläche unabhängig vom System (Hydroponik, Sandbett) eine starke, mikroskopisch gut sichtbare mikrobielle Besiedlung vorhanden. Die Wurzeln zeigten hierbei höhere Besiedlungsdichten als wurzelnahe Sand. Beim Sand wiederum war die Stärke der mikrobiellen Besiedlung der Oberfläche von der Entfernung zur Wurzel bestimmt. Wurzelnahe Sand wies eine höhere Besiedlung auf als wurzelferner Sand. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen zur Visualisierung aktiver Bakterien mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid bestätigt.

Detailliertere Ergebnisse lieferten die KBE-Ansätze, die im Trend die mikroskopischen Beobachtungen bestätigten. Bei *Carex gracilis* stellte sich an der Wurzeloberfläche eine mikrobielle Besiedlungsdichte im Bereich von  $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6 / \text{cm}^2$  unter Hydroponik- als auch in Sandbettssystemen ein. Bei *Phalaris arundinacea* und *Juncus effusus* zeigten sich unter Hydroponikbedingungen mit ca.  $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$  etwas niedrigere Werte, wohingegen in Sandbettssystemen ähnliche Besiedlungsdichten wie bei *Carex gracilis* erreicht wurden.

Eine Bewertung dieser Zahlen über Daten aus der Literatur ist schwierig, da die Bezugsgröße sehr verschieden gewählt wird. In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Besiedlung auf die Oberfläche bezogen, was zwar methodisch recht zeitaufwendig ist, aber einen deutlich besseren Vergleich von Wurzeln unterschiedlicher Pflanzen beziehungsweise Vergleiche mit anorganischen Oberflächen ermöglicht. Gebräuchlicher sind als Bezugsgröße aber das Trockengewicht (Barber & Lynch 1977), die Frischmasse (Gagné et al. 1987, Mahaffee & Kloepper 1997), der Bezug der KBE auf die Wurzellänge (Gilbert et al. 1993) oder das Wurzelvolumen (Gardner et al. 1982). Ein Vergleich verschiedener Wurzelsysteme mit z.B. unterschiedlich hohem Feinwurzelanteil ist so allerdings nur sehr unzureichend möglich.

Deutlich wird der Einfluß der Pflanzen auf die mikrobielle Besiedlung, wenn die Ergebnisse der Besiedlungsdichte am Sand als R/S Werte dargestellt werden. In *Carex gracilis* Sandbettssystemen ergab sich ein R/S Wert von ca. 19, also eine 19fach höhere Besiedlung am wurzelnahen Sand als am Sand in unbepflanzten Ansätzen. Bei *Juncus effusus* stellte sich ein Wert von 24 ein. Die Werte liegen in der Größenordnung wie sie auch für normale Bodensysteme beschrieben werden (s.o.). Auch hinsichtlich der absoluten Zahl wird eine Besiedlungsdichte an der Oberfläche des Rhizosphärensand erreicht, die auch in natürlichen Rhizosphärenböden zu finden ist. Die Angaben in der Literatur zur Besiedlungsdichte in Rhizosphärenböden weisen allerdings je nach Boden, Pflanze und Bedingungen eine große Bandbreite auf. So werden für verschiedene landwirtschaftliche Nutzpflanzen z.B. Werte in der Größenordnung von  $10^5$  (Anderson et al. 1994) bis  $10^8$  (Miller et al. 1989) pro Gramm genannt. Die Zelldichte am wurzelnahen Sand lag bei Umrechnung auf Gramm bei  $1 \times 10^7$ .

Direkt an der Wurzel waren wiederum höhere Besiedlungsdichten vorhanden als am umgebenden Sand. Nach einer Verweilzeit im System von 2 Monaten hatte sich bei *Carex gracilis* eine 5fach höhere Besiedlungsdichte und bei *Juncus effusus* eine 7fach höhere Besiedlung eingestellt. In älteren Systemen (4 Monate) erhöhten sich diese Werte noch etwas, bei *Carex* um das 1,5fache und bei *Juncus* um das 2fache. Die mit Abstand höchste bakterielle Besiedlung ist also direkt an der Wurzeloberfläche vorhanden. Bezieht man die dort vorhandene Bakteriendichte auf die Besiedlung an der Sandoberfläche in unbepflanzten Systemen wird dieses besonders deutlich. Bei *Carex gracilis* zeigte sich eine annähernd 100fach höhere und bei *Juncus effusus* sogar eine 170fach höhere Besiedlungsdichte als am Sand unbepflanzter Systeme.

Interessant sind die weiteren Ergebnisse der KBE-Untersuchungen hinsichtlich des Anteils an Schadstoff verwertenden Bakterien in den unbelasteten Systemen. Die vermutete höhere mikrobielle Diversität in der Rhizosphäre und hieraus folgend ein höheres biochemisches Potential spiegelte sich zumindest nicht in dem Anteil an 2,6-Dimethylphenol oder 4-Nitrophenol verwertenden Bakterien wider. Der prozentuale Anteil an kultivierbaren Schadstoffverwertern lag im gleichen Größenbereich unabhängig davon, ob es sich um ein bepflanztes oder um ein unbepflanztes System handelte. Unterschiede ergaben sich allerdings in der absoluten Zahl an Schadstoff verwertenden Bakterien je nach vorhandener Gesamtbesiedlungsdichte. Die Gesamtzahl an 2,6-Dimethylphenol oder 4-Nitrophenol verwertenden Bakterien war also direkt an der Wurzel und folgend an der Sandoberfläche bepflanzter Systeme höher als bei unbepflanzten Systemen. Dieselbe Beobachtung machten

Jordahl et al. 1997 für BTX-verwertende Bakterien bei Vergleich der Zellzahlen in der Rhizosphäre von Pappeln und von unbepflanztem Boden. Während sich bei der relativen Abundanz der Schadstoffabbauer keine signifikanten Unterschiede zeigten, bewirkte der Rhizosphärenereffekt aber eine Zunahme bei der absoluten Zellzahl (R/S Faktor von 5). Auch Sandmann & Loos (1984) beschrieben einen Rhizosphärenereffekt für Schadstoff (2,4-D) verwertende Bakterien in nicht Schadstoff exponierten Systemen.

Zusätzlich zum Einfluß der Bepflanzung auf die sich einstellende mikrobielle Besiedlungsdichte sind die Ergebnisse der Gruppenzusammensetzung interessant. Die deutlichen Unterschiede zwischen bepflanzten und unbepflanzten Systemen zeigen die Bedeutung der Pflanze auch auf die sich ausbildende mikrobielle Struktur. In pflanzenbeeinflussten Systemen (Wurzel und Sand) waren Alpha- und Gamma-Proteobakterien dominant. Beta-Proteobakterien erreichten maximal 10%. In unbepflanzten Sandbett-Systemen stellten hingegen Beta-Proteobakterien mit über 40% die dominanteste Gruppe gefolgt von Bakterien der Alpha-Gruppe. Die mit *Carex gracilis* oder *Juncus effusus* bepflanzten Systeme zeigten insgesamt eine recht ähnliche Besiedlungsstruktur, wobei Juncus-Systeme auch bei Vergleich der Besiedlung zwischen Wurzeloberfläche und Sandoberfläche in der Rhizosphäre eine weitgehende Übereinstimmung zeigten.

Insgesamt ist also festzuhalten, daß bei den untersuchten Helophyten und Testsystemen ein ausgeprägter Rhizosphärenereffekt vorhanden war. Dieser war bei den erreichten Zelldichten in vergleichbarer Ausprägung wie es auch für andere Pflanzen und Systeme (z.B. normale Bodensysteme) beschrieben wird. Dieses Ergebnis ist auch von Bedeutung hinsichtlich der generellen Aussagefähigkeit von Hydroponiksystemen als Testsystem. Auch die höhere physiologische Aktivität geht mit dem Stand der Literatur überein. Für die Verwertung von 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol äußert sich die Bedeutung der Pflanze in diesen nicht kontaminierten Kontrollsystemen aber nur in der absoluten Zahl an kultivierbaren Schadstoffverwertern, der prozentuale Anteil lag in bepflanzten und unbepflanzten Systemen im gleichen Bereich. Die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung bei Rhizosphärensand und bei nicht Rhizosphärensand zeigten im weiteren die Bedeutung der Pflanze auf. Diese qualitative Beeinflussung der mikrobiellen Biozönose führte bei den vorliegenden Untersuchungen zwar nicht zu Veränderungen beim Anteil schadstoffverwertender Bakterien, verdeutlicht aber dennoch welche Bedeutung die Pflanze für das sich einstellende mikrobielle Stoffwechselfpotential haben kann.

#### 4.4. Schadstoffbedingte Veränderungen der Rhizosphärenbiozönose

Ein wesentlicher Punkt bei Phytoremediation-Konzepten ist die Nutzung der Vorzüge der Rhizosphäre für den Abbau von Schadstoffen. Im Idealfall verspricht hierbei die diverse und aktive Rhizosphärenbiozönose ein schnelles Ansprechverhalten bei Schadstoffbelastung, wobei der Schadstoffabbau durch die Sauerstoffabgabe durch die Wurzeln und ggf. die Exsudatfreisetzung gefördert wird. Voraussetzung hierfür ist aber, daß es in der auf Exsudatverwertung ausgerichteten Rhizosphäre auch wirklich zum Schadstoffabbau kommt. Eine Einschätzung der sich einstellenden mikrobiellen Abbauvorgänge in der Rhizosphäre nach Schadstoffexposition ist deshalb von erheblicher Bedeutung bei der Bewertung von Systemen hinsichtlich des zu erwartenden Abbauverhaltens. Bisher gibt es vergleichsweise wenig detaillierte mikrobielle Untersuchungen in Zusammenhang mit Schadstoffabbau in der Rhizosphäre. Bei vielen Arbeiten liegt der Fokus auf der analytischen Erfassung des Schadstoffabbaus. Ein erhöhter Umsatz durch die mikrobielle Rhizosphärenpopulation wird zumeist nur theoretisch diskutiert (z.B. Reddy & Sethunathan 1983, Aprill & Sims 1990, McKinlay & Kasperek 1999, Best et al. 1999, Chaineau et al. 2000, Chen et al. 2003, Banks et al. 2003, Sun et al. 2004).

Ausschlaggebend für einen eventuell stattfindenden Schadstoffabbau sind die Einflußfaktoren Pflanze, Boden und Schadstoff durch die Bestimmung der resultierenden mikrobiellen Biozönose. Hierbei kann die Reaktion eines Systems auf eine Schadstoffexposition vereinfachend durch folgende Szenarien beschrieben werden.

1. Keine deutlichen Veränderungen in der mikrobiellen Struktur der Rhizosphäre bei Schadstoffexposition. Es kommt zu keinen nennenswerten Schadstoffumsatz. (Allen & Wagner 2000)
2. Keine deutlichen Veränderungen in der mikrobiellen Struktur der Rhizosphäre bei Schadstoffexposition. Die hohe Besiedlungsdichte und Stoffwechselaktivität in der Rhizosphäre begünstigt aber einen erhöhten Schadstoffumsatz. (Siciliano et al. 2003)
3. Schadstoff bedingte Veränderungen in der mikrobiellen Rhizosphärenbiozönose, die aber nicht mit einem erhöhten Schadstoffabbau einhergehen. (Fang et al. 2001)
4. Schadstoff bedingte Veränderungen in der Rhizosphärenbiozönose, die mit einem erhöhten Schadstoffabbau einhergehen. (Anderson et al. 1994, Costa et al. 2000, Muratova et al. 2003)

Dieser Unterteilung folgend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dem vierten Punkt zuzuordnen. Die Schadstoffexposition mit 2,6-Dimethylphenol oder 4-Nitrophenol bewirkte bei allen drei Pflanzenspezies Veränderungen in der mikrobiellen Struktur, die zugleich mit einer Ausrichtung auf die Schadstoffverwertung einhergingen. Die Zahl kultivierbarer schadstoffverwertender Bakterien nahm sowohl direkt an der Wurzel und der Sandoberfläche in der Rhizosphäre als auch bei nicht bepflanzten Systemen zu. Bepflanzte Systeme zeigten aber höhere Besiedlungsdichten und hiermit einhergehend einen schnelleren Schadstoffabbau.

Bei detaillierter Betrachtung der Ergebnisse für beide Modellschadstoffe wird der Umfang der schadstoffbedingten Veränderungen deutlich.

Der Prozentanteil an kultivierbaren 2-6-Dimethylphenol verwertenden Bakterien an der Gesamtbesiedlungsdichte lag in nicht belasteten Ansätzen mit *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus* oder *Carex gracilis* bei 0,04-0,4 %, was nebenher die Bedeutung der Diversität der Rhizosphäre für den Schadstoffabbau zeigt. Dieser Anteil nahm bei Schadstoffexposition um das 5-13fache zu. Bei hoher Raumbelastung äußerte sich dieses in den Reaktorsystemen mit *Carex gracilis* in einer bis zu 770fach höheren Zahl an kultivierbaren DMP-Verwertern. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die bei DMP-Belastung stattfindende deutliche Zunahme (25-55fach) bei der Gesamtbesiedlungsdichte, die sich bei allen drei Pflanzengattungen zeigte. Hierbei könnte es sich durchaus auch um am Abbau von DMP beteiligte Bakterien handeln, die aber einer Kultivierung unter den sehr selektiven Bedingungen der DMP-KBE nicht zugänglich waren. In diese Richtung könnten auch die Ergebnisse der Reaktorversuche mit *Carex gracilis* zur Bestimmung der 'maximalen Abbauleistung' interpretiert werden. Die Verdopplung in der 'maximalen Abbauleistung' ging mit einem Anstieg der Gesamtbesiedlungsdichte um das 4,6fache einher. Die Zahl der kultivierbaren DMP-Verwerter stieg hingegen nur um das 1,25fache.

Die Bedeutung der Bepflanzung für den Schadstoffabbau zeigten die Versuche in Sandbettsystemen. Eine Entfernung der Pflanze bewirkte eine Halbierung der Abbauleistung. Zudem wies das bepflanzte System eine 63fach höhere Besiedlungsdichte bei 2,6-Dimethylphenol verwertenden Bakterien auf als ein unbepflanztes Sandbett.

Neben den höheren Zellzahlen sind die durch die DMP-Exposition bewirkten Veränderungen in der Struktur der Rhizosphärenbiozönose sehr beeindruckend. Diese äußerten sich bei allen drei Pflanzengattungen in einer starken Zunahme des Anteils Grampositiver Bakterien auf Basis der Isolate aus hoher Verdünnungsstufe. Die Ausprägung der Veränderungen nahm mit der Länge der Expositionszeit zu. So konnten beispielsweise in

einem Sandbettansatz nach 6 Monaten Expositionszeit nur noch Gram-positive Isolate gewonnen werden (Soltmann et al. 2002). Ergänzend wurden diese Beobachtungen durch Analysen über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse bestätigt, die eine Abnahme der Diversität zeigten. Nach einmonatiger Expositionszeit mit 2,6-Dimethylphenol halbierte sich die Anzahl unterschiedlicher Isolate.

Insgesamt zeigten sich also grundlegende Veränderungen bei Schadstoffbelastung ohne Beeinträchtigung der Pflanze und bei nahezu vollständigem Abbau des Schadstoffes, die in diesem Umfang in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurden.

Auch die Belastung mit 4-Nitrophenol als Schadstoff bedingt starke Veränderungen in Sandbett und Hydroponiksystemen. Vor allem die Zunahme bei den kultivierbaren Nitrophenol-Verwertern, der schnellere Schadstoffumsatz und eine andere Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose beschreiben diese Veränderungen. Bereits eine Schadstoffexposition mit einer Konzentration von 2 mg/l führte in Carex- und Juncus-Systemen zu einem Anstieg der Zahl kultivierbarer 4-Nitrophenol verwertender Bakterien um das 5fache an der Wurzel und das 7fache an der Oberfläche des Rhizosphärensand. Bei höherer Schadstoffbelastung verstärkte sich dieser Effekt. Nach zweimonatiger Belastung mit 20 mg/l zeigten sich 10-18fach höhere Werte an der Rhizoplane und 9-13fach höhere Werte am Rhizosphärensand. Interessant ist, daß bei Herabsetzung der Schadstoffkonzentration (von 20mg/l auf 2mg/l) die hohen Zellzahlen Nitrophenol verwertender Bakterien erhalten blieben. Im Unterschied zu den Ergebnissen der Versuche mit 2,6-Dimethylphenol waren bei Schadstoffexposition aber keine größeren Veränderungen in der Gesamtbesiedlungsdichte bei Wurzeln und Sand zu beobachten.

Die Bedeutung der Pflanzen in den Systemen für die sich einstellende mikrobielle Besiedlung zeigt sich bei vergleichender Betrachtung mit den Ergebnissen des unbepflanzten Systems. Bei den bepflanzten Systemen lag die Zahl an kultivierbaren 4-Nitrophenol verwertenden Bakterien 7-30fach höher als in einem Sandbett ohne Bepflanzung. In der gleichen Größenordnung lagen die Werte für die Gesamtbesiedlungsdichte. Die höchsten Besiedlungsdichten waren aber, wie in den unbelasteten Ansätzen und bei den Versuchen mit 2,6-Dimethylphenol, direkt an der Rhizoplane zu finden. Dennoch waren aber bei Bezug auf die im System zur Verfügung stehenden Oberflächen (Wurzel vs. Sand) insgesamt mehr 4-Nitrophenol verwertende Bakterien an der Sandoberfläche lokalisiert als an den Wurzeln. Bei dieser anhand der Gesamtoberflächen im System geschätzten Zahl an 4-Nitrophenol verwertenden Bakterien

zeigten sich auch pflanzenspezifische Unterschiede zwischen *Juncus effusus* und *Carex gracilis*. In *Juncus effusus* Systemen stellten sich 1,6-2,9fach höhere Werte ein. Die höherer Zahl an 4-Nitrophenol-Verwertern wirkte sich aber nur geringfügig auf die erzielte 'maximalen Abbauleistung' aus, was ursächlich durch die Sauerstoff-Limitation bei hoher Raumbelastung bedingt sein dürfte.

In Übereinstimmung mit den höheren Zellzahlen in den bepflanzten Systemen zeigte sich die Abbauleistung. Bepflanzte Systeme wiesen eine 2,5-3fach höhere 'maximale Abbauleistung' auf als unbepflanzte Systeme. Der hohe Schadstoffumsatz in Hydroponiksystemen, bei der im Vergleich mit Sandbettsystemen fehlenden Parallelität zwischen Zellzahlen und Abbauleistung, wurde bereits in den Ergebnissen angesprochen und ist ein wichtiges Indiz für die Bedeutung aerober Stoffwechselprozesse. Entsprechend sind die Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlung direkt an der Wurzel mit einer Zunahme Schadstoff verwertender Bakterien zu bewerten, die eine Nutzung des von der Wurzel abgegebenen Sauerstoffs für Abbauprozesse ermöglichen würden. Zusätzlich zur starken Zunahme Schadstoff verwertender Bakterien in der Rhizosphäre nach Schadstoffexposition zeigten die Versuche zum Ansprechverhalten bei der 4-Nitrophenolverwertung die Bedeutung des Rhizosphärenmilieus für die physiologische Aktivität auf. Hierbei wiesen die Bakterien direkt von der Wurzeloberfläche die kürzesten lag-Zeiten bis zum einsetzenden Nitrophenolabbau auf. Die mit Abstand längste lag-Phase war hingegen bei den Bakteriensuspensionen aus unbepflanzten Systemen zu beobachten.

Die Analyse der Gruppenzusammensetzung verdeutlicht, wie umfassend die Veränderungen in der mikrobiellen Struktur nach Schadstoffbelastung sein können. Im Unterschied zu der Zahl Nitrophenol verwertender Bakterien zeigte sich hier eine höhere Abhängigkeit von der Schadstoffkonzentration. Nach Belastung mit 20 mg/l kam es in den *Carex gracilis* und *Juncus effusus* Systemen zu einer starken Verschiebung in Richtung Beta-Proteobakterien bei Abnahme der Alpha- und Gamma-Proteobakterien. Die mit 2 mg/l belasteten Systeme ähnelten in ihrer bakteriellen Zusammensetzung hingegen eher den Kontrollansätzen, als den mit 20 mg/l exponierten Systemen. Bei den Unterschieden in der mikrobiellen Struktur am Sand bepflanzter und unbepflanzter Systeme kam es mit ansteigender Schadstoffkonzentration zu einer zunehmenden Angleichung in der Gruppenzusammensetzung. Beides zeigt auch für 4-Nitrophenol die Bedeutung der Schadstoffgegenwart für die sich einstellende mikrobielle Biozönose auf, wobei die Veränderungen in den bepflanzten Systemen größer sind.

Wie in der Einleitung dargestellt, zeigt sich in der Literatur kein einheitliches Bild hinsichtlich der Wirkung von Xenobiotika auf die mikrobielle Biozönose. Die Bedeutung der stark milieuprägenden Faktoren Pflanze und Boden bei der Ausprägung schadstoffbedingter Veränderungen werden je nach Untersuchungssystem verschieden bewertet. Bei den hier gewählten Versuchssystemen (Hydroponik und überstautes Sandbett) unter Ausblendung einer Bodenmatrix wurde die mikrobielle Besiedlung im wesentlichen durch die Pflanzen bestimmt. Die Ergebnisse zusammenfassend führte eine nachfolgende Schadstoffexposition dann aber in allen Systemen zu Veränderungen bei den Zellzahlen und der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose. Der Schadstoff bestimmte also zusätzlich zur Pflanze die mikrobielle Besiedlung und führte zu Veränderungen in der auf Exsudatverwertung ausgerichteten Rhizosphäre. Die starke Zunahme Schadstoffverwertender Bakterien in der Rhizosphäre und der schnellere und höhere Schadstoffumsatz zeigen, daß die förderlichen Aspekte der Rhizosphäre dem Schadstoffabbau zur Verfügung stehen, was vor dem Hintergrund des Einsatzes zur Sanierung kontaminierter Wässer bzw. Böden von entscheidender Bedeutung ist.

#### **4.5. Direkte Beteiligung der Pflanze an der Schadstoffverwertung**

Neben der Förderung mikrobieller Stoffumsetzungen durch die Pflanze ist auch die Aufnahme in die Pflanze bei der Schadstoffentfernung von Bedeutung. Die Schadstoffaufnahme hängt hierbei stark von der Größe und Polarität der Verbindung ab, wobei sehr hydrophile Stoffe (kaum Passage über die Zellmembranen) als auch sehr hydrophobe Verbindungen (werden stark an den lipophilen Bestandteilen der Wurzel zurückgehalten) kaum in die Pflanzengefäße aufgenommen werden (Burken & Schnoor 1998). Schnoor et al. (1995) nennen in diesem Zusammenhang einen Oktanol / Wasser Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{OW}$  0,5 – 3 für Verbindungen, die in den Sproß aufgenommen werden können. Die Werte für 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol liegen mit einem  $\log K_{OW}$  von 2,36 und 1,91 in diesem Bereich, so daß eine Schadstoffaufnahme in die Gefäßbahnen zu erwarten ist. Der Nachweis der Schadstoffaufnahme wurde hier über Konzentrationsveränderungen in der verbleibenden Schadstofflösung nach Flüssigkeitsverbrauch durch die Pflanze geführt. Durch die ausreichend langen lag-Zeiten bei zuvor unbelasteten Pflanzen bis zum Einsetzen eines mikrobiellen Abbaus von 2,6-Dimethylphenol oder 4-Nitrophenol konnten so Aussagen zur Aufnahme der Schadstoffe in die Pflanze bzw. der Sorption an Pflanzenstrukturen getroffen werden. Die lag-Zeiten mit

ca. 3 Tagen für 2,6-Dimethylphenol und 2-2,5 Tagen für 4-Nitrophenol ließen während der 24 stündigen Versuchsdauer keine Effekte durch mikrobiellen Abbau erwarten. Die Dauer der Ansprechzeit lag hierbei in einer Größenordnung, wie sie auch für andere Systeme beschrieben wurde. Für Nitrophenol gibt z.B. Heitkamp et al. (1990) andere Arbeiten zusammenfassend als lag-Phase eine Spanne von 2-42 Tagen an.

Für 4-Nitrophenol zeigten die Ergebnisse keine Konzentrationsveränderungen in der verbleibenden Lösung. Nitrophenol wurde also von *Carex gracilis* und *Juncus effusus* unselektiv mit dem Transpirationsstrom in die Pflanze aufgenommen. Der Vergleichsansatz mit abgetrenntem Sproß gibt einen Eindruck über die Bedeutung der Anlagerung von 4-Nitrophenol an die Wurzel. Eine Sorption ist in starker Abhängigkeit von der Lipophilie des Stoffes (Burken & Schnoor 1998). Für das recht polare 4-Nitrophenol ergaben sich entsprechend mit einer Schadstoffanlagerung an das Wurzelmaterial von 1,6% bei *Carex gracilis* und 2,4% bei *Juncus effusus* geringe Werte.

Im Unterschied zu 4-Nitrophenol kam es bei 2,6-Dimethylphenol bei allen drei Pflanzengattungen zu einer Aufkonzentration in der Lösung. Der Schadstoff wurde also langsamer von den Pflanzen aufgenommen als das Wasser als Lösungsmittel. Insgesamt wurden nur 20-40% des gelösten 2,6-Dimethylphenols mit den Transpirationsstrom in die Pflanze aufgenommen. Dieses ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Bederski (2000) der bei Versuchen mit Wasserminze (*Mentha aquatica*) ebenfalls eine langsamere 2,6-Dimethylphenol Aufnahme beobachtete. Ein geringer Teil des 2,6-Dimethylphenols in der Pflanze wird dann nach Untersuchungen von Bederski (2000) über die Blätter in die Gasphase abgegeben. Bei sehr volatilen Stoffen kann die Evaporation über die Blätter einen bedeutenden Weg zum Schadstoffaustrag darstellen (Burken & Schnoor 1998, Aitchison et al. 2000). Aitchison et al. (2000) beschrieben beispielsweise für 1,4-Dioxan eine Evaporation von 76-83% des von Pappeln aufgenommenen Schadstoffes. Bei Nitrophenol hingegen dürfte dieser Weg der Schadstoffentfernung aus der Pflanze aufgrund des geringen Dampfdrucks keine Rolle spielen. Die Anlagerung von 2,6-Dimethylphenol an das Pflanzenmaterial ist wie bei 4-Nitrophenol eher von untergeordneter Bedeutung. Es werden von dem in Lösung befindlichen Schadstoff nur 3,5-6,5% bei *Carex* und 1,1-2,8% bei *Juncus* an die Wurzel sorbiert.

Die Bedeutung der Schadstoffaufnahme in die Pflanzen ist angesichts der schnellen mikrobiellen Verwertung in der Rhizosphäre gering. Unter Versuchsbedingungen mit hoher Raumbelastung, bei der es zu keinem vollständigen Schadstoffabbau mehr kam (siehe Versuche zur 'maximale Abbauleistung'), wurde bei Annahme einer 20 prozentigen

Restkonzentration des Schadstoffes in der Lösung und des gegebenen Wasserverbrauchs der Pflanzen die aufgenommene Schadstoffmenge abgeschätzt. Hierbei zeigte sich das bei 4-Nitrophenol ca. 6-7 % und bei 2,6-Dimethylphenol ca. 1 % des eliminierten Schadstoffs von der Pflanze aufgenommen wurden.

#### **4.6. Etablierung inokulierter Schadstoff abbauender Bakterien in der Rhizosphäre**

Das Einbringen von Schadstoff abbauenden Bakterien in die Rhizosphäre von Pflanzen, stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, um einen verbesserten Schadstoffabbau (Ermöglichung bzw. Verbesserung des Abbaus, Verkürzung der Ansprechzeit) in der Rhizosphäre zu erreichen. Eine erfolgreiche Etablierung wird hierbei aber durch eine Reihe von Faktoren wie z.B. Bodentyp, Feuchtigkeit, pH-Wert, Zusammensetzung der Wurzelexsudate und der mikrobiellen Rhizosphärenbiozönose in Folge der komplexen Wechselwirkungen vor Ort bedingt. Die eingebrachten Bakterien müssen erfolgreich um benötigte Nährstoffe konkurrieren und in der Lage sein, sich an der Oberfläche der Wurzeln anzulagern bzw. dem wachsenden Wurzelsystem folgen zu können (de Weger et al. 1995). Insbesondere Bodensysteme wirken durch die vom Bodentyp bestimmten abiotischen Faktoren sehr stark auf die mikrobielle Rhizosphärenstruktur ein und erschweren die Etablierung von außen eingebrachter Bakterien. Standortfremde Mikroorganismen sind deshalb häufig nicht in der Lage, sich in solchen Systemen durchzusetzen (Van Zwieten et al. 1995). Je nach den Bedingungen im System finden sich entsprechend in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse. So beschrieben Goldstein et al. (1985) beispielsweise, daß eine Inokulation allochthoner 4-Nitrophenol und 2,4-dichlorophenol abbauender Stämme nicht zu einer Verbesserung der Abbauleistung führte. Als Ursache wird eine zu geringe Schadstoffkonzentration, die Möglichkeit der Verwertung anderer Nährstoffe durch die eingebrachten Bakterien oder eine Hemmung durch die autochthone Mikroorganismen-Population diskutiert. Domey & Döring (1994) hingegen zeigten, daß sich ein inokulierter 2,4-DCP abbauender *Pseudomonas putida* Stamm gegenüber der natürlichen Rhizosphärenpopulation durchzusetzen vermochte.

Günstig für eine erfolgreiche Etablierung ist die Nutzung Schadstoff verwertender Stämme, die aus vergleichbaren Systemen stammen, wie die hier erzielten Ergebnisse zur Etablierung des Stammes *Mycobacterium fortuitum* DMP-20 zeigten. Auch 10 Wochen nach der Inokulation konnte der 2,6-DMP verwertende Stamm noch mit hoher Abundanz an den Wurzeln von *Carex gracilis* nachgewiesen werden. Der ursprünglich auch von Wurzeln

belasteter *Carex gracilis* Pflanzen isolierte Stamm etablierte sich also problemlos in der Rhizosphäre zuvor nicht schadstoffbelasteter Pflanzen. Hierbei zeigt aber die schlechte Besiedlung der Sandoberflächen wie spezifisch die Anforderungen an eine erfolgreiche Etablierung sind.

Dieses bestätigten auch weitere Versuche, die unter gleichen Systembedingungen (überstautes Sandbett, bepflanzt mit *Carex gracilis*) allerdings mit einem allochthonen, Naphthalin verwertenden *Pseudomonas putida* Stamm durchgeführt wurden (Soltmann et al. 2002). Trotz der sehr guten Abbaueigenschaften konnte sich der Stamm nicht in der Rhizosphäre des Naphthalin belasteten Systems etablieren.

Unabhängig von einer erfolgreichen Etablierung eingebrachter Stämme, besteht die Möglichkeit der Übertragung plasmidcodierter Abbaueigenschaften des inokulierten Stammes auf die autochthonen Mikroorganismen. So beschrieben Crowley et al. (1996) beispielsweise die Übertragung der Fähigkeit zum 2,5-Dichlorbenzoat Abbau durch einen inokulierten *Pseudomonas fluorescens* Stamm auf autochthone Mikroorganismen in bepflanzten und unbepflanzten Bodensystemen.

Zusammenfassend stellt die Inokulation von Bakterien über beide Wege, der Etablierung von Mikroorganismen und der Übertragung von Abbaueigenschaften, eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Flexibilität und Leistungsfähigkeit von Phytoremediation-Systemen zu erhöhen.

## 5. Zusammenfassung

Unter dem Begriff Phytoremediation findet in den letzten Jahren der Einsatz von Pflanzen zur Behandlung schadstoffbelasteter Böden, Schlämme und Wässer zunehmend Interesse. Der entscheidende Vorteil solcher Sanierungsverfahren liegt in einem in der Regel geringen Aufwand bei der Umsetzung und beim Betrieb, was insbesondere bei dezentraler Lage und großer räumlicher Ausdehnung kontaminierter Flächen von Interesse ist. Durch die Verwendung von Helophyten, mit ihrer Fähigkeit auch unter anoxischen Bedingungen im Wurzelraum zu wachsen, können auch kontaminierte Wässer oder staunasse Böden behandelt werden. Die Grundlage vieler Phytoremediation-Konzepte ist die Nutzung der mikrobiellen Rhizosphärenbiozönose zur Schadstoffverwertung. Die Vorzüge der Rhizosphäre, wie z.B. die hohe mikrobielle Besiedlungsdichte und Diversität, die Abgabe organischer Verbindungen durch die Pflanze (z.B. Exsudate) und bei Helophyten der mögliche Sauerstoffeintrag in den Wurzelraum, sollen hierbei ein schnelles Ansprechverhalten der mikrobiellen Rhizosphärenbiozönose und einen guten Schadstoffabbau befördern. Voraussetzung zur Nutzung der günstigen Bedingungen in der Rhizosphäre für den Schadstoffabbau ist aber, daß es in der auf Exsudatverwertung ausgerichteten Rhizosphäre auch wirklich zum Schadstoffabbau kommt. Eine Einschätzung der sich einstellenden mikrobiellen Abbauvorgänge in der Rhizosphäre nach Schadstoffexposition ist deshalb von erheblicher Bedeutung bei der Bewertung von Systemen hinsichtlich des zu erwartenden Abbauverhaltens. Einschätzungen hierzu über Literaturdaten sind schwierig, da es nur wenige Arbeiten gibt, die sich detaillierter mit der Bedeutung der Einflußgrößen Pflanze, Boden bzw. Substrat und Schadstoff bei der sich ausbildenden mikrobiellen Struktur in der Rhizosphäre beschäftigen. Für sauerstofflimitierte Systeme mit Helophyten, in denen die Prozesse in der Rhizosphäre zusätzlich durch die Sauerstoffabgabe beeinflußt werden, liegen noch weniger Kenntnisse vor anhand derer Aussagen zur Schadstoffverwertung in der Rhizosphäre getroffen werden könnten.

An diesem Punkt setzte die vorliegende Arbeit an und sollte am Beispiel verschiedener Helophyten in Hydroponik- oder überstauten Standbett-Systemen Zusammenhänge zwischen Schadstoffbelastung und der sich ausbildenden mikrobiellen Rhizosphärenstruktur aufzeigen, und so den Kenntnisstand zur Bedeutung der Einflußgrößen (Pflanze, Schadstoff, Versuchssystem) für die Schadstoffverwertung in der Rhizosphäre erweitern. Im weiteren sollten vergleichende Betrachtungen zur mikrobiellen Besiedlung der Rhizosphäre mit der

in unbepflanzten Systemen Unterschiede in der Reaktion auf Schadstoffbelastung zeigen und Aussagen zur Stärke des Rhizosphäreneffekts bei verschiedenen Helophyten erlauben. Die in der Rhizosphäre stattfindenden Abbauvorgänge sollten hierbei in Relation zur mikrobiellen Struktur und Abbauleistung in nicht pflanzenbeeinflussten Systemen bewertet werden und insgesamt zu einer Beschreibung abbaurelevanter Vorgänge in den Laborsystemen führen.

Um pflanzenspezifische Unterschiede zu erfassen, wurde mit drei verschiedenen Pflanzenspezies (*Carex gracilis*, *Juncus effusus* und *Phalaris arundinacea*) gearbeitet. Als Modellschadstoffe fanden, vor dem Hintergrund der Problematik phenolischer Kontaminationen bei vielen Altlasten, 2,6-Dimethylphenol und 4-Nitrophenol in unterschiedlichen Konzentrationen Verwendung.

Die Ergebnisse zeigten bei den gewählten Versuchssystemen (Hydroponik und überstautes Sandbett) eine starke Beeinflussung der mikrobiellen Besiedlung durch die Pflanzen. Unabhängig von einer Schadstoffbelastung war ein ausgeprägter Rhizosphäreneffekt vorhanden. Dieser war bei den erreichten Zelldichten in vergleichbarer Ausprägung wie es auch für andere Pflanzen und Systeme (z.B. normale Bodensysteme) beschrieben wird. Die höchsten Besiedlungsdichten (Gesamtzellzahl als auch schadstoffverwertende Bakterien) waren direkt an den Wurzeln zu finden, gefolgt von wurzelnahem Sand. Im Vergleich mit unbepflanzten Systemen zeigten sich an der Sandoberfläche in *Carex gracilis* und *Juncus effusus* Systemen 19fach bzw. 24fach höhere mikrobielle Besiedlungsdichten. Insgesamt waren deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung bei bepflanzt und unbepflanzten Systemen zu beobachten. Anhand von Isolaten mit hoher Abundanz (Isolate aus hoher Verdünnungsstufe) wurden in bepflanzt Systemen (Wurzel und Sand) Alpha- und Gamma-Proteobakterien als dominante Gruppen nachgewiesen. Beta-Proteobakterien erreichten maximal 10%. Die mit *Carex gracilis* oder *Juncus effusus* bepflanzt Systeme zeigten insgesamt eine recht ähnliche Besiedlungsstruktur. In unbepflanzten Sandbett-Systemen stellten hingegen Beta-Proteobakterien mit über 40% die dominanteste Gruppe gefolgt von Bakterien der Alpha-Gruppe.

Eine Schadstoffexposition mit 2,6-Dimethylphenol oder 4-Nitrophenol bewirkte bei allen drei Pflanzenspezies starke Veränderungen in der mikrobiellen Struktur (Besiedlungsdichte, Diversität, Abundanz), die zugleich mit einer Ausrichtung auf die Schadstoffverwertung einhergingen. Eine Belastung mit 2,6-Dimethylphenol führte an den Wurzeln zu einem prozentualen Anstieg an kultivierbaren Schadstoff verwertenden Bakterien um das 5-13fache. Gleichzeitig konnte bei 2-6-Dimthylphenol-Belastung bei allen Pflanzen auch ein

Anstieg in der Gesamtbesiedlungsdichte um das 25-55fache beobachtet werden. Diese starke Zunahme der mikrobiellen Besiedlung an den Wurzeln äußerte sich in einem *Carex gracilis* Hydroponiksystem bei hoher Raumbelastung in einer 770fach höheren Zahl an kultivierbaren DMP-Verwertern. In bepflanzten Sandbettssystemen zeigte sich die Förderung der mikrobiellen Besiedlung durch die Pflanzen in einer 63fach höheren Besiedlungsdichte bei 2,6-Dimethylphenol verwertenden Bakterien im Vergleich zu unbepflanzten Sandbettssystemen. Eine Entfernung der Pflanze bewirkte eine Halbierung der Abbauleistung.

Auch in 4-Nitrophenol exponierten Systemen war eine starke Zunahme bei Schadstoff verwertenden Bakterien zu beobachten, eine generelle Zunahme in der Gesamtbesiedlungsdichte zeigte sich hingegen nicht. Eine Schadstoffexposition mit 2 mg/l führte in *Carex*- und *Juncus*-Systemen bereits zu einem Anstieg der Zahl kultivierbarer 4-Nitrophenol verwertender Bakterien um das 5fach an der Wurzel und das 7fache an der Oberfläche des Rhizosphärensand. Bei höherer Schadstoffbelastung verstärkte sich dieser Effekt. Nach zweimonatiger Belastung mit 20 mg/l zeigten sich 10-18fach höhere Werte an der Rhizoplane und 9-13fach höhere Werte am Rhizosphärensand. Bei Herabsetzung der Schadstoffkonzentration (von 20mg/l auf 2mg/l) blieben die hohen Zellzahlen Nitrophenol verwertender Bakterien erhalten. Wie auch bei 2,6-Dimethylphenol waren in bepflanzten Systemen deutlich mehr Schadstoff verwertenden Bakterien vorhanden. In bepflanzten Systemen lag die Zahl an kultivierbaren 4-Nitrophenol verwertenden Bakterien 7-30fach höher als in einem Sandbett ohne Bepflanzung. In der gleichen Größenordnung lagen die Werte für die Gesamtbesiedlungsdichte. Die höchsten Besiedlungsdichten waren, wie in den unbelasteten Ansätzen und bei den Versuchen mit 2,6-Dimethylphenol, direkt an der Rhizoplane zu finden. Dennoch waren aber bei Bezug auf die im System zur Verfügung stehenden Oberflächen (Wurzel vs. Sand) insgesamt mehr Schadstoff verwertende Bakterien an der Sandoberfläche lokalisiert als an den Wurzeln.

Neben den höheren Zellzahlen bewirkte die Schadstoffexposition starke Veränderungen in der Struktur der Rhizosphärenbiozönose. Bei DMP-Belastung äußerte sich dieses bei allen drei Pflanzengattungen in einer starken Zunahme des Anteils Gram-positiver Bakterien. Ergänzend zeigte sich eine Abnahme der Diversität bei Untersuchungen von Isolaten aus hoher Verdünnungsstufe über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse. Nach 1monatiger Expositionszeit mit 2,6-Dimethylphenol halbierte sich die Anzahl unterschiedlicher Isolate. Die Exposition mit 4-Nitrophenol führte in höher belasteten Ansätzen (20mg/l) übereinstimmend für *Carex gracilis* und *Juncus effusus* Systemen zu einer starken

Verschiebung in Richtung Beta-Proteobakterien bei Abnahme der Alpha- und Gamma-Proteobakterien. Mit 2 mg/l belastete Systeme ähnelten in ihrer bakteriellen Zusammensetzung hingegen eher den Kontrollansätzen, als den mit 20 mg/l exponierten Systemen. Bei den Unterschieden in der mikrobiellen Struktur am Sand bepflanzter und unbepflanzter Systeme kam es mit ansteigender Schadstoffkonzentration zu einer Angleichung in der Gruppenzusammensetzung.

In Übereinstimmung mit den höheren Zellzahlen in den bepflanzten Systemen zeigte sich die Abbauleistung. Bepflanzte Systeme zeigten eine höhere Abbauleistung und ein schnelleres Ansprechverhalten nach Schadstoffbelastung. Hierbei wiesen Bakterien von der Wurzeloberfläche die kürzesten lag-Zeiten bis zum einsetzenden Schadstoffabbau auf. Eine direkte Beteiligung der Pflanzen an der Schadstoffentfernung durch eine Schadstoffaufnahme in die Pflanze war angesichts der schnellen mikrobiellen Verwertung in der Rhizosphäre von geringer Bedeutung. Bei hoher Schadstoffbelastung wurden bei Nitrophenol ca. 6-7% und bei Dimethylphenol ca. 1% der Abbauleistung durch eine Aufnahme in die Pflanze erzielt.

Insgesamt zeigte sich also bei den gewählten Versuchssystemen (Hydroponik und überstautes Sandbett) eine starke Beeinflussung der mikrobiellen Besiedlung durch die Pflanzen. Eine Schadstoffexposition führte dann aber in allen Systemen zu grundlegenden Veränderungen in der Rhizosphärenbiozönose ohne Beeinträchtigung der Pflanze und bei nahezu vollständigem Abbau des Schadstoffes. Der Schadstoff bestimmte also zusätzlich zur Pflanze die mikrobielle Besiedlung in der Rhizosphäre. Vor allem die Zunahme bei Schadstoff verwertenden Bakterien an der Wurzel, der schnellere Schadstoffabbau und eine andere Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose beschreiben diese Veränderungen und zeigen, daß die förderlichen Aspekte der Rhizosphäre dem Schadstoffabbau zur Verfügung stehen, was vor dem Hintergrund des Einsatzes zur Sanierung kontaminierter Wässer bzw. Böden von entscheidender Bedeutung ist.

## 6. Literatur

- Abdel-Nasser, M., Makawi, A.A., Abdel-Moneim, A.A. (1979) *Egypt. J. Microbiol.*, **14**, 37-44.
- Aitchison, E.W., Kelley, S.L., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L. (2000) Pytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environment Research*, **72**, 313-321.
- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.O., Wille, A., Psenner, R. (1996) Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environm. Microbiol.*, **62**, 2138-2144.
- Allen, C.A., Wagner, S.C. (2000) Rhizosphere activity of cattail (*Typha latifolia*) and spike rush (*Eleocharis tuberculosa*) inhabiting an oil spill. *Texas Journal of Science*, **52**, 335-344.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. (1990 a) Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**, 762-770.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R, Stahl, D.A. (1990 b) Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925.
- Anderson, T. A., Coats, J. R. (1994) Bioremediation Through Rhizosphere Technology, ACS Symposium Series, 563, Washington, DC.
- Anderson, T. A., Guthrie, E.A., Walton, B.T. (1993) Bioremediation in the rhizosphere – plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630-2636.
- Anderson, T.A., Kruger, E.L., Coats, J.R. (1994) Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. *Chemosphere*, **28**, 1551-1557.
- Anderson, T.A., Walton, B.T. (1995) Comparative fate of [<sup>14</sup>C]trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 2041-2047.
- Aprill, W., Sims, R.C. (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, **20**, 253-265.
- Armstrong, W., Armstrong, J., Beckett, P.M. (1990) Measurement and modelling of oxygen release from roots of *Phragmites australis*. In: Cooper, P.F., Findlater, B.C. (Eds.) Constructed wetlands in water pollution control. Proc. Int. Conf. Cambridge, Pergamon Press Oxford, 41-52.
- Armstrong, W. (1979) Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, **7**, 226-332.

- Armstrong, W., Beckett, P.M., Justin, S.H.F.W., Lythe, S. (1991) Modelling and other aspects of root aeration by diffusion. In: Jackson, M.B., Davies, D.D., Lambers, H. (Eds.) *Plant Life under Oxygen Deprivation*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- Bachman, J., Patterson, H.H. (1999) Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: kinetics and the influence of dissolved organic matter. *Environ.Sci. Technol.*, **33**, 874-881.
- Bachmann, G., Kinzel, H. (1992) Physiological and ecological aspects of the interactions between plant roots and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.*, **24**, 543-552.
- Banks, M.K., Kulakow, P., Schwab, A.P., Chen, Z., Rathbone, K. (2003) Degradation of crude oil in the rhizosphere of Sorghum bicolor. *International Journal of Phytoremediation*, **5**, 225-234.
- Barber, D.A., Lynch, J.M. (1977) Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 305-308.
- Barry, T., Collieran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F. (1991) The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods & Applications*, **1**, 51-56.
- Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 582-587.
- Bederski, O. (2000) Die Emission organischer Chemikalien durch Sumpfpflanzen auf kontaminierten Standorten. Dissertation Universität Leipzig. UFZ-Bericht Nr. 3/2001; ISSN 0948-9452.
- Best, E.P.H., Sprecher, S.L., Larson, S.L., Fredrickson, H.L., Bader, D.F. (1999) Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Removal mass balances and fate in groundwater of TNT and RDX. *Chemosphere*, **38**, 3383-3396.
- Bochner, B.R., Savageau, M. (1977) Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 434-444.
- Bone, T.L., Balkwill, D.L. (1988) Morphological and cultural comparison of microorganisms in surface and subsurface sediments at a pristine study site in Oklahoma. *Micorb. Ecol.*, **16**, 49-64.
- Boyle, J.J., Shann, J.R. (1995) Biodegradation of phenol, 2,4-DCP, 2,4-D, and 2,4,5-T in field-collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. *J. Environ. Qual.*, **24**, 782-785.
- Boyle, J.J., Shann, J.R. (1998) The influence of planting and soil characteristics on mineralization of 2,4,5-T in rhizosphere soil. *J. Environ. Qual.*, **27**, 704-709.

- Brix, H. (1990) Gas exchange through the soil-atmosphere interphase and through dead culms of *Phragmites australis* in a constructed reed bed receiving domestic sewage. *Water Research* **24**, 259-266.
- Brix, H. (1994) Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Wat. Sci. Technol.*, **29**, 71 – 78.
- Brümmer, I. H. M., Fehr, W., Wagner-Döbler, I. (2000) Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3078-3082.
- Bruns, A., Hoffelner, H., Overmann, J. (2003) A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**, 161-171.
- BUA – Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.). 2-Nitrophenol: (2-Hydroxy-nitrobenzol). 4-Nitrophenol: (4-Hydroxy-nitrobenzol). VCH, Weinheim 1992.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L. (1998) Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science & Technology*, **32**, 3379-3385.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. (1991) DNA amplification using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technology*, **9**, 553-557.
- Campbell, R., Greaves, M.P. (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: *Lynch, J.M. (ed) The Rhizosphere*, Wiley & Sons, Chinchester UK, pp. 11-34.
- Cardenas, M.L., Kickuth, R. (1978) Sekundäre Metabolite aus Makrophyten und ihre ökochemische Funktion. I. 3-(3-Carboxyphenyl)alanin als Inhaltsstoff und Exkretionsprodukt von *Iris pseudacorus* L.. *Angew. Botanik*, **52**, 203-214.
- Chaineau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J. (2000) Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of Environmental Quality*, **29**, 569-578.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, **415**, 545-549.
- Chen, Y.C., Banks, M.K., Schwab, A.P. (2003) Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.) *Environmental Science & Technology*, **37** (24): 5778-5782.
- Chin, K.-J., Hahn, D., Hengstmann, U., Liesack, W., Janssen, P. H. (1999) Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5042-5049.
- Cho, J.C., Giovannoni, S.J. (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 432-440.

- Coleman, J.O.D., BlakeKalff, M.M.A., Davies, T.G.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, **2** (4), 144-151.
- Costa, R.M., Camper, N.D., Riley, M.B. (2000) Atrazine degradation in a containerized rhizosphere system. *Journal of Environmental Science and Health Part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **35**, 677-687.
- Crowley, D.E., Brennerova, M.V., Irwin, C., Brenner, V., Focht, D.D. (1996) Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Ecology*, **20**, 79-89.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechn.(TIBTECH)*, **13**, 393-397.
- de Weger, L.A., van der Bij, A.J., Dekkers, C.L., Simons, M., Wijffelman, C.A., Lugtenberg, B.J.J. (1995) Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, **17**, 221-228.
- Dojka, M.A., Harris, J.K., Pace, N.R. (2000) Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1617-1621.
- Domey, S., Döring, G. (1994) Einfluss von Chlorphenolen auf die Bakterienbesiedlung der Rhizosphäre und Besiedlungsverhalten chlorphenolabbauender Bakterien in situ nach Inokulation. In: Merbach, W. (Ed.), *Mikroökologische Prozesse im System Pflanze-Boden. Ökophysiologie des Wurzelraums* Nr. 5, 42-46, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft.
- Dunny, G.M., Leonard, B.A.B. (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 527-56.
- Eberl, L. (1999) N-Acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. *System Appl Microbiol*, **22**, 493-506.
- Epstein, E. (1972) *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. John Wiley & Sons Inc.
- Eykholt, G.R., Davenport, D.T. (1998) Dechlorination of the chloroacetanilide herbicides Alachlor and Metolachlor by iron metal. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1482-1487.
- Fang, C.W., Radosevich, M., Fuhrmann, J.J. (2001) Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**, 679-682.
- Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S ribosomal-RNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2798-2801.
- Federle, T.W., Schwab, B.S. (1989) Mineralization of surfactants by microbiota of aquatic plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2092-2094.

- Friedrich, U., Naismith, M. M., Altendorf, K., Lipski, A. (1999) Community analysis of biofilters using fluorescence in situ hybridization including a new probe for the *Xanthomonas* branch of the class *Proteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3547-3554.
- Führ, A. (1996): Untersuchungen zu der Biodiversität natürlicher Bakterienpopulationen im Boden mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA-Sequenzen. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1996) Sensus and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 727-751.
- Gagné, S., Richard, C., Rousseau, H., Antoun, H. (1987) Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.*, **33**, 996-1000.
- Gao, H., Zepp, R.G. (1998) Factors influencing photoreactions of dissolved organic matter in a coastal river of the southeastern United States. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2940-2946.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L., Muyzer, G. (1996) Phenotypic analysis show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3248-3291.
- Gardner, J.M., Feldman, A.W., Zablotowicz, R.M. (1982) Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1335-1342.
- Gavrilova, E.A., Kruglov, Y.V., Garankina, N.G. (1983) *Tr. Vses. Nauchno-Issled. Instit. Skh. Mikrobiologii*, **52**, 67-70.
- Geller, G. (1998) Horizontal durchflossene Pflanzenkläranlagen im deutschsprachigen Raum - langfristige Erfahrungen, Entwicklungsstand. *Wasser & Boden*, **50**, 18 - 25.
- Gilbert, E.S., Crowley, D.E. (1997) Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1933-1938.
- Gilbert, G.S., Parke, J.L., Clayton, M.K., Handelsman, J. (1993) Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, **74**, 840-854.
- Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., Schleifer, K.-H. (1996) An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 403-406.
- Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M. (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 977-983.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C. (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 369-378.
- Gürtler, V., Stanisich A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**, 3-16.

- Gunther, T., Dornberger, U., Fritsche, W. (1996) Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **33**, 203-215.
- Hale, M.G., Foy, C.L., Shay, F.J. (1971) Factors affecting root exudation. *Advances in Agronomy*, **23**, 89-109.
- Harms, H.H. (1992) In-vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pestic. Sci.*, **35**, 277-281.
- Hathway, D.E. (1989) *Molecular Mechanisms of Herbicide Selectivity*. Oxford University Press, New York, ISBN 0-19-857642-0.
- Hegde, R.S., Fletcher, J.S. (1996) Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, **32**, 2471-2479.
- Heitkamp, M.A., Camel, V., Reuter, T.J., Adams, W.J. (1990) Biodegradation of p-Nitrophenol in an aqueous waste stream by immobilized bacterial. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2967-2973.
- Helal, H.M., Sauerbeck, D. (1989) Carbon turnover in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **152**, 211-216.
- Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirt. Ges.* **98**, 59-78.
- Höflich, G. (2000) Colonization and growth promotion of non-legumes by *Rhizobium* bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M. Johnson-Green, P. (Eds.) *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M. (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 703-711.
- Hsu, T.-S., Bartha, R. (1979) Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 36-41.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998b) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, **180** (18), 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L., Pace, N.R. (1998a) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.*, **180** (2), 366-376.
- Jackson, A.W., Pardue, J.H., Araujo, R. (1996) Monitoring crude oil mineralization in salt marshes: use of stable carbon isotope ratios. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1139-1144.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M. (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2391-2396.

- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. (1993) Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 945-952.
- Jordahl, J.L., Foster, L., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J. (1997) Effect of hybrid poplar trees on microbial populations important to hazardous waste bioremediation. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1318-1321.
- Ka, J.O., Yu, Z., Mohn, W.W. (2001) Monitoring the size and metabolic activity of the bacterial community during biostimulation of fuel-contaminated soil using competitive PCR and RT-PCR. *Microbial Ecology*, **42**, 267-273.
- Kadlec, R.H. (2002) Wetlands and Rebeds for wastewater treatment. In: Bitton, G. (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, Vol.6, 3389-3401, Wiley & Sons, NY.
- Kaitzis, G. (1970) Mikrobiozide Verbindungen aus *Scirpus lacustris* L. (Ein Beitrag zur Ökochemie des Wurzelraumes). Dissertation Universität Göttingen.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., Horikoshi, K. (1998) Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1510-1513.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**, 885-886.
- Knaebel, D.B., Vestal, J.R. (1992) Effects of intact rhizosphere microbial communities on the mineralization of surfactants in surface soils. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 643-653.
- Knight, R.L., Kadlec, R.H., Ohlendorf, H.M. (1999) The use of treatment Wetlands for petroleum industry effluents. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 973-980.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. (2004) Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17** (1): 6-15.
- Laha, S., Petrova, K.P. (1997) Biodegradation of 4-nitrophenol by indigenous microbial populations in Everglades soils. *Biodegradation*, **8**, No.5, 349-356.
- Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlee, D., Antoun, H. (1989) Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, **115**, 7-11.
- Lappin, H.M., Greaves, M.P., Slater, J.H. (1985) Degradation of the herbicide Mecoprop [2-(2-Methyl-4-Chlorophenoxy) Propionic Acid] by a synergistic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 429-433.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.-M., Alabouvette, C. (1995) Effect of two plant species, Flax (*Linum usitatissimum* L.) and Tomato (*Lycopersicon esulentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1004-1012.

- Lin, Q., Mendelsohn, I.A., Henry jr., C.B., Roberts, P.O., Walsh, M.M., Overton, E.B., Portier, R.J. (1999) Effects of bioremediation agents on oil degradation in mineral and salt marsh sediments. *Environmental Technology*, **20**, 825-837.
- Liu, S.V., Zhou, J.Z., Zhang, C.L., Cole, D.R., Gajdarziska-Josifovska, M., Phelps, T.J. (1997) Thermophilic Fe(III)-reducing bacteria from the deep subsurface: The evolutionary implications. *Science*, **277**, 1106-1109.
- Lohmann, R., Nelson, E., Eisenreich, S.J., Jones, K.C. (2000) Evidence for dynamic air-water exchange of PCDD/Fs: a study in the raritan Bay/Hudson river estuary. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 3086-3093.
- Lorah, M.M., Olsen, L.D. (1999) Degradation of 1,1,2,2-Tetrachloroethane in a freshwater tidal wetland: field and laboratory evidence. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 227-234.
- Lynch, J. M. (1990) The Rhizosphere. J. M. Lynch (ed.), Wiley & Sons, Chichester, England, ISBN 0 471 92548 9.
- Lynch, J.M., Whipps, J.M. (1990) Substrate Flow in the Rhizosphere. *Plant and Soil*, **129**, 1-10.
- Machate, T., Ketrup, A. (1998) Reinigung von PAK-kontaminiertem Grundwasser in einer Pflanzenkläranlage. *Wasser&Boden*, **50**, 52-54.
- Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997) Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.*, **34**, 210-223.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.-H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probe designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, **142**, 1097-1106.
- Mavingui, P., Laguerre, G., Berge, O., Heulin, T. (1992) Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 1894-1903.
- McFarlane, C., Pflieger, T. (1990) Effect, uptake and deposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 513 – 520.
- McInroy, J.A., Kloepper, J.W. (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, **173**, 337-342.
- McKinlay, R.G., Kasperek, K. (1999) Observations on decontamination of herbicide-polluted water by marsh plant systems. *Wat. Res.*, **33**, 505-511.

- Michaud, L., Di Cello, F., Brillì, M., Fani, R., Lo Giudice, A., Bruni, V. (2004) Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiology Letters*, **230**, 63-71.
- Miller, H.J., Henken, G., van Veen, J.A. (1989) Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 656-660.
- Møller, S., Petersen, A.R., Poulsen, L.K., Arvin, E., Molin, S. (1996) Activity and Three-Dimensional Distribution of Toluene Degrading *Pseudomonas putida* in a Multispecies Biofilm Assessed by Quantitative In Situ Hybridization and Scanning Confocal Laser Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4632-4640.
- Moormann, H., Kusch, P., Stottmeister, U. (2002) The Effect of Rhizodeposition from Helophytes on Bacterial Degradation of Phenolic Compounds. *Acta Biotechnol.* **22**, 107-112.
- Müller, F. (1986) *Phytopharmakologie: Verhalten und Wirkungsweise von Pflanzenschutzmitteln*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, ISBN 3-8001-3069-6.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335.
- Muratova, A., Hübner, T., Tischer, S., Turkovskaya, O., Moder, M., Kusch, P. (2003) Plant -Rhizosphere-Microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, **5** (2), 137-151.
- Muyzer, G., de Wall, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700.
- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter – conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4329-4339.
- Neilands, J.B., Leong, S.A. (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 187-208.
- Newman, E.I. (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.*, **3**, 139-145.
- Newman, L. A., Strand, S. E., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G., Ruzaj, M., Shurtleff, B.B., Wilmoth, J., Heilman, P., Gordon, M.P. (1997) Uptake and Biotransformation of Trichloroethylene by Hybrid Poplars. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1062-1067.
- Nietch, C.T., Morris, J.T., Vroblesky, D.A. (1999) Biophysical mechanisms of trichloroethene uptake and loss in baldcypress growing in shallow contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 2899-2904.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734-740.

- Pavel, E.W., Lopez, A.R., Berry, D.F., Smith, E.P., Reneau jr., R.B., Mostaghimi, S. (1999) Anaerobic degradation of dicamba and metribuzin in riparian wetland soils. *Wat. Res.*, **33**, 87-94.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Hallbeck, L., Pettersson, C. (1996) Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Molecular Ecology*, **5**, 427-436.
- Pingel, U. (1976) Der Einfluß phenolischer Aktivatoren und Inhibitoren der IES-Oxydase-Aktivität auf die Adventivbewurzelung bei *Tradescantia albiflora*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **79**, 109-120.
- Piutti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G., Martin-Laurent, F. (2002) Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils*, **36** (6): 434-441.
- Plugge, J. (2001) Wechselwirkungen industrieller organischer Schadstoffe mit Rhizosphärenkomponenten und Bilanzierung von Stoffströmen in Pflanzenkläranlagen – Laborversuche. Dissertation Universität Leipzig.
- Pörschmann, J., Kopinke, F.-D., Remmler, M., Mackenzie, K., Geyer, W., Mothes, S. (1996) Hyphenated techniques for characterizing coal wastewaters and associated sediments. *J.Chromatogr.*, **750**, 287 – 301.
- Porter, K. G., Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- Rasmussen, G., Olsen, R.A. (2004) Sorption and biological removal of creosote-contaminants from groundwater in soil/sand vegetated with orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Advances in Environmental Research*, **8** (3-4): 313-327.
- Reddy, B.R., Sethunathan, N. (1983) Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 826-829.
- Reddy, B.R., Sethunathan, N. (2004) Mineralization of p-Nitrophenol in the rhizosphere of rice. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **47**, 313-317.
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3417-3418.
- Römheld, V., Marschner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.*, **80**, 175-180.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1994) In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23 S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, **140**, 2849-2858.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., van Elsas, J.D. (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturing

- gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2770-2779.
- Roy, S., Ithantola, R., Hanninen, O. (1992) Peroxidase-activity in lake makrophytes and its relation to pollution tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **32** (4), 457-464.
- Saiki, R.K., Gelfant, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487 – 491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbour, NY.
- Sandermann, H.Jr. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends. Biochem. Sci. (TIBS)*, **17** (Feb), 82-84.
- Sandmann, E.R.I.C., Loos, M.A. (1984) Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media, high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Chemosphere*, **13**, 1073-1084.
- Sasser, M. (1990) MIDI technical note 101 & 102. MIDI, Newark, Del.  
<http://www.midi-inc.com/>
- Schäffner, A., Messner, B., Langebartels, C., Sandermann, H. (2002) Genes and enzymes for *in-planta* phytoremediation of air, water and soil. *Acta Biotechnol.*, **22**, 141-152.
- Schnoor, J.L., Licht, L.A., Mc Cutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H. (1995) Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 318A-323A.
- Seidel, K. (1963) Über Phenolspeicherung und Phenolabbau in Wasserpflanzen. *Naturwissenschaften*, **50**, 452-453.
- Seidel, K. (1965) Phenolabbau im Wasser durch *Scirpus lacustris* L. während einer Versuchsdauer von 31 Monaten. *Naturwissenschaften*, **52**, 398.
- Seidel, K. (1969) Zur bakteriziden Wirkung höherer Pflanzen. *Naturwissenschaften*, **56**, 642-643.
- Seidel, K. (1971) Wirkung höherer Pflanzen auf pathogene Keime in Gewässern. *Naturwissenschaften*, **58**, 150-151.
- Seidel, K. (1973) Reinigung von Industrieabwässern durch *Juncus maritimus* Lamarc. *Naturwissenschaften*, **60**, 158-159.
- Seidel, K. (1974) Eliminierung von Pentachlorphenol durch Pflanzen aus Gewässern. *Naturwissenschaften*, **61**, 81.
- Shann, J.R. (1995) The role of plants and plant/microbial systems in the reduction of exposure. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 13-15.

- Shann, J.R., Boyle, J.J. (1994) Influence of plant-species on in-situ rhizosphere degradation. *Bioremediation Through Rhizosphere Technology ACS Symposium Series*, **563**, 70-81.
- Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W., Erickson, L.E., Schnoor, J.L. (1993) Beneficial Effects of Plants in the Remediation of Soil and Groundwater Contaminated With Organic Materials. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **23**, 41 – 77.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K., Greer, C.W. (2003) Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 483-489.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W. T., Forney, L. (1998) Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1220-1225.
- Soltmann, U., Wand, H., Müller, A., Kusch, P., Stottmeister, U. (2002) Exposure to xenobiotics deeply affects the bacteriocenosis in the rhizosphere of helophytes. *Acta Biotechnologica*, **22**, 161-166.
- Sorrell, B.K., Armstrong, W. (1994) On the difficulties of measuring oxygen release by root systems of wetland plants. *Journal of Ecology*, **82**, 177-183.
- Spain, J.C., Gibson, D.T. (1991) Pathway for biodegradation of p-Nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 812-819.
- Stackebrandt, E. (1991) Unifying phylogeny and phenotypic diversity. In: *The Prokaryotes*. 2<sup>nd</sup> ed., pp. 19-47. Hrsg. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. New York, Springer Verlag.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., Trüper, H.G. (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. System. Bac.*, **38**, 321-325.
- Stengel, E. (1993) Species-specific aeration of water by different vegetation types in constructed wetlands. In: Moshiri, G.A.(Ed.) *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. Lewis Publishers, CRC Press Inc., 427-434.
- Stiborova, M., Anzenbacher, P. (1991) What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants – Cytochromes-P450 or Peroxidases – (A hypothesis). *General Physiology and Biophysics*, **10** (2), 209-216.
- Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D., Schleifer K.-H. (1998) Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreaktor degrading aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 930-939.
- Stottmeister, U., Kusch, P., Wießner, A., Weißbrodt, E., Martius, G., Becker, P. M., Eismann, F., Kotte, H. (1997a) Altlastenprobleme der Carbochemie in Nordwestsachsen: Entstehung, Ausmaß und erste Sanierungskonzepte. In: Knorr, C. und v. Schell, T.(Eds) "Mikrobieller Schadstoffabbau", Vieweg, Wiesbaden, 357 – 375.
- Stottmeister, U., Kusch, P., Weißbrodt, E., Martius, G., Wießner, A., Becker, P. M.,

- Kopinke, F.-D. (1997b) Altlasten aus der Carbochemie im mitteldeutschen Raum: Dimensionen, Besonderheiten und Sanierungsstrategien. In: E. Bayer et al., "Umwelt und Chemie", VCH, Weinheim, 8, 185 – 199.
- Studer, C., Brändle, R. (1984) Oxygen-consumption and availability in the rhizomes of *Acorus calamus* L., *Glyceria maxima* (Hartmann) Holmberg, *Menyanthes trifoliata* L., *Phalaris arundinacea* L., *Phragmites communis* Trin. and *Typha latifolia* L. *Botanica Helvetica*, **94**, 23-31.
- Sun, H.W., Xu, J., Yang, S.H., Liu, G.L., Dai, S.G. (2004) Plant uptake of aldicarb from contaminated soil and its enhanced degradation in the rhizosphere. *Chemosphere*, **54** (4): 569-574.
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 625-630.
- Takai, K., Mose, D.P., Onstott, T.C., Spoelstra, N., Pfiffner, S.M., Dohnalkova, A., Fredrickson, J.K. (2001) *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 1245-1256.
- Thofern, U. (1994) Pflanzenkläranlagen – Prinzipien, Verfahrensvarianten, Einsatzmöglichkeiten. *Zbl.Hyg.*, **196**, 197-226.
- Thompson, P.L., Ramer, L.A., Schnoor, J.L. (1998) Uptake and Transformation of TNT by Hybrid Poplar Trees. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 975-980.
- Van Zwieten, L., Feng, L., Kennedy, I.R. (1995) Colonisation of seedling roots by 2,4-D degrading bacteria: a plant-microbial model. *Acta Biotechnol.*, **15**, 27-39.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., DeVos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K. (1992) Rapid identification of Bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*, **93**, 227-234.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, **14**, 136-143.
- Walton, B.T., Anderson, T.A. (1990) Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1012-1016.
- Walton, B. T., Guthrie, E. A., Hoylman, A. M. (1994) Toxicant Degradation in the Rhizosphere. In: T. A. Anderson; J. R. Coats (Eds.) *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. ACS Symposium Series, 563, 11-26. American Chemical Society, Washington D.C.
- Watanabe, M. E. (1997) Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ. Sci.Technol.*, **31**, 182 – 186.

- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting Genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
- Wießner, A., Kusch, P., Stottmeister, U. (2002) Oxygen Release by Roots of *Typha latifolia* and *Juncus effusus* in Laboratory Hydroponic Systems. *Acta Biotechnol.*, **22**, 209-216.
- Wießner, A., Kusch, P., Weißbrodt, E., Stottmeister, U., Pörschmann, J., Kopinke, F.-D. (1993) Charakterisierung des Wassers und des Sedimentes einer Braunkohle-Schwelwasserdeponie. *Wasser Abwasser Praxis*, 375 – 379.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbial Rev*, **51**, 221-271.
- Yoshitomi, K.J., Shann, J.R. (2001) Corn (*Zea mays* L.) root exsudates and their impact on C-14-pyrene mineralization. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**, 1769-1776.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R., Zeyer, J. (1997) Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch. Microbiol.*, **168**, 185-192.
- Zhao, S.H., Arthur, E.L., Coats, J.R. (2003) The use of native prairie grasses to degrade atrazine and metolachlor in soil. *Environmental Fate and Effects of Pesticides, ACS Symposium Series*, **853**, 157-166.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSB <sub>5</sub>	Biologischer Sauerstoffbedarf
C	Cytosin
CE	<i>Carex gracilis</i> , Schadstoff exponiert
CK	<i>Carex gracilis</i> , nicht exponierte Kontrolle
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
2,4-DCP	2,4-Dichlorphenol
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMP	2,6-Dimethylphenol
DOC	Dissolved Organic Carbon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EW	Einwohnergleichwert
FM	Frischmasse
g	Gramm
G	Guanin
G+C	Guanin und Cytosin
GPHGC	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C Gehalt
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
JE	<i>Juncus effusus</i> , Schadstoff exponiert
JK	<i>Juncus effusus</i> , nicht exponierte Kontrolle
kAmp.	Keine Amplifikation
KBE	Kolonie bildende Einheiten
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MPN	Most Probable Number
n	Probenumfang
NP	4-Nitrophenol
OD	Optische Dichte
PAK	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>Phalaris arundinacea</i> , Schadstoff exponiert
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PK	<i>Phalaris arundinacea</i> , nicht exponierte Kontrolle
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
TM	Trockenmasse
TNT	Trinitrotoluol
TOC	Total Organic Carbon
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen / Volumen
w	Gewicht
w/v	Masse / Volumen
$\sigma$	Standardabweichung

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Wurzelquerschnitt von *Carex gracilis* ca. 3 cm von der Wurzelspitze entfernt. Angefärbt mit Safraninlösung.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung bei 2,6-Dimethylphenol belasteten Hydroponiksystemen.

**Abbildung 3:** Schema zum Versuchsaufbau bei 4-Nitrophenol belasteten Systemen.

**Abbildung 4:** *Carex gracilis* nach 10-wöchiger Exposition mit 50 mg/l 2,6-Dimethylphenol.

**Abbildung 5:** Batchversuch zur Verringerung der DMP-Konzentration in Hydroponiksystemen mit und ohne Pflanze.

**Abbildung 6:** Batchversuch mit zuvor nicht exponierten *Carex* und *Juncus* Pflanzen zum 4-Nitrophenol Abbau unter Hydroponikbedingungen. Startkonzentration. 2,2 mg/l.

**Abbildung 7:** Batchversuch mit zuvor nicht exponierten *Carex* und *Juncus* Pflanzen zum 4-Nitrophenol-Abbau unter Hydroponikbedingungen. Startkonzentration 18,5 mg/l.

**Abbildung 8:** Bakterielle Besiedlung (grün-gelb) an Wurzelhaaren von *Carex gracilis*. Anfärbung mit SYTO 9.

**Abbildung 9:** Bakterienbesiedlung (grün) eines auf einem Sandkorn aufliegenden Wurzelhaares. A, Sandkorn ausgeblendet; B, mit Sandkorn. Fluoreszenzmarkierung mit SYTO 9.

**Abbildung 10:** CLSM-Aufnahme eines Biofilms an einem Sandpartikel aus dem Wurzelbereich von *Carex gracilis*. Anfärbung mit SYTO 9. Rot = Biofilm.

**Abbildung 11:** *Carex gracilis* Wurzeln nach Einbettung in Sojaagar, dem 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zugesetzt wurde.

**Abbildung 12:** Sand aus einem DMP belasteten Ansatz (B) und aus einem nicht belasteten Kontrollansatz (A) nach Einbettung in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid -Agar.

**Abbildung 13:** RAPD- (A), Spacer- (B) und Spacer-Restriktions-Analyse (C) für Isolate mit hoher Abundanz von der Rhizoplane von *Phalaris arundinacea* aus einem nicht DMP-exponiertem System.

**Abbildung 14:** Untersuchungen abundanter Isolate von der Rhizoplane von *Phalaris arundinacea* über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse.

**Abbildung 15:** Untersuchungen abundanter Isolate von der Rhizoplane von *Carex gracilis* über RAPD und Spacer-Restriktionsanalyse.

**Abbildung 16:** Entwicklung der DMP Abbauleistung in einem *Carex gracilis* Sandbett-system bei einer Raumbelastung von 67mg/1000cm<sup>3</sup> d.

**Abbildung 17:** Entwicklung der NP-Konzentration im Ablauf innerhalb der ersten 2 Monate nach Inbetriebnahme. Zulaufkonzentration 20 mg/l, Zulaufmenge 711 ml/d Gefäß.

**Abbildung 18:** CLSM-Aufnahme der Oberfläche einer *Carex gracilis* Wurzel. Färbung mit SYTO 9.

**Abbildung 19:** Ähnlichkeiten der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an Wurzel oder Sand in Systemen mit *Carex gracilis*. Dendrogramm nach dem Verfahren von WARD.

**Abbildung 20:** Ähnlichkeiten der mikrobiellen Besiedlungsstruktur an Wurzel oder Sand in Systemen mit *Juncus effusus*. Dendrogramm nach dem Verfahren von WARD.

**Abbildung 21:** *Mycobacterium spec.* DMP20 auf R2A-Agar.

### 7.3. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Verwendete Oligonukleotidsonden.

**Tabelle 2:** *Carex gracilis*. Mittlerer Wasserverbrauch der Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der DMP- oder NP-Konzentration.

**Tabelle 3:** *Juncus effusus*. Mittlerer Wasserverbrauch der Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der DMP- oder NP-Konzentration.

**Tabelle 4:** *Phalaris arundinacea*. Mittlerer Wasserverbrauch bei Exposition mit 50 mg/l 2,6-Dimethylphenol.

**Tabelle 5:** Massezuwachs bei *Carex gracilis* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen, die mit NP bzw. DMP exponiert wurden.

**Tabelle 6:** Massezuwachs bei *Juncus effusus* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen, die mit NP bzw. DMP exponiert wurden.

**Tabelle 7:** Massezuwachs bei *Phalaris arundinacea* über einen Zeitraum von 41 Tagen bei nicht belasteten Kontrollpflanzen und Pflanzen, die mit DMP exponiert wurden.

**Tabelle 8:** Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Carex gracilis*.

**Tabelle 9:** Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Juncus effusus*.

**Tabelle 10:** Veränderung der DMP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Phalaris arundinacea*.

**Tabelle 11:** Veränderung der NP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Carex gracilis*.

**Tabelle 12:** Veränderung der NP-Konzentration in der Nährlösung infolge der Flüssigkeitsaufnahme durch *Juncus effusus*.

**Tabelle 13:** Besiedlungsdichte (KBE auf R2A- und DMP-Agar) an den Wurzeln von *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Juncus effusus* Pflanzen nach 1monatiger DMP-Exposition und bei nicht belasteten Kontrollen.

- Tabelle 14:** Anzahl unterschiedlicher Isolate nach RAPD bzw. Spacer-Restriktionsanalyse.
- Tabelle 15:** Entwicklung der bakteriellen Besiedlungsdichte an den Wurzeln von *Carex gracilis* und der Abbauleistung bei Exposition mit 50 mg/l DMP.
- Tabelle 16:** Zellzahlen nach 2 Monaten in *Carex gracilis* Hydroponiksystemen bei Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.
- Tabelle 17:** Zellzahlen nach 2 Monaten in *Carex gracilis* Sandbettssystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.
- Tabelle 18:** Zellzahlen in *Carex gracilis* Sandbettssystemen nach 2monatiger Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol gefolgt von einer 2monatigen Belastung mit 2 mg/l bzw. nach 4 Monaten bei der unbelasteten Kontrolle.
- Tabelle 19:** Zellzahlen nach 2 Monaten in *Juncus effusus* Hydroponiksystemen bei Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.
- Tabelle 20:** Zellzahlen nach 2 Monaten in *Juncus effusus* Sandbettssystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.
- Tabelle 21:** Zellzahlen in *Juncus effusus* Sandbettssystemen nach 2monatiger Belastung mit 20 mg/l Nitrophenol gefolgt von einer 2monatigen Belastung mit 2 mg/l bzw. nach 4 Monaten bei der unbelasteten Kontrolle.
- Tabelle 22:** Zellzahlen nach 2 Monaten in unbepflanzten Sandbettssystemen bei Belastung mit 2 mg/l bzw. 20 mg/l Nitrophenol und bei unbelasteten Kontrollen.
- Tabelle 23:** Dauer bis zum einsetzenden Nitrophenolabbau in 1 ml Testansätzen.
- Tabelle 24:** Maximale Abbauleistung verschiedener Systeme nach 2monatiger Nitrophenol-Exposition.
- Tabelle 25:** Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Wurzel- oder Sandoberfläche in *Carex gracilis* Systemen ohne Nitrophenol-Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.
- Tabelle 26:** Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Wurzel- oder Sandoberfläche in *Juncus effusus* Systemen ohne Nitrophenol-Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.
- Tabelle 27:** Prozentualer Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen bei Isolaten von der Sandoberfläche in unbepflanzten Systemen ohne Nitrophenol-Belastung (Kontrolle) bzw. nach Exposition mit Nitrophenolkonzentrationen von 2 mg/l oder 20 mg/l.
- Tabelle 28:** 4-Nitrophenol verwertende Bakterien mit hoher Abundanz. Isoliert von Wurzeln von *Carex gracilis* in Sandbettssystemen.
- Tabelle 29:** 2,6-Dimethylphenol verwertende Bakterien mit hoher Abundanz. Isoliert aus *Carex gracilis* Hydroponik- und Sandbett-Systemen nach Langzeitbelastung.
- Tabelle 30:** Zellzahlen nach 2monatiger Nitrophenolexposition.
- Tabelle 31:** Zusammenstellung übereinstimmender bakterieller Isolate von Wurzeln (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus*) anhand der RAPD-Analyse und nach morphologischen Gesichtspunkten.

#### 7.4. Zellzahlen nach 2monatiger Nitrophenolexposition

Tabelle 30: Zellzahlen nach 2monatiger Nitrophenolexposition.

		R2A-Agar KBE / cm <sup>2</sup>	NP-Agar KBE /cm <sup>2</sup>	Pilze (Malzagar) KBE/cm <sup>2</sup>	Fluoresz. Pseudom. KBE/cm <sup>2</sup>
<b>Carex gracilis Hydroponik</b>					
Kontrolle	Wurzel	1,7 * 10 <sup>5</sup>	1,8% 3,0*10 <sup>3</sup>	0,1% 1,8*10 <sup>2</sup>	0,07% 1,2*10 <sup>2</sup>
	Wasser	2,0 * 10 <sup>4</sup> /ml	3,1% 6,1*10 <sup>2</sup> /ml	0,4% 7,1*10 <sup>1</sup> /ml	0,2% 4,8*10 <sup>1</sup> /ml
NP exponiert 20 mg/l	Wurzel	2,2 * 10 <sup>5</sup>	15% 3,4*10 <sup>4</sup>	0,2% 4,5*10 <sup>2</sup>	0,1% 2,4*10 <sup>2</sup>
	Wasser	3,7 * 10 <sup>4</sup> /ml	14% 5,3*10 <sup>3</sup> /ml	0,09% 3,2*10 <sup>1</sup> /ml	0,09% 3,5*10 <sup>1</sup> /ml
<b>Carex gracilis Sandbett</b>					
Kontrolle	Wurzel	2,3 * 10 <sup>5</sup>	1,5% 3,4 * 10 <sup>3</sup>	0,08% 1,7 * 10 <sup>2</sup>	0,03% 7,0 * 10 <sup>1</sup>
	Sand	4,6 * 10 <sup>4</sup>	1% 4,8 * 10 <sup>2</sup>	0,1% 5,0 * 10 <sup>1</sup>	0,1% 5,0 * 10 <sup>1</sup>
4-NP exponiert 2 mg/l	Wurzel	2,0 * 10 <sup>5</sup>	8,6% 1,7 * 10 <sup>4</sup>	0,09% 1,8 * 10 <sup>2</sup>	0,1% 2,4 * 10 <sup>2</sup>
	Sand	3,6 * 10 <sup>4</sup>	9,1% 3,3 * 10 <sup>3</sup>	0,1% 4,0 * 10 <sup>1</sup>	0,3% 1,0 * 10 <sup>2</sup>
4-NP exponiert 20 mg/l	Wurzel	4,1 * 10 <sup>5</sup>	15% 6,3 * 10 <sup>4</sup>	0,03% 1,5 * 10 <sup>2</sup>	0,1% 4,4 * 10 <sup>2</sup>
	Sand	4,1 * 10 <sup>4</sup>	11% 4,3 * 10 <sup>3</sup>	0,05% 2,0 * 10 <sup>1</sup>	0,2% 1,0 * 10 <sup>2</sup>
<b>Scirpus lacustris Hydroponik</b>					
Kontrolle	Wurzel	2,7 * 10 <sup>5</sup>	0,8% 2,1*10 <sup>3</sup>	0,05% 1,4*10 <sup>2</sup>	Kein Wachstum
	Wasser	1,2 * 10 <sup>4</sup> /ml	0,8% 1,0*10 <sup>2</sup> /ml	0,4% 4,9*10 <sup>1</sup> /ml	Kein Wachstum
4-NP exponiert 20 mg/l	Wurzel	3,2 * 10 <sup>5</sup>	6,6% 2,1*10 <sup>4</sup>	0,2% 6,7*10 <sup>2</sup>	0,8% 2,4*10 <sup>3</sup>
	Wasser	3,4 * 10 <sup>4</sup> /ml	4% 1,4*10 <sup>3</sup> /ml	0,2% 7,0 * 10 <sup>1</sup> /ml	0,07% 2,5*10 <sup>1</sup> /ml
<b>Scirpus lacustris Sandbett</b>					
Kontrolle	Wurzel	4,1 * 10 <sup>5</sup>	2,1% 8,5 * 10 <sup>3</sup>	0,2% 9,0 * 10 <sup>2</sup>	Kein Wachstum
	Sand	5,7 * 10 <sup>4</sup>	2,1% 1,2 * 10 <sup>3</sup>	0,4% 2,7 * 10 <sup>2</sup>	Kein Wachstum
4-NP exponiert 2mg/l	Wurzel	5,3 * 10 <sup>5</sup>	8,5% 4,5 * 10 <sup>4</sup>	0,2% 1,3 * 10 <sup>3</sup>	0,1% 6,0 * 10 <sup>2</sup>
	Sand	6,0 * 10 <sup>4</sup>	14% 8,2 * 10 <sup>3</sup>	0,2% 9,8 * 10 <sup>1</sup>	Kein Wachstum
4-NP exponiert 20 mg/l	Wurzel	4,7 * 10 <sup>5</sup>	19% 8,7 * 10 <sup>4</sup>	0,009% 4,0 * 10 <sup>1</sup>	0,1% 4,5 * 10 <sup>2</sup>
	Sand	1,0 * 10 <sup>5</sup>	16% 1,6 * 10 <sup>4</sup>	Kein Wachstum	0,05% 4,8 * 10 <sup>1</sup>
<b>Sand unbepflanzt</b>					
Kontrolle	Sand	2,4 * 10 <sup>3</sup>	2,8% 6,6 * 10 <sup>1</sup>	Kein Wachstum	Kein Wachstum
4-NP 2mg/l	Sand	3,7 * 10 <sup>3</sup>	8,4% 3,1 * 10 <sup>2</sup>	n.b.	n.b.
4-NP 20mg/l	Sand	2,8 * 10 <sup>3</sup>	19% 5,3 * 10 <sup>2</sup>	Kein Wachstum	Kein Wachstum

## 7.5. Zusammenstellung übereinstimmender bakterieller Isolate von Wurzeln anhand der RAPD-Analyse und nach morphologischen Gesichtspunkten

Tabelle 31: Zusammenstellung übereinstimmender bakterieller Isolate von Wurzeln (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Juncus effusus*) anhand der RAPD-Analyse und nach morphologischen Gesichtspunkten.

Stamm	Morphologie						Übereinstimmende Isolate (Zuordnung über RAPD und Morphologie)	Wachstum auf DMP	
	Farbe	Opt.Struktur	Konsistenz	Umriss	Profil				
<b>Carex gracilis</b>									
d 1	Gram neg. Stäbchen (1x2)		3-2	2	1	1	2	CK (R2A) 1	nein
d 2	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		3-2	2	1	1	3	CK (R2A) 2	nein
d 3	Gram neg. Stäbchen (1x3-5)		3-2	2	1	1	3	CK (R2A) 3,4	nein
d 4	Gram neg. Stäbchen (1x2)		2-3	1+2	1	1	3	CK (R2A) 5,17	nein
d 5	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		3-2	2	1	1	2	CK (R2A) 6,7,9	nein
d 6	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		3-2	2	1	1	2	CK (R2A) 8,13,15,21	nein
d 7	Gram neg. Stäbchen (1x2)		3-2	2	1	1	2	CK (R2A) 10	nein
d 8	Gram neg. kurze Stäbchen		1	1+2	1	1	1	CK (R2A) 11,12	nein
d 9	Gram neg. Stäbchen		3-2	2	1	1	1	CK (R2A) 14	nein
d 10	Gram neg. Stäbchen		4	3	2	2	2	CK (R2A) 16,22,25,26,27,29	nein
d 11	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)		3-2	2	1	1	4	CK (R2A) 18	nein
d 12	Gram neg. Stäbchen (1x2)		4	2	1	1	1	CK (R2A) 19,23	nein
d 13	Gram neg. kurze Stäbchen		2-3	1	1	1	1	CK (R2A) 20	nein
d 14	Gram pos. Stäbchen		3-2	2	1	1	3	CK (R2A) 24	nein
d 15	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)		3-2	2	1	1	2	CK (R2A) 28	nein
d 16	Gram neg. kurze Stäbchen		2-3	1	1	1	1	CK (R2A) 30	nein
d 17	Gram neg. Stäbchen		2-4-3	2	1	1	3	CK (DMP) 1,8,11	ja
d 18	Gram neg. K. o. kurze Stäb.		2-5-7	2	4	1	7	CK (DMP) 2,5	ja
d 19	Gram neg. kurze Stäbchen		2-4	2	1	1	2	CK (DMP) 3,4,9,10,16,17,24,25,26, 27,28,30	ja
d 20	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)		2-4-3	2	1	1	2	CK (DMP) 12	ja
d 21	Gram pos. Stäbchen (1x3)		2-4-3	2	1	1	2	CK (DMP) 13 (k.Amp.)	ja
d 22	Gram neg. Stäbchen (1x3-4)		2-4	2	1	1	3	CK (DMP) 14	ja
d 23	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		2-4	2	1	1	3	CK (DMP) 18	ja
d 24	Gram neg. Stäbchen (1x1,5-2)		2-3	2	1	1	2	CK (DMP) 19	ja
d 25	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)		2-4-3	2	1	1	2	CK (DMP) 20 (k.Amp.)	ja
d 26	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)		2-3	2	1	1	2	CK (DMP) 21,22,23	ja
d 27	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)		2-5-7	2	4	1	7	CK (DMP) 29 (k.Amp.)	ja
d 28	Gram pos. Stäbchen		2-3	1	1	1	3	CE (R2A) 1 (k.Amp.)	nein
d 29	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)		2-4	2	1	1	2	CE (R2A) 2,4,6,10,13,22,30	nein
d 30	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)		3-2	1+2	1	1	3	CE (R2A) 3,17,7,9,12,14,18 CE (DMP) 27 CK (DMP) 6,7,15	nein/ja
d 31	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		3-2	2	1	1	2	CE (R2A) 5,15,29 CE (DMP) 3,5,6,19,25	nein/ja
d 32	Gram pos. Stäbchen (1x3,4)		2-3	1	1	1	3	CE (R2A) 8	nein
d 33	Gram neg. Stäbchen (1x2)		4-2	2	4	1	2	CE (R2A) 11	nein
d 34	Gram pos. Stäbchen (1x4)		2-3	1	1	1	3	CE (R2A) 16	nein
d 35	Gram pos. Stäbchen (1x3)		2-3	1	1	1	2	CE (R2A) 19 (k.Amp.)	nein
d 36	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)		3	1	4	1	1	CE (R2A) 20	nein
d 37	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		3-2	2	1	2	2	CE (R2A) 21	nein
d 38	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)		5	2	1	1	3	CE (R2A) 23	nein
d 39	Gram neg. Stäbchen (1x2)		2-3	1	1	1	2	CE (R2A) 24	nein
d 40	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)		4	2	1	1	2	CE (R2A) 25	nein
d 41	Gram neg. Kokken		7	2	1	1	3	CE (R2A) 26	nein
d 42	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)		2	3	3	2	2	CE (R2A) 27	ja

d 43	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)	2-4	2	1	1	2		CE (R2A) 28	nein
d 44	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2	1+2	1	1	1		CE (DMP) 1 (k.Amp.)	ja
d 45	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2	1+2	1	1	1		CE (DMP) 2 (k.Amp.)	ja
d 46	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3	1+2	1	1	2		CE (DMP) 14	ja
d 47	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3	1+2	1	1	2		CE (DMP) 23	ja
d 48	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)	2	3	3	2	2		CE (DMP) 28 (k.Amp.)	ja
d 49	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)							CE (DMP) 10,15,20,26,30	ja
d 50	Stäbchen (1x2)	2	1+2	1	1	2		CE (DMP) 29	ja
d 51	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)	2	3	3	2	2		CE (DMP) 4,7,8,9	ja
d 52	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2	1+2	1	1	2		CE (DMP) 21	ja
d 53	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)	2	3	3	2	2		CE (DMP) 11,12,13,18,22,24,28	ja
d 54	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)	2	3	3	2	2		CE (DMP) 17	ja
<b>Phalaris arundinacea</b>									
d 55	Gram pos. Kokken	7	2	1	1	3		PK (R2A) 1	nein
d 56	Gram neg. Stäbchen (1x1,5-2)	4	3	4	2	1		PK (R2A) 2,13	nein
d 57	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	4-2	2	1	1	1		PK (R2A) 3	nein
d 58	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	2	4	4	1	2		PK (R2A) 4	nein
d 59	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	3-2	1+2	1	1	2		PK (R2A) 5	nein
d 60	Gram neg. Stäbchen (1x3-4)	3-2	2	1	1	4		PK (R2A) 6,10	nein
d 61	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3-2	2	1	1	2		PK (R2A) 7,8,11,14,27 PE (R2A) 29	nein
d 62	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	4-2	2	1	1	3		PK (R2A) 9,17,29	nein
d 63	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	4-3	2	1	1	3		PK (R2A) 12	nein
d 64	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	5-7	2	1	1	3		PK (R2A) 15	nein
d 65	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)	4	2	4	1	1		PK (R2A) 16	nein
d 66	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	4	2	1	1	2		PK (R2A) 18	nein
d 67	Gram pos. Kokken	7	2	2	1	2		PK (R2A) 19	nein
d 68	Gram neg. Stäbchen (1x2)	3-2	2	1	1	3		PK (R2A) 20	nein
d 69	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3-2	2	1	1	3		PK (R2A) 21	nein
d 70	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	4	2	4	1	1		PK (R2A) 22	nein
d 71	Gram neg. Stäbchen	2-4-3	2	1	1	3		PK (R2A) 23	nein
d 72	Gram neg. Stäbchen (1x3-4)	2	4	4	1	1		PK (R2A) 24	nein
d 73	Gram pos. Stäbchen	4	2	1	1	3		PK (R2A) 25	nein
d 74	Gram pos. K. o. kurze Stäb.	7	2	1	1	3		PK (R2A) 26	nein
d 75	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	2-4	2	2	1	2		PK (R2A) 28	nein
d 76	Gram pos. Kokken	7	2	1	1	3		PK (R2A) 30	nein
d 77	Gram pos. Stäbchen (1x2)	5	2	1	1	3		PK (DMP) 30,21,20,16	ja
d 78	Gram pos. Kokken	6-5	4	4	1	2		PK (DMP) 23,11,8	ja
d 79	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	6-5	4	1	1	3		PK (DMP) 17	ja
d 80	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2-5	4	3	2	1		PK (DMP) 24	ja
d 81	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2-5	4	3	2	1		PK (DMP) 18 (kaum Banden)	ja
d 82	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2-5	4	3	2	1		PK (DMP) 12	ja
d 83	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	2-3	1	1	1-2	2		PK (DMP) 7,6	ja
d 84	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	2-3	1	1	1	2		PK (DMP) 3,1	ja
d 85	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	2	4	4	1	2		PK (DMP) 2 (kaum Banden) nach mehrfachen Überimpfen K.W.	nein
d 86	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2	4	1	1	3		PK (DMP) 29,28,25,10,9	ja
d 87	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2	4	1	1	3		PK (DMP) 27,5,15	ja
d 88	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2	4	1	1	2		PK (DMP) 4	ja
d 89	Gram pos. Stäbchen (1x1,5)	2	4	1	1	2		PK (DMP) 26,22,19,14,13	ja
d 90	Gram neg. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2	2	1	1	3		PE (R2A) 1,16,25	nein
d 91	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	2-3	1	1	1	2		PE (R2A) 2,3,4,8	nein
d 92	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	3-2	2	1	1	3		PE (R2A) 5,11,12,17,18,27	nein
d 93	Gram neg. Stäbchen (1x2-2,5)	2-4-3	2	1	1	2		PE (R2A) 6	nein
d 94	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	2-3	1	4	1	1		PE (R2A) 7	ja

d 95	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	7   2   1   1   4	PE (R2A) 9	nein
d 96	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	2-3   1   1   1   2	PE (R2A) 10,19,21,23,28,30	nein
d 97	Gram neg. Stäbchen (1x3-4)	4   3   1   2   3	PE (R2A) 13,24	nein
d 98	Gram pos. Stäbchen (1x2)	3-2   2   1   1   2	PE (R2A) 14,20	nein
d 99	Gram neg. Stäbchen (1x3-4)	2-5-7   2   1   1   3	PE (R2A) 15	nein
d 100	Gram neg. Stäbchen (1x3-5)	2-5   4   1   2   1	PE (R2A) 22	nein
d 101	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	2   3   3   2   2	PE (R2A) 26	nein
d 102	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   4   1   1	PE (DMP) 1 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 103	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 2 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 104	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 3 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 105	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 4 (k.Amp.)	ja
d 106	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   4   1   1	PE (DMP) 5 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 107	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 6 (k.Amp.)	ja
d 108	Gram ? Kokken	4   3   2   2   3	PE (DMP) 7	ja
d 109	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	3-4   1+2   4   1   3	PE (DMP) 8 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 110	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 9 (k.Amp.)	ja
d 111	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 10 (k.Amp.)	ja
d 112	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 11 (k.Amp.)	ja
d 113	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 13 (k.Amp.)	ja
d 114	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   4   1   1	PE (DMP) 14 nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 115	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 15 (k.Amp.)	ja
d 116	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 16 (k.Amp.)	ja
d 117	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 17 (k.Amp.)	ja
d 118	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 18 (k.Amp.)	ja
d 119	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 19 (k.Amp.)	ja
d 120	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 20 (k.Amp.)	ja
d 121	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 21 (k.Amp.)	ja
d 122	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 22 (k.Amp.)	ja
d 123	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 23 (k.Amp.)	ja
d 124	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 24 (k.Amp.)	ja
d 125	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 25 (k.Amp.)	ja
d 126	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 26 (k.Amp.)	ja
d 127	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3   1+2   1   1   2	PE (DMP) 27 (k.Amp.)	ja
d 128	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 28 (k.Amp.)	ja
d 129	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   1   1   2	PE (DMP) 29 (k.Amp.)	ja
d 130	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	3-2   1+2   4   1   1	PE (DMP) 30 (k.Amp.) nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
<b>Juncus effusus</b>				
d 131	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	4-5-7   4   1   2   7	JK (R2A) 1	nein
d 132	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)	4-2   2   2   1   2	JK (R2A) 2	nein
d 133	Gram neg. Stäbchen (1x1,5-2)	4   2   1   1   3	JK (R2A) 5,9,13,15,16,17,21,25,29	nein
d 134	Gram neg. Stäbchen (1x1,5-2)	4   3   3   1   2	JK (R2A) 6	nein
d 135	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3-2   2   1   1   3	JK (R2A) 10,18,26 SE (R2A) 25	nein
d 136	Gram neg. Stäbchen (1x2)	4-2   2   1   1   2	JK (R2A) 11	nein
d 137	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3-2   2   1   1   3	JK (R2A) 12,14	nein
d 138	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3   2   1   1   2	JK (R2A) 20	nein
d 139	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	4   2   4   1   1	JK (R2A) 24	nein
d 140	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	3-2   1+2   1   1   2	JK (R2A) 4	nein
d 141	Gram neg. Stäbchen (1x2)	3   1+2   1   1   3	JK (R2A) 7	nein
d 142	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	3   1+2   1   1   2	JK (R2A) 8	nein

d 143	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2	4   3   3   1   2	JK (R2A) 3,28	nein
d 144	Gram neg. K. o. kurze Stäb.	3-2   2   1   1   3	JK (R2A) 19	nein
d 145	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)	4-3   2   1   1   3	JK (R2A) 22	nein
d 146	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)		JK (R2A) 23,27	nein
d 147	Gram neg. Stäbchen (1x2-4)	3-2   1+2   1   1   2	JK (R2A) 30	nein
d 148	Gram pos. Stäbchen (1x1,5-2)		JK (DMP) 1,2,9,10,7	ja
d 149	Gram pos. Stäbchen	2-3   1   1   1   2	JK (DMP) 3	ja
d 150	Gram neg. Stäbchen (1x1,5)	4-3   2   1   1   3	JK (DMP) 4	ja
d 151	Gram pos. Stäbchen	2-3   1   1   1   2	JK (DMP) 5	ja
d 152	Gram neg. Kokken	2-3   1   4   1   1	JK (DMP) 6	ja
d 153	Gram pos. Stäbchen (1x3-4)	2-3   1   1   1   4	JK (DMP) 8 (k.Amp.)	ja
d 154	Gram neg. Stäbchen	1   1+2   1   2   1	JE (R2A) 30	nein
d 155	Gram neg. Stäbchen	3-2   1+2   1   1   2	JE (R2A) 10,21,29	nein
d 156	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3   1+2   1   1   2	JE (R2A) 3,16,19	nein
d 157	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-4-1   2   1   1   5	JE (R2A) 28,27,26,12,6	nein
d 158	Gram pos. Stäbchen (1x2)	3-4   2   1   1   5	JE (R2A) 2,5,24	nein
d 159	Gram pos. Stäbchen (1x2)	3-4   2   1   1   5	JE (R2A) 18,15,4	nein
d 160	Gram neg. Stäbchen (1x2-3)	3-2   1+2   2   1   2	JE (R2A) 23,11,8,7	nein
d 161	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	5-3   4   3   2   2	JE (R2A) 9,22	nein
d 162	Gram neg. Stäbchen	4-3   2   1   1   3	JE (R2A) 1,13,20	nein
d 163	Gram pos. Stäbchen (1x2)	5   2   1   1   3	JE (R2A) 14,17	nein
d 164	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	5   2   1   1   3	JE (DMP) 1 (k.Amp.)	ja
d 165	Gram neg. Kokken		JE (DMP) 2 nach mehrfachen Überimpfen k.W.	nein
d 166	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2   1+2   1   1   2	JE (DMP) 13	ja
d 167	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2   1+2   1   1   2	JE (DMP) 15	ja
d 168	Gram ? Stäbchen (1x2-4)	3   2   1   1   3	JE (DMP) 16	ja
d 169	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2   2   1   1   2	JE (DMP) 17	ja
d 170	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3   2   1   1   3	JE (DMP) 18,19	ja
d 171	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3-2   1+2   1   1   2	JE (DMP) 20,22,23,24,25,26,28,29,30	ja
d 172	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	3   1+2   1   1   2	JE (DMP) 21	ja
d 173	Gram pos. Stäbchen (1x2-3)	2-3   2   1   1   3	JE (DMP) 27	ja
d 174	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	3-2   1+2   1   1   2	JE (DMP) 3,4,5,7,10	ja
d 175	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	3   1+2   1   1   2	JE (DMP) 6,8,9	ja
d 176	Gram pos. Stäbchen (1x2-4)	2-3   1+2   1   1   2	JE (DMP) 11,12,14	ja

Farbe	farblos	weiß	beige	gelb	orange	rot	braun
	1	2	3	4	5	6	7
Optische Struktur	durchscheinend	glänzend	matt	glatt	rau	fluoreszierend	
	1	2	3	4	5	6	
Konsistenz	cremig	viskos		krümelig		fest	
	1	2		3		4	
Umriß	rund 	unregelmäßig 		wurzelförmig 	filamentös 		
	1	2		3	4		
Profil	flach	erhaben	konvex	halb-kugelig	konvex-gerunzelt	navelförmig 	knopf-förmig 
	1	2	3	4	5	6	7

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH gefördert und in Projektzusammenarbeit mit dem Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie (SIAB) in Leipzig durchgeführt. Beiden Institutionen möchte ich für die Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Helmut Wand vom SIAB für sein großes, unterstützendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, der freundlichen Arbeitsatmosphäre und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. U. Stottmeister möchte ich für die Arbeitsmöglichkeiten am UFZ in Leipzig danken. Weiterhin danke ich ihm herzlichst für die anregenden Diskussionen insbesondere während der unvergeßlichen Doktorandenseminare in Großbothen und für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. A. Nehr Korn danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit und die wissenschaftliche Einbindung an die Universität Bremen.

Schließlich möchte ich den Mitstreitern der Phytoremediation-Gruppe um Dr. Peter Kuschk für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit in Leipzig danken.