



UFZ-Bericht

ORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 1/2002

Dissertation

Einfluss der Rhizodeposition von Helophyten auf den mikrobiellen Schadstoffabbau

Horst Moormann

RS

02

355 MA

ISSN 0948-9452

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)



00409360

Einfluss der Rhizodeposition von Helophyten auf
den mikrobiellen Schadstoffabbau

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.
im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen

vorgelegt von
Horst Moormann

Bremen, im August 2001

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 26.10.2001

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Weidemann
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Stottmeister

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

1. EINLEITUNG	5
1.1 Helophyten	6
1.2 Rhizodeposition	9
1.3 Einfluss der Rhizosphäre auf den mikrobiellen Schadstoffabbau	16
1.3.1 Cometabolismus und die Funktion der Rhizodepositionsprodukte als Wachstumssubstrat	19
1.3.2 Helphyten und Schadstoffelimination	21
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Auswahl und Anzucht der Pflanzen in Hydroponikkultur	27
2.2 Testschadstoffe	29
2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den Schadstoffabbau	29
2.3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen	30
2.3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen am Beispiel von 2,6-Dimethylphenol-abbauenden Bakterien	31
2.3.3 Untersuchungen zum Einfluss pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für den bakteriellen 4-Chlorphenol-Abbau	34
2.4 Gewinnung pflanzenassoziiierter Bakterien	39
2.4.1 Gewinnung einer phenolabbauenden Vorkultur	39
2.4.2 Zellzahlvergleich (KBE) wurzelassoziiierter Bakterien von schadstoffexponierten und nicht exponierten Pflanzen in Hydroponikkultur	39
2.5 Mikrobiologische und analytische Methoden	40
2.5.1 Zellzahlbestimmung	40
2.5.2 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten	41
2.5.3 Isolierung und Identifizierung der schadstoffabbauenden Mikroorganismen	42
2.5.4 TOC/DOC (total organic carbon / dissolved organic carbon)-Analytik	52
2.5.5 UV-Vis Spektralphotometrie	52
2.5.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	53
2.5.7 Ionenchromatographie (IC)	55
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	57
3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen	57
3.1.1 Expositionsversuche mit Phenol	57
3.1.2 Expositionsversuche mit 2,6-Dimethylphenol	61
3.1.3 Expositionsversuche mit 4-Chlorphenol	62
3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen auf schadstoffabbauende Bakterien	63
3.2.1 Versuche mit einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem	64
3.2.2 Versuche zum Einfluss von Wurzelabscheidungen auf schadstoffabbauende Bakterien in batch-Kulturen	66
3.3 Untersuchungen zum Einfluss pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für cometabolische Abbaureaktionen	71
3.3.1 Untersuchungen mit <i>Ralstonia eutropha</i> (DSMZ Stamm 5536) zum cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol	71
3.3.2 Versuche mit wurzelassoziierten Bakterien	75

3.3.3	Untersuchungen mit den wurzelassoziierten Bakterien <i>Acinetobacter baumannii</i> und <i>Ralstonia</i> sp. _____	76
3.3.4	Wurzelabscheidungen verschiedener Helophyten in ihrer Wirkung als Wachstumssubstrat für den 4-Chlorphenol-Abbau _____	78
3.4	Abbau der Testsubstanz 4-Chlorphenol _____	85
3.5	Bakterien der Versuchspflanzen _____	90
3.5.1	Identifizierung der Bakterien _____	92
3.5.2	Sequenzierung des Isolates H _____	98
3.6	DOC-Abgabe der Testpflanzen _____	100
4.	ABSCHLIEßENDE DISKUSSION _____	104
4.1	Einfluss von Helophyten auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen _____	104
4.2	Einfluss der Rhizodeposition auf schadstoffabbauende Bakterien _____	106
4.2.1	Untersuchungen mit dem kontinuierlich durchflossenen Testsystem _____	106
4.2.2	Untersuchungen zum Einfluss der Wurzelabscheidungen in batch-Kulturen _____	107
4.3	Untersuchungen zum Einfluss der Rhizodeposition für cometabolische Abbaureaktionen _____	109
4.4	Bakterien der Versuchspflanzen _____	112
4.5	Rhizodeposition _____	114
4.6	Zusammenfassende Bewertung der Rhizodeposition für den bakteriellen Schadstoffabbau und Schlussfolgerungen _____	118
5.	Literaturverzeichnis _____	123

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen (Rhizodepositionsprodukten) auf den mikrobiellen Schadstoffabbau wurden mit den Helophyten *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis* und *Scirpus lacustris* durchgeführt. Eingesetzte Testsubstanzen waren die Schadstoffe Phenol, 2,6-Dimethylphenol und 4-Chlorphenol. Als Richtwert für die Rhizodeposition wurde summarisch die Konzentration an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) ermittelt.

Die Versuche zum Schadstoffabbau durch Bakterien wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- a. Die Pflanzen wurden in schadstoffhaltige Hydroponikkulturen eingebracht und waren damit direkt Phenol-, 2,6-Dimethylphenol- und 4-Chlorphenol-exponiert.
- b. Der Einfluss von Wurzelabscheidungen auf zuvor angereicherte Bakterienabbaugemeinschaften wurde in einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem und in batch-Kulturen unter Ausschluss der Pflanzen untersucht.
Für die Untersuchungen in dem kontinuierlich betriebenen Testsystem waren die Pflanzen in Hydroponikkultur dem eigentlichen Testfermenter vorgeschaltet, und die Wurzelabscheidungen wurden über einen Überlauf in den Testfermenter gespült.
Als Testsubstanz wurde 2,6-Dimethylphenol eingesetzt.
- c. Des weiteren wurde die Wirkung pflanzlicher Substanzen als Cosubstrat (Wachstumssubstrat) für den Abbau persistenter Verbindungen überprüft. Diese Untersuchungen erfolgten ebenfalls in batch-Kulturen mit dem Schadstoff 4-Chlorphenol.

Zur Gewinnung der Rhizodepositionsprodukte für die Versuche unter batch-Bedingungen wurden die Pflanzen in Nährsalzlösung bei unterschiedlicher Verweilzeit gegeben.

Dabei

- a. wurde ein Einfluss von Pflanzen bei direkter Schadstoffexposition, der von Umweltrelevanz sein könnte, für die Verbindung 4-Chlorphenol gezeigt. Die Verbindung wurde unter Pflanzeneinfluss beschleunigt abgebaut. Die Bedeutung

cometabolischer Prozesse auf den beschleunigten 4-Chlorphenol-Abbau wurde unter Punkt c untersucht.

- b. zeigte sich für 2,6-Dimethylphenol kein positiver Einfluss von Wurzelabscheidungen auf die Abbaugeschwindigkeit von zuvor angereicherten 2,6-Dimethylphenol-abbauenden Bakterien.
- c. konnte die Funktion der Rhizodepositionsprodukte als Wachstumssubstrat für den bakteriellen cometabolischen Abbau gezeigt werden.

Die Versuche wurden zu Beginn mit dem Bakterium *Ralstonia eutropha* (Stamm 5536 der DSMZ Braunschweig) durchgeführt. Die sich anschließenden Versuche mit zuvor von *Phalaris arundinacea* gewonnenen Bakterien zeigten ebenfalls die Funktion der Wurzelabscheidungen als Wachstumssubstrat und damit die Möglichkeit des Abbaues von 4-Chlorphenol.

Von den identifizierten Bakterien waren *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. abbaurelevant. Diese Stämme verhielten sich analog zum *Ralstonia eutropha* Stamm der DSMZ. Allerdings zeigten die mit dem UV-Vis ermittelten Absorptionsspektren der metabolisierten schadstoffhaltigen Mineralsalzlösungen, dass diese Stämme das 4-Chlorphenol über die ortho-Spaltung des aromatischen Ringes degradieren im Gegensatz zum DSMZ-Stamm *Ralstonia eutropha*, der den meta-Abbauweg geht. Die Arten *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. dechlorieren dabei das 4-Chlorphenol, so dass eine Detoxifizierung der Ausgangssubstanz erfolgt.

Eine Abschätzung zur Quantität der Wurzelabscheidungen und zu deren Bedeutung für die Sanierung kontaminierter Böden oder Wässer läßt anhand der ermittelten DOC-Werte in Abhängigkeit vom Schadstoff und dessen Konzentration einen Einfluss auf den Abbau durch Bakterien erwarten. Der Einfluss der Rhizodeposition kann insbesondere für Schadstoffkonzentrationen im Spurenbereich und für persistente Verbindungen relevant sein.

1. EINLEITUNG

Die Funktion von Pflanzen bei Schadstoffexposition und der Einsatz von Pflanzen zur Sanierung kontaminierter Standorte als kostengünstige Alternative zu konventionellen Techniken gewinnt zunehmend an Bedeutung und wird durch Begriffe wie „natural attenuation“ und „Phytoremediation“ beschrieben.

Unter dem Begriff Phytoremediation ist die Nutzung natürlich vorkommender oder genetisch veränderter Pflanzen zur Sanierung der kontaminierten Umwelt definiert (FLATHMAN u. LANZA 1998). Dabei ist der Einsatz der Pflanzen in kontaminierten Böden, Sedimenten und Wässern denkbar.

Die Sanierung kann dabei sowohl durch Stabilisierung (Sicherung) als auch durch Dekontamination erfolgen.

Durch die Phytostabilisierung wird die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen und ihre Verbreitung eingeschränkt. Die Stabilisierung erfolgt durch Bindung der Schadstoffe an die Bodenmatrix. Die Intensität der Bindung ist dabei wesentlich von den organischen Bestandteilen des Bodens und ihrem Zersetzungsgrad abhängig. Es kann eine Reduzierung der Schadstoffverfügbarkeit als auch eine irreversible Bindung von Schadstoffen (z.B. Inkorporation der Schadstoffe in Zellwandbestandteile) erfolgen (CUNNINGHAM et al. 1996).

Durch Phytodekontamination werden Schadstoffe durch Pflanzen und die mit ihnen assoziierten Mikroorganismen oder durch die mit ihnen assoziierten Mikroorganismen allein dem Boden entzogen. Die Phytodekontamination wird nach CUNNINGHAM et al. (1996) unterteilt in:

- Phytoextraktion
- Phytovolatilisation
- Phytodegradation
- **Rhizo(sphären)degradation**

Die Untersuchungen dieser Arbeit sind dem Bereich der Rhizosphärendegradation zuzuordnen.

Die Rhizosphärendegradation bzw. der Abbau in der Rhizosphäre wird durch erhöhte mikrobielle Aktivität beeinflusst, welche wesentlich auf die Rhizodeposition und postmortalen Substanzen der Pflanzen zurückzuführen ist. Die Pflanzen nehmen

durch periodisches Wachstum und Absterben von Pflanzenteilen Einfluss auf das Redoxpotenzial, den pH-Wert, die Bodenstruktur und damit auf die hydraulische Wegsamkeit und Belüftung. Dadurch wird das Mikromilieu für Mikroorganismen mitgeprägt.

1.1 Helophyten

Helophyten sind Pflanzen, die durch morphologische Anpassungen auf wassergesättigten, teilweise überstauten oder permanent überfluteten Böden auch unter anaeroben Bedingungen im Wurzelraum lebensfähig sind.

Eine schlechte Sauerstoffversorgung im Boden wird von Helophyten durch Bildung oberflächennaher Adventivwurzeln und wesentlich durch die Ausbildung eines Aerenchyms kompensiert.

Das Aerenchym (s. Abb. 1) ist durch ein Interzellulär-Lacunar-System gekennzeichnet. Die Interzellulärräume fungieren dabei als Speicher von Gasen und ermöglichen die Absorption von CO_2 und die Abgabe von O_2 an die Atmosphäre.

In wassergesättigten Böden kann über dieses System durch rein physikalische Vorgänge ein Gasaustausch zwischen der Wurzel und dem Pflanzensproß erfolgen (Thermosmose und hygrometrischer Druckaufbau sowie Druckventilation) (STENGEL 1991). Das Wurzelsystem verfügt über feine Gaskanäle, die in junge Wurzelteile penetrieren und mit dem Aerenchym die Verbindung zur Atmosphäre ermöglichen. Neben der Versorgung der Pflanzenwurzeln mit Sauerstoff (Respiration) ist dadurch die Abgabe von Sauerstoff an die Rhizosphäre unter bestimmten Bedingungen möglich (ARMSTRONG et al. 1992). So zeigten MOOG u. BRÜGGEMANN (1998) für *Carex* Spezies eine radiale Sauerstoffabgabe. Diese ist am höchsten im Bereich junger Lateralwurzeln und an der Wurzelspitze, die durch unlignifizierte Rhizodermis gekennzeichnet ist.

Damit kann die Oxidation reduzierter Verbindungen in der Wurzelzone ermöglicht werden. So wird z.B. davon ausgegangen, dass in Feuchtgebieten Ammonium bei entsprechendem Redoxpotenzial durch Sauerstoffabgabe in der Nähe des Wurzelcortex durch nitrifizierende Mikroorganismen oxidiert wird (ERNST 1990).

Weiterhin können Helophyten Perioden der Dormanz oder geringer metabolischer Aktivität als Überlebensstrategie bei zeitweiliger Staunässe einlegen (ERNST 1990).

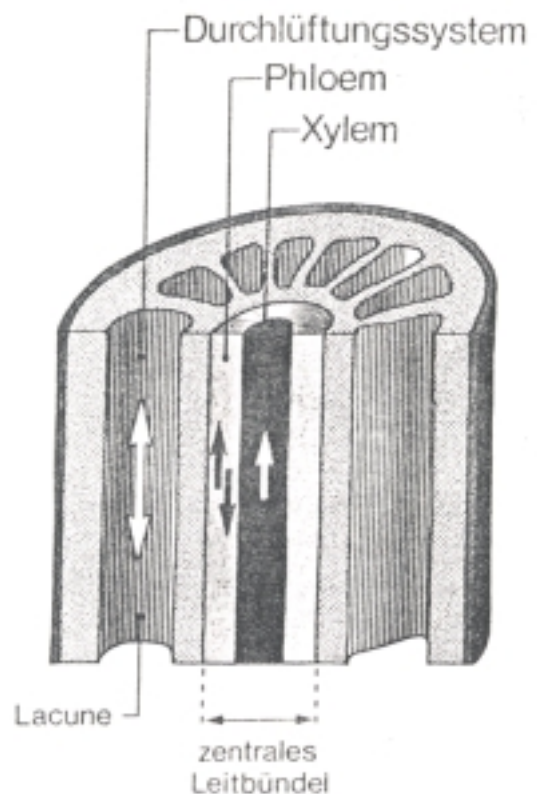


Abb. 1: Aerenchym von *Myriophyllum* (Tausendblatt) als Modellbeispiel für Helophyten (Abb. nach STENGEL 1991)

Unter den Helophyten dominieren in gemäßigten Klimaten Gräser wie Schilf (*Phragmites australis*), Rohrglanzgras (*Phalaris arundinacea*), Rohrkolben (*Typha latifolia*, *T. angustifolia*), verschiedene Seggen (*Carex*) und Binsen (*Juncus*, *Scirpus*).

Gräser besitzen sogenannte Büschelwurzeln, die durch einen hohen Anteil an Feinwurzeln gekennzeichnet sind und damit eine große Aufwuchsoberfläche für Mikroorganismen bilden. So zeigten BOYLE u. SHANN (1995), dass die mikrobielle Besiedlung bei Monokotylen (und damit auch bei Gräsern) höher ist als bei Dikotylen.

Durch den hohen Anteil der Feinwurzeln erfolgt durch die Gräser auch die Einbringung organischer Substanzen in den Boden umfassender, als dies z.B. Pfahlwurzeln zu leisten vermögen (APRILL u. SIMS 1990).

Die eingesetzten Versuchspflanzen zeichnen sich des weiteren durch starkes Horizontalwachstum der Rhizome aus, denen wiederum unterschiedlich starke Wurzeln entspringen. Diese Pflanzen können somit eine geschlossene Decke mit hohem Anteil an Feinwurzelfilz bilden, der sie für Sanierungszwecke besonders geeignet erscheinen lässt (s. Abb. 2).

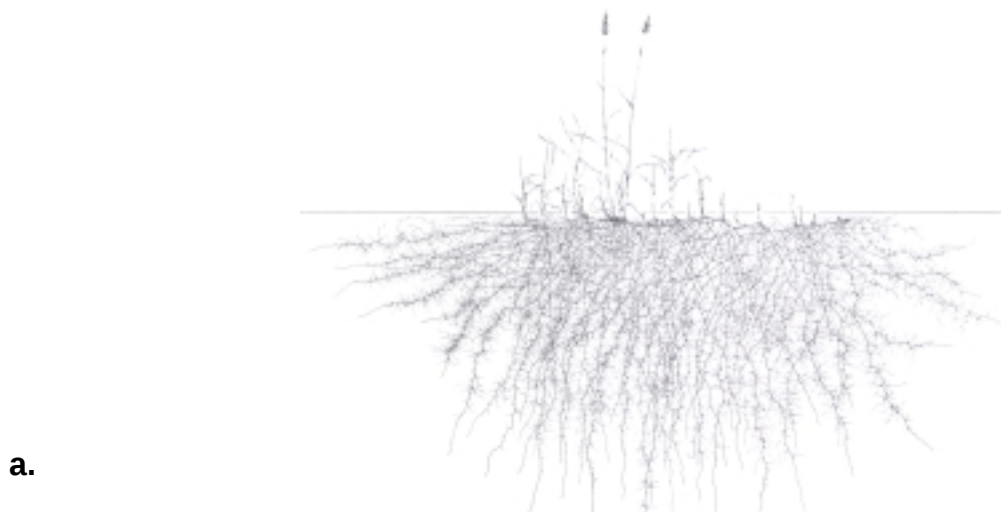


Abb. 2: Sproß und Wurzeln der Testpflanzen **a.** *Phalaris arundinacea* und **b.** *Carex gracilis* (KUTSCHERA u. LICHTENEGGER 1982)

1.2 Rhizodeposition

In der Nähe von Pflanzenwurzeln ist eine erhöhte mikrobielle Aktivität zu beobachten. Diese ist im Wesentlichen auf die Abgabe organischer Substanzen durch die Pflanzenwurzeln zurückzuführen.

Die Abgabe erfolgt zum einen durch das Wachstum der Pflanzen, wobei durch Abschürfung pflanzliches Material in die Rhizosphäre abgegeben wird, zum anderen durch Sekretion und Exsudation verschiedener Verbindungen in den Boden.

Die Wurzeln wachsen direkt hinter der Wurzelspitze durch Teilung meristematischer Zellen. Geschützt wird das Meristem dabei durch die Wurzelhaube, die an der Basis dieses Meristems gebildet wird. Mit dem Wachstumsprozeß werden zuerst Zellen der Wurzelhaube abgestreift bzw. in Folge des Wachstums durch den Boden abgeschürft. Darauf folgend wird durch Ablösen epidermaler Zellen und durch die sich bildende Mucilageschicht weiteres organisches Material freigesetzt. Direkt oberhalb des Meristems setzt in der sogenannten Elongations- bzw. Differenzierungszone eine Streckung und Differenzierung der Zellen ein, die zur Bildung von vasculärem Gewebe, welches vom Pericykel (Schicht meristematischer Zellen) umgeben ist, und zur Bildung des Cortex führt. Ein Großteil der epidermalen Zellen dieser Region bildet Wurzelhaare. Die Wurzelhaare verbessern den Kontakt zwischen Wurzel und Boden, vergrößern die Resorptionsfläche für den Ionenaustausch und fungieren zugleich als Widerlager für die wachsenden Wurzelspitzen. Mit dem Wachstum der Pflanzen werden neue Wurzelhaare gebildet, während die älteren spätestens in Folge des Dickenwachstums der Pflanzen absterben (ROMBERGER et al. 1993).

Zu einer weiteren Freisetzung pflanzlichen Materials kommt es durch die Bildung von Sekundärwurzeln im Perizykel. Sie wachsen durch den Cortex und die epidermalen Zellen und geben infolge des Durchbruchs und dabei entstehender Wunden organisches Material in die Rhizosphäre ab (MATTHYSSE 1996) (zum Bau der Wurzel, s. Abb. 4, S. 16).

Die Abgabe organischer Substanzen wird in der Literatur nicht einheitlich benannt, vielfach jedoch zusammenfassend als Exsudation bezeichnet. So werden nach SMITH (1976) auch anorganische Substanzen den Exsudaten zugerechnet und von MERBACH (1990) abfallende Cortex-, Epidermis- und Kalyptrazellen den Exsudaten zugeordnet. Eine präzisere Differenzierung der über die Wurzel in den Boden abgegebenen Kohlenstoffverbindungen (=Rhizodepositionsprodukte) wird von LYNCH u. WHIPPS (1990) und GRAYSTON et al. (1996) vorgenommen. Danach erfolgt die Unterteilung nach Art der Freisetzung über die Wurzeln:

1. Exsudate umfassen nur wasserlösliche niedermolekulare Verbindungen, die passiv an den Boden abgegeben werden. Die Abgabe erfolgt damit in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten der Verbindungen. Unter die Exsudate fallen u.a. Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, Hormone und Vitamine.
2. Sekrete beinhalten höhermolekulare Verbindungen wie Polysaccharide und Enzyme, deren Freisetzung metabolische Prozesse erfordert. Die Freisetzung kann auch gegen ein elektrochemisches oder chemisches Potenzial erfolgen.
3. Lysate sind Verbindungen, die durch Autolyse von Zellen freigesetzt werden. Sie können aus dem Material abgestreifter Zellen bzw. langfristig mit Seneszenz der Pflanzen aus der ganzen Wurzel stammen.
4. diverse Gase

Die Zusammensetzung der Rhizodepositionsprodukte variiert in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen, dem Entwicklungsstadium und der Nährstoffverfügbarkeit der Pflanzen. Dominierende Verbindungen sind Zucker, Aminosäuren und organische Säuren (CURL u. TRUELOVE 1986, TATE 1995). Verbindungen, wie Hormone und Vitamine sind dagegen nur in geringen Mengen detektierbar, können in ihrer Wirkung aber entscheidend für das Vorkommen spezieller Mikroorganismen in der Rhizosphäre sein (GISI et al. 1990). In Spuren können Substanzen mit hemmenden (Repellentien) oder aber stimulierenden Effekten (Attraktantien) auf andere Organismen auftreten. Ebenso sind allelopathische Effekte durch Exsudate bekannt (HALE et al. 1978). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in Wurzelexsudaten nachgewiesenen Substanzen.

Überwiegend Polysaccharide und Polygalacturonsäuren höheren molekularen Gewichtes sind Bestandteil der „Mucilage“, die die Wurzeln vieler Pflanzen ummantelt. Die „Pflanzenmucilage“ wird von epidermalen und Kalyptrazellen gebildet. Unter natürlichen bzw. nicht sterilen Bedingungen nutzen Mikroorganismen Exsudate, Sekrete etc. als Kohlenstoffquelle. Die dadurch entstehenden Metabolite haben ebenfalls Einfluss auf die Zusammensetzung der Mucilage. Nach JENNY u. GROSSENBACHER (1963) wird die aus Mikroorganismen und Pflanzen gebildete Mucilage als Mucigel bezeichnet.

Tab. 1: Substanzen in Exsudaten von Pflanzenwurzeln

Art der Verbindung	Exsudatkomponenten
Kohlenhydrate	Arabinose, Ribose, Xylose, Fruktose, Galaktose, Glukose, Rhamnose, Maltose, Sukrose, Raffinose, Oligosaccharide, verschiedene andere Polysaccharide
Aminosäuren und Amide	alle 20 Protein-Aminosäuren, Aminobuttersäure, Homoserin, Cystathionin
organische Säuren	Essigsäure, Glycolsäure, Oxalsäure, Malonsäure, Propionsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Buttersäure, Fumarsäure, Weinsäure, Valeriansäure, Zitronensäure, Protocatechusäure, Salicylsäure, Sinapiussäure, <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Cumarsäure, Ferulsäure, Gallussäure, Gentisinsäure
Fettsäuren u. Sterole	Palmitin, Stearin, Olein, Linolsäure, Linolensäure, Cholesterol, Campesterol, Stigmasterol, Sitosterol
Wachstumsfaktoren	Biotin, Thiamin, Niacin, Pantothenat, Cholin, Inositol, Pyridoxine, <i>p</i> -Aminobenzoesäure, <i>n</i> -Methylnicotinsäure
Nukleotide, Flavone und Enzyme	Flavonon, Adenin, Guanin, Uridin, Cytidin, Desoxyribonuclease, Peroxidase, Ribonuclease, Phosphatase, Invertase, Amylase, Protease, Polygalacturonase
weitere diverse Verbindungen	Auxin, Scopoletin, fluoreszierende Substanzen, Blausäure, Glycoside, Saponin (Glucoside), organische Phosphorverbindungen, Nematoden-Zysten- bzw. Eischlüpfaktoren, Nematoden-Attraktivstoffe, Pilzmycel-Wachstumsstimulatoren, Mycel-Wachstumshemmer, Zoosporen-Attraktivstoffe, Sporen- und Sclerotium-Keimungsstimulantien und- hemmer, Bakterienstimulantien und parasitische Unkraut-Keimstimulatoren

modifiziert nach Curl & Truelove, aus KLEIN et al. 1990 und nach Bolton aus GRAYSTON et al. 1996

Pflanzen verlagern durchschnittlich zwischen 30 % bis 60 % des netto fixierten Kohlenstoffs in ihre Wurzeln (LYNCH u. WHIPPS 1990). Die Autoren ermittelten für eine *Agropyron-Koeleria* Mischsaat eine Verlagerung von 30 bis 50 Prozent.

Hiervon wird ein hoher Anteil durch Wurzelwachstum assimiliert und durch Wurzelrespiration als CO_2 freigesetzt. Der Anteil des insgesamt assimilierten Kohlenstoffs, der in Form organischer Verbindungen oder als CO_2 durch die Rhizosphärenrespiration (Mikroorganismen- und Wurzelrespiration) freigesetzt wird, liegt im Bereich von 7 % bis 40 % (SHIMP et al. 1993, GRAYSTON et al. 1996). Die starken Schwankungen sind im Wesentlichen auf Faktoren wie Pflanzenart, Untersuchungsbedingungen und Untersuchungsmethoden zurückzuführen.

Von den organischen Substanzen, die in die Rhizosphäre verlagert werden, wird ein Teil relativ schnell mikrobiell assimiliert und veratmet. Die Prozentangaben variieren stark. So ermittelten MERBACH et al. (1999) für Weizen innerhalb einer Versuchszeit von 5 Tagen eine mikrobielle Respiration von bis zu 86 %, und SWINNEN et al. (1994) benennen die Respiration innerhalb einer Versuchszeit von 19 Tagen für die gleiche Pflanze mit lediglich 11 bis 25 Prozent.

Von den verbleibenden Substanzen ist der größte Teil wasserunlöslich. JACOB et al. (1995) geben bis zu 80 % an.

TINKER u. BARRACLOUGH (1991) berichten von 1 % bis 2 % wassergelöster Exsudate unter Hydroponikbedingungen und vermuten in etwa die gleiche Größenordnung im Boden. JACOB et al. (1995) ermittelten weniger als 0,5 % an wasserlöslichen Verbindungen für Weizenpflanzen und stimmen damit mit BOWEN und ROVIRA (1976) überein, die für die gleiche Pflanze 0,2 % bis 0,4 % angeben. JORDAHL et al. (1997) ermittelten für Pappeln lediglich 0,25 % (gemessen als DOC).

Abb. 3 zeigt schematisch am Beispiel von Weizen den Transfer des photosynthetisch assimilierten Kohlenstoffs in die Rhizosphäre.

Die Rhizodeposition der Pflanzen hat einen direkten und einen indirekten Einfluss auf die Rhizosphäre.

- Die direkte Wirkung ist insbesondere auf die Respiration der Wurzeln (CO_2 -Abgabe), die Abgabe von Protonen zur Kationenaufnahme und auf die Abgabe organischer Säuren zurückzuführen. Dadurch wird der pH-Wert der Bodenlösung beeinflusst, können Veränderungen der Redoxbedingungen erfolgen und dadurch kann Einfluss auf die Pflanzenverfügbarkeit von Mineralien genommen werden. So kann durch eine pH-Absenkung der Bodenlösung oder durch die komplexbildenden Eigenschaften der organischen Säuren die Verfügbarkeit von Nährelementen für Pflanzen erhöht werden. Die Abgabe pflanzenbürtiger organischer Verbindungen kann außerdem zur Aggregation von Bodenpartikeln führen und damit die

Bodeneigenschaften für Organismen vorteilhaft beeinflussen (HALE et al. 1978, UREN u. REISENAUER 1988).

- Die indirekte Wirkung der Rhizodeposition erfolgt durch die Mikroorganismen. Aufgrund der erhöhten mikrobiellen Aktivität in der Rhizosphäre nehmen diese Einfluß auf die Mineralienverfügbarkeit für Pflanzen. Dieser kann z.B. durch Abgabe mikrobieller Enzyme (Phosphatasen für Phosphat, Sulfohydrolasen für Schwefel) oder durch mikrobielle Chelatisierung von Nährelementen erfolgen. Des Weiteren können Mikroorganismen durch Produktion von Pflanzenwachstumshormonen stimulierend wirken.

Die Interaktion zwischen Wurzeln und Mikroorganismen, die auf pflanzenbürtige Substanzen zurückzuführen ist, ist bisher nur im Ansatz erforscht. Relativ gut untersucht ist die Nodulation stickstofffixierender Pflanzen durch *Rhizobium*-Arten und die Mycorrhizierung von Pflanzen. An beiden Vorgängen sind Flavonoide, die durch Exsudation abgegeben werden, beteiligt (UREN u. REISENAUER 1988, Rao 1990, TATE 1995).

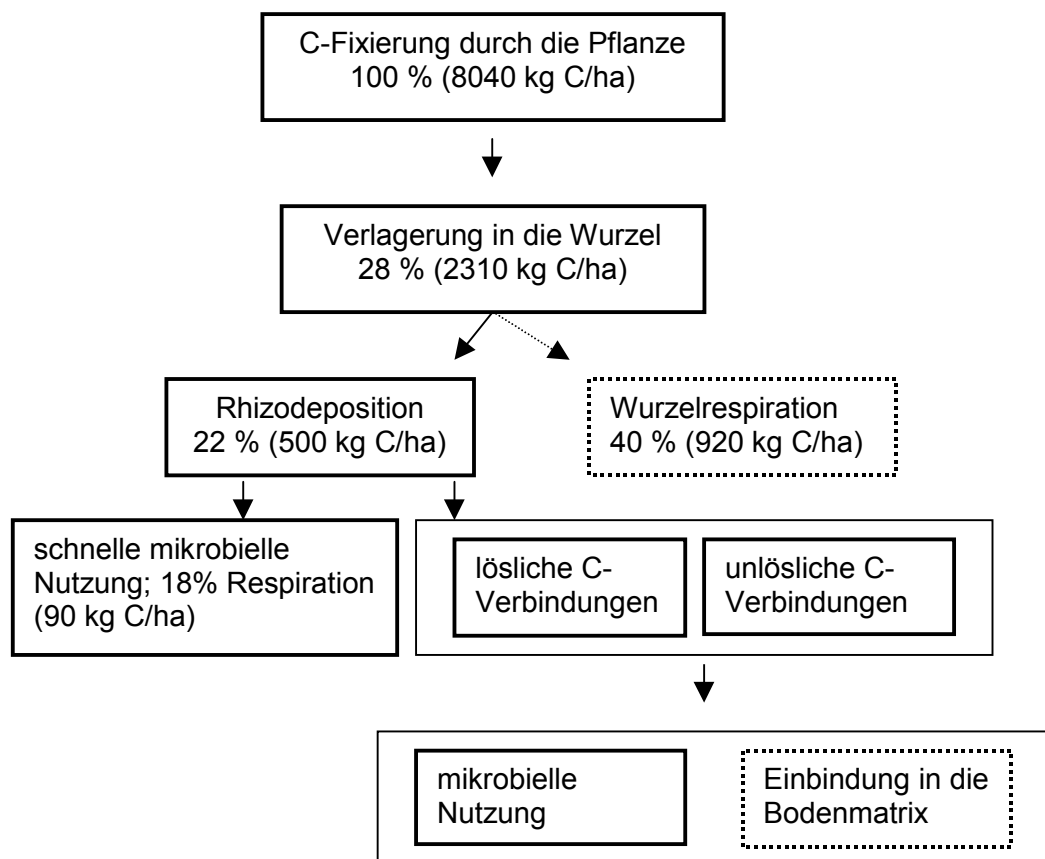


Abb. 3: Verlagerung des photosynthetisch assimilierten Kohlenstoffs von Weizenpflanzen in die Rhizosphäre (Abb. nach Daten von SWINNEN et al. 1994, die über eine Wachstumsperiode ermittelt wurden).

Die Wurzelabscheidungen wirken sich auf die Anzahl der Mikroorganismen im Rhizosphärenbereich positiv aus. Ihre Anzahl kann um mehr als das 100fache steigen. Im Durchschnitt wird ein 5- bis 20facher Anstieg der Mikroorganismenzahl in der Rhizosphäre beobachtet (ANDERSON et al. 1995). Dieser Effekt wird als Rhizosphäreneffekt bezeichnet und durch den Rhizosphärenfaktor bzw. durch das R/S-Verhältnis (rhizosphere/soil) charakterisiert. Das R/S-Verhältnis ergibt sich aus der Anzahl der Mikroorganismen pro Gewichtseinheit Boden an der Wurzeloberfläche zu der Anzahl im wurzelfreien Boden (GISI et al. 1990).

Eine typische Rhizosphärenmikrozönose setzt sich aus Amylolyten, Proteolyten und Ammonifizierern (z.B. *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) und Denitrifizierern (z.B. *Pseudomonas*, *Achromobacter*) zusammen. Des Weiteren kommen Zuckerreduzenten, Zellulolyten und Gattungen wie *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium* sowie die im Stickstoffkreislauf beteiligten *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* vor (GISI et al. 1990).

Die Bakterien sind vorwiegend auf der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) und der unmittelbaren Umgebung konzentriert, da sie dort am stärksten von der Abgabe organischer Substanzen profitieren (TINKER u. BARRACLOUGH 1991).

Die Bakterien der Rhizoplane bedecken 4 % bis 10 % der Oberfläche (ATLAS u. BARTHA 1998) und liegen überwiegend als distinkte Kolonien mit ca. 100 Zellen pro Kolonie auf der Rhizoplane. Dabei konzentrieren sie sich zwischen den Berührungspunkten der epidermalen Zellen (LYNCH 1982).

BARBER (1973) ermittelte im Bereich bis zu 2 bis 3 mm Entfernung von der Pflanzenwurzel eine Bakterienanzahl von 10^{10} pro Gramm Boden, was in etwa 0,2 % des Bodengewichtes bzw. 2200 kg Lebendgewicht pro Hektar in einer Tiefe bis zu 15 cm entspricht. Diese Anzahl ermittelte er ohne Einbeziehung von Actinomyceten und Pilzen. Für Actinomyceten geht er von der doppelten und für Pilze von der dreifachen Masse aus.

Hinsichtlich der Verteilung überwiegt die Bakterienanzahl direkt hinter der Wurzelspitze gefolgt von dem Bereich der Elongationszone (GRAYSTON et al. 1996) (s. Abb. 4, S.16).

HANSEN et al. (1997) konnten durch Inokulation von Gerstensamen mit *Pseudomonas fluorescens* mittels CSLM (Confocal Scanning Laser Microscopy) zeigen, dass die Besiedlung direkt hinter der Wurzelspitze einsetzt. Sie gehen davon aus, dass die Bakterien als C-Quelle für die Kolonisierung Mucigel oder abgestoßene epidermale Zellen an der Wurzelspitze nutzen. Die Attraktion der Mikroorganismen erfolgt den Autoren zufolge durch Exsudate, die direkt hinter der Wurzelspitze abgegeben werden. Als weitere Exsudationsquelle benennen sie die Grenzbereiche zwischen den Epidermiszellen. Bereits nach sieben Tagen waren die Wurzeln von einer Mucilage umgeben, die über die gesamte Wurzellänge mit Bakterien durchsetzt war.

Dabei lagen die Zellen einzeln oder als kleine Aggregate vor. Stränge von Bakterien befanden sich an den Längsgrenzen der Epidermiszellen oder umlagerten die ganze Zelle. Der Wurzelspitzenbereich war nach einer Woche weitgehend frei von Mikroorganismen. Die Wurzelhaare, die zu diesem Zeitpunkt sehr gut entwickelt waren, waren ebenfalls nur schwach besiedelt.

Die Nichtbesiedlung der Wurzelspitze wird u.a. durch HALE et al. (1978) und LYNCH (1982) bestätigt. VAN VUURDE und SCHIPPERS (1980) führen die Nichtbesiedlung auf die Abgabe von insbesondere niedermolekularen Verbindungen an der Wurzelspitze zurück, da diese sehr schnell in wurzelfernere Bereiche diffundieren würden und damit für Mikroorganismen an der Wurzelspitze nicht nutzbar wären. SEMENOV et al. (1999) erklären die geringe Bakterienanzahl an der Wurzelspitze mit den nährstoffarmen Bedingungen in der Rhizosphäre, wodurch Bakterien größtenteils im dormanten Stadium vorliegen würden. Erst der Kontakt mit der Wurzelspitze würde die Bakterien mit Verzögerung in ein aktives Stadium überführen. Zu diesem Zeitpunkt hätte sich die Wurzelspitze räumlich bereits verlagert und bliebe dadurch selbst bakterienarm.

Allgemein steigt die Anzahl der Bakterien auf der Rhizoplane mit dem Alter der Pflanzen in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Pflanzen. So verweisen DARBYSHIRE u. GREAVES (1973) darauf, dass mit Seneszenz der Pflanzen die Größe der Bakteriengemeinschaft (Zellzahl / g Boden TG) zurückgeht.

Nach TINKER u. BARRACLOUGH (1991) kommt im wurzelnahen und im wurzelfernen Bereich das gleiche Artenspektrum vor. Dabei überwiegen Gram-negative Mikroorganismen, insbesondere Stäbchen (ROVIRA 1969). Bei diesen wiederum handelt es sich vorwiegend um Arten der Gattung *Pseudomonas* (TINKER u. BARRACLOUGH 1991). Die Angaben dieser Autoren können durch neuere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Insbesondere molekularbiologische Methoden (DNA-Sequenzierungen) lassen auf eine vielfältigere und sehr spezialisierte Mikroorganismenzönose schließen (CROWLEY et al. 1997).

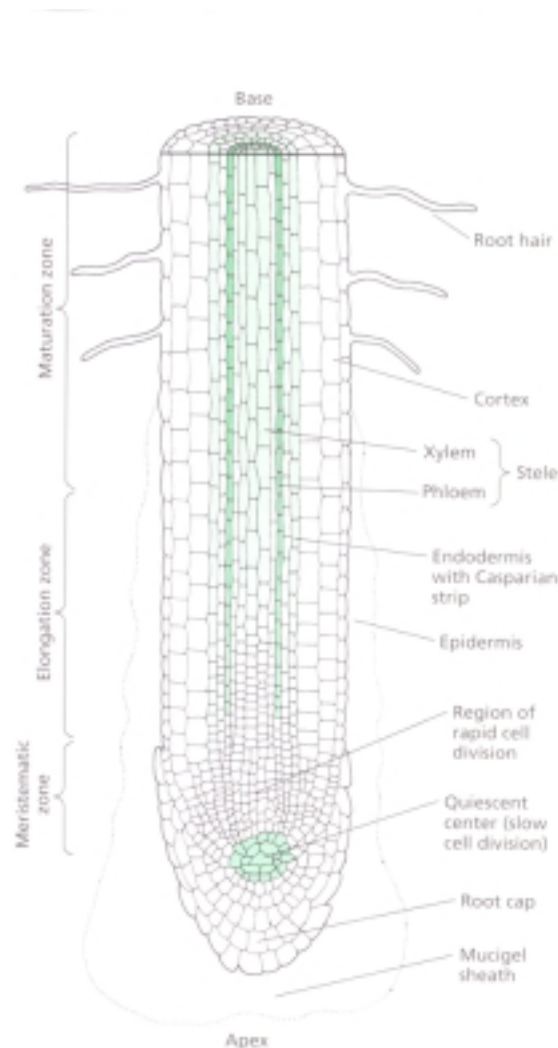


Abb. 4: Bau einer Primärwurzel, Längsschnitt in halbschematischer Darstellung. Die Abb. zeigt die Wurzelhaube, das apikale Meristem, die Streckungszone und die Reifungszone in zunehmender Entfernung von der Spitze (nach TAIZ u. ZEIGER 1998).

1.3 Einfluss der Rhizosphäre auf den mikrobiellen Schadstoffabbau

Pflanzen können vielfältig Einfluss auf den Verbleib von Schadstoffen wie toxischen Metallen oder persistenten Organika (Mineralölkohlenwasserstoffe, Pestizide, Explosivstoffe, chlorierte Verbindungen) im Boden oder im Wasser nehmen. Dabei sind folgende Wirkmechanismen beschrieben:

1. Desorption der Kontaminanten vom Boden und direkte Aufnahme der Kontaminanten: Abhängig von der Art der Verbindungen ist eine Anreicherung oder Metabolisierung der Verbindungen im Pflanzengewebe möglich. Dabei können polare

Verbindungen mit geringem Molekulargewicht allgemein leichter von Pflanzen aufgenommen werden, als apolare Verbindungen mit einem hohen Molekulargewicht. Des Weiteren ist die Abgabe von Verbindungen oder ihrer Metabolite durch Evapotranspiration der Pflanzen (Phytovolatilisation) nicht auszuschließen (BAEDER-BEDERSKI et al. 1999, ORCHARD et al. 2000).

2. Freisetzung von Rhizodepositionsprodukten und damit Einflussnahme auf die mikrobielle Aktivität von potenziellen schadstoffabbauenden Bakterien und auf die biochemische Transformation von Kontaminanten. So kann durch die Abgabe von Enzymen wie Dehalogenasen, Nitroreduktasen, Peroxidasen sowie Laccasen durch Pflanzen eine Schadstoffmetabolisierung einsetzen (z.B. TNT Metabolisierung durch Laccasen und Nitroreduktasen) (SCHNOOR et al. 1995).
3. Nach Absterben der Pflanzen kann eine Festlegung bzw. Stabilisierung durch Einbindung in die organische Substanz erfolgen. Langfristig ist in Abhängigkeit vom Schadstoff und den Bodeneigenschaften eine Inkorporation in die Huminstoffmatrix nicht auszuschließen. Als Beispiel seien polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) genannt, deren Grad der Bindung im Boden mit Zunahme der organischen Substanz steigt (KÄSTNER et al. 1993).

Der Verbleib der Schadstoffe ist des Weiteren abhängig von den Bodeneigenschaften und der Zusammensetzung der Organismen, die miteinander wechselwirken. Dabei sind auch Pilze zu nennen. Von den Pilzen wiederum ist die Mykorrhizierung mit höheren Pflanzen für den Verbleib von Schadstoffen ein wichtiger Faktor. Eine Übersichtsarbeit von MEHARG u. CAIRNEY (2000) weist auf das Schadstoffabbau-Potenzial von Ektomykorrhiza hin.

Die Vielzahl von Faktoren, die Einfluss nehmen, wird durch Abb. 5 wiedergegeben.

In Arbeiten, die die Wirkung der Rhizosphäre auf den Schadstoffabbau untersuchten, konnte vielfach ein positiver Einfluss auf die Elimination unterschiedlichster Xenobiotika gezeigt werden. Als Beispiele seien Arbeiten von HSU u. BARTHA (1979) sowie von REDDY u. SETHUNATHAN (1983) genannt, die eine erhöhte Mineralisierung von Insektiziden im Rhizosphärenboden zeigten. Weitere Arbeiten belegen den abbaufördernden Einfluss der Pflanzen für chlorierte Verbindungen wie chlorierte Benzoesäure (SICILIANO et al. 1998) und Trichlorethylen (WALTON u. ANDERSON 1990). Für PAK zeigten APRILL u. SIMS (1990) sowie PRADHAN et al. (1998) den eliminationsfördernden Einfluss von Pflanzen.

Als Pflanzen wurden sowohl verschiedene Gräser (z.B. *Agropyron*, *Festuca*), Kulturpflanzen (z.B. Buschbohnen) als auch Bäume (z.B. Pappeln, Weiden) eingesetzt. Tab. 2 (s. S. 22) zeigt einen Ausschnitt aus der Vielzahl von Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau.

Einen umfassenden Überblick zu Untersuchungen mit organischen Kontaminanten geben CUNNINGHAM et al. (1996) und NEWMAN et al. (1998).

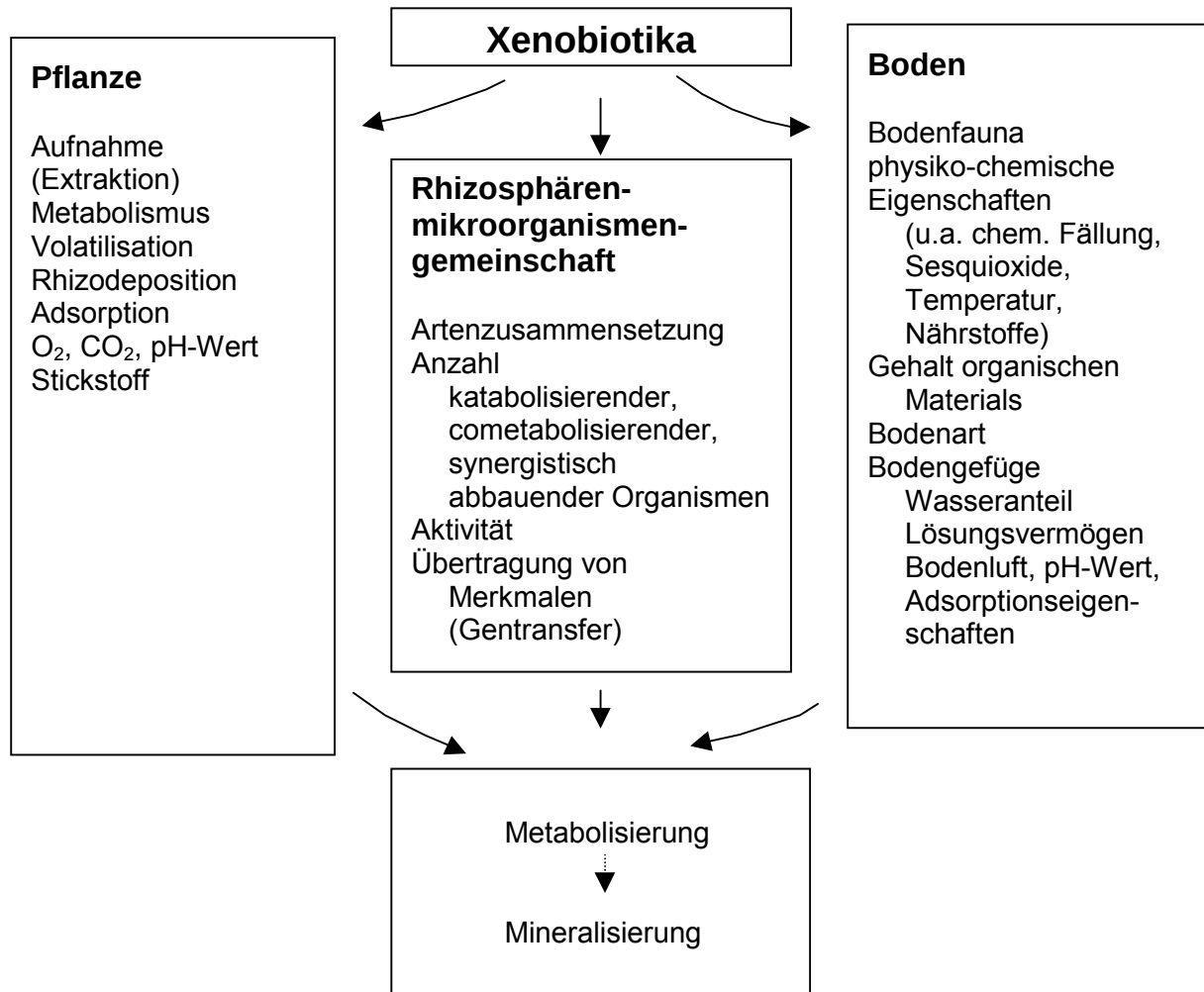


Abb. 5: Schematische Darstellung möglicher Einflussfaktoren der Pflanzen und des Bodens auf die Bioverfügbarkeit und den Abbau von Xenobiotika durch Mikroorganismengemeinschaften in der Rhizosphäre

Insbesondere bei Exposition mit Fremdstoffen, für die ein bakterielles Abbaupotenzial aufgebaut werden muß, kann sich die Rhizosphäre im Vergleich zur Edaphosphäre (von Pflanzen nicht beeinflusster Boden) auf den Schadstoffabbau vorteilhaft auswirken. Die Pflanzen können bei Schadstoffexposition für potenzielle bakterielle Abbauer als Rückzugsnische fungieren, durch die eine Adaptation an die Fremdsbstanzen erleichtert wird.

Aufgrund der erhöhten aktiven Biomasse in der Rhizosphäre ist eine kürzere Akklimatisationszeit naheliegend. Dabei wirkt sich die höhere Wahrscheinlichkeit eines

Plasmidaustausches in Bereichen dicht gelagerter Bakterienkolonien vorteilhaft aus, wodurch die Selektion schadstoffabbauender Bakterien gefördert wird. Synergistische Effekte aufgrund der hohen Bakterienzahlen und einer möglichen höheren Diversität können sich ebenfalls vorteilhaft auf den Abbau von Schadstoffen auswirken. So ist für persistente Schadstoffe ein schrittweiser Abbau durch Bakterienzönsen beschrieben worden (LAPPIN et al. 1985).

Durch die Abgabe pflanzlicher Substanzen werden auch Bedingungen für cometabolische Umwandlungen, insbesondere persistenter Schadstoffe, geschaffen (HABY u. CROWLEY 1996, CROWLEY et al. 1997).

1.3.1 Cometabolismus und die Funktion der Rhizodepositionsprodukte als Wachstumssubstrat

Auf das Potenzial cometabolischer Prozesse in der Rhizosphäre und die dadurch gegebene höhere Transformationswahrscheinlichkeit persistenter Xenobiotika wird in verschiedenen Arbeiten hingewiesen (u.a. JANKE u. FRITSCH 1985, CROWLEY et al. 1997). Danach können insbesondere strukturanaloge Verbindungen pflanzlicher Substanzen (Rhizodepositionsprodukte und Dekompositionsprodukte) zu verschiedenen Xenobiotika abbaufördernd wirken, da diese eine Induktion der für den Abbau erforderlichen Enzyme ermöglichen.

Cometabolischer Abbau setzt ein Wachstumssubstrat voraus, um Verbindungen bakteriell zu transformieren. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit dem cometabolischen Schadstoffabbau befassen (s. PERRY 1979, DALTON u. STIRLING 1982, BOYLE 1989, CRIDDLE 1992, CHAMPAGNE et al. 1998, WANG u. LOH 2000). Cometabolismus ist dabei definiert als Transformation eines Sekundärsubstrates in der obligaten Anwesenheit eines Primärsubstrates oder einer anderen transformierbaren Verbindung. Dabei kann durch das Sekundärsubstrat eine Zellreplikation und damit ein Biomassezuwachs der Bakterien nicht erfolgen (DALTON u. STIRLING 1982). Das Wachstumssubstrat ist definiert als Elektronendonator, der als Reduktionsäquivalent und Energielieferant für Zellwachstum und Zellerhaltung dient (CRIDDLE 1992). Zur Beschreibung des Cometabolismus werden die Begriffe „Cometabolit“ oder „non growth substrate“ synonym für Sekundärsubstrat, und der Begriff „Wachstumssubstrat“ bzw. „Cosubstrat“ synonym für Primärsubstrat verwendet (s. Abb. 6).

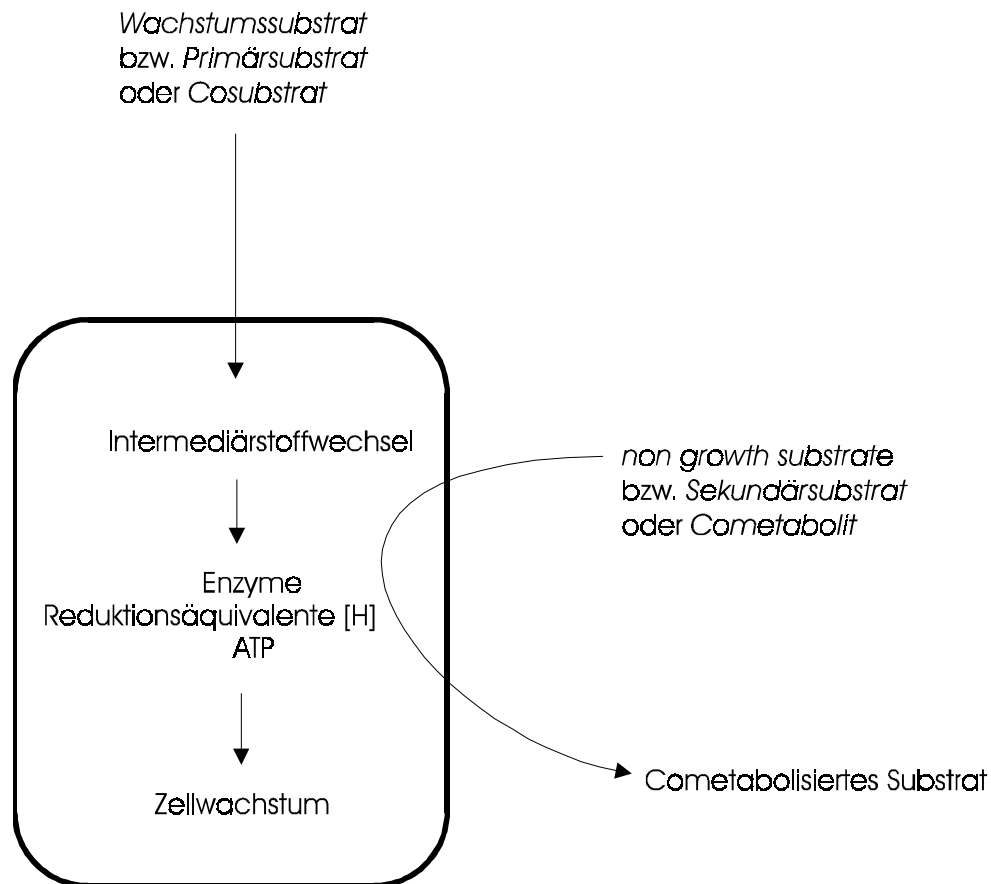


Abb. 6: Prinzip des Cometabolismus (modifiziert nach FRITSCH 1999)

Nach CHAMPAGNE et al. (1998) können cometabolische Reaktionen aus zwei Gründen bedeutend sein:

1. das Sekundärsubstrat liegt in so geringer Konzentration vor, dass mikrobielle Populationen ihre Lebensfunktionen mit nur diesem Substrat nicht aufrecht erhalten können *und*
2. das Sekundärsubstrat kann unabhängig von der Konzentration nur in Anwesenheit eines Primärsubstrates abgebaut werden. Das Primärsubstrat hat Einfluss auf die aktive, vorhandene Biomasse und stellt entweder die Energie für cometabolische Reaktionen, indem es metabolisiert wird, oder reagiert als Reaktant in der Transformationsreaktion.

Für den Abbau chlororganischer Verbindungen sind cometabolische Prozesse von großer Bedeutung. So wird nach LOH u. WANG (1998) ein Großteil der am weitesten

in der Umwelt verbreiteten chlorierten gelösten Verbindungen cometabolisch abgebaut.

Auf die Bedeutung pflanzlicher Assimilate für cometabolische Schadstofftransformationen weisen verschiedene Arbeiten hin: SHIMP u. PFAENDER (1985) führen den erhöhten bakteriellen Abbau von monochlorierten Phenolen auf die durch Pflanzen abgegebenen leicht verfügbaren Kohlenstoffverbindungen zurück. Ebenso weisen DONNELLY et al. (1994) für polychlorierte Biphenyle (PCB) und HABY u. CROWLEY (1996) für 3-Chlorbenzoat auf die abbausteigernde Wirkung pflanzlicher Assimilate hin. GILBERT u. CROWLEY (1997) konnten für aus *Mentha spicata* gewonnene Extrakte die Induktion des PCB-Abbaues durch eine *Arthrobacter*- und *Alcaligenes*-Spezies zeigen.

1.3.2 Helphyten und Schadstoffelimination

Helophyten sind aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften, wie z.B. Überflutungstoleranz, insbesondere zur Reinigung schadstoffbelasteter Wässer geeignet. Eine technische Anwendung finden sie u.a. in Pflanzenkläranlagen.

Arbeiten von SEIDEL (u.a. 1968, 1976) weisen auf die Bedeutung von Helophyten für den Schadstoffabbau hin. Für die Untersuchungen wurde Phenol als Testsubstanz eingesetzt. SEIDEL schlussfolgerte, dass die Pflanzen durch direkte Aufnahme des Schadstoffes den wesentlichen Anteil an seiner Eliminierung haben.

Nach heutigem Wissensstand sind die Abbauleistungen zum überwiegenden Teil auf Mikroorganismen zurückzuführen, die die durch die Pflanzen geschaffenen Milieubedingungen für den katabolischen Abbau der Abwässer nutzen (u.a. FEDERLE u. SCHWAB 1989, WISSING 1995).

Tab. 2: Literaturbeispiele über Untersuchungen zum Einfluss der Rhizosphäre auf den mikrobiellen Schadstoffabbau

Schadstoff	Rhizosphäreneffekt	Referenz
2,4-D ¹	Zunahme der 2,4-D-Abbauer, der auf Einfluss von Zuckerrohr zurückgeführt wird	SANDMANN u. Loos 1984
Lineare Alkylbenzensulfonate Lineare Alkoholethoxylate	abbaufördernde Wirkung durch Wasserpflanzen (<i>Lemna minor</i> u. <i>Typha latifolia</i>)	FEDERLE u. SCHWAB 1989
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	beschleunigte Eliminierung unter Einfluss von Hirse (<i>Panicum virgatum</i> u. Luzerne (<i>Medicago sativa</i>))	PRADHAN et al. 1998
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	beschleunigte Eliminierung unter Einfluss verschiedener Steppengräser	APRIL u. SIMS 1990
Aliphatische Kohlenwasserstoffe	beschleunigte Eliminierung unter Einfluss von Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>)	GÜNTHER et al. 1996
Trichlorethylen	beschleunigte Eliminierung aufgrund erhöhter mikrobieller Aktivität durch Einfluss verschiedener Pflanzen	WALTON u. ANDERSON 1990
Chlorierte Benzoesäure	beschleunigter Abbau unter Einfluss verschiedener Gräser durch Bakterieninokulation	SICILIANO u. GERMIDA 1997
Parathion ²	beschleunigter Abbau unter Einfluss von Reis, der auf aerobe u. anaerobe Mikromilieus in der Rhizosphäre zurückgeführt wird	REDDY u. SETHUNATHAN 1983
Parathion, Diazinon ³	beschleunigter Abbau unter Einfluss von Buschbohnen: wird auf erhöhte Aktivität u. Selektion abbauender Mikroorganismen sowie auf cometabolische u. synergistische Effekte zurückgeführt	HSU u. BARTHA 1979
Mecoprop ⁴	synergistischer Abbau unter Einfluss von Maispflanzen	LAPPIN et al. 1985
Polychlorierte Biphenyle	Einfluss pflanzlicher phenolischer Verbindungen verschiedener Pflanzen auf den Abbau	FLEDCHER u. HEDGE 1995

Erläuterungen zur Schadstoffbezeichnung: 1 = 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure;

2 = [0,0-Diethyl-0-(p-nitrophenyl)-thionophosphorsäureester] (E605®)

3 = [0,0-Diethyl-0-(2-isopropyl-4-methyl-pyrimidyl-6)-thionophosphorsäureester]

4 = 2-(2-Methyl-4-chlorphenoxy)-propionsäure

1.4 Zielstellung

Die meisten Arbeiten zum Schadstoffabbau in der Rhizosphäre sind deskriptiv, wobei Unterschiede der Schadstoffkonzentrationen bepflanzter Standorte bzw. Versuchsvarianten zu unbepflanzten aufgezeigt werden. Obwohl eine Vielzahl von Autoren einen positiven Einfluss von Pflanzen auf den Schadstoffabbau beschreibt, ist der Anteil der Arbeiten, die den mikrobiologischen Einfluss explizit als Faktor für den Abbau untersuchten, relativ gering. Noch weniger Informationen liegen zum möglichen Einfluss der Rhizodeposition auf den mikrobiellen Schadstoffabbau vor.

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist der Einfluss von Helophyten, insbesondere der durch Rhizodeposition abgegebenen organischen Substanzen, auf den Abbau von Xenobiotika durch Bodenbakterien, ein Bereich, der der Rhizosphären-degradation zugeordnet werden kann. Obwohl der Einsatz dieser Pflanzen zum Schadstoffabbau weit verbreitet ist, wurde die Bedeutung der Rhizodeposition der Helophyten für den Abbau bisher nicht untersucht.

Die Untersuchungen werden mit Phenol, 2,6-Dimethylphenol und 4-Chlorphenol als Testschadstoffe durchgeführt. Die Wahl von Phenol und der derivatisierten phenolischen Verbindungen ermöglicht Aussagen zur Degradation relativ leicht abbaubarer Verbindungen (Phenol) über schwerer abbaubare Substanzen (2,6-Dimethylphenol) bis hin zu Untersuchungen zum Cometabolismus mit der Verbindung 4-Chlorphenol. Für 4-Chlorphenol wurde ein cometabolischer Abbau mit Phenol als Wachstumssubstrat durch das Bakterium *Ralstonia eutropha* beschrieben (HILL et al. 1996). Aufgrund eines angenommenen cometabolischen Abbaues in der Rhizosphäre werden Untersuchungen zur Funktion der Helophyten-Rhizodepositionsprodukte als Wachstumssubstrat durchgeführt.

Untersucht werden des Weiteren mögliche negative Effekte auf den Abbau von Schadstoffen durch pflanzenbürtige Verbindungen. Diese können durch das zusätzliche C-Substrat in Form pflanzlicher Verbindungen gegeben sein. Vorstellbar ist ein diauxischer Effekt; hierdurch würde eine Verzögerung des Schadstoffabbaues erfolgen, wenn die pflanzlichen Substanzen bevorzugt von den Bakterien verwertet würden. Auch bakterizide Wirkungen von Rhizodepositionsprodukten sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden (u.a. SEIDEL 1969, 1971, KICKUTH u. KAITZIS 1975).

Als Testorganismen werden neben Mischkulturen Bakterien in Reinkultur eingesetzt, die zuvor von einer *Phalaris*wurzel isoliert werden. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, Abbauprozesse helophytenassoziierten Bakterien zuzuordnen. Der Einsatz von Reinkulturen schließt zudem synergistische Effekte aus. Zur Charakterisierung der Bakterien werden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt.

Zusammenfassend sind folgende Möglichkeiten der Wirkung pflanzlicher Substanzen auf Bakterien bei Schadstoffexposition zu untersuchen:

- Beschleunigung des Abbaues durch:
 - *Anstieg der Bakterienzahl*: der Einfluss der Pflanzen bewirkt eine Vervielfachung der Bakterienzahl (Rhizosphäreneffekt). Somit ist auch eine erhöhte Zahl von Bakterien denkbar, die sich vorteilhaft auf den Schadstoffabbau auswirken könnte.
 - *Anstieg der Diversität*: die Wurzelstruktur, das Wachstum der Wurzeln und die Abgabe organischer Substanzen über die Wurzeln läßt auf eine erhöhte Diversität in der Rhizosphäre schließen. Dadurch werden zum einen synergistische Effekte, speziell beim Abbau persistenter Schadstoffe wahrscheinlicher, und zum anderen steigt mit der Diversität das Adaptationspotenzial der Bakterienzönose.
- Ermöglichung des Abbaues durch:
 - *wurzelassoziierte Bakterien*: eine Präadaptation verschiedener Bakterien an eine Vielzahl organischer Schadstoffe könnte aufgrund strukturanaloger Verbindungen in Rhizodepositionsprodukten gegeben sein.
 - *Wirkung als Cosubstrat*: pflanzenbürtige Substanzen könnten für Bakterien als Wachstumssubstrat für cometabolische Prozesse fungieren. Insbesondere bei persistenten Verbindungen ist ein cometabolischer Abbau häufig erforderlich.
- Verzögerung des Abbaues durch:
 - *Wirkung als zusätzliche Nährstoffquelle* (z.B. diauxischer Effekt): nicht auszuschließen ist eine Verzögerung des Schadstoffabbaues, insbesondere solcher Schadstoffe, die von Bakterien direkt verwertet werden. Leicht abbaubare Rhizodepositionsprodukte, wie Zucker, organische Säuren und diverse weitere Verbindungen könnten bevorzugt von möglichen Abbauern metabolisiert werden.
 - *bakterizide Substanzen*: die Abgabe bakterizider Substanzen über die Rhizodeposition ist bekannt. Somit ist eine Hemmung degradierender Bakterien durch diese Substanzen in Betracht zu ziehen.

Da bei einem signifikanten Einfluss von Rhizodepositionsprodukten auch die Quantität der Abgabe für den Einsatz als „Repositionspflanzen“ entscheidend ist, erfolgt eine Abschätzung der Rhizodeposition unter realen Bedingungen.

Ein nachgewiesener positiver Einfluss auf den Schadstoffabbau durch Rhizodepositionsprodukte wäre in Abhängigkeit von der Quantität der Abgabe ein Argument für einen verstärkten Einsatz von Helophyten in technischen Verfahren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Auswahl und Anzucht der Pflanzen in Hydroponikkultur

Für die Untersuchungen wurden folgende Helophyten eingesetzt:

Carex gracilis Curt. (Schlanke Segge), *Phalaris arundinacea* L., (Rohrglanzgras), *Phragmites australis* (Cav.) Trin. (Schilf) und *Scirpus lacustris* L. (Teichsimse) (s. Abb. 7).

Die Pflanzen wurden aus Samen (Fa. Jelitto, Schwarmstedt) bzw. aus Ablegern gezogen. Für die Zucht aus Samen wurden diese in Wasser vorgequollen und anschließend auf Quarzsand ausgebracht. Schließlich wurden sie in einen Lichtthermostaten (Phytotron der Fa. Schütt) gegeben. Die Pflanzen unterlagen einem Tag/Nachtrhythmus von 16/8 Stunden bei 22° C am Tag. Über Nacht wurde die Temperatur bei 16° C gehalten. Die Lichtintensität betrug ca. 320 $\mu\text{Mol pro m}^2$ und Sekunde. Bei entsprechender Größe wurden die Pflanzen zwischenzeitlich in Kies gesetzt oder direkt in ein Hydroponikgefäß überführt. Das Hydroponikgefäß, in das bis zu fünf Pflanzen eingebracht wurden, faßte ein Volumen von 2,5 Liter. Die Hydroponikgefäße wurden in ein Gewächshaus gestellt und mit einer im Handel erhältlichen Universal-Nährlösung (Hakaphos der Fa. Compo, Thum) versorgt.

Zur Pflege der Pflanzen wurde die Nährlösung einmal wöchentlich gewechselt. Eine Woche vor Einsatz der Pflanzen in den Versuchen wurden ihre Wurzeln gewaschen und in eine definierte Nährlösung überführt (Zusammensetzung der Nährlösungen, s. Anhang Tab. A-1 u. A-2).

Die Pflanzen zeigten in Hydroponikkultur bis auf *Phragmites australis* ein gutes Wachstum. Dadurch konnten immer wieder Ableger von den Pflanzen gewonnen werden. *Phragmites australis* wuchs relativ langsam und war sehr anfällig gegenüber Schädlingen, insbesondere Zikaden.

Probleme mit Schädlingen traten außerdem bei *Carex gracilis* mit Spinnmilben (*Tetranychidae*) und bei *Phalaris arundinacea* mit Blattläusen auf. Sporadisch war des Weiteren Pilzbefall zu verzeichnen.

Bei Schädlingsbefall wurden neben Gelb- und Blautafeln (Klebetafeln in gelber bzw. blauer Farbe, die einen Landereiz auf bestimmte Insekten ausüben) entsprechende Antagonisten der Schädlinge eingesetzt (die Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* für Spinnmilben; Florfliegenlarven der Art *Crysoperla carnea* und Gallmückenlarven der Art *Aphidoletes aphidimyca* für Blattläuse), die im Handel (Fa. Flora Nützlinge, Fürstenwalde) bezogen wurden.

Bei zu starkem Schädlingsbefall wurden die Pflanzen aussortiert.

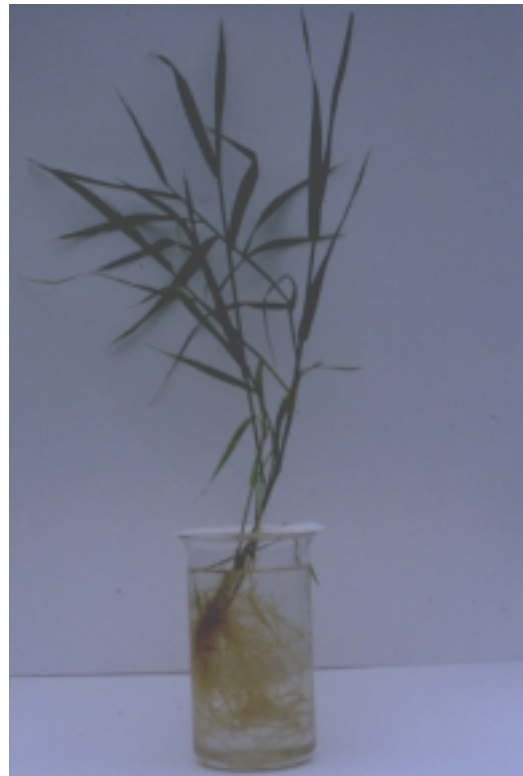
a.**b.****c.****d.**

Abb. 7: Versuchspflanzen der Hydroponikkulturen: **a:** *Carex gracilis*, **b:** *Phalaris arundinacea*, **c:** *Phragmites australis*, **d:** *Scirpus lacustris*

2.2 Testschadstoffe

Als Schadstoffe wurden phenolische Verbindungen eingesetzt.

Die Stoffgruppe der Phenole weist aufgrund der verschiedenen Substitutionsmöglichkeiten am aromatischen Ring eine hohe Vielfalt an Derivaten auf. Als Substituenten kommen u.a. Chlor, verschiedene Alkyl- und Arylreste, die Nitrogruppe, die Aminogruppe, die Carbonyl- und die Carboxylgruppe in Betracht (WORCH 1997).

Phenole sind wichtige Zwischenprodukte der chemischen Industrie. Sie werden zur Herstellung von Kunststoffen, Weichmachern, Pestiziden, Farbstoffen, Sprengstoffen, Detergentien und Desinfektionsmitteln genutzt (WORCH 1997).

Die umweltgefährdende Bedeutung der phenolischen Verbindungen ist insbesondere auf den Abbau von Kohle und deren industrielle Nutzung (Pyrolyse) zurückzuführen. Zusätzlich fallen beträchtliche Mengen an Chlorphenolen durch Papierbleichung, durch Wasserchlorierung und durch Müllverbrennung an (ENSLEY et al. 1997).

Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit und der geringen Akkumulationstendenz ist Phenol in der Hydrosphäre sehr mobil. Es ist ein starkes Fischgift, sehr geruchs- und geschmacksintensiv und kann dadurch sowohl Fische als auch Trinkwasser ungenießbar machen. Für Phenole im Trinkwasser gilt ein summarischer Grenzwert von 0,5 µg/L (berechnet als Phenol C_6H_5OH ; WORCH 1997).

Neben Phenol und dem methylierten Derivat 2,6-Dimethylphenol wurde 4-Chlorphenol als Testschadstoff für die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Untersuchungen eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden von der Fa. Merck bezogen.

In Vorversuchen mit diesen Substanzen zeigte sich ein von Phenol über 2,6-Dimethylphenol nach 4-Chlorphenol abnehmender Abbau durch adaptierte Bakterienmischkulturen. Dabei ist der Abbau als Transformation der Ausgangssubstanzen definiert.

2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den Schadstoffabbau

Die Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den Schadstoffabbau erfolgten zum einen bei direkter Exposition der Pflanzen gegenüber den Schadstoffen und zum anderen durch Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen (keine direkte Exposition der Pflanzen) auf den Schadstoffabbau. Als Richtwert für die von den Pflanzen abgegebenen Stoffmengen wurde die Konzentration an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC, s. P. 2.5.4) bestimmt.

Zur Bestimmung der Schadstoffkonzentrationen wurden während der Versuchsreihen Aliquots aus den Versuchsgefäßen entnommen und deren Schadstoffgehalte mittels UV-Vis-Spektralphotometrie (s. P. 2.5.5) bzw. mittels HPLC (high performance liquid chromatography, s. P. 2.5.6) gemessen.

2.3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen

Die Versuchspflanzen *Phalaris arundinacea* und *Carex gracilis* waren in der Hydroponiklösung (Zusammensetzung, s. Anhang Tab. A-1) schadstoffexponiert. Als Schadstoffe wurden Phenol, 2,6-Dimethylphenol und 4-Chlorphenol der Lösung beigemengt.

Die Hydroponikgefäße faßten ein Volumen von 2,5 L. Darin befanden sich 5 relativ junge Pflanzen mit einem Frischgewicht von ca. 10 g je Pflanze. Zu Beginn der Versuche wurden die Pflanzenwurzeln mit destilliertem Wasser gespült, um den Eintrag an Mikroorganismen zu minimieren. Nach Einbringung der Pflanzen in die Testgefäße waren die Wurzeln freischwimmend. Die Mineralsalzlösung wurde mittels Magnetrührer (500 Umdrehungen pro Minute) bewegt.

Die Konzentrationen für Phenol und 2,6-Dimethylphenol betrugen 30 mg/L. Für 4-Chlorphenol wurde aufgrund seiner höheren Persistenz mit 10 mg/L eine geringere Ausgangskonzentration gewählt.

Für die Messungen wurden drei Replikate mit Pflanzen gegen drei Referenzen gemessen, d.h. gegen Testgefäße bei gleichen Bedingungen, aber ohne Pflanzen.

Während des Versuches mit 2,6-Dimethylphenol wurde ein Aliquot zur ionenchromatographischen Messung der Nährsalzzusammensetzung entnommen.

2.3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen am Beispiel von 2,6-Dimethylphenol-abbauenden Bakterien

Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die Wirkung von Wurzelabscheidungen auf zuvor angereicherte Abbauer geben. Als Testsubstanz wurde 2,6-Dimethylphenol eingesetzt.

Die Versuche wurden zu Beginn mit einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem (Rührreaktor) durchgeführt, das mit der Hydroponikkultur der Pflanzen verbunden war, und in batch-Kulturen fortgesetzt.

2.3.2.1 Untersuchungen mit einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem

In dem kontinuierlich durchflossenen Testsystem (s. Abb. 8, S. 33) wurde ein Hydroponikkulturgefäß (G1) mit einem Rührreaktor (G2) verbunden. Die Hydroponikkultur hatte ein Volumen von ca. 2 L, welches stark durchwurzelt war, und der Rührreaktor ein Volumen von 5 Liter. Der Reaktor G2 war schadstoffexponiert (20 mg/L 2,6-Dimethylphenol) und wurde genutzt, um den Einfluss der über G1 eingetragenen pflanzlichen Substanzen auf die Abbaukinetik einer in G2 eingebrachten 2,6-Dimethylphenol-Abbaugemeinschaft (s. P. 2.3.2.3) zu untersuchen. Das Inokulum der Abbaugemeinschaft betrug 1 Vol.-%. In der Stammlösung befanden sich ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Damit wurden als Inokulum ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in den Rührreaktor eingebracht.

Durch diese Versuchsanordnung konnte ein direkter Einfluss der Pflanze (Schadstoffaufnahme durch die Pflanzen, Adsorption an der Pflanze) ausgeschlossen werden. Als Referenz diente ein paralleler Versuchsaufbau ohne Pflanze.

Als Pflanze wurde *Carex gracilis* gewählt, von der jeweils 5 Einzelpflanzen in den Behälter G1 gesetzt wurden. Die Pflanzen waren einer Lichtintensität ausgesetzt, die einem Photonenfluss von ca. 320 $\mu\text{mol pro m}^2$ und Sekunde entsprach. Die Nährlösung (Zusammensetzung, s. Anhang Tab. A-1) wurde belüftet, um ein aerobes Milieu zu gewährleisten. Außerdem war über die Belüftung sowie mit einem Magnetrührer eine gleichmäßige Durchmischung in den Gefäßen gewährleistet.

Da mit der Nährstoffzufuhr (N) eine Verdünnung der Schadstoffkonzentration in G2 erfolgte, wurde dem Testreaktor (G2) zur Kompensation der Schadstoff kontinuierlich über eine Einspritzpumpe (Z) zugeführt. Zur Berechnung der erforderlichen Menge sind die Parameter Flussrate, Verdünnungsrate und Schadstoffkonzentration erforderlich.

Die Verdünnungsrate lässt sich über

$$D = \frac{F}{V} \text{ berechnen.}$$

Dabei gibt die Verdünnungsrate (D) das Verhältnis der Nährstoffzufuhr (Flüssigkeitsstrom) pro Stunde (F) zum Volumen im Reaktor (V) wieder. Damit gibt D den Volumenwechsel pro Stunde an. Ohne Zugabe des Schadstoffes über die Einspritzpumpe würde dieser mit der Auswaschrate

$$D \cdot N = -\frac{dN}{dt}$$

ausgewaschen. Die Schadstoffkonzentration würde exponentiell nach $N = N_0 e^{-dt}$ abnehmen. Dabei ist N_0 die Anfangskonzentration (hier 20 mg/L) und N die Schadstoffkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Da für die Kompensation des Schadstoffes über die Einspritzpumpe kein signifikanter Einfluss auf das Volumen in dem Testbehälter (G2) ausgeübt werden sollte, wurde der Schadstoff in 1000facher Konzentration in 50 ml Methanol gelöst und dann über ein Volumen von 1/1000 den Testbehältern zugeführt.

Bei einer angenommenen Flussrate von 50 ml/h läßt sich daraus die kontinuierlich zu ersetzende Schadstoffmenge ermitteln.

Beispiel:

$$F = 50 \text{ ml} / h$$

$$D = \frac{F}{V} = \frac{50}{5000} = 0,01 / h$$

$$\text{d. h.} \quad \frac{0,01 \cdot 20 \text{ mg}}{h \cdot L} = \frac{0,2 \text{ mg}}{h \cdot L} \text{ bzw. } \frac{1,0 \text{ mg}}{h \cdot 5L} \quad (5L \text{ entspricht dem Volumen der Testgefäße})$$

müssen kontinuierlich ersetzt werden. Die 1000fache Menge wird in 50 mL Methanol gelöst, da von der gelösten Menge lediglich 50 µl und damit eine Konzentration von 1,0 mg pro Testgefäß zur Kompensation kontinuierlich zugeführt wird.

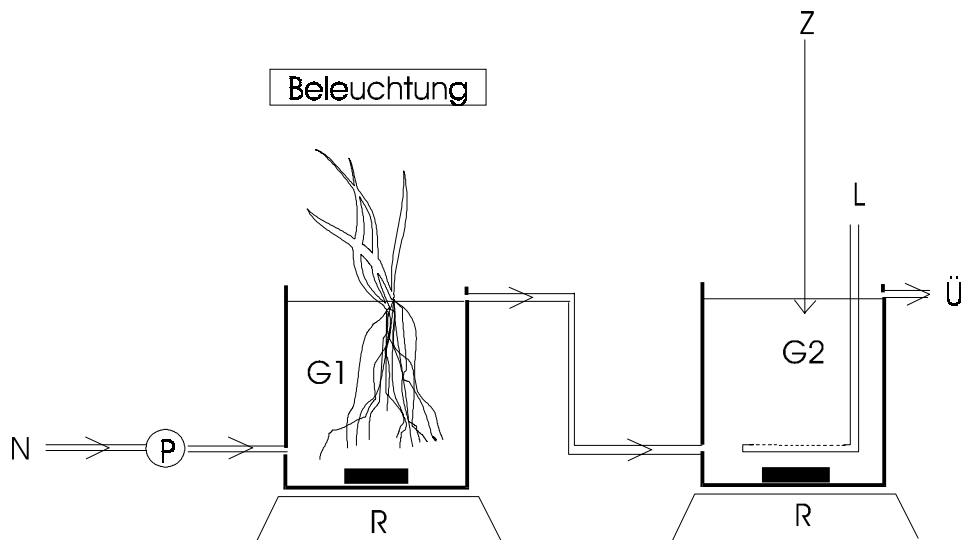


Abb. 8: Versuchsaufbau des kontinuierlich durchflossenen Testsystems zur Untersuchung des Einflusses von Wurzelabscheidungen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau:

- G1 = Gefäß mit Helophyten in Hydroponikkultur
- G2 = Fermenter mit Überlauf
- L = Luftzufuhr
- N = Vorratsbehälter mit Nährmedium (ohne Schadstoff)
- P = Dosierpumpe
- R = Magnetrührgerät
- Ü = Überlauf
- Z = kontinuierliche Schadstoffzudosierung (Einspritzpumpe)

2.3.2.2 Untersuchungen in batch-Kulturen

Für die Versuche in batch-Kulturen wurden jeweils mehrere Pflanzen (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Scirpus lacustris*) in 500 ml Behälter mit Mineralsalzlösung (Zusammensetzung s. Tab. A-1 im Anhang) gegeben. Nach einer bestimmten Dauer (Verweilzeit der Pflanzen in der Regel drei Tage) wurden die in der Mineralsalzlösung gelösten organischen Bestandteile über DOC-Messung (s. Punkt 2.5.4) quantifiziert.

Mit dieser Lösung wurden nach Sterilfiltration (0,2 µm) Abbauprobversuche mit 2,6-Dimethylphenol unter batch-Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden i.d.R. 5 Vol.-% der Anreicherungskultur (s. P. 2.3.2.3) als Inokulum hinzugegeben. In der Anreicherungskultur befanden sich ca. 10^6 bis 10^7 Zellen/ml. Parallel dazu wurden zur Kontrolle (Referenz) die gleichen Ansätze, jedoch ohne Wurzelabscheidungen, angesetzt.

Die Bebrütung der Schüttelkolben erfolgte über die gesamte Versuchsdauer auf einem Horizontalschüttler (Fa. Infors AG) bei 130 U/min und 20° C.

2.3.2.3 Gewinnung der mikrobiellen Abbaugemeinschaft

Für die Testsubstanz 2,6-Dimethylphenol wurden mikrobielle Abbaugemeinschaften angereichert. Diese Vorkulturen wurden in Erlenmeyerkolben gezogen. Hierzu wurden der Mineralsalzlösung 50 mg/L 2,6-Dimethylphenol als alleinige C-Quelle beigemengt.

Die Erlenmeyerkolben wurden bei 20° C unsteril auf einen Horizontalschüttler (Fa. INFORS AG) mit 130 Umdrehungen pro Minute gestellt. Nach 10 bis 14 Tagen etablierte sich aufgrund der unsterilen Bedingungen eine mikrobielle Abbaugemeinschaft.

2.3.3 Untersuchungen zum Einfluss pflanzlicher Substanzen als Wachstums-substrat für den bakteriellen 4-Chlorphenol-Abbau

Viele chlorierte organische Verbindungen sind mikrobiell nicht direkt verwertbar. Sie erfordern vor einem weiteren Abbau eine mikrobielle Transformation. Hierfür ist eine weitere Substanz, die als Wachstumssubstrat für die Mikroorganismen fungiert, erforderlich.

Die Eignung der Rhizodepositionsprodukte von Helophyten als Wachstumssubstrat für den 4-Chlorphenol-Abbau wurde untersucht. Als Teststamm wurde zu Beginn *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) gewählt. Für diesen Stamm konnten HILL et al. (1996) zeigen, dass er die Verbindung 4-Chlorphenol mit Phenol als Wachstumssubstrat transformiert, wenn die Verbindungen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:5 (4-Chlorphenol : Phenol) vorliegen.

Im Anschluss an die Arbeiten mit *Ralstonia eutropha* wurden Bakterien, die von *Phalaris arundinacea* zuvor isoliert wurden, als Testorganismen auf diese Abbaufähigkeit hin untersucht.

Als Referenz wurden Testansätze gewählt, die keine Wachstumssubstrate enthielten.

2.3.3.1 Abbauversuche mit *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) und 4-Chlorphenol unter Einfluss pflanzlicher Substanzen

Der Testorganismus *Ralstonia eutropha* Stamm 5536 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

In batch-Versuchen (300 ml Erlenmeyerkolben) wurde die Eignung pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für diesen Organismus getestet. Die Versuche wurden als Vorversuch mit Wurzelhomogenat und im Anschluss daran mit Abscheidungen (Gewinnung s. P. 2.3.2.2) von *Phalaris*wurzeln durchgeführt.

Für den Vorversuch mit dem Wurzelhomogenat wurden die Wurzeln, die einem Trockengewicht von 350 mg entsprachen, zerkleinert, homogenisiert und nach Zugabe von Mineralsalzlösung autoklaviert, um einen Eintrag von Mikroorganismen auszuschließen.

Die mit Wurzelabscheidungen angereicherte Mineralsalzlösung (Zusammensetzung, s. Anhang Tab. A-2) wurde zuvor sterilfiltriert (0,2 µm Cellulosenitrat-Membranfilter, Fa. Sartorius).

Die Versuche mit den Wurzelabscheidungen erfolgten bei verschiedenen 4-Chlorphenol-Konzentrationen und unterschiedlichen DOC-Konzentrationen (s. Tab. 3). Dabei wurden die Wachstumssubstrate in höherer Konzentration als die des 4-Chlorphenols eingesetzt. Die Phenol zu 4-Chlorphenol Konzentrationsverhältnisse wurden in Anlehnung an einer von HILL et al. (1996) durchgeführten Arbeit, in der die genannten Substanzen und der Stamm *Ralstonia eutropha* eingesetzt wurden, gewählt.

Vor Zugabe von *Ralstonia eutropha* in die Testgefäße wurde das Bakterium von einer Dauerkultur zur Anreicherung in Mineralsalzlösung mit Phenol als C-Quelle überführt.

Diese Vorkultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen analog zu Punkt 2.3.2.3.

Nach zwei Tagen (Trübungsmessungen zeigten, dass sich die Bakterien zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase befanden) wurden von dieser Vorkultur, nach Waschen in physiologischer Kochsalzlösung, 10 ml (das Inokulum entsprach 5 Vol.-%) entnommen und in die Mineralsalzlösung mit unterschiedlichem C-Substrat (3 Ansätze, s. Tab. 3) pipettiert.

Tab. 3: Versuchsvarianten zur Untersuchung des Einflusses pflanzlicher Substanzen auf den cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536); Abk.: Ph = Phenol, 4-CP = 4-Chlorphenol, RDP = Wurzelabscheidungen bzw. Rhizodepositionsprodukte

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
	Phenol als Wachstums- substrat	Pflanzliche Substanzen als mögliches Wachstumssubstrat	4-CP als allei- nige C-Quelle
1. Versuchs- reihe	4-CP (25 mg/L) + Ph (100 mg/L)	4-CP (25 mg/L) + Wurzelhomogenat (TG 350 mg/L)	4-CP (25 mg/L)
2. Versuchs- reihe	4-CP (2 mg/L) + Ph (15 mg/L)	4-CP (2 mg/L) + RDP (DOC: 12; 6; 3 mg/L)	4-CP (2 mg/L)
3. Versuchs- reihe	4-CP (5 mg/L) + Ph (15 mg/L)	4-CP (5 mg/L) + RDP (DOC: 24; 12; 6; 3 mg/L)	4-CP (5 mg/L)

2.3.3.2 Abbauprobversuche mit wurzelassoziierten Bakterien

Im Anschluss an die Versuche mit *Ralstonia eutropha* wurden wurzelassoziierte Bakterien (Gewinnung, s. P. 2.4) hinsichtlich ihres Abbaupotenzials bei Zugabe von Wurzelabscheidungen getestet.

Die Versuche wurden mit Mikroorganismen-Mischkulturen begonnen (Versuchsvarianten, s. Tab. 4). Nachdem sich ein positiver Einfluss der Wurzelabscheidungen zeigte, wurden die Versuche mit Isolaten, die von *Phalaris*wurzeln stammten und ein dem *Ralstonia eutropha* Stamm analoges Verhalten zeigten, fortgeführt. Anstelle der Wurzelabscheidungen wurde für einen Testansatz Natriumacetat als C-Quelle hinzugegeben, um eine Aussage zur Verwertbarkeit bzw. Qualität der Wurzelabscheidungen im Vergleich zu leicht abbaubaren C-Quellen wie Natriumacetat treffen zu können (Versuchsvarianten, s. Tab. 5).

Tab. 4: Versuchsvarianten zur Untersuchung des Einflusses pflanzlicher Substanzen auf den cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol durch eine Bakterienmischkultur, die von *Phalaris arundinacea* gewonnen wurde (Gewinnung der Bakterien, s. P. 2.4)

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
	Phenol als Wachstums- substrat	Pflanzliche Substanzen als mögliches Wachstumssubstrat	4-CP als allei- nige C-Quelle
1. Versuchs- reihe	4-CP (2,5 mg/L) + Ph (15,0 mg/L)	4-CP (2,5 mg/L) + RDP (DOC 12 mg/L)	4-CP (2,5 mg/L)
2. Versuchs- reihe	4-CP (2,5 mg/L) + Ph (15,0 mg/L)	4-CP (2,5 mg/L) + RDP (DOC 4 mg/L)	4-CP (2,5 mg/L)

Tab.5: Versuchsvarianten zur Untersuchung des Einflusses pflanzlicher Substanzen auf den cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol durch Bakterienisolate, die von *Phalaris arundinacea* gewonnen wurden

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
	Pflanzliche Substanzen als mögliches Wachs- tumssubstrat	Na-Acetat als mögliches Wachstumssubstrat	4-CP als allei- nige C-Quelle
Isolat A	4-CP (2,0 mg/L) + RDP (DOC 10 mg /L)	4-CP (2,0 mg/L) + Na-Acetat (DOC 10 mg/L)	4-CP (2,0 mg/L)
Isolat B	4-CP (2,0 mg/L) + RDP (DOC 10 mg /L)	4-CP (2,0 mg/L) + Na-Acetat (DOC 10 mg/L)	4-CP (2,0 mg/L)

Anschließend wurden als weitere Testpflanzen *Carex gracilis* und *Phragmites australis* eingesetzt. Die Ausgangskonzentration des 4-Chlorphenols wurde auf 0,8 mg/L gesenkt, aber das Verhältnis Wachstumssubstrat zu 4-Chlorphenol beibehalten. Somit wurden die Wurzelabscheidungen in einer Konzentration, die einem DOC von 4 mg/L entsprach, eingesetzt.

Für die unter diesem Punkt aufgeführten Versuche wurden zum Teil nach Animpfen der Testgefäße die Bakterienzahlen ermittelt (s. P. 2.5.1) und ihre Veränderungen

über den Untersuchungszeitraum verfolgt. Ebenfalls wurden zum Teil die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der unterschiedlichen Testvarianten berechnet (s. P. 2.5.2).

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten unter Einfluss des über die Nährlösung eingetragenen Kohlenstoffs wurden abschließend Versuche durchgeführt. Dafür wurde die mit 0,8 mg / Liter DOC eingesetzte Nährlösung (entspricht der Verunreinigung) mit definierten Inokula eines von *Phalaris arundinacea* gewonnenen Isolates angeimpft. Die Inokula enthielten $6 \cdot 10^4$, $1,5 \cdot 10^5$ und $3 \cdot 10^5$ Zellen / Milliliter.

In einem weiteren Versuch wurde für bestimmte Animpfdichten (10^4 , $2 \cdot 10^4$, 10^5 , $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) die Zellzahlentwicklung festgehalten.

Diese Versuche wurden zum einen durchgeführt, um den Einfluss des mit der Nährlösung eingetragenen Kohlenstoffs beurteilen zu können (dieser Eintrag muß bei den Versuchen für die jeweilige Referenz berücksichtigt werden), zum zweiten, um abiotische Effekte bei der Auswertung der Ergebnisse ausschließen zu können und zum dritten, um Aussagen zum Abbau in Abhängigkeit von der Zellzahl zu treffen.

2.3.3.3 Untersuchungen zum Abbau von 4-Chlorphenol

Versuche zur Degradation von 4-Chlorphenol erfolgten durch Aufnahme von UV-Vis Absorptionsspektren (s. P. 2.5.5) und durch ionenchromatographische Untersuchungen (s. P. 2.5.7) zur Freisetzung des Chloridions aus dem 4-Chlorphenol.

Die Aufnahme der UV-Vis Spektren erfolgte im Bereich von 290 bis 410 nm: UV-Maxima von 378 nm bei pH 7,5 und von 330 nm bei pH 2 sind ein Indiz für den Metaboliten 2-Hydroxy-5-chlormuconatsemialdehyd (JANKE u. FRITSCH 1979), der beim 4-Chlorphenol-Abbau über die meta-Spaltung gebildet wird.

Die ionenchromatographischen Ergebnisse ermöglichen Aussagen zur Dechlorierung und damit zur Detoxifizierung der Ausgangssubstanz 4-Chlorphenol.

2.4 Gewinnung pflanzenassoziierter Bakterien

2.4.1 Gewinnung einer phenolabbauenden Vorkultur

Für die Gewinnung einer phenolabbauenden Mischkultur wurden Wurzelteile von *Phalaris arundinacea* in einer Länge von ca. 10 cm mit ihren Seitenwurzeln in Erlenmeyerkolben mit Mineralsalzlösung gegeben, in der sich Phenol mit einer Konzentration von 20 mg/L als alleinige C-Quelle befand. Nachdem bakterielles Wachstum sichtbar (Trübung) eingetreten war, wurden Aliquots für die unter Punkt 2.3 genannten Abbauprobversuche entnommen.

2.4.2 Zellzahlvergleich (KBE) wurzelassoziierter Bakterien von schadstoff-exponierten und nicht exponierten Pflanzen in Hydroponikkultur

Zur Gewinnung von wurzelassozierten Mikroorganismen wurden außerdem Pflanzen in Erlenmeyerkolben mit Glasperlen (50 g in 100 ml steriler Mineralsalzlösung) gesetzt und 20 Minuten bei 130 Umdrehungen pro Minute auf einen Horizontalrüttler gestellt. Anschließend wurden die Kolben für 1 Minute in ein Ultraschallbad gegeben (Methode modifiziert nach BENNETT u. LYNCH 1981, KLOEPPER u. BEUACHAMP 1992). Für die so gewonnenen Mikroorganismen wurde die Gesamtzellzahl über KBE (s. P. 2.5.1.2) nach Ausplattieren auf R2A- und Selektivnährboden ermittelt.

In einer weiteren Variante wurden auf gleiche Weise die Mikroorganismen einer phenolexponierten Pflanze gewonnen und zum Vergleich mit der nicht exponierten Pflanze auch deren Gesamtzellzahl gleichermaßen ermittelt.

Die Bezugsgröße für die KBE ist ein Gramm Wurzelfrischgewicht.

2.5 Mikrobiologische und analytische Methoden

2.5.1 Zellzahlbestimmung

2.5.1.1 Zellzahlbestimmung mittels Membranfilterverfahren nach Acridinorangeanfärbung

Mit dieser Methode erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl in den Nährlösungen. Hierfür wurde 1 ml Probenwasser (gegebenenfalls mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt) filtriert (0,2 µm Polycarbonatfilter der Fa. Costar) und die auf dem Filter verbleibenden Bakterien mit 0,01%iger Acridinorangelösung (Acridin, Fa. Merck) angefärbt (s. HOBIE et al. 1977). Der Farbstoff bindet an die DNA bzw. RNA der Bakterienzellen. Mit einem Mikroskop (Fa. Zeiss, Jena; Typ: 30-G 0050a) wurden durch Fluoreszenzanregung (Anregungsfilter BP 450-490) die Zellen sichtbar und mit einem entsprechenden Okular (mit Zählquadraten) die Zellzahlen ermittelt.

Die Berechnung der Organismenzahl erfolgte nach der Formel:

$$\text{Bakterien / ml} = \frac{N \cdot A_F}{d \cdot V_f \cdot A_g \cdot G}$$

dabei ist

- N : gezählte Zellzahl
- A_F: Filterfläche
- d : Verdünnungsfaktor
- V_f: Volumen der filtrierten Probe
- A_g: Fläche des Zählquadrates
- G : Anzahl der gezählten Quadrate

2.5.1.2 Zellzahlbestimmung über Ermittlung der KBE (koloniebildende Einheiten)

Die KBE-Zahl wurde über das Spatelplattenverfahren ermittelt. Dafür wurden je 0,1 ml aus einer geeigneten Reihe von Verdünnungen der Testlösung auf entsprechende Nährmedien (Selektiv- und R2A-Nährmedium der Fa. DIFCO LABORATORIES, Detroit, MI, USA) ausgespatelt. Nach fünftägiger Bebrütung bei 20° C wurden die

KBE mit unterschiedlicher Gewichtung der Verdünnungsstufen (s. SÜßMUTH et al. 1987) als Maß für die Lebendzellzahl ermittelt.

2.5.2 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Die Transformation der Ausgangssubstanz 4-Chlorphenol folgt der Differentialgleichung

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 \cdot S$$

S = Substratkonzentration
k₁ = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung

nach Integration ergibt sich

$$S_t = S_0 \cdot e^{-k_1 \cdot t}$$

S_t = Konzentration des Substrates nach der Zeit t
S₀ = Anfangskonzentration

durch Logarithmisierung

$$\ln S_t = \ln S_0 - k_1 \cdot t$$

wird die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ermittelt:

$$k_1 = \frac{\ln S_0 - \ln S_t}{t}$$

Für die Berechnungen im Ergebnisteil werden die Integrationsgrenzen t₂ (Konzentration zum Zeitpunkt t₂) und t₁ (Konzentration zum Zeitpunkt t₁) festgelegt.

modifiziert nach OTTOW 1997

2.5.3 Isolierung und Identifizierung der schadstoffabbauenden Mikroorganismen

Zur Isolierung der Abbauer wurden 0,1 ml der Anreicherungskulturen auf Selektivnährmedien (Phenol, 2,6-Dimethylphenol oder 4-Chlorphenol als alleinige C-Quelle) ausplattiert und bei 20° C bebrütet. Die nach ca. 5 Tagen gewonnenen Kolonien wurden durch Übertragung auf weitere Platten isoliert und nach Überprüfung auf Reinheit auf Schrägagar isoliert und für eine spätere Verwendung (Abbauversuche, Identifizierung) bei 4° C gelagert bzw. für eine langfristige Kultivierung in Nährlösung mit einem Glycerinanteil von 65 % in Kryoröhrchen bei minus 70° C tiefgefroren.

Die Mikroorganismen wurden näher charakterisiert und nach Möglichkeit identifiziert. Dafür erfolgte eine Zuordnung nach morphologischen Merkmalen, nach dem Wachstumsbild bei Kultivierung auf Agar, nach Motilität der Mikroorganismen und nach physiologischen Merkmalen. Hierfür wurde die Gram-Färbung durchgeführt, die Cytochromoxidase- und Katalasereaktion getestet und die Verwertbarkeit verschiedenster C-Quellen mittels standardisierter Verfahren, wie dem BIOLOG- bzw. API-System (s. P. 2.5.3.1), geprüft.

Des Weiteren wurde zur Identifizierung bzw. zur Trennung der isolierten Mikroorganismen die Analytik der Fettsäuren (s. P. 2.5.3.5) und die Amplifizierung von 16S rRNA Gensegmenten mittels PCR (polymerase chain reaction) (s. P. 2.5.3.6) herangezogen. Die amplifizierten Fragmente ermöglichen gegebenenfalls die Sequenzierung zur Artenidentifizierung.

2.5.3.1 API und BIOLOG

Bei API (Fa. bioMérieux) und Biolog (Fa. Biolog) handelt es sich um standardisierte Testsysteme, bei denen miniaturisierte Reaktionsgefäße (Mikrowannen, Volumen eines Testgefäßes bei Biolog = 150 µl), in denen Substrate in dehydrierter gebrauchsfertiger Form vorgegeben sind, genutzt werden. Die Reinkulturen der zu identifizierenden Bakterien werden in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) suspendiert und in bestimmter Konzentration, die über die optische Dichte bestimmt wird, in die Testgefäße pipettiert. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird die Nutzung eines Substrates durch ein Bakterium durch Farbumschlag im Reaktionsgefäß indiziert. So entstehen bei der Vielzahl von unterschiedlichen Substraten spezielle Farbmuster, die auf spezifische Bakterien schließen lassen. Die Identifizierung erfolgte über entsprechende Software.

Für das API-System der Fa. BioMérieux wurden die Varianten API 20 NE und API Staph eingesetzt.

Mit API 20 NE werden 8 verschiedene Stoffwechselprodukte/Enzyme und 12 Assimilationsreaktionen zur Identifizierung nicht anspruchsvoller, Gram-negativer Stäbchen, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören, genutzt. Dieses System ist geeignet um z.B. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, etc. zu identifizieren.

Das API Staph-System nutzt spezifische biochemische Reaktionen zur Identifizierung von *Micrococcus*- und *Staphylococcus*-Arten. Für die Untersuchungen dieser Arbeit waren *Micrococcus*-Arten relevant.

Das Biolog-System testet die Verwertung bzw. Oxidation von insgesamt 95 Kohlenstoffquellen. Genutzt wurden die Systeme GP MicroPlate™ für Gram-positive Bakterien und GN MicroPlate™ für Gram-negative Bakterien. Als Redoxfarbstoff, der die Verwertung der C-Substrate indiziert, wird Tetrazoliumviolett genutzt. Die Auswertung erfolgte mit dem System Microlog2 und dem Micro-Plate Reader EL 340 von Bio-Tech. Instruments. Nach Herstellerangaben ermöglichen die Biolog-Testsysteme die Identifizierung von 1100 Arten/Gruppen.

Die Inkubationszeit betrug für beide Systeme 24 Stunden bei einer Temperatur von 30° Celsius.

2.5.3.2 Cytochrom-Oxidase Test

Die Cytochrom-Oxidase katalysiert als terminales Enzym in der Atmungskette die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Dieses Enzym ist bei vielen Bakterien in der Membran lokalisiert und kann als weiteres Merkmal für eine Identifizierung von Mikroorganismen hinzugezogen werden.

Der Cytochrom-Oxidase Test wurde mit den Nachweisreagenzien (1)-Naphthol in 96%igem Ethanol (1%ige Lösung) (=Lösung A) und N,N-Dimethyl-p-phenylendi-ammoniumdichlorid (1%ige wässrige Lösung) (=Lösung B) der Fa. Merck durchgeführt. Die beiden Lösungen werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 2:3 gemischt und auf die jeweils jungen Agarkulturen aufgetropft. Eine Blaufärbung (Bildung von Indophenolblau) innerhalb von 30 Sekunden gilt als oxidasepositiv (s. auch SÜßMUTH et al. 1987).

2.5.3.3 Katalase-Test

Als weiteres Merkmal für die Bakterienidentifizierung wurde der Katalase-Test durchgeführt.

Die Katalase katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches für die Zelle toxisch ist, zu Sauerstoff und Wasser. Der Katalase-Test erfolgt, indem Agarkulturen mit H_2O_2 überschichtet werden. Ein katalasepositiver Organismus wird durch Gasbläschenbildung angezeigt (s. auch SÜßMUTH et al. 1987).

2.5.3.4 Gram-Färbung und Amino-peptidase-Test

Die Gram-Färbung basiert auf der Anfärbung hitzefixierter Bakterienausstriche mit einem basischen Farbstoff, hier Karbolgentianaviolett. Anschließend wird der Ausstrich mit Jodlösung überschichtet. Jod bildet mit Karbolgentianaviolett Lack, der in Wasser unlöslich und in Alkohol oder Aceton nur mäßig löslich ist. Die Ausstriche werden dann mittels Alkohol differenziert: Gram-positive Zellen halten den Farbstoff-Jod-Komplex zurück und bleiben violett; Gram-negative Zellen werden entfärbt (Arbeitsschritte, s. Anhang Tab A-3).

L-Alanin-Amino-peptidase ist ein in der Bakterien-Zellhülle lokalisiertes Enzym. Das Enzym spaltet die Aminosäure L-Alanin aus unterschiedlichen Substraten ab. Dieses Enzym kommt in relevanter Aktivität praktisch nur bei Gram-negativen Mikroorganismen vor. Damit kann der Nachweis dieses Enzyms zur Bestätigung der Ergebnisse der Gram-Färbung hinzugezogen werden.

Für die Durchführung wird eine gut gewachsene Kolonie in 0,2 ml destilliertem Wasser in Suspension gebracht und anschließend ein Teststäbchen (Bactident-Amino-peptidase, Fa. Merck) mit seiner Reaktionszone in diese Suspension gegeben. So wurden die Teststäbchen für 10 bis maximal 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Amino-peptidase-positive- bzw. Gram-negative Stämme sind durch Gelbfärbung der Suspension zu erkennen.

Mikroorganismen mit starker Eigenfärbung sind für diesen Test nicht geeignet.

2.5.3.5 Weitere mikrobiologische Testmethoden

Neben diesen Tests wurden bei Unklarheiten weitere Untersuchungen zur Differenzierung der Kolonien durchgeführt:

- Fluoreszenztest zur Differenzierung der Pseudomonaden: nach Wachstum auf Pseudomonas Agar F (Fa. Merck) wurden die Kolonien durch Anregung bei 366 nm (CAMAG UV-Cabinet II) auf Fluoreszenz getestet.
- Flexirubinnachweis: die Unterscheidung zwischen den Gattungen *Cytophaga* und *Proteus* erfolgte durch Zugabe von 20%iger KOH-Lösung zu den Kolonien. Bei Vorhandensein von Flexirubinen, die bei *Cytophaga*-Arten nachgewiesen wurden, schlägt die gelbe Farbe der Kolonien nach rot bis braun um (SÜßMUTH et al. 1987).
- Methanolwachstumstest zur möglichen Identifizierung der Gattung *Methylobacterium*.

2.5.3.6 Erfassung der membrangebundenen Fettsäuren

Die Membranen der Eubakterien bestehen zu 98 % aus Phospholipiden. Sie liegen in der Regel in der Form eines Diacylglycerids vor. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass zwei Fettsäuremoleküle mit der ersten und zweiten Hydroxylgruppe des Glycerins verestert sind und die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins mit der Phosphorsäure verestert ist.

Die veresterten Fettsäuren wiederum unterscheiden sich durch die Kettenlänge (Anzahl der C-Atome) sowie Vorhandensein, Anzahl und Position von Doppelbindungen. Des Weiteren können sie verzweigtständige Methylgruppen enthalten (LEHNINGER 1987).

Da die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide hinsichtlich Anzahl und Struktur zwischen verschiedenen Mikroorganismen variiert, kann ihre Bestimmung zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt werden.

Eine Methode, bei der die unterschiedlichen Fettsäuremuster zur Charakterisierung von Mikroorganismen, u.a. auch in Umweltproben, herangezogen werden, ist die FAME (fatty acid methyl ester) Methode. Hierbei werden nach Aufschluss der Zellen und nach Freisetzung der Fettsäuren diese methyliert, um eine Auftrennung im Gaschromatographen zu ermöglichen.

Für die Gewinnung der Fettsäuren aus den zu bestimmenden Reinkulturen wurden diese zuerst bei 28° C für 24 Stunden auf fettfreiem tryptischen Sojaagar (Fa. Merck) kultiviert. Kolonien, die auf diesem Agar nicht oder zu langsam wuchsen, konnten mit dieser Methoden nicht näher charakterisiert werden.

Anschließend wurden Abstriche von den Kulturen, die einer Zelltrockenmasse von ca. 4 bis 8 mg entsprachen, in Reagenzgläser mit Teflonschraubverschluss gegeben.

Durch anschließende Verseifung mit NaOH, Methanol und Wasser wurden die Fettsäuren freigesetzt und daran anschließend für den GC-Lauf methyliert (mit Salzsäure und Methanol), extrahiert (in n-Hexan und Methyl-t-butylether) und mit NaOH und Wasser gewaschen (entsprechend der Anleitung des Systems Microbial Identification SHERLOCK; MIDI Newark, Del., USA).

Für die Detektion der Fettsäuren wurde ein Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Als Trägergas diente Wasserstoff.

Die Analysen erfolgten mit einem Hewlett - Packard Gaschromatographen des Typs 5890 Reihe II (splitlose Injektion; Trägergas Wasserstoff; Anfangsdruck 10 psi; Temperaturprogramm: 170-260° C bei 5° C/Min., 260-310° C bei 40° C/Min, 310° C, 1,5 Minuten halten; Flammenionisationsdetektor; Hewlett-Packard) und wurden über eine HP 3365 ChemStation Software (Hewlett-Packard) gesteuert.

Die Zuordnung der Fettsäuren erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der Proben mit denen bekannter Standards der MIDI Datenbank, TSBA 4040.

Die Fettsäurezusammensetzung wurde über den Peakflächenanteil berechnet und in Prozent angegeben.

Folgende Fettsäurenomenklatur wurde genutzt:

die Zahl, die dem Doppelpunkt vorangeht, gibt die Gesamtanzahl der C-Atome wieder; Zahlen, die dem Doppelpunkt folgen, die Anzahl der Doppelbindungen und der Zusatz bezeichnet die Position (vom Methylende des Moleküls, sofern nichts anderes angegeben ist) und die *cis*- oder *trans*-Konfiguration der Doppelbindungen (s. auch HÄRTIG et al. 1999).

Zur Ermittlung der Ähnlichkeiten der untersuchten Isolate wird durch das MIDI-System über eine Clusteranalyse ein Dendrogramm erstellt. Dabei werden die Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Reinkulturen durch die Euklidische Distanz dargestellt.

2.5.3.7 Polymerase-Kettenreaktion und Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (PCR-DGGE)

PCR (allgemein)

Zur Differenzierung der schadstoffrelevanten Mikroorganismen wurde als weitere Methode die PCR (polymerase chain reaction) mit einer daran anschließenden DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) durchgeführt.

Bei der PCR handelt es sich um eine enzymatische DNA-Synthese mittels DNA-Polymerase. Spezifische Oligonukleotide (Primer) flankieren den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt, an dem durch Zugabe von Nukleotiden zwei komplementäre DNA-Stränge binden können. Damit diese Prozesse stattfinden, sind prinzipiell 3 Temperatur- bzw. Prozeßphasen im Reaktionsgefäß erforderlich:

Erste Phase: Denaturierung, d.h. durch Erhitzen auf i.d.R. 94° C wird die als Matritze vorliegende DNA denaturiert;

zweite Phase: Annealing, d.h. durch Abkühlung kann eine sequenzspezifische Anlagerung der Primer an die jetzt vorliegenden Einzelstränge (template DNA) erfolgen;

dritte Phase: Extension, d.h., dass für die folgende DNA-Synthese eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt wird, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Das Temperaturoptimum dieser sogenannten *Taq*-Polymerase liegt bei 72° C. Die Polymerase synthetisiert bei dieser Temperatur aus den vorliegenden Nukleotiden neue komplementäre Stränge, die einseitig durch die beiden Primer begrenzt sind.

Bei Wiederholung der Phasen wird im 2. Zyklus erstmals das durch die beiden Primer begrenzte PCR-Produkt gebildet. Dieses wird in den darauf folgenden Schleifen exponentiell vervielfacht (s. Abb. 9).

So wird mit 30 bis 40 Zyklen eine 10^5 bis 10^9 -fache Amplifikation erreicht und damit genügend PCR-Produkt für weitere Verfahrensschritte zur Differenzierung (hier: DGGE) gewonnen (PALUMBI 1990, LÜTHY 1996).

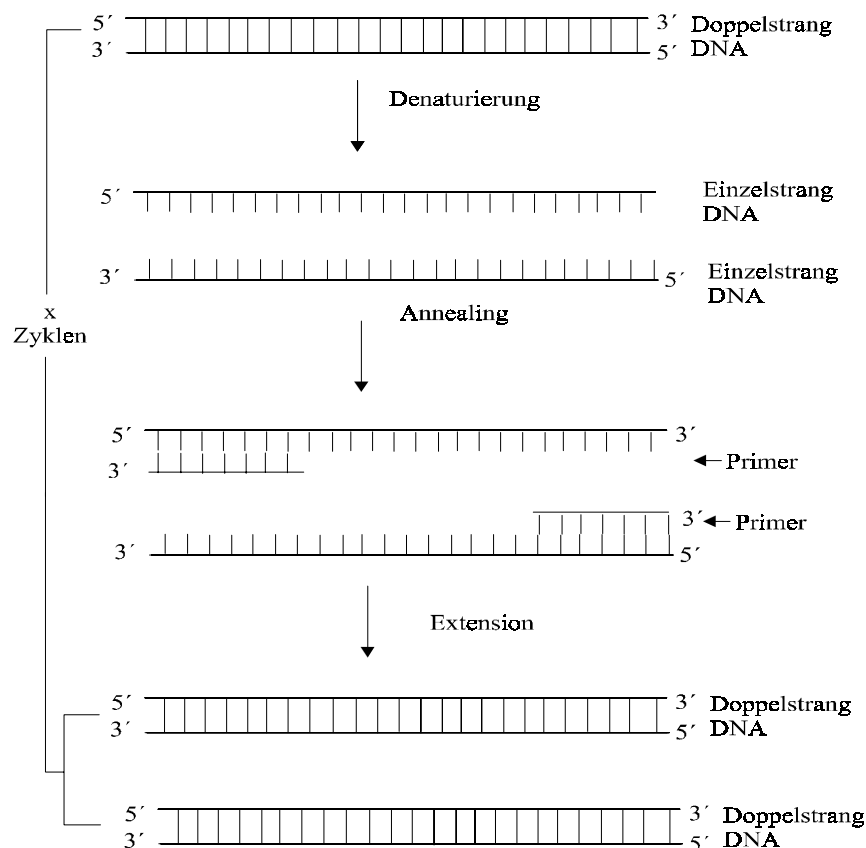


Abb. 9: Schematische Darstellung der PCR

Die Prozessphasen werden automatisch mittels eines Thermocyclers gesteuert. Durch Modifizierung der Temperatur und Dauer der einzelnen Schleifen kann die PCR optimiert werden. So kann durch ein „touch down“ Verfahren erreicht werden, dass zu Beginn der Vervielfältigungsphasen bei relativ hoher Temperatur („hot start“, bei dem die Temperatur oberhalb der für die Primer optimalen Annealingtemperatur liegt) eine hohe Stringenz bei der Bindung der Primer an das Zieltemplate gegeben ist und somit das Risiko falscher PCR-Produkte vermindert wird, während mit Verlauf weiterer Zyklen, bei denen die Temperatur herabgesetzt wird (bis zur für die Primer optimalen Annealingtemperatur), die Bindung der Primer zu Lasten der Stringenz erleichtert wird. Aufgrund der zu dem späteren Zeitpunkt bereits relativ hohen Menge an PCR-Produkt ist die Wahrscheinlichkeit der Artefaktentstehung jedoch gesunken. Durch die niedrigere Temperatur ist gewährleistet, dass genügend Primer binden (PALUMBI 1990, MUYZER et al. 1993).

Für die genotypische Analyse kann grundsätzlich die chromosomale DNA sowie die RNA genutzt werden.

Für diese Arbeit wurde als zu amplifizierender Bereich die ribosomale DNA gewählt. Die rDNA enthält sowohl variable als auch konservierte Regionen, die mit der phylogenetischen Entwicklung nahezu unverändert geblieben sind. Diese Bereiche weisen zwischen verschiedenen Arten/Typen eine identische bzw. sehr ähnliche DNA-Sequenz auf. Die variablen Bereiche dagegen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer DNA-Sequenz, wobei der Unterschied um so größer wird, je geringer die phylogenetische Verwandtschaft der Arten/Typen ist.

Die rDNA besteht aus drei Komponenten. Für die vorliegende Arbeit wurde die 16S rDNA gewählt, die mit ca. 1500 Nukleotiden eine genügende Informationsdichte besitzt, um zwischen der Vielzahl unterschiedlicher Organismen zu unterscheiden. Die 16S rDNA ist bei den einzelnen Bakterienarten zwar in ihrer Sequenz unterschiedlich, jedoch in der Länge identisch oder zumindest sehr ähnlich. Die einzusetzenden Primer binden an die konservierten Bereiche und die dazwischenliegenden variablen Bereiche werden amplifiziert, so dass die PCR-Produkte aus Sequenzen gleicher Länge, aber unterschiedlicher Zusammensetzung, gebildet werden (DUINEVELD et al. 1998, ESCHWEILER 1999).

Diese Produkte können aufgrund der unterschiedlichen Nukleotidzusammensetzung und der dadurch bedingten spezifischen Schmelzeigenschaften durch die DGGE separiert werden.

DGGE (allgemein)

Die DGGE hat ihren Ursprung im medizinischen Bereich und wurde von MUYZER et al. (1993) zur Determinierung der genetischen Diversität natürlicher mikrobieller Gemeinschaften als Methode in der mikrobiellen Ökologie eingesetzt (MUYZER et al. 1995, ESCHWEILER 1999). Bei der DGGE werden die PCR-Produkte auf eine Polyacrylamid-Gelmatrix aufgetragen und dann während der elektrophoretischen Migration über einen chemischen Denaturierungsgradienten (Harnstoff/Formamid) in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der DNA-Fragmente aufgetrennt. Die Trennung und die damit einhergehende Veränderung der Migration führt letztendlich zum Stillstand auf der Matrix. Der Zeitpunkt ist abhängig von der Nukleotidzusammensetzung der Fragmente.

Die DGGE kann optimiert werden, indem an einem Primer am 5' Ende eine sogenannte GC-Klammer addiert wird. Die GC-Klammer besteht aus 20 bis 40 Nukleotiden mit den Basen Guanin und Cytosin. Aufgrund der 3fach-Wasserstoffbrückenbindungen dieser Basen wird die Stabilität der Segmente erhöht und dadurch die Trennung verzögert. Dadurch ist es möglich annähernd bis zu 100 % aller möglichen Sequenzvariationen zu detektieren (MUYZER et al. 1993).

Durch Anfärbung mit Silbernitrat oder Ethidiumbromid können die Banden sichtbar gemacht werden. Dabei entspricht im Idealfall jede Bande einer Bakterienart.

PCR-DGGE (Versuchsdurchführung)

Die PCR wurde mit Lysaten als DNA-Quelle aus den interessierenden Bakterienrein-kulturen durchgeführt. Die Lysate wurden gewonnen, indem nach 24 bzw. 48 Stunden Bakterienwachstum mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material aus der Kolonie entnommen und in 50 µl Lyselösung (0,05 M NaOH, 0,25 % [Gew./Vol.] SDS) suspendiert wurde. Das so entstandene Lysat wurde durch zweiminütiges Kochen in der Mikrowelle bei 500 W Leistung aufgeschlossen. Nach Zugabe von 450 µl Wasser wurde das Lysat pelletiert, indem es bei 14.000 U/min zentrifugiert wurde. 2 µl des Pellets wurden in die vorbereitete PCR-Lösung (s. Tab. 6) pipettiert und mit Mineralöl überschichtet. Jeder Stamm wurde in drei Parallelen angesetzt. Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach dem „hot start“ (Temperaturprogramm der touch down PCR, s. Anhang Tab. A-4).

Für die Untersuchungen wurden eubakterielle Primer (GM5F und 907R), die an die 16S rDNA binden, eingesetzt. Der Primer GM5F erhielt am 5' Ende für die DGGE zusätzlich eine GC-Klammer (s. Tab. 7). Aus den gewählten Primern ergibt sich insgesamt eine Fragmentlänge von 550 Basenpaaren.

Nach Ablauf der PCR wurden die aus den Reinkulturen gewonnenen Amplifikationsprodukte durch Elektrophorese mit jeweils 6 µl Aliquot in einem 1,5%igem Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung auf Reinheit kontrolliert. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V über einen Zeitraum von 70 Minuten.

Die daran anschließende DGGE mit den aus der PCR gewonnenen Amplifikationsprodukten läßt unter der Voraussetzung, dass die Reinkulturen unterschiedlichen Bakterienarten zugeschrieben werden können, für jedes Produkt eine spezifische Laufstrecke und damit eine diskrete DNA-Bande erwarten.

Für die DGGE wurden abhängig von der Intensität der zuvor erzielten PCR-Banden im Agarosegel, 5 bis 20 µl der Amplifikate im Verhältnis 1 : 4 mit Beladungspuffer versetzt und in die Taschen des DGGE-Gels gefüllt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad angefärbt (s. auch Tab. 8). Die Banden wurden auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und fotografiert. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Gelläufen zu ermöglichen, wurde in allen Läufen ein bestimmter Stamm, und zwar *Caulobacter subvibrioides*, als interner Standard mitgeführt.

Tab. 6: Zusammensetzung der PCR-Lösung:

Komponente	Volumen pro Ansatz	Menge pro Ansatz
Puffer (10 x)	5,00 µl	
dNTP-Mix (5 mM)	2,00 µl	10 nmol
Polymerase (5U / µl)	1,00 µl	5 U
Primer 907 (100 µM)	0,25 µl	25 pmol
Primer GM5 (100 µM)	0,25 µl	25 pmol
Zellsuspension	2,00 µl	
MgCl ₂ (100 mM)	1,00 µl	100 nmol
BSA (10 mg/ml)	10,00 µl	0,1 mg
Wasser	28,50 µl	
Gesamtvolumen	50,00 µl	

Tab. 7: Primer Sequenz und Position (*F* forward primer, *R* reverse primer). Die Numerierung der Positionen basiert auf der 16S rRNA von *Escherichia coli* (nach Brosius et al. 1981, zit. in MUYZER et al. 1995)

Primer	Position	Sequenz
GM5F	341-357	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
907R	907-927	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'
GC-Klammer		5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3'

Tab. 8: Technische Daten zur DGGE

Acrylamidgel: 6 % (Gew./Vol.)

Harnstoff/Formamid-Gradient: 20 % → 70 %

eingesetztes Amplifikat: 5 – 20 µl

Lauftemperatur: 60° C

Laufzeit: 20 – 24 h

Spannung: 100 V

Färbung: Ethidiumbromid

2.5.4 TOC/DOC (total organic carbon / dissolved organic carbon)-Analytik

Der DOC-Wert diene als Richtwert für die von den Versuchspflanzen über ihre Wurzeln abgegebenen organischen Substanzen.

Der DOC setzt sich aus den in Wasser löslichen Verbindungen, welche von lebenden Wurzelzellen abgegeben werden, und den Lysaten abgestorbener Zellen zusammen. Aufgrund unsteriler Bedingungen kann außerdem ein Anteil teilweise mikrobiell metabolisierter Substanzen nicht ausgeschlossen werden.

Neben Kohlenhydraten und organischen Säuren (u.a. Aminosäuren) können mit dem DOC Substanzen wie Cellulose, Lignin, Chitin, Hemicellulose, Lignocellulose, etc. erfaßt werden (EGLI 1995).

Die Analytik erfolgte mit einem TOC-Messgerät (Fa. Elementar GmbH: highTOC V2.6). Das Messprinzip basiert auf einer Trennung des anorganischen Kohlenstoffs vom Gesamtkohlenstoff durch Ansäuerung und anschließender Messung des verbleibenden organisch gebundenen Kohlenstoffs. Der organisch gebundene Kohlenstoff wird durch Hochtemperaturaufschluss in CO₂ umgewandelt. Das CO₂ durchströmt anschließend einen Mehrkanal IR-Detektor und das Integral des Messsignals wird mittels gespeicherter Kalibrationskurven in den entsprechenden Konzentrationswert umgewandelt.

Für die Untersuchungen zum Schadstoffabbau wurden im Anschluss an die nach der DIN vorgeschriebenen 0,45 µm Filterung die Proben mit 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert (Cellulosenitrat-Membranfilter der Fa. Sartorius).

Am Beispiel der Pflanzen *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Scirpus lacustris* wurde bei unterschiedlicher Verweilzeit (1, 2 und 3 Tage) der Pflanzen in 1/2 Liter-Gefäßen mit Mineralsalzlösung der Einfluss des Pflanzengewichtes und der Transpiration auf die Abgabe von DOC-Verbindungen untersucht.

2.5.5 UV-Vis Spektralphotometrie

Für die Arbeit wurde ein UV/Vis Spektralphotometer UV 4 der Fa. ATI UNICAM mit einem möglichen Wellenlängenbereich von 190 bis 850 nm genutzt.

Die Absorptionsmessungen der schadstoffhaltigen Nährlösungen erfolgten gegen schadstofffreie Nährlösungen als Referenz. Zuvor wurden die Nährlösungen für zehn Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Die Absorptionsmaxima, über die die Konzentrationen der Testsubstanzen ermittelt wurden, lagen für Phenol bei 270 nm, für 2,6-Dimethylphenol bei 269 nm und für

4-Chlorphenol bei 280 Nanometer. Die Konzentrationsmessungen erfolgten nach Kalibrierung mit der entsprechenden Nährlösung und Wellenlänge.

Für die unter Punkt 2.3 beschriebenen Versuchsdurchführungen erfolgten die Konzentrationsbestimmungen der Anreicherungskulturen mittels UV/Vis Spektralphotometrie.

Außerdem wurde das Spektralphotometer für die Untersuchungen zum 4-Chlorphenol-Abbau eingesetzt. Dafür wurden die Absorptionsspektren des metabolisierten 4-Chlorphenols im Wellenlängenbereich von 290 bis 410 nm aufgenommen (s. P. 2.3.3.3).

2.5.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Messungen wurde die „reversed phase chromatography“ genutzt. Bei diesem Verfahren ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Als stationäre Phase wurden Säulen mit chemisch gebundenem Octadecylsilan (ODS), ein n-Alkan mit 18 C-Atomen, verwendet.

Die Testlösungen wurden nach Filtration (0,2 µm Nylonmembran, Fa. Nalgene) in die HPLC injiziert. Dabei wurde für die Nachweise geringerer Phenol- bzw. 4-Chlorphenol-Konzentrationen (Kalibrierung bis zu 12,5 mg/L Phenol, resp. 2,5 mg/L 4-Chlorphenol) eine empfindlichere Säule eingesetzt, als für die Nachweise höherer Konzentrationen (Kalibrierung bis zu 50 mg/L Phenol, resp. 10 mg/L 4-Chlorphenol).

Die Analytik des 2,6-Dimethylphenols, Phenols und des 4-Chlorphenols erfolgte unter folgenden Bedingungen:

2,6-Dimethylphenol:

Kalibrierung bis zu 10 mg/L

Säule: Fa. Beckman; ODS: dp 5, 4,6 mm x 15 cm

Eluent: Wasser/Methanol-Gemisch (50:50); isokratisch

Fluss: 1,0 ml pro Minute bei einer Temperatur von 20° C und einem Druck von ca. 2000 psi

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: $\lambda = 220$ nm

Retentionszeit: 12,24 Minuten.

Phenol bzw. 4-Chlorphenol:

- Kalibrierung bis zu 12,5 mg/L Phenol, resp. 2,5 mg/L 4-Chlorphenol
Säule: Fa. Phenomex; Prodigy, 5 μ , ODS 3; 100A, 30 x 3,2 mm
Eluent: Wasser/Methanol-Gemisch (40:60); isokratisch
Fluss: 0,5 ml pro Minute bei einer Temperatur von 20° C und einem Druck von ca. 1500 psi
Injektionsvolumen: 100 μ l
Detektion: λ = 220 und 280 nm
Retentionszeit Phenol: 3,72 Minuten
Retentionszeit 4-CP: 6,64 Minuten
- Kalibrierung bis zu 50 mg/L Phenol, resp. 10 mg/L 4-Chlorphenol
Säule: Fa. Beckman; ODS: dp 5, 4,6 mm x 15 cm
Eluent: Wasser/Methanol-Gemisch (50:50); isokratisch
Fluss: 1,0 ml pro Minute bei einer Temperatur von 20° C und einem Druck von ca. 2000 psi
Injektionsvolumen: 100 μ l
Detektion: λ = 280 nm
Retentionszeit Phenol: 3,95 Minuten
Retentionszeit 4-CP: 8,35 Minuten

Zur Detektion wurde ein Dioden-Array-Detektor (Fa. Beckman; System Gold; Diode Array Detector Module 168) eingesetzt.

Für die unter Punkt 2.3 beschriebenen Versuchsdurchführungen erfolgten die Konzentrationsbestimmungen in den Abbauprobungen ausschließlich über Messungen mit der HPLC.

2.5.7 Ionenchromatographie (IC)

Die ionenchromatographische Auswertung der Zusammensetzung der Nährsalzlösung (s. P. 2.3.1) erfolgte mit dem Gerät DIONEX DX 100 (Fa. Dionex):

Säule: - Anionen: IonPac AS4A-SC (d=4 mm), Vorsäule AG4A-SC (d=4 mm)

- Kationen: IonPac SC 12 (d=4 mm), Vorsäule CG 12 (d=4 mm)

Eluent: - Anionen: 1,8 mmolare Na_2CO_3 / 1,7 mmolare NaHCO_3

- Kationen: Methan-Sulfonsäure

Flussrate: 2ml pro Minute

Detektoren: UV, Leitfähigkeit

Injektionsvolumen: 25 μl

Retentionszeiten (Minuten):

Natrium: 3,87; Ammonium: 4,53; Kalium: 5,78; Magnesium: 7,47; Calcium: 9,25;

Chlorid: 1,72; Nitrat: 3,25; Phosphat: 5,53; Sulfat: 7,42

Die ionenchromatographische Auswertung der Versuche zur Dechlorierung erfolgte mit dem Gerät DIONEX DX 500 (Fa. Dionex):

Säule: - Anionen: IonPac AS4A-SC (d=4 mm), Vorsäule AG4A-SC (d=4 mm)

Eluent: - Anionen: 1,8 mmolare Na_2CO_3 / 1,7 mmolare NaHCO_3

Flussrate: 2 ml pro Minute

Detektoren: Leitfähigkeit

Injektionsvolumen: 10 μl

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzen auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Schadstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen bei direkter Exposition der Pflanzen durchgeführt.

Die ersten Versuche erfolgten mit Phenol und 2,6-Dimethylphenol mit einer Konzentration von 30 mg/L. Im Anschluss an diese Versuche wurde mit der Verbindung 4-Chlorphenol gearbeitet, wobei die Ausgangskonzentration aufgrund ihrer höheren Persistenz auf 10 mg/L herabgesetzt wurde.

Eine sichtbare Schädigung der Pflanzen war bei diesen Konzentrationen nicht gegeben.

Die Mineralsalzlösung war während der Versuche mit 88 % bis 91 % sauerstoffgesättigt, Messungen ergaben O₂-Gehalte von 7,5 bis 8 mg/L. Die Temperatur variierte zwischen 20 und 27° C.

3.1.1 Expositionsversuche mit Phenol

Als Pflanze wurde *Phalaris arundinacea* eingesetzt.

Der Verlauf der Phenolabnahme während des Versuches wird durch Abb. 10 wiedergegeben.

Die Konzentrationsabnahme von Phenol erfolgt in den Pflanzenbehältern schneller als in der Referenz. Bereits nach 24 Stunden ist die Konzentration um die Hälfte gefallen. In den Referenzen setzt die Konzentrationsabnahme zu einem späteren Zeitpunkt ein.

Die relativ frühe Abnahme der Phenolkonzentration dürfte in dem Eintrag durch Mikroorganismen über die Pflanze begründet liegen. Trotz des Waschens der Wurzeln, ließ sich ein Eintrag nicht gänzlich ausschließen. Ein geringer Verlust an Phenol könnte außerdem auf Evapotranspiration und Inkorporation (SIQUEIRA et al. 1991) sowie auf pflanzliche Enzyme (u.a. ADLER et al. 1994, DEC u. BOLLAG 1994, BARBER et al. 1995), die möglicherweise von den Pflanzen abgegeben wurden, zurückzuführen sein.

In den Referenzbehältern wurde das Phenol aufgrund der unsterilen Bedingungen, über Lufteintrag von Mikroorganismen bzw. über Eintrag von Mikroorganismen mit der Nährlösung, abgebaut.

Wie die Referenz zeigt, ist Phenol auch ohne Einfluss von Pflanzen sehr schnell mikrobiell als C-Quelle erschließbar.

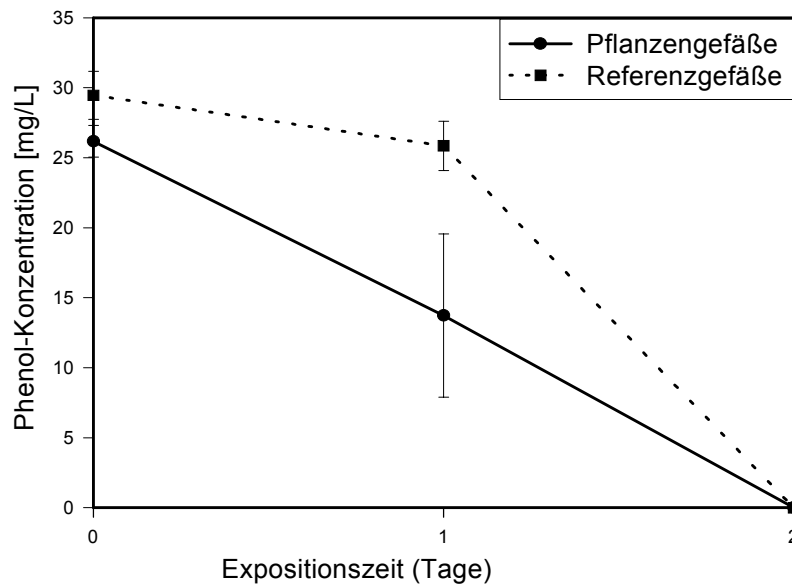


Abb. 10: Phenolabnahme in Testbehältern mit *Phalaris arundinacea* gegen eine Referenz ohne Pflanzeneinfluss; arithmetisches Mittel $\pm$ s; n = 3

Aus den Testgefäßen wurden nach Ablauf des Versuches (am zweiten Tag) Proben entnommen und auf R2A- und Selektivmedium (Nährmedium mit einem Phenolanteil von 1mmol/L) ausplattiert. Dabei zeigte sich, dass die ermittelte Zahl der Mikroorganismen in den Referenzgefäßen (und somit ohne Pflanzeneinfluss) sowohl auf dem R2A- als auch auf dem Selektivmedium um ca. eine 10er Potenz höher lag als in den Pflanzengefäßen (s. Tab. 9).

Ein Vergleich der Kolonien ließ jedoch auf eine höhere mikrobielle Diversität in den Pflanzenbehältern schließen (hier nicht dargestellt).

Tab. 9: KBE-Zahl ermittelt nach unterschiedlicher Gewichtung der 1/10 und 1/100-Verdünnungen (n=3) (nach SÜßMUTH et al. 1987)

Zellzahl	Pflanzenbehälter	Referenzbehälter
R2A-Agar	$4,1 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^6$
Selektiv (Phenol)-Agar	$1,4 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^6$

Die höhere Zahl der Mikroorganismen, die aus Aliquots der Referenzen auf dem Phenolmedium gewonnen wurden, sind ein Indiz dafür, dass pflanzliche Substanzen auf den mikrobiellen Phenolabbau keinen signifikanten Einfluss ausüben.

Theoretisch könnte die ermittelte höhere KBE-Zahl in den Referenzbehältern aber auch darin begründet liegen, dass die Mikroorganismen die Wurzeln als Aufwuchsmöglichkeit nutzten und sich somit an und auf der Wurzel konzentrierten. Dadurch lägen sie im schadstoffbelastetem Wasser nicht gleichmäßig verteilt vor und würden somit auch bei der Probennahme nicht erfaßt. Eine einsetzende Schleimbildung bei Phenoldauerexposition der Pflanzen verstärkten diesen Eindruck. Dabei zeigten mikroskopische Untersuchungen, dass die Verschleimung auf Scheidenbakterien zurückzuführen war (s. Abb. 11).

Unabhängig davon, welche der beiden Varianten zutrifft, zeigte der Versuch, dass die von *Phalaris arundinacea* über die Wurzeln freigesetzten pflanzlichen Substanzen keinen signifikanten Einfluss auf den mikrobiellen Abbau von Phenol hatten. Nach Einsetzen des mikrobiellen Abbaues in der Referenz, war ein beschleunigter Abbau in den Pflanzenansätzen, im Vergleich zur Referenz, nicht gegeben.

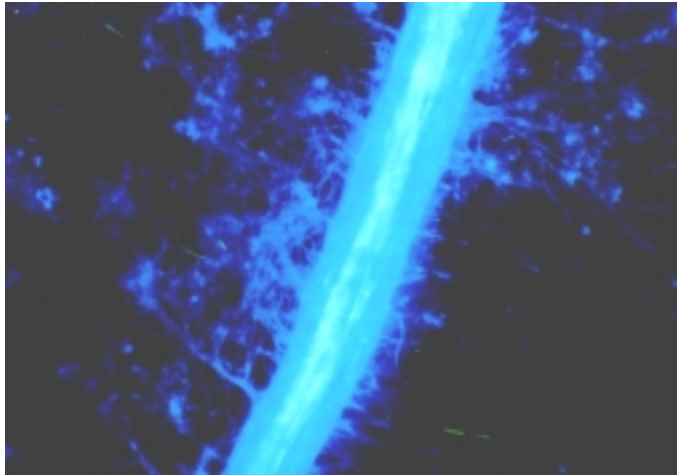
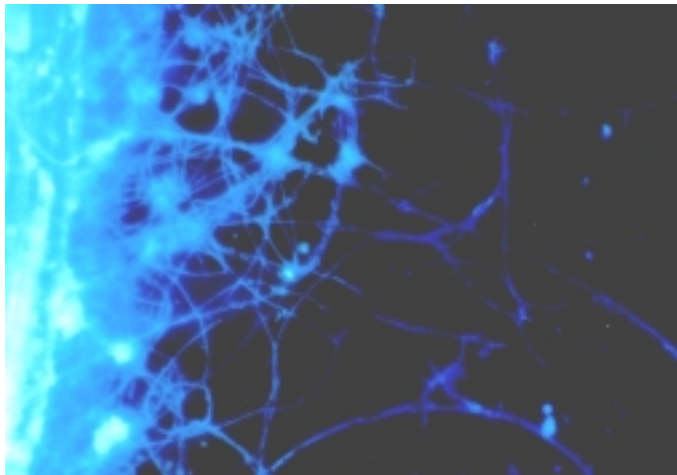
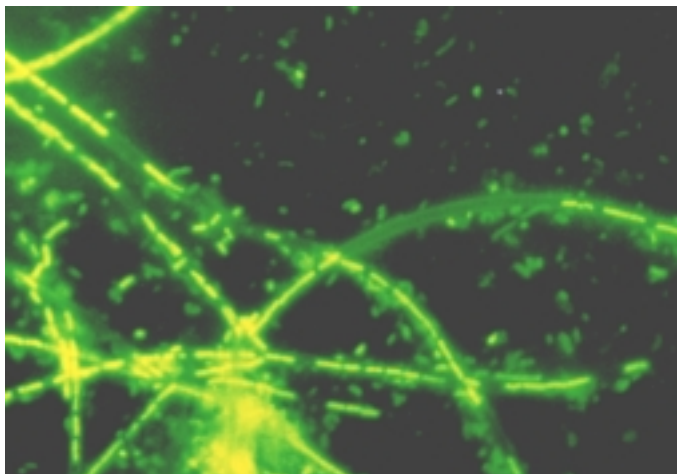
a.**b.****c.**

Abb. 11: Scheidenbakterien auf der Wurzel einer phenolexponierten *Phalaris arundinacea*-Pflanze. Die mikrobiologischen Untersuchungen (s. P. 2.5) lassen auf die Art *Burkholderia cepacia* schließen. (**a**: DAPI-Färbung, 100 x vergrößert; **b**: DAPI-Färbung, 250 x vergrößert, **c**: Pico green Färbung, 1000 x vergrößert)

3.1.2 Expositionsversuche mit 2,6-Dimethylphenol

2,6-Dimethylphenol erwies sich bei Vorversuchen im Vergleich zu Phenol als weniger schnell bakteriell abbaubar. Daher war für 2,6-Dimethylphenol eher ein Einfluss pflanzlicher Substanzen zu erwarten. Der für Phenol beschriebene Versuch (3.1.1) wurde somit mit 2,6-Dimethylphenol als Testsubstanz wiederholt. Abb. 12 zeigt, dass die Substanz schwerer abbaubar ist als Phenol. Die Verbindung ist auch nach 14 Tagen nur annähernd zur Hälfte eliminiert. Ein positiver Einfluss der Pflanzen (*Phalaris arundinacea*) auf die Konzentrationsabnahme läßt sich jedoch nicht zeigen. Zu Beginn setzt die Konzentrationsabnahme in den Pflanzenbehältern scheinbar schneller ein. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Vom fünften bis dreizehnten Tag verläuft die Schadstoffkonzentrationsabnahme in beiden Testvarianten gleich. Vom dreizehnten Tag an stellt sich ein Unterschied zugunsten der Referenzgefäße ein. Die Konzentrationsabnahme in den Pflanzengefäßen kommt zum Erliegen. Dies könnte theoretisch auf die unterschiedliche Nährstoffverfügbarkeit für die Mikroorganismen zurückzuführen sein, in der Annahme, dass ein Teil der Nährstoffe von den Pflanzen aufgenommen und damit den Mikroorganismen entzogen wurde. Eine ionenchromatographische Analyse der Makronährelemente zeigt jedoch, dass zumindest diese ausreichend für Mikroorganismen zur Verfügung standen (s. Tab. 10). Zwar ist die NH_4 -Konzentration in den Pflanzenbehältern sehr gering, dennoch dürfte, aufgrund der Fähigkeit der meisten Mikroorganismen NO_3 zu reduzieren, Stickstoff kein limitierendes Element gewesen sein. Somit könnte ein Mangel an Spurenelementen infolge der Pflanzenaufnahme oder die hemmende Wirkung bakterizider pflanzlicher Substanzen auf die Abbauer als Ursache in Frage kommen.

Versuche mit *Carex gracilis* Pflanzen führten in der Tendenz zu gleichen Ergebnissen (hier nicht dargestellt). Es konnte erneut kein positiver Einfluss der Pflanzen auf den Abbau der Testschadstoffe Phenol und 2,6-Dimethylphenol festgestellt werden.

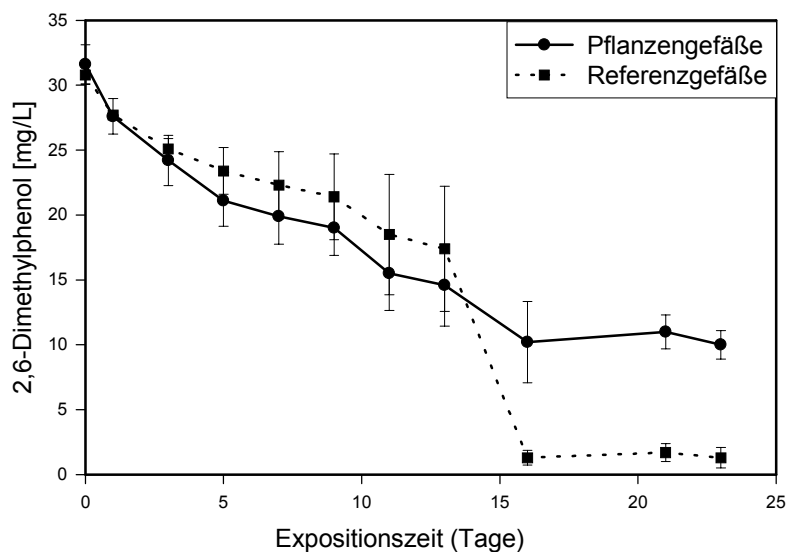


Abb. 12: 2,6-Dimethylphenolabnahme in Testbehältern mit *Phalaris arundinacea* gegen eine Referenz ohne Pflanzeneinfluss; arithmetisches Mittel $\pm$ s; n = 3

Tab. 10: Konzentration der Makroelemente (mg/L) in den Testgefäßen beim Versuch zum 2,6-Dimethylphenol-Abbau am 16ten Versuchstag

	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Pflanzen	1,6	102,9	117,2	1088,3	5,4	0,1	247,8	43,3	233,6
Referenz	2,4	144,9	101,0	965,3	2,8	26,7	267,4	27,1	169,7

3.1.3 Expositionsversuche mit 4-Chlorphenol

Die Abbauprobversuche mit 4-Chlorphenol erfolgten mit einer Ausgangskonzentration von 10 mg pro Liter.

Bei dieser Substanz war ein deutlicher Einfluss der Pflanzen erkennbar (s. Abb.13). Schon nach 3 Tagen ist die Ausgangssubstanz in den Pflanzenbehältern nicht mehr nachweisbar. Da cometabolische Prozesse für persistente Verbindungen in der Umwelt von Bedeutung sind, und ein cometabolischer Abbau für bestimmte Mikroorganismen für die Verbindung 4-Chlorphenol beschrieben ist, wurden unter Punkt 3.3 entsprechende Versuche zur Wirkung pflanzlicher Substanzen als Cosubstrat durchgeführt. Die Funktion pflanzlicher Substanzen als Cosubstrat für Bakterien könnte den beschleunigten Abbau in den Pflanzengefäßen erklären.

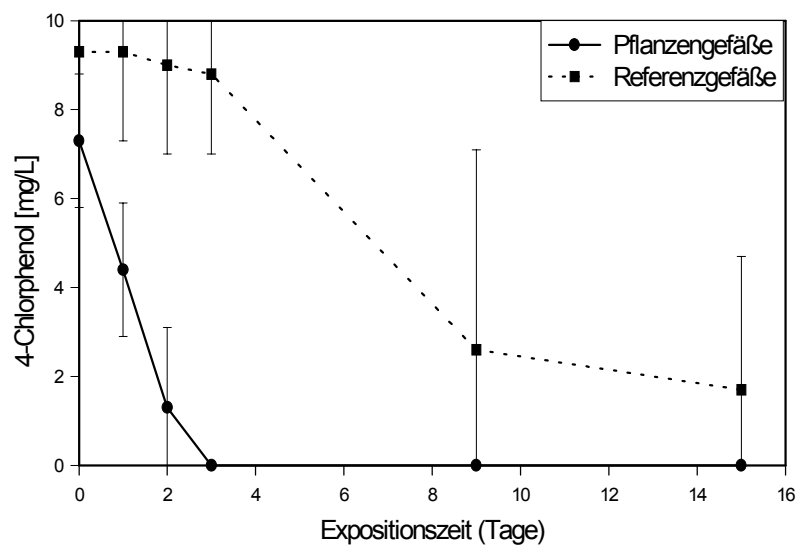


Abb. 13: 4-Chlorphenolabnahme in Testbehältern mit *Phalaris arundinacea* gegen eine Referenz ohne Pflanzeneinfluss; arithmetisches Mittel $\pm$ s; n = 3

3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Wurzelabscheidungen auf schadstoffabbauende Bakterien

Die unter Punkt 3.1 dargestellten Versuche stellen eine umweltrelevante Bedeutung pflanzlicher Stoffe für den Abbau von Xenobiotika, die relativ leicht mikrobiell erschließbar sind (hier Phenol und 2,6-Dimethylphenol), in Frage.

Zur Absicherung dieser Hypothese wurden Versuche mit 2,6-Dimethylphenol und zuvor angereicherten Abbauern (s. P. 2.3.2.3) unter Einfluss von pflanzlichen Abscheidungen durchgeführt.

Die Versuche erfolgten in einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem und in batch-Kulturen.

Mit dieser Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, ob pflanzliche Substanzen einen beschleunigenden bzw. verzögernden Einfluss auf das Abbauverhalten haben.

3.2.1 Versuche mit einem kontinuierlich durchflossenen Testsystem

Die Versuche mit dem kontinuierlich durchflossenen Testsystem erfolgten bei Raumtemperaturen zwischen 19° und 24° C. Die Sauerstoffsättigung in den Rührreaktoren lag während der Testreihen zwischen 77 und 100 Prozent.

Die Durchführung des Versuches erwies sich als sehr schwierig (s. P. 4.2.1). Es war eine Vielzahl von Vorversuchen erforderlich, bevor mit dem System vergleichende Untersuchungen zur Referenz (Testsystem ohne Pflanzen) durchgeführt werden konnten.

Abb. 14 zeigt den Konzentrationsverlauf bei einer Anfangskonzentration von 20 mg/L. Für diese Versuchsreihe erfolgten die Untersuchungen zweier paralleler Testreaktoren unter Pflanzeneinfluss gegen eine Referenz.

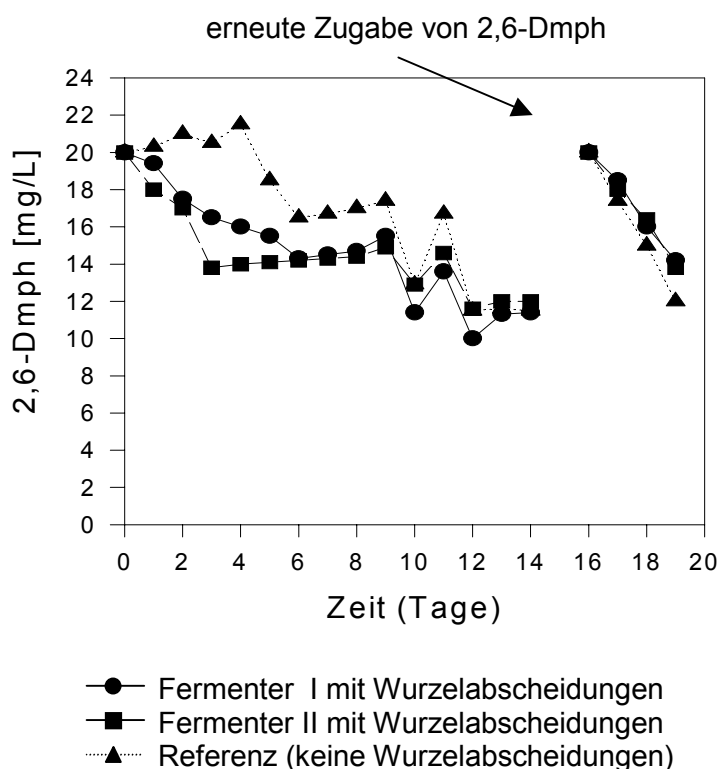


Abb. 14: Untersuchungen zum 2,6-Dimethylphenol (2,6-DmPh)-Abbau in kontinuierlich durchflossenen Testfermentern. Die Untersuchungen erfolgten mit zwei Fermentern (G2, s. Abb. 8, S. 33) unter Einfluss von Wurzelabscheidungen gegen eine Referenz (kein Einfluss von Wurzelabscheidungen).

Mit Ausnahme eines unterschiedlichen Konzentrationsverlaufs in den ersten vier Tagen, in denen die Konzentration des Schadstoffes in den Fermentern unter Pflanzeneinfluss niedriger liegt, ist kein signifikanter Einfluss der Wurzelabscheidungen

gegenüber der Referenz erkennbar. Der Unterschied zu Beginn kann durch drei Faktoren beeinflusst sein:

1. die Mikroorganismenzahl war im Referenzgefäß geringer, da eine höhere Anzahl an Mikroorganismen ausgewaschen wurde: Die höhere Auswaschungsrate (s. Tab. 11) ist auf die fehlende Pflanzentranspiration in der Referenz zurückzuführen, denn dadurch steigt der Volumenwechsel im Fermenter. Im Gegensatz zum ausgeschwemmten Schadstoff, der über die Einspritzpumpe kompensiert wird, nimmt die Bakterienzahl ab. Die ermittelten Zellzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Versuchsdurchführung (s. Tab. 12) lassen jedoch nicht auf diese Erklärung schließen;
2. die Zudosierung über die Einspritzpumpe war in der Referenz zu hoch: Über die Einspritzpumpe wird zur Kompensation des ausgewaschenen Schadstoffes, mit einem geringen Volumen eine relativ hohe Konzentration des 2,6-Dimethylphenols zudosiert (z.B. 2,5 mg in 50 µl pro Stunde). So können schon geringe Abweichungen bei der Berechnung der zuzugebenen Menge über die Einspritzpumpe zu Konzentrationsverschiebungen führen. Nicht gänzlich auszuschließen sind Fehler bei der Zudosierung mit der Einspritzpumpe durch falsches Aufziehen des Schadstoffes in die Spritze oder durch das Vorhandensein von Luftblasen durch Undichtigkeiten der Spritze;
3. die Pflanzen hatten in der Startphase einen abbaubeschleunigenden Einfluss auf die Mikroorganismen.

Tab. 11: Mittlere theoretische Verweilzeit (Stunden) in dem kontinuierlich betriebenen Testsystem; (arithmetisches Mittel $\pm$ s; n = 18)

nach Passage des Pflanzenbehälters (G2)		Referenz (G2)
Fermenter I	Fermenter II	
110,6 $\pm$ 9,4	105,7 $\pm$ 8,2	78,6 $\pm$ 3,5

Die mittleren theoretischen Verweilzeiten wurden während der Versuchsdurchgänge zu jedem Messzeitpunkt anhand der Durchflussraten (ml/h) ermittelt

Vom 6. bis zum 19. Tag waren die Kurvenverläufe nahezu identisch. Dem entsprach auch die Entwicklung der Zellzahlen (s. Tab. 12). Ein Einfluss der durch die Pflanzen eingebrachten Substanzen war nicht erkennbar. Dieser war auch mittels DOC-Messungen nicht nachweisbar. Die gemessenen Werte wiesen zwischen den beiden Testvarianten keine signifikanten Unterschiede auf. Der mögliche Pflanzeneintrag an in Wasser löslichen Kohlenstoffverbindungen ist zu gering, um gegenüber den durch

das 2,6-Dimethylphenol sowie dessen mikrobielle Abbauprodukte eingetragenen DOC-Mengen von Gewicht zu sein.

Tab. 12: Ermittelte Zellzahlen/ml im kontinuierlich betriebenen Testsystem bei einer Ausgangskonzentration von 20 mg/L 2,6-Dimethylphenol

	Beginn	nach 3 Tagen	nach 16 Tagen
Fermenter I mit Pflanzeneinfluss	$4,6 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^8$
Fermenter II mit Pflanzeneinfluss	$5,2 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$
Referenzfermenter	$2,2 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8$

3.2.2 Versuche zum Einfluss von Wurzelabscheidungen auf schadstoffabbauende Bakterien in batch-Kulturen

Die Untersuchungen wurden nach Gewinnung der Abscheidungen unter Ausschluss der Pflanzen in batch-Kulturen fortgesetzt. Die Testgefäße enthielten Wurzelabscheidungen, deren Kohlenstoff-Konzentrationen durch DOC-Messungen ermittelt wurden (s. P. 2.3.2.2).

Die ersten Versuche mit *Carex gracilis* ließen einen signifikanten Einfluss auf die adaptierte Anreicherungskultur vermuten. Für die Schadstoffausgangskonzentration von ca. 6 mg/L war dieser nach 24 Stunden (t-Test; $\alpha = 0,01$) und für die Konzentration von ca. 0,8 mg/L nach 14,5 Stunden (t-Test; $\alpha = 0,2$) gegeben (s. Abb. 15 u. 16).

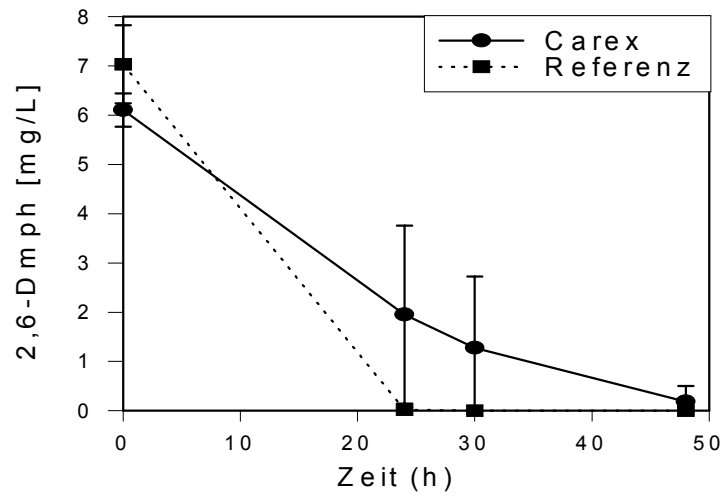


Abb. 15: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Carex gracilis* auf den 2,6-Dimethylphenol (2,6-Dm ph)-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 3 Tage

Inokulum: 5 Vol.-%

DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 2,9 mg/L

DOC-Wert in Referenz: ca. 1,5 mg/L

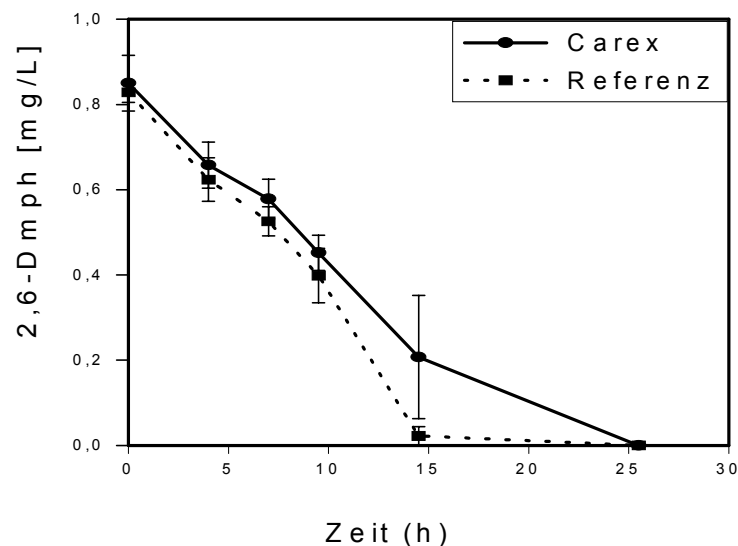


Abb. 16: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Carex gracilis* auf den 2,6-Dimethylphenol-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 3 Tage

Inokulum: 5 Vol.-%

DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 3,0 mg/L

DOC-Wert in Referenz: ca. 1,5 mg/L

Die Vermutung, dass dieser Effekt auf eine pH-Wert Absenkung zurückzuführen war, die aus dem Eintrag der Wurzelabscheidungen resultierte - die pH-Werte fielen zum Teil um mehr als eine Einheit - wurde mit einem weiteren Versuch, bei dem die pH-Werte an die Referenz angeglichen wurden, bestätigt (s. Abb. 17 und 18).

Im Anschluss an die in Abb. 15 bis 18 dargestellten Versuche wurden als weitere Pflanzen *Phalaris arundinacea* und *Scirpus lacustris* auf einen möglichen Einfluss auf den Schadstoffabbau getestet. Auch hier war nach Angleichung der pH-Werte trotz der relativ hohen DOC-Konzentrationen (5,7 und 9,2 mg/L) kein Einfluss erkennbar (s. Abb. 19 und 20).

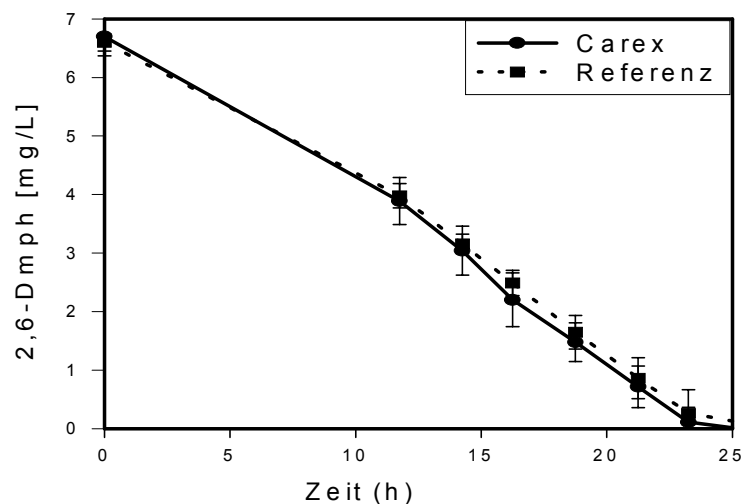


Abb. 17: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Carex gracilis* auf den 2,6-Dimethylphenol-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur (nach Angleichung der pH-Werte an die Referenz); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 4 Tage
DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 5,7 mg/L

Inokulum: 5 Vol.-%
DOC-Wert in Referenz: ca. 0,7 mg/L

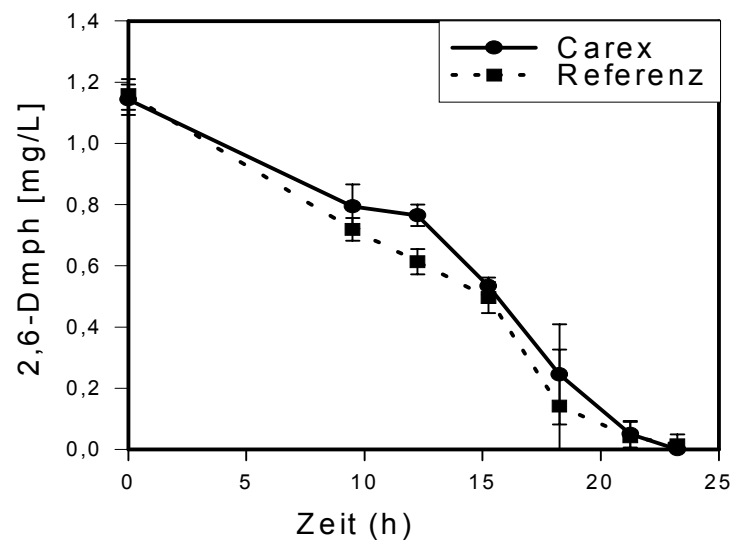


Abb. 18: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Carex gracilis* auf den 2,6-Dimethylphenol-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur (nach Angleichung der pH-Werte an die Referenz); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 2 Tage
DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 4,1 mg/L

Inokulum: 5 Vol.-%
DOC-Wert in Referenz: ca. 1,1 mg/L

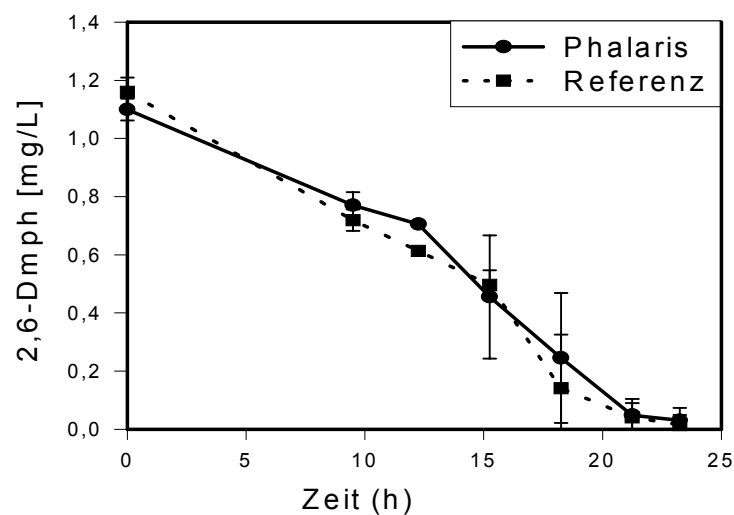


Abb. 19: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Phalaris arundinacea* auf den 2,6-Dimethylphenol-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur (nach Angleichung der pH-Werte an die Referenz); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 2 Tage
DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 5,7 mg/L

Inokulum: 5 Vol.-%
DOC-Wert in Referenz: ca. 1,1 mg/L

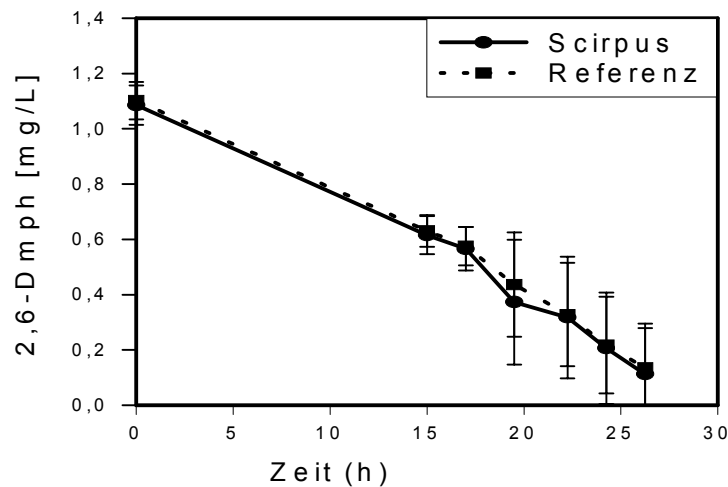


Abb. 20: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Scirpus lacustris* auf den 2,6-Dimethylphenol-Abbau einer adaptierten Anreicherungskultur (nach Angleichung der pH-Werte an die Referenz); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=5

Versuchsbedingungen

Verweilzeit der Pflanzen in Nährlösung: 3 Tage

Inokulum: 5 Vol.-%

DOC-Wert in Pflanzenbehältern: ca. 9,2 mg/L

DOC-Wert in Referenz: ca. 0,9 mg/L

Die unter 3.1 und 3.2 beschriebenen Versuche lassen zusammenfassend die Schlussfolgerung zu, dass bei Repräsentativität der eingesetzten Pflanzen und bei Repräsentativität der Schadstoffe Phenol und 2,6-Dimethylphenol für „mäßig abbaubare“ Substanzen, ein Einfluss von Wurzelabscheidungen auf potenzielle Abbauer eher unwahrscheinlich ist. Diese Aussage gilt unter Praxisbedingungen zumindest für Böden, für die pH-Wert Verschiebungen aufgrund der Wurzelabgaben auszuschließen sind.

Anders stellt sich die Situation für 4-Chlorphenol dar, welches eine relativ persistente Verbindung ist, für die cometabolische Prozesse von Bedeutung sein könnten.

Punkt 3.3 beleuchtet die mögliche Rolle pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für den cometabolischen Abbau dieser Verbindung.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für cometabolische Abbaureaktionen

Die Versuche unter Punkt 3.1 zeigen einen Einfluss der Pflanzen bei der Metabolisierung der relativ persistenten Verbindung 4-Chlorphenol (s. P. 3.1.3). Dieser könnte zum einen auf einen Eintrag von 4-Chlorphenol-abbauenden Mikroorganismen über die Pflanze zurückzuführen sein und des Weiteren auf die Wirkung pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für cometabolische Abbauprozesse.

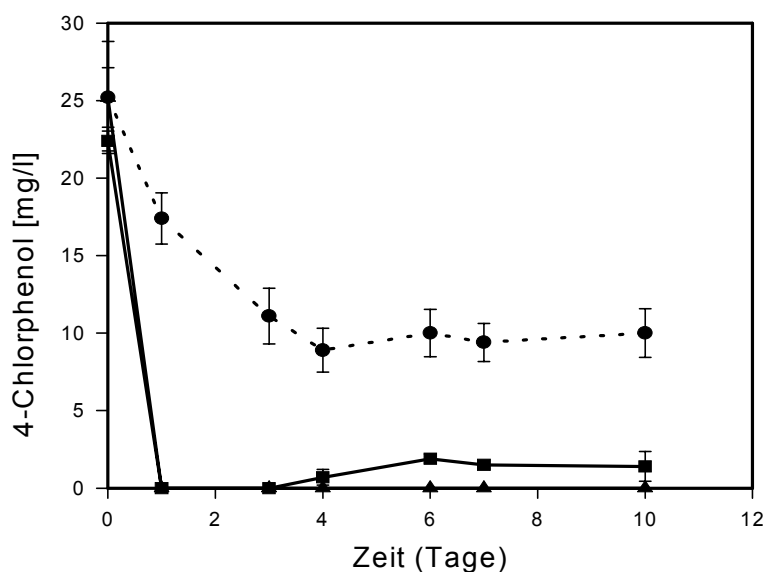
3.3.1 Untersuchungen mit *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) zum cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol

Für die Verbindung 4-Chlorphenol wird für bestimmte Mikroorganismen ein cometabolischer Abbau beschrieben (u.a. SÁEZ u. RITTMANN 1993, BAE et al. 1996, HILL et al. 1996, LOH u. WANG 1998). HILL et al. (1996) zeigten für *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) den cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol bei Zugabe von Phenol als Wachstumssubstrat.

Die folgenden Versuche überprüfen die Eignung pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat für diesen Mikroorganismus.

Zu Beginn der Testreihe wurde in einem Vorversuch von *Phalaris arundinacea* gewonnenes Wurzelhomogenat, das einem Trockengewicht von ca. 350 mg/L entsprach, als Wachstumssubstrat für den eingesetzten Mikroorganismus getestet. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss der pflanzlichen Substanzen auf die Eliminierung des 4-Chlorphenols (s. Abb. 21). Dabei stieg die Bakterienzahl mit Abnahme des 4-Chlorphenols (s. Anhang, Tab. A-5a).

Die 4-Chlorphenol enthaltende Testlösung verfärbte sich während des Versuches grün. Diese Färbung sowie die mit dem UV-Vis Spektralphotometer gemessenen Absorptionsspektren, weisen auf den Intermediaten 2-Hydroxy-5-chlormuconatsemialdehyd hin (s. Punkt 3.4). Des Weiteren wird der 4-Chlorphenol-Metabolit als „dead end product“ für den cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol beschrieben (SÁEZ u. RITTMANN 1991).



—●— 4-CP (Referenz), —■— 4-CP + Wurzelhomogenat, —▲— 4-CP + Ph

Abb. 21: Einfluss pflanzlicher Substanzen beim cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol (4-CP) durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) - Phenol (Ph)-Konzentration: 100 mg/L; pflanzliches Homogenat: ca. 350 mg TG der Pflanze/L; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n = 3

Nachdem mit der Wurzelsuspension ein Einfluss pflanzlicher Substanzen auf den Abbau gezeigt werden konnte, folgten weitere Messungen mit Wurzelabscheidungen (Gewinnung s. P. 2.3.2.2). Für die Versuche wurde die Abbaubarkeit der 4-Chlorphenolkonzentrationen mit 2 und 5 mg/L bei verschiedenen Wurzelabscheidungskonzentrationen bzw. DOC-Konzentrationen untersucht.

4-Chlorphenol konnte bei einer Konzentration von 2 mg/L mit den eingesetzten DOC-Konzentrationen (3,6 und 12 mg/L DOC) vollständig transformiert werden. Dabei zeigt sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (Berechnung s. P. 2.5.2) mit Zunahme der DOC-Werte ansteigen (k_1 bei $t_1 = 5$ h; $t_2 = 29$ h) (s. Abb. 22; 4-CP-Konzentrationen zu den Zeiten t_1 und t_2 , s. Anhang Tab A-5b).

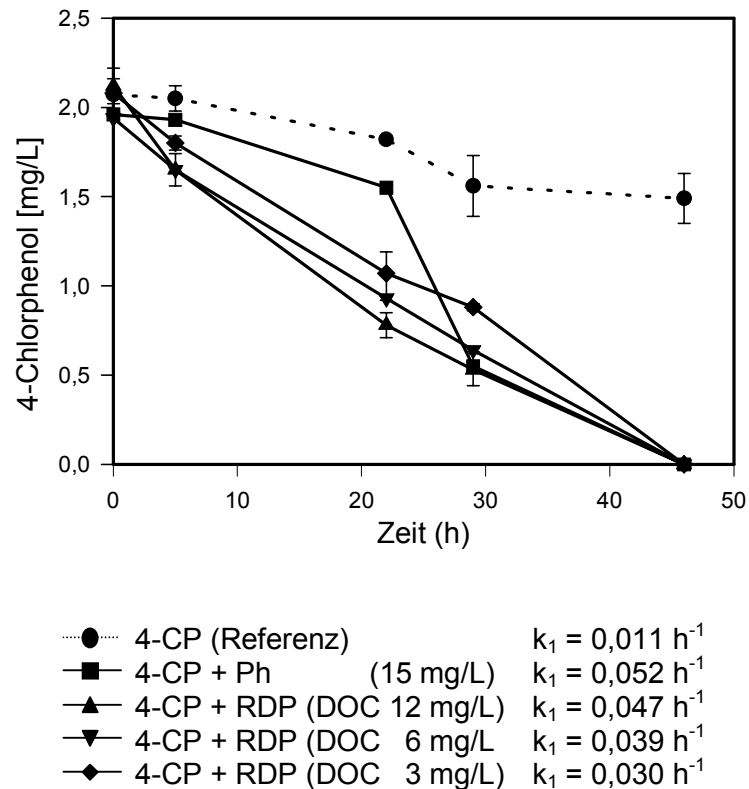


Abb. 22: Einfluss der Rhizodepositionsprodukte (RDP) auf den Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536). Für die einzelnen Varianten ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (k_1) bei $t_1 = 5$ h und $t_2 = 29$ h angegeben; arithmetisches Mittel $\pm$ s, $n=3$

Bei einer Konzentration von 5 mg/L 4-Chlorphenol (Abb. 23) war der Kohlenstoffeintrag von 3, 6 und 12 mg/L für den vollständigen 4-Chlorphenol-Abbau nicht ausreichend. Der Eintrag von 3 und 6 mg/L DOC wies nur einen geringfügigen Unterschied zur Referenz auf. Mit einer Konzentration von 12 mg/L wurde ein 52prozentiger Abbau der Verbindung erzielt. Erst bei einem DOC von 24 mg/L wurde das 4-Chlorphenol vollständig umgesetzt.

Bei den Versuchsreihen mit 4-Chlorphenol als alleinige Kohlenstoffquelle (Referenz) kam es ebenfalls zu geringen Konzentrationsabnahmen. Ursache hierfür ist die verwendete Nährlösung, die nicht gänzlich frei von Kohlenstoffverunreinigungen ist. So wurde für die Nährlösung zum einen ein DOC von durchschnittlich 0,83 mg/L gemessen und zum anderen ist ein Phenoleintrag aufgrund der Vorkultivierung trotz Waschens der Bakterienkultur mit physiologischer Kochsalzlösung nicht absolut auszuschließen (für den Vorversuch mit Wurzelhomogenat wurde die Bakterienkultur nicht gewaschen, womit der besonders auffallende 4-Chlorphenol-Rückgang in der Referenz erklärbar ist). Geringe Konzentrationsabnahmen des 4-Chlorphenols

können außerdem auf Autoxidation endogener Reserven der über das Inokulum eingebrachten Bakterien zurückzuführen sein (s. hierzu auch Diskussionsp. 4.3). Die Bestimmung der Bakterienzahlen in den Versuchsreihen verdeutlicht, dass die Abnahme der 4-Chlorphenolkonzentration auf mikrobiologische Aktivität zurückzuführen ist und nicht auf abiotischen Effekten beruht. In dem in Abb. 23 dargestellten Versuch stieg die Mikroorganismenzahl bei der Versuchsreihe mit Wurzelabscheidungen mit einem DOC von 24 mg/L auf das 90fache, in der Kontrolle jedoch nur um das 7fache der Ausgangszellzahl an (s. Anhang, Tab. A-5c).

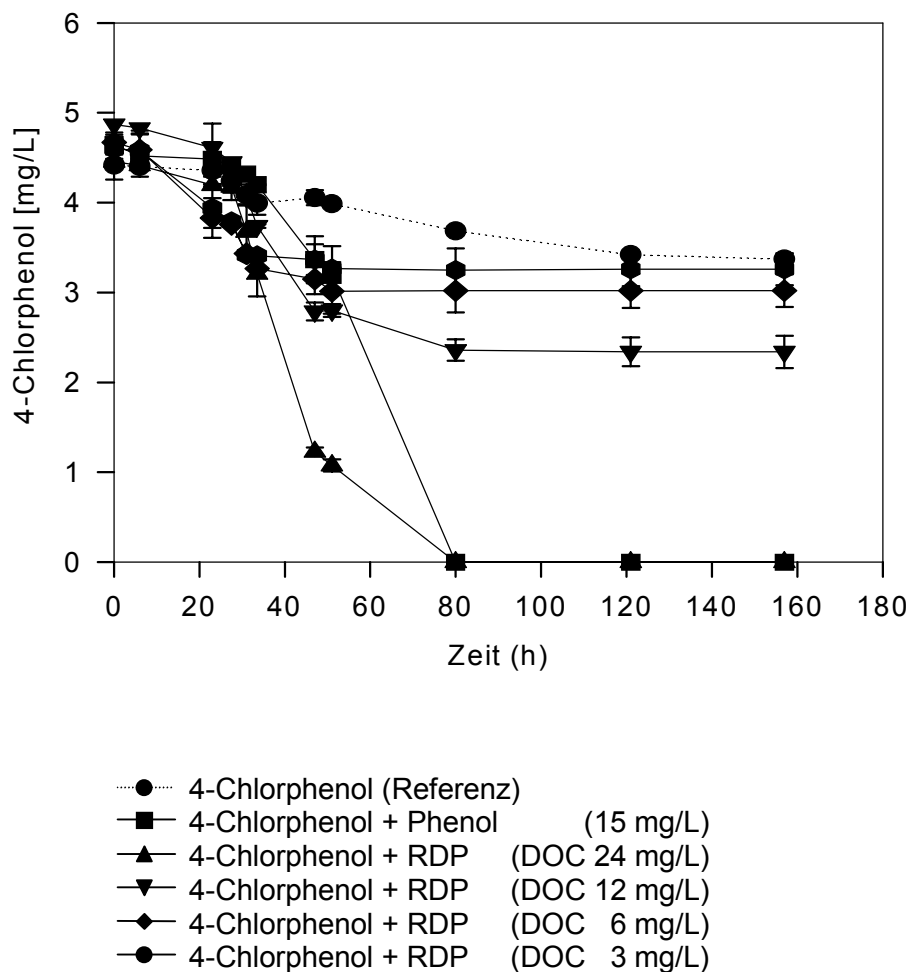


Abb. 23: Einfluss von Rhizodepositionsprodukten (RDP) auf den Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

Wurzelabscheidungen von Rohrglanzgras (*Phalaris arundinacea*) zeigten einen positiven Einfluss auf den Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536). Die Bakterienart kann die Wurzelabscheidungen als Wachstumssub-

strat verwerten und somit wird ein Abbau bzw. die Transformation dieser Substanz durch die Abscheidungen ermöglicht.

3.3.2 Versuche mit wurzelassoziierten Bakterien

In weiteren Versuchen wurden wurzelassoziierte Bakterien verwendet.

Die Versuche wurden zu Beginn mit einer von Rohrglanzgras-Wurzeln isolierten Mischkultur durchgeführt. Als Schadstoffkonzentration wurden 2,5 mg/L 4-Chlorphenol vorgegeben. Die von Rohrglanzgras gewonnenen Wurzelabscheidungen wurden mit einer DOC-Konzentration von 12 mg/L und 4 mg/L eingesetzt.

Bei der DOC-Konzentration von 12 mg/L konnte der Schadstoff durch die Mischkultur 100prozentig transformiert werden (s. Abb. 24). Der Abbau verlief im Vergleich zur Variante mit Phenol (15 mg/L) als Wachstumssubstrat jedoch viel langsamer. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante betrug bei Phenol als Wachstumssubstrat $0,15 \text{ h}^{-1}$ und im Vergleich dazu die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante mit Wurzelabscheidungen $0,02 \text{ h}^{-1}$ (k_1 bei $t_1 = 6 \text{ h}$; $t_2 = 24 \text{ h}$). Bei diesem Versuch korrelierte die Abnahme der 4-Chlorphenolkonzentration mit einer steigenden Bakterienzahl (4-CP-Konzentrationen und Zellzahlen, siehe Anhang Tab. A-5d).

Außerdem war zu beobachten, dass die Färbung der Nährlösung (grün-gelb), die auf den gebildeten Intermediaten 2-Hydroxy-5-chloromuconatsemialdehyd zurückzuführen sein dürfte, langsam wieder abnahm. Dies läßt auf mögliche synergistische Effekte oder aber auf vollständigen meta-Abbau schließen (s. hierzu auch Punkt 4.3).

Bei einem DOC von nur 4 mg/L konnte kein Abbau des Schadstoffes durch die Mischkultur beobachtet werden. Wie zuvor gezeigt, erfolgte bei den Versuchen mit *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) bei einer Schadstoffkonzentration von 5 mg/L und einer DOC-Konzentration von 6 bzw. 3 mg/L ebenfalls kein cometabolischer Abbau mit Wurzelabscheidungen als Wachstumssubstrat. Dies könnte auf eine Inhibition des cometabolischen Abbaues durch 4-Chlorphenol zurückzuführen sein. Auf die Bedeutung ausgewogener Verhältnisse von Wachstumssubstrat zu Cometa-bolit wird insbesondere von SÁEZ u. RITTMANN (1993) verwiesen (s. auch P. 4.3).

Aus der wurzelassoziierten Bakterienmischkultur konnten drei Isolate gewonnen werden, mit denen die Versuche wiederholt wurden.

Indem die Versuche mit jeweils einzelnen Bakterienarten durchgeführt wurden, waren synergistische Effekte beim Abbau des 4-Chlorphenols auszuschließen und dessen Eliminierung leichter cometabolischen Prozessen zuschreibbar.

Die Versuche mit diesen isolierten Bakterienarten ermöglichten jedoch keine Transformation des 4-Chlorphenols. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass das abbauende Bakterium nicht als Isolat gewonnen wurde.

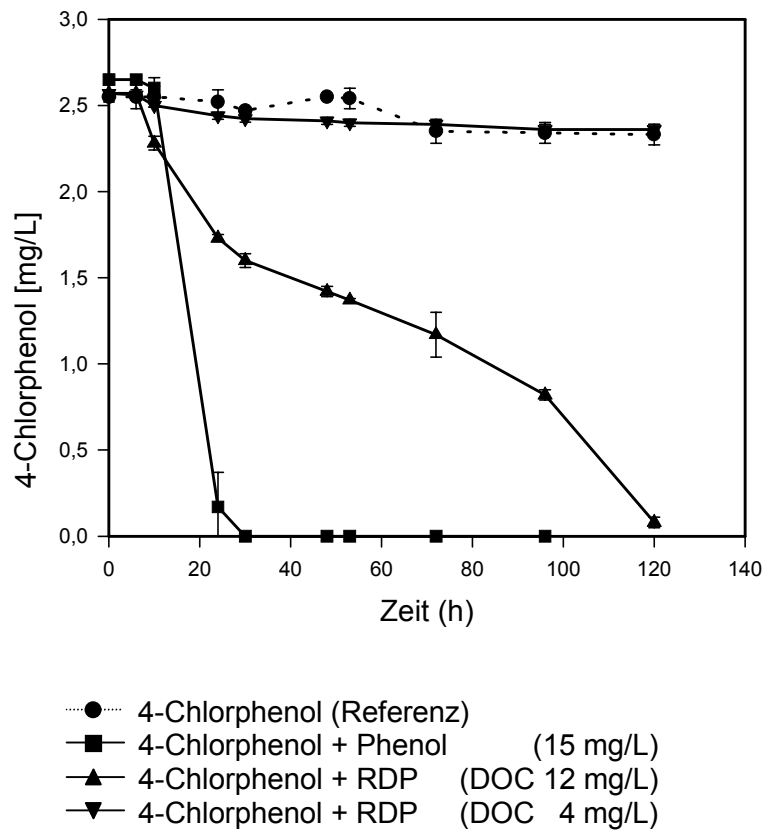


Abb. 24: Einfluss von verschiedenen Wachstumssubstraten (Phenol u. Rhizodepositionsprodukte) auf den 4-Chlorphenol-Abbau mit einer von *Phalaris arundinacea* isolierten Mischkultur; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

3.3.3 Untersuchungen mit den wurzelloziierten Bakterien *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp.

Die Versuche wurden deshalb mit weiteren Bakterien, die zuvor von einer unbelasteten *Phalaris* wurzel isoliert (s. P. 2.4 u. P. 3.5) und anschließend auf Phenolwachstum getestet wurden, fortgesetzt.

Insgesamt konnten 6 Isolate gewonnen werden, die Phenol als C-Quelle nutzten. Hiervon wiederum konnten 4 Isolate Phenol als Cosubstrat für die Metabolisierung von 4-Chlorphenol nutzen. Zwei dieser Isolate konnten als *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. identifiziert werden (s. P. 4.4) und wurden aufgrund ihrer guten

Wachstumseigenschaften für die Versuche zum Abbau von 4-Chlorphenol eingesetzt.

Abb. 25 zeigt, dass die von der *Phalaris*-wurzel isolierten Stämme *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. 4-Chlorphenol bei einer Konzentration von ca. 10 mg/L als alleinige C-Quelle, analog zu dem von der DSMZ bezogenen Stamm *Ralstonia eutropha*, nicht verwerten können. Unter Zugabe von Phenol (50 mg/L) wird 4-Chlorphenol dagegen metabolisiert.

Nachdem somit für diese Stämme die Funktion von Phenol als Wachstumssubstrat gezeigt werden konnte, wurde auch für *Acinetobacter baumannii* und dem *Ralstonia* sp. Isolat die Eignung pflanzlicher Substanzen als Wachstumssubstrat untersucht. Dafür wurde 4-Chlorphenol mit einer Ausgangskonzentration von ca. 2 mg/L und Wurzelabscheidungen von *Phalaris arundinacea* mit einem DOC-Wert von 10 mg/L eingesetzt. Diese Anteile wurden gewählt, da die vorherigen Versuche mit *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) eine vollständige Eliminierung des 4-Chlorphenols bei einem Verhältnis von 1 : 5 zeigten.

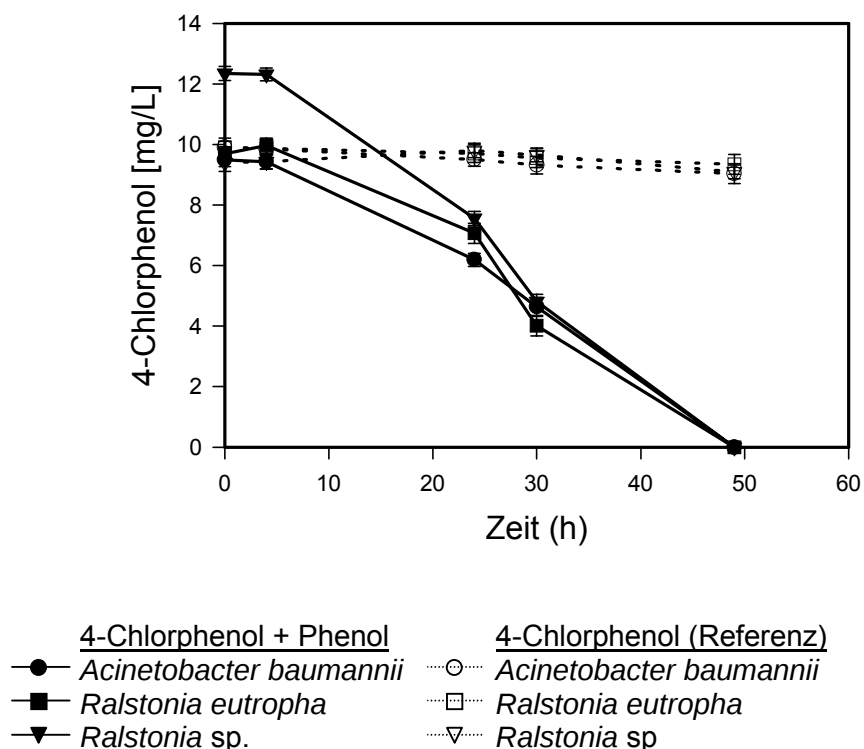
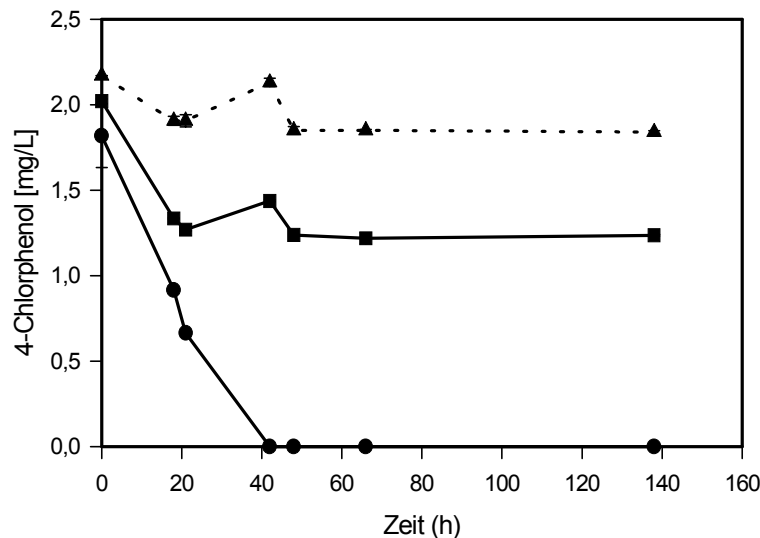


Abb. 25: 4-Chlorphenol-Transformation bei Zugabe von Phenol (50 mg/L) als Wachstums-substrat durch die von *Phalaris arundinacea* gewonnenen Isolate *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. und durch den Referenzstamm *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) (durchgehende Linie). Die Referenz beinhaltet als alleinige C-Quelle 4-Chlorphenol (gestrichelte Linie); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

In Abb. 26 ist dargestellt, dass der *Ralstonia* sp. Stamm 4-Chlorphenol unter diesen Bedingungen vollständig metabolisiert, während *Acinetobacter baumannii* das 4-Chlorphenol nur etwa bis zur Hälfte der Ausgangskonzentration umsetzt. Ein Phenoleintrag über die Vorkultivierung ist auszuschließen. Eine vorherige Messung mit der HPLC stellte dies sicher.



—●— *Ralstonia* sp., —■— *Acinetobacter baumannii*, —▲— 4-Chlorphenol (steril)

Abb. 26: Einfluss der Wurzelabscheidungen von *Phalaris arundinacea* (DOC=10mg/L) auf den 4-Chlorphenol-Abbau durch pflanzenassoziierte Mikroorganismen (arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3)

3.3.4 Wurzelabscheidungen verschiedener Helophyten in ihrer Wirkung als Wachstumssubstrat für den 4-Chlorphenol-Abbau

Für *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. wurde im Folgenden die Eignung der Wurzelabscheidungen der Helophyten *Carex gracilis*, *Phragmites australis* und *Scirpus lacustris* als Wachstumssubstrat für den 4-Chlorphenol-Abbau getestet. Davon ausgehend, dass es qualitative Unterschiede bei der Rhizodeposition der verschiedenen Pflanzenarten gibt, waren unterschiedliche Abbaukinetiken aufgrund unterschiedlicher Verfügbarkeit der Wurzelabscheidungen für Mikroorganismen zu erwarten. So konnte z.B. durch die Verwendung von Natriumacetat als Wachstumssubstrat gezeigt werden, dass es leichter als C-Quelle nutzbar ist als die Wurzelabscheidungen (vergleiche Abb. 26 und Abb. 27).

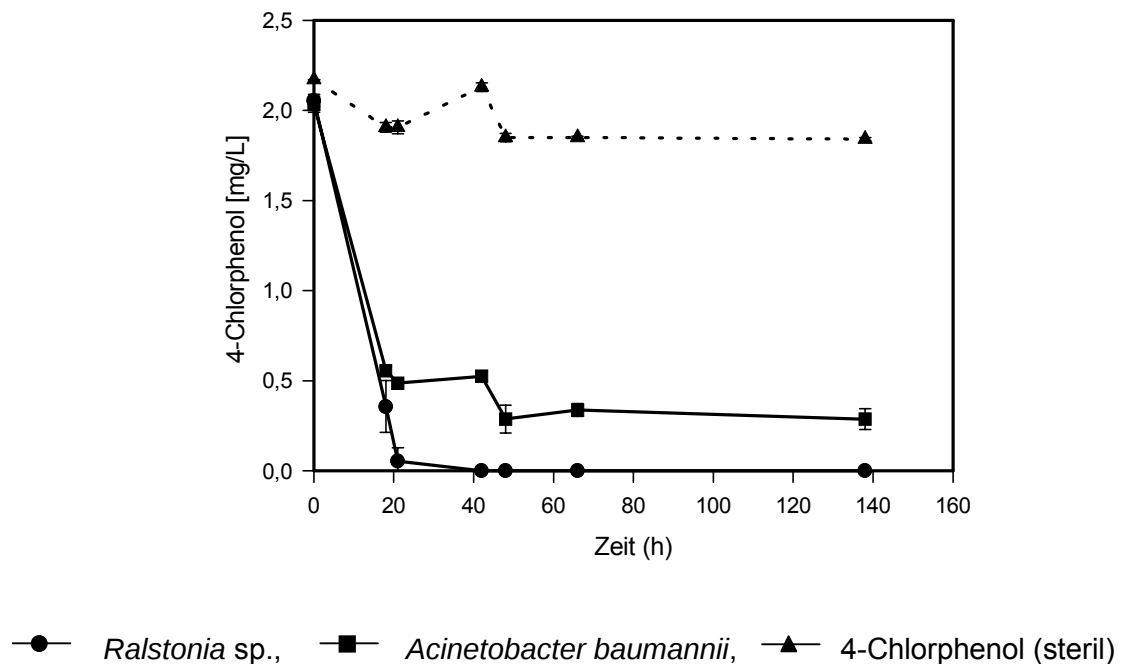
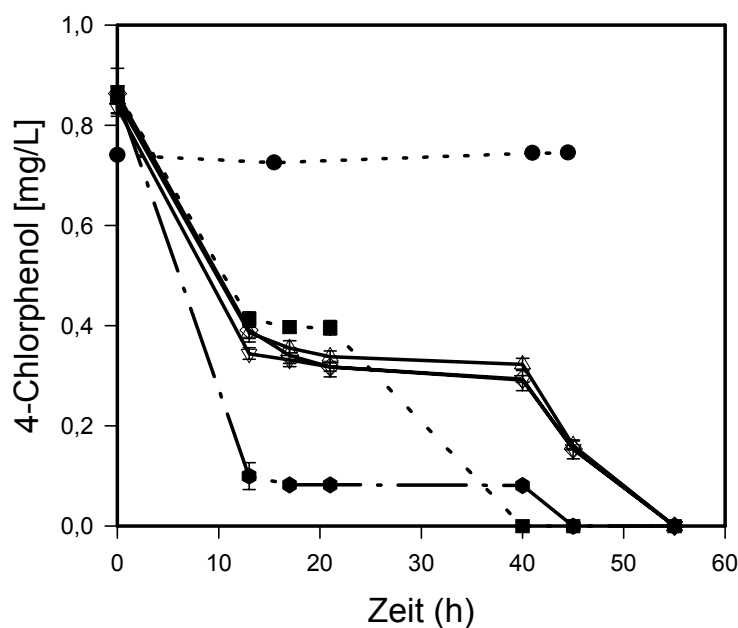


Abb. 27: Einfluss von Na-Acetat (DOC=10 mg/L) als C-Quelle auf den 4-Chlorphenol-Abbau durch pflanzenassoziierte Mikroorganismen; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

Für die Untersuchungen mit den Wurzelabscheidungen verschiedener Pflanzen wurde die 4-Chlorphenol-Ausgangskonzentration auf ca. 0,8 mg/L herabgesenkt, das Verhältnis jedoch bei 5 : 1 (also DOC 4 mg/L) belassen. Dabei ließen sich mit den eingesetzten Bakterien für den Schadstoffabbau keine signifikanten Unterschiede aufgrund der verschiedenen Pflanzen erkennen (s. Abb. 28 u. Abb. 29).

Die Abbildungen verdeutlichen, dass Phenol von den Organismen als Wachstums-substrat am besten genutzt wird. Unabhängig von der Pflanzenart war während der Versuchsdauer ein verzögerter Abbau des Schadstoffes zu verzeichnen. Das 4-Chlorphenol wurde dagegen bei dieser Konzentration auch ohne zusätzliches C-Substrat abgebaut. Dieser Abbau läßt sich auf die Kohlenstoffverunreinigungen der Nährlösung sowie auf intrazelluläre Reserven der abbauenden Organismen zurück-führen (s. hierzu auch den nächsten Abschnitt).



- 4-Chlorphenol (steril)
- 4-Chlorphenol + Phenol
- 4-Chlorphenol (Referenz)
- ▽ 4-Chlorphenol + RDP von *Carex gracilis*
- ◇ 4-Chlorphenol + RDP von *Phragmites australis*
- △ 4-Chlorphenol + RDP von *Scirpus lacustris*

Abb. 28: 4-Chlorphenol-Abbau durch *Acinetobacter baumannii* unter Einfluss von Wachstumssubstraten in Form von Rhizodepositionsprodukten (RDP) verschiedener Helophyten und Phenol (das Phenol und die Wurzelabscheidungen entsprechen einem DOC-Anteil von 4 mg/L); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

Die Verzögerung des 4-Chlorphenol-Abbaues in den Gefäßen mit pflanzlichen Substanzen könnte auf diauxische Effekte zurückzuführen sein: Unter der Voraussetzung, dass der DOC-Anteil der Nährlösung den 4-Chlorphenolabbau ermöglicht, würde der Abbau des 4-Chlorphenols durch die bakterielle Verwertung der pflanzlichen Substanzen in diesem Fall verzögert einsetzen.

Des Weiteren ist eine Hemmung des für den Abbau erforderlichen Enzyms Phenolhydroxylase durch strukturanaloge Verbindungen in den Wurzelabscheidungen nicht auszuschließen (s. Diskussionspunkt 4.3).

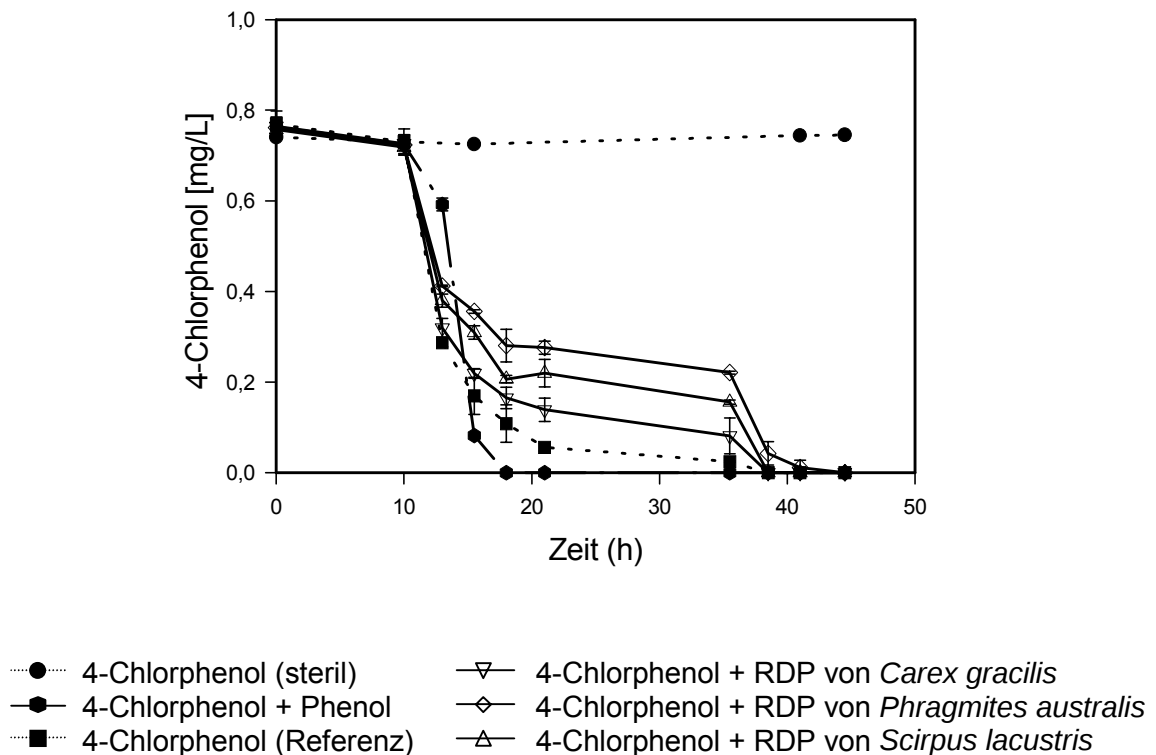


Abb. 29: 4-Chlorphenol-Abbau durch *Ralstonia* sp. unter Einfluss von Wachstumssubstraten in Form von Rhizodepositionsprodukten (RDP) verschiedener Helophyten und Phenol (das Phenol und die Wurzelabscheidungen entsprechen einem DOC-Anteil von 4 mg/L); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

Die bessere Nutzung des Phenols als Wachstumssubstrat könnte auf die Vorkultivierung und die dadurch gegebene Adaptation der Mikroorganismen (Enzyminduktion durch Vorkultivierung) zurückzuführen sein (SÁEZ u. RITTMANN 1991, 1993, HILL et al. 1996). Die leichtere Verwertbarkeit von Natrium-Acetat im Vergleich zu den Wurzelabscheidungen (vergl. Abb. 27 mit Abb. 28 u. 29) wiederum ließe sich mit den zum Teil komplexeren Molekülstrukturen der Wurzelabscheidungen erklären.

Zusammenfassend zeigten die Versuche zum Einfluss von Rhizodepositionsprodukten als Wachstumssubstrat für cometabolische Abbaureaktionen, dass

- *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) bei der 4-Chlorphenol-Konzentration von 2 mg/L einen vollständigen Abbau durch pflanzliche Substanzen mit DOC-Konzentrationen von 3; 6 und 12 mg/L ermöglicht. Bei Erhöhung der Schadstoffkonzentration auf 5 mg/L ist bei einem DOC-Wert von 12 mg/L nur noch ein 52%iger Abbau zu verzeichnen.

- Analog zu diesem Versuch wurde eine von der *Phalaris*-Wurzel gewonnene phenolabbauende Mikroorganismenmischkultur eingesetzt. Dabei zeigte sich für eine 4-Chlorphenol-Konzentration von 2,5 mg/L bei einer DOC-Konzentration von 12 mg/L ein 100%iger Abbau. Bei einer geringeren DOC-Konzentration von 4 mg/L war auch hier kein Abbau des Schadstoffes mehr möglich. Als Ursache wäre eine Inhibition des schadstoffabbauenden Enzyms durch das 4-Chlorphenol denkbar (s. hierzu Diskussionspunkt 4.3).
- Mit den von *Phalaris*-Wurzeln gewonnenen Isolaten der Arten *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp., die ein analoges Abbauverhalten zu *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) zeigten, wurden die Versuche fortgesetzt. Das Verhältnis 4-Chlorphenol zur DOC-Konzentration der Rhizodeposition wurde aufgrund der vorhergegangenen Versuche mit 1 : 5 gewählt. Dabei stellte sich heraus, dass der *Ralstonia* sp. Stamm das 4-Chlorphenol vollständig eliminiert. Der *Acinetobacter* Stamm eliminierte die Verbindungen nur etwa bis zur Hälfte der Ausgangskonzentration.
- Der Vergleich zum Einfluss der Rhizodeposition unterschiedlicher Helophyten auf den bakteriellen 4-Chlorphenol-Abbau zeigte für die Schadstoffkonzentration von 0,8 mg/L keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pflanzen.

Bei der Schadstoffkonzentration von 0,8 mg/L zeigte sich, dass auch ohne Zugabe einer C-Quelle der Abbau erfolgte.

Mit den folgenden Untersuchungen wird deutlich gemacht, dass dieser Abbau mikrobiell erfolgte und nicht auf abiotischen Faktoren beruhte.

Abbildung 30 zeigt den Abbau bei unterschiedlichen Animpfvolumina (5; 2,5 und 1 Vol.-% von einer Stammkultur mit $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Es erfolgt bei allen Volumina ein 100%iger Abbau.

Mit Hilfe der Abbaukurven lassen sich darüber hinaus die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei unterschiedlichen Inokula ermitteln (s. Punkt 2.5.2). Abb. 31 verdeutlicht deren linearen Anstieg mit Zunahme der Zellzahl im Inokulum.

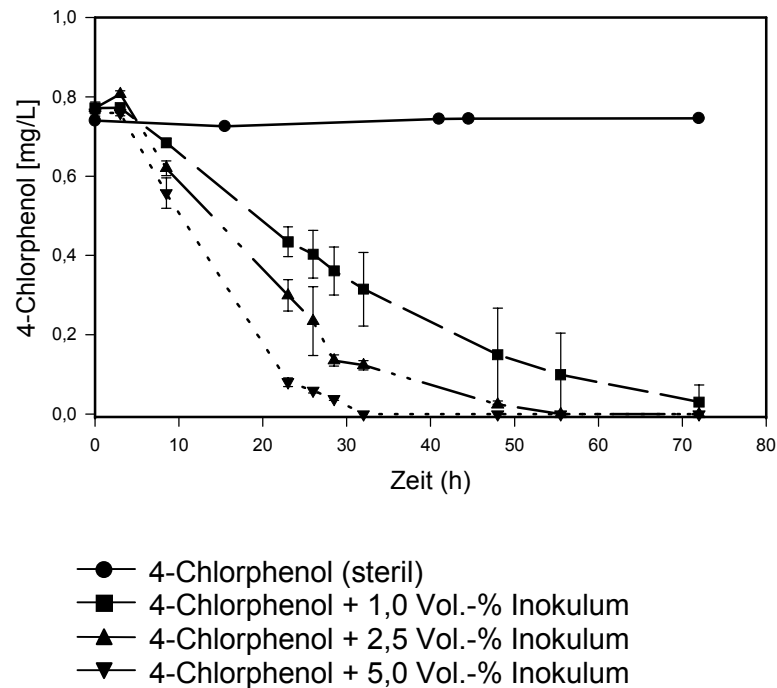


Abb. 30: 4-Chlorphenol-Abbau durch *Ralstonia* sp. bei unterschiedlichen Animpfdichten unter Nutzung des in der Nährlösung vorhandenen Kohlenstoffs (Zellzahl der Stammkultur: $6,0 \cdot 10^6$); arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

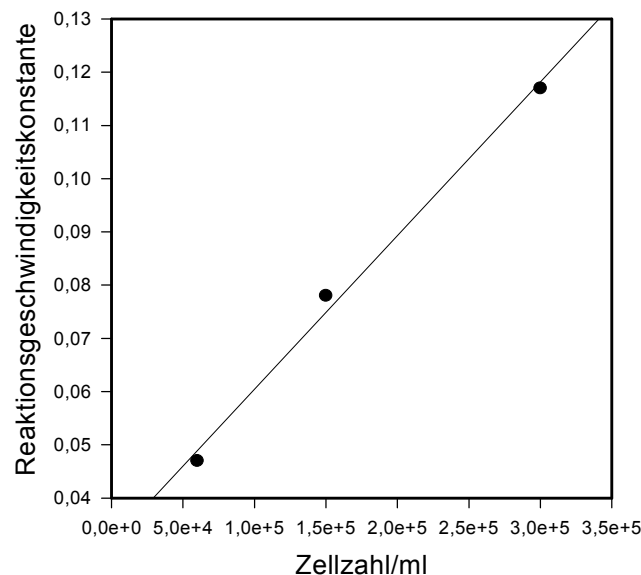


Abb. 31: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von *Ralstonia* sp. bei unterschiedlichen Zellzahlen im Inokulum:

k_1 für 1,0 Vol.-% ($6,0 \cdot 10^4$ Zellen/ml) = $0,046 \text{ h}^{-1}$ bei $t_1 = 3 \text{ h}$ u. $0,7722 \text{ mg/L}$; $t_2 = 72,0 \text{ h}$ u. $0,0306 \text{ mg/L}$
 k_1 für 2,5 Vol.-% ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) = $0,078 \text{ h}^{-1}$ bei $t_1 = 3 \text{ h}$ u. $0,8068 \text{ mg/L}$, $t_2 = 48,0 \text{ h}$ u. $0,0244 \text{ mg/L}$
 k_1 für 5,0 Vol.-% ($3,0 \cdot 10^5$ Zellen/ml) = $0,117 \text{ h}^{-1}$ bei $t_1 = 3 \text{ h}$ u. $0,7586 \text{ mg/L}$, $t_2 = 28,5 \text{ h}$ u. $0,0381 \text{ mg/L}$

In einem weiteren Versuch wurde die Entwicklung der Zellzahlen während der 4-Chlorphenol-Abnahme festgehalten. Die geringste Zellzahl wurde mit einem Inokulum von 10^4 Zellen eingebracht, das Inokulum mit der höchsten Zelldichte setzte sich aus $2 \cdot 10^5$ Zellen zusammen. Abb. 32 zeigt den Verlauf der Schadstoffkonzentrationen und die entsprechende Entwicklung der Zellzahlen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass der Schadstoffabbau mikrobiell bedingt ist. Die Zellzahlen steigen um bis zu zwei Zehnerpotenzen.

Der Abbau ist somit auf die Nutzung von C-Bestandteilen in der Nährlösung zurückzuführen.

SÁEZ u. RITTMANN (1993) ermittelten für einen *Pseudomonas putida* Stamm, dass mit 1 mg/L Phenol der komplette Abbau von 0,41 bis zu 0,47 mg/L 4-Chlorphenol ermöglicht wird. Nimmt man den C-Anteil des Phenols als Basis (= 76,6 % und damit 0,77 mg/L), lassen sich für diese Arbeit Abbauwerte von 0,44 mg bis zu 0,51 mg/L 4-Chlorphenol durch den C-Anteil der Nährlösung ($\emptyset$ 0,83 mg/L) errechnen. Die noch fehlende Differenz zur Konzentration von 0,83 mg/L kann auf die Spezifität des Mikroorganismus zurückzuführen sein und wäre des Weiteren durch Oxidation der Biomasse und durch Nutzung bakterieller endogener Reserven interpretierbar.

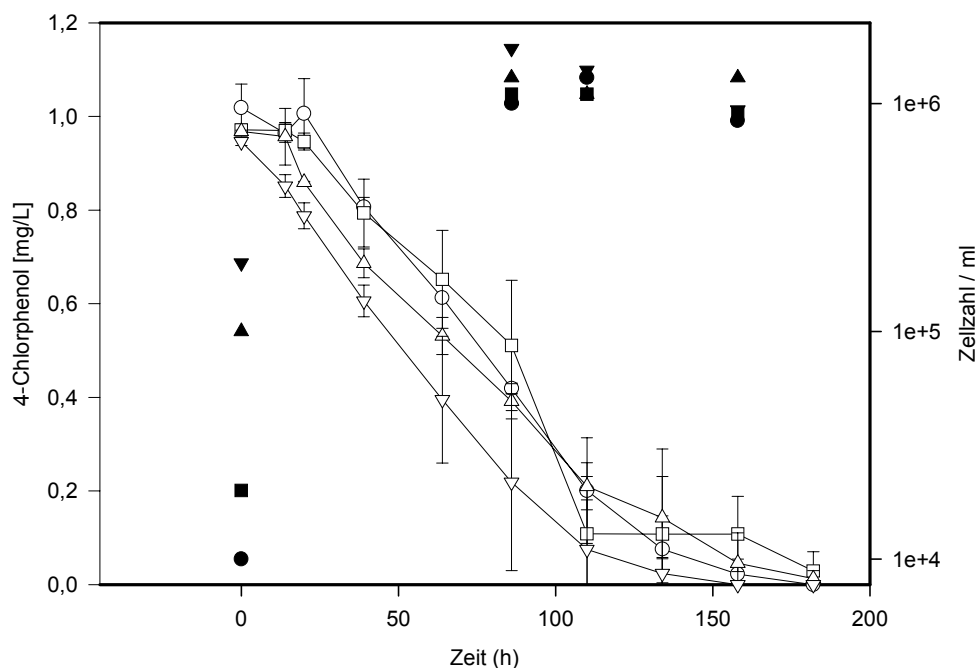


Abb. 32: 4-Chlorphenol-Abbau durch den in der Nährlösung vorhandenen Kohlenstoff durch *Ralstonia* sp. bei unterschiedlichen Startzellzahlen: $\bullet = 10^4$; $\blacksquare = 2 \cdot 10^4$; $\blacktriangle = 10^5$; $\blacktriangledown = 2 \cdot 10^5$ die dunklen Symbole geben die auf der rechten Ordinate aufgetragenen Zellzahlen wieder; die hellen Symbole geben die auf der linken Ordinate aufgetragene Schadstoffkonzentration wieder; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n=3

Die Versuche haben gezeigt, dass der Abbau von 4-Chlorphenol von bestimmten Bakterien, darunter auch Bakterien, die von Helophytenwurzeln gewonnen wurden, nur bei Hinzugabe einer C-Quelle als Wachstumssubstrat erfolgen kann.

Die Effizienz ist dabei abhängig von dem Verhältnis Wurzelabscheidungen (bzw. DOC) zu 4-Chlorphenol.

3.4 Abbau der Testsubstanz 4-Chlorphenol

Chlorierte Phenole können von verschiedenen Bakterien über die meta- oder ortho-Spaltung des aromatischen Ringes abgebaut werden (s. Abb. 33).

Der Abbau chlorierter Verbindungen einschließlich der Monochlorphenole wurde von der Arbeitsgruppe Knackmuss (DORN et al. 1974, DORN u. KNACKMUSS 1978, KNACKMUSS u. HELLWEG 1978, REINEKE et al. 1982) sehr intensiv untersucht. Neben verschiedenen *Pseudomonas*-Arten konnte ein Abbau durch diverse Arten der Gattung *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* gezeigt werden.

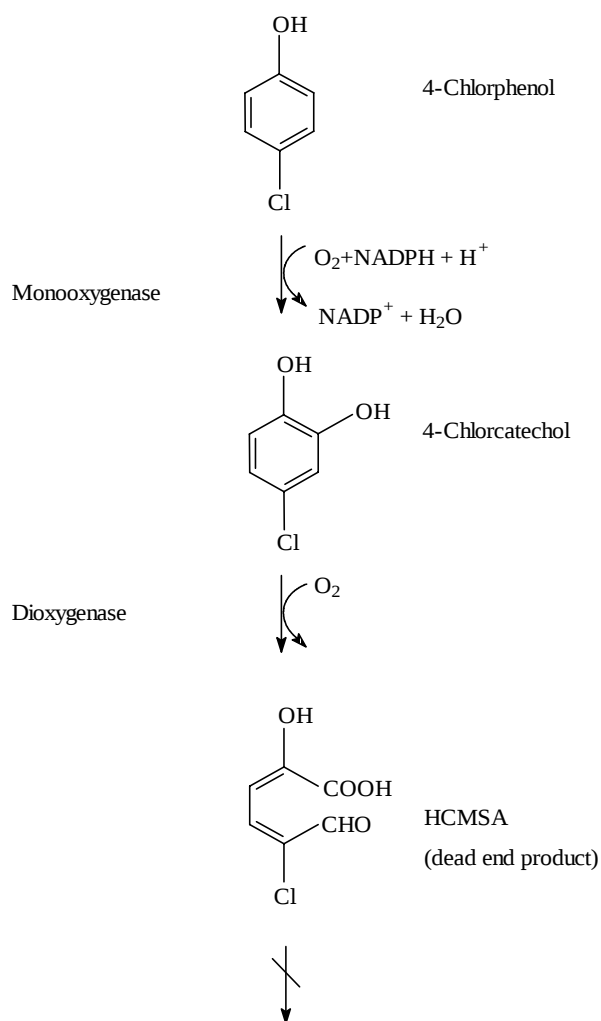
Weitere Publikationen zum direkten 4-Chlorphenol-Abbau liegen u.a. von FAVA et al. (1995), BAE et al. (1996) und HOLLENDER et al. (1997) vor.

Einen zusammenfassenden Überblick über den Abbau chlorierter monoaromatischer Verbindungen geben HÄGGBLOM (1990) sowie COMMANDEUR u. PARSSON (1994).

Der Abbau über die meta-Spaltung verläuft häufig unvollständig über die Bildung chlorierter Catechole zu persistenten „dead end“ Produkten.

Für 4-Chlorphenol ist über die meta-Spaltung des aromatischen Ringes die Bildung des Metaboliten 2-Hydroxy-5-chlormuconatsemialdehyd beschrieben (u.a. SÁEZ u. RITTMANN 1991, HILL et al. 1996) (s. Abb. 33a).

a.



b.

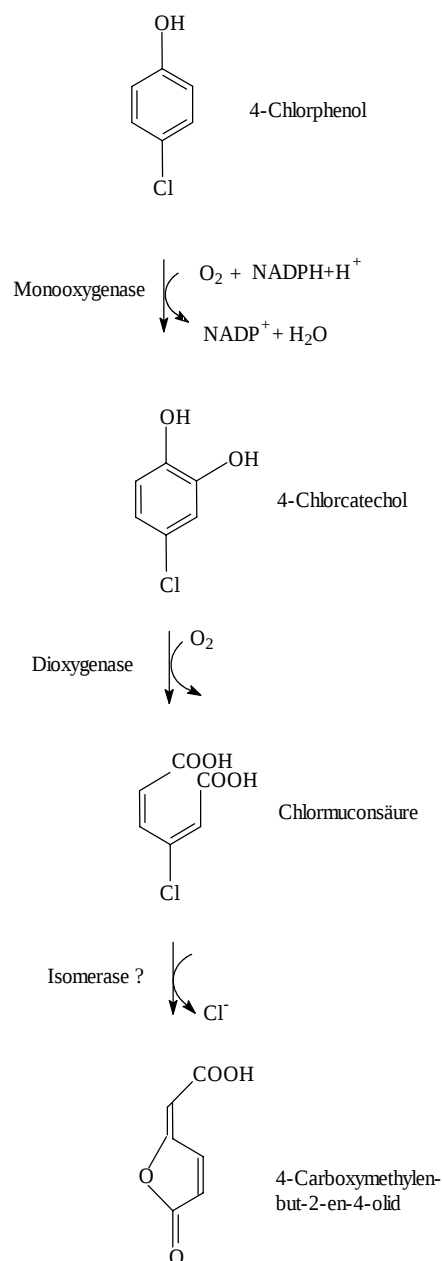


Abb. 33: Metabolisierung von 4-Chlorphenol über die **a.** meta-Spaltung des aromatischen Ringes durch *Pseudomonas putida* Pp64 (SÁEZ u. RITTMANN 1991) und **b.** über die ortho-Spaltung des aromatischen Ringes durch *Pseudomonas* sp. B13 (HÄGGBLOM 1992)

Abb. 34 zeigt den Abbau von 4-Chlorphenol und Phenol durch die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterien (*Ralstonia eutropha*, *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp.) bei einer Anfangskonzentration von 10 resp. 50 mg/L und einem Konzentrationsverhältnis von 4-Chlorphenol zu Phenol von 1 : 5. Durch die Abbildung wird der

simultane Abbau beider Substanzen deutlich. Dabei wird Phenol zuerst oxidiert und schafft damit die Voraussetzung für die Transformation des 4-Chlorphenols. Bei einem ausgeglichenen Verhältnis von Cosubstrat zu Cometabolit wird das Phenol daher vorher eliminiert. Nach Verbrauch des Phenols stoppt das Zellwachstum und die weitere Transformation des 4-Chlorphenols wird zunehmend bis zum Stillstand verlangsamt (SÁEZ u. RITTMANN 1993).

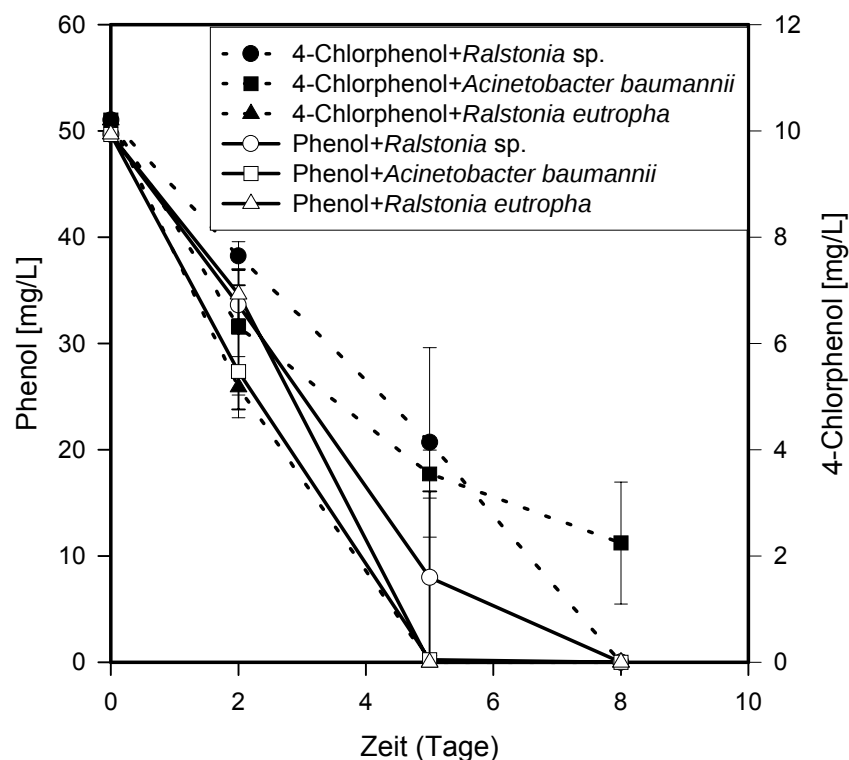


Abb. 34: Simultaner Abbau von 4-Chlorphenol und Phenol durch die eingesetzten Testorganismen *Acinetobacter baumannii*, *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) und *Ralstonia sp.*

Der für diese Arbeit verwendete Stamm *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) wurde von HILL et al. (1996) als cometabolischer Abbauer von 4-Chlorphenol beschrieben. Der dabei entstehende Metabolit 2-Hydroxy-5-chlormuconatsemialdehyd kann nach JANKE u. FRITSCH (1979) über ein charakteristisches Absorptionsspektrum detektiert werden. Die Autoren geben für den pH-Wert 7,5 ein Absorptionsmaximum von 378 nm und für pH 2 ein Absorptionsmaximum von 330 nm an. Abb. 35 gibt die ermittelten Spektren während des Abbaues wieder. Damit werden die von den Autoren angegebenen Absorptionsmaxima und damit der Abbau über den genannten Metaboliten bestätigt.

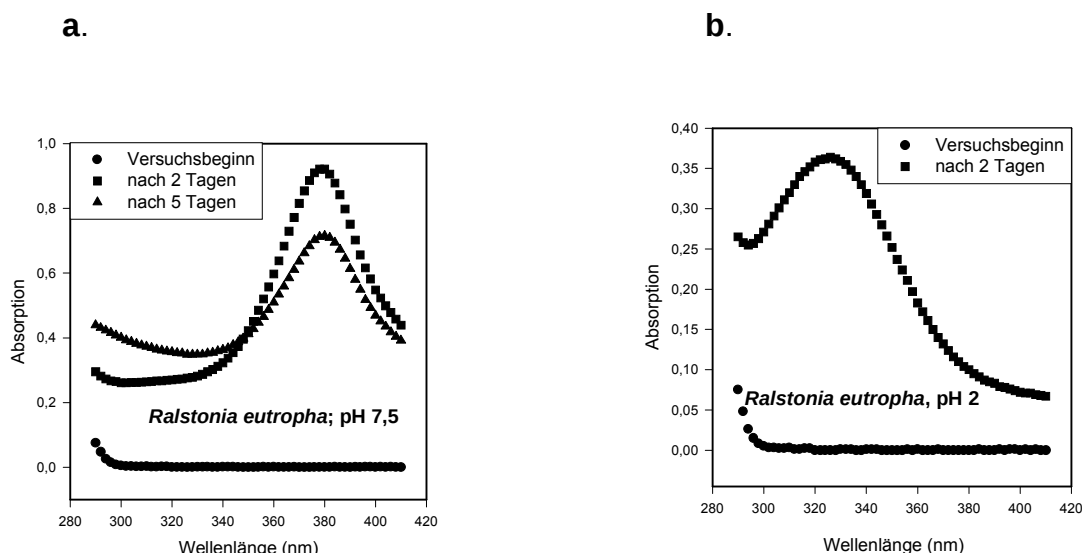


Abb. 35: UV-Vis Absorptionsspektren der 4-Chlorphenol-Konzentration in der Mineralsalzlösung bei **a.** pH 7,5 und **b.** pH 2 während der Transformation durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536)

Anders stellten sich die Absorptionsspektren für die von der Pflanze isolierten Organismen *Ralstonia* sp. und *Acinetobacter baumannii* dar (s. Abb. 36). Der Metabolit wird nicht gebildet. Der Abbau dürfte damit über die ortho-Spaltung erfolgen.

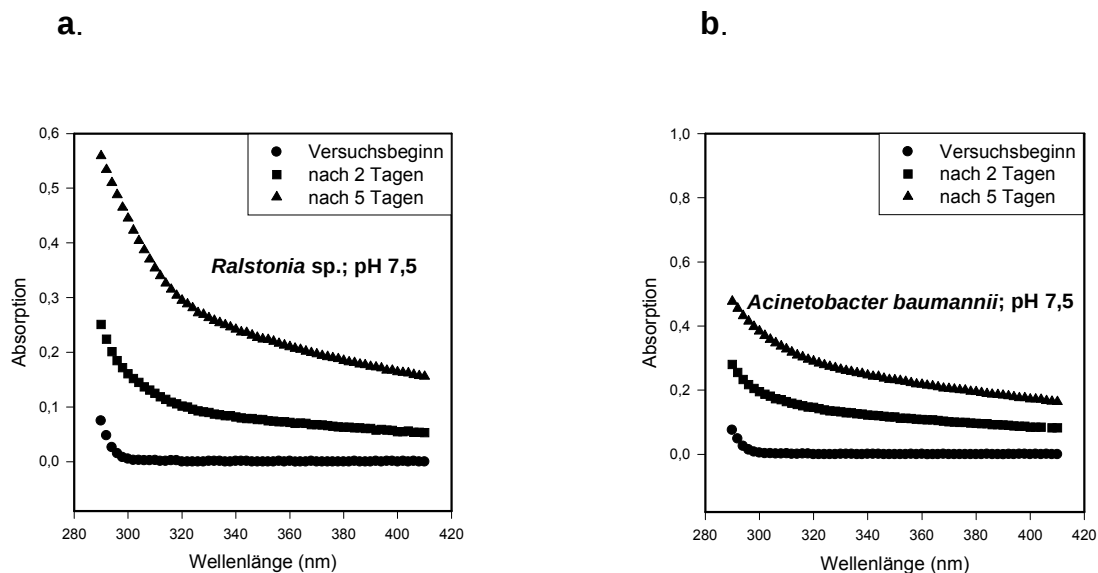


Abb. 36: UV-Vis Absorptionsspektren der 4-Chlorphenol-Konzentration in der Mineralsalzlösung bei pH 7,5 während der Transformation durch **a.** *Ralstonia* sp. und **b.** *Acinetobacter baumannii*

Gestützt wird diese Hypothese durch Versuche zur Dechlorierung. Die Dechlorierung ist unter umwelttoxikologischen Gesichtspunkten erforderlich, da nur nach erfolgter Freisetzung der Chloridionen von einer Detoxifizierung ausgegangen werden kann. Für die Untersuchungen mit den Testorganismen wird in Abb. 37 der Grad der Chloridfreisetzung widerspiegelt. Dabei zeigt sich, dass der Abbau des 4-Chlorphenols für die von den Wurzeln isolierten Arten *Ralstonia* sp. und *Acinetobacter baumannii* equimolar zur Freisetzung der Chloridionen erfolgt. Für *Ralstonia eutropha* (DSMZ-Stamm 5536) zeigt sich dagegen, dass der Abbau der Verbindung 4-Chlorphenol am schnellsten erfolgt, die Chloridfreisetzung jedoch mit Verzögerung bzw. unvollständig verläuft, was auf die Bildung des Metaboliten 2-Hydroxy-5-chlor-muconatsemialdehyd, der über die meta-Spaltung gebildet wird, zurückzuführen ist.

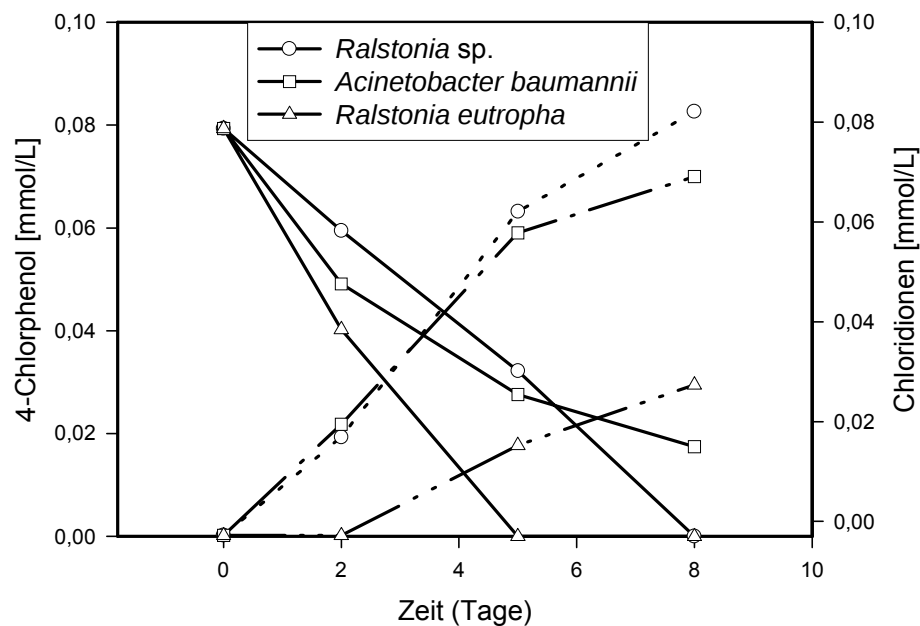


Abb. 37: Chloridfreisetzung (gestrichelte Linien) während des Abbaues von 4-Chlorphenol (durchgezogene Linien) unter Zugabe von Phenol als Wachstumssubstrat durch die getesteten Bakterienisolate

3.5 Bakterien der Versuchspflanzen

Die Pflanzenwurzeln fungieren für die Bakterien als Aufwuchsoberfläche und Nährstoffquelle. Dabei bestätigte sich für die in Hydroponikkultur gezogenen Testpflanzen die in der Literatur benannte Verteilung auf der Pflanzenwurzel. Aus Abb. 38 geht hervor, dass auch auf der Wurzelspitze von *Phalaris arundinacea* Bakterien überwiegend aggregiert vorkommen.

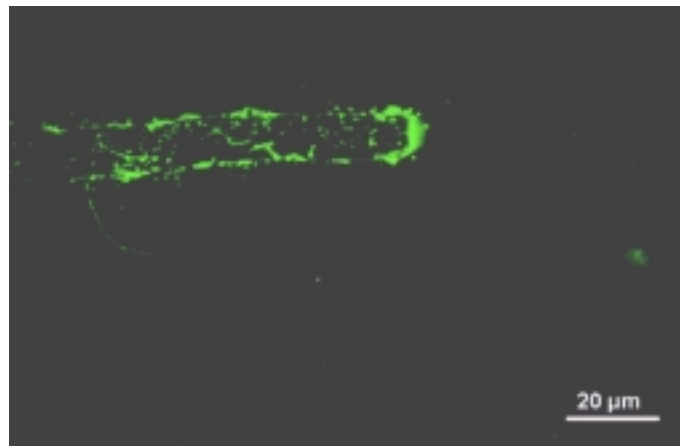


Abb. 38: Wurzelspitze von *Phalaris arundinacea* mit adhärenenten Bakterien (CSLM-Aufnahme; Darstellung durch fluoreszierende Lectine)

Bei Phenolexposition steigt die Zellzahl auf der Rhizoplane.

Bei einer entsprechend langen Verweilzeit der Pflanzen in kontaminierter Mineral-salzlösung kann dies zur Bildung von Schleimen an den Pflanzenwurzeln führen (s. Abb. 39).

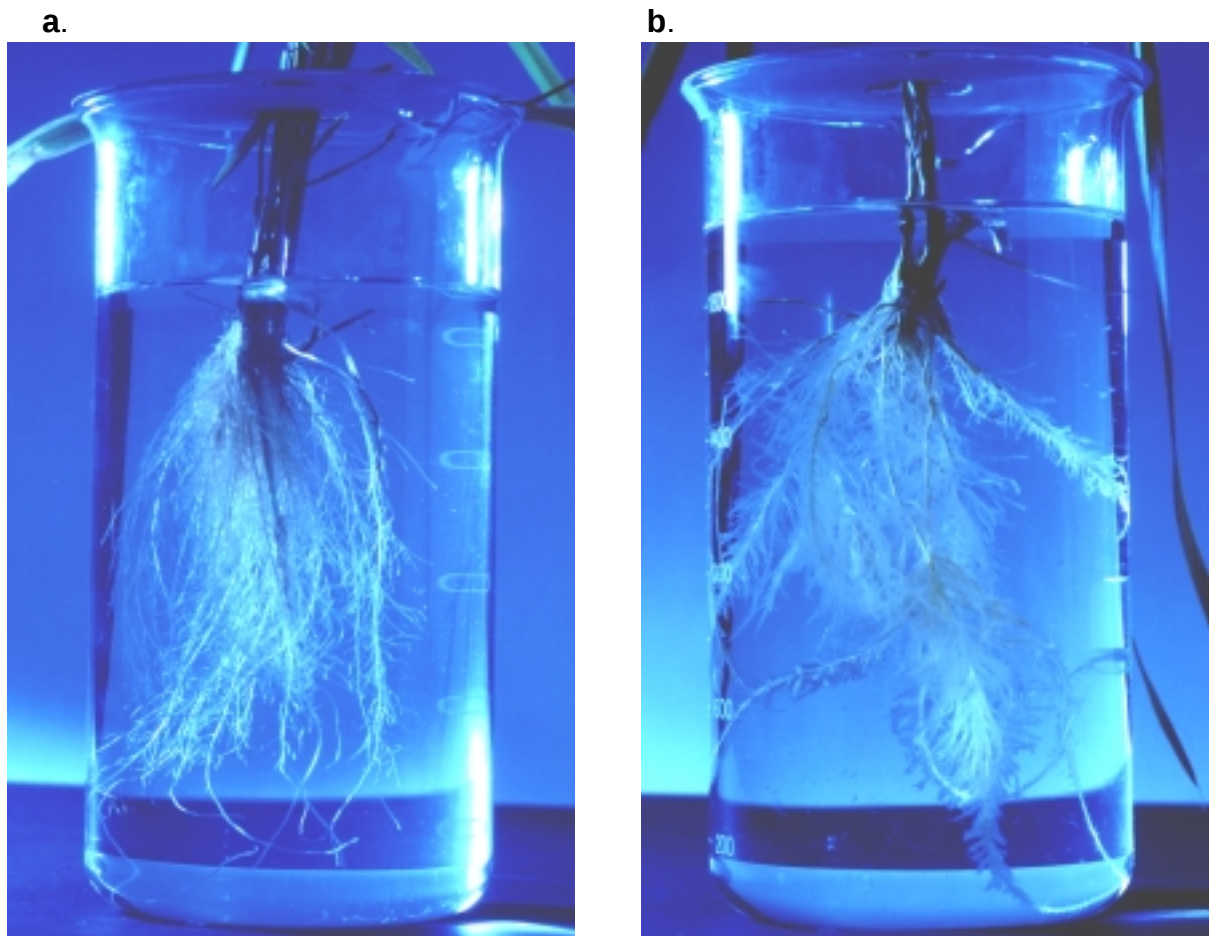


Abb. 39: *Phalaris*wurzel einer **a.** nicht schadstoffexponierten Pflanze und einer **b.** phenolexponierten Pflanze (14tägige Exposition in Nährlösung mit einer Phenol-Konzentration von 1 mmol/L)

Ein Vergleich der Zellzahlen, die nach Gewinnung von Bakterien von den Wurzeln phenolexponierter Pflanzen und nicht exponierter Pflanzen über die KBE ermittelt wurden und als Bezugsgröße je 1 g Wurzelfrischgewicht haben, zeigt, dass sowohl auf dem unselektiven R2A-Medium, als auch auf dem Selektivmedium (Phenol als C-Quelle) die Zellzahl infolge der Schadstoffexposition steigt (s. Abb. 40).

Für die nicht exponierten Pflanzen wurden auf dem R2A-Medium die Zellzahlen $1,9 \cdot 10^6$ (Referenz I) und $6,3 \cdot 10^6$ (Referenz II) und für die phenolexponierten $6,3 \cdot 10^7$ (phenolexponierte Pflanze I) und $1,6 \cdot 10^8$ (phenolexponierte Pflanze II) ermittelt. Die Zellzahlen auf dem Selektivmedium zeigen für die beiden Varianten die gleiche Tendenz, lagen dabei jedoch um bis zu mehr als zwei Zehnerpotenzen unter der auf R2A-Medium ermittelten Zellzahl.

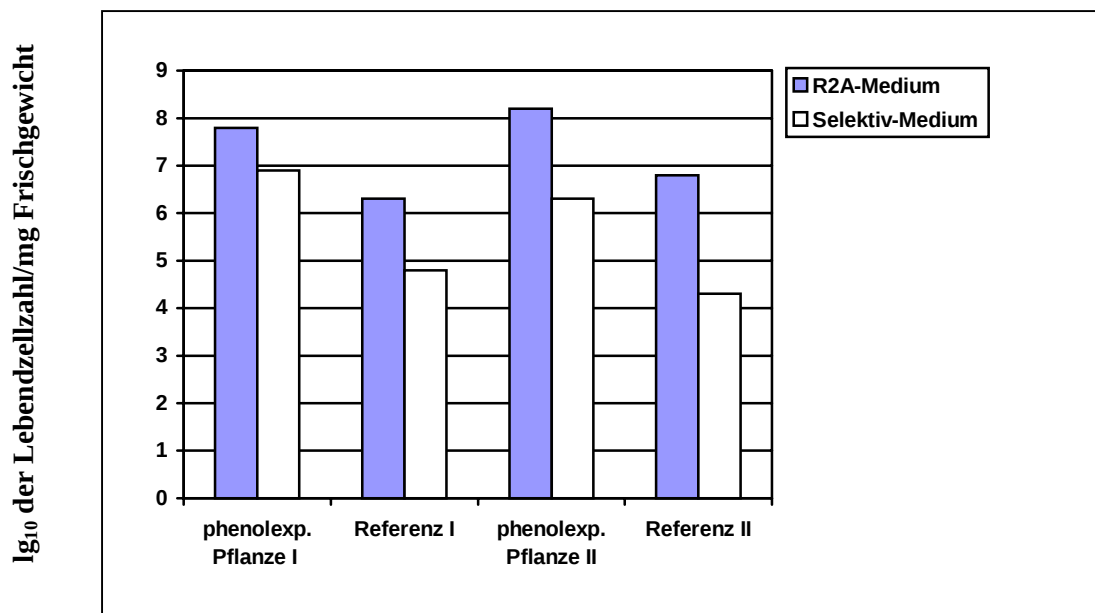


Abb. 40: KBE-Zahl von phenolexponierten Pflanzen und nicht exponierten Pflanzen (Referenz) auf R2A- und Selektivmedium bezogen auf 1 g Wurzelfrischgewicht

3.5.1 Identifizierung der Bakterien

Insgesamt wurden von der Pflanzenwurzel von *Phalaris arundinacea* 27 Isolate gewonnen, die mit den unter Punkt 2.5.3 beschriebenen Methoden untersucht und zum Teil bis auf Artebene identifiziert wurden.

Die isolierten Bakterien sind zum überwiegenden Teil Gram-negativ (21 Bakterien) (s. Tab. 13). Das ermittelte Übergewicht Gram-negativer Bakterien stimmt mit vielen Literaturangaben überein (ANDERSON et al. 1993, TATE 1995, ATLAS u. BARTHA 1998). Bei diesen Angaben ist jedoch zu bedenken, dass die Zuordnung der Häufigkeiten in starkem Maß von der Kultivierbarkeit dieser Organismen abhängt. So zeigte sich in neueren Arbeiten mit oligotrophen Nährmedien bzw. durch Zuhilfenahme molekularbiologischer Methoden, dass die Bakteriengemeinschaft der Rhizosphäre sehr viel diverser ist, als bisher angenommen (CROWLEY et al. 1997).

Neben den in Tab. 13 genannten Befunden wurden die standardisierten Systeme API und Biolog und des Weiteren die Fettsäureanalytik zur Identifizierung der Bakterien hinzugezogen.

Isolat	Gram	Katalase	Cytochrom-Oxidase	Morphologie	sonstige Merkmale der Kolonien
A	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
B	-	+	-	Kurzstäbchen	
C	-	+	+	Kurzstäbchen	
D	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
E	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
F	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
G	-	+	+	Kurzstäbchen	
H	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
I	-	+	-	Kurzstäbchen	
J	+	+	+	Kokken	
K	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
L	-	+	-	Kurzstäbchen	
M	+	(-)	+	Kurzstäbchen	(Bacillus, Sporen)
N	-	+	+	Stäbchen mit fadigem Ende	gelborange, schwärmend, Flexirubinnachweis durch KOH-Lösung
O	-	-	+	Stäbchen, häufig mit zweitem verbunden	
P	+	(-)	+	Kokken (häufig zu zweit)	
Q	-	+	+	Kurzstäbchen	
R	-	+	+	Stäbchen (häufig zu zweit)	rot
S	-	+	+	Kurzstäbchen	
T	+	+	+	Kurzstäbchen	ocker bis gelb
U	-	+	-	Stäbchen, mit fadigen Ende	gelb, schwärmend, Flexirubinnachweis durch KOH-Lösung
V	-	-	+	Stäbchen	
W	+	-	+	Stäbchen	
X	+	-	+	Kokken	
Y	-	+	+	Kurzstäbchen	orange
Z	-	+	+	Kurzstäbchen	fluoreszierend
Aa	-	+	+	Kurzstäbchen	gelborange

Tab. 13: Morphologische und physiologische Charakteristika der untersuchten Isolate, die von *Phalaris arundinacea*-Wurzeln gewonnen wurden (in Klammern gesetzte + oder - - Zeichen ermöglichten keine klare Zuordnung)

Mit Hilfe der Fettsäureanalytik werden 11 Isolate mit unterschiedlicher Identitätsübereinstimmung zur MIDI-Datenbank benannt (s. Tab. 14, S. 99; Fettsäurespektren, s. Anhang Tab. A-6).

Die Isolate können den Arten der MIDI Datenbank zugeordnet werden, wenn eine Ähnlichkeit von größer 0,5 gegeben ist und wenn außerdem die Distanz zum nächsten vorgeschlagenen Organismus größer 0,1 ist.

Ein Dendrogramm (Abb. 41), das über die Euklidische Distanz ermittelt wurde, verdeutlicht die Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Isolaten aufgrund ihrer Fettsäurespektren.

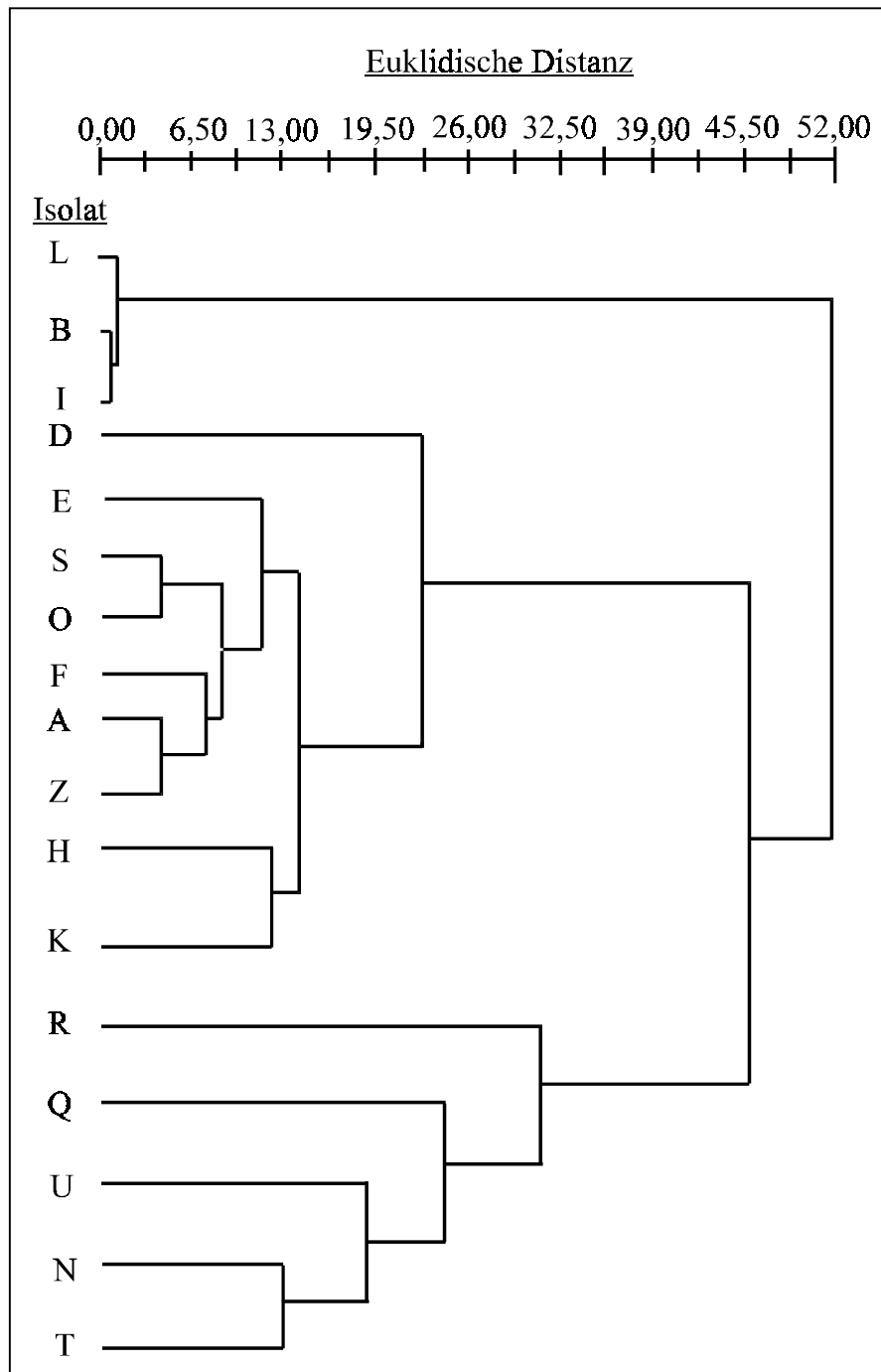


Abb. 41: Dendrogramm der über die Fettsäureanalytik ermittelten Ähnlichkeiten der Isolate (ermittelt über die Euklidische Distanz)

Aufgrund empirischer Befunde ist bei einer Zuordnung der Isolate zur MIDI Datenbank davon auszugehen, dass Isolate mit einer Euklidischen Distanz von kleiner 10 einer Art zuordenbar sind, während Isolate mit einer Distanz, die größer 10 ist, unterschiedlichen Arten zuzuordnen sind. Für Isolate mit einer Euklidischen Distanz von kleiner 2 ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um die jeweils gleichen Isolate handelt.

Daraus ergibt sich für die untersuchten Isolate, dass es sich bei B, I, und L um das jeweils gleiche Isolat handelt und das des Weiteren die Isolate S, F, A und Z einer Art zugehörig sind (das Isolat O konnte keinem Organismus der Datenbank zugeordnet werden).

Bei Hinzuziehung der Identifizierungssysteme API und Biolog wird die Identifizierung der Isolate B, I und L als *Acinetobacter baumannii* sehr wahrscheinlich (s. Tab. 14, S. 99). Insbesondere die mit 99,9 % angegebene Identität zu dem API-System läßt auf diese Art schließen.

Für die Isolate A, F und Z ist die Zuordnung zu *Pseudomonas putida* (Isolat A und Isolat F) und *Pseudomonas fluorescens* (Z) aufgrund der Übereinstimmung bei den drei Systemen ebenfalls sehr wahrscheinlich. Die Identifizierung des Isolates S als *Comamonas testosteroni* durch die Fettsäureanalytik wird durch das Biolog-System bekräftigt.

Die Hinzuziehung der aus Tab. 13 entnehmbaren Bakterieneigenschaften ermöglicht mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Identifizierung folgender Mikroorganismen:

Isolat A, F = *Pseudomonas putida*

P. putida ist wie *P. fluorescens* ein weit verbreitetes Wasser- und Bodenbakterium, das eine Vielzahl verschiedener Kohlenwasserstoffe und Fremdstoffe abzubauen vermag (SCHLEGEL 1992, FRITSCH 1999).

Isolat B, I, L = *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter ist ein Oxidase-negatives Boden- und Wasserbakterium und ähnelt in der Vielseitigkeit hinsichtlich der Verwertung von Substraten der Gattung *Pseudomonas* (SCHLEGEL 1992). Als C-Quellen können von *Acinetobacter* Ethanol, Acetat, Lactat sowie diverse Kohlenwasserstoffe, Aromaten etc. verwertet werden (JUNI 1984).

Isolat E = *Pseudomonas marginalis*

P. marginalis ist ein pflanzenpathogenes Bakterium (YOUNG et al. 1996) (dieser Organismus wird mit dem API System als *P. fluorescens* erfaßt).

Isolat G = *Sphingobacterium multivorum*

(dieser Organismus wurde nur mit dem API-System erfaßt).

Isolat N, U = *Flavobacterium johnsonae* (Synonym *Cytophaga johnsonae*) (die Alternativen konnten durch den Flexirubinnachweis und weiterer Merkmale ausgeschlossen werden). Morphologisch sind die sich zum Ende verjüngenden Stäbchen charakteristisch und die schwärmenden pigmentierten Kolonien. Es ist ein Bakterium, das in Schmutz- und Frischwasser vorkommt und weit verbreitet in Boden und Kompost ist. Es baut sowohl Chitin (REICHENBACH 1989) als auch Cellulose im Boden ab (SCHLEGEL 1992).

Isolat S = *Comamonas testosteroni*

Comamonas testosteroni ist ein Bodenbakterium, das verschiedene organische Verbindungen als C-Quelle nutzen kann, u.a. auch das namensgebende Testosteron (PALLERONI 1984).

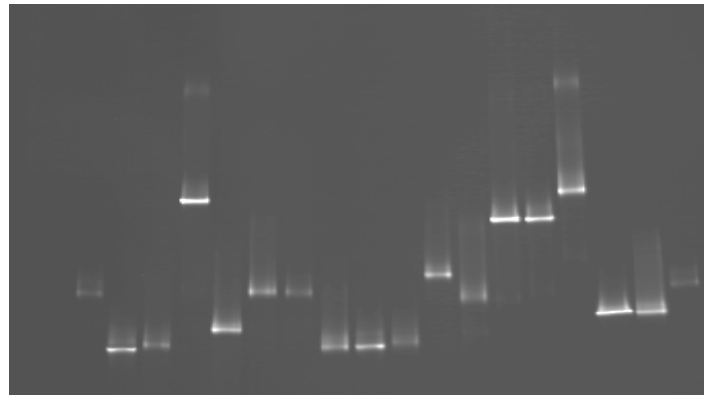
Isolat W,X = *Micrococcus* spp.

Isolat Z = *Pseudomonas fluorescens* (s. Isolat A).

Die Gattungen *Pseudomonas*, *Flavobacterium* und *Cytophaga* gelten als typische Bakterien bepflanzter Bodenfilter (BIEKER 1991, HOFMANN 1991 in WISSING 1995).

Die Isolate M, P, Q, V und Aa waren mit keinem der Testsysteme identifizierbar.

Der PCR-DGGE-Lauf mit einer Auswahl an Isolaten (s. Abb. 42) wäre ohne die bisher genannten Untersuchungen zur Charakterisierung der Bakterien wenig aussagekräftig: Das Isolat X zeigt einen ähnlichen Lauf wie V; die Stämme H, K und evtl. O könnten identisch sein; des Weiteren die Stämme L und I; die Isolate R und M sind sich zumindest ähnlich und N, U und T könnten ebenfalls gleich sein.



St H M N Q L I O K R G E U T Aa X V St

Abb. 42: DGGE-Lauf mit einem Teil der isolierten Bakterien auf Polyacrylamidgel. Der Standard (St) ist *Caulobacter subvibrioides*

Unter Hinzuziehung der zuvor durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung der Bakterien wird durch den Gellauf für die Stämme N und U die Identifizierung als *Flavobacterium johnsonae* bekräftigt und für die Stämme I und L die Identifizierung als *Acinetobacter baumannii*. Des Weiteren könnten die Stämme H und K gleicher Art sein. Die anderen Ähnlichkeiten im Gellauf lassen durch die zuvor durchgeführten Untersuchungen nicht auf identische Arten schließen.

Mit den für die DGGE amplifizierten Produkten ist bei Bedarf die Möglichkeit zur Sequenzierung und damit zur Identifizierung gegeben.

So wurde das Isolat H, das von schadstoffabbauender Relevanz ist und deshalb für die Untersuchungen zur Funktion der Rhizodepositionsprodukte als Wachstumssubstrat eingesetzt wurde, sequenziert.

Als schadstoffabbaurelevant erwiesen sich neben den verschiedenen *Pseudomonas*-Arten und dem genannten Isolat H, die Isolate B, I und L, und damit die Art *Acinetobacter baumannii*.

Das Isolat H und *Acinetobacter baumannii* können 4-Chlorphenol unter Zugabe von Phenol simultan metabolisieren (s. P. 3.4). Gleiches gilt für die Isolate M und P, die nicht identifiziert wurden.

3.5.2 Sequenzierung des Isolates H

Die Sequenzierung des Isolates H erfolgte nach vorheriger Aufreinigung durch die Fa. Genom Analytik GmbH, Bremen.

Die dabei ermittelten Sequenzabfolgen sind dem Anhang (Tab. A-7) zu entnehmen.

Die sich anschließende Zuordnung zur NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) zeigt, dass das Isolat H eine 98%ige Übereinstimmung mit *Ralstonia*-Stämmen aufweist. Als eine der aufgeführten Arten ist *Ralstonia gilardii* benannt, eine Subspezies der Art *Ralstonia faecalis*, die mit dem API System identifiziert wurde.

Tab. 14: Zuordnung der Bakterien nach Fettsäureanalytik (FAME), API und BIOLOG

Isolat	FAME	Identität	API	Identität %	Klassifizierung	Biolog	Identität
A	Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida	0,867 0,855	P. putida	99,6	sehr gute Identifizierung	P. fulva (24h) P. putida (48 h)	0,606 0,484
B	Acinetobacter baumannii	0,836	Acinetobacter baumannii/calco.	99,9	sehr gute Identifizierung	Acinetobacter baumannii/calcoacet.	0,721
C			Methylo. mesophilicum	94,1	gute Identifizierung	P. fragi	0,517
D						P. fragi	0,594
E	Pseudomonas marginalis Pseudomonas putida	0,622 0,856	P. fluorescens	92,3	gute Identifizierung	P. corrugata P. marginalis (48 h)	0,833 0,645
F	Pseudomonas putida	0,754	P. putida	99,7	sehr gute Identifizierung	P. putida	0,866
G			Sphingobacterium multivorum	99,9	ausgezeichnete Identifizierung		
H			Alcaligenes faecalis	71,4	unzuverlässige Identifizierung	P. putida P. mendocina	0,602 0,594
I	Acinetobacter baumannii	0,823	Acinetobacter baumannii	99,9	ausgezeichnete Identifizierung		
J			Micrococcus spp	99,9	sehr gute Identifizierung	Micrococcus diversus	0,806
K	Burkholderia pickettii	0,541	-			P. mendocina	0,741
L	Acinetobacter baumannii	0,819	Acinetobacter baumannii/calco.	99,9	ausgezeichnete Identifizierung	Burkholderia cepacia (24h) P. putida (48h)	0,558 0,644
N	Cytophaga johnsonae	0,799				Sphingomonas paucimobilis	0,618
O						P carboxydohydrogena (24h) Burkh. solanacearum (48)	0,776 0,624
R						Shewanella putrefaciens	0,564
S	Comamonas testosteroni	0,870				Comamonas testosteroni	0,985
T						Bacillus pasteurii	0,674
U	Cytophaga johnsonae	0,548	Sphing. multivorum	98,9	gute Identifizierung		
W			Micrococcus spp	99,9	sehr gute Identifizierung		
X			Micrococcus spp	99,9	sehr gute Identifizierung		
Y			Burkholderia cepacia	99,7	zweifelhaftes Profil	Acinetobacter (Gattung)	
Z	Pseudomonas fluorescens	0,962	P. fluorescens	99,1	sehr gute Identifizierung	P. fluorescens Typ F	0,371

3.6 DOC-Abgabe der Testpflanzen

Die DOC-Werte fungierten für die Untersuchungen als Richtwert für die von den Testpflanzen abgegebenen Substanzen.

Abb. 43 (S. 102) gibt eine Gesamtübersicht der über den DOC ermittelten Rhizodeposition der eingesetzten Pflanzen. Jeder Balken gibt den Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) bei bestimmten Verweilzeiten wieder. Der Mittelwert setzt sich mit Ausnahme von *Phragmites australis* (n=9) aus je 5 DOC-Einzelwerten zusammen (die Einzelwerte können dem Anhang, Tab. A-8 entnommen werden). Der DOC ist dabei auf ein durchschnittliches Pflanzenfrischgewicht von 50 g umgerechnet.

Eine quantitative Tendenz bei der Abgabe organischer Substanzen aufgrund unterschiedlicher Verweilzeiten ist aus der Abbildung (s. Abb. 43) nicht deutlich erkennbar. Dies dürfte auf die unterschiedliche Vitalität der Pflanzen, des Weiteren auf die unterschiedlichen Probenahmezeiten und im Wesentlichen auf die Laborbedingungen zurückzuführen sein. Die Vorbereitungen für die Kurzzeitversuche und die Hydroponikbedingungen haben sicherlich einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Rhizodeposition.

Allgemein ist für die Versuchspflanzen eine positive Korrelation zwischen dem Gewicht bzw. der Transpiration der Pflanzen und der DOC-Zunahme gegeben (diese Tendenz ist auch für die Testpflanzen erkennbar, s. Abb. 44, S. 103), d.h., dass eine größere im Wachstum befindliche Pflanze erwartungsgemäß mehr Assimilate über die Wurzeln in die Rhizosphäre abgibt, als eine kleinere Pflanze. Dies trifft jedoch nur für die absoluten Mengen zu. Aus der Literatur ist bekannt, dass die relativen Mengen an Wurzelabscheidungen bei jüngeren Pflanzen höher sind als bei älteren (u.a. GROLEAU-RENAULD et al. 1998).

Zellzahlmessungen zeigten zudem, dass die Zahl der Mikroorganismen mit Erhöhung der Verweilzeit steigt (hier nicht dargestellt), d.h., dass somit der Einfluss der Mikroorganismen auf die Zusammensetzung des gelösten organischen Kohlenstoffs ansteigen dürfte. So konnten JONES u. DARRAH (1993) zeigen, dass insbesondere der Zuckeranteil durch Mikroorganismen nach einer Verweilzeit von 10 Tagen im Vergleich zu einer sterilen Variante um die Hälfte zurückging. Die Konzentrationen anderer Verbindungen wie Aminosäuren, phenolische Verbindungen und Proteine waren in etwa wie zu Versuchsbeginn.

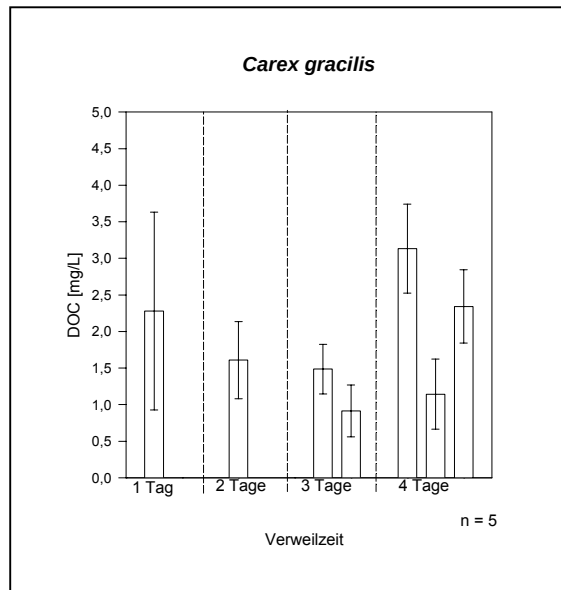
Der Anteil an mikrobiellen Metaboliten im DOC dürfte mit der Verweilzeit der Pflanzen in der Mineralsalzlösung zunehmen. Außerdem ist eine Abnahme der DOC-Menge aufgrund der mikrobiellen Assimilation und Respiration zu vermuten. Auf der anderen Seite konnten MEHARG u. KILLHAM (1995) nachweisen, dass die Rhizode-

position durch Anwesenheit von Mikroorganismen in der Regel signifikant (5%-Niveau) erhöht wurde.

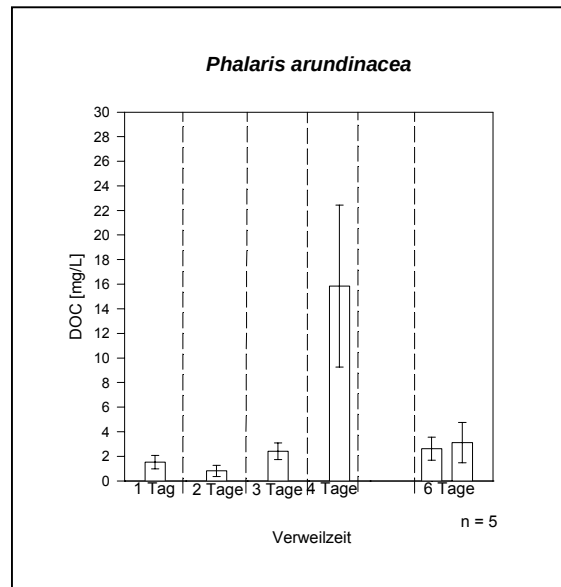
Auch wenn die Mikroorganismen auf die Qualität und Quantität des DOC wirken und dadurch streng genommen keine Aussagen zur Rhizodeposition „pflanzenbürtiger Verbindungen“ gemacht werden können, so dürften die unter unsterilen Bedingungen gewonnenen DOC-Mengen in der Zusammensetzung ihrer Verbindungen jedoch eher der Realität der im Boden vorliegenden Verbindungen entsprechen, als dies unter sterilen Bedingungen der Fall wäre.

Eine DOC-Anreicherung durch Rhizodeposition war auch nach Verweilzeiten von 6 Tagen unter nicht sterilen Bedingungen möglich (s. Abb. 43b).

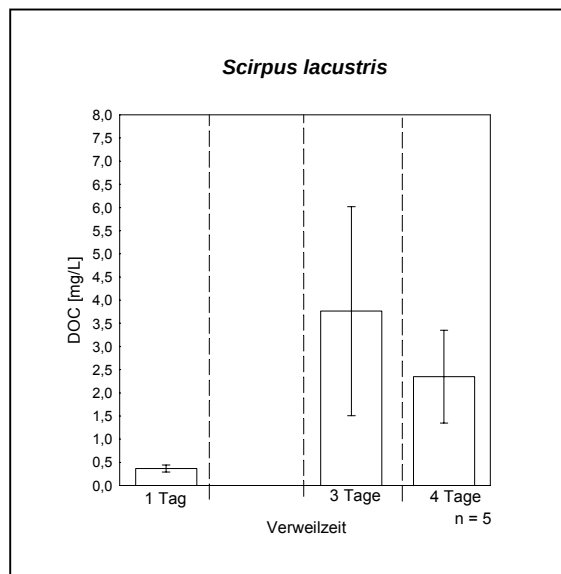
a.



b.



c.



d.

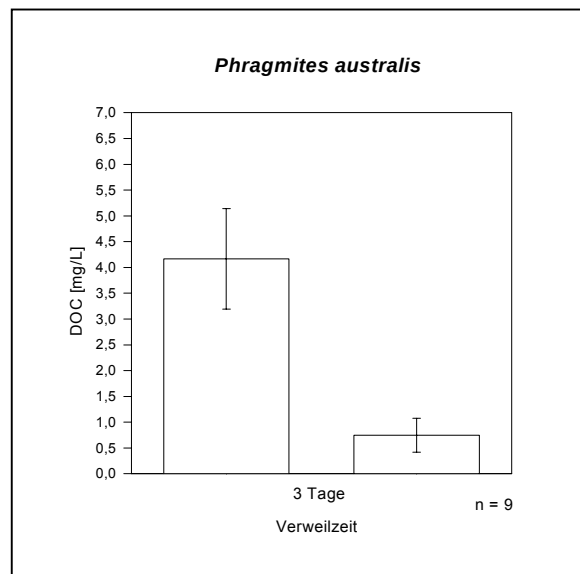


Abb. 43: DOC-Werte der Mineralsalzlösungen, in denen sich verschiedene Pflanzen bei unterschiedlicher Verweilzeit befanden (die DOC-Werte beziehen sich auf ein Pflanzenfrischgewicht von 50g: **a.** *Carex gracilis*, **b.** *Phalaris arundinacea*, **c.** *Phragmites australis* und **d.** *Scirpus lacustris*; arithmetisches Mittel $\pm$ s.

(jede Testreihe wurde mit Ausnahme von *Carex gracilis* für 3 und 4 Tage Verweilzeit, *Phalaris arundinacea* für 6 Tage Verweilzeit und *Phragmites australis* für 3 Tage Verweilzeit einmal durchgeführt: die DOC-Werte von *Carex gracilis* wurden bei 3 Tagen Verweilzeit in 2 Testreihen ermittelt und für 4 Tage Verweilzeit in 3 Testreihen; die DOC-Werte von *Phalaris arundinacea* bei 6 Tagen Verweilzeit und *Phragmites australis* bei 3 Tagen Verweilzeit wurden in 2 Testreihen ermittelt).

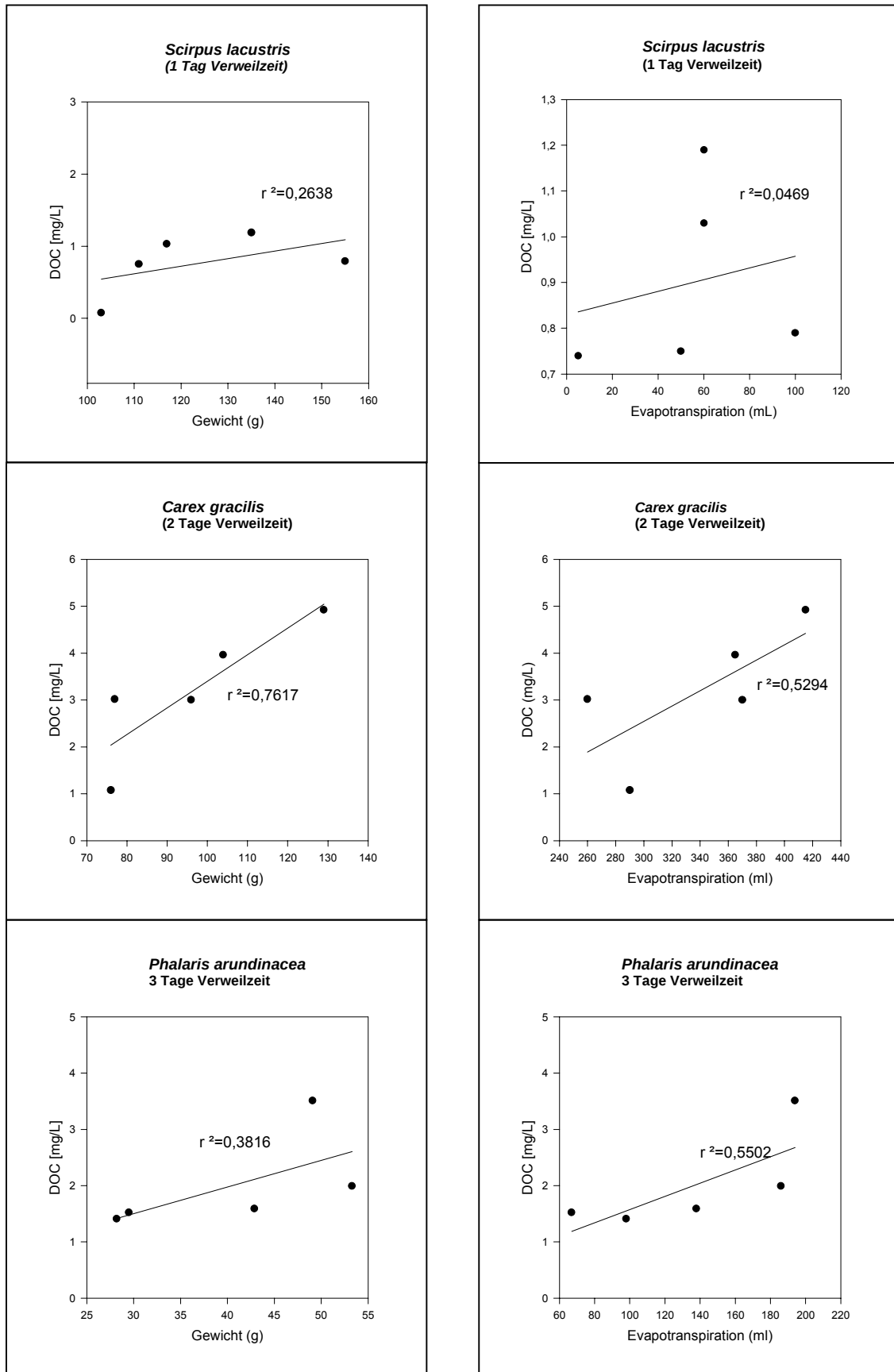


Abb. 44: DOC-Abgabe der Versuchspflanzen bei unterschiedlicher Verweilzeit in Abhängigkeit vom Gewicht und von der Evapotranspiration. Die Messwerte wurden nach unterschiedlicher Verweilzeit in 0,5 L Mineralsalzlösung ermittelt.

4. ABSCHLIEßENDE DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Helophyten, speziell ihrer Wurzelabscheidungen, auf den mikrobiellen Schadstoffabbau in der Rhizosphäre modellhaft zu untersuchen. Dafür wurden die Arten *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis* und *Scirpus lacustris* als Testpflanzen gewählt.

Mit den gewählten Testvarianten sollten Aussagen zur Bedeutung der Pflanzen hinsichtlich des Abbaues verschiedener phenolischer Verbindungen als Modellschadstoffe getroffen werden.

4.1 Einfluss von Helophyten auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bei direkter Exposition der Pflanzen

Für die Helophyten *Phalaris arundinacea* und *Carex gracilis* konnte bei direkter Exposition kein signifikanter Einfluss auf den Abbau der Testsubstanzen Phenol und 2,6-Dimethylphenol festgestellt werden.

Diese Substanzen sind relativ einfach von Bakterien als C-Quelle erschließbar. Sie bieten eine Nährstoffquelle für diverse Bakterien, die von einem Schadstoffeintrag offensichtlich profitieren und selektiert werden. Dies geschieht unabhängig von pflanzlichen Substanzen, die von den gewählten Helophyten abgegeben wurden. Die unter Punkt 3.1.1 in den Phenolabbauversuchen ermittelten KBE-Zahlen sowie die geringere Diversität in den Testbehältern der Referenz (ohne Pflanzeneinfluss) bestärken diesen Eindruck.

Die Untersuchungen verdeutlichen auch, dass die Adsorption an den Wurzeln und die Schadstoffaufnahme über die Wurzeln durch die Pflanzen unter den gewählten Bedingungen nicht von Bedeutung sind, bzw. durch die schnelle bakterielle Nutzung der Schadstoffe nicht zum Tragen kommen.

Im Gegensatz dazu berichten verschiedene Autoren über die Aufnahme phenolischer Verbindungen durch die Pflanzen, bzw. über die Metabolisierung durch pflanzliche Enzyme.

So wurde von SEIDEL (1963, 1968, 1976) postuliert, dass *Scirpus lacustris* Phenole aus dem Wasser entfernt, indem diese von den Pflanzen akkumuliert und mineralisiert werden können. Bei einem Überangebot an Phenolen würden diese über die Stomata abgegeben. Auch O'KEEFE et al. (1987) und WOLVERTON u. MCKOWN (1976) weisen auf die überwiegende Bedeutung der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen beim Phenolabbau durch Wasserhyazinthen (*Eichhornia crassipes*) hin. HAFEZ et al.

(1998) verweisen auf die Bedeutung von Laichkraut (*Potamogeton crispus*) für die Phenoleliminierung, ohne den Einfluss von Mikroorganismen zu berücksichtigen.

KICKUTH (1970) konnte die Metabolisierung von Phenol durch die Pflanze *Scirpus lacustris* nachweisen. Die methodische Vorgehensweise ermöglicht jedoch keine Rückschlüsse zur Bedeutung der Pflanze unter realen Bedingungen. Es wurde bei einem osmotischen Druck von 10 Atmosphären kontinuierlich Phenol in einer Konzentration von 10 mmol/L (das entspricht 941 mg/L Phenol) in das pflanzliche Gewebe injiziert. Dabei nahmen ca. 50 g schwere Pflanzen 4 mg Phenol / 24 h auf (das entspricht 0,4 % der injizierten Phenolkonzentration).

Obwohl eine Aufnahme durch Pflanzen erfolgt und verschiedene pflanzliche Enzyme, wie die Phenolhydroxylase der Alge *Ochromonas danica*, Phenole abbauen können (SEMPLE u. CHAIN 1995) bzw. Peroxidasen Phenole durch Polymerisierung detoxifizieren (FILIP u. PREUSSE 1985, SIQUEIRA et al. 1991, ADLER et al. 1994, DEC u. BOLLAG 1994), zeigen die eigenen Untersuchungen, dass Phenol auch ohne Pflanzen unter natürlichen, also unsterilen Bedingungen, in den Untersuchungsgefäßen ohne erkennbare Adaptationszeit abgebaut wird. Ein signifikanter Einfluss der Pflanzen auf die Schadstoffeliminierung war nicht erkennbar.

Die Bedeutung der Pflanzen bei der Schadstoffeliminierung wird von den genannten Autoren überbewertet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch Untersuchungen von MEISSNER u. FRIEDMANN (1968) und FELGNER u. MEISSNER (1967) sowie NÜMANN (1970) bestätigt. So belegten FELGNER und MEISSNER (1967) in ihren Untersuchungen mit *Scirpus lacustris*, dass bei Phenol-Konzentrationen zwischen 50 und 100 mg/L ein Pflanzeneinfluss nicht nachweisbar ist und widersprachen damit den Arbeiten von SEIDEL (1963, 1968, 1976). NÜMANN (1970) wies nach, dass die Abnahme der Phenolkonzentration mit einer Zunahme der Zellzahlen einhergeht, was für einen mikrobiellen Abbau spricht.

In einer weiteren Arbeit zeigten KAPOOR et al. (1998), dass Phenol mit einer Ausgangskonzentration von 200 mg/L von Mikroorganismen in vier Tagen zu 80 % abgebaut war.

Die Arbeiten von SEIDEL (1963, 1968, 1976) erscheinen außerdem sehr fragwürdig, da sie von einer sichtbaren Abgabe des Phenols über die Stomata berichtet. Eine Abgabe von durch die Wurzeln aufgenommenen organischen Schadstoffen über die Blätter ist jedoch nur unter Laborbedingungen im Spurenbereich nachweisbar und unter realen Bedingung nicht umweltrelevant (BAEDER-BEDERSKI et al. 1999, ORCHARD et al. 2000).

4.2 Einfluss der Rhizodeposition auf schadstoffabbauende Bakterien

Bei den unter Punkt 4.1 genannten Untersuchungen ist der direkte bzw. alleinige Einfluss der Rhizodeposition auf den mikrobiellen Schadstoffabbau nicht untersucht worden, da die Pflanzen ebenfalls schadstoffexponiert waren. Dieser Einfluss sollte durch die gewählten Versuche mit zuvor angereicherten 2,6-Dimethylphenol-abbauenden Bakterien aufgezeigt werden.

4.2.1 Untersuchungen mit dem kontinuierlich durchflossenen Testsystem

Ein Einfluss der Rhizodeposition auf den Schadstoffabbau durch Bakterien wurde mit einem kontinuierlich betriebenen Testsystem untersucht (s. 2.3.2.1 u. 3.2.1).

Mit dem entwickelten System konnte kein Einfluss festgestellt werden.

Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass dieser nicht gegeben ist. Das verwendete System wäre jedoch nur unter der Voraussetzung eines gravierenden Pflanzeneinflusses aussagekräftig gewesen. Ein geringer Einfluss der Pflanzen ist aufgrund ungleicher Bedingungen in den Pflanzenvarianten und der Referenzvariante nicht messbar:

Die unterschiedlichen Bedingungen können auf Ungenauigkeiten der Pumpen; auf einen ungleichmäßigen Ablauf nach Fermenterpassage durch unterschiedliche Adhäsion der Lösungen an den Gefäßausläufen; und insbesondere auf die Transpiration der Pflanzen zurückzuführen sein.

Unterschiedliche Abflusswerte resultieren in einer zu hohen bzw. zu niedrigen Dosierung der Einspritzpumpe (s. Abb. 8, S. 33) und erschweren daher Rückschlüsse auf den Pflanzeneinfluss.

Allgemein nimmt mit dem Pflanzenwachstum die Transpiration zu und damit die messbare Abflussrate ab. Diese unterschiedlichen Abflussmengen wirken sich auf die Auswaschung des Schadstoffes aus. Diese ließe sich zwar durch eine jeweils entsprechende Zudosierung über die Einspritzpumpe ausgleichen, die Verweilzeiten für die Bakterien sind jedoch dann in den zu vergleichenden Fermentern unterschiedlich und somit die Ergebnisse nicht vergleichbar.

Des Weiteren kommt erschwerend hinzu, dass die Konzentration in der Einspritzpumpe bei einem mikrobiellen Schadstoffabbau kontinuierlich verändert werden müsste, da sich mit dem Abbau durch Mikroorganismen die Ausschwemmungsrate des Schadstoffes verringert. Die kontinuierliche Anpassung der Zulaufmenge an die Konzentration im Reaktor war nicht gegeben.

Ein Einfluss von *Carex gracilis* bei einer Konzentration von 20 mg/L 2,6-Dimethylphenol ließ sich nicht feststellen. Die Fortsetzung der Untersuchungen mit diesem System, z.B. mit anderen Pflanzen oder anderen Konzentrationen oder aber durch Verwendung anderer Schadstoffe, wurde aufgrund der genannten Bedingungen und eines zu hohen Zeitaufwandes daher abgebrochen.

4.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der Wurzelabscheidungen in batch-Kulturen

Mit den gewonnenen Wurzelabscheidungen von *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Scirpus lacustris* wurde ein Einfluss auf den Abbau von 2,6-Dimethylphenol untersucht.

Ein Einfluss der Wurzelabscheidungen (Beschleunigung bzw. Verzögerung des Abbaues) konnte dabei zumindest nach Angleichung der pH-Werte in der Nährlösung nicht festgestellt werden.

Ein beschleunigter Abbau wäre theoretisch durch Pflanzenenzyme oder durch Pflanzensubstanzen, die die mikrobielle Abbauproduktivität erhöhen, denkbar gewesen. So konnten DONNELLY et al. (1994) einen positiven Einfluss von Pflanzensubstanzen auf den PCB-Abbau zeigen. SCHNOOR et al. (1995) verweisen auf Pflanzenenzyme, die an der Eliminierung verschiedener Schadstoffe beteiligt sind: z.B. Nitroreduktasen (2,4,6-TNT) und Dehalogenasen (Hexachlorethan) in *Myriophyllum spicatum* und der Alge *Nitella*. Im vorhergehenden Abschnitt wurde bereits auf pflanzenbürtige Peroxidasen und Monohydroxylasen verwiesen, die an der Phenoldekontamination beteiligt sind.

Eine Verzögerung des bakteriellen Abbaues von 2,6-Dimethylphenol wäre ebenfalls möglich gewesen, da die Wurzelabscheidungen zum Teil leicht verwertbare C-Quellen sind und somit bevorzugt von den Bakterien metabolisiert werden könnten.

Außerdem kommen bakterizide Substanzen in pflanzlichen Substanzen vor. So wies CARDENAS (1975) im Helophyten *Iris pseudacorus* Substanzen mit bakterizider Wirkung nach. KICKUTH und KAITZIS (1975) konnten aus dem Rhizomgewebe von *Scirpus lacustris* mikrobiozide Substanzen (Benzoe- und Zimtsäurederivate) isolieren und deren Wirksamkeit für *Escherichia coli* aufzeigen. Obwohl der Nachweis nicht geführt werden konnte, gehen sie von einem Übertritt der Substanzen in die Rhizosphäre aus.

Auch wenn bakterizide Substanzen von verschiedenen Pflanzen durch Rhizodeposition abgegeben werden können, ist fraglich, ob sich deren Konzentration auf bakterielle Abbaugemeinschaften in der Rhizosphäre signifikant auswirken würden.

In mehreren Untersuchungen wird sehr undifferenziert eine Abnahme bakterieller Keime bei Pflanzeneinsatz auf biozide Substanzen zurückgeführt. Auch hinsichtlich dieser These heben sich Arbeiten von SEIDEL (1969, 1971, 1976) hervor.

Die Arbeiten besagen, dass pathogene Keime wie Salmonellen und Enterokokken durch Einfluss verschiedener Pflanzen, u.a. *Alisma plantago*, *Iris pseudacorus*, *Mentha aquatica*, *Phragmites australis* und *Scirpus lacustris* eliminiert werden. Durch Einsatz von 10 getesteten Pflanzenarten, die nicht explizit genannt sind, konnte eine 99 %ige Elimination von *Escherichia coli*-Keimen innerhalb von 48 Stunden nachgewiesen werden (SEIDEL 1971). In weiteren Arbeiten, wie z.B. von VINCENT et al. (1994) und BURGER u. WEISE (1984) wird von der Eliminierung pathogener Keime durch Wasserpflanzen berichtet. Als Pflanzen wurden von VINCENT et al. (1994) *Mentha aquatica*, *Phragmites australis* und *Scirpus lacustris* eingesetzt und BURGER und WEISE (1984) arbeiteten mit *Alisma plantago*, *Acorus calamus*, *Scirpus lacustris* und *Glyceria maxima*. Sowohl in der Arbeit von SEIDEL (1971) als auch bei diesen Arbeiten ist der Nachweis bakterizider Substanzen nicht geführt worden. So ist die Verdrängung der eingebrachten pathogenen Keime durch autochthone Organismen bei den von SEIDEL (1971) und BURGER u. WEISE (1984) durchgeführten Arbeiten nicht auszuschließen, da sie nicht steril arbeiteten, und des Weiteren ist ein Rückgang der Keimzahlen infolge methodischer Fehler denkbar. VINCENT et al. (1994) verglichen die Zellzahlen aus Hydroponikkulturen gegen Referenzen, in denen sich keine Pflanzen befanden. Durch das Einbringen der Pflanzen wird Einfluss auf die Verteilung der Mikroorganismen genommen und damit die repräsentative Erfassung mittels Probennahmen erschwert.

Die Versuche dieser Arbeit ließen allgemein keinen Einfluss bakterizider Substanzen auf die Schadstoffabbauer erkennen. Der einsetzende Abbaustop von 2,6-Dimethylphenol bei direkter Exposition von *Phalaris*-Pflanzen (s. P. 3.1.2) ist nicht auf bakterizide Substanzen zurückzuführen, denn mit den sich anschließenden Versuchen in batch-Kulturen war kein hemmender Einfluss auf die Schadstoffabbauer feststellbar.

Darüber hinaus wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von PRUTZER (1997) Untersuchungen zur bakteriziden Wirkung der Wurzelabscheidungen der Helophyten *Mentha aquatica* und *Scirpus lacustris* durchgeführt. Als Zielorganismen wurden *Pseudomonas putida* als typischer Bodenorganismus und *Escherichia coli* als Indikatororganismus für pathogene Keime gewählt. Für die Untersuchungen wurde der Atmungshemmtest (*Pseudomonas putida*) und eine Gesamtzellzahlermittlung (*Escherichia*

coli) durchgeführt. Mit diesen Methoden konnte eine bakterizide Wirkung der eingesetzten Pflanzen auf die Testbakterien ebenfalls nicht gezeigt werden.

4.3 Untersuchungen zum Einfluss der Rhizodeposition für cometabolische Abbaureaktionen

Die Untersuchungsergebnisse zeigen für die gewählten Testschadstoffe, dass die wesentliche Bedeutung der pflanzlichen Substanzen in ihrer Funktion als bakterielles Wachstumssubstrat für Schadstoffabbauer liegt.

Der Abbau der Verbindung 4-Chlorphenol wird erst durch die Wurzelabscheidungen der gewählten Helophyten für bestimmte Mikroorganismen (hier die von *Phalaris arundinacea* gewonnenen und getesteten Arten *Acinetobacter baumannii*, *Ralstonia* sp. sowie der Referenzorganismus *Ralstonia eutropha*, DSMZ Stamm 5536) ermöglicht.

Für die Art *Ralstonia eutropha* zeigten HILL et al. (1996) den cometabolischen Abbau. Dabei wurde 4-Chlorphenol mit Phenol als Wachstumssubstrat über den meta-Abbauweg metabolisiert und Phenol fungierte als Wachstumssubstrat für die Hydroxylierung des 4-Chlorphenols zu 4-Chlorcatechol. Diese Verbindung wurde dann über die meta-Spaltung des aromatischen Ringes weiter degradiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Isolate (*Acinetobacter baumannii* u. *Ralstonia* sp.) von Wurzeln gewonnen, die ein dem DSMZ Stamm *Ralstonia eutropha* analoges Verhalten im cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol zeigten. Die Untersuchungen zur Metabolisierung des 4-Chlorphenols durch die von der Pflanze isolierten Reinkulturen mit Hilfe der UV-Vis Absorptionsspektren weisen jedoch auf den Abbauweg über die ortho-Spaltung des aromatischen Ringes hin.

Die Definition des Cometabolismus wurde nach Studien mit methanverwertenden Mikroorganismen entwickelt. Für das Bakterium *Pseudomonas methanica* konnten LEADBETTER u. FOSTER (1958, 1960 in DALTON u. STIRLING 1982) zeigen, dass es Ethan oxidieren, aber nicht als alleinige C- und Energiequelle nutzen kann. Es beansprucht dafür Methan als Wachstumssubstrat

Für das Beispiel mit Methan ist es die Methan-Monooxygenase, die durch ihre geringe Spezifität die Oxidation einer Vielzahl halogener aliphatischer und aromatischer Verbindungen ermöglicht (Cooxidation) (DALTON u. STIRLING 1982, CRIDDLE 1992, SEMPRINI u. MCCARTY 1992). Für die Insertion des Sauerstoffs in die zu metabolisierende Verbindung ist NAD(P)H als Elektronencarrier erforderlich (DALTON u. STIRLING 1982).

Analog zu dem Beispiel des cometabolischen Abbaues durch methanotrophe Mikroorganismen wird folgender Abbau für 4-Chlorphenol postuliert (s. Abb. 45):

Durch Anwesenheit eines Cosubstrates (Phenol oder Wurzelabscheidungen) oder durch den Cometaboliten selbst (WANG u. LOH 1999) erfolgt die Induktion des Enzyms, das einen bakteriellen Abbau des 4-Chlorphenols ermöglicht. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine unspezifische Monooxygenase (Phenolhydroxylase), die an den Cometaboliten (hier: 4-Chlorphenol) bindet und die Transformation zu 4-Chlorcatechol ermöglicht. Die Insertion des O_2 würde ohne die Oxidation des Phenols bzw. der Rhizodepositionsprodukte (Cosubstrat) nicht oder nur geringfügig durch Oxidation von phenolinduzierter Biomasse erfolgen (SÁEZ u. RITTMANN 1991, 1993).

Es wird angenommen, dass aufgrund der Unspezifität des Enzyms, Cometabolit und Cosubstrat um das Enzym konkurrieren. Das heißt, bei einem hohen Verhältnis von Cosubstrat (Phenol) zu Cometabolit (Chlorphenol) dominiert das Cosubstrat bei der Anlagerung an das Enzym mit der Folge, dass der Cometabolit erst nach Verbrauch des Cosubstrates vollständig degradiert werden kann (LOH u. WANG 1998). Die Degradation wird nach der Vorstellung von SÁEZ u. RITTMANN (1993) noch zusätzlich dadurch behindert, dass das gebildete oxidierte Phenolintermediat ebenfalls um das Enzym konkurriert; liegt das Cosubstrat dagegen in nur geringer Konzentration im Vergleich zum Cometaboliten vor, kann der Fall eintreten, dass der Cometabolit an das aktive Zentrum des Enzyms bindet und damit die Oxidation des Wachstumssubstrates herabgesetzt wird. Dadurch unterbleibt auch die Regenerierung des $NADP^+$ (s. Abb. 45) und das Chlorphenol hemmt somit seine eigene Transformation. Diese „kompetitive Hemmung“ ist reversibel (SÁEZ u. RITTMANN 1991) und kann z.B. durch Erhöhung der Konzentration des Wachstumssubstrates rückgängig gemacht werden.

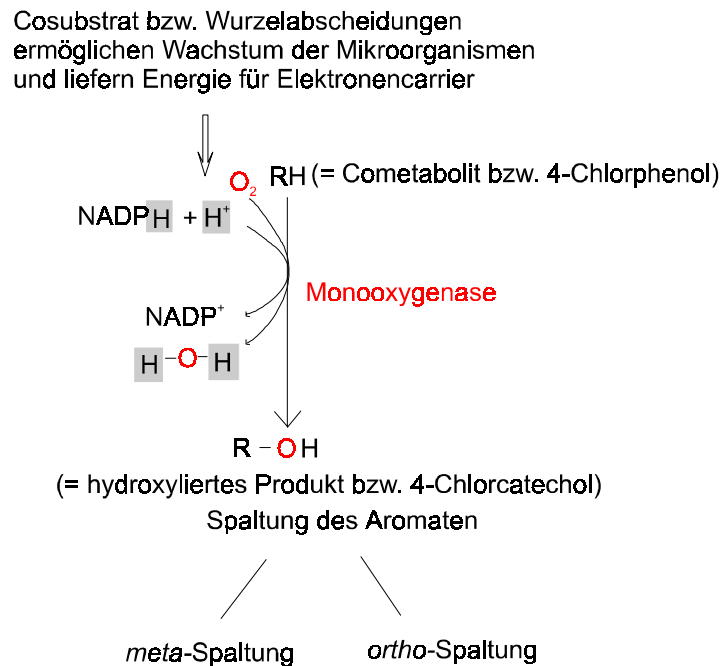


Abb. 45: Schematische Darstellung der cometabolischen Transformation von 4-Chlorphenol (RH) zu 4-Chlorcatechol (R-OH). Das Cosubstrat ist biochemisch betrachtet NADPH+H⁺, das die H-Atome liefert (schattiert), mit denen das nach der Hydroxylierung verbleibende O-Atom zu H₂O reduziert wird

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass die Enzyminduktion für den 4-Chlorphenol-Abbau entweder durch Phenol, 4-Chlorphenol oder durch Wurzelabscheidungen erfolgt. Die Induktion durch Wurzelabscheidungen ließe sich auf den hohen Anteil phenolischer Verbindungen sowie phenolischer Derivate in pflanzlichen Substanzen zurückführen. So sind u.a. Flavone, Anthocyane und Katechylene als phenolische Bestandteile in pflanzlichen Geweben (FILIP u. PREUSSE 1985) enthalten und eine Vielzahl weiterer phenolischer Verbindungen in Exsudaten identifiziert worden (s. Abschnitt 1.2).

Das Cosubstrat ist darüber hinaus erforderlich als Energielieferant (Elektronendonator) für die Monooxygenasereaktion, bei der 4-Chlorphenol zu 4-Chlorcatechol hydroxyliert wird.

Des Weiteren kann eine Hemmung der Primärsubstratnutzung (der Oxidation des Primärsubstrates Phenol) durch den Cometaboliten erfolgen und damit auch dessen eigener Abbau gestoppt werden (Selbstinhibition) (SÁEZ u. RITTMANN 1993).

4.4 Bakterien der Versuchspflanzen

Die Identifizierung der Mikroorganismen wurde durch die Anwendung verschiedener Methoden ermöglicht. Voraussetzung für die Identifizierung war eine gute Kultivierbarkeit auf dem Komplexnährboden (R2A) und damit ein relativ gutes Wachstum um entsprechende Mengen der Reinkulturen für die Auswertung in den Testsystemen zur Verfügung zu haben.

Für die langsam wachsenden Bakterienkolonien, unter denen sich häufig Gram-positive befanden, war eine Zuordnung nicht möglich.

Der Einsatz der Systeme Biolog, API und die Fettsäureanalyse, der Vergleich der erzielten Ergebnisse mit diesen Systemen untereinander, sowie die darüber hinaus durchgeführten Tests hinsichtlich verschiedener Stoffwechseleigenschaften, ermöglichten von den insgesamt gewonnenen Isolaten eine Zuordnung zu den unter Punkt 3.5.1 aufgeführten Bakterienarten.

Die durchgeführte PCR-DGGE konnte aufgrund der erzielten Banden der eingesetzten Reinkulturen nur wenig zur Identifizierung der Arten beitragen. Die Sequenzierung der für die PCR amplifizierten 16S rDNA des mit H benannten Isolates ermöglichte dafür aber die Zuordnung zu *Ralstonia* sp.. Dieser Stamm war schadstoffabbaurelevant und wurde für die Versuche zum cometabolischen Abbau von 4-Chlorphenol eingesetzt.

Es ist allgemein schwierig, Aussagen über das Artenspektrum der Rhizosphärenbakterien zu treffen. In Lehrbüchern und einer Vielzahl von Arbeiten (ANDERSON et al. 1993, TATE 1995, ATLAS u. BARTHA 1998) wird das typische Artenspektrum mit einem Übergewicht an Gram-negativen Bakterien, die wiederum von *Pseudomonaden* dominiert werden, angegeben. Diese Angaben sind zweifelhaft, insbesondere da sich bei direkten Zählungen zeigte, dass lediglich 0,1 bis 10 % der Bakterien durch die konventionelle Kultivierungstechnik erfaßt werden (FOSTER 1986, HEAD et al. 1998).

Die identifizierten Mikroorganismen und der eingesetzte Testorganismus *Ralstonia eutropha* sind weitverbreitete Wasser- und Bodenorganismen.

Für die Gattungen *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* und *Comamonas* ist die Fähigkeit zum Abbau aromatischer Xenobiotica nachgewiesen worden.

Insbesondere die Arten *Pseudomonas putida* und *P. fluorescens*, die als Primärsiedler von Pflanzenwurzeln beschrieben sind, gelten als typische Abbauer unterschiedlichster Xenobiotika. Neben der katabolischen Nutzung relativ leicht abbaubarer Substanzen wie Phenol, werden persistenteren Verbindungen zu einem großen

Teil cometabolisch transformiert. So zeigten DAPAAH u. HILL (1992) und SÁEZ u. RITTMANN (1991) für 4-Chlorphenol, dass es mit Phenol als Wachstumssubstrat von einem *P. putida* Stamm abgebaut werden konnte.

In einer Arbeit von CROWLEY et al. (1996) gibt es Hinweise, dass ein cometabolischer Abbau von 2,5-Dichlorbenzoat nur durch Nutzung von Exsudaten als Wachstums-substrat möglich ist. Die Eignung der Exsudate wird in dieser Arbeit auf die struktur-analogen Verbindungen in Pflanzenlignin zurückgeführt.

Acinetobacter ist wie *Pseudomonas* eine Gattung, die eine Vielzahl organischer Schadstoffe zu metabolisieren vermag. Ein cometabolischer Abbau durch *Acineto-bacter* sp. wurde von ADRIAENS u. FOCHT (1991) für 3,4-Dichlorbenzoat gezeigt.

Für *Comamonas testosteroni* beschreibt BAE et al. (1996) den vollständigen Abbau von 4-Chlorphenol über den meta-Abbauweg, wobei der Abbau unter Zugabe von Phenol beschleunigt verläuft.

Der cometabolische Abbau von 4-Chlorphenol konnte in der vorliegenden Arbeit für *Ralstonia eutropha* (Testbakterium von der DSMZ Braunschweig, Stamm 5536) und für die von der *Phalaris*wurzel gewonnenen und identifizierten Arten *Acinetobacter baumannii* und *Ralstonia* sp. gezeigt werden. Dabei lassen die UV-Vis Absorptions-spektren der schadstoffhaltigen Mineralsalzlösungen während des Abbaues für das Isolat *Ralstonia* sp. und *Acinetobacter baumannii* auf einen Abbau über die ortho-Spaltung des aromatischen Ringes schließen. Im Gegensatz dazu, erfolgt der 4-Chlorphenol-Abbau durch *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) über die energetisch weniger effektive meta-Spaltung.

Phenol und 2,6-Dimethylphenol wurden von den Bakterien direkt verwertet und wirkten sich positiv auf die Zellzahl aus.

Bei langfristiger und relativ hoher Exposition bildete sich an der Wurzel eine Schleim-schicht, die insbesondere unter dem Aspekt von „clogging Effekten“ für den techni-schen Einsatz von Pflanzen in Pflanzenkläranlagen zu berücksichtigen ist, da dieser Effekt Einfluss auf die hydraulische Bodendurchlässigkeit hat.

4.5 Rhizodeposition

Der DOC wurde als Richtwert für die Abgabe organischer Kohlenstoffverbindungen durch die Pflanzen bestimmt. Mit dem DOC werden neben Stoffklassen wie Zucker und organische Säuren zum Teil auch Substanzen wie Cellulosen, Lignine, Hemicellulosen und Lignocellulosen erfaßt (EGLI 1995).

Da bei der Gewinnung des gelösten organischen Kohlenstoffs nicht steril gearbeitet wurde, setzen sich die gemessenen DOC-Werte nicht ausschließlich aus den pflanzenbürtigen Substanzen zusammen. Ein Eintrag mikrobiell metabolisierter Verbindungen in die ermittelten DOC-Werte ist gegeben. So ist davon auszugehen, dass insbesondere die leicht verwertbaren Zuckerbestandteile der Wurzelabscheidungen von Mikroorganismen metabolisiert werden und ein Teil als CO₂ verloren geht. In Versuchen mit Maispflanzen konnten JONES und DARRAH (1993) zeigen, dass bei einer Verweilzeit von 10 Tagen der Zuckeranteil im Vergleich zu einer sterilen Referenz nur noch halb so hoch war. Bei ihren Untersuchungen zeigte sich auch, dass andere Verbindungen wie phenolische Substanzen, Aminosäuren und Proteine in der Quantität kaum Unterschiede zu einer sterilen Variante aufwiesen und damit in diesem Zeitraum mikrobiell nicht verwertet wurden.

In diesem Zusammenhang sei aber darauf hingewiesen, dass u.a. MEHARG u. KILHAM (1995) für Weidelgras (*Lolium perenne*) zeigten, dass Mikroorganismen die Rhizodeposition der Pflanzen fördern. Das belegte auch die Arbeit von JONES und DARRAH (1993). Unter unsterilen Bedingungen wurde eine höhere Rhizodeposition nachgewiesen. Außerdem wird durch Mikroorganismen das Wachstum der Pflanzen verbessert (LYNCH 1982), was ebenfalls zur Erhöhung der Rhizodeposition beiträgt.

Die erfaßten Messwerte können aufgrund der artifiziellen Bedingungen nur als Richtwerte für die tatsächliche Rhizodeposition von Pflanzen dienen. Insbesondere bei hohen Verweilzeiten (wie z.B. 6 Tage) ist mit einem verstärkten Abbau bzw. einer zunehmenden Metabolisierung durch Mikroorganismen zu rechnen. Des Weiteren ist bei ansteigender Verweilzeit von einer Abnahme der Diffusion pflanzlicher Substanzen in die Testlösung auszugehen. Von JONES u. DARRAH (1993) wird darüber hinaus auf „Re-Sorptionseffekte“ (Wiederaufnahme abgegebener Substanzen durch die Pflanzen) unter Laborbedingungen hingewiesen. Die Menge ist dabei abhängig von der Verweilzeit der Pflanzen in den Testgefäßen und von dem Verhältnis der Wurzeloberfläche zu dem Volumen der Mineralsalzlösung.

Trotz der möglichen Einschränkungen zeigt sich, dass die gemessenen Werte im Bereich der in der Literatur angegebenen Messdaten liegen.

An dieser Stelle sei vermerkt, dass auch in den Veröffentlichungen zu dieser Thematik eine Vielzahl von Methoden zur Erfassung der Rhizodeposition zu finden ist. Die Quantitätsangaben variieren dabei stark. Dies ist u.a. auf unterschiedliche methodische Verfahren zurückzuführen, des Weiteren auf die verschiedenen Pflanzenarten, die für die Untersuchungen eingesetzt wurden, sowie vom Alter und den Kultivierungsbedingungen der Pflanzen abhängig.

^{14}C -Untersuchungen lassen auf Mengen zwischen 7 % und 40 %, bezogen auf den photosynthetisch assimilierten Kohlenstoff, schließen (u.a. LYNCH 1982, BÖTTGER u. RENSCH 1987, UREN u. REISENAUER 1988, TINKER u. BARRACLOUGH 1991, SHIMP et al. 1993, GRAYSTON et al. 1996, für *Phragmites australis* RICHERT et al. 2000). Der DOC gibt dabei nur einen Teil der Rhizodeposition wieder, da bis zu 85 % aufgrund sofortiger mikrobieller Respiration nicht erfaßt werden (MERBACH et al. 1999). Zusätzlich sind Anteile von 5 % bis 10 % auf Kalyptramaterial, zerfallende Wurzelhaare, feine Wurzeln und abgestreifte cortikale sowie epidermale Zellen zurückzuführen, die mikrobiell nur schwer und damit nur zeitlich versetzt, erschließbar sind.

TINKER u. BARRACLOUGH (1991) geben in einer Übersichtsarbeit Kohlenstoffabgaben in Form wasserlöslicher Verbindungen (entspricht dem DOC) von 1 bis 2 % bezogen auf das Pflanzengewicht an und liegen damit über den Messwerten von BOWEN u. ROVIRA (1976) und JACOB et al. (1995), die für Weizenpflanzen ca. 0,5 % ermittelten oder JORDAHL et al. (1997), die für Pappeln einen Anteil von 0,25 % ermittelten.

Die in dieser Arbeit ermittelten DOC-Werte lassen für die Versuchspflanzen *Carex gracilis* und *Phalaris arundinacea* pro Tag eine Abgabe, die im Bereich von 0,5 bis 2 mg/L DOC und für *Scirpus lacustris* im Bereich von 0,5 bis 1 mg/L DOC liegt, realistisch erscheinen (s. Abb. 43, S. 102). Bezogen auf den Gewichtszuwachs der Pflanzen während einer Versuchsdauer von 60 Tagen läßt sich hieraus, nach Ermittlung der spezifischen Wachstumsraten der Pflanzen (s. Abb. 46), die prozentuelle Rhizodeposition wasserlöslicher Substanzen bezogen auf die Photosynthesenetttoproduktion ermitteln.

Die Prozentwerte wurden über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen ermittelt. Als Bezugsgröße wurde das Trockengewicht der Pflanzen gewählt. Die ermittelten Werte werden durch Tab. 14 wiedergegeben (die Berechnung der Werte ist Tab. A-9 im Anhang entnehmbar).

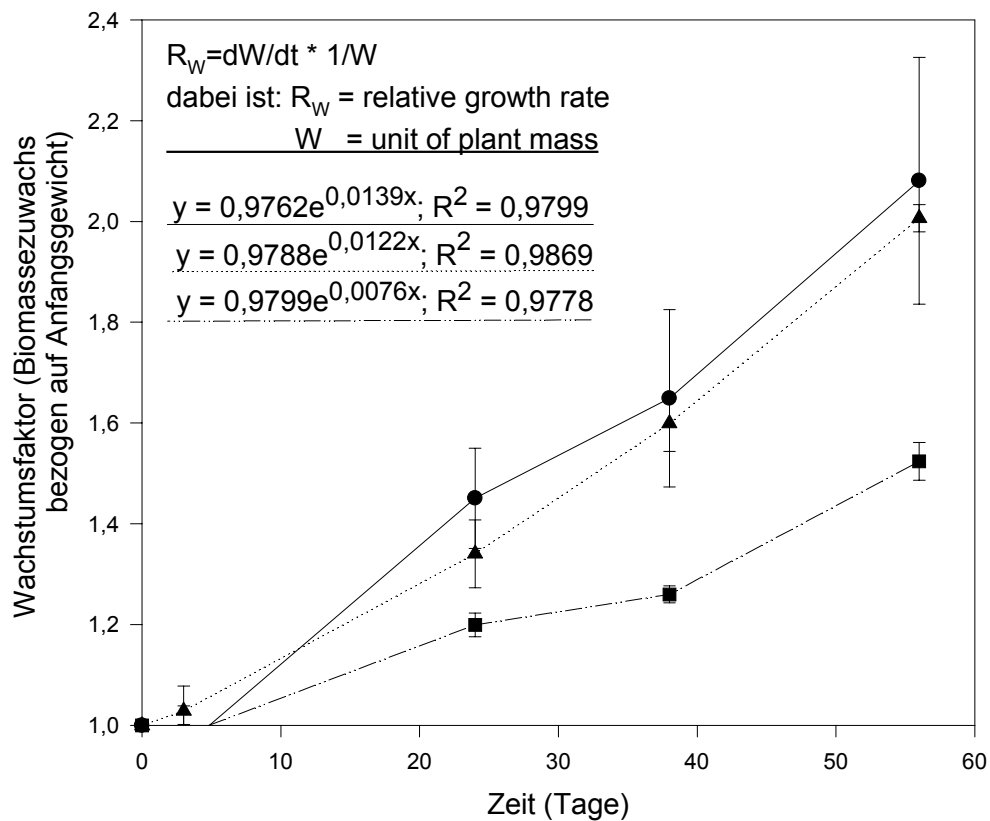


Abb. 46: Biomassezuwachs von *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Scirpus lacustris* über einen Zeitraum von 2 Monaten; arithmetisches Mittel $\pm$ s, n = 5

—●— *Carex gracilis* ▲..... *Phalaris arundinacea* -■- *Scirpus lacustris*

Tab. 14: Prozentuale Rhizodeposition gelösten organischen Kohlenstoffs der Versuchspflanzen bezogen auf die Trockengewichtszunahme der Pflanzen

Rhizodeposition/Tag	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
<i>Carex gracilis</i>	0,26 – 0,29	0,52 – 0,58	1,03 – 1,15
<i>Phalaris arundinacea</i>	0,30 – 0,33	0,60 – 0,66	1,19 – 1,32
<i>Scirpus lacustris</i>	0,50 – 0,53	1,00 – 1,06	—

Die ermittelten Werte liegen mit einem Minimalwert von 0,26 % (*Carex gracilis* bei einer täglichen Rhizodeposition von 0,5 mg/L) und einem Maximum von 1,32 % (*Phalaris arundinacea* bei einer täglichen Rhizodeposition von 2 mg/L) im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte. Die Tabelle verdeutlicht aber auch die großen Spannweiten der Werte in Abhängigkeit von der angenommenen DOC-Abgabe und vom Pflanzengewicht.

Unter natürlichen Bedingungen im Freiland variiert die Nettoprimärproduktion der Helophyten aufgrund der Vielzahl von Faktoren, welche Einfluss auf das Wachstum nehmen, stark. So gibt RODEWALD-RUDESCU (1974) für Schilf (*Phragmites australis*) eine jährliche Trockengewichtszunahme von 500 bis 4300 g / m² und Jahr an.

RUTH u. TRESCKOW (1991) geben für *Phalaris*-Flächen Trockengewichtszunahmen an, die in Abhängigkeit von der Bewirtschaftung und der Jahreszeit zwischen 525 und 600 g / m² und Jahr liegen. Bei einer angenommenen Trockengewichtszunahme von 550 g / m² und Jahr, was einem täglichen Zuwachs von 3,06 g bei einer angenommenen Vegetationsperiode von 180 Tagen entspricht, würde dies auf die *Phalaris*-Versuchspflanzen übertragen bedeuten, dass während der Vegetationsperiode täglich minimal 9,18 mg (bei 0,30 % Trockensubstanzzuwachs) bzw. maximal 40,39 mg (bei 1,32 % Trockensubstanzzuwachs) an Kohlenstoff abgegeben wird.

Die gesamte Rhizodeposition liegt über ein Jahr gesehen um ein Vielfaches höher, da durch die DOC-Messungen nur der im Wasser verbliebene lösliche Kohlenstoffanteil und damit nur wenige Prozent der Rhizodeposition erfaßt wurden (s. Abschnitt 1.2).

LYNCH u. WHIPPS (1990) geben für Grasflächen eine Rhizodeposition von insgesamt 1,3 t C / ha und Jahr an. Das entspricht bei einer angenommenen Vegetationsperiode von 180 Tagen einer täglichen Kohlenstoffabgabe von 700 mg/m².

4.6 Zusammenfassende Bewertung der Rhizodeposition für den bakteriellen Schadstoffabbau und Schlussfolgerungen

Die Bedeutung der Rhizodeposition für den mikrobiellen Schadstoffabbau in der Rhizosphäre ist in Abhängigkeit von den Schadstoffen und deren Konzentrationen unterschiedlich zu bewerten.

Für mikrobiell relativ leicht abbaubare Verbindungen wie Phenol haben die Versuche bei den gewählten Konzentrationen keinen positiven Einfluss von durch Pflanzen abgegebene Substanzen gezeigt. Verbindungen wie Phenol sind für viele Mikroorganismen direkt als C-Quelle verwertbar und erfordern für den Abbau kein zusätzliches Substrat.

Wahrscheinlicher ist der gegenteilige Effekt, nämlich die Verzögerung des Abbaus aufgrund möglicher pH-Absenkungen durch die Rhizodeposition der Pflanzen. Dieser könnte insbesondere für wenig gepufferte Böden, für die pH-Absenkungen um 1 bis 2 Einheiten aufgrund des Rhizosphäreneinflusses gemessen wurden, einsetzen (FOSTER 1986, KUNTZE et al. 1988).

Für den Abbau persistenter Verbindungen haben pflanzliche Substanzen eine größere Bedeutung. Während Enzyme für leicht abbaubare Substanzen allgemein konstitutiv vorliegen, erfordert der mikrobielle Abbau persistenterer Verbindungen häufig die Induktion entsprechender Enzyme. Aufgrund strukturanaloger Verbindungen, die durch die Rhizodeposition freigesetzt werden, können Adaptationszeiten an die Schadstoffe durch wurzelassoziierte Mikroorganismen verkürzt sein, d.h. die Expression abbauender Enzyme verläuft schneller. Verschiedene Arbeiten stützen diese Hypothese (HSU u. BARTHA 1979, KNACKMUSS 1981, JANKE u. FRITSCH 1985, ALVEY u. CROWLEY 1996).

Des Weiteren können die pflanzlichen Substanzen als Wachstumssubstrate für pflanzenassoziierte Bakterien die Metabolisierung persistenter Verbindungen beschleunigen oder gar erst ermöglichen.

Da mit der vorliegenden Arbeit die Eignung von Rhizodepositionsprodukten als Wachstumssubstrat gezeigt wurde, ist auch für Schadstoffkonzentrationen, die unterhalb der für den bakteriellen Abbau erforderlichen Grenzkonzentrationen liegen (unterhalb dieses Wertes findet kein Wachstum und keine Teilung der Bakterien statt), durch die von den Pflanzen abgegebenen Substanzen als zusätzliche Kohlenstoffquelle ein simultaner Abbau dieser Schadstoffe nicht auszuschließen. Untersuchungen verschiedener Autoren zeigten, dass bei Substratmengen, die unterhalb der für das Bakterienwachstum erforderlichen Konzentrationen liegen, durch Zugabe spezifischer Kohlenstoffquellen ein simultaner Abbau der in Grenzkonzentration vorliegenden Verbindungen erfolgte. Die simultane Verwertung kann auch oberhalb

von Grenzkonzentrationen (in Abhängigkeit der Substratverhältnisse) zu einer Beschleunigung des Abbaus führen (SCHMIDT u. ALEXANDER 1985, SCHMIDT et al. 1985, SCHMIDT et al. 1987, EGLI 1995, KOVÁROVÁ u. EGLI 1997).

Für persistente Verbindungen und für Schadstoffe, die in zu geringer Konzentration vorliegen, um bakteriell genutzt zu werden, können pflanzliche Substanzen somit eine wichtige Funktion für den Abbau haben. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass organische Fremdstoffe in Spuren weit verbreitet in natürlichen Wässern vorliegen (micropollutants), ist die mögliche Bedeutung der Pflanzen hervorzuheben. Auch bei „shock loadings“, wie unerwartete Einträge von Xenobiotika in Oberflächenwasser, wäre ein positiver Einfluss der Pflanzen auf den Schadstoffabbau durch die Rhizodepositionsprodukte oder durch Mikroorganismen, die durch zu Schadstoffen strukturanalogen Rhizodepositionsprodukten präadaptiert sind, vorstellbar.

Aus einem beschleunigten Abbau von Schadstoffen unter Pflanzeneinfluss, der in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, läßt sich noch nicht die Eignung zur technischen Umsetzung für Sanierungsmaßnahmen herleiten. In einer Arbeit von WACKETT u. ALLAN (1995) wird für viele Beispiele eines pflanzenfördernden Einflusses auf den Schadstoffabbau gezeigt, dass die Abbauraten dennoch viel zu gering sind, um für eine Sanierung relevant zu sein.

Die Bedeutung der Wurzelabscheidungen von Helophyten ist unter dem Gesichtspunkt einer Sanierung bzw. für den Betrieb technischer Anlagen (z.B. Pflanzenkläranlagen) eher als gering einzuschätzen, da in diesen der Schadstoffabbau nach Überbrückung einer eventuell erforderlichen Adaptationszeit kontinuierlich erfolgen kann oder weil bereits adaptierte Mikroorganismen als Inokulum eingesetzt werden können. Cometabolisierende Mikroorganismen sind in technischen Anlagen gegenüber den Direktverwertern kaum konkurrenzfähig und wären hinsichtlich des Abbaues auch weniger effektiv (BOYLE 1989, JANKE u. FRITSCH 1989). Des Weiteren ist davon auszugehen, dass schadstoffhaltige Abwässer bereits eine relativ hohe DOC-Fracht aufweisen und die Abgabe durch die Pflanzen kaum von zusätzlichem Gewicht sein dürfte. Sollten für den Abbau der Schadstoffe dennoch spezifische Wachstumssubstrate erforderlich sein, könnten diese in technischen Anlagen gezielt hinzugegeben werden. Die Bedeutung der Rhizodeposition ist für eine Nachreinigung, z.B. in Schönungsteichen, für in Spuren vorliegende Schadstoffe, die nicht kontinuierlich anfallen, bei geringen DOC Frachten am ehesten vorstellbar.

Dann ist jedoch zu bedenken, dass die Abgabe gelösten organischen Kohlenstoffs vom Wachstum der Pflanzen abhängt und damit periodisch stark variiert. Das bedeutet, dass bei Wachstumsstagnation (z.B. Herbst und Winter) kaum eine Abgabe organischer Verbindungen erfolgt.

Die weitaus wichtigere Bedeutung der Pflanzen für Sanierungsmaßnahmen dürfte in der durch die Wurzeln gegebene Besiedlungsfläche für Mikroorganismen liegen. Des Weiteren werden durch die „Siebwirkung“ der Pflanzen Schwebstoffe aus dem fließenden Wasser entfernt und in Folge der Durchwurzelung Porenraum geschaffen, wodurch ein positiver Einfluss auf das Mikromilieu für potenzielle Schadstoffabbauer gegeben ist. Dieser kann bei Einsatz von Helophyten durch den möglichen O₂-Eintrag in die Rhizosphäre noch erhöht werden.

In Abhängigkeit von der Toxizität der Schadstoffe auf die einzusetzenden Pflanzen ist der Einsatz von Helophyten für Sanierungsmaßnahmen möglich.

Für Wasserpflanzen wie *Eichhornia crassipes* (Wasserhyazinthen) und *Scirpus lacustris* konnte eine hohe Belastbarkeit bei Phenolexposition gezeigt werden. *Eichhornia crassipes* toleriert bis zu 200 mg/L Phenol (O'KEEFE et al. 1987) und *Scirpus lacustris* bis zu 500 mg/L Phenol (SEIDEL 1968). Bei dieser Konzentration ist jedoch bis auf wenige Ausnahmen die Toxizitätsgrenze sowohl für Pflanzen als auch für abbauende Bakterien erreicht.

Untersuchungen von KAPOOR et al. (1998) mit *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia* sp. und *Yersinia* sp. zeigten, dass 200 mg/L Phenol für *P. fluorescens* toxisch waren, während die drei anderen Mikroorganismen bis zu 400 mg/L Phenol abzubauen im Stande waren.

Die abbaufördernde Bedeutung von Helophyten für die Reinigung belasteter Böden und Wässer ist bekannt und vielfach beschrieben worden. Diese Pflanzen werden seit vielen Jahren für die Degradation, insbesondere für die leicht abbaubarer Schadstofffrachten, in Pflanzenkläranlagen genutzt.

Der Bereich der Interaktion der Pflanze über ihre Wurzeln bzw. über das Rhizom mit den Mikroorganismen und ein dadurch bedingter Effekt auf einen Schadstoffabbau ist trotzdem wenig untersucht und im Detail damit nicht verstanden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten Effekte der Rhizodepositionsprodukte auf den Schadstoffabbau und insbesondere ihre Bedeutung für cometabolische Prozesse aufgezeigt werden.

Damit konnten die wenigen Arbeiten, die einen fördernden Einfluss von pflanzlichen Substanzen auf den bakteriellen Schadstoffabbau vermuteten oder zeigten, für Helophyten bestätigt werden. Durch Wahl des Referenzorganismus *Ralstonia eutropha* (DSMZ Stamm 5536) konnte im Vergleich zu den von der Pflanze *Phalaris arundinacea* gewonnenen Bakterien *Ralstonia* sp. und *Acinetobacter baumannii* der Abbau auf cometabolische Mechanismen zurückgeführt werden.

Für die durchgeführten Untersuchungen ist einschränkend festzuhalten, dass sie nur Einblicke in das komplexe System der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Pflanzen und das sie umgebende Medium geben. So sind über die Funktionen des Bodens bei Schadstoffexposition keine Aussagen machbar, da zur Vereinfachung der Versuche Hydroponikbedingungen gewählt wurden.

Bei Einschluss des Faktors Boden wären Aussagen zur Funktion der Wurzelabscheidungen auf den mikrobiellen Abbau nur schwer zu erbringen, insbesondere aufgrund der Adsorptionsmöglichkeiten der Schadstoffe im Boden und des Vorhandenseins bzw. der Bildung von inhomogenen Bereichen und einer damit erschwerten Analytik. Des Weiteren wurde nur der Einfluss ausgewählter Testschadstoffe auf eine bestimmte Pflanze getestet. In Sanierungsfällen ist aber in der Regel von einer Vielzahl unterschiedlicher C-Substrate, Pflanzen und einer hohen Mikroorganismendiversität auszugehen.

Die gewählten Untersuchungsmethoden geben aber Einblicke in die Bedeutung von Helophyten für den Abbau von Schadstoffen durch Mikroorganismen.

Damit ist aber auch ein Feld zukünftiger Arbeiten im Bereich der Rhizosphären-degradation aufgezeigt. Dieses dürfte neben Untersuchungen mit weiteren Schadstoffen und Pflanzen in der Erweiterung methodischer Möglichkeiten liegen, um das ganze Potenzial der Rhizosphärendegradation zu erschließen. Weitere Untersuchungen unter Einbindung innovativer mikrobiologischer und analytischer Methoden könnten einem Verständnis der Interaktion von Organismen (Pflanze, Mikroorganismen, Makroorganismen) in der Rhizosphäre unter realitätsnahen Bedingungen dienen. Dieses Verständnis ist eine Grundvoraussetzung dafür, Verbesserungen bei der Sanierung unter Einsatz von Pflanzen zu erzielen.

5. Literaturverzeichnis

- Adler PR, Arora R, El Ghaout A, Glenn DM & Solar JM. (1994). Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.* **23**, 1113-1117.
- Adriaens P & Focht DD. (1991). Cometabolism of 3,4-Dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. Strain 4-CB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 173-179.
- Alvey S & Crowley DE. (1996). Survival and activity of an atrazine mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1596-1603.
- Anderson TA, Guthrie EA & Walton BT. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2630-2636.
- Anderson TA, White DC & Walton BT. (1995). Degradation of hazardous organic compounds by rhizosphere microbial communities. In *Biotransformation: Microbial degradation of health risk compounds* (Singh VP, Hrsg.), Elsevier., Amsterdam, pp. 205-225.
- Aprill W & Sims RC. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* **20**, 253-265.
- Armstrong J, Armstrong W & Beckett PM. (1992). *Phragmites australis*: Venturi- and humidity-induced convections enhance rhizome aeration and rhizosphere oxidation. *New Phytol.* **120**, 197-207.
- Atlas RM & Bartha R. (1998). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Addison Wesley Longman, Menlo Park, California.
- Bae HS, Lee JM, Kim YB & Lee S-T. (1996). Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **7**, 463-469.
- Baeder-Bederski O, Kusch P & Stottmeister U. (1999). Phytovolatilization of organic contaminants. In *Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven* (Heiden St, Erb R, Warrelmann J, Dierstein R, Hrsg.), Erich Schmidt Verlag, Berlin, pp. 175-183.
- Barber DA. (1973). Effects of microorganisms on the absorption of inorganic nutrients by plants. *Pestic. Sci.* **4**, 367-373.
- Barber JT, Sharma HA, Ensley HE, Polito MA & Thomas DA. (1995). Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* **31**, 3567-3574.
- Bennett RA & Lynch JM. (1981). Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 95-102.

- Bowen GD & Rovira AD. (1976). Microbial colonization of plant roots. *Annu.Rev.Phytopathol.* **14**, 121-144.
- Boyle JJ & Shann JR. (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 M. (1989). The environmental microbiology of chlorinated aromatic decomposition. *J.Environ.Qual.* **18**, 395-402.
- Böttger M & Rensch C. (1987). Das Experiment: Über die Mühsal, sich vom Boden zu ernähren. *Biologie in unserer Zeit* **5**, 153-156.
- Burger G & Weise G. (1984). Untersuchungen zum Einfluss limnischer Makrophyten auf die Absterbegeschwindigkeit von *Escherichia coli* im Wasser. *Acta Hydrochim.Hydrobiol.* **12**, 301-309.
- Cardenas ML. 3-(3-Carboxyphenyl)alanin aus *Iris pseudacorus* - Zur Ökochemie kerncarboxylierter aromatischer Verbindungen mit natürlichem Vorkommen. 1975. Universität Göttingen. Dissertation.
- Champagne P, Van Geel PJ & Parker WJ. (1998). A proposed transient model for cometabolism in biofilm systems. *Biotechnol.Bioeng.* **60**, 541-550.
- Commandeur LCM & Parsons JR. (1994). Biodegradation of halogenated aromatic compounds. In *Biochemistry of microbial degradation* (Ratledge C, Hrsg.), Kluwer, Dordrecht, pp. 423-458.
- Criddle CS. (1992). The kinetics of cometabolism. *Biotechnol.Bioeng.* **41**, 1048-1056.
- Crowley DE, Alvey S & Gilbert ES. (1997). Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. In *Phytoremediation of soil and water contaminants* (Kruger EL, Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 20-36.
- Crowley DE, Brennerova MV, Irvin C, Brenner V & Focht DD. (1996). Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**, 79-89.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab P & Hsu FC. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy* **56**, 55-114.
- Curl EA & Truelove B. (1986). *The rhizosphere*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Dalton H & Stirling DI. (1982). Co-metabolism. *Philos.Trans.R.Soc.London Ser.B* **297**, 481-496.
- Dapaah SY & Hill GA. (1992). Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol.Bioeng.* **40**, 1353-1358.

- Darbyshire JF & Greaves MP. (1973). Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pestic.Sci.* **4**, 349-360.
- Dec J & Bollag J-M. (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol.Bioeng.* **44**, 1132-1139.
- Donnelly PK, Hedge RS & Fletcher JS. (1994). Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere* **28**, 981-988.
- Dorn E, Hellwig M, Reineke W & Knackmuss H-J. (1974). Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading Pseudomonad. *Arch.Microbiol.* **99**, 61-70.
- Dorn E & Knackmuss H-J. (1978). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. *Biochem.J.* **174**, 85-94.
- Duineveld BM, Rosado AS, van Elsas JD & van Veen JA. (1998). Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**, 4950-4957.
- Egli T. (1995). The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Adv.Microb.Ecol.* **14**, 305-386.
- Ensley HE, Sharma A, Barber JT & Polito MA. (1997). Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba*, Duckweed. *contaminants* (Kruger EL, Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 238-253.
- Ernst WHO. (1990). Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. *Aquatic botany* **38**, 73-90.
- Eschweiler B. Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung von Grundwässern unterschiedlicher Beschaffenheit mittels molekularbiologischer Methoden. 1999. Universität Bremen. Dissertation.
- Fava F, Armenante PM & Kafkewitz D. (1995). Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonas pickettii* strain. *Lett.Appl.Microbiol.* **21**, 307-312.
- Federle TW & Schwab BS. (1989). Mineralization of surfactants by microbiota of aquatic plants. *Appl.Environ.Microbiol.* **55**, 2092-2094.
- Felgner G & Meissner B. (1967). Untersuchungen zur Reinigung phenolhaltiger Abwässer durch die Flechtbinse (*Scirpus lacustris*). *Fortschritte der Wasserchemie* **5**, 199-214.
- Filip Z & Preusse T. (1985). Phenoxidierende Enzyme - ihre Eigenschaften und Wirkungen im Boden. *Pedobiologia* **28**, 133-142.
- Flathman PE & Lanza GR. (1998). Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J.Soil Contam.* **7**, 415-432.

- Fledcher JS & Hedge RS. (1995). Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere* **31**, 3009-3016.
- Foster RC. (1986). The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annu.Rev.Phytopathol.* **24**, 211-234.
- Fritsche W. (1999). *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Gilbert ES & Crowley DE. (1997). Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**, 1933-1938.
- Gisi U, Schenker R, Schulin R, Stadelmann FX & Sticher H. (1990). *Bodenökologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Günther T, Dornberger U & Fritsche W. (1996). Effect of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **33**, 203-215.
- Grayston SJ, Vaughan D & Jones D. (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied soil ecology* **5**, 29-56.
- Groleau-Renaud, Plantureux S & Guckert A. (1998). Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant and Soil* **201**, 231-239.
- Haby PA & Crowley DE. (1996). Biodegradation of 3-chlorobenzoate as affected by rhizodeposition and selected carbon substrates. *J.Environ.Qual.* **25**, 304-310.
- Hafez N, Abdalla S & Ramadan YS. (1998). Accumulation of phenol by *Potamogeton crispus* from aqueous industrial waste. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **60**, 944-948.
- Hale MG, Moore LD & Griffin GJ. (1978). Root exudates and exudation. In *Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants* (Dommergues YR, Krupa SV, Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, pp. 163-203.
- Hansen M, Kragel L, Nybroe O & Sorensen J. (1997). Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**, 353-360.
- Hägglblom MM. (1990). Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *J.Basic Microbiol.* **30**, 115-141.
- Hägglblom MM. (1992). Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 29-72.
- Härtig C, Löffhagen N & Babel W. (1999). Glucose stimulates a decrease of the fatty acid saturation degree in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch.Microbiol.* **171**, 166-172.

- Head IM, Saunders JR & Pickup RW. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol.Ecol.* **35**, 1-21.
- Hill GA, Milne BJ & Nawrocki PA. (1996). Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **46**, 163-168.
- Hobbie JE, Daley RJ & Jasper S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl.Environ.Microbiol.* **33**, 1225-1228.
- Hollender J, Hopp J & Dott W. (1997). Degradation of 4-chlorophenol via the meta cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4567-4572.
- Hsu TS & Bartha R. (1979). Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl.Environ.Microbiol.* **37**, 36-41.
- Jacob HJ. (1995). ¹⁴C-Verwertung von Weizen im Verlauf der Ontogenese. In *Kohlenstoff- und Stickstoffumsatz im System Pflanze-Boden* (Merbach W, Bork H-R, Hrsg.), Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF) e.V., Müncheberg, pp. 73-74.
- Janke D & Fritsche W. (1979). Dechlorierung von 4-Chlorphenol nach extradioler Ringspaltung durch *Pseudomonas putida*. *Z.Allg.Mikrobiol.* **19**, 139-141.
- Janke D & Fritsche W. (1985). Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J.Basic Microbiol.* **25**, 603-619.
- Jenny H & Grossenbacher KD. (1963). Root-soil boundary zone as seen in the electron microscope. *Soil Sci.Soc.Am.Proc.* **27**, 273-277.
- Jones DL & Darrah PR. (1993). Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. *Plant and Soil* **153**, 47-59.
- Jordahl JL, Foster L, Schnoor JL & Alvarez JJ. (1997). Effect of hybrid poplar trees on microbial populations important to hazardous waste bioremediation. *Environ.Toxicol.Chem.* **16**, 1318-1321.
- Juni E. (1984). *Acinetobacter*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Holt JG, Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, London, pp. 303-307.
- Kästner M, Mahro B, Wienberg R (1993). Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden. In *Hamburger Berichte Bd. 5* (Stegmann R, Hrsg.), Economia, Bonn.
- Kapoor A, Kumar R, Kumar A, Sharma A & Prasad S. (1998). Application of immobilized mixed bacterial culture for the degradation of phenol present in oil refinery effluent. *J.Environ.Sci.Health* **A33**, 1009-1021.
- Kickuth R. (1970). Ökochemische Leistungen höherer Pflanzen. *Naturwissenschaften* **2**, 55-61.

- Kickuth R & Kaitzis G. (1975). Mikrobizid wirksame Aromaten aus *Scirpus lacustris* L. *Forum Umwelthygiene* **26**, 134-135.
- Klein DA, Salzwedel JL & Dazzo FB. (1990). Microbial colonization of plant roots. In *Biotechnology of plant-microbe interactions* (Nakas JP, Hagedorn C, Hrsg.), McGraw-Hill, New York, pp. 189-225.
- Kloepper JW & Beuchamp CJ. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can.J.Microbiol.* **38**, 1219-1232.
- Knackmuss H-J. (1981). Degradation of halogenated and sulfonated hydrocarbons. In *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds* (Leisinger T, Hutter R, Cook AM, Nuesch J, Hrsg.), Academic Press, London, pp. 189-212.
- Knackmuss H-J & Hellwig M. (1978). Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Arch.Microbiol.* **117**, 1-7.
- Kovárová K & Egli T. (1997). Effects of naturally occurring substrates on the biodegradation of pollutants at low concentrations. In *Environmental Biotechnology* (Verachtert H, Verstraete W, Hrsg.), Conference Proceeding Part 1, Oostende, pp. 99-103.
- Kuntze HG, Roeschmann G & Schwerdtfeger G. (1988). *Bodenkunde*. Ullmer Verlag Stuttgart.
- Kutschera L & Lichtenegger E. (1982). *Wurzelatlas mitteleuropäischer Grünlandpflanzen*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Lappin HM, Greaves MP & Slater JH. (1985). Degradation of the herbicide Mecoprop [2-(2-Methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid] by a synergistic microbial community. *Appl.Environ.Microbiol.* **49**, 429-433.
- Lehninger AL. (1987). *Prinzipien der Biochemie*. de Gruyter Berlin, New York.
- Loh K-C & Wang S-J. (1998). Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation* **8**, 329-338.
- Lüthy J. (1996). Die Polymerase Chain Reaction (PCR) in der Lebensmittelanalytik. *GIT Fachz.Lab.* **4**, 368-370.
- Lynch JM. (1982). Interactions between bacteria and plants in the root environment. In *Bacteria and plants* (Rhodes-Roberts ME, Skinner FA, Hrsg.), Academic Press, New York, pp. 1-23.
- Lynch JM & Whipps JM. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* **129**, 1-10.
- Matthysse AG. (1996). Adhesion in the rhizosphere. In *Bacterial adhesion: Molecular and ecological diversity* (Fletcher M, Hrsg.), Wiley-Liss, New York, pp. 129-153.

- Meharg AA & Kilham K. (1995). Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant and Soil* **170**, 345-349.
- Meharg AA & Cairney JWG. (2000). Ectomycorrhizas-extending the capabilities of rhizosphere remediation? *Soil Biol.Biochem.* **32**, 1475-1484.
- Meissner B & Friedmann E. (1968). Abwassernachreinigung mit Teichsimsen (*Schoenoplectus lacustris*) in Abwasserteichen. *WWT* **11/12**, 420-425.
- Merbach W, Jäger R, Mirus E & Rietz C. (1990). C-Bilanzierung im System Pflanze-Boden. In *Ökophysiologie des Wurzelraumes* (Merbach W, Hrsg.), Teubner, Stuttgart, Leipzig, pp. 81-85.
- Merbach W, Mirus E, Knof G, Remus R, Ruppel S & Russow R. (1999). Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *J.Plant Nutr.Soil Sci.* **162**, 373-383.
- Moog PR & Brüggemann W. (1998). Flooding tolerance of *Carex* species. II. Root gas-exchange capacity. *Planta* **207**, 199-206.
- Muyzer G, De Waal EC & Uitterlinden AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis ananlysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**, 695-700.
- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO & Jannasch HW. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch.Microbiol.* **164**, 165-172.
- Newman LA, Doty SL, Gery KL, Heilman PE, Muiznieks I, Shang TQ, Siemieniec ST, Strand SE, Wang X, Wielson AM & Gordon MP. (1998). Phytoremediation of organic contaminants: a review of phytoremediation research at the university of Washington. *J.Soil Contam.* **7**, 531-542.
- Nümann W. (1970). Die Möglichkeiten der Gewässerreinigung mit höheren Pflanzen nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen und theoretischen Überlegungen. *Int.Revue Hydrobiol.* **55**, 149-158.
- O'Keefe DH, Wiese TE, Brummet SH & Miller TW. (1987). Uptake and metabolism of phenolic compounds by the water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Recent advances in phytochemistry* **21**, 101-129.
- Orchard BJ, Doucette WJ, Chard JK & Bugbee B. (2000). Uptake of trichloroethylene by hybrid poplar trees grown hydroponically in flow-through plant growth chambers. *Environ.Toxicol.Chem.* **19**, 895-903.
- Ottow JCG. (1997). Abbaukinetik und Persistenz von Fremdstoffen in Böden. In *Umweltbiotechnologie* (Ottow JCG, Bidlingmayer W, Hrsg.), Fischer, Stuttgart, pp. 97-138.

- Palleroni NJ. (1984). Pseudomonadaceae. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Holt JG, Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, London, pp. 141-199.
- Palumbi SR. (1990). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In *Molecular Systematics* (Hillis DM, Moritz C, Mable BK, Hrsg.), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 205-247.
- Perry JJ. (1979). Microbial cooxidation involving hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **43**, 59-72.
- Pradhan SP, Conrad JR, Paterek JR & Srivastava VJ. (1998). Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *J. Soil Contam.* **7**, 467-480.
- Prutzer I. Untersuchungen zum Einfluss der Pflanzenwurzeln auf die mikrobielle Aktivität in der Rhizosphäre. 1997. UFZ Leipzig-Halle GmbH. Diplomarbeit.
- Rao AS. (1990). Root flavonoids. *Bot. Rev.* **51**, 1-84.
- Reddy BR & Sethunathan N. (1983). Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 826-829.
- Reichenbach H. (1989). Cytophaga. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Holt JG, Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 2015-2050.
- Reineke W, Wessels SW, Rubio MA, Latorre J, Schvien U, Schmidt E, Schlömann M & Knackmuss H-J. (1982). Degradation of monochlorinated aromatics following transfer of genes encoding chlorocatechol catabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* **14**, 291-294.
- Richert M, Saarnio S, Juutinen S, Silvola J, Augustin J & Merbach W. (2000). Distribution of assimilated carbon in the system *Phragmites australis*-waterlogged peat soil after carbon-14 pulse labelling. *Biol. Fertil. Soils.* **32**, 1-7.
- Rodewald-Rudescu L. (1974). *Das Schilfrohr Phragmites communis Trinius*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart.
- Romberger JA, Hejnowicz Z & Hill JF. (1993). *Plant structure: function and development, a treatise on anatomy and vegetative development, with special references to woody plants*. Springer-Verlag Berlin.
- Rovira AD. (1969). Plant root exudates. *Bot. Rev.* **35**, 35-57.
- Ruth M & Tresckow M. (1991). *Wirkungen von Phalaris arundinacea L. und Glyceria fluitans (L.) R. Brown auf Abwasser und Sediment*. Wissenschafts-Verlag Frankfurt / M.
- Sáez PB & Rittmann BE. (1991). Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol, an inhibitory co-metabolite. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* **63**, 838-847.

- Sáez PB & Rittmann BE. (1993). Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). *Biodegradation* **4**, 3-21.
- Sandmann ER & Loos MA. (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.
- Schlegel HG. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Schmidt SK & Alexander M. (1985). Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 822-827.
- Schmidt SK, Simkins S & Alexander M. (1985). Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 323-331.
- Schmidt SK, Scow KM & Alexander M. (1987). Kinetics of *p*-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: Effects of second substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2617-2623.
- Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL & Carreira LH. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sc. Technol.* **29**, 318A-323A.
- Seidel K. (1963). Über Phenolspeicherung und Phenolabbau in Wasserpflanzen. *Naturwissenschaften* **50**, 452-453.
- Seidel K. (1968). Elimination von Schmutz- und Ballaststoffen aus belasteten Gewässern durch höhere Pflanzen. *Sonderdruck aus der Zeitschrift Vitalstoffe-Zivilisationskrankheiten* **4**.
- Seidel K. (1969). Zur bakteriziden Wirkung höher Pflanzen. *Naturwissenschaften* **56**, 642-643.
- Seidel K. (1971). Wirkung höher Pflanzen auf pathogene Keime in Gewässern. *Naturwissenschaften* **58**, 150-151.
- Seidel K. (1976). Über die Selbstreinigung natürlicher Gewässer. *Naturwissenschaften* **63**, 286-291.
- Semenov AM, van Bruggen AHC & Zelenev VV. (1999). Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbiol. Ecol.* **37**, 116-128.
- Semple KT & Chain RB. (1995). Metabolism of phenols by *Ochromonas danica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 253-257.
- Semprini L & McCarty PL. (1992). Comparison between model simulations and field results for in-situ bioremediation of chlorinated aliphatics: part 2. cometabolic transformations. *Ground water* **30**, 37-44.

- Shimp JF, Tracy JC, Davis LC, Lee E, Huang W, Erickson LE & Schnoor JL. (1993). Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Crit.Rev.Environ.Sci.Technol.* **23**, 41-77.
- Shimp R & Pfaender FK. (1985). Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **49**, 394-401.
- Siciliano SD, Theoret CM, de Freitas JR, Hucl PJ & Germida JJ. (1998). Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can.J.Microbiol.* **44**, 844-851.
- Siqueira JO, Nair MG, Hammerschmidt R & Safir GR. (1991). Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Crit.Rev.Plant Sci.* **10**, 63-121.
- Smith WH. (1976). Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology* **57**, 324-331.
- Stengel E. (1991). Wasserreinigung mit Hilfe höherer grüner Pflanzen: DENIPLANT. In *DENIPLANT-ein naturnahes Wasseraufbereitungsverfahren. Berichte aus der Ökologischen Forschung, Band 5* (Schindler R, Hrsg.), Forschungszentrum Jülich, Jülich, pp. 129-142.
- Süßmuth R, Eberspracher J, Haag R & Springer W. (1987). *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Swinnen J, van Veen JA & Merckx R. (1994). Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: model calculations based on ¹⁴C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biol.Biochem.* **26**, 171-182.
- Taiz L & Zeiger E. (1998). *Plant physiology*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Tate RL. (1995). The rhizosphere/mycorrhizosphere. In *Soil microbiology* (Tate RL, Hrsg.), Wiley, New York, pp. 171-200.
- Tinker PB & Barraclough PB. (1991). Root-soil interactions. In *Handbook of environmental chemistry, Band 2* (Hutzinger E, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, pp. 153-175.
- Uren NC & Reisenauer HM. (1988). The role of root exudates in nutrient acquisition. *Advances in plant nutrition* **3**, 79-114.
- van Vuurde JWL & Schippers B. (1980). Bacterial colonization of seminal wheat roots. *Soil Biol.Biochem.* **12**, 559-565.
- Vincent G, Dallaire S & Lauzer D. (1994). Antimicrobial properties of roots exudate of three macrophytes: *Mentha aquatica* L., *Phragmites australis*(Cav.) Trin. and *Scirpus lacustris* L. 290-296.
- Wackett LP & Allan DL. (1995). Comment on "bioremediation in the rhizosphere". *Environ.Sci.Technol.* **29**, 551.

- Walton BT & Anderson TA. (1990). Microbial degradation of trichlorethylene in the rhizosphere: Potential application to biological remediation of waste sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1012-1016.
- Wang S-J & Loh K-C. (1999). Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate. *Biodegradation* **10**, 261-269.
- Wang S-J & Loh K-C. (2000). Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of a conventional carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 437-447.
- Wissing F. (1995). *Wasserreinigung mit Pflanzen*. Eugen Ulmer GmbH & Co. Stuttgart.
- Wolverton BC & McKown MM. (1976). Water hyacinths for removal of phenols from polluted waters. *Aquatic botany* **2**, 191-201.
- Worch E. (1997). *Wasser und Wasserinhaltsstoffe*. B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart, Leipzig.
- Young JM, Saddler GS, Takikawa Y, De Boer SH, Vauterin L, Gardan L, Gvozdyak RI & Stead DE. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Rev. Plant Pathol.* **75**, 721-763.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Umweltforschungszentrum in Leipzig.

Herrn Prof. Dr. Stottmeister möchte ich für die organisatorische und fachliche Unterstützung am Umweltforschungszentrum danken. Ebenso bedanke ich mich bei seiner Arbeitsgruppe. Dabei sind insbesondere die Technische Assistentin Kerstin Puschendorf, Dr. Baeder-Bederski und Dr. Kuschik zu nennen. Dr. Kuschik begleitete meine Arbeit mit fachlichen Hinweisen und Ideen.

Des Weiteren möchte ich auf die gute Zusammenarbeit mit der Sektion Analytik, Hydrologie und Mikrobiologie hinweisen. Hier gilt mein Dank insbesondere Frau Fiedler, Frau Klein, Herrn Dr. Härtig und Herrn Dr. Neu.

Für die Betreuung meiner Arbeit und fachliche Beratung danke ich Herrn Prof. Gerd Weidemann. Prof. Weidemann und seine Arbeitsgruppe ermöglichten mir außerdem die theoretische Ausarbeitung unter wissenschaftlicher Einbindung an der Universität Bremen. Dr. Koch danke ich für die Unterstützung bei der PCR-DGGE.

Prof. Dr. Röske von der TU Dresden möchte ich für die kritische Durchsicht der Arbeit und die wertvollen Hinweise für Verbesserungen danken.

Ferner danke ich all denen herzlichst, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfsbereit unterstützten.



Anhang

Tab. A-1: Nährlösung: Grundmedium (Lösung I) nach HOAGLAND u. ARNON (1950); Mikronährstoffe (Lösung II) unter Berücksichtigung von Mikroorganismen

Lösung I:

KNO ₃	606 mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	255 mg/l
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	945 mg/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	230 mg/l
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	21 mg/l

Lösung II:

MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	170 mg/l
ZnCl ₂	14 mg/l
CuCl ₂ x 5 H ₂ O	20 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	30 mg/l
H ₃ BO ₃	310 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	42 mg/l
H ₂ SeO ₃	1 mg/l

10 ml von Lösung II werden auf 990ml von Lösung I gegeben

Tab. A-2: Nährlösung nach HILL (1996)

Lösung I:

KH ₂ PO ₄	840 mg/l
K ₂ HPO ₄	750 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	488 mg/l
NaCl	60 mg/l
CaCl ₂	60 mg/l
MgSO ₄	60 mg/l
FeCl ₂	6 mg/l

Lösung II:

H ₃ BO ₃	300 mg/l
CoCl ₂	200 mg/l
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/l
MnSO ₄	30 mg/l
Na ₂ MoO ₄	30 mg/l
Ni(NO ₃) ₂	20 mg/l
CuCl ₂	10 mg/l

1 ml von Lösung II werden auf 999ml von Lösung I gegeben

Tab. A-3: Arbeitsschritte der Gram-Färbung

1. Herstellen eines luftgetrockneten Präparates und Hitze-fixierung
Überschichten mit Karbolgentianaviolett; 2 Minuten Einwirkzeit; abgießen
2. mit 1. Tropfen Lugol-Lösung nachspülen; Lugol-Lösung auftropfen; 2 Min. Einwirkzeit, abgießen
3. Differenzieren mit 96 %igem Ethanol bis keine Farbe mehr abgegeben wird (nur kurze Zeit); nachspülen mit Aqua dest.
4. Gegenfärbung mit verdünnter Fuchsinlösung; ca. 15 Sek.
5. Abspülen mit Aqua dest.; zwischen Fließpapier mit leichtem Druck trocknen

Tab. A-4: Temperaturprogramm der touch-down PCR:

Hot Start: 96°C, 5 min

1. Cyclus: 80°C, 1 min (Zugabe der Polymerase); 65°C, 1 min; 72°C 1 min
2. Cyclus: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 1 min
3. Cyclus: 94°C, 1 min; 64°C, 1 min; 72°C, 1 min (2*)
4. bis 12. Cyclus: wie 3. Cyclus, Annealingtemp. jeden Cyclus um 1°C gesenkt bis auf 55°C, jeden Cyclus zweimal wiederholen, 55°C 14-mal wiederholen.
13. Cyclus: 94°C 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 10 min

Tab. A-5: Ermittelte Gesamtzellzahlen nach Acridinorangeanfärbung und 4-CP-Konzentrationen zu Abb. 22 und Abb. 24

a. zu Abb. 21 (cometabolischer Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* bei Zugabe von Wurzelhomogenat)

	Inokulum	nach 3 Tagen
4-CP (Referenz)	7,0 E+5	4,5E+6
4-CP+homogenisierte Wurzeln	7,0E+5	8,3E+6
4-CP+Phenol	7,0E+5	2,7E+7

b. zu Abb. 22

4-CP-Konzentrationen (mg/L) zum Zeitpunkt $t_1=5$ und $t_2=29$

Variante	4-CP	4-CP+Ph	4-CP+RDP (12mg/L DOC)	4-CP+RDP (6mg/L DOC)	4-CP+RDP (3mg/L DOC)
t_1	2,05	1,93	1,65	1,65	1,80
t_2	1,56	0,55	0,53	0,64	0,88

c. zu Abb. 23 (cometabolischer Abbau von 4-Chlorphenol durch *Ralstonia eutropha* bei Zugabe von Rhizodepositionsprodukten (RDP))

	Inokulum	nach 80 Std.
4-CP (Referenz)	5,0E+4	3,4E+5
4-CP+RDP (24 mg DOC/L)	5,0E+4	4,5E+6
4-CP+RDP (12 mg DOC/L)	5,0E+4	1,5E+6
4-CP+RDP (6 mg DOC/L)	5,0E+4	7,2E+5
4-CP+RDP (3 mg DOC/L)	5,0E+4	4,0E+5
4-CP+Phenol (15 mg/L)	5,0E+4	3,3E+7

d. zu Abb. 24 (cometabolischer Abbau von 4-Chlorphenol durch eine von *Phalaris arundiancea* gewonnene bakterielle Mischkultur bei Zugabe von Rhizodepositionsprodukten)

	Inokulum	nach 24 Std.	nach 48 Std.
4-CP (Referenz)	7,9E+5	7,5E+5	7,5E+5
4-CP+RDP (12 mg DOC/L)	7,9E+5	3,5E+6	3,8E+6
4-CP+Phenol (15 mg/L)	7,9E+5	2,3E+7	keine Zählung

4-Chlorphenol-Konzentration mit Phenol als Wachstumssubstrat zum Zeitpunkt $t_1 = 2,65$ mg/L und zum Zeitpunkt $t_2 = 0,17$ mg/L

4-Chlorphenol-Konzentration mit Wurzelabscheidungen (DOC 12 mg/L) als Wachstumssubstrat zum Zeitpunkt $t_1 = 2,56$ mg/L und zum Zeitpunkt $t_2 = 1,73$ mg/L

Isolat	14:0	16:0	4*	7*	18:0	3*	12:0	17:0	17:0 cyclo	15:0	12:0- 2OH	12:0- 3OH	17:1 ω8c	10:0- 3OH	unbe- kannt 1	16:0- iso	16:0 N Alkohol	16:1 ω5C	10:0	17:0- iso	Fettsäuren identifizierte Art
B	0,4	23,7	14,1	0,7	3,7	2,5	4,7	0,9			1,9	3,3	0,7		0,5		0,8				<i>Acinetobacter baumannii</i>
L	0,4	22,9	14,5	0,7	3,8	2,6	5,1	0,8			2,0	3,5	0,7		0,6		0,8				<i>Acinetobacter baumannii</i>
I	0,3	23,4	14,0	0,7	3,9	2,4	4,7	0,9			1,8	3,1	0,7		0,5		0,7		0,1		<i>Acinetobacter baumannii</i>
Z	0,5	31,06	33,2	16,4	0,9		2,9		2,5		4,2	4,3		3,8				0,1	0,2		<i>Pseudomonas fluorescens</i> od. <i>P. putida</i>
A	0,4	29,8	33,9	19,5	0,7		1,7		1,3		5,1	4,2		3,5							<i>P. fluorescens</i> od. <i>P. putida</i>
F	1,0	26,0	32,4	22,6	0,5	0,1	2,1		0,5		4,3	4,1		5,4	0,3						<i>P. putida</i>
E	0,8	29,0	26,9	18,8	1,2		2,0	0,2	7,5	0,3	4,4	3,6	0,1	2,6	0,1		0,1		0,3	0,1	<i>P. marginalis/putida</i>
S	0,4	29,6	36,2	21,4	0,4		2,0	0,5	1,0	0,3				3,7					0,2		<i>Comamonas testosteroni</i>
H	4,5	25,0	35,7	18,7	0,7	9,3			2,0							0,2		0,2			<i>Alcalig./Erwinia</i>
K	4,5	25,8	25,5	22,6	1,0	7,2		0,2	6,5	0,2						0,6		0,2			<i>Burkholderia pickettii</i>
N	0,5	2,8	10,2			1,4				6,6			0,7			0,7		0,3		1,0	<i>Cytophaga johnsonae</i>
U	2,4	9,6	25,1			1,7				2,7			0,2			0,4		0,6		0,4	<i>Cytophaga johnsonae</i>
Bezei- chnung	16:0- 2OH	16:1- 2OH	18:3 ω6c (6, 9,12)	18:1 ω9c	19:0 cyclo ω8c	8:0- 3OH	5*	unbe- kannt 2	14:0- 2OH	18:1- 2OH	16:0- 3OH	15:0- iso- 3OH	17:0- iso- 3OH	unbe- kannt 3	unbe- kannt 4	unbe- kannt 5	13:1 AT 12- 13	15:1 ω6c	17:1 ω6c	16:1 ω7c Alkohol	
B			0,7	41,3				0,2													<i>Acinetobacter baumannii</i>
L			0,8	40,8																	<i>Acinetobacter baumannii</i>
I			0,7	41,8				0,3													<i>Acinetobacter baumannii</i>
F						0,2															<i>P. putida</i>
E					1,3	0,2	0,1														<i>P. marginalis/putida</i>
S	2,2	1,1			0,6				0,3												<i>Comamonas testosteroni</i>
H	2,6	0,4								0,7											<i>Alcalig./Erwinia</i>
K	2,3	0,6			1,6				0,2	0,8											<i>Burkholderia pickettii</i>
N							1,8				2,1	8,1	12,0	3,0	0,8	1,3	0,4	2,5	2,0	0,1	<i>Cytophaga johnsonae</i>
U											8,9	6,3	4,8	1,8	1,1	0,6	2,7	0,7	0,5	0,1	<i>Cytophaga johnsonae</i>
Bezei- chnung	iso 17:1 ω9c	13:0- iso	14:0- iso	15:0- iso	15:1- iso G	15:0- anteiso	15:0- 2OH	anteiso 17:1 ω9c	17:0- 2OH	17:0- 3OH	12:1- 3OH	16:0- iso- 3OH	2*	18:1 ω5c	14:1 iso E						
F											0,5										<i>P. putida</i>
E									0,1				0,2		0,1						<i>P. marginalis/putida</i>
S																					<i>Comamonas testosteroni</i>
N	6,5	0,1	0,2	27,2	3,7	1,4	0,3			0,4		1,8		0,2							<i>Cytophaga johnsonae</i>
U	1,4	0,3	0,3	22,3	1,9	1,9	0,3	1,2													<i>Cytophaga johnsonae</i>

Tab. A-6: Übersicht über die Fettsäuremuster der untersuchten Bakterien. Die Fettsäuren sind nach Häufigkeit ihres Vorkommens im untersuchten Artenspektrum geordnet

Erläuterungen zu Tab. 6

2* = Summe der 15:1 ISO H/13:0 3OH Fettsäuren, die gaschromatographisch nicht getrennt wurden

3* = Summe der 12:0 ALDE? und 16:1 ISO I/14:0 3OH Fettsäuren, die gaschromatographisch nicht getrennt wurden

4* = Summe der 16:1 ω 7c und 15:0-iso-2OH Fettsäuren, die gaschromatographisch nicht getrennt wurden

5* = Summe der 17:1 ISO I/ANTEI B Fettsäuren, die gaschromatographisch nicht getrennt wurden

7* = Summe der 18:1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t und 18:1 ω 12t/ ω 9t/ ω 7c, die gaschromatographisch nicht getrennt wurden

unbekannt 1 = Fettsäure (nicht identifiziert) mit ECL Peak nach 12,486 Minuten

unbekannt 2 = Fettsäure (nicht identifiziert) mit ECL Peak nach 13,961 Minuten

unbekannt 3 = Fettsäure (nicht identifiziert) mit ECL Peak nach 13,566 Minuten

unbekannt 4 = Fettsäure (nicht identifiziert) mit ECL Peak nach 11,541 Minuten

unbekannt 5 = Fettsäure (nicht identifiziert) mit ECL Peak nach 16,589 Minuten

Tab. A-7: Sequenzierung der 16S rDNA im Bereich der Primer GM5F und 907R



Tab A-8: Gemessene DOC-Werte der Versuchspflanzen *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*, *Scirpus lacustris*, und *Phragmites australis* bei unterschiedlicher Verweilzeit

Die absoluten DOC-Werte sind auf ein Frischgewicht von 50 g (entspricht in etwa Gewicht einer Versuchspflanze) umgerechnet

Carex gracilis

Monat	Verweilzeit	DOC-Werte (mg/L)					
		Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	arithm. Mittel
April	1 Tag	2,12	2,64	1,51	4,35	0,77	2,28
Juli	2 Tage	0,71	1,90	1,56	1,91	1,96	1,61
Februar	3 Tage	1,47	2,04	1,41	1,11	1,4	1,49
	3 Tage	0,82	1,09	0,64	1,44	0,58	0,91
Februar	4 Tage	3,03	4,20	2,85	2,7	2,88	3,13
März	4 Tage	1,58	1,66	0,55	0,81	1,12	1,14
Juni	4 Tage	2,96	2,57	2,52	1,9	1,76	2,34

Phalaris arundinacea

Monat	Verweilzeit	DOC-Werte (mg/L)					
		Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	arithm. Mittel
Oktober	1 Tag	1,55	2,30	1,24	0,82	1,72	1,53
	2 Tage	0,30	0,89	1,33	0,39	1,17	0,81
Oktober	3 Tage	2,53	3,44	1,81	2,43	1,81	2,40
	4 Tage	25,86	17,24	8,43	15,93	11,79	15,85
Oktober	6 Tage	2,29	2,72	2,09	4,2	1,82	2,62
Oktober	6 Tage	2,71	6,00	1,97	2,45	2,46	3,12

Scirpus lacustris

Monat	Verweilzeit	DOC-Werte (mg/L)					
		Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	arithm. Mittel
Juli	1 Tag	0,44	0,25	0,36	0,34	0,44	0,37
Juli	3 Tage	4,21	4,86	6,72	1,66	1,39	3,77
Juli	4 Tage	4,12	1,77	2,14	1,87	1,83	2,35

Phragmites australis

Monat	Verweilzeit	DOC-Werte (mg/L)					
		Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	arithm. Mittel
September	3 Tage	2,83	4,83	4,63	5,94	4,10	4,16
		Pflanze 6	Pflanze 7	Pflanze 8	Pflanze 9		
		4,63	3,35	3,10	4,09		
Oktober	3 Tage	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	0,75
		0,61	0,52	1,26	1,29	0,76	
		Pflanze 6	Pflanze 7	Pflanze 8	Pflanze 9		
		0,87	0,49	0,44	0,49		

Tab. A-9: Berechnung der prozentuellen Rhizodeposition bezogen auf die Trockengewichtszunahme der Pflanzen *Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea* und *Scirpus lacustris* über die Versuchsdauer von 10 Tagen, bei einer angenommenen täglichen DOC-Abgabe der Pflanzen von 0,5; 1,0 und 2,0 mg/L (*Carex gracilis*, *Phalaris arundinacea*) bzw. 0,5 und 1,0 mg/L (*Scirpus lacustris*)

a = Anzahl der Versuchstage;

b = Gewicht (TG) der Pflanzen (ermittelt nach den spez. Wachstumsraten der Pflanzen, s. Abb. 46);

c = Nettoassimilation in g;

d = aus Versuchen ermittelte DOC-Abgabe der Pflanzen

Carex gracilis						Phalaris arundinacea					Scirpus lacustris				
a	b	c	d			b	c	d			b	c	d		
			DOC-Abgabe pro Tag					DOC-Abgabe pro Tag					DOC-Abgabe pro Tag		
			0,50	1,00	2,00			0,50	1,00	2,00			0,50	1,00	
	12,50					12,50					12,50				
1,00	12,37	-0,13				12,39	-0,11				12,34	-0,16			
2,00	12,55	0,17	0,29	0,58	1,15	12,54	0,15	0,33	0,66	1,32	12,44	0,09	0,53	1,06	
3,00	12,72	0,18	0,28	0,57	1,14	12,69	0,15	0,32	0,65	1,30	12,53	0,09	0,53	1,05	
4,00	12,90	0,18	0,28	0,56	1,12	12,85	0,16	0,32	0,64	1,28	12,63	0,10	0,52	1,05	
5,00	13,08	0,18	0,28	0,55	1,11	13,00	0,16	0,32	0,63	1,27	12,72	0,10	0,52	1,04	
6,00	13,26	0,18	0,27	0,55	1,09	13,16	0,16	0,31	0,63	1,25	12,82	0,10	0,52	1,03	
7,00	13,45	0,19	0,27	0,54	1,08	13,33	0,16	0,31	0,62	1,24	12,92	0,10	0,51	1,02	
8,00	13,64	0,19	0,27	0,53	1,06	13,49	0,16	0,31	0,61	1,22	13,02	0,10	0,51	1,01	
9,00	13,83	0,19	0,26	0,52	1,05	13,65	0,17	0,30	0,60	1,21	13,12	0,10	0,50	1,01	
10,00	14,02	0,19	0,26	0,52	1,03	13,82	0,17	0,30	0,60	1,19	13,22	0,10	0,50	1,00	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2,6-DmPh	2,6-Dimethylphenol
4-CP	4-Chlorphenol
CSLM	Konfokales Raster-Lasermikroskop (Engl.: confocal scanning laser microscope)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (Engl.: denaturing gradient gel electrophoresis)
DIN	Deutsche Industrie Norm(en)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Engl.: deoxyribonucleic acid)
DOC	Konzentration an gelöstem organischen Kohlenstoff (Engl.: dissolved organic carbon)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ha	Hektar
HCMSA	2-Hydroxy-5-chlormuconatsemialdehyd (Engl.: 2-hydroxy-5-chloromuconic semialdehyd)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (Engl.: high performance liquid chromatography)
IC	Ionenchromatograph
h	Stunde
k_1	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung
KBE	Koloniebildende Einheiten
n	Anzahl der Proben
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Engl.: Polymerase chain reaction)
Ph	Phenol
R2A	Nährboden zur Kultivierung heterotropher Bakterien aus Wasserproben
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RDP	Rhizodepositionsprodukte, syn. Wurzelabscheidungen
RNA	Ribonukleinsäure (Engl.: ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Engl.: revolutions per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulphate
t	Zeit
TG	Trockengewicht
TNT	Trinitrotoluol

TOC	Total organic carbon
U	Umdrehungen
UV/Vis	Spektrometrie mit ultraviolettem und sichtbarem Licht