

*Dissertation 05/2007*

**Der Beitrag mikrobieller Biomasse zur Bildung der  
refraktären organischen Substanz im Boden**

Reimo Kindler

ISSN 1860-0387

# **Der Beitrag mikrobieller Biomasse zur Bildung der refraktären organischen Substanz im Boden**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Diplom-Biochemiker Reimo Kindler,

geboren am 04.06.1976 in Belzig

Dekan: Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger

Gutachter: Prof. Dr. Hauke Harms

Prof. Dr. Matthias Kästner

Prof. Dr. Ellen Kandeler

Tag der Verteidigung: 19.01.2007

---

## Bibliographische Beschreibung

Reimo Kindler

### **Der Beitrag mikrobieller Biomasse zur Bildung der refraktären organischen Substanz im Boden**

Universität Leipzig, Dissertation

16 Abbildung, 19 Tabellen, 3 Gleichungen, 161 Literaturstellen

#### **Referat**

Die organische Substanz im Boden beeinflusst die Eigenschaften eines Bodens, wie Bodenfruchtbarkeit, Wasserhaltekapazität, etc., und stellt den größten Pool im Kohlenstoffkreislauf der Erde dar. Aus diesen Gründen ist die Bildung und Stabilisierung der organischen Bodensubstanz (OBS) seit einigen Jahren ein Schwerpunkt der wissenschaftlichen Forschung (DFG-Schwerpunktprogramm 1090 „Böden als Quelle und Senke für CO<sub>2</sub> – Mechanismen und Regulation der Stabilisierung organischer Substanz in Böden“).

Da die Eigenschaften einer Substanz von ihrer chemischen Struktur bestimmt werden, ist es im Fall der OBS von Bedeutung, ihren Ursprung zu kennen. Beispielsweise wirkt sich ein geringes C/N-Verhältnis der OBS, was im Boden weitestgehend einer hohen Konzentration an Aminosäuren entspricht (Knicker et al., 1993), positiv auf die Bodenfruchtbarkeit aus (Schachtschabel et al., 1984). Da das C/N-Verhältnis der pflanzlichen Biomasse > 30 und das der mikrobiellen Biomasse ca. 5 beträgt (Kästner, 2000), ist der biologische und molekulare Ursprung der OBS wesentlich für die Bodeneigenschaften. Der Kohlenstoffeintrag in Boden ist zwar hauptsächlich pflanzlich, allerdings zeigt das C/N-Verhältnis der OBS von durchschnittlich 10 (Amelung, 1997) eine deutlich mikrobielle Prägung. Zudem konnten in der OBS eindeutig mikrobielle Fettsäuren (Lichtfouse et al., 1995), Aminosäuren (Kowalenko, 1978) und Aminosucker (Amelung et al., 2001) nachgewiesen werden. Der Beitrag der mikrobiellen Biomasse zur Bildung der OBS wurde jedoch bisher nie detailliert und quantitativ untersucht. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, diesen Beitrag mittels <sup>13</sup>C- und *lux*-Gen-markierter *E. coli*-Zellen im

---

Boden zu quantifizieren und das Schicksal verschiedener Stoffgruppen (Fettsäuren, Aminosäuren und DNA) der mikrobiellen Biomasse zu ermitteln.

Die markierten *E. coli*-Zellen wurden in einem landwirtschaftlich genutzten Boden inkubiert und starben innerhalb eines Monats zu 99 % ab. Nach acht Monaten verblieben noch 44 % des *E. coli*-Kohlenstoffs im Boden, während 56 % zu CO<sub>2</sub> mineralisiert wurden. Die Zellen starben im ersten Monat der Inkubation aufgrund suboptimaler Bedingungen im Boden (z.B. Nährstofflimitation) und wurden aktiv durch bakterielle Prädatoren (*Myxococcales*, *Xanthomonadaceae*, *Bacteroidetes*) lysiert. Dadurch wurde die Grundlage für den Einbau des markierten *E. coli*-Kohlenstoffs in das mikrobielle Nahrungsnetz des Bodens bzw. in die OBS gelegt. In den Phospholipidfettsäuren (PLFS), die für lebende Mikroorganismen spezifisch sind, sank die Menge des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs auf 45 %; in den mikrobiellen Aminosäuren bzw. Proteinen nahm sie auf nur 25 % der Ausgangsmenge ab. In den folgenden sieben Monaten – nachdem die *E. coli*-Biomasse verbraucht war – blieb die Menge des in Proteinen gebundenen *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs nahezu konstant. Die Menge in den PLFS sank auf etwa 20 % des Ausgangswertes. Diese <sup>13</sup>C-Abnahme in den PLFS ist insbesondere auf den Abbau der Cytoplasmamembran-Komponenten nach Zellyse und deren Re-Synthese während Wachstums- und Vermehrungsprozessen zurückzuführen. So kann man im inkubierten System von einer Wachstumsrate der Bodenmikroorganismen von etwa 2,1 pro Jahr ausgehen, was mit Schätzungen von Wachstumsraten unter natürlichen Bedingungen im Boden übereinstimmt (Kästner, 2000; Schink, 1999). Die konstante <sup>13</sup>C-Menge in den Proteinen sowie das konstante Aminosäuremuster deuten auf eine effektive Verwertung vollständiger Proteine nach der Lyse von Zellen hin. Am Ende der Inkubation nach ca. acht Monaten liegen die 44 % des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs vorwiegend stabilisiert in der toten OBS und zum Teil in der mikrobiellen Biomasse vor. Die Festlegung des Kohlenstoffs zeigt substanzabhängige Unterschiede in der Stabilisierung. Nach ca. acht Monaten liegen 55 % des in den Bodenfettsäuren verbliebenen *E. coli*-bürtigen <sup>13</sup>C in Fettsäuren der toten OBS vor und haben eine Halbwertszeit von 2,15 Jahren. Im Vergleich dazu wurden 75 % der *E. coli*-bürtigen Aminosäuren in der toten OBS festgelegt, was eine Mineralisierung von Aminosäurekohlenstoff im Boden nahezu ausschließt. Die Festlegung erfolgt in Form ganzer Peptide und zwar so stabil, dass im zeitlichen Rahmen des

---

Experimentes keine Halbwertszeit ermittelbar war. Da der jährlich durch Pflanzen eingebrachte und nicht mineralisierte Kohlenstoff der Kohlenstoffmenge der mikrobiellen Biomasse im Boden entspricht, zeigen diese Ergebnisse, dass ca. die Hälfte der OBS durch Mikroorganismen gebildet wurde. Dabei werden einige Substanzen der mikrobiellen Biomasse auch direkt in der OBS festgelegt, was durch den Nachweis replizierbarer *lux*-DNA-Moleküle am Ende des Experimentes anschaulich bewiesen werden konnte.

Der mikrobielle Beitrag zur Bildung der OBS wird allerdings durch Umweltparameter, Bodeneigenschaften und die mikrobielle Biomasse selbst beeinflusst. Die Untersuchung dieser Faktoren stellt ein wichtiges Forschungsfeld für die nächsten Jahre dar. Das daraus resultierende Wissen über die Bildung und Stabilisierung der OBS würde eine gezielte Beeinflussung von Bodeneigenschaften über ein nachhaltiges Bodenmanagement ermöglichen. Damit könnte die Sicherung und Erschließung fruchtbarer Böden und folglich die Ernährung der Menschheit in der Zukunft gewährleistet werden.

---

Der Inhalt dieser Dissertationsschrift ist bzw. wird in folgenden wissenschaftlichen Publikationen dargelegt:

Kindler, R., Miltner, A., Richnow, H.H. and Kästner, M., 2006. Fate of gram-negative bacterial biomass in soil - mineralization and contribution to SOM. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 2860 - 2870.

Kindler, R., Miltner, A., Richnow, H.H. and Kästner, M., in prep. Fate of microbial biomass compounds (fatty acids, amino acids) in soil and contribution to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*.

Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M.W. and Kaestner, M., 2006. Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5342-5348.

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die organische Substanz im Boden	1
1.2 Das Potential der organischen Bodensubstanz (OBS)	3
1.3 Die Quelle der OBS - Stand des Wissens	5
1.3.1 Molekulare Struktur und Ursprung der OBS	5
1.3.2 Der potentiell mikrobielle Anteil an der OBS	6
1.3.3 Die Relevanz der mikrobiellen Biomasse für die Bildung der OBS	9
1.4 Allgemeine Fragestellung und Konzeption der Arbeit	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Boden	16
2.1.3 Bakterienstamm und Kultivierung	17
2.2 Aufbau des Experimentes	18
2.3 Analytische Methoden	20
2.3.1 Nachweis lebender <i>E. coli</i> -Zellen im Boden	20
2.3.2 Analyse des emittierten CO <sub>2</sub>	21
2.3.3 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes und des <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C-Isotopenverhältnisses im Boden und in der <i>E. coli</i> -Biomasse	22
2.3.4 Quantifizierung und Bestimmung des Isotopenverhältnisses der Phospholipide (PLFS) und Gesamtfettsäuren (t-FS) im Boden	22
2.3.5 Quantifizierung und Bestimmung des Isotopenverhältnisses der mikrobiellen und Gesamt-Aminosäuren im Boden	25
2.3.6 Analyse der DNA	27
2.3.7 Analyse der Abbaukinetiken und Statistik	29
2.3.8 Identifizierung <i>E. coli</i> -verwertender bakterieller Prädatoren und Pilze	30
3 Ergebnisse	36
3.1 Überleben von <i>E. coli</i>	36

---

3.1.1	Empfindlichkeit der Methode .....	36
3.1.2	Nachweis lebender <i>E. coli</i> -Zellen .....	37
3.2	Metabolisierung und Mineralisierung des bakteriellen Kohlenstoffs .....	39
3.3	Identifizierung bakterieller Prädatoren und <i>E. coli</i> -verwertender Pilze .....	42
	Identifizierung <i>E. coli</i> -verwertender Bakterien (Prädatoren).....	42
3.3.2	Identifizierung <i>E. coli</i> -verwertender Pilze .....	48
3.4	Transformation der Biomassekomponenten.....	51
3.4.1	Mikrobielle PLFS und Gesamtfettsäuren.....	51
3.4.2	Mikrobielle und Gesamt-Aminosäuren .....	62
3.4.3	Persistenz der Plasmid-DNA.....	66
4	Diskussion.....	68
4.1	Überleben von <i>E. coli</i> im Boden .....	69
4.2	Metabolisierung und Mineralisierung des bakteriellen Kohlenstoffs .....	72
4.3	Identifizierung der <i>E. coli</i> -verwertenden Bakterien und Pilze.....	75
4.3.1	Gleitende Bakterien.....	75
4.3.2	Pilze .....	77
4.4	Transformation des Biomasse-Kohlenstoffs und dessen Verteilung zwischen mikrobieller Biomasse und toter OBS.....	78
4.4.1	Fettsäurekohlenstoff.....	78
4.4.2	Aminosäurekohlenstoff.....	83
4.5	Funktionalität der in der OBS festgelegten Substanz am Beispiel der Marker- DNA.....	88
4.6	Das Schicksal mikrobieller Biomasse im Boden (Synthese der Daten).....	89
5	Zusammenfassung .....	95
6	Literaturverzeichnis.....	97
7	Danksagung.....	107

---

## Abkürzungen

$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff
a	Jahr(e)
a (vor Fettsäuren)	anteiso
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AS	Aminosäure(n)
AS <sub>mik</sub>	Mikrobielle Aminosäuren
AS <sub>total</sub>	Gesamte Aminosäuren im Boden
bp	Basenpaare
br (vor Fettsäuren)	<i>branched</i> ; verzweigt
C	Kohlenstoff
CBS	4-Chlobenzoessäure
CFE	Chloroform-Fumigation-Extraktion
CsTFA	Cäsiumtrifluoracetat
cy (vor Fettsäuren)	cyclisch methyliert
d	Tag(e)
DEPC	Diethyl-pyrocabonate
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EA/IRMS	Elementaranalyser - <i>isotope ratio</i> Massenspektrometrie
FAM	Fluoreszenzfarbstoff
FS	Fettsäure(n)
FSMEs	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie
GC	Guanin - Cytosin
GC/C/IRMS	Gaschromatographie - <i>Combustion – isotope ratio</i> Massenspektrometrie
GC/MS	Gaschromatography - Massenspektrometrie
Gly	Glycin

---

GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
i (vor Fettsäuren)	iso
Ile	Isoleucin
in prep.	<i>in preparation</i> ; in Vorbereitung
IS <sub>IP</sub>	Isotopensignatur von <i>iso</i> -Propanol
IS <sub>korr</sub>	korrigierte Isotopensignatur
IS <sub>mess</sub>	gemessene Isotopensignatur
IS <sub>TFAA</sub>	Isotopensignatur von Trifluoressigsäure
KBE	koloniebildende Einheiten
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
m	Masse
me (vor Fettsäuren)	Methyliert
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
MPN	<i>Most Propable Number</i>
n <sub>AS</sub>	Anzahl der Kohlenstoffatome der Aminosäure im Derivatmolekül
n <sub>IP</sub>	Anzahl der Kohlenstoffatome der Trifluoressigsäure im Derivatmolekül
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> ; Kernresonanzspektroskopie
n <sub>TFAA</sub>	Anzahl der Kohlenstoffatome des <i>iso</i> -Propanols im Derivatmolekül
OBS	Organische Bodensubstanz
OS	Organische Substanz
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PLFS	Phospholipidfettsäuren
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal Ribonucleic Acid</i> ; ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
S.	Seite

---

s.u.	Siehe unten!
S.u.	Siehe unten!
SIP	<i>Stable Isotope Probing</i>
SIR	Substrat-induzierte Respiration (Atmung)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS - Acetic acid (Essigsäure) - EDTA
TFAA	<i>Trifluoro acetic acid</i> ; Trifluoressigsäure
t-FS	Gesamtfettsäuren des Bodens
Thr	Threonin
TM	Trockenmasse
T-RF	Terminales Restriktionsfragment bzw. Terminale Restriktionsfragmente
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
u.a.	und andere
UFZ	Umweltforschungszentrum
UK	<i>United Kingdom</i> ; Großbritannien
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VBNC	<i>Viable but not culturable</i> (lebend aber nicht kultivierbar)

---



## 1 Einleitung

Die Weltbevölkerung wächst derzeit jährlich um mehr als 1 %, was über 70 Millionen Menschen entspricht (nach Johnson, 2005). Proportional zur Bevölkerungszahl steigt auch der Nahrungsbedarf, dem allerdings nur eingeschränkt entsprochen werden kann, was schließlich zu Hunger bzw. Unterernährung führt. Dies betrifft in besonderem Maße die Entwicklungsländer, welche sich in Zukunft einen derartigen Bevölkerungszuwachs bzw. eine zunehmende Nahrungsknappheit nicht leisten können. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Steigerung landwirtschaftlicher Erträge dar, die durch eine Verbesserung der Bodenzusammensetzung und der resultierenden Bodeneigenschaften, wie z.B. der Fruchtbarkeit, realisiert werden kann. Folglich bildet ein optimiertes Bodenmanagement zur Verbesserung der Bodenzusammensetzung das Werkzeug zur Bekämpfung des Welthungers und anderer anthropogener Probleme (vergleiche 1.2). Dabei ist der Anteil und die Zusammensetzung der organischen Substanz im Boden von entscheidender Bedeutung.

### 1.1 Die organische Substanz im Boden

Der Boden besteht neben anorganischen Mineralen aus lebender und toter organischer Substanz. Die lebende organische Substanz setzt sich hauptsächlich aus mikrobieller Biomasse ( $24 - 30 \times 10^9$  t C; entspricht etwa 2 % des Bodenkohlenstoffs; Haider, 1996) und zu geringen Anteilen aus tierischen und pflanzlichen Organismen zusammen. Die tote organische Substanz stellt mit  $1200 - 1500 \times 10^9$  t C den größten organischen Kohlenstoffpool im Kohlenstoffkreislauf der Erde dar (2,1 - 2,7-mal größer als der Kohlenstoffpool der pflanzlichen Biomasse; Haider, 1999; Schlesinger, 1990) und besteht aus Pflanzenresten, mikrobiellen Zellfragmenten und tierischen Resten sowie humifiziertem, refraktärem organischen Material (Sollins et al., 1996). Diese Komponenten nehmen im Boden eine Vielzahl von Funktionen wahr (Tab. 1). Die organische Substanz im Boden gewährleistet so überhaupt erst die typischen Bodeneigenschaften, wie z.B. die Bodenstruktur und -fruchtbarkeit.

## Einleitung

---

Tabelle 1: Allgemeine Eigenschaften der organischen Substanz (OS) und assoziierte Effekte im Boden (nach Stevenson, 1994)

Eigenschaft	Erläuterung	Effekt im Boden
Energie- und Nährstoff-Quelle	1200 – 1500 x 10 <sup>9</sup> t C sind in Huminstoffen gebunden (Haider, 1999), besonders die Streu und die labile Fraktion der OS dienen als Energiequelle. Der Abbau (Mineralisierung) von OS liefert CO <sub>2</sub> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> und SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .	Die OS ist Quelle von Energie und Nährstoffen (C-, N-, P- und S-Quelle) für das Wachstum von Makro- und Mikroorganismen.
Farbe	Die typische dunkle Farbe des Bodens beruht auf der OS.	Die Farbe kann die Erwärmung fördern.
Wasserretention	Die OS kann bis zum 20fachen ihres eigenen Gewichtes an Wasser aufnehmen.	Die OS beugt dem Austrocknen und Schrumpfen vor. Sie fördert die feuchtigkeitshaltenden Eigenschaften sandiger Böden.
Sorption mit Tonmineralen	Die OS verkittet Bodenpartikel in strukturellen Einheiten, die Aggregate genannt werden.	Die OS ermöglicht den Gasaustausch, stabilisiert die Struktur und erhöht die Permeabilität.
Chelatisierung	Die OS bildet stabile Komplexe mit Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> u.a. polyvalenten Kationen.	Die OS fördert die Verfügbarkeit von Mikronährstoffen für höhere Pflanzen.

Eigenschaft	Erläuterung	Effekt im Boden
Löslichkeit in Wasser	Die Unlöslichkeit von OS beruht auf der Assoziation mit Ton. Des Weiteren sind Salze von bivalenten und trivalenten Kationen mit OS unlöslich.	Wenig OS geht durch Auswaschung verloren.
Puffer-Eigenschaft	OS puffert im leicht sauren, neutralen und alkalischen Bereich.	Die OS trägt zur Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Bodenreaktion bei.
Kationen-austauscher	Die Austauschkapazität isolierter Humusfraktionen reicht von 300 bis 1400 $\text{cmol kg}^{-1}$ .	Die OS steigert die Kationenaustauschkapazität des Bodens; 20 bis 70 % der Kapazität vieler Böden ist auf die OS zurückzuführen.
Bindung von Xenobiotika	Die OS beeinflusst die Bioaktivität, die Persistenz und die biologische Abbaubarkeit von Xenobiotika, wie z.B. Pestiziden.	Die OS modifiziert die Anwendungsrate von Pestiziden für eine effektive Kontrolle.

## 1.2 Das Potential der organischen Bodensubstanz (OBS)

Aufgrund wirtschaftlicher Interessen und zur Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung besteht ein ständig steigender Bedarf an landwirtschaftlichen Erträgen. Häufig geht jedoch mit der landwirtschaftlichen Nutzung einer Fläche eine Abnahme der Bodenqualität einher, da der Gehalt an OBS mit der Kultivierung einer Fläche sinkt (Keeney and Bremner, 1964; Schachtschabel et al., 1984). Dafür gibt es im Wesentlichen zwei Ursachen. Einerseits werden durch die Bodenbearbeitung (Pflügen, Bewässern) Aggregate zerstört und die frei gewordenen oder desorbierten

organischen Stoffe werden mikrobiell verstärkt umgesetzt. Andererseits findet durch Erntevorgänge eine verminderte Rückführung von organischem Material in den Boden statt, da die oberirdischen Pflanzenteile häufig anders verwertet werden (Schachtschabel et al., 1984). Folgeeffekte der Kultivierung, wie z.B. die verstärkte Auswaschung von gelöstem organischem und anorganischem Kohlenstoff (Brye et al., 2001), der Verlust von  $\text{NO}_3^-$ -Stickstoff durch Auswaschung und Denitrifikation (Jackson et al., 1994; Ryden and Lund, 1980) oder Erosion (Lal, 2003), führen zur weiteren Abnahme der OBS. Nach mehreren Jahren (10 – 30 a) stellt sich dann ein neues Gleichgewicht auf niedrigerem Niveau ein (Schachtschabel et al., 1984; Stevenson, 1994). So beträgt der Gehalt an OBS im Pflughorizont deutscher ackerbaulich genutzter Böden nur 1,5 – 4 % (Schachtschabel et al., 1984), während die Gehalte in Wald- und Wiesenböden um ein Vielfaches höher liegen (im Auflagehorizont bis zu 100 %). Um die Struktur und die Qualität der Böden zu erhalten bzw. zu steigern, ist es notwendig, einer Abnahme der OBS entgegen zu wirken. So führt z.B. der Anbau von Leguminosen zu einer Steigerung des OBS-Gehaltes. Düngungsexperimente mit organischen Materialien, wie Pflanzenstreu, Stallmist, Klärschlamm u.a., zeigten, dass die Menge der OBS erhöht werden kann (Albiach et al., 2001; Bernal et al., 1998; Sanchez-Monedero et al., 2004; Selivanovskaya et al., 2003), wobei eine erfolgreiche Stabilisierung des organischen Materials nur durch vorkompostierte, also bereits stabilisierte Materialien erreicht wird (Bernal et al., 1998). So wurde die Größe der Nutzflächen unter organischem Management in den 25 EU-Staaten von  $0,1 \times 10^6$  ha im Jahr 1985 über  $1,5 \times 10^6$  ha im Jahr 1995 auf mehr als  $6 \times 10^6$  ha im Jahr 2004 heraufgesetzt (Lampkin, 1997), was 2,9 % der landwirtschaftlich genutzten Fläche entspricht. Dennoch sinkt die OBS weltweit jährlich um  $1 - 2 \times 10^9$  t C (KansasStateUniversity, 2004), was zusammen mit dem  $\text{CO}_2$  aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe zu einer jährlichen Zunahme des atmosphärischen  $\text{CO}_2$ -Pools von  $4,5 - 6,5 \times 10^9$  t C führt. Allerdings stellt die OBS auch eine Senke für  $\text{CO}_2$  dar, da die mikrobielle Biomasse des Bodens  $\text{CO}_2$  durch heterotrophe und autotrophe Prozesse zu binden vermag (Dong and Layzell, 2001; Miltner et al., 2004a).

Infolgedessen könnte durch die Aufklärung der Prozesse der Bildung, der Stabilisierung und des Abbaus der organischen Substanz im Boden die Grundlage für die Lösung anthropogener Probleme durch ein nachhaltiges Bodenmanagement gelegt werden. So könnte:

- durch eine verstärkte CO<sub>2</sub>-Assimilation und OBS-Stabilisierung im Boden dem Treibhauseffekt-bedingten Klimawandel entgegengewirkt werden,
- durch die Steigerung der Bodenfruchtbarkeit, -struktur und -qualität der Hunger der Welt gestillt werden oder
- die Umweltverschmutzung bekämpft werden, da die OBS Pestizide, chlorierte Aromaten und polyaromatische Kohlenwasserstoffe via hydrophober Wechselwirkungen und/oder kovalenter Bindungen festlegen kann (nach Fan et al., 2004).

Das Schwerpunktprogramm 1090 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (<http://www.wzw.tum.de/bk/schwrdt/schwerpt.htm>) hatte das Ziel, das Verständnis der Stabilisierungsmechanismen organischer Substanz in Böden und deren Regulation auf eine neue qualitative und quantitative Stufe zu heben. Damit sollten die Grundlagen für ein nachhaltiges Management des Kohlenstoffhaushalts und für die Erhaltung der Bodenfunktionen gelegt werden. Ein Teilprojekt davon stellt diese Arbeit dar, welche die Bildung der OBS aus der mikrobiellen Biomasse erörtert.

### **1.3 Die Quelle der OBS - Stand des Wissens**

#### *1.3.1 Molekulare Struktur und Ursprung der OBS*

Die Zusammensetzung sowie der Ursprung der OBS sind sehr heterogen. Die OBS stellt ein Gemisch aus Reststrukturen toter Organismen und mikrobiell abgebauten, humifizierten, refraktären organischen Materialien dar (Sollins et al., 1996), die durch eine Vielzahl von physikalischen und chemischen Wechselwirkungen im Boden stabilisiert werden (Krull et al., 2003; von Lützow et al., 2006). Aufgrund unterschiedlicher Abbaugrade und unterschiedlich starker Stabilisierung der in den Boden eingetragenen Substanzen und ihrer spezifischen Inertheit stellt die OBS ein Kontinuum von Substanzen mit verschiedensten Verweilzeiten dar. Diese können für refraktäre oder stabile Substanzen mehrere 1000 Jahre betragen (Haider, 1999).

Aus der Heterogenität der eingetragenen Reststrukturen und deren unterschiedlicher Verweilzeit im Boden ergibt sich eine hohe Komplexität der chemischen

## Einleitung

---

Zusammensetzung der OBS. Zu den bedeutendsten Substanzgruppen der OBS zählen Lignin (30 – 50 %), Proteine (30 – 35 %), Hemicellulose/Pylose (5 – 12 %), Cellulose (3 – 5 %), Fette, Wachse, Öle (0,5 – 4,7 %), Harze (0,3 - 3 %) (nach Stevenson, 1994)) und andere Substanzen sowie daraus resultierende, partiell abgebaute, stabile Reststrukturen. Die möglichen Ursprünge dieser Substanzen wurden durch Kögel-Knabner (2002) zusammengetragen (Tab. 2).

Tabelle 2: Herkunft von Substanzen der OBS (nach Kögel-Knabner, 2002)

Substanzgruppe	Herkunft
Cellulose	Pflanzen, Algen, Pilze, Tiere
Hemicellulose/Pylose	Pflanzen, Pilze, Bakterien
Lignin, Tannin	Pflanzen, Moose, Algen
Proteine, Fettsäuren	Pflanzen, Mikroorganismen, Tiere
Cutin, Suberin	Gefäßpflanzen

### 1.3.2 *Der potentiell mikrobielle Anteil an der OBS*

Die mikrobielle Biomasse besteht hauptsächlich aus Proteinen (50 % der TM), Zellwandbestandteilen (10 – 20 %), RNA (10 – 20 %) und Lipiden (10 %; Schlegel, 1992). Der mikrobielle Beitrag zur Bildung der OBS wird sich folglich primär aus diesen mikrobiellen Substanzen zusammensetzen. Diese Substanzen und ihre Abbauwege sind im Organismenreich allerdings universell vertreten, was eine leichte und schnelle Abbaubarkeit der Substanzen impliziert und folglich einen effektiven Abbau toter mikrobieller Biomasse in kurzer Zeit vermuten lassen würde.

Proteine bzw. Peptide bilden die Haupts substanz bakterieller Zellen und bestehen aus Aminosäuren (AS). AS selbst können ebenfalls von Mikroorganismen abgebaut und von den meisten auch neu synthetisiert (mit Ausnahme einiger essentieller AS; Gottschalk, 1986). Sie dienen im Organismus primär als Baustein zur Proteinbiosynthese und besitzen in ihrer freien Form im Boden eine sehr kurze Halbwertszeit (wenige Stunden bis wenige Tage; Dashman and Stotzky, 1986; Hopkins et al., 1997; Jones, 1999). Dennoch können AS aus dem Boden extrahiert werden (Kielland, 1994; Monreal and McGill, 1985). Hydrolysierbare AS repräsentieren den größten organischen Stickstoffpool im Boden (30 - 45 % des

Bodenstickstoffs nach Jones, 1999; 20 - 51 % nach Friedel and Scheller, 2002). Dies begründet sich darin, dass AS in der toten OBS in gebundener Form auftreten, so z.B. in Proteinen bzw. Peptiden oder Melaninen (Allard, 2006), die sich als Reaktionsprodukt der Maillard-Reaktion von AS (insbesondere basischen) und reduzierenden Kohlenhydraten oder Polyphenolen ergeben oder direkt von Pilzen und Actinomyceten produziert werden (Stevenson, 1982). So zeigte die Analyse des nicht-hydrolysierbaren Teils der OBS mittels Thermochemolyse-GC/MS, dass auch dieser Teil AS beinhaltet (Knicker and Hatcher, 1997). Insgesamt liegen im Boden mehr als 80 % der Stickstoffverbindungen der OBS in Amidbindungen, also Peptiden, vor (Knicker et al., 1993) und mehr als 90 % des Stickstoffs im Boden ist organisch gebunden (Friedel and Scheller, 2002).

Proteine und Peptide sind demnach ein fester Bestandteil der toten OBS (Fan et al., 2004; Kögel-Knabner, 2002). Die Persistenz der Peptide im Boden beruht auf der Einkapselung in hydrophoben Domänen, den Wechselwirkungen mit zumeist negativ geladenen funktionellen Gruppen im Boden (z.B. mit Ton) und der Stabilisierung der 3D-Struktur über Wasserstoffbrücken an Huminstoffoberflächen (Ding and Henrichs, 2002; Schulten and Schnitzer, 1997; von Lützow et al., 2006; Zang et al., 2000). Die uniforme Verteilung der proteinogenen AS und das Vorhandensein bestimmter nicht-proteinogener AS (Ornithin und die für bakterielle Zellwände spezifische AS Diaminopimelinsäure; Kowalenko, 1978; vergleiche 1.3.3) deuten darauf hin, dass die AS in der OBS größtenteils mikrobielle Syntheseprodukte aus dem Abbau pflanzlicher und tierischer Reste sind und somit eine größere Bedeutung haben als die pflanzlichen AS (Friedel and Scheller, 2002; Sowden et al., 1977; Szajdak and Osterberg, 1996). Der Anteil mikrobieller AS in der OBS nimmt folglich mit dem Humifizierungsgrad zu (Allard, 2006). Die mikrobiellen Peptidreste in der Huminstofffraktion können sogar refraktären Charakter erlangen (Fan et al., 2004), wobei für Proteine im Boden Halbwertszeiten von ca. 50 Jahren beobachtet wurden (Gleixner et al., 2002). Ein direkter Zusammenhang zwischen der AS-Zusammensetzung des Bodens und der der mikrobiellen Biomasse konnte allerdings nicht gefunden werden (Friedel and Scheller, 2002). Das bedeutet, dass sich die AS-Zusammensetzung der mikrobiellen Biomasse in Folge von Veränderungen der Bodeneigenschaften, der Vegetation oder des landwirtschaftlichen Anbaus ändern kann. Der größere Pool der AS in der toten OS des Bodens bleibt von solchen

Veränderungen allerdings aufgrund seiner Stabilisierung unbeeinflusst (Friedel and Scheller, 2002).

Die kurzkettigen ( $< C_{20}$ ) Phospholipidfettsäuren (PLFS) sind für die Cytoplasmamembran lebender Mikroorganismen charakteristisch, da sie im Boden eine kurze Halbwertszeit aufweisen (Pinkart et al., 2002; White et al., 1979a; White et al., 1979b). Pilze und Protozoen können in geringen Mengen PLFS bis zu einer Kettenlänge von  $C_{22}$  besitzen. In der Bakterienzelle stellen die PLFS bis zu 99,88 % aller Lipide dar (Hood et al., 1986). Freie Phospholipide werden im Boden zu großen Teilen mineralisiert bzw. in die mikrobielle Biomasse eingebaut, wie Tollefson et al. (1983) anhand von  $^{14}C$ -markiertem Dipalmitoyl-phosphatidylcholin nachwies. Da das PLFS-Muster stammspezifisch ist, kann man aus dem PLFS-Muster der Biomasse eines Bodens Rückschlüsse über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gesellschaft im Boden ziehen (Tunlid et al., 1989). Anhand der Zusammensetzung kann man dann Rückschlüsse auf den physiologischen Status des Bodens ziehen (Tunlid et al., 1989). Das PLFS-Muster stellt dabei eine Funktion der Biomassezusammensetzung, der Umweltbedingungen und der Nahrungsquellen dar (Jandl et al., 2005). Die Identifizierung eines Stammes in einem komplexen Lebensraum wie Boden ist allerdings anhand der Fettsäuren nicht möglich, da diese (auch zwischen Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren) weitestgehend universell sind. Zudem zeigen Mikroorganismen infolge von Adaptationen an Umweltbedingungen Änderungen ihrer Fettsäurezusammensetzung (Ramos et al., 2001). Die in der OBS gebundene Lipidfraktion hat hauptsächlich höhere Pflanzen als Ursprung (Allard, 2006; Jambu et al., 1993), während mikrobielle Produkte einen geringen Anteil daran ausmachen (Schnitzer et al., 1986; Scholes and Scholes, 1995). Dennoch sind auch mikrobielle Fettsäuren in der toten OBS nachgewiesen worden (vergleiche 1.3.3). Der größte Teil der Fettsäuren in der Huminstofffraktion scheint als nicht kovalent gebundene Substanz vorzuliegen, die im makromolekularen Netzwerk der OBS festgelegt ist (Allard, 2006). Sie werden dabei durch ionische Wechselwirkungen, Kationenbrücken, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte stabilisiert (von Lützwow et al., 2006).

Zellwandbestandteile beinhalten diverse Substanzgruppen. Den Gram-negativen und -positiven Bakterien ist das Mureingerüst gemeinsam (vergleiche 1.3.3), das sich im Wesentlichen aus AS und Aminosuktern zusammensetzt. Zellwand-spezifische

Aminosäuren, wie z.B. die Diaminopimelinsäure (wie bereits erwähnt) und die Aminozucker (siehe 1.3.3) sind ebenfalls in der toten OBS nachweisbar.

Die RNA wird aufgrund der Aktivität überall vorhandener und stabiler RNasen nur der lebenden Biomasse zugeschrieben. Sie liegt im Boden also nicht in freier Form vor. Ein hoher RNA-Gehalt von Mikroorganismen ist ein Charakteristikum für die aktiven Mitglieder des mikrobiellen Nahrungsnetzes im Boden. Die RNA bietet damit die Möglichkeit über mit stabilen Isotopen markierten Substraten die Konsumenten, die diese Isotope in ihre RNA integrierten, molekularbiologisch zu identifizieren. Diese Art von Untersuchungen nennt man *RNA-stable isotope probing* (RNA-SIP). SIP-Analysen im Allgemeinen und besonders in Bezug auf Nukleinsäuren sind ein wirkungsvolles Werkzeug zur Beobachtung von Abbauprozessen und zur Identifizierung von Mikroorganismen, die auf definierten, meist niedermolekularen und definitionsgemäß isotopisch-markierten Substraten gedeihen (Dumont and Murrell, 2005).

### 1.3.3 Die Relevanz der mikrobiellen Biomasse für die Bildung der OBS

Aufgrund der Zusammensetzung der OBS (Tab. 2) und der Poolgröße der pflanzlichen Biomasse (ca. 20 % des organischen Bodenkohlenstoffs; Haider, 1999) stellen nach heutiger Meinung Pflanzenreste die größte Quelle von Substanzen zur Bildung der OBS dar. Dies wird dadurch bestärkt, dass nachweislich  $50 - 60 \times 10^9$  t C des pflanzlichen Biomassepools pro Jahr in den Boden eingetragen und die selbe Menge durch die mikrobielle Biomasse wieder abgebaut wird (Haider, 1999). Die Hauptkomponenten der OBS (Polysaccharide und aromatische Substanzen wie z.B. Lignin) sind in Pflanzenwurzeln und -stämmen dominierend. Des Weiteren zeichnet sich die OBS durch in Blüten, Laubblätter und Stämme vorkommende Alkane, Fettsäuren (als Reste von Suberin und Cutin) und Alkohole (als Rest von Suberin) aus. Deshalb beschäftigen sich die meisten Studien mit dem Verbleib und der Transformation von Pflanzenstreu bzw. pflanzlichen Substanzen im Boden (Beuch et al., 2000; Kögel-Knabner, 2002; Pelz et al., 2005).

Der Kohlenstoffpool der aktiven mikrobiellen Biomasse ( $24 - 30 \times 10^9$  t C; Haider, 1999) im Boden beträgt durchschnittlich 1 – 5 % des organischen Bodenkohlenstoffs (Anderson and Joergensen, 1997; Friedel and Scheller, 2002; Kleber et al., 1998; Oades, 1995). Zudem sind 2 – 7 % des Bodenstickstoffs in den Mikroorganismen

gebunden (Friedel and Scheller, 2002). Damit scheint die mikrobielle Biomasse als substantielle Quelle für die Bildung der OBS vernachlässigbar zu sein (Scholes and Scholes, 1995). Die mikrobielle Biomasse repräsentiert nach derzeitigem Wissensstand eine „*Black Box*“, deren Mitglieder und jeweiliger spezifischer Beitrag zur terrestrischen Kohlenstofftransformation weitestgehend unbekannt sind (Tiedje et al., 1999). Nach heutigem Lehrbuchwissen kommt der mikrobiellen Biomasse eine doppelte Rolle im Boden zu. Zum einen bilden sie einen labilen Nährstoffpool und zum anderen baut sie die Pflanzenreste ab und schafft so inerte Biopolymere pflanzlichen Ursprungs, die Teil der refraktären OBS werden (Stevenson, 1994).

Nichtsdestotrotz findet während des Abbaus der leicht abbaubaren, pflanzlichen Substanzen auch ein Aufbau mikrobieller Biomasse statt (z.B. Fliessbach et al., 2000), d.h. eine Transformation von pflanzlichem Kohlenstoff zu mikrobiellem Kohlenstoff. Dementsprechend wurde die Bildung von bakteriellen und pilzlichen Aminosukzern während der Inkubation von Pflanzenstreu mit Mineralen belegt (Amelung et al., 2001). Auch andere Substanzen im Boden, wie Glucose (Baldock et al., 1989), Umweltkontaminanten (Anthracen (Kästner et al., 1995; Richnow et al., 1999); Phenanthren (Richnow et al., 2000); TNT (Weiß et al., 2004)) oder CO<sub>2</sub> (Miltner et al., 2004c), können für den Aufbau mikrobieller Biomasse (Einbau des Kohlenstoffs in die Fettsäuren und Aminosäuren) herangezogen werden. Nach dem Tod dieser mikrobiellen Zellen werden deren Reststrukturen in die tote OBS integriert. Diese Strukturen verkörpern trotz weiteren Abbaus im Boden Komponenten der OBS mit mikrobieller Herkunft und Charakter. So ist zwar der Kohlenstoffeintrag in den Boden pflanzlichen Ursprungs, allerdings handelt es sich nach dem Einbau in die mikrobielle Biomasse um mikrobiellen Kohlenstoff bzw. mikrobielle Substanz, die nach der Lyse in die tote OBS integriert wird. Dieser Eintrag von mikrobiellen Substanzen in die OBS konnte mehrfach eindeutig belegt werden (Kögel-Knabner, 2002). Beispielsweise sind Homo- und Heteropolysaccharide (Glucan), Proteine, kurze Lipide und Melanine (polymere Kondensationsprodukte von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und einem polymeren Kern) sowie Chitin (= N-Acetyl-glucosamin) als Bestandteil von Pilzen in der toten OBS nachweisbar. Eindeutig bakterielle Substanzen in der toten OBS sind bakterielle Zellwandkomponenten. Die Zellwand, die in Gram-positiven Bakterien bis zu 50 % der Trockenmasse ausmacht und in Gram-negativen Bakterien bis zu 10 %,

besteht aus Peptidoglycan (auch Murein genannt), welches sich aus Aminosäuren und spezifischen Kohlenhydraten zusammensetzt. Diese Kohlenhydrate sind N-Acetyl-glucosamin, das auch in Insekten und Pilzen vorkommt, und N-Acetyl-muraminsäure, die allein für Bakterien charakteristisch ist. Beide können eindeutig in der toten OBS nachgewiesen werden. Diaminopimelinsäure, welche einen für das bakterielle Murein spezifischen Aminosäurebaustein darstellt, wurde ebenfalls in der OBS detektiert (Kowalenko, 1978). Des Weiteren sind neben anderen für Bakterien charakteristische Aminosäuren (Kowalenko, 1978) auch bakterielle Dextrane (Kögel-Knabner, 2002), Fettsäuren (Lichtfouse et al., 1995) sowie Alkane und Alkene (Lichtfouse et al., 1998) in der OBS nachweisbar. Dieser Beitrag wurde allerdings bis heute noch nicht quantifiziert. Alle erwähnten Substanzen können in ihrer „freien“ Form gut abgebaut werden, da sie eine geringe bis mittlere intrinsische, biochemische Stabilität aufweisen. Folglich müssen diese Substanzen im Boden stabilisiert werden, um über einen längeren Zeitraum im Boden zu verweilen. Die mikrobiellen Substanzen erlangen dabei sogar partiell einen refraktären Charakter (Rauch and Dreves, 2004). Durch diese Persistenz der mikrobiellen Substanzen im Boden in relativ hohen Konzentrationen zeichnet sich eine bisher unterschätzte Beteiligung der mikrobiellen Biomasse an der Bildung der OBS ab. Da sich die chemische Zusammensetzung der mikrobiellen Biomasse von der der Pflanzenreste und folglich der Umsatz der Substanzen im Boden unterscheidet, hat der mikrobielle Eintrag einen substantiellen Einfluß auf die chemischen Eigenschaften und die Funktion der OBS. Dies wirkt sich direkt auf die resultierenden Bodeneigenschaften aus. Beispielsweise impliziert das C:N-Verhältnis der mikrobiellen Biomasse von ca. 5 gegenüber dem der pflanzlichen Biomasse von  $> 30$  (Kästner, 2000) einen größeren Einfluß der mikrobiellen Biomasse bei der Bildung der OBS, die ein C:N-Verhältnis von 8 – 12 aufweist (Amelung, 1997) und sich in den Feinpartikelfractionen konzentriert (Anderson et al., 1981). Da der Stickstoffbedarf von Pflanzen im Vergleich zu anderen Nährstoffen am höchsten ist, wird der pflanzliche Ertrag durch den mikrobiellen Beitrag zur OBS-Bildung gesteigert (Schachtschabel et al., 1984). Folglich ist der mikrobielle Kohlenstoff als potentielle Quelle für die Bildung der OBS von wesentlichster Bedeutung.

Die Menge der mikrobiellen Zellreste plus Exoenzyme u.ä. stellt den Nettobeitrag des Kohlenstoffs der mikrobiellen Biomasse zur Bildung der OBS dar. Dabei läßt sich

eine relativ hohe Beteiligung mikrobieller Substanzen an der Bildung der OBS vermuten, da der Kohlenstoffpool der mikrobiellen Biomasse im Boden der Hälfte der Kohlenstoffmenge entspricht, die jährlich durch Pflanzenreste in den Boden eingetragen wird (Haider, 1999). Der einmalige Turnover dieser Pflanzenreste, d.h. des neuen Bodenkohlenstoffs, benötigt allerdings mehr als ein Jahr (Van Kessel et al., 2000). Dem gegenüber beträgt die durchschnittliche Wachstumsrate der mikrobiellen Biomasse ca. 1 – 3 pro Jahr (Kästner, 2000; Schink, 1999). Danach kann der Kohlenstoffeintrag durch mikrobielle Reststrukturen in die OBS in der gleichen Größenordnung liegen wie der Eintrag durch pflanzliche Reste.

Obwohl die Mikroorganismen offensichtlich auch substantiell zur Bildung der toten und der refraktären OBS beitragen, ist es ausgehend vom heutigen Wissensstand nicht möglich, Rückschlüsse auf das Ausmaß des mikrobiellen Beitrags zu ziehen. Bis heute gibt es keine Methoden, die eine separate Analyse des Kohlenstoffs der mikrobiellen Biomasse und der toten OBS zulassen, weshalb für die Untersuchung der toten OBS differenzierte Methoden zur Analyse der Komponenten in der Biomasse und im gesamten Boden eingesetzt werden. Des Weiteren führt der Einbau des mikrobiellen Kohlenstoffs in die OBS zu keiner Steigerung des Bodenkohlenstoffs, sondern lediglich zu einer Änderung der Zusammensetzung, der Halbwertszeiten und letztlich der Eigenschaften der OBS. Da die molekulare Struktur weitreichende Auswirkungen auf die Bodeneigenschaften haben kann, wird in dieser Studie der Einbau von Kohlenstoff der mikrobiellen Biomasse in die (evtl. refraktäre) OBS untersucht.

### **1.4 Allgemeine Fragestellung und Konzeption der Arbeit**

Trotz der theoretisch leichten Abbaubarkeit toter mikrobieller Zellen bzw. ihrer Komponenten, wie Aminosäuren und Fettsäuren, sind diese im Boden nachweisbar (vergleiche 1.3.2). Peptidreste und Fettsäuren werden in der OBS physikalisch und chemisch stabilisiert, was anhand von Inkubationsversuchen mit derartigen Substanzen bereits untersucht wurde (vergleiche 1.3.3). Allerdings ist der Beitrag von in der Biomasse integrierten Substanzen bisher noch nicht quantifiziert worden. Der Kohlenstoffumsatz der Biomassekomponenten kann durch substanzspezifische Eigenschaften und durch Wechselwirkungen innerhalb der Zellstruktur beeinflusst

werden. Beispielsweise werden die Substanzen in der Zelle oder in Zellfragmenten durch chemische Bindungen, physikalische Kräfte oder Einkapselung in ihrer molekularen Umgebung geschützt und stabilisiert. Des Weiteren beeinflussen Primingeffekte, Konkurrenz oder Inhibition durch verschiedene Substanzen den Abbau der mikrobiellen Komponenten durch die indigene (entspricht autochthone und zymogene) Mikroflora (Kuzyakov et al., 2000).

Daraus resultieren für die Quantifizierung des Beitrags mikrobieller Biomasse zur Bildung der OBS folgende Fragen:

- Wie groß ist der Beitrag des mikrobiellen Kohlenstoffs?
- Welche Mikroorganismen der indigenen Biomasse haben primär Einfluß auf den Verbleib des mikrobiellen Kohlenstoffs bzw. sind aktiv an der initialen Kohlenstoffmineralisierung und -assimilierung beteiligt?
- Sind alle Substanzklassen eines Organismus in gleichem Ausmaß an der Bildung der OBS beteiligt?
- Werden mikrobielle Substanzen als intakte und unter Umständen funktionsfähige Moleküle in der toten OBS stabilisiert?

Um den Einbau des mikrobiellen Kohlenstoffs in die tote OBS zu untersuchen, wurde ein isotopisch (mit dem stabilen Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$ ) und genetisch (mit dem *lux*-Gen) markierter Mikroorganismus mit Modellcharakter für Gram-negative Bakterien in einem landwirtschaftlich genutztem Boden inkubiert. Die Auswahlkriterien und die Eigenschaften des Modellorganismus' und des verwendeten Bodens sind im Kapitel 2 näher erläutert. Um die Freisetzung des mikrobiellen Kohlenstoffs im Boden und den folgenden Einbau des Kohlenstoffs in das mikrobielle Nahrungsnetz oder die tote OBS zu gewährleisten, mußte das Überleben des Mikroorganismus' in dem System limitiert sein, weshalb ein *E. coli*-Stamm für die Untersuchungen herangezogen wurde (vergleiche 4.1). Anhand der genetischen Markierung mit dem *lux*-Gen und der daraus resultierenden Biolumineszenz konnte das Überleben der *E. coli*-Zellen und die Persistenz der genetischen Information im Boden verfolgt werden. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung der Zellen ermöglichte die Identifizierung und Quantifizierung der *E. coli*-Reste im Boden, die Analyse der Kohlenstoffverteilung zwischen der indigenen mikrobiellen Biomasse, der toten OBS und dem mineralisierten  $\text{CO}_2$  sowie die Identifizierung der Primärkonsumenten der *E. coli*-Zellen.

## Einleitung

---

Der mikrobielle Beitrag zur Bildung der OBS und das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen mikrobiellen Substanzen wurde während einer Inkubation sterbender, *lux*- und  $^{13}\text{C}$ -markierter *E. coli*-Zellen im Boden untersucht. Die allgemeinen Fragestellungen sollten dabei anhand der folgenden Analysen beantwortet werden können:

- Beobachtung der Abnahme der Lebendzellzahl von *E. coli* im Boden,
- Kinetische Analyse der Mineralisierung des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  und der im Boden verbleibenden  $^{13}\text{C}$ -Menge,
- Identifizierung der Primärkonsumenten (oder Mikroprädatoren) der eingetragenen *E. coli*-Zellen, d.h. die Identifizierung von Schlüsselmitgliedern des mikrobiellen Nahrungsnetzes mittels RNA-SIP,
- Untersuchung auf die Persistenz der genetischen Information im Boden und
- Kinetische Analyse des Einbaus der *E. coli*-bürtigen Fettsäuren (als Modellsubstanz für apolare Verbindungen) und Aminosäuren (als Modellsubstanz für eher polare Verbindungen) in die autochthone Biomasse des Bodens und in die tote OBS.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von VWR/Merck (Darmstadt, Deutschland) im höchsten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad (p. A.) bezogen.

Tabelle 3: Chemikalien und deren Vertreter

Chemikalien	Vertreiber
100 bp-DNA-Leiter	BIOzym Diagnostics GmbH, Hes. Oldendorf, Deutschland
<sup>13</sup> C-markierter D-Glucose-U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ( <sup>13</sup> C 99 atom%)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biorad, Hercules, CA, USA
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cäsiumtrifluoracetat	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
De-oxynucleosidtriphosphate	Pharmacia, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fettsäurestandardmischung ( <i>Bacterial Acid Methyl Esters</i> )	Supelco, München, Deutschland
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems; Foster City; USA
Kanamycin	ICN Biochemicals, Aurora, USA
<i>Msp I</i> (Enzym)	<i>Msp I</i> (Promega, Mannheim, Deutschland)
Natrium-deoxycholat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Poly(vinylpyrrolidon)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG 6000)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RiboGreen	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
RNase-freie DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
ROX-markierter <i>MapMarker</i> (1000bp Leiter)	Bio-Ventures, Murfreesboro, USA
Silicagel (für PLFS-Analyse)	Unisil, Clarkson Chromatography Products, South Williamsport, USA
Silicagel (für t-FS-Analyse)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
SybrGreen	FMC Bioproducts, Rockland, USA
<i>tetra</i> -Natriumpyrophosphat (> 98 %)	Fluka, Buchs, Schweiz

### 2.1.2 Boden

Da der Boden eine bereits etablierte mikrobielle Population aufweisen sollte, die an die Zugabe von *Enterobacteriaceae*, z.B. durch Stallmistdüngung, und an die Wechselwirkung mit *E. coli*-Zellen angepaßt war, wurde ein landwirtschaftlich genutzter Boden herangezogen. Der verwendete Boden stammte vom landwirtschaftlichen Langzeit-Feldexperiment „Ewiger Roggenbau“ der Universität Halle, Deutschland. Die Versuchsfelder wurden seit 1878 mit Roggen bestellt, wobei auf den einzelnen Feldern unterschiedliche Düngungsvarianten eingesetzt wurden. Das für die vorliegenden Versuche verwendete Ah-Material wurde im September 2000 gesammelt und stammte aus einem Versuchsfeld mit kontinuierlicher Stallmistdüngung ( $12 \text{ t ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ). Der Boden wurde als Haplic Phaeozem (Tab. 4; Flessa et al., 2000) mit einem natürlichen Kohlenstoffgehalt von  $140 \mu\text{g g}^{-1}$  und  $7,5 \times 10^6$  koloniebildenden Einheiten (KBE)  $\text{g}^{-1}$  (Kindler et al., 2006) charakterisiert. Für den Versuch wurde der Boden im nativen Zustand eingesetzt, um die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens (Lynch, 1982) und folglich die Freisetzung des organischen Kohlenstoffs nicht zu beeinflussen. Der Boden wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und vor dem Beginn des Experimentes durch ein 2-mm-Sieb (Retsch, Haan, Deutschland) gesiebt, um den Einfluß von Pflanzenresten zu minimieren.

Tabelle 4: Bodenparameter (Kindler et al., 2006); <sup>a</sup> Daten aus Flessa et al. (2000)

Boden	Haplic Phaeozem
Sand	70 % <sup>a</sup>
Schluff	20 % <sup>a</sup>
Ton	10 % <sup>a</sup>
pH (CaCl <sub>2</sub> )	6,2
Wasserhaltekapazität	28,3 %
C <sub>org</sub>	1,9 wt %
$\delta^{13}\text{C}$	-26,3 ‰
N <sub>total</sub>	0,1 %
$\delta^{15}\text{N}$	19,9 ‰
Mikrobieller Biomasse C	135 $\mu\text{g g}^{-1}$ (CFE) 148 $\mu\text{g g}^{-1}$ (SIR) $7,5 \times 10^6$ KBE $\text{g}^{-1}$ (R2A-Agar)

### 2.1.3 Bakterienstamm und Kultivierung

Als Modellorganismus wurde der biolumineszente Stamm *Escherichia coli* RFM443 (Rozen et al., 1999), der die *luxCDABE*-Kaskade auf einem *high-copy* Plasmid trägt, gewählt. Gründe dafür waren außer einem limitierten Überleben der Zellen im Boden, da der Kohlenstofffluß das eigentliche Untersuchungsobjekt darstellte,

- dass *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) durch organische Düngung in landwirtschaftlich genutzte Böden eingetragen werden,
- dass die lebenden Zellen durch die Biolumineszenz sensitiv nachgewiesen werden können,
- dass *E. coli* eines der am besten charakterisierten, Gram-negativen Bakterien ist, dessen limitiertes Überleben im Boden auch bereits untersucht wurde (Bogolian et al., 1996) und
- dass sich *E. coli* durch seine chemische Zusammensetzung und deren Ähnlichkeit zu anderen Gram-negativen Zellen (Schlegel, 1992) als Modellorganismus für die Gram-negative Biomasse im Boden auszeichnet.

Dieser biolumineszente Stamm entstand bei der Transformation des Plasmids pASU in *E. coli* UTL2 (Rozen et al., 1999). Das Plasmid trägt das 4-Chlorbenzoesäure-Dehalogenase-Operon von *Arthrobacter* SU, das mit dem *luxCDABE*-Gen von *Vibrio fischeri* fusioniert wurde, sowie die Gene für die Resistenzen gegenüber Kanamycin und Ampicillin. Das Plasmid und die resultierende Fähigkeit des Stammes zur Biolumineszenz ermöglichten sowohl molekularbiologische Untersuchungen als auch die Detektion der lebenden Zellen nach Inkubation mit 4-Chlorbenzoesäure (CBS; Rozen et al., 1999).

Der *E. coli*-Stamm wurde in LB-Medium (Tab. 5) mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin kultiviert. Für die Produktion der  $^{13}\text{C}$ -markierten Biomasse erfolgte die Kultivierung von *E. coli* RFM443 in einem optimierten Mineralmedium (Tab. 5; Kindler et al., 2006) mit  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin und  $2 \text{ g l}^{-1}$   $^{13}\text{C}$ -markierter D-Glucose- $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ . Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung des *E. coli*-Kohlenstoffs betrug 98 atom% (Kindler et al., 2006). Die unmarkierten Zellen des Kontrollansatzes wurden durch Kultivierung in dem Mineralmedium mit Glucose mit natürlicher Isotopensignatur gewonnen. Die Kulturen wurden dafür auf einem Rotationsschüttler bei  $200 \text{ U min}^{-1}$  und  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen durch Zentrifugation ( $8000 \cdot \text{g}$ ,

## Material und Methoden

---

5 min, 4°C) geerntet und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen.

Tabelle 5: Medien zur Kultivierung von *E. coli* RFM443

Medium	LB-Medium	Mineralmedium
pH	pH 7,2	pH 7,2
Zusammensetzung	10 g l <sup>-1</sup> tryptisch verdautes Pepton 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt 5 g l <sup>-1</sup> NaCl	6,97 g l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,42 g l <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g l <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1,0 g l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl 0,1 g l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 0,01 g l <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> 0,2 mg l <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> 0,2 mg l <sup>-1</sup> MnSO <sub>4</sub> 2 g l <sup>-1</sup> Glucose

---

## 2.2 Aufbau des Experimentes

Der Boden wurde in drei verschiedenen Ansätzen inkubiert:

- Boden ohne Zugabe von Bakterienzellen (Leerwert),
- Boden mit unmarkierten *E. coli*-Zellen (Kontrolle) und
- Boden mit <sup>13</sup>C-markierten *E. coli*-Zellen (<sup>13</sup>C-Ansatz).

Jeder Ansatz bestand aus zwei Kilogramm (TM) Boden. Die mit Zellen inkubierten Ansätze wurden entsprechend mit  $1,3 \times 10^8$  <sup>13</sup>C-markierten bzw. unmarkierten *E. coli*-Zellen (Kontrolle) pro g Boden (TM) beimpft. Die zugesetzten Zellen entsprachen 26 % der natürlichen mikrobiellen Biomasse. Der zugesetzte mikrobielle Kohlenstoff von 36,5 µg C g<sup>-1</sup> (entspricht 3 µmol <sup>13</sup>C g<sup>-1</sup>) Boden korrespondierte mit 18 % des natürlichen <sup>13</sup>C-Gehaltes des Bodens.

Die geernteten Zellen wurden in einer Bodenlösung suspendiert, die durch die Filtration einer 1:1 (m:m) Mixtur von Boden und Wasser durch eine Glasfasermembran (GF/B; Whatman International Ltd., Maidstone, UK) erhalten wurde. Parallel dazu wurde die Zellzahl mittels Fluoreszenzmikroskopie der mit

Acridinorange gefärbten Zellen in einer entsprechend mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) verdünnten Zellsuspension ermittelt. Die Zellsuspensionen in der Bodenlösung bzw. die Bodenlösung (für den Leerwert) wurden tropfenweise zu den zu inkubierenden Böden gegeben, wobei durch Mixen mit einer Teigrührmaschine (Kenwood Major, Seligenstadt, Deutschland) eine homogene Verteilung erreicht wurde. Der Wassergehalt der Bodenmixturen wurde schließlich durch Zugabe von Bodenlösung auf 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt.

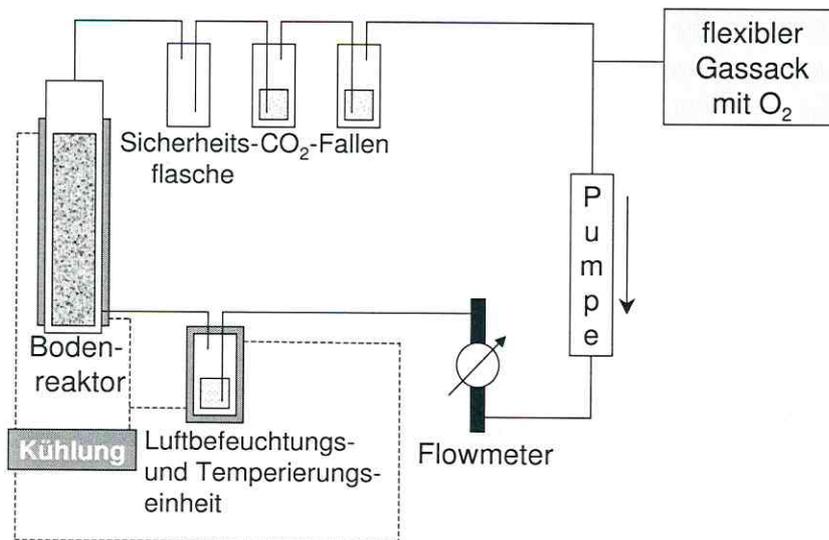


Abbildung 1: Schema einer Inkubationsapparatur (Boden-Bioreaktor-System; Kindler et al., 2006)

Die unterschiedlichen Ansätze wurden jeweils in einem geschlossenen Boden-Bioreaktor-System mit kontinuierlicher Luftzirkulation inkubiert. Der Boden wurde in temperierte (20 °C) Glasreaktoren (55 cm Höhe; 10 cm Durchmesser; 5 l Volumen) eingebracht, die mit befeuchteter und temperierter Luft bei einem Fluss von 30 ml min<sup>-1</sup> belüftet wurden (modifiziert nach Weiß et al., 2004; Abb. 1). Die Luft, die den Bodenreaktor durchströmte, wurde durch drei Flaschen geleitet. Die erste war eine Sicherheitsflasche, um einen eventuellen Rückfluß von NaOH in den Bodenreaktor zu verhindern. Die zweite und dritte Flasche waren CO<sub>2</sub>-Fallen, die NaOH (1 mol l<sup>-1</sup>; 100 ml) enthielten. Das Luftdruckdefizit, das durch die Entfernung

des CO<sub>2</sub> entstand, wurde durch Sauerstoff-Zudosierung aus einem flexiblen Gassack, der als verbrauchsabhängiges, selbstdosierendes System funktionierte, kompensiert. Die Schläuche bestanden aus Tygon R3603V (äußerer Durchmesser 15,9 mm; Wandstärke 4,8 mm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), um die Gasdiffusion aus dem System zu minimieren.

Für spätere Analysen wurden zu Beginn des Experimentes 150 g des Bodens zurückgestellt. Des Weiteren wurden nach 1, 2, 4, 8, 15, 23 und 32 Inkubationswochen Bodenproben aus den Reaktoren entnommen. Dafür wurden die Glasreaktoren am oberen Ende geöffnet und jeweils sieben vertikale Bodenkerne (je ca. 20 g) an unterschiedlichen Orten der Bodensäule entnommen, die ca. 150 g Boden entsprachen. Um eine für jeden Ansatz gültige Aussage zu erhalten, wurden die Probenkerne jedes Ansatzes gepoolt und homogenisiert. Die Analyse der homogenisierten Proben in drei Parallelen stellte damit nicht nur ein Maß für die analytische Präzision dar, sondern repräsentierte einen allgemein gültigen Mittelwert aus allen evtl. auftretenden Mikroinhomogenitäten im gesamten inkubierten Boden. Nach der Probennahme wurde der verbleibende Reaktorinhalt mittels einer Metallspirale vermischt, um größeren Gasporen und Gasflüssen vorzubeugen.

### 2.3 Analytische Methoden

#### 2.3.1 Nachweis lebender *E. coli*-Zellen im Boden

Die Quantifizierung der lebenden *E. coli* RFM 443-Zellen im Boden erfolgte über die Detektion der biolumineszenten Zellen aus Bodenextrakten (Kindler et al., 2006) mittels einer *Most Probable Number* Methode (MPN; de Man, 1975).

Die Mikroorganismen wurden durch Zugabe von 10 ml *tetra*-Natriumpyrophosphat Lösung (2,8 g l<sup>-1</sup>) und einer zehnmütigen Inkubation im Ultraschallbad aus fünf Gramm Boden extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte dekadisch verdünnt. Dabei wurden von jedem Bodenansatz drei Biomasseextraktionen durchgeführt, von denen jeweils drei Verdünnungsreihen hergestellt wurden. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 500 µl zu 1,5 ml LB-Medium mit 50 mg l<sup>-1</sup> Kanamycin in Zellkulturplatten (Nunc Multidish, 24 Kavitäten, Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben und zwei Tage auf einem Rotationsschüttler bei 30°C und 200 U min<sup>-1</sup> inkubiert.

Die Induktion der Biolumineszenz erfolgte leicht modifiziert nach Rozen (1999). Dafür wurde die erhaltene Anreicherungskultur in neuen Zellkulturplatten 1:10 in LB-Medium mit  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS; pH 7,0) verdünnt und auf dem Rotationsschüttler bei  $30^\circ\text{C}$  und  $200 \text{ U min}^{-1}$  für zwei Stunden inkubiert. In den so erhaltenen Zellen der früh-exponentiellen Phase wurde durch Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  LB-Medium mit  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  MOPS und  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  CBS (pH 7,0) zu  $100 \mu\text{l}$  jeder Zellsuspension in einer Mikrotiterplatte für Lumineszenzmessungen (sterile Zellkultur-Mikrotiterplatte, Dynex Technologies, Worthing, UK) die Biolumineszenz induziert. Diese wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Multilabel counter 1420, Victor<sup>2</sup>, Wallac, Turku, Finnland) bei  $26^\circ\text{C}$  über einen Tag aufgezeichnet.

Lumineszenzwerte, die das Zehnfache der Werte von reinem Medium überstiegen, wurden als positive, lumineszierende Kulturen angesehen. Die Auswertung erfolgte nach MPN-Tabellen für drei Parallelen (de Man, 1975). Dabei wurde die Zellzahl für jeden Inkubationsansatz dreimal bestimmt.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze lebender *E. coli* RFM443-Zellen im Boden wurde eine Verdünnungsreihe von *E. coli*-Zellen in Boden zwischen  $1 \text{ Zelle g}^{-1}$  und  $10^8 \text{ Zellen g}^{-1}$  hergestellt. Dafür wurden entsprechende Verdünnungsstufen von *E. coli* RFM443-Zellen zu Bodenaliquoten gegeben. Von dieser Reihe wurde nach der zuvor beschriebenen Methode die Zellzahl bestimmt.

### 2.3.2 Analyse des emittierten $\text{CO}_2$

Das in der  $1 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH-Lösung der  $\text{CO}_2$ -Fallen gebundene  $\text{CO}_2$  wurde durch Titration von  $10 \text{ ml}$ -Aliquoten mit  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  HCl gegen pH 10,5 mit einem automatischen Titrator (Mettler DL 21, Mettler, Greifensee, Schweiz) bestimmt (Kindler et al., 2006). Zuvor wurde das Carbonat mit  $2 \text{ ml}$   $1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{BaCl}_2$  präzipitiert. Die Bestimmung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses erfolgte nach Ansäuerung von  $3\text{-ml}$ -Aliquoten der Falleninhalte mit 32 %iger Schwefelsäure in  $10 \text{ ml-Headspace}$ -Röhrchen. Proben aus der Gasphase des Röhrchens wurden dann zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses des freigesetzten  $\text{CO}_2$  mittels Gaschromatographie-Combustion-Isotope Ratio Massenspektrometrie (GC/C/IRMS) analysiert. Dies erfolgte unter Benutzung eines Finnigan MAT 252 *Isotope Ratio*

Massenspektrometers mit einem GC-Verbrennungsinterface (Temperatur des Oxidationsofens: 940 °C; Temperatur des Reduktionsofens: 640 °C; Finnigan, Bremen, Deutschland), das mit einem HP 6890 Plus Gaschromatographen (Hewlett Packard, Wilmington, USA) verbunden war (GC/C/irMS; Finnigan MAT 252 equipped with a GC combustion interface coupled to a Hewlett Packard 6890 Plus gas chromatograph; Miltner et al., 2004b). Für die gaschromatographische Trennung des CO<sub>2</sub> von permanenten Gasen wurde eine Poraplot Q-HT Plot FS Säule (25 m × 0,32 mm × 10 µm, Chrompack, Middelburg, Niederlande) und ein isothermes Temperaturprogramm bei 40 °C verwendet.

### 2.3.3 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes und des <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Isotopenverhältnisses im Boden und in der *E. coli*-Biomasse

Die Bodenproben und die *E. coli*-Biomasse wurden bei 40 °C getrocknet. Für die weitere Analyse der Bodenproben wurden diese gemahlen (Schwingmühle MM200, Reetsch, Haan, Deutschland). Der Kohlenstoffgehalt und das <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Isotopenverhältnis der Bodenproben (1,5 mg) wurden durch *bulk*-Analysen durchgeführt. Dafür wurde eine *on-line* Elementaranalyse-*Isotope Ratio* Massenspektrometrie (EA/IRMS)-Technik eingesetzt. Die Messungen erfolgten mit einem EA 1108 CHN Analyzer (Carlo Erba, Mailand, Italien), der mit einem Delta C Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) über ein Conflo II Interface verbunden war.

Die Isotopenzusammensetzung der *E. coli*-Biomasse wurde durch Elementaranalyse mit einem Elementaranalysator/Massenspektrometer (EA/MS; *Elementary analyzer*, Euro EA 3000 und Balzer *quadrupole mass spectrometer, model* QMG 422, Balzer Instruments, Liechtenstein) bestimmt (Kindler et al., 2006).

### 2.3.4 Quantifizierung und Bestimmung des Isotopenverhältnisses der Phospholipide (PLFS) und Gesamtfettsäuren (t-FS) im Boden

Um eine Unterscheidung treffen zu können, welche Fettsäuren dem mikrobiellen Pool und welche dem nicht-lebenden Pool der organischen Substanz im Boden zuzuordnen sind, wurden zwei unterschiedliche Extraktionen durchgeführt: die

Extraktion der mikrobiellen Phospholipidfettsäuren (PLFS) und die Extraktion der Gesamtfettsäuren (t-FS) im Boden (Kindler et al., in prep.).

Die mikrobiellen Fettsäuren wurden mittels eines Ein-Phasen-Gemisches aus Phosphatpuffer (2 ml), Methanol (5 ml) und Chloroform (2,5 ml) während einer zweistündigen Inkubation auf dem Schüttler aus dem Boden (1 g) extrahiert (Bligh and Dyer, 1959; Zelles, 1997). Nach Zugabe von Wasser (2,5 ml) und Chloroform (2,5 ml) fand eine Phasentrennung statt, wobei die Fettsäuren in der organischen Phase vorlagen. Diese Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft (Rotationsverdampfer Rotavapur-R124 und Wasserbad-B480, Büchi, Flawil, Schweiz). Die in Chloroform aufgenommenen Extrakte wurden durch eine Chromatographie über Ammoniumacetat-behandeltes Silicagel und mit Chloroform (5 ml), Aceton (5 ml) und Methanol (10 ml) als Eluenten in Neutrallipide, Glykolipide und Phospholipide aufgetrennt. Die Phospholipidfraktion wurde mittels Chlortrimethylsilan und Methanol 1:9 (V/V) bei 60 °C für 2 h methyliert (Thiel et al., 2001).

Die Analyse der Gesamtfettsäuren des Bodens, welche auch die mikrobiellen Fettsäuren beinhalteten, wurde durch direkte Methylierung im Boden erreicht (Thiel et al., 2001). Dafür wurden 2 ml Derivatisierungsreagenz (Chlortrimethylsilan: Methanol 1:9) direkt auf den trockenen Boden (1 g) gegeben. Die Fettsäuremethylester (FSMEs) wurden mit Diethylether aus dem Boden extrahiert und über Silicagel aufgereinigt.

Die FSMEs beider Fraktionen wurden via Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) identifiziert und quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde vor der Injektion in die GC/MS ein interner Standard (FSME von 21:0) zur Probe zugegeben. Die FSMEs wurden durch Vergleich der Retentionszeiten der Fettsäuren in der Probe mit denen einer Standardmischung (*Bacterial Acid Methyl Esters*) und durch Auswertung der Massenspektren identifiziert. Die Trennung der FSMEs erfolgte über eine BPX-5 Säule (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm; SGE, Darmstadt, Deutschland) und einem HP 6890 Gaschromatographen, der mit einem HP 5973 massenselektiven Detektor (Hewlett Packard, Wilmington, USA) verbunden war. Das Temperaturprogramm und weitere Analysenparameter sind in Tabelle 6 angegeben.

Das Isotopenverhältnis der einzelnen FSMEs wurde mittels GC/C/IRMS bestimmt. Die FSMEs wurden über eine BPX-5 Säule (50 m × 0,32 mm × 0,5 µm; SGE,

## Material und Methoden

Darmstadt, Deutschland) in einem HP 6890 Gaschromatographen mit den in Tabelle 6 angegebenen Parametern getrennt. Die eluierten Substanzen wurden im *Combustion Interface* oxidiert (Temperatur des Oxidationsofens: 940 °C; Temperatur des Reduktionsofens: 640 °C) und deren Isotopensignatur mittels Finnigan MAT 252 *Isotope Ratio*-Massenspektrometer (Finnigan, Bremen, Deutschland) analysiert.

Die Isotopensignaturen in atom% der FSME wurden für die Berechnung der Menge der <sup>13</sup>C-markierten Fettsäuren herangezogen. Eine Isotopenfraktionierung während der Probenaufbereitung wurde im Vergleich zu den im Experiment vorliegenden <sup>13</sup>C-Anreicherungen der Proben als vernachlässigbar angesehen. Während der Methylierung wurde in jede Fettsäure ein zusätzliches C-Atom mit natürlichem <sup>13</sup>C-Gehalt eingefügt. Die daraus resultierende Änderung der Isotopensignatur zwischen den beobachteten Fettsäuren unterschied sich maximal um 3,2 % und wurde deshalb im Verhältnis zu den analysebedingten Abweichungen als vernachlässigbar angesehen.

Tabelle 6: Parameter für die Fettsäureanalyse

Analyse	GC/MS	GC/C/IRMS
Säule	BPX-5 Säule (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm)	BPX-5 Säule (50 m × 0,32 mm × 0,5 µm)
Temperaturprogramm	120 °C 4 min	70 °C 1 min
	2 °C min <sup>-1</sup> 250 °C 0 min	20 °C min <sup>-1</sup> 120 °C 0 min
	20 °C min <sup>-1</sup> 300 °C 10 min	2 °C min <sup>-1</sup> 300 °C 15 min
Split	<i>splitless</i>	1:1
Heliumfluß	2 ml min <sup>-1</sup>	2 ml min <sup>-1</sup>
Injektortemperatur	280 °C	280 °C
<i>Transferline</i> -Temperatur	300 °C	

Die Fettsäuren (FS) wurden nach folgendem, allgemein gültigen System A:BωD benannt. Dabei ist A die Kettenlänge des Fettsäurerückgrats, B ist die Anzahl der Doppelbindungen, und D gibt die Position der Doppelbindung ausgehend vom Methylende an. Das Präfix i bzw. a kennzeichnet das *iso*- bzw. *anteiso*-Isomer der Fettsäure. Verzweigungen an anderen Positionen sind in folgender Weise

dargestellt: Eme-A:B, wobei E die Position der Methylgruppe (me) angibt. Bei einer undefinierten Verzweigung der Fettsäure ist dies durch den Präfix br (*branched*) gekennzeichnet. Die Cyclopropan-Fettsäuren sind durch das Präfix cy gekennzeichnet. In diesem Fall wird das Methylenkohlenstoffatom zur Anzahl der Kohlenstoffatome des Rückgrats dazugezählt (cyA+1:B).

### 2.3.5 Quantifizierung und Bestimmung des Isotopenverhältnisses der mikrobiellen und Gesamt-Aminosäuren im Boden

Um eine Unterscheidung treffen zu können, welche Aminosäuren dem mikrobiellen Pool und welche dem nicht-lebenden Pool der organischen Substanz im Boden zuzuordnen sind, wurden zwei unterschiedliche Bodenextraktionen durchgeführt: die Extraktion der mikrobiellen Aminosäuren ( $AS_{\text{mik}}$ ) aus den Bakterienextrakten und die Extraktion der Gesamt-Aminosäuren ( $AS_{\text{total}}$ ) aus dem Boden (Kindler et al., in prep.). Die Bakterienextraktion erfolgte nach Rassmussen. Diese wurde durch zweistündige Inkubation von fünf Gramm Boden mit einem Gramm Chelex 100 und 10 ml 0,1 % Natrium-Deoxycholat / 2,5 % Polyethylenglycol-Lösung auf dem Überkopfschüttler erreicht. Dann wurden durch 15 min Zentrifugation bei  $960 \cdot g$  und  $4^\circ C$  grobe Bodenpartikel abgetrennt. Die Bakterien wurden anschließend bei  $11000 \cdot g$  über eine Stunde und  $4^\circ C$  pelletiert.

Aus dem Bakterienpellet wurden anschließend die  $AS_{\text{mik}}$  und aus einem Gramm Boden die  $AS_{\text{total}}$  auf gleiche Weise extrahiert und derivatisiert (Macko et al., 1987). Die Proben wurden mit 5 ml  $6 \text{ mol l}^{-1}$  HCl unter Stickstoffatmosphäre bei  $110^\circ C$  über 22 h hydrolysiert. Grobe Bodenpartikel wurden mittels Filtration des Hydrolysates durch Glasfasermembranen (Filter Device Puradisc<sup>TM</sup> 25 GF/F,  $0,7 \mu\text{m}$ , Glas Microfiber, Whatman Inc., Clifton, USA) entfernt. Zwei Milliliter des Hydrolysates wurden bis zur Trockne (Rotationsverdampfer Rotavapur-R124 und Wasserbad-B480, Büchi, Flawil, Schweiz) einrotiert. Durch Zugabe von einem Milliliter *iso*-Propanol und 250  $\mu\text{l}$  Acetylchlorid und Inkubation bei  $110^\circ C$  für eine Stunde wurde die Carbonylgruppe *iso*-propyliert. Die getrocknete Probe wurde bei  $60^\circ C$  eine Stunde lang in Anwesenheit von 0,5 ml Dichlormethan und 0,5 ml Trifluoressigsäureanhydrid an der Aminogruppe trifluoracetyliert bevor sie getrocknet und in 500  $\mu\text{l}$  Dichlormethan aufgenommen wurde.

## Material und Methoden

---

Die Aminosäurederivate beider Fraktionen wurden via GC/MS identifiziert und quantifiziert. Für die Quantifizierung der Aminosäuren (AS) wurden die jeweiligen integrierten Flächen der Probe mit den entsprechenden Peakflächen eines externen Standards ins Verhältnis gesetzt. Dieser Standard enthielt alle detektierbaren Aminosäuren und wurde für jeden Ansatz mitgeführt. Die Identifizierung der AS erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der AS in der Probe mit denen des externen Standards und durch Auswertung der Massenspektren. Die Trennung der AS erfolgte mit dem gleichen Equipment (Säule und GC/MS), das bei der Fettsäureanalytik Anwendung fand. Die Analysenparameter sind in Tabelle 7 angegeben.

Das Isotopenverhältnis der einzelnen AS wurde mittels GC/C/IRMS bestimmt, wobei der gleiche Säulentyp und die gleichen Apparaturen wie bei den Fettsäurebestimmungen genutzt wurden. Die eluierten Substanzen wurden im *Combustion Interface* oxidiert (Temperatur des Oxidationsofens: 940 °C; Temperatur des Reduktionsofens: 640 °C) und deren Isotopensignatur mittels Finnigan MAT 252 *Isotope Ratio*-Massenspektrometer (Finnigan, Bremen, Deutschland) analysiert. Die Analysenparameter sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Parameter für die Aminosäureanalyse

Analyse	GC/MS	GC/C/IRMS
Säule	BPX-5 Säule (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm)	BPX-5 Säule (50 m × 0,32 mm × 0,5 µm)
Temperaturprogramm	50 °C 1 min	50 °C 5 min
	30 °C min <sup>-1</sup> 100 °C 5 min	4 °C min <sup>-1</sup> 260 °C 0 min
	10 °C min <sup>-1</sup> 175 °C 5 min	20 °C min <sup>-1</sup> 300 °C 5 min
	10 °C min <sup>-1</sup> 250 °C 5 min	
	30 °C min <sup>-1</sup> 300 °C 12 min	
Split	50:1	3:1
Heliumfluß	2 ml min <sup>-1</sup>	2 ml min <sup>-1</sup>
Injektortemperatur	280 °C	250 °C
<i>Transferline</i> -Temperatur	300 °C	

Eine etwaige Isotopenfraktionierung während der Probenaufbereitung wurde im Vergleich zu den Anreicherungen im Experiment als vernachlässigbar angesehen. Allerdings wurde eine Korrektur der Isotopensignatur durchgeführt, da das Derivatisierungsprodukt jeder AS durch *iso*-Propylierung drei zusätzliche Kohlenstoffatome pro Carbonylgruppe und durch Trifluoracetylierung zwei zusätzliche Kohlenstoffatome pro Aminogruppe enthielt. Die Korrektur erfolgte nach der folgenden Formel.

$$IS_{korr} = \frac{IS_{mess} * [n_{AS} + n_{TFAA} + n_{IP}] - IS_{TFAA} * n_{TFAA} - IS_{IP} * n_{IP}}{n_{AS}} \quad (1)$$

Dabei stellten  $IS_{korr}$  und  $IS_{mess}$  die korrigierten und gemessenen Isotopensignaturen der AS dar. Die Isotopensignaturen von Trifluoressigsäure ( $IS_{TFAA}$ ) und *iso*-Propanol ( $IS_{IP}$ ) wurden mittels Elementaranalyse-Massenspektrometrie auf 1,07474 atom% bzw. 1,07802 atom% bestimmt. Die Variablen  $n_{AS}$ ,  $n_{TFAA}$  und  $n_{IP}$  gaben die Anzahl der Kohlenstoffatome der Aminosäure, der TFAA bzw. des *iso*-Propanols an, die das derivatisierte Molekül bildeten.

### 2.3.6 Analyse der DNA

#### a) Extraktion und Quantifizierung der DNA

Die Extraktion der DNA aus dem Boden erfolgte mit dem *FastDNA spin kit for soil* (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) entsprechend der Anleitung. Die Zellen der Bodenproben (0,5 g in *Lysing Matrix Tube*) wurden durch zweimaliges, kräftiges Schütteln im *Beatbeater* (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland; 30 s, Intensität 5,5) lysiert. Die DNA wurde anschließend laut Herstellerangaben extrahiert und gereinigt, mit der Ausnahme, dass die DNA während einer einstündigen Inkubation mit der *Bindingmatrix* extrahiert wurde. Die Extrakte wurden dann nach Berthelet et al. (1996) via Chromatographie über Poly(vinylpolypyrrolidon) nochmals gereinigt.

Die Persistenz der *lux*-Gene wurde mittels PCR unter Verwendung zweier Primerpaare (*luxA1/A2* und *luxA6/A7*), die sich in ihrer Empfindlichkeit unterschieden, überprüft (Jacobsen, 1995; Kästner, 1996; Tab. 2). Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der beiden Primerpaare erlaubte eine Unterteilung der *lux*-DNA-Mengen in drei Konzentrationsbereiche. Die PCRs wurden

## Material und Methoden

unter Verwendung des *HotStarTaq*<sup>TM</sup> PCR Polymerase Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Ansätze enthielten 2 µl des entsprechenden DNA-Extraktes aus den Bodenproben, 5 µl des PCR-Puffers, 3 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration), 25 µmol l<sup>-1</sup> De-oxynucleosidtriphosphate, 10 pmol von Primer *luxA6* und *luxA7* oder 100 pmol von Primer *luxA1* und *luxA2* und 2,5 Units *HotStarTaq* DNA-Polymerase. Die Reaktionsansätze wurden auf ein Volumen von 50 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden unter Verwendung eines *Thermocycler* (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und den in Tabelle 8 aufgeführten Temperaturprogrammen amplifiziert. Eine Positivkontrolle, für die ein Plasmidextrakt aus in LB-Medium (mit Kanamycin) kultivierten *E. coli* RFM443-Zellen verwendet wurde, und eine Negativkontrolle (DEPC-behandeltes Wasser) wurden in jeder PCR mitgeführt.

Die PCR-Produkte wurden durch Auftragen von 10 µl auf ein 1,6 %iges Agarosegel in TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) und anschließender Elektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (4 µg ml<sup>-1</sup>) gefärbt und zur Auswertung unter UV-Beleuchtung fotografiert. Eine 100 bp-DNA-Leiter diente als Größenmarker.

Tabelle 8: Sequenzen der Primer und Temperaturprogramme für die PCR-basierte DNA-Bestimmung von *E. coli* RFM443 (*lux*-Gen von *V. fischeri*; Kindler et al., 2006)

Primer	Sequenz	Literatur
<i>luxA6</i>	5' ACA-GCA-CAC-CCA-GTT-CGA-CAG	Jacobsen, 1995
<i>luxA7</i>	5' CTC-CCG-ACA-AAC-ATC-TTG-CGC	Jacobsen, 1995
<i>luxA1</i>	5' TTA-TTA-GAT-CAA-ATG-TCG-AAA-GGG-CG	Kästner, 1996
<i>luxA2</i>	5' TCA-GTT-CCA-TTA-GCT-TCA-AAT-CC	Kästner, 1996

Primerpaar	Amplifikat Länge (bp)	Temperatur-Programm der PCR
<i>luxA6/luxA7</i>	495	95 °C für 15 min, 35 Zyklen: 94 °C für 30 s, 55 °C für 45 s und 72 °C für 90 s finale Extension: 72 °C für 15 min
<i>luxA1/luxA2</i>	722	95 °C für 15 min, 35 Zyklen: 94 °C für 60 s, 53 °C für 60 s und 72 °C für 60 s finale Extension: 72 °C für 5 min

*b) Bestimmung der Nachweisgrenze der lux-DNA im Boden*

Durch Zugabe einer Verdünnungsreihe von *E. coli* RFM443-Zellen zu Boden-aliquoten wurde eine Verdünnungsreihe von *E. coli*-Zellen in Boden zwischen 1 Zelle g<sup>-1</sup> und 10<sup>8</sup> Zellen g<sup>-1</sup> hergestellt. Von dieser Reihe wurde nach der zuvor beschriebenen Methode die DNA extrahiert und mit den beiden Primerpaaren eine PCR durchgeführt.

*2.3.7 Analyse der Abbaukinetiken und Statistik*

Die durch die *E. coli*-Biomasse dem Boden zugesetzten Mengen der Biomoleküle wurden als Differenz der jeweiligen Substanzmengen des <sup>13</sup>C-Ansatzes und des Leerwertbodens berechnet. Dies ist notwendig um die Menge von Biomolekülen, die natürlicher Weise im Boden vorliegen, von den durch *E. coli* eingeführten Biomolekülen rechnerisch zu unterscheiden.

Um die Abnahme bzw. die Festlegung des *E. coli*-<sup>13</sup>C in den Fettsäuren und Aminosäuren zu veranschaulichen und besser vergleichen zu können, wurden die <sup>13</sup>C-Gehalte der Fettsäuren und Aminosäuren in theoretisch vollständig markierte Äquivalente der Substanzen umgerechnet. Dies erfolgte durch Multiplikation der Konzentrationen mit den entsprechenden <sup>13</sup>C-Gehalten (atom%/100).

Ein Zwei-Pool-Modell für exponentiellen Abbau Qualls und Haines (1992) wurde für die kinetische Auswertung der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Emission sowie der Konzentrationsänderungen der Fettsäuren und Aminosäuren herangezogen. Die Gleichung lautet

$$A_t = (100 - b) * e^{-k_1 * t} + (b * e^{-k_2 * t}), \quad (2)$$

Dabei stellt A<sub>t</sub> den Prozentsatz des ursprünglich zugegebenen *E. coli*-Kohlenstoff dar, der zum Zeitpunkt t noch im Boden verbleibt; k<sub>1</sub> und k<sub>2</sub> sind die Abbauraten des schnell und langsam abbaubaren Pools und b ist der Prozentsatz des langsam abbaubaren Pools zu Beginn des Versuches. Dementsprechend ist 100 – b der Prozentsatz des schnell abbaubaren Pools zu Beginn des Versuches.

$$CO_{2,t} = 100 - A_t \quad (3)$$

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der von *E. coli* stammenden  $^{13}CO_2$ -Emission wurde Gleichung 2 durch Gleichung 3 so modifiziert, dass sie für die kinetische Auswertung der Emission genutzt werden konnte. Die Variable  $CO_{2,t}$  stellt den Prozentsatz an *E. coli*-bürtigem Kohlenstoff dar, der zum Zeitpunkt t bereits zu  $CO_2$  mineralisiert wurde.

Alle Untersuchungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt, sofern nicht anders beschrieben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### 2.3.8 Identifizierung *E. coli*-verwertender bakterieller Prädatoren und Pilze

#### a) RNA-Extraktion und Dichtegradientenzentrifugation

Die folgenden Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. T. Lüders (GSF Neuherberg, Deutschland) und Dr. M.W. Friedrich (MPI Marburg, Deutschland) durchgeführt, wobei die Proben in der Arbeitsgruppe von Dr. Lüders analysiert wurden.

Die RNA wurde aus den Bodenproben des Inkubationsbeginns sowie aus den Probenahmen nach einer, zwei und acht Wochen nach Lueders (2004a) extrahiert. Dafür wurden in einem verschraubbaren 2 ml-*Beadbeating*-Röhrchen 0,7 g Zirconia/Silica-Perlen (0,1 mm; [www.biospec.com](http://www.biospec.com)), 750  $\mu$ l 120 mmol l<sup>-1</sup> Natriumphosphatpuffer (pH 8; Tab. 9) und 250  $\mu$ l TNS-Lösung (Tab. 9) mit 0,5 g Boden bzw. 500  $\mu$ l Kulturlösung mit einem *Beadbeater* (45 s; Intensität: 6,5 m s<sup>-1</sup>) inkubiert. Die Proben wurden bei 13000 U min<sup>-1</sup> und 4 °C für 4 min zentrifugiert. In ein 2 ml Röhrchen (eisgekühlt) wurden 900  $\mu$ l des Überstandes mit 900  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8) 4 min zentrifugiert. 800  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein 2 ml-„*Phase Lock Gel Heavy*“-Röhrchen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Deutschland) überführt und mit 800  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 4 min zentrifugiert. 650  $\mu$ l dieses Überstandes wurden mit 1300  $\mu$ l PEG-Lösung (Tab. 9) gemixt und durch 30-minütige Zentrifugation (20000  $\cdot$ g; 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500  $\mu$ l kaltem (4 °C) Ethanol (70 %) vorsichtig gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurde es in Abhängigkeit von der Ausbeute in 30 bis 100 µl EB-Puffer (Tab. 9) aufgenommen.

Die RNA wurde durch den Verdau der mitextrahierten DNA mittels RNase-freier DNase I entsprechend der Anleitung gewonnen. Dafür wurden 50 – 200 µl Extrakt mit 40 µl 10fach DNase-Puffer, 1 – 2 µl DNase I (10 Units µl<sup>-1</sup>) und RNase-freiem Wasser (auf 400 µl auffüllen) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Extraktionsschritte mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol sowie die PEG-Prezipitation und das Waschen mit Ethanol wiederholt, bevor die extrahierte RNA wieder gelöst wurde.

Tabelle 9: Lösungen für die RNA-Extraktion

Lösung	Herstellung
120 mmol l <sup>-1</sup> Natriumphosphat- puffer, pH 8	112,87 mmol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7,12 mmol l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , sterilfiltriert und autoklaviert
TNS-Lösung	500 mmol l <sup>-1</sup> Tris-HCl, 100 mmol l <sup>-1</sup> NaCl, 10 % SDS (m/V), pH 8.0, pH-Einstellung mit HCl, sterilfiltriert und autoklaviert
PEG-Lösung	30 % (m/V) Polyethyleneglycol 6000 in 1,6 mol l <sup>-1</sup> NaCl, Benutzung ausgeglüheter Glassgeräte und RNase-freiem Wasser, autoklaviert
EB-Puffer	10 mmol l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.5, Benutzung von RNase-freiem Wasser, sterilfiltriert und autoklaviert
10fach DNase- Puffer	400 mmol l <sup>-1</sup> Tris HCl, 100 mmol l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 10 mmol l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> . pH 8, Benutzung ausgeglüheter Glassgeräte mit RNase-freiem Wasser und RNA-grade Chemikalien, sterilfiltriert und autoklaviert

In den Extrakten wurde die RNA-Konzentration mittels RiboGreen entsprechend der Anleitung an einem Safire Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan Deutschland, Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Extraktaliquote, die 500 ng rRNA enthielten, wurden durch eine Gleichgewichtsdichtegradientenzentrifugation mit Cäsiumtrifluoracetat ihrer Dichte entsprechend aufgetrennt (Manefield et al., 2002). Der Gradient bestand aus 1,86 ml Cäsiumtrifluoracetat (1,99 g ml<sup>-1</sup>), 375 µl Wasser

und 75  $\mu\text{l}$  deionisiertes Formamid. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation in einer Optima TLX Ultrazentrifuge mit TLA120.2-Rotor (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bei  $64000 \text{ U min}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  über 36 Stunden. Die Gradienten wurden fraktioniert, indem sie von unten mit Wasser mittels einer Spritzenpumpe ( $3,3 \mu\text{l s}^{-1}$ ) entfernt wurden. Für die anschließende quantitative Analyse und die Untersuchung der mikrobiellen Population wurde die Schwimmdichte der gesammelten Gradientenfraktionen refraktometrisch bestimmt (Lueders et al., 2004a). Für einen Vergleich der RNA-Verteilung wurden Kontrollgradienten mit der rRNA des Leerwert- und des Kontrollbodens genutzt. Der Bereich der zu erwartenden Schwimmdichten des Zentrifugationssystems wurde mit der RNA von unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen kalibriert. Die RNA wurde aus den Gradientenfraktionen durch Präzipitation mit *iso*-Propanol gewonnen.

### b) Quantitative rRNA-Analyse

Die präzipitierten und wieder gelösten Bakterien- und Archae-16S-rRNA sowie die Pilz-18S-rRNA-Templates der Dichtegradientenfraktionierung wurden via *real time*-reverse Transkriptions (RT)-PCR (Lueders et al., 2004a; Lueders et al., 2004b) mit dem MX3000P Cyler (Stratagene, La Jolla, USA) quantifiziert. Die Bestimmung basierte auf dem Promega *AccessQuick RT-PCR-System* (Promega, Mannheim, Deutschland). Die in Tabelle 10 angegebenen Primerpaare und Temperaturprogramme wurden für die Analysen verwendet. Ein Reaktionsansatz (40  $\mu\text{l}$ ) enthielt jeweils 20  $\mu\text{l}$  *AccessQuick-Mastermix*, 0,6  $\mu\text{l}$  RoxDye (1/500), 0,2x SybrGreen, 0,2  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  BSA, 0,3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  jedes Primers (MWG, Ebersberg, Deutschland), 1  $\mu\text{l}$  AMV-ribose Transkriptase (im *AccessQuick-Kit* enthalten; Promega, Mannheim, Deutschland) und 2  $\mu\text{l}$  Standard- bzw. Template-RNA. Nach jedem Durchlauf wurde eine Schmelzkurve zwischen  $55$  und  $95^\circ\text{C}$  aufgezeichnet, um zwischen spezifischen Amplifikaten und unspezifischen SybrGreen-Signalen (z.B. Primerdimere) zu unterscheiden. Die Konzentrationsbestimmung der rRNA (in  $\text{ng ml}^{-1}$ ) erfolgte in Relation zu einer Verdünnungsreihe reiner rRNA aus Reinkulturen von *E. coli* (Bakterium), *Methanosarcina barberi* (Archaeobakterium), und *Fusarium oxysporum* (Pilz) und war linear für rRNA-Konzentrationen zwischen  $10^1$  und  $10^{-5} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  für *M. barberi* und *E. coli* und zwischen  $10^1$  und  $10^{-3} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  für *F. oxysporum*.

## Material und Methoden

Tabelle 10: Sequenzen der Primer und Temperaturprogramm für die *real time*-RT-PCR (K = G oder T; M = A oder C; N = G, A, T, oder C; R = A oder G; W = A oder T)

Primer	Sequenz	Literatur
<i>Ar109t</i>	5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT	Lueders & Friedrich (2002)
<i>Ar912rt</i>	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	Lueders & Friedrich (2002)
<i>Ba519t</i>	5'- CAG CMG CCG CGG TAA NWC	Stubner (2002)
<i>Ba907r</i>	5'- CCG TCA ATT CMT TTR AGT T	Stubner (2002)
<i>Fung5f</i>	5'-GTA AAA GTC CTG GTT CCC C	Smit (1999)
<i>FF390r</i>	5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT	Vainio & Hantula (2000)

Organismen	Temperatur-Programme der PCR
Bakterien	45°C für 30 min (RT), 95°C für 5 min, 38 Zyklen: 95°C für 30 s, 52°C für 30 s und 68°C für 30 s, 68°C für 5 min, 95°C für 1 min, Schmelzkurve: 55°C für 30 s, 95°C für 30 s
Pilze	45°C für 30 min (RT), 95°C für 5 min, 38 Zyklen: 95°C für 30 s, 48°C für 30 s und 68°C für 30 s, 68°C für 5 min, 95°C für 1 min, Schmelzkurve: 55°C für 30 s, 95°C für 30 s

### c) Qualitative Populationsanalyse

Die qualitative Populationsanalyse des Leerwertbodens und des <sup>13</sup>C-Ansatzes via Terminalem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP)-Analyse in den gelösten Gradientenfraktionen wurde in Lueders (2004b; 2004c) beschrieben. Aus der rRNA der Gradientenfraktionen wurden via RT-PCR mit den Primern *Ba27f* und *Ba907r* für Bakterien (Tab. 11) sowie den Primern *Fung5f* und *FF390r* für Pilze

## Material und Methoden

---

(Tab. 10) und dem Temperaturprogramm aus Tabelle 10 Amplifikate der bakteriellen bzw. pilzlichen Biomasse generiert, wobei die *forward*-Primer FAM-markiert waren. Die Amplifikate wurden mit *Msp I* verdaut und auf einem ABI Prism 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems; Foster City; USA) im GeneScan-Modus (Lueders and Friedrich, 2002) analysiert.

Die Analyse des Kontrollbodens wurde wie folgt durchgeführt: die verdauten Amplifikate (ca. 50 ng in 10 µl) wurden mittels *DyeEX Spin Columns* (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsalzt. Diese Restriktionsverdauung (1 µl) wurden mit 13 µl Hi-Di Formamid, welches eine 400fache Verdünnung der ROX-markierten *MapMarker* 1000 bp-Leiter enthielt, gemischt. Anschließend wurden die Lösungen denaturiert (3 min bei 95°C), eisgekühlt und mittels 3730 DNA Sequenzer (Applied Biosystems) nach Fragmentgrößen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit POP-7-Polymer in einer 50 cm-Kapillare unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 s Injektionszeit, 7 kV Laufspannung, 66°C Lauftemperatur und 63 min Analysezeit. Die Elektropherogramme wurden mit der *GeneMapper* 3.5 Software (Applied Biosystems) analysiert.

Tabelle 11: Sequenzen der Primer und Temperaturprogramm für die T-RFLP-Analyse

Primer	Sequenz	Literatur
<i>Ba27f</i>	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Edwards, 1989
<i>Ba907r</i>	5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Muyzer, 1995

Organismen	Temperatur-Programm der PCR
Bakterien und Pilze	94°C für 3 min, 30 Zyklen: 94°C für 30 s, 52°C für 30 s und 74°C für 60 s, 74°C für 5 min, 4°C halten

Das anschließende Klonen und Sequenzieren der bakteriellen und pilzlichen Populationen in den gelösten Gradientenfraktionen wurde in Lueders (2004b) beschrieben. rRNA-Amplifikate (*Ba27f/Ba907r* für Bakterien, Tab. 11; *Fung5f/FF390r* für Pilze, Tab. 10) wurden hergestellt. Diese PCR-Produkte wurden mit dem pGEM-T-Vektor-System II (Promega) in *E. coli*-Zellen geklont. Einige Klone wurden zufällig

ausgewählt und von der Arbeitsgruppe ADIS (*Automatic DNA Isolation and Sequencing*, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Deutschland) auf einem ABI Prism 3700 Sequenzer (Applied Biosystems) vollständig sequenziert. Die Sequenzen betragen für die Bakterien ca. 900 bp und für die Pilze ca. 600 bp. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit der ARB-Software (Ludwig et al., 2004; <http://www.arbhome.de>) und maximalen Wahrscheinlichkeitsalgorithmen (Lueders et al., 2001) erstellt. Die Sequenzen wurden in der *GenBank* unter den Zugangsnummern DQ643629 – DQ643792 hinterlegt (Lueders et al., 2006).

### 3 Ergebnisse

Um den Beitrag der mikrobiellen Biomasse bzw. ihrer biologischen Bausteine an der Bildung der OBS zu erfassen, wurden  $^{13}\text{C}$ - und *lux*-Gen-markierte *E. coli*-Zellen in einem landwirtschaftlich genutzten, mit Stallmist gedüngtem Boden inkubiert. Dabei wurde der Stamm *E. coli* RFM 443 aus den bereits genannten Gründen (siehe 2.1.3) verwendet. Während der Inkubation wurden

- das Überleben bzw. Absterben der *E. coli* Zellen,
- die Mineralisierung des durch *E. coli* zugeführten Kohlenstoffs anhand des emittierten  $^{13}\text{CO}_2$  sowie
- der im Boden verbleibende Kohlenstoff quantifiziert.

Der direkte Beweis dafür, dass mikrobielle Biomassekomponenten in der organischen Substanz im Boden stabilisiert vorliegen, sollte durch den Nachweis von

- Fettsäuren,
- Aminosäuren und
- *E. coli*-bürtiger DNA

erbracht werden, welche frei im Boden vorliegen und nicht in Mikroorganismen gebunden sind.

Zudem wurden die indigenen Mikroorganismen, die die *E. coli*-Komponenten als Substrat nutzen, via RNA-SIP identifiziert. Diese Organismen bilden die Grundlage für die Mineralisierung und den Einbau mikrobieller Bausteine in die tote OBS.

Zur Verifizierung der Beobachtungen wurde der Boden nicht nur mit  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen ( $^{13}\text{C}$ -Ansatz) inkubiert, sondern auch mit isotopisch unangereicherten *E. coli*-Zellen (Kontrolle) und ohne die Zugabe zusätzlicher Bakterienzellen (Leerwert).

#### 3.1 Überleben von *E. coli*

##### 3.1.1 Empfindlichkeit der Methode

Für die quantitative Detektion der lebenden *E. coli*-Zellen im Boden, die gegenüber Kanamycin resistent sind und deren Biolumineszenz induzierbar ist, wurde eine MPN-Methode mit der Lumineszenzinduktion kombiniert. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Verdünnungsreihe von *E. coli*-Zellen in Boden

hergestellt. Drei Bakterienextrakte jedes Bodens wurden mehrfach dekadisch verdünnt und jede Verdünnungsstufe in LB-Medium mit Kanamycin kultiviert. In den selektiven Anreicherungskulturen wurde dann die Biolumineszenz induziert. Anhand der Anzahl der lumineszenten Kulturen pro Verdünnungsstufe wurde die extrahierbare Zellzahl pro Gramm Boden bestimmt. Aus dem Vergleich der Böden ließ sich so ein Detektionslimit von 25 Zellen pro Gramm nicht-sterilem Boden feststellen. Diese Zellen waren in Anwesenheit von  $> 10^6$  natürlich vorliegenden KBE  $\text{g}^{-1}$  Boden nachweisbar.

### 3.1.2 Nachweis lebender *E. coli*-Zellen

Zu Beginn des Experimentes wurden dem Boden  $1,3 \times 10^8$  *E. coli*-Zellen  $\text{g}^{-1}$  zugegeben. Die Zellzahl lumineszenter *E. coli*-Zellen sank in weniger als 105 d unter das Detektionslimit der modifizierten MPN-Methode von 25 Zellen  $\text{g}^{-1}$  Boden, wobei  $> 99$  % der anfänglich erfaßten Zellen bereits nach 28 d nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 2; Kindler et al., 2006). Dabei waren im Boden selbst keine lumineszenten Zellen vorhanden, wie Voruntersuchungen und der Leerwert zeigten. Die Abnahme der nachweisbaren Lebendzellen war in den mit *E. coli*-Zellen beimpften Böden (Kontrollboden und  $^{13}\text{C}$ -Ansatz) nicht signifikant unterschiedlich. Zwei mögliche Erklärungen für die Abnahme der Zellzahl konnten dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden:

- Das Eintreten von *E. coli* in ein dormantes Stadium oder dass die Zellen noch leben, aber nicht kultivierbar sind; so waren auch nach einer Inkubationsverlängerung für die Anreicherungskultur von über eine Woche keine lumineszierenden Zellen nachweisbar.
- Der Verlust des *high-copy* Plasmids mit dem *lux*-Gen und folglich der Verlust der Fähigkeit der *E. coli*-Zellen zur Biolumineszenz während der Inkubation; ein Plasmidverlust konnte sogar während einer siebentägigen Kultivierung in LB- oder Mineralmedium ohne Kanamycin nicht beobachtet werden.

Somit ist die Abnahme der *E. coli*-Zellzahl auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen. Dadurch stellten die *E. coli*-Zellen ein mögliches Modell für Gram-negative mikrobielle Biomasse als Substrat für andere Mikroorganismen im Boden und für den Einbau mikrobieller Komponenten in die tote organische Substanz im Boden dar.

## Ergebnisse

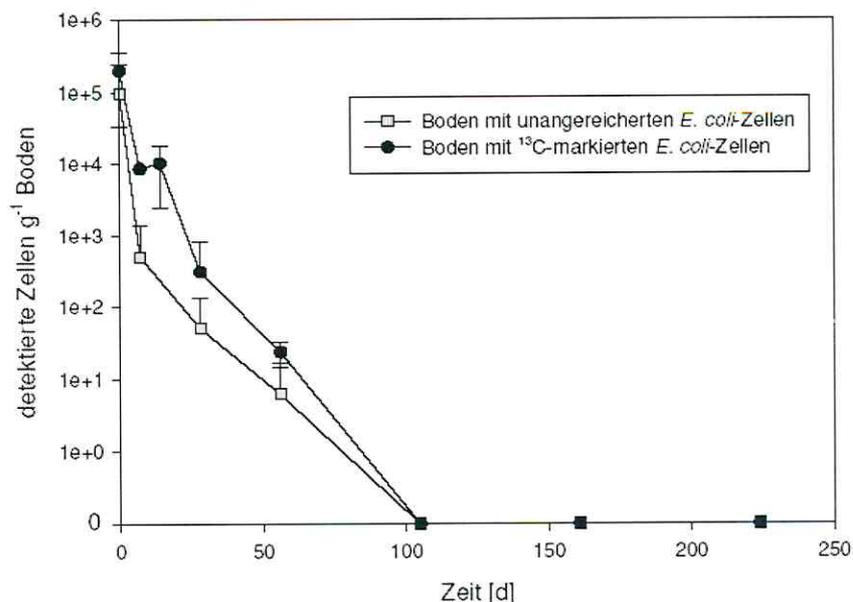


Abbildung 2: Die Wiederfindung der isotopisch unangereicherten und <sup>13</sup>C-markierten *E. coli*-Zellen im Boden (Kindler et al., 2006).

Die laut Berechnung zugegebene Zellzahl ( $1,3 \times 10^8$  Zellen g<sup>-1</sup> Boden) unterschied sich von der nachgewiesenen Zellzahl zu Experimentbeginn ( $1 \times 10^5$  Zellen g<sup>-1</sup> Boden im Kontrollansatz bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen g<sup>-1</sup> Boden im <sup>13</sup>C-Ansatz). Diese Differenz konnte mit einer eingeschränkten Wiederfindung der Zellen nach Zugabe zum Boden und mit einem Verlust der mikrobiellen Aktivität und der Wachstumsfähigkeit, z.B. aufgrund der Zerstörung von Zellen durch die Scherkräfte beim Mixen, erklärt werden. Obwohl 99,9 % der zugeführten Zellen nicht als lebende Zellen nachgewiesen werden konnten, entsprach die zugeführte <sup>13</sup>C-Menge zum Inkubationsbeginn 94 % des theoretischen *E. coli*-Kohlenstoffs (vergleiche 3.2). Zudem ließ sich aus der Menge <sup>13</sup>C-markierter Fettsäuren zu Inkubationsbeginn die Zellzahl bestimmen, die mit ca.  $1 \times 10^8$  Zellen g<sup>-1</sup> Boden der theoretischen Zellzahl entsprach (vergleiche 3.4.1).

### 3.2 Metabolisierung und Mineralisierung des bakteriellen Kohlenstoffs

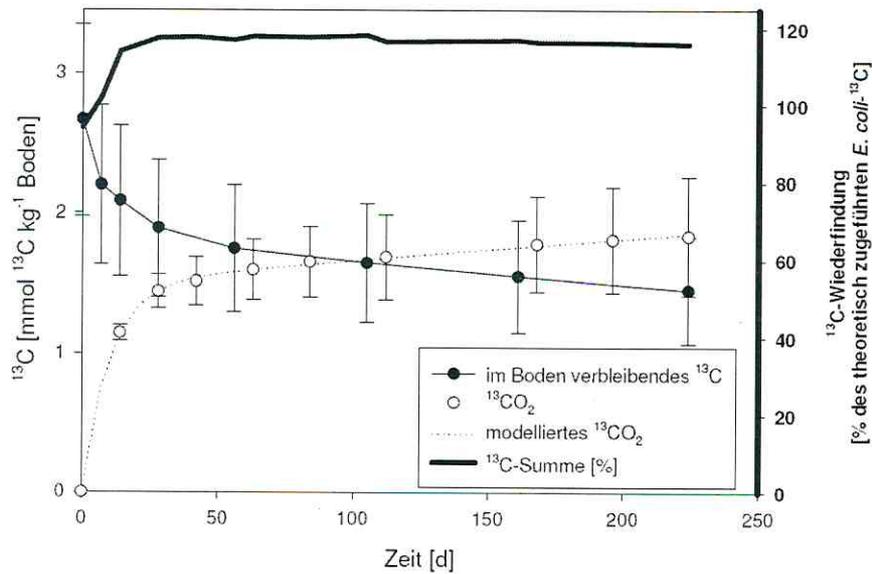


Abbildung 3: Summarische  $^{13}\text{C}$ -Wiederfindung und die  $^{13}\text{C}$ -Menge, die im Boden verbleibt bzw. zu  $^{13}\text{CO}_2$  mineralisiert wurde während der Inkubation  $^{13}\text{C}$ -markierter *E. coli*-Zellen im Boden. Die gepunktete Linie repräsentiert die modellierte  $^{13}\text{CO}_2$ -Emission nach dem Zwei-Pool-Modell für exponentielle Ab- bzw. Zunahme ( $R^2 = 0,9995$ ; Kindler et al., 2006).

Der Verbleib des bakteriellen Kohlenstoffs der sterbenden,  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen (98 atom%  $^{13}\text{C}$ ; Kindler et al., 2006) ist als Mineralisierung in Form der  $^{13}\text{CO}_2$ -Emission und des im Boden verbleibenden  $^{13}\text{C}$  in Abb. 3 dargestellt. Während der Inkubation zeigte die  $^{13}\text{CO}_2$ -Emission wie auch die Abnahme des im Boden verbleibenden  $^{13}\text{C}$  eine zweiphasige Kinetik (Kindler et al., 2006). Die Summe des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$ -Markers, d.h. die Summe aus der kumulativen  $^{13}\text{CO}_2$ -Konzentration und dem im Boden verbliebenen  $^{13}\text{C}$ , abzüglich der Leerwerte, betrug während der Inkubation konstant  $3,31 \text{ mmol kg}^{-1}$  Boden und somit 117 % der theoretisch durch *E. coli* zugegebenen Kohlenstoffmenge. Dies ließe sich durch einen Kohlenstoffgehalt von *E. coli* erklären, der höher wäre als die theoretischen 50 % der Trockenmasse (Schlegel, 1992) oder durch eine Unterschätzung der zugegebenen Zellzahl. Letzteres wäre aufgrund der hohen Konzentration der Zellsuspension zur Beimpfung des Bodens und des daraus resultierenden schnellen Absetzens der Zellen und der hohen Viskosität der Suspension möglich. Dies führte

## Ergebnisse

---

dann zu Unterschieden in der Zelldichte der Volumina zur Bestimmung von Zellzahl und Zellmasse sowie denen zur Beimpfung des Bodens.

Die geringere Menge zu Beginn des Experimentes kann durch CO<sub>2</sub>-Emission und den daraus resultierenden Kohlenstoffverlusten während der Probenahme und der Lagerung der Proben bis zur Analyse erklärt werden. Aufgrund der Differenz im Bodenkohlenstoff wurde die Umsetzung des *E. coli*-Kohlenstoffs anhand der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Entwicklung kinetisch charakterisiert.

Während der Inkubation nahm die Mineralisierung kontinuierlich ab (Abb. 3). Der <sup>13</sup>C aus *E. coli* zeigte dabei im Verhältnis zum übrigen Kohlenstoff aus dem Boden einen stärkeren Rückgang, da der Anteil von <sup>13</sup>C im CO<sub>2</sub> von 8 atom% nach 14 d auf ca. 2 atom% nach 224 d sank (Abb. 4). Die größte Abnahme des *E. coli*-Kohlenstoffs durch Mineralisierung findet im ersten Monat der Inkubation statt. Danach wird der *E. coli*-Kohlenstoff langsamer und relativ gleichmäßig als CO<sub>2</sub> emittiert.

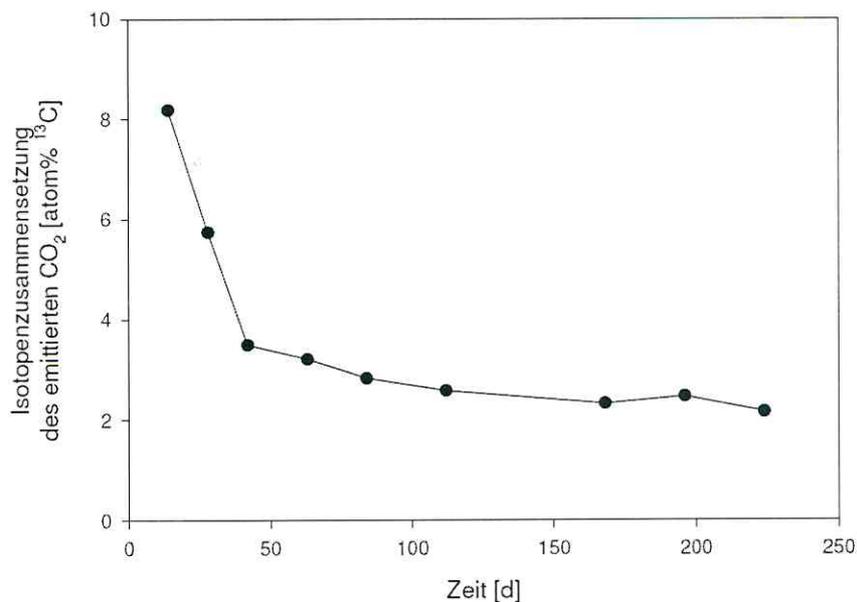


Abbildung 4: Isotopenzusammensetzung (<sup>13</sup>C-Anteil) des emittierten CO<sub>2</sub> des Bodens mit <sup>13</sup>C-markierten *E. coli*-Zellen. Zu Versuchsbeginn wurde kein CO<sub>2</sub> emittiert (Kindler et al., 2006).

Das Zwei-Pool-Modell (Gleichungen 2 und 3) konnte der biphasigen Mineralisierung der Biomasse in Form der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Daten exakt angepaßt werden ( $R^2 = 0,9995$ ). Demnach ließ sich die mikrobielle Substanz in zwei Pools mit unterschiedlicher

Stabilität unterteilen: einen labilen und einen stabilen Pool. Dabei war der dem Boden zugesetzte *E. coli*-Kohlenstoff zu 52 % (100-b) dem labilen Pool und zu 48 % (b) dem stabilen Pool zuzuordnen. Die Mineralisierung der labilen, leicht abbaubaren *E. coli*-Komponenten, z.B. Zucker und Fettsäuren, durch die indigene Biomasse des Bodens dominierte während der ersten Wochen. Der labile Kohlenstoff im Boden wies dabei eine Halbwertszeit von sieben Tagen ( $k_1 = 0.10 \text{ d}^{-1}$ ) auf.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, verlangsamte sich die Mineralisierung des  $^{13}\text{C}$  nach ca. 42 d zunehmend. Der Abbau von stabileren *E. coli*-Komponenten und von Metaboliten der indigenen Biomasse, die aus dem *E. coli*-Kohlenstoff synthetisiert wurden, begann zu dominieren. Der Kohlenstoff der stabilen Substanzen wies dabei eine Halbwertszeit von 1,3 Jahren ( $k_2 = 0,5 \text{ a}^{-1}$ ) auf. Diese Mineralisierung führte zu einem durchschnittlichen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt des emittierten  $\text{CO}_2$  von 2 atom%, was einer Verdopplung der natürlichen Häufigkeit entsprach.

Nach acht Monaten (224 d) Inkubation lagen 64 % des durch *E. coli*-Zellen theoretisch zugeführten  $^{13}\text{C}$  (117 % Wiederfindung) mineralisiert als  $\text{CO}_2$  vor und 51 % waren mit der OBS assoziiert oder in die Mikroflora des Bodens integriert (siehe 3.3 und 4.3; Lueders et al., 2006). Diese Daten entsprachen 56 bzw. 44 % des detektierten  $^{13}\text{C}$ , was aufgrund der guten Übereinstimmung der modellierten Werte mit den gemessenen Werten die Anwendbarkeit des Zwei-Pool-Modells bestätigte. Folglich schienen der labile und der "stabile" Pool des *E. coli*-Kohlenstoffs annähernd die gleiche Größe zu besitzen, wobei beide Pools eine Mischung aus Substanzen darstellten. Der stabile Teil war dabei das Ergebnis der Inkorporation von *E. coli*-bürtigen Substanzen in die indigene Biomasse des Bodens und der Festlegung von stabileren *E. coli*-Restsubstanzen als Teil der OBS.

### 3.3 Identifizierung bakterieller Prädatoren und *E. coli*-verwertender Pilze

Die RNA-SIP-Analysen und die Identifizierung der Bakterien und Pilze (Lueders et al., 2006) wurde in Kooperation mit Dr. T. Lüders (GSF Neuherberg, Deutschland) und Dr. M.W. Friedrich (MPI Marburg, Deutschland) durchgeführt.

#### 3.3.1 Identifizierung *E. coli*-verwertender Bakterien (Prädatoren)

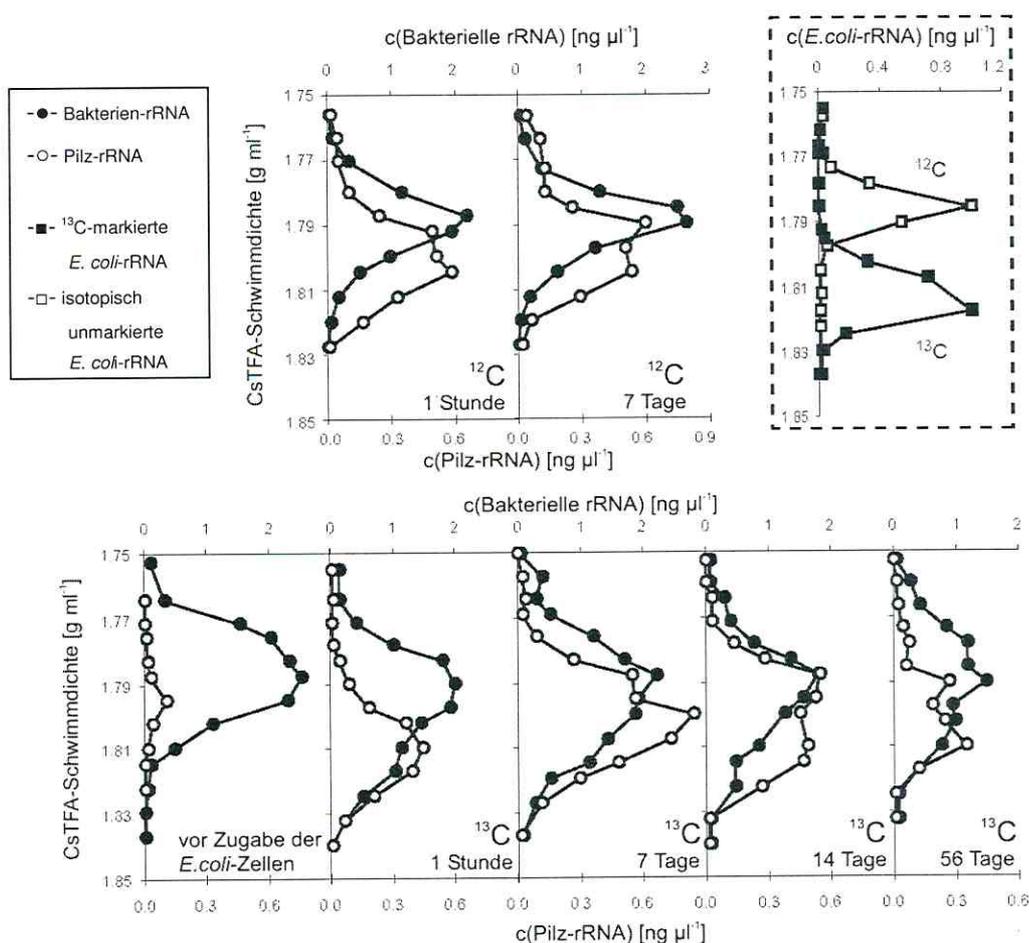


Abbildung 5: Quantitative Profile der RNA-SIP-Dichtegradien. Verteilung der Bakterien- und Pilz-rRNA der schweren Ribosomen-Untereinheit in den rRNA-Dichtegradienfraktionen. Sie wurde aus den Böden mit isotopisch unmarkierter ( $^{12}\text{C}$ , obere Reihe) und  $^{13}\text{C}$ -markierter *E. coli*-Biomasse (untere Reihe) zu verschiedenen Zeiten nach dem Einbringen der *E. coli*-Zellen extrahiert. Die domänen-spezifische Templateverteilung in den Gradienten wurde mittels *real time*-RT-PCR quantifiziert. Umrandetes Profil rechts oben: Dichtegradienverteilung der *E. coli*-rRNA aus Reinkultur. Die quantitative Verteilung der *E. coli*-rRNA der schweren Untereinheit aus vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten und aus isotopisch unmarkierten Reinkulturen im CsTFA-Dichtegradien (Lueders et al., 2006).

Um die indigenen Mikroorganismen im Boden zu identifizieren, die allen voran den *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  einbauen, wurde die  $^{13}\text{C}$ -angereicherte („schwere“) rRNA von der übrigen rRNA durch Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Bei Inkubationsbeginn, d.h. ca. 1 h nach dem Einbringen der *E. coli*-Zellen in den Boden, lag stark  $^{13}\text{C}$ -angereicherte, bakterielle rRNA (Abb. 5) vor. Ihre Schwimmdichte entsprach der von vollständig markierter *E. coli*-rRNA (Abb. 5). In den Extrakten des Leerwert- und des Kontrollbodens war solch „schwere“ rRNA für Bakterien nicht nachweisbar. Eine Stunde nach Inkubationsbeginn stammte die „schwere“ rRNA direkt aus intakten oder lysierten *E. coli*-Zellen, die zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht abgebaut war.

Die T-RFLP-Analyse der bakteriellen Populationen in den „leichten“ und „schweren“ Gradientenfraktionen belegte diese These. So dominierte nach einer Stunde das für *E. coli*-rRNA charakteristische, 497 bp-große, terminale Restriktionsfragment (T-RF) die „schweren“ Fraktionen (Abb. 6). Der rRNA-Gradient des Kontrollbodens mit unmarkierten *E. coli*-Zellen zeigte zu Inkubationsbeginn ein Tailing der „leichten“ rRNA in den „schweren“ Gradientenbereich. Die entsprechenden Muster der „leichten“ und der „schweren“ Fraktion waren sehr ähnlich. Allerdings konnte das 497 bp-T-RF keiner spezifischen Fraktion zugeordnet werden.

Nach der ersten Inkubationswoche war im Gradienten des  $^{13}\text{C}$ -Ansatzes immer noch eine große Menge „schwerer“, bakterieller rRNA vorhanden (Abb. 5). Allerdings zeigten die T-RFLP-Muster gegenüber denen des Inkubationsbeginns sowie des Leerwert- und Kontrollbodens eine drastische Änderung (Abb. 6). Diverse T-RF traten auf, die speziell in der „schweren“ rRNA vorherrschten. Die Tatsache, dass diese T-RF weder zu Inkubationsbeginn noch nach einer Woche in signifikanten Mengen in der „leichten“ Fraktion nachweisbar waren, führte zu der These, dass einige Organismen der indigenen Biomasse des Bodens mehr oder weniger spezifisch die zugeführte,  $^{13}\text{C}$ -markierte Biomasse verwerteten und so in erheblichem Maße  $^{13}\text{C}$  in ihre eigene rRNA integrierten.

## Ergebnisse

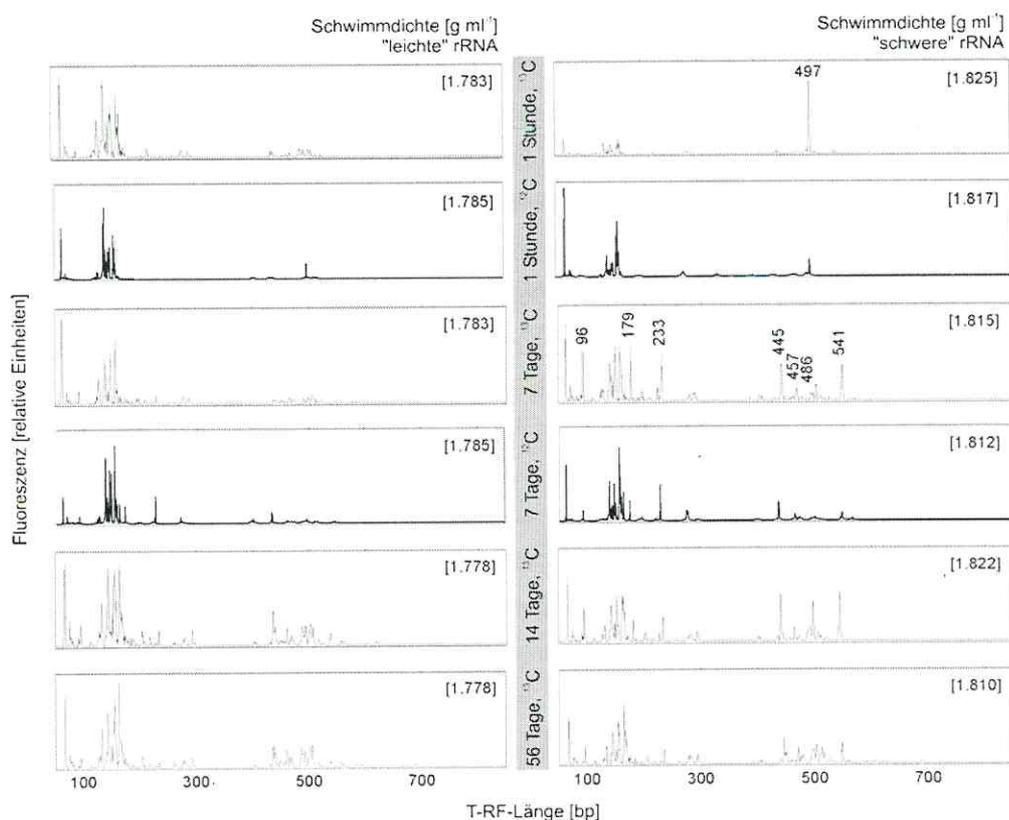


Abbildung 6: T-RFLP-Muster der dichteaufgelösten Bakteriengemeinschaft. Die Profile wurden von repräsentativen „leichten“ und „schweren“ rRNA-Gradientenfraktionen der  $^{13}\text{C}$ -markierten ( $^{13}\text{C}$ ) und unangereicherten ( $^{12}\text{C}$ ) Bodeninkubationen erstellt. Die CsTFA-Schwimmdichten [ $\text{g ml}^{-1}$ ] der Fraktionen sind in eckigen Klammern angegeben. Charakteristische T-RF der „schweren“ rRNA (nach einer Woche) sind durch ihre entsprechenden Fragmentlängen [bp] in der Abbildung spezifiziert. Sie wurden durch Klonen und Sequenzierung identifiziert (Lueders et al., 2006).

Auch der Gradient des Kontrollbodens zeigte nach einer Woche verschiedene, charakteristische T-RF, wie z.B. das 233 bp- und das 445 bp-Fragment. Die T-RFLP-Muster der „leichten“ rRNA und der in die „schwere“ rRNA tailenden rRNA waren auch zu diesem Zeitpunkt sehr ähnlich. Es reicherten sich also keine spezifischen T-RF in der „schweren“ Fraktion an, was einen klaren Unterschied zum  $^{13}\text{C}$ -Ansatz darstellte und die These der Verwertung der *E. coli*-Zellen durch spezifische Mikroorganismen bekräftigt.

Die rRNA spezifischer T-RFLP-Peaks der „schweren“ Gradientenfraction (Schwimmdichte  $1,815 \text{ g ml}^{-1}$ ) nach einer Inkubationswoche wurde geklont, um die mutmaßlichen Verwerter der Biomasse zu identifizieren. Eine Zahl von 99 Klonen wurde nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, sequenziert und phylogenetisch analysiert. Wie bereits aufgrund der T-RFLP-Muster der entsprechenden Gradientenfraction (Abb. 6) zu vermuten war, war die Zusammensetzung der Phylotypen in der Klonbibliothek divers (Tab. 12). 22 Klone mit „schwerer“ rRNA wurden erfolgreich identifiziert (Abb. 7; Tab. 12). Sie bildeten in verschiedenen phylogenetischen Gruppen Cluster, welche Übereinstimmungen zeigten mit:

- Sequenzen unkultivierter  $\gamma$ -Proteobakterien der *Xanthomonadaceae*, die insbesondere eine nahe Verwandtschaft mit *Lysobacter* spp. (179- und 233-bp T-RF) nahelegten,
- diversen Sequenzen der *Myxococcales* (445- und 457-bp T-RF) und
- mit einigen unkultivierten Mitgliedern der Ordnung *Bacteroidetes* (451- und 486-bp T-RF).

Des Weiteren wurde nach der ersten Inkubationswoche ein hoch konzentriertes 96 bp T-RF in der „schweren“ rRNA gefunden. Es konnte nur ein *Bacteroidetes*-Klon identifiziert werden, der zu diesem Fragment geführt haben könnte. Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Klonbibliotheken ( $n = 99$ ), ist es möglich, dass dieser Peak der T-RFLP-Analyse eine bedeutende Gruppe der *Bacteroidetes* mit spezifisch angereicherter, „schwerer“ rRNA darstellt, die sich womöglich durch ihre Aktivität beim Abbau der  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Biomasse auszeichnet. Auffallend ist, dass alle drei phylogenetischen Linien, die durch die T-RFLP-Analyse der selektiv angereicherten, „schweren“ rRNA identifiziert wurden, einzellige, gleitende, bakterielle Mikroprädatoren beinhalten (Reichenbach, 1992a;b;c). Möglicherweise stellt diese Art der Fortbewegung im Boden eine Schlüsseleigenschaft für mikrobielle Prädatoren dar.

## Ergebnisse

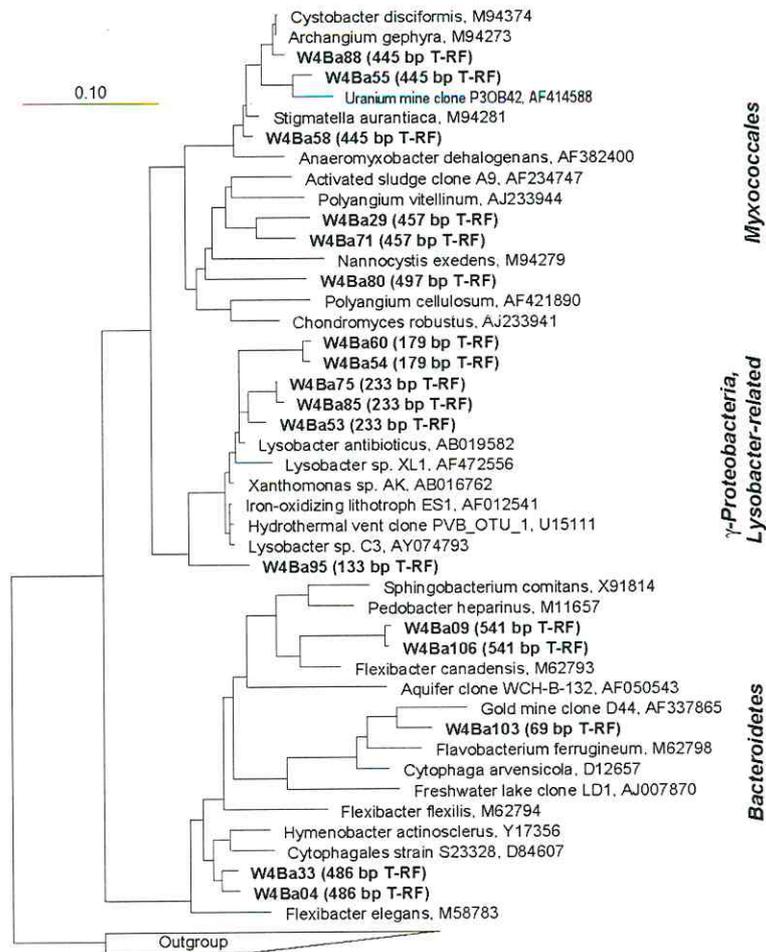


Abbildung 7: Phylogenetischer Stammbaum der für die „schweren“ rRNA-Fractionen charakteristischen bakteriellen 16S-rRNA-Klone. Die identifizierten Klone sind fett gedruckt und die Länge ihrer T-RF ist in Klammern angegeben. Die Klone wurden aus der „schweren“ rRNA ( $1,815 \text{ g ml}^{-1}$ ) nach einer Inkubationswoche erzeugt. In dieser Zeit wurde die  $^{13}\text{C}$ -markierte *E. coli*-Biomasse im Boden nachweisbar abgebaut. Der Maßstabsbalken stellt eine 10 %ige Divergenz zwischen den Sequenzen dar. Die GenBank-Zugangsnummern der Referenzsequenzen sind Kapitel 2.3.8 c) zu entnehmen (Lueders et al., 2006).

Tabelle 12: Zusammensetzung der „schweren“ bakteriellen Klonbibliothek. Phylogenetische Zuordnung, charakteristische T-RF und die Anzahl der bakteriellen 16S-rRNA-Klone, die aus der Klonbibliothek der „schweren“ (Schwimmdichte = 1.815 g ml<sup>-1</sup> in CsTFA) rRNA eine Woche nach Einbringen der <sup>13</sup>C-markierten Biomasse in den Boden generiert werden konnten (Lueders et al., 2006). Bakterienordnungen, die einzellige Gleiter einschließen, wurden fett gedruckt.

Phylogenetische Linie <sup>a</sup>	Anzahl der Klone	Charakteristische T-RF-Längen [bp]
<i>α-Proteobacteria</i>	9	–
<i>β-Proteobacteria</i>	8	–
<i>γ-Proteobacteria</i>	2	–
<b><i>Lysobacter-related</i></b>	<b>10</b>	<b>179, 233</b>
<b><i>δ-Proteobacteria,</i></b> <b><i>Myxobacteria</i></b>	<b>7</b>	<b>445, 457</b>
<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b>6</b>	<b>486, 541</b>
<i>Planctomycetes</i>	5	–
<i>Acidobacteria</i>	10	201, 293
<i>Cyanobacteria</i>	2	–
<i>Firmicutes, Bacilli</i>	8	148, 154
<i>Actinobacter</i>	30	140, 143, 146, 162, 276
andere nicht-kultivierte	2	–

Dennoch wurden nicht nur diese gleitenden Bakterien durch die Klonbibliothek identifiziert. Ein Drittel der Klone wiesen Ähnlichkeiten zu verschiedenen Gattungen der *Actinobacter* auf. Die Sequenzen zeigten, dass sie zusammen mit den Mitgliedern des Stammes *Bacilli* besonders in den T-RF zwischen 135 und 165 bp Länge dominierten (Abb. 6; Tab. 12). Diese T-RF wurden allerdings nicht spezifisch in der „schweren“ rRNA nachgewiesen, vielmehr herrschten sie in allen „leichten“ Gradientenfraktionen vor. Folglich kam diesen Bakterien beim Abbau der zugeführten Biomasse auch keine spezifische Rolle zu. Sie repräsentierten vielmehr eine zahlenmäßig stark vertretene Gruppe von Mikroorganismen, die die Mehrheit der unmarkierten oder der zu späteren Zeitpunkten teilweise markierten rRNA

bildete. Wie am Gradienten des Kontrollbodens erkennbar war, konnten diese „leichten“ Templates die „schweren“ Gradientenfractionen kontaminieren, da der Cäsiumtrifluoracetat-Gradient eine limitierte Kapazität hinsichtlich der Trennung von rRNA-Gemischen in präzise definierte Banden besitzt (Lueders et al., 2004a; Manefield et al., 2002).

Mit fortschreitender Inkubationszeit wurden die Unterschiede zwischen den T-RFLP-Mustern der „leichten“ und der „schweren“ rRNA geringer (Abb. 6). Das implizierte, dass der Einbau des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  nicht länger auf eine kleine Zahl von Bakterienpopulationen beschränkt war, sondern sich über das mikrobielle Nahrungsnetz bzw. die trophischen Ebenen in die gesamte mikrobielle Biomasse des Bodens ausdehnte. Stark angereicherte, bakterielle rRNA war auch noch nach acht Inkubationswochen noch nachweisbar (Abb. 6). Da zu diesem über die Hälfte (63 %) des detektierten, *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  im Boden vorhanden waren, lagen folglich bedeutende Mengen des  $^{13}\text{C}$  in der lebenden, indigenen mikrobiellen Biomasse des Bodens vor, wie in der Diskussion (siehe 4.2; 4.3) erläutert wird.

### 3.3.2 Identifizierung *E. coli*-verwertender Pilze

Im Gegensatz zu den aktiven Bakterien schienen die Pilzpopulationen im Boden eine dynamischere Rolle im Turnover der Biomasse einzunehmen. Im Vergleich zur bakteriellen rRNA zeigte die Pilz-rRNA bereits eine Stunde nach dem Einbringen der *E. coli*-Zellen eine bedeutende mengenmäßige Zunahme (Abb. 5). Der größte Teil dieser Pilz-rRNA fand sich dabei in „schwereren“ Gradientenfractionen als die bakterielle rRNA wieder. Allerdings traf dies für den  $^{13}\text{C}$ -Ansatz ebenso wie für den Kontrollansatz mit unmarkierten *E. coli*-Zellen zu. Der Unterschied zwischen den beiden Ansätzen war nicht signifikant. Die meisten Pilz-Templates nach einer Inkubationsstunde konzentrierten sich für den  $^{13}\text{C}$ -Ansatz bei einer Schwimmdichte von  $1,81 \text{ g ml}^{-1}$  und für den Kontrollansatz leicht darunter. Die größten Mengen Pilz-rRNA wurden nach einer Inkubationswoche detektiert. Im folgenden Verlauf der Inkubation nahm diese rRNA wieder ab. Da eine hohe RNA-Konzentration eine hohe metabolische Aktivität impliziert, deutete diese Beobachtung auf eine Abnahme des stimulierenden Effekts hin, den die labilen Komponenten der sterbenden Biomasse auf die Aktivität der Pilze ausüben.

Um diese Pilze zu identifizieren, wurden drei kleine Klonbibliotheken generiert: eine jeweils für die anscheinend „schwere“ rRNA zu Inkubationsbeginn und nach 14 d sowie und eine für die „leichte“ rRNA nach 14 d (Tab. 13). Alle Bibliotheken wurden durch *Microascaceae*, die eine nahe Verwandtschaft zu *Petriella* und *Pseudallescheria* aufweisen, dominiert (Abb. 8). Eine weitere, häufig auftretende Gruppe von Klonen zeigte eine Verwandtschaft zu *Chaetomium* spp. Allerdings war anhand der Bibliotheken kein signifikanter Unterschied zwischen den dichteaufgelösten Pilzgesellschaften nachweisbar.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Pilz-Klonbibliotheken. Phylogenetische Zuordnung und Anzahl der pilzlichen 18S-rRNA-Sequenzen, die aus der Klonbibliothek der dichtefraktionierten Nukleinsäuren zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten nach dem Einbringen der <sup>13</sup>C-markierten Biomasse in den Boden generiert werden konnten (Lueders et al., 2006).

Zeitpunkt	1 h	14 d	14 d
Schwimmdichte [g ml <sup>-1</sup> ]	1,817	1,815	1,788
Name der Bibliothek	Y4Fu	I4Fu	I8Fu
Phylogenetische Gruppe			
<i>Sordariomycetes</i>			
<i>Microascaceae</i>	22	8	9
<i>Hypocreales</i>			1
<i>Chaetomiaceae</i>	4	5	
<i>Inserta sedis</i>	1	2	3
<i>Eyrotiomycetes</i>	1		
<i>Dothideomycetes</i>	3		1
Basidiomycota		1	
Zygomycota	2	2	

## Ergebnisse

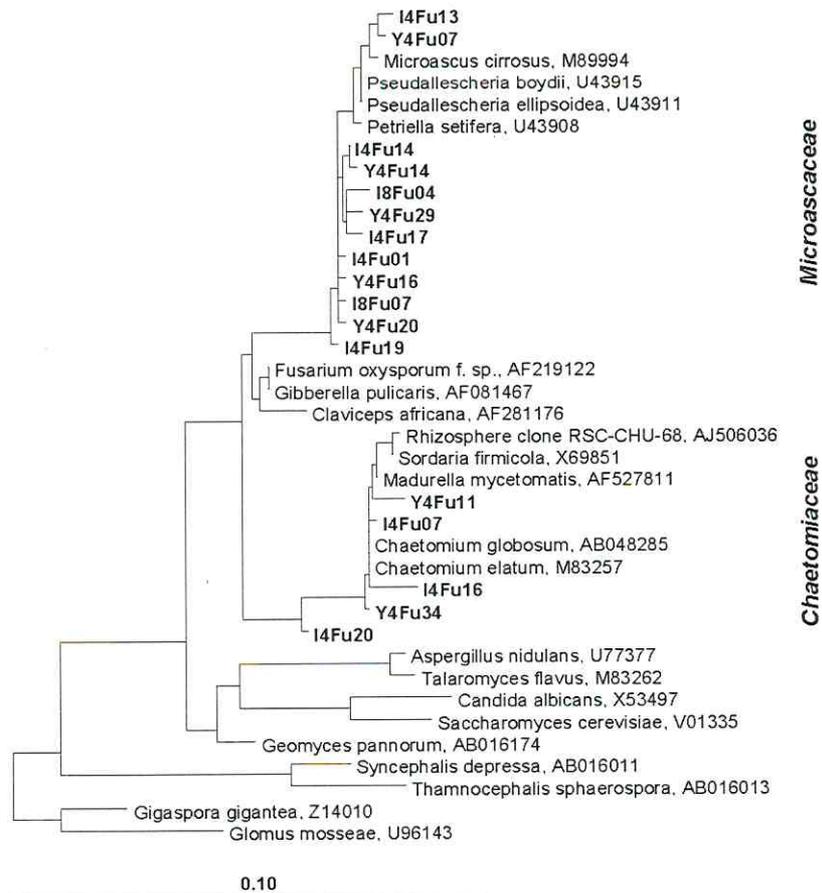


Abbildung 8: Phylogenetischer Stammbaum der pilzlichen 18S-RNA-Klone der Gradientenfractionierung. Identifizierte Klone innerhalb der *Sordariomycetes* aus der „schweren“ (Y04Fu- und I04Fu-Klone) und der „leichten“ (I08Fu-Klone) Fraktionen sind fett gedruckt. Der Maßstabsbalken stellt eine 10 %ige Divergenz zwischen den Sequenzen dar. Die GenBank-Zugangsnummern der Referenzsequenzen sind Kapitel 2 zu entnehmen (Lueders et al., 2006).

### 3.4 Transformation der Biomassekomponenten

Die Fettsäuren und Aminosäuren wurden mittels differenzierter Methoden analysiert, um die Menge dieser Substanzen in der toten OBS abzuschätzen (Kindler et al., 2006). Die Freisetzung der Biomassekomponenten aus der Gram-negativen Biomasse und deren Einbau in die indigene Biomasse konnte anhand des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den mikrobiellen PLFS bzw. Aminosäuren ( $\text{AS}_{\text{mik}}$ ) analysiert werden. Die Differenz zwischen den Mengen des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in diesen mikrobiellen Substanzen und den Mengen in den gesamten Fettsäuren (t-FS) und Aminosäuren ( $\text{AS}_{\text{total}}$ ) im Boden stellte die Menge mikrobiellen Kohlenstoffs dar, die in die tote OBS integriert wurde. Dass diese in der OBS festgelegten mikrobiellen Substanzen teilweise noch ihre ursprüngliche Struktur besaßen und biologisch aktiv waren, konnte beispielhaft an der Marker-DNA (*lux*-Gen) gezeigt werden.

#### 3.4.1 Mikrobielle PLFS und Gesamtfettsäuren

##### a) Die Ausgangssituation

Der verwendete Boden (Leerwertboden) zeigte, dass zu Beginn der Inkubation nur 25 % der kurzkettigen t-FS ( $< \text{C}_{20}$ ) zu den mikrobiellen PLFS zu zählen waren (Tab. 14). Da die PLFS charakteristisch für die Phospholipidmembranen intakter Zellen sind (Green and Scow, 2000; White et al., 1979a; White et al., 1979b) und nach deren Tod einem schnellen Abbau unterliegen (Pinkart et al., 2002), bedeutet das, dass nur 25 % der Fettsäuren im Boden in der lebenden indigenen Biomasse gebunden waren und dass 75 % der Fettsäuren im Boden der toten OBS zuzuordnen sind.

Durch die Zugabe der *E. coli*-Zellen zum Boden wurden dem Boden auch Fettsäuren zugesetzt. Dies äußerte sich in einer zusätzlichen Menge an t-FS in den beimpften Böden (Kontrolle:  $32 \pm 1,9 \text{ nmol t-FS g}^{-1}$  Boden; Ansatz mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Zellen:  $36 \pm 7,9 \text{ nmol t-FS g}^{-1}$  gegenüber Leerwert:  $29 \pm 7,9 \text{ nmol t-FS g}^{-1}$ ; Tab. 14). Die *E. coli*-bürtigen Fettsäuren zeichneten sich dabei durch ihre  $^{13}\text{C}$ -Markierung aus. Nach der Zugabe der  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen lagen gegenüber dem Leerwert 2100 pmol mehr  $^{13}\text{C}$ -markierte t-FS  $\text{g}^{-1}$  Boden vor. Unter der Voraussetzung eines konstanten PLFS-Anteils der *E. coli*-Zellen mit  $5,9 \times 10^4$  Zellen  $\text{pmol}^{-1}$  PLFS (Green and Scow, 2000) entspricht diese Zunahme einer Zellzahl von  $1,2 \times 10^8$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Boden und damit der zugegebenen *E. coli*-Menge. Allerdings lagen nur 60 % (1200

## Ergebnisse

pmol  $^{13}\text{C}$ -markierte PLFS  $\text{g}^{-1}$  Boden) der t-FS als PLFS vor. Die verbleibenden 40 % waren der toten Fraktion zuzuordnen. Dies war hauptsächlich auf eine Zerstörung von *E. coli*-Zellen während des Mischens während der Zugabe der Zellen und der Einstellung des Wassergehaltes sowie auf den schnellen Abbau der PLFS während der Probenlagerung zurückzuführen. Ein weiterer Grund ist darin zu sehen, dass in den Zellen neben den PLFS auch Fettsäuren anderen Ursprungs vorlagen, wie z.B. aus Glycolipiden. Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den PLFS beschränkte sich zu Beginn hauptsächlich auf vier Fettsäuren (16:0; cy17; 18:1 $\omega$ 7c und cy19; Abb. 12, S. 70), welche die typischen *E. coli*-Fettsäuren darstellen (Abb. 9; Zelles, 1997). Diese vier Fettsäuren verkörpern über 90 % der PLFS von *E. coli* RFM 443, wie anhand des PLFS-Musters zu erkennen ist (Abb. 9). Die übrigen Fettsäuren im Boden wiesen die natürliche  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit von ca. 1,1 atom% auf, was zu Versuchsbeginn (Abbildung 13, S. 72) an der Streuung der Punkte des um die durchgezogene Linie der natürlichen Häufigkeit zu sehen ist.

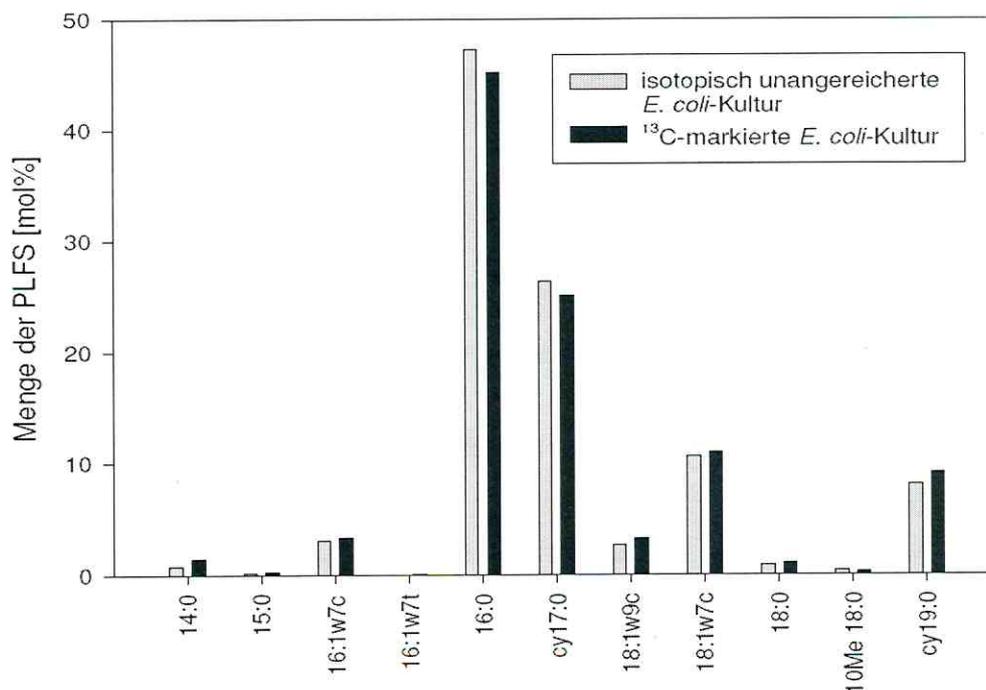


Abbildung 9: Das PLFS-Muster von *E. coli* RFM 443. Die PLFS-Zusammensetzung der  $^{13}\text{C}$ -markierten und der isotopisch unmarkierten *E. coli*-Kultur sind als Anteile (mol%) der jeweiligen Fettsäure an der Gesamtfettsäuremenge dargestellt.

Tabelle 14: Menge der gesamten (a) und  $^{13}\text{C}$ -markierten (b) Fettsäuren in der t-FS-Fraktion des Bodens und der PLFS-Fraktion der lebenden Mikroorganismen (Kindler et al., in prep.).

(a)	Inkubationszeit		t-FS	PLFS
	[d]		[pmol t-FS g <sup>-1</sup> ]	[pmol PLFS g <sup>-1</sup> ]
Leerwertboden <sup>°</sup>	0		28600 ± 7900	7000 ± 3400
	224		24500 ± 1400	4700 ± 3000
Kontrollboden <sup>°</sup>	0		31600 ± 1900	12700 ± 6800
	224		23500 ± 6700	5300 ± 2600
Boden mit $^{13}\text{C}$ -markierten <i>E. coli</i> -Zellen	0		35500 ± 7900	8900 ± 1800
	224		23500 ± 13600	8300 ± 4900

(b)	Inkubationszeit		t-FS	PLFS
	[d]		[pmol $^{13}\text{C}$ -t-FS g <sup>-1</sup> ]	[pmol $^{13}\text{C}$ -PLFS g <sup>-1</sup> ]
Leerwertboden <sup>°</sup>	0		306 ± 85	75 ± 34
	224		263 ± 15	50 ± 31
Kontrollboden <sup>°</sup>	0		337 ± 20	136 ± 73
	224		251 ± 72	56 ± 28
Boden mit $^{13}\text{C}$ -markierten <i>E. coli</i> -Zellen	0		2390 ± 245	1289 ± 365
	224		753 ± 374	283* (452) ± 248

<sup>°</sup> Die geringen Mengen  $^{13}\text{C}$ -markierter Fettsäuren im Leerwert- und im Kontrollbodenblank beruhen auf der natürlichen Häufigkeit an  $^{13}\text{C}$  von 1,1 %.

\* nach dem kinetischen Modell berechneter Wert.

#### b) Der Inkubationsverlauf

Während der Inkubation nahm die Menge der Fettsäuren (t-FS und PLFS) in allen inkubierten Böden (auch dem Leerwertboden; Tab. 14) ab. Die Menge der t-FS im Boden sank dabei auf eine Konzentration, die unabhängig von der Zugabe von *E. coli*-Zellen war (Tab. 14a). Sie betrug nach 224 d Inkubation in allen Böden ca. 24 nmol t-FS g<sup>-1</sup> Boden. Da dieser Fettsäurepool in An- und Abwesenheit zusätzlicher mikrobieller Biomasse auf eine vergleichbare Größe abnahm, werden eine starke Stabilisierung und Protektion der Bodenfettsäuren impliziert. Die stärkere Abnahme der t-FS in den beimpften Böden im Vergleich zum unbeimpften Boden deutete auf den verstärkten Abbau „frischer“ Fettsäuren, wie die aus den zugesetzten *E. coli*-Zellen.

## Ergebnisse

---

Um den Verbleib des *E. coli*-Kohlenstoffs in den Fettsäuren näher zu beleuchten, beziehen sich die folgenden Ergebnisse auf den *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den Fettsäuren des  $^{13}\text{C}$ -Ansatzes. Die Abnahme der Fettsäuren zeigte, wie auch schon die Mineralisierung des Gesamtkohlenstoffs (siehe 3.2), eine zweiphasige Kinetik (Abb. 10). In der ersten Phase wurden primär die Komponenten der sterbenden *E. coli*-Zellen abgebaut. In der zweiten Phase fand dann eine Metabolisierung des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes des Bodens statt. Die stärkere Abnahme beider Fettsäurefraktionen in den ersten Inkubationswochen ließ sich auf die bessere Verfügbarkeit des Fettsäurekohlenstoffs in Form der frisch zugesetzten, sterbenden *E. coli*-Zellen zurückführen. Der Abbau war den hungernden *E. coli*-Zellen selbst und einer erhöhten Aktivität der indigenen Mikroorganismen im Boden zuzuschreiben. Letztere wurde durch das Mixen und Befeuchten des Bodens und durch die Erhöhung der Bodentemperatur auf  $20^\circ\text{C}$  in allen Böden erhöht. In den beiden mit *E. coli*-Zellen inkubierten Böden wurde sie im Vergleich zum Leerwertboden zusätzlich durch die *E. coli*-Komponenten als Substrat stimuliert. Zudem könnten Primingeffekte dazu führen, dass die indigene Biomasse die stabilisierten Fettsäuren der toten OBS verstärkt abbaut.

Während der achtmonatigen Inkubation (224 d) sank die Menge des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in der t-FS-Fraktion des Bodens auf ca. 25 % der Ausgangsmenge (Abb. 10a; Tab. 14, S. 73). Während im ersten Monat (28 d) der Inkubation die Ausgangsmenge allerdings um ca. 70 % abnahm, betrug die Abnahme in den verbleibenden sieben Monaten (Tag 28 – 224) weniger als 7 % der Ausgangsmenge. Dieser Verlauf implizierte einen langsameren Umsatz der *E. coli*-Kohlenstoff enthaltenden Fettsäuren während der zweiten Phase (nach Tag 28). Eine mögliche Erklärung wäre der Einbau des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in die Fettsäuren der Bodenmikroorganismen oder die Verwendung ganzer *E. coli*-Fettsäuren als „Bausteine“ durch diese Mikroorganismen. Andererseits könnten die *E. coli*-Fettsäuren auch in der toten OBS vorliegen. In beiden Fällen käme es durch Stabilisierungsmechanismen – innerhalb lebender Zellen oder durch Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix (vergleiche 1.3.2) – zu dem beobachteten verlangsamten Umsatz. Nach einer starken Mineralisierung der *E. coli*-Komponenten kam es also nach ca. einem Monat zu einer Stabilisierung von Fettsäuren im Boden, welche *E. coli*-bürtigen Kohlenstoff enthielten.

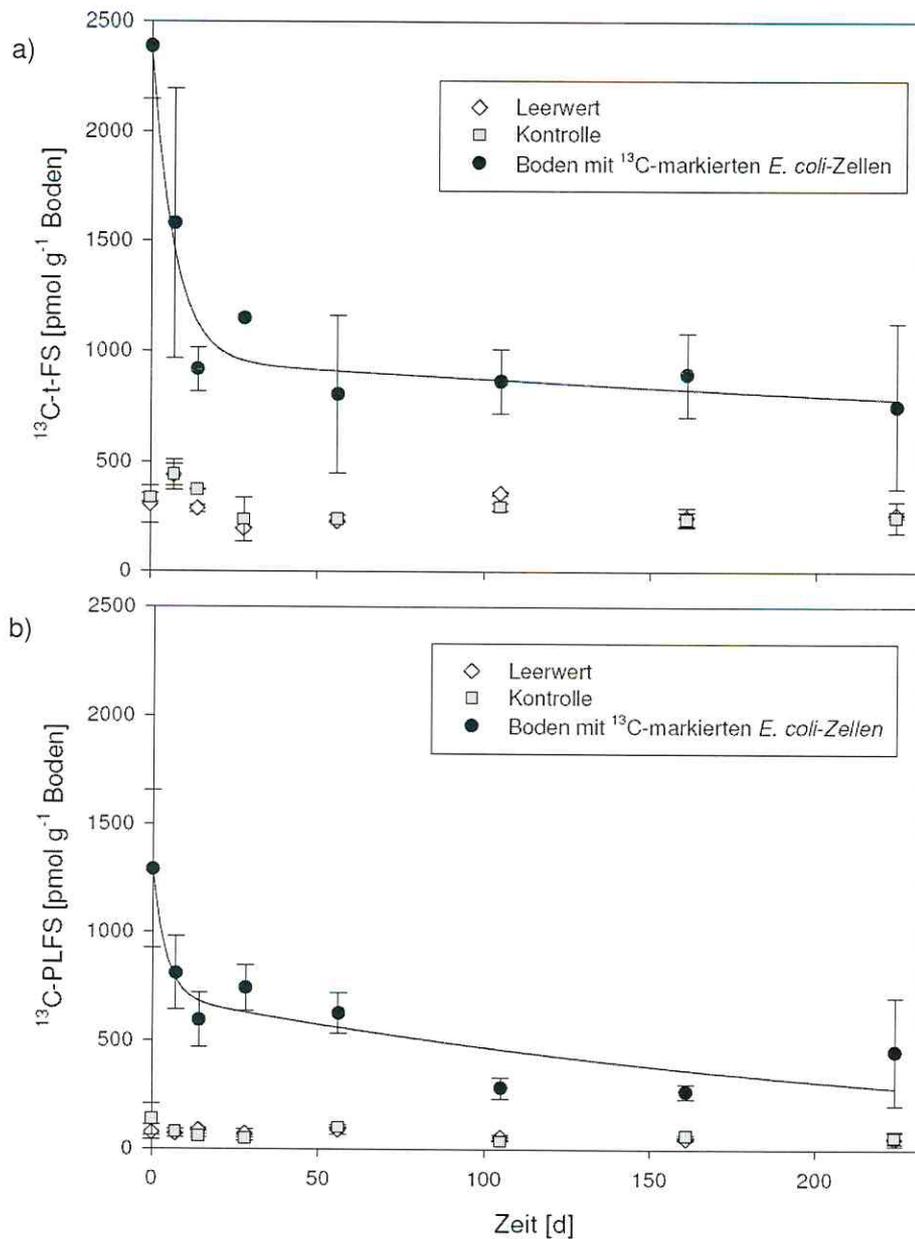


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Abnahme der  $^{13}\text{C}$ -markierten Gesamtfettsäuren (t-FS) im Boden (a) und der  $^{13}\text{C}$ -markierten PLFS in der mikrobiellen Biomasse des Bodens (b) während der Inkubation. Die  $^{13}\text{C}$ -Menge in den Fettsäurefraktionen wurde durch Multiplikation des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes der Fettsäuren mit deren Konzentration in entsprechende  $^{13}\text{C}$ -Fettsäureäquivalente umgerechnet. Diese stellen den  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der Fettsäuren als theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte Fettsäuren dar. Die Linie repräsentiert die modellierte Abnahme nach dem Zwei-Pool-Modell für exponentiellen Abbau (Kindler et al., in prep.).

## Ergebnisse

---

Die generelle Stabilisierung von Fettsäuren im Boden zeigte sich beispielhaft am Leerwertboden. Die Menge der  $^{13}\text{C}$ -markierten t-FS (Abb. 10a; Tab. 14, S. 63) und der t-FS (Tab. 14) in diesem Boden entwickelten sich aufgrund der natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit parallel und nahmen um nur 15 % des Ausgangswertes ab. Die Abnahme der *E. coli*-bürtigen Fettsäuren im Kontrollboden war nicht ermittelbar, da sie ohne Markierung vor dem Hintergrund der natürlichen t-FS-Menge nicht detektierbar waren. Die Menge der t-FS im Kontrollboden sank aber um 25 % des Ausgangswertes.

Die Zwei-Pool-Modell-Kinetik (Gleichung 2) der Abnahme des  $^{13}\text{C}$  in den t-FS des  $^{13}\text{C}$ -Ansatzes wurde anhand theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter t-FS-Äquivalente (siehe 2.3.7) modelliert. Sie ergab, dass der langsamer umsetzbare Teil dieser Fettsäureäquivalente (b) 40 % der Ausgangsmenge betrug (Tab. 15). Die Abnahmerate des labilen Pools des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den t-FS des Bodens ( $k_1$ ) betrug  $0,15 \text{ d}^{-1}$  und die des stabilen Pools ( $k_2$ )  $0,32 \text{ a}^{-1}$  (Tab. 15).

Im Vergleich dazu verlief die Abnahme des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in der lebenden mikrobiellen Biomasse des Bodens gleichmäßiger (Abb. 10b). Dennoch war die schnelle Metabolisierung der Fettsäuren der sterbenden *E. coli*-Zellen in der ersten Phase von der langsameren Metabolisierung des  $^{13}\text{C}$  in den PLFS von Organismen des mikrobiellen Nahrungsnetzes in der zweiten Phase deutlich zu unterscheiden. Dies spiegelte sich in den kinetischen Konstanten wider:  $k_1 = 0,25 \text{ d}^{-1}$  und  $k_2 = 1,48 \text{ a}^{-1}$  (Gleichung 2; Tab. 15). Obwohl die Größe des stabilen Pools der theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten PLFS-Äquivalente nach dem kinetischen Modell (b) 54 % der Ausgangsmenge betrug (Tab. 15), sank die  $^{13}\text{C}$ -PLFS-Konzentration während der achtmonatigen Inkubation auf etwa 20 % des Ausgangswertes (Abb. 10b). Die 34 %ige Differenz im  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der „stabilen“ PLFS (entspricht „stabile“  $^{13}\text{C}$ -PLFS) ging also bereits während der Inkubation (224 d) durch Stoffwechselprozesse verloren, was die geringe Stabilität der Fettsäuren lebender Mikroorganismen veranschaulicht. Die relativ (zu den t-FS) hohe Abnahmerate der  $^{13}\text{C}$ -PLFS bzw. des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes der PLFS während der zweiten Phase deutete auf einen kontinuierlichen Auf- und Abbau von Fettsäuren der mikrobiellen Biomasse hin. Durch diese Prozesse wurde der *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$  kontinuierlich aus den PLFS entfernt. Die Halbwertszeit betrug  $0,47 \text{ a}$  (Tab. 15).

Tabelle 15: Die kinetischen Parameter der Metabolisierung des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  im Boden. Erfasst wurden die Gesamtmineralisierung des *E. coli*-Kohlenstoffs anhand des emittierten  $^{13}\text{CO}_2$ , die Abnahme des  $^{13}\text{C}$  in den Gesamtfettsäuren des Bodens ( $^{13}\text{C}$ -t-FS) und in den mikrobiellen Fettsäuren ( $^{13}\text{C}$ -PLFS) und Aminosäuren ( $^{13}\text{C}$ -AS<sub>mik</sub>). Die Parameter  $k_1$  und  $k_2$  sind die Abbauraten des schnell und langsam umsetzbaren Pools.  $t_{1/2;1}$  bzw.  $t_{1/2;2}$  sind die Halbwertszeiten dieser Pools und  $b$  stellt die Größe des langsam umsetzbaren Pools in Prozent der jeweiligen Ausgangsmenge dar (Kindler et al., in prep.).

	$k_1$ [ $\text{d}^{-1}$ ]	$t_{1/2;1}$ [d]	$k_2$ [ $\text{a}^{-1}$ ]	$t_{1/2;2}$ [a]	$b$ [% der Ausgangs- menge]	$R^2$
$^{13}\text{CO}_2^*$	0,100	6,94	0,523	1,33	47,8	0,9995
$^{13}\text{C}$ t-FS	0,147	4,72	0,322	2,15	40,0	0,9492
$^{13}\text{C}$ PLFS	0,253	2,74	1,478	0,47	54,4	0,8765
$^{13}\text{C}$ AS <sub>mik</sub>	0,161	4,32	0,248	2,79	31,5	0,9062

\* Daten aus Kindler et al; 2006

Da die PLFS im Boden für die Cytoplasmamembranen lebender Zellen charakteristisch sind (Pinkart et al., 2002; White et al., 1979a; White et al., 1979b), ist die PLFS-Menge proportional zur Menge der lebenden Mikroorganismen (Green and Scow, 2000). Unter gleichbleibenden Bedingungen kann man demzufolge darauf schließen, dass die Menge der lebenden mikrobiellen Biomasse im Boden konstant bleibt. Das wurde durch die gleich bleibenden Mengen der mikrobiellen Aminosäuren und der PLFS während der zweiten Phase belegt. Letzteres ist beispielhaft an den konstanten  $^{13}\text{C}$ -Mengen in den PLFS des Leerwert- und Kontrollbodens (Abb. 10b) zu erkennen, da deren Verlauf aufgrund der natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit dem Verlauf der PLFS entspricht. Da während der zweiten Phase der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der PLFS abnimmt, während die PLFS-Menge konstant bleibt, kann man auf einen Ab- und Aufbau der Cytoplasmamembran-Fettsäuren schließen. Dabei müssen sich die Mengen abgebauter und aufgebauter Fettsäuren entsprechen. Die Synthesen finden wahrscheinlich besonders stark während Zellteilungen statt. Somit würde der reziproke Wert der Halbwertszeit ( $1/t_{1/2}$ ) des  $^{13}\text{C}$ -Verlustes aus den PLFS eine Abschätzung der Wachstumsrate der indigenen Biomasse des Bodens in diesem Experiment darstellen. Die Biomasse würde sich folglich 2,1 mal pro Jahr verdoppeln.

Aufgrund der mikrobiellen Aktivität (Abbau und Synthese) änderte sich während der Inkubation das PLFS-Muster ebenso wie die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen PLFS. Die Konzentrationen und der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der PLFS im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz zu

## Ergebnisse

---

Inkubationsbeginn und nach 224 d sind in Abbildung 11 dargestellt. Nach der Zugabe der *E. coli*-Zellen wiesen die typischen *E. coli*-PLFS (16:0; cy17; 18:1 $\omega$ 7c; cy19) die höchste  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung auf, was bereits erläutert wurde (siehe 3.4.1a). Während der Inkubation verlor das *E. coli*-Muster der  $^{13}\text{C}$ -markierten PLFS an Intensität (Abb. 12). Währenddessen erfolgte ein relativ gleichmäßiger Einbau des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in die meisten mikrobiellen PLFS. Dies wird durch den Vergleich der PLFS-Konzentrationen mit den entsprechenden  $^{13}\text{C}$ -Gehalten der PLFS veranschaulicht (Abb. 12). Nach 224 d Inkubation wiesen alle mikrobiellen PLFS eine durchschnittliche  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von 4 atom% auf, was dem Anstieg der gepunkteten Linie entspricht. Die Pfeile repräsentieren die Änderungen in der Konzentration und im  $^{13}\text{C}$ -Gehalt verschiedener Fettsäuren und zeigen, dass die Musterverschiebungen (Konzentration und  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung) unabhängig voneinander verliefen. So nahmen Konzentration und  $^{13}\text{C}$ -Gehalt von drei *E. coli*-typischen PLFS ab (Pfeilrichtung nach links-unten). Die Konzentration der für *E. coli* charakteristischen Fettsäure 16:0 stieg allerdings aufgrund ihrer Synthese im Boden an, während ihr  $^{13}\text{C}$ -Gehalt sank (Pfeilrichtung nach rechts-unten). Andere PLFS (z.B. br17:0; 17:0; 18:1 $\omega$ 9c) zeigten einen Einbau des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs (Pfeilrichtung nach oben). Das resultierende PLFS-Muster mit einem relativ gleichmäßigen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt aller PLFS belegte den Einbau des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in das mikrobielle Nahrungsnetz des Bodens. Der Einbau des  $^{13}\text{C}$  in bestimmte PLFS mit Biomarker-Funktion erlaubte dabei Rückschlüsse auf bestimmte mikrobielle Gruppen (Vestal and White, 1989). Beispielsweise implizierte der beobachtete  $^{13}\text{C}$ -Einbau in verzweigte Fettsäuren (z.B. i15:0, a15:0; br 17:0) die Beteiligung von Gram-positiven Bakterien, der Einbau in einfach ungesättigte Fettsäuren (z.B. 18:1 $\omega$ 9c) die Beteiligung von Gram-negativen Bakterien und der Einbau in 10me18:0 die Beteiligung von Actinomyceten (DeGrood et al., 2005; Vestal and White, 1989). Die Zunahme der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von 18:1 $\omega$ 9c war auch ein Beleg für die Aktivität von Pilzen (Vestal and White, 1989).

Aufgrund der größeren Poolgröße der t-FS-Fraktion waren die Veränderungen in den Konzentrationen und den  $^{13}\text{C}$ -Gehalten der t-FS weitaus weniger signifikant (Tab. 16). Da die PLFS als Bestandteil der t-FS bei der Analyse ebenfalls erfaßt wurden, stimmten zudem die Verschiebungen in den  $^{13}\text{C}$ -Gehalten tendenziell überein.

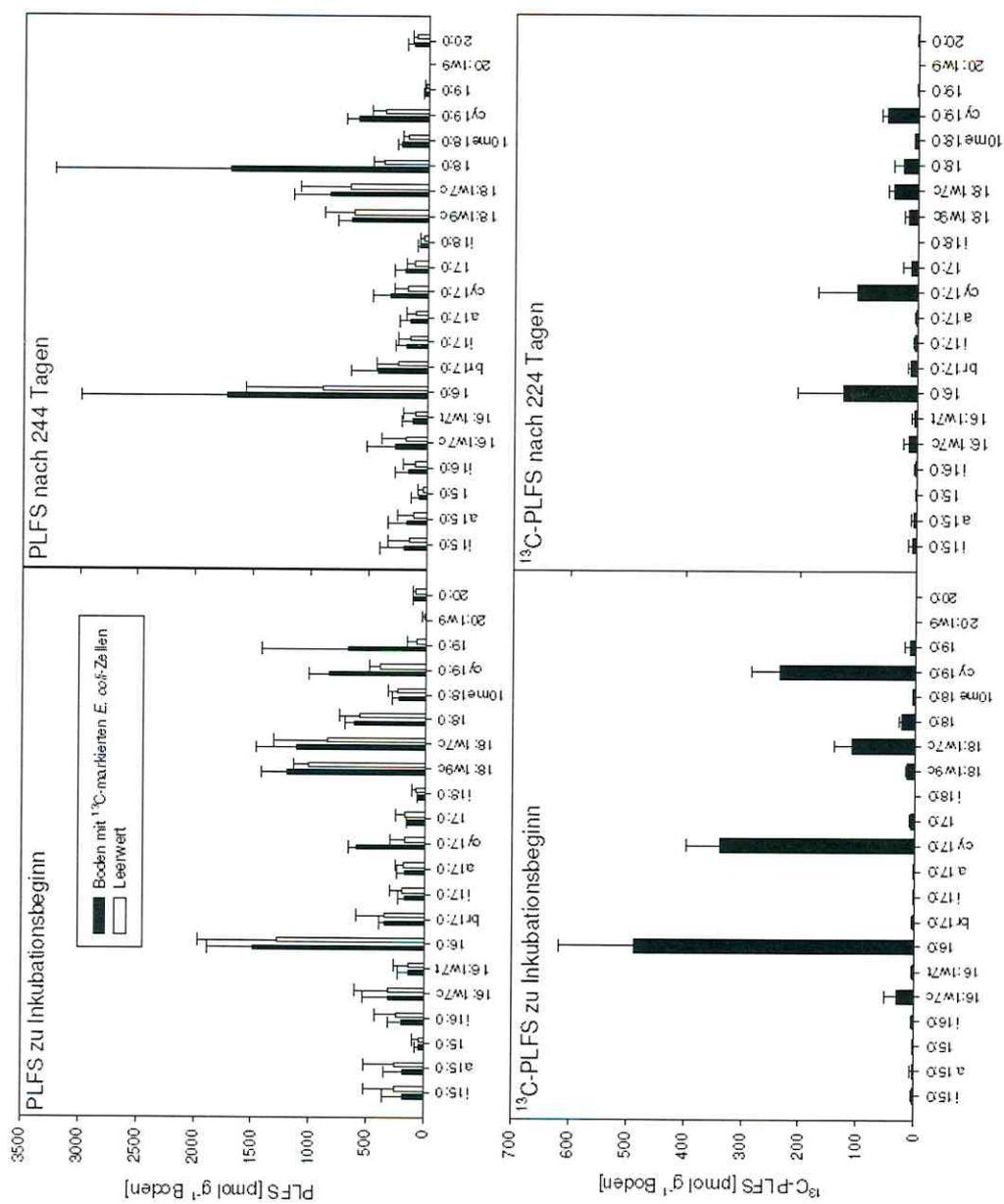


Abbildung 11: Konzentrationen der PLFS im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz und im unbeimpften Boden (Leerwert) sowie der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der PLFS (als theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte PLFS-Äquivalente) im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz zu Inkubationsbeginn und nach 224 d (Kindler et al., in prep.).

Ergebnisse

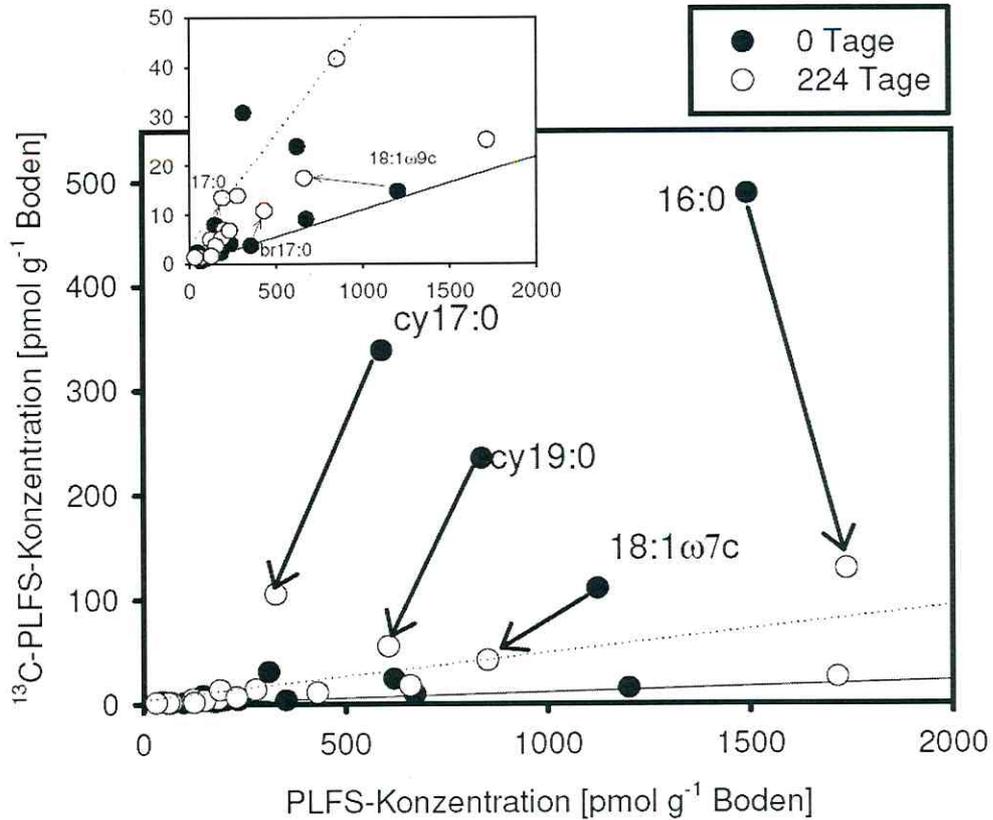


Abbildung 12: Vergleich der Konzentrationen und der  $^{13}\text{C}$ -Gehalte der mikrobiellen PLFS zu Inkubationsbeginn und nach 224 d. Der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der PLFS wurde dabei als theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte PLFS dargestellt ( $^{13}\text{C}$ -PLFS). Die durchgezogene Linie entspricht der natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  (1,1 atom%). Die gepunktete Linie gibt die durchschnittliche  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung aller erfaßten mikrobiellen PLFS nach 224 d Inkubation wieder (4 atom%). Die Pfeile veranschaulichen die Änderungen in der Konzentration und im  $^{13}\text{C}$ -Gehalt verschiedener Fettsäuren (Kindler et al., in prep.).

Am Ende der Inkubation lag aber nicht das gesamte in Fettsäuren gebundene *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$  in Mikroorganismen vor. Nur 45 % des *E. coli*- $^{13}\text{C}$  aller Bodenfettsäuren war in Mikroorganismen integriert. Die anderen 55 % waren in der toten OBS stabilisiert.

Tabelle 16: Prozentuale Zusammensetzung und  $^{13}\text{C}$ -Verteilung in den t-FS zu Inkubationsbeginn (0 d) und zu Inkubationsende (224 d). Zum Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Mengen in den jeweiligen t-FS wurde deren  $^{13}\text{C}$ -Gehalt in theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte t-FS-Äquivalente umgerechnet. Die Pfeile zeigen die signifikanten Zunahmen oder Abnahmen in den entsprechenden Fettsäuremengen. Die fettgedruckten Fettsäuren sind charakteristisch für die *E. coli*-Zellen (Kindler et al., in prep.).

	t-FS [% der Summe]		$^{13}\text{C}$ -t-FS [% der Summe]	
	0 Tage	224 Tage	0 Tage	224 Tage
<b>Gesättigt unverzweigt</b>				
12:0	2,7 ± 0,3 ↑	5,2 ± 0,4	3,6 ± 0,6 ↑	11,9 ± 0,9
14:0	5,0 ± 0,6 ↑	7,3 ± 3,0	5,0 ± 0,4 ↑	12,2 ± 4,1
15:0	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,7	0,5 ± 0,1 ↑	0,9 ± 0,3
<b>16:0</b>	<b>53,8 ± 4,8</b>	<b>53,6 ± 28,1</b>	<b>82,9 ± 6,6</b> ↓	<b>59,3 ± 32,3</b>
17:0	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,7	0,4 ± 0,1 ↑	0,7 ± 0,4
18:0	16,1 ± 7,6	14,3 ± 13,9	3,2 ± 1,5 ↑	5,6 ± 5,4
19:0	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
20:0	2,8 ± 0,7	3,4 ± 3,1	0,4 ± 0,1 ↑	1,2 ± 1,0
<b>Gesättigt methyl-verzweigt</b>				
i15:0	4,7 ± 2,4	3,5 ± 2,3	1,0 ± 0,5 ↑	2,7 ± 1,8
a15:0	5,2 ± 2,2	4,3 ± 2,3	1,2 ± 0,5 ↑	2,7 ± 1,5
i16:0	2,5 ± 1,1	1,7 ± 1,1	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,6
br17:0	1,2 ± 0,8	0,8 ± 0,5	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,4
i17:0	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,4
a17:0	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,7	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4
i18:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10me18:0	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2
<b>Gesättigt cyclopropyl-verzweigt</b>				
cy17:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
cy19:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Ungesättigt</b>				
16:1 $\omega$ 7c	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
16:1 $\omega$ 7t	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:1 $\omega$ 9c	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>18:1<math>\omega</math>7c</b>	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>0,0 ± 0,0</b>	<b>0,0 ± 0,0</b>

## Ergebnisse

### 3.4.2 Mikrobielle und Gesamt-Aminosäuren

Zu Beginn der Inkubation lagen im verwendeten Boden (Leerwert) nur  $80 \mu\text{g g}^{-1}$  der  $870 \mu\text{g Aminosäuren g}^{-1}$  Boden in der mikrobiellen Biomasse vor, was darauf hindeutete, dass der größte Teil der Aminosäuren (ca. 90 %) in der toten OBS stabilisiert war.

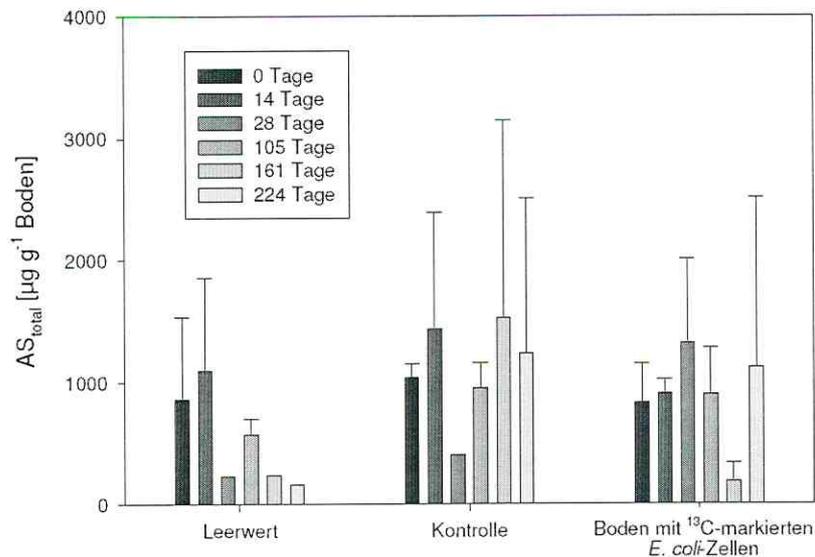


Abbildung 13: Menge der Gesamt-Aminosäuren ( $AS_{\text{total}}$ ) im Boden während der Inkubation (Kindler et al., in prep.).

Während der achtmonatigen (224 d) Inkubation unterschied sich der zeitliche Verlauf der Konzentrationen (Abb. 13) und der des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes der Gesamtaminosäuren ( $AS_{\text{total}}$ ; Abb. 14a) zwischen unbeimpftem Boden (Leerwert) und den beimpften Böden (Kontrolle und  $^{13}\text{C}$ -Ansatz). Die Menge an durch Hydrolyse freigesetzten  $AS_{\text{total}}$  im Leerwertboden nahm während der Inkubation langsam ab, indes sie in den beimpften Böden unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine signifikante Änderung aufwies (Abb. 13). Das deutete entweder auf eine Stabilisierung oder eine Synthese von Aminosäuren im Boden hin, wobei letzteres weniger wahrscheinlich war, wie in der Diskussion erläutert wird (siehe 4.4.2).

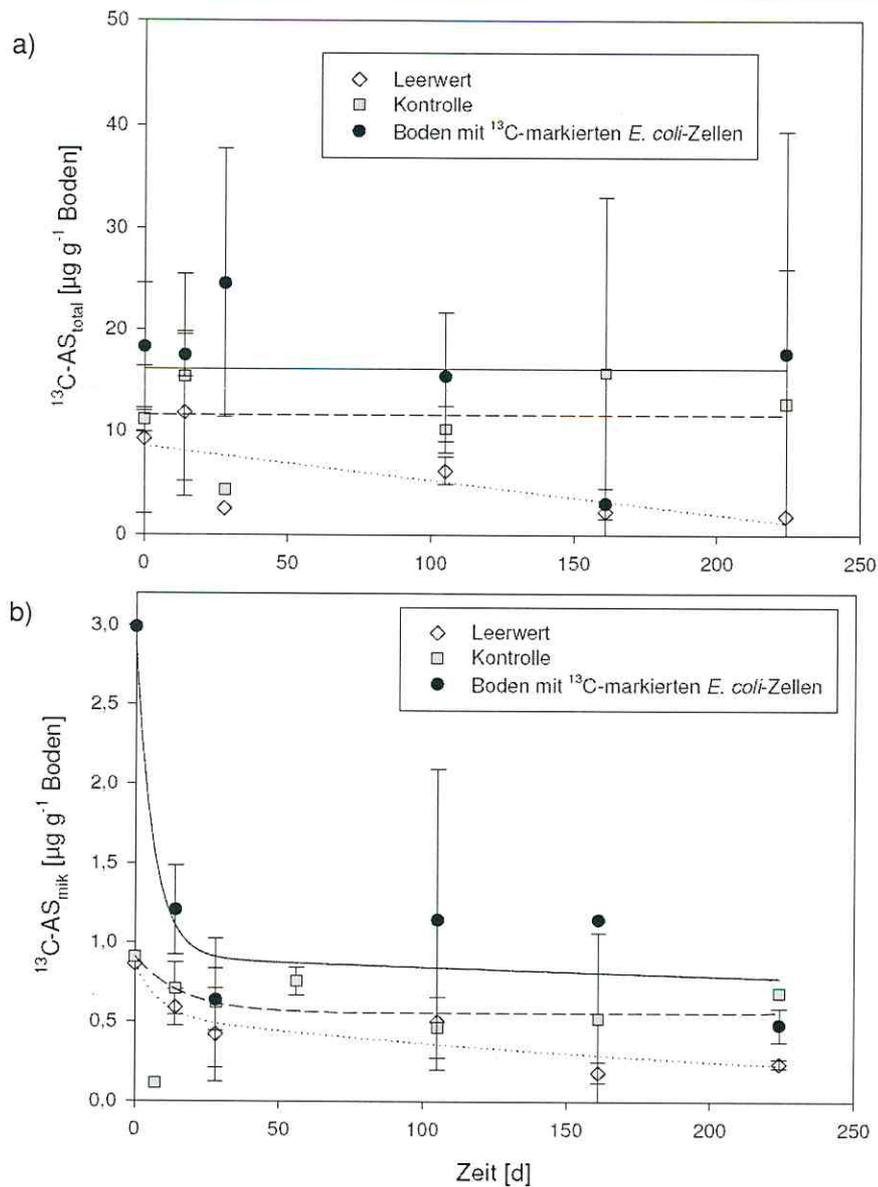


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Abnahme der  $^{13}\text{C}$ -markierten Gesamtaminosäuren ( $\text{AS}_{\text{total}}$ ; a) und der  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren in der mikrobiellen Biomasse ( $\text{AS}_{\text{mik}}$ ; b) des Bodens während der Inkubation. Die  $^{13}\text{C}$ -Menge in den Aminosäurefraktionen wurde durch Multiplikation des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes mit der Konzentration in entsprechende  $^{13}\text{C}$ -Aminosäureäquivalente umgerechnet. Diese stellen den  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der Aminosäuren als theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte Aminosäuren dar. Die Linien in a) zeigen die Entwicklung 0. Ordnung. Die Linien in b) repräsentieren die modellierten Abnahmen nach dem Zwei-Pool-Modell für exponentiellen Abbau. Die durchgezogene Linie entspricht dem  $^{13}\text{C}$ -Ansatz, die gestrichelte der Kontrolle und die gepunktete dem Leerwert (Kindler et al., in prep.).

## Ergebnisse

---

Die Isotopenzusammensetzung ( $^{13}\text{C}$ -Gehalt) der beiden Aminosäurefraktionen ( $\text{AS}_{\text{total}}$  und  $\text{AS}_{\text{mik}}$ ) änderte sich während der Inkubation nicht signifikant (außer einer Abnahme von  $< 0,7$  atom%  $^{13}\text{C}$  während der ersten Woche). Im Leerwert- und Kontrollboden lag in jeder Aminosäure die natürliche  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit vor. Im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz wiesen die  $\text{AS}_{\text{mik}}$  eine Isotopenzusammensetzung von ca. 2 atom%  $^{13}\text{C}$  auf und die  $\text{AS}_{\text{total}}$  zeigten ca. 1,5 atom%  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung. Infolgedessen bestand in beiden Aminosäurefraktionen eine direkte Abhängigkeit zwischen dem zeitlichen Verlauf der AS-Mengen und dem der  $^{13}\text{C}$ -Mengen in den AS (mit Ausnahme der leicht erhöhten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung zu Inkubationsbeginn). Dies ist am Beispiel der  $\text{AS}_{\text{total}}$  in den Abbildungen 13 und 14a zu erkennen.

Wie bei den Fettsäuren konzentriert sich die folgende Darstellung zum Verbleib des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs und der Aminosäuren auf den Boden, der mit den  $^{13}\text{C}$ -markierten Zellen inkubiert wurde. Im Gegensatz zur Menge des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den  $\text{AS}_{\text{total}}$  im Boden (Abb. 14a) nahm die Menge des *E. coli*- $^{13}\text{C}$  in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$  ab (Abb. 14b). Sie folgten, wie der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff im Boden (vergleiche 3.2) und in den Fettsäuren (vergleiche 3.4.1), einer zweiphasigen Abnahmekinetik (Gleichung 2) mit den Parametern:  $k_1 = 0,16 \text{ d}^{-1}$ ;  $k_2 = 0,25 \text{ a}^{-1}$  und  $b = 32 \%$  (Tab. 15, S. 67). Dabei beschrieb  $k_1$  den schnellen Umsatz der *E. coli*-bürtigen Proteine bzw. Aminosäuren durch die Bodenmikroorganismen während des Absterbens der *E. coli*-Zellen im ersten Monat (28 d). Nach dieser Zeit fand sich in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$  der Bodenmikroorganismen eine Menge  $^{13}\text{C}$  wieder, die etwa 25 % des anfänglichen *E. coli*-bürtigen Aminosäure- $^{13}\text{C}$  entspricht (Abb. 14b). Da im Boden keine Abnahme des  $^{13}\text{C}$  in den  $\text{AS}_{\text{total}}$  zu beobachten war (Abb. 14a), deutet diese Beobachtung auf eine Stabilisierung von 75 % des *E. coli*-bürtigen Aminosäure-Kohlenstoffs im Boden hin. Die Menge des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  änderte sich während der zweiten Phase (Tag 28 – 224) nicht (Abb. 14b). Der geringere Wert für  $k_2$  verdeutlicht den langsamen Umsatz des  $^{13}\text{C}$  in den Aminosäuren des mikrobiellen Nahrungsnetzes.

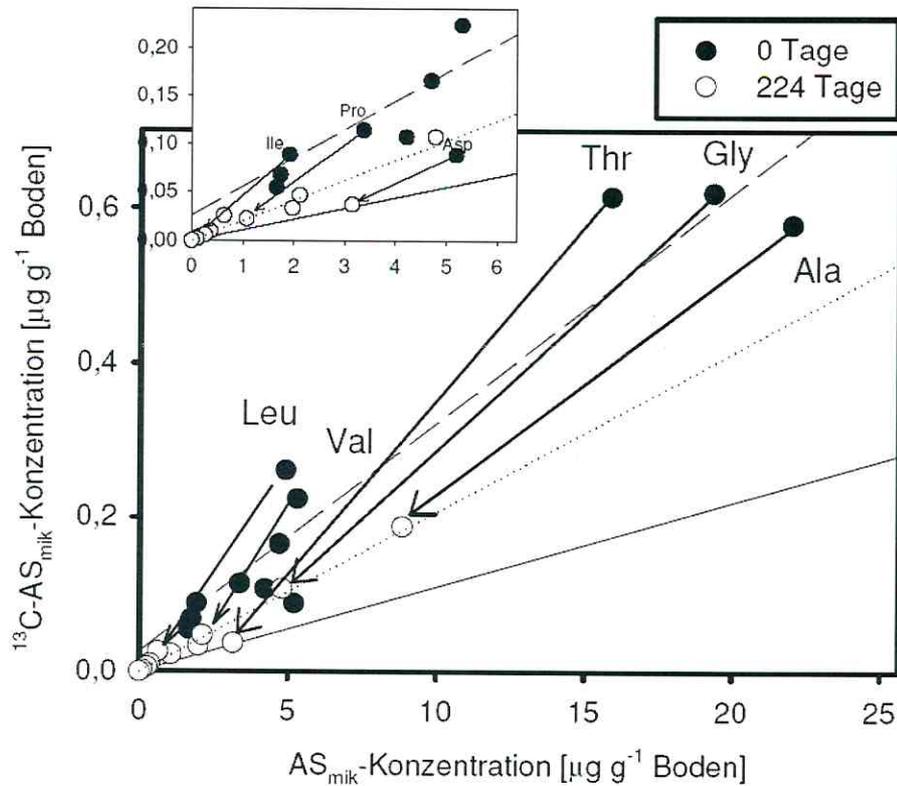


Abbildung 15: Vergleich der Konzentrationen und der  $^{13}\text{C}$ -Gehalte der AS<sub>mik</sub> zu Inkubationsbeginn und nach 224 d. Der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der AS<sub>mik</sub> wurde dabei als theoretisch vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierte AS<sub>mik</sub>-Menge dargestellt ( $^{13}\text{C}$ -AS<sub>mik</sub>). Die durchgezogene Linie entspricht der natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  (1,1 atom%). Die gestrichelte Linie gibt die durchschnittliche  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der detektierten AS<sub>mik</sub> zu Inkubationsbeginn wieder (ca. 2,5 atom%). Die gepunktete Linie zeigt die durchschnittliche  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung nach 224 d Inkubation (ca. 2 atom%). Die Pfeile veranschaulichen die Änderungen in der Konzentration und im  $^{13}\text{C}$ -Gehalt verschiedener Aminosäuren (Kindler et al., in prep.).

Während der Inkubation nahm aufgrund der mikrobiellen Aktivität die Menge des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in der mikrobiellen Biomasse ab. Allerdings blieb das AS<sub>mik</sub>-Muster ebenso wie die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen AS<sub>mik</sub> relativ konstant. Die Konzentrationen und der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der AS<sub>mik</sub> im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz zu Inkubationsbeginn und nach 224 d sind in Abbildung 15 dargestellt. Nach der Zugabe der *E. coli*-Zellen zeigten alle mikrobiellen Aminosäuren im Boden ein ähnliches Verhältnis zwischen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt (dargestellt als  $^{13}\text{C}$ -AS<sub>mik</sub>-Äquivalente) und ihrer Konzentration (Lage entlang der gestrichelten Linie). Dies veranschaulicht eine

ähnliche Isotopenzusammensetzung aller detektierten  $AS_{mik}$  (etwa 2,5 atom%). Die größere Menge des *E. coli*-bürtigen  $^{13}C$  in den Aminosäuren Threonin, Glycin und Alanin (hohe  $^{13}C$ - $AS_{mik}$ -Werte) impliziert, dass diese Aminosäuren in *E. coli*-Zellen relativ häufig vorkommen. Die gleichmäßige Isotopenzusammensetzung aller Aminosäuren der Mikroorganismen im Boden (Lage entlang der gestrichelten Linie) zeigt allerdings, dass diese Aminosäuren auch in anderen Mikroorganismen stark vertreten sind. Es gibt also innerhalb der hier analysierten Biomasse des Bodens keine *E. coli*-typischen  $AS_{mik}$ . Alle Aminosäuren kommen in der gesamten mikrobiellen Biomasse mit relativ gleicher Häufigkeit wie in *E. coli* vor, was den Modellcharakter von *E. coli* unterstreicht. Während der Inkubation nahmen Konzentration und  $^{13}C$ -Gehalt der  $AS_{mik}$  in Relation zueinander ab, was sich an den parallel zur gepunkteten Linie verlaufenden Pfeilen zeigt. Infolgedessen blieb die  $^{13}C$ -Anreicherung der  $AS_{mik}$  während der Inkubation relativ konstant, was durch den ähnlichen Anstieg der gepunkteten und der gestrichelten Linie veranschaulicht wird. Die parallelen Musterverschiebungen (Konzentration und  $^{13}C$ -Gehalt) der  $AS_{mik}$  implizieren, dass alle Aminosäuren zu einem ähnlichen Ausmaß und vermutlich miteinander gekoppelt durch die Bodenmikroorganismen umgesetzt werden.

### 3.4.3 Persistenz der Plasmid-DNA

Die DNA wurde aus dem Boden extrahiert und die Menge der im Boden vorhandenen *lux*-Gene mittels PCR mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren untersucht (Kindler et al., 2006). Die beiden Primerpaare unterschieden sich in ihren Empfindlichkeiten gegenüber dem *lux*-Gen. Das Primerpaar *luxA6/luxA7* (Jacobsen, 1995) zeigte eine Nachweisgrenze der Plasmid-DNA, welche  $10^3$  Zellen pro Gramm Boden entsprach, während für das Primerpaar *luxA1/luxA2* (Kästner, 1996)  $10^6$  Zellen pro Gramm Boden notwendig waren.

Die Menge der amplifizierbaren *lux*-Gene im Boden entsprach während der ersten zwei Inkubationswochen einer Zellzahl von  $> 10^6$  Zellen  $g^{-1}$  Boden. Die detektierbare Plasmidmenge sank während der weiteren Inkubation und entsprach zwischen dem zweiten und achten Inkubationsmonat (Tag 28 – 224) einer Konzentration von  $10^3$  bis  $10^6$  Zellen  $g^{-1}$  Boden (Tab. 17). Dies war deutlich mehr als an lebenden Zellen detektiert werden konnte, welche nach 105 Inkubationstagen gar nicht mehr nachweisbar waren (vergleiche 3.1.2).

Das Vorliegen der Plasmide in lebenden, aber nicht kultivierbaren *E. coli*-Zellen (VBNC-Zellen) konnte als Grund für die Persistenz der DNA im Boden ausgeschlossen werden, da im Anreicherungsmedium der MPN-Methode nach einer verlängerten Kultivierung über eine Woche keine *E. coli*-Zellen enthalten waren (siehe 3.1.2). Allerdings konnte eine Transformation des *lux*-Gens in nicht-kultivierbare Bodenmikroorganismen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sie erscheint aber wenig wahrscheinlich, wie in der Diskussion (siehe 4.5) gezeigt wird. Die Persistenz der *lux*-Gene im Boden mehr als ein viertel Jahr (> 119 d) nach dem Absterben der *E. coli*-Zellen ließ somit auf eine Stabilisierung intakter (amplifizierbarer) DNA an Komponenten der Bodenmatrix (z.B. Tonmineralen) schließen. Die DNA als Bestandteil der toten OBS konnte also ihre biologische Funktionalität beibehalten.

Tabelle 17: Persistenz der DNA (*lux*-Gen) während einer Inkubation über 224 d (Kindler et al., 2006).

Zeit [d]	DNA-Menge [Zelläquivalente g <sup>-1</sup> Boden]	
	Kontrollboden mit unmarkierten <i>E. coli</i> -Zellen	Boden mit <sup>13</sup> C-markierten <i>E. coli</i> -Zellen
0	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>
7	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>
14	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>
28	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>
56	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>
105	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>
161	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>
224	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>

## 4 Diskussion

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde eine komplette Kohlenstoffbilanz des Abbaus eines Gram-negativen Mikroorganismus im Boden erstellt. Dafür wurde ein landwirtschaftlich genutzter Boden mit dem *E. coli*-Stamm RFM 443 inkubiert, der sich besonders für diesen Versuch auszeichnete, da sein Überleben in einem organismusfremden Habitat limitiert war. Aufgrund des allgemein gültigen Aufbaus Gram-negativer Mikroorganismen erlaubt diese Arbeit, Aussagen über die Relevanz Gram-negativer Mikroorganismen bei der Bildung der OBS zu treffen.

Wie sich hier zeigte, setzt mikrobielle Biomasse nicht nur den durch die Pflanzen eingebrachten Kohlenstoff um, sondern wird auch selbst umgesetzt und trägt so zur Bildung der OBS bei.

Während der achtmonatigen (224 d) Inkubation des Bodens mit den  $^{13}\text{C}$ - und *lux*-markierten *E. coli*-Zellen wurde

- das Absterben von 99 % der *E. coli*-Zellen in weniger als 28 Tagen,
- die Mineralisierung von etwa 50 % des durch *E. coli* zugeführten Kohlenstoffs anhand des emittierten  $^{13}\text{CO}_2$  sowie
- das Verbleiben der anderen 50 % des durch *E. coli* zugeführten Kohlenstoffs im Boden beobachtet.

Der direkte Beweis für die Stabilisierung mikrobieller Biomassekomponenten in der toten organischen Substanz im Boden wurde durch den Nachweis  $^{13}\text{C}$ -markierter freier Fettsäuren, Aminosäuren und *E. coli*-bürtiger DNA außerhalb lebender Zellen erbracht.

Dabei ist der Abbau der einzelnen Substanzklassen bzw. die Festlegung des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in der mikrobiellen Biomasse und der toten OBS substanz-abhängig. So verbleibt der gesamte Aminosäurekohlenstoff im Boden, aber nur 25 % des Fettsäurekohlenstoffs. Die Mineralisierung und die Verteilung dieser Substanzen zwischen der Biomasse und der toten OBS wird durch die Bodenmikroorganismen gesteuert, wobei die bakteriellen Schlüsselorganismen für den Abbau der *E. coli*-Zellen mittels *rRNA-stable isotope probing* (rRNA-SIP) identifiziert werden konnten.

#### 4.1 Überleben von *E. coli* im Boden

Tabelle 18: Überleben von *E. coli* im Boden

Stamm	Zeitliches Überleben	Bedingungen	Literatur
<i>E. coli</i>	60 d	20°C	Bogosian et al. (1996)
<i>E. coli</i> K12	19 d	25°C	Sorensen et al. (1999)
	42 d	15°C	
<i>E. coli</i>	38 d	25°C	Cools et al. (2001)
	> 80 d	15°C	
	250 d	unter bestimmten Bedingungen	
<i>E. coli</i> RFM 443	> 56 d	20°C	Kindler et al. (2006)

Die habitatsfremde Biomasse überlebte mehr als zwei Monate (> 56 d) im Boden. Nach 105 d waren die biolumineszenten *E. coli*-Zellen nicht mehr nachweisbar. Dies entspricht den für *E. coli* unter ähnlichen Umweltparametern beobachteten Literaturwerten (Tab. 18).

Zu Beginn des Versuches betrug die bestimmte Zellzahl  $1 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Boden im Kontroll-Ansatz bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen  $g^{-1}$  Boden im  $^{13}C$ -Ansatz, was einer Wiederfindungsrate von 0,15 % entspricht. Kultivierungsabhängige Analysen mikrobieller Biomasse im Boden mit effizienteren Bakterienextraktionen (Dichtegradientenzentrifugation) weisen Wiederfindungsraten zwischen 0,4 und 5,1 % auf (Courtois et al., 2001; Maron et al., 2006). Mögliche Gründe für die vorliegende eingeschränkte Wiederfindung sind:

- die Zerstörung von Zellen durch Scherkräfte während der Zumischung zum Boden und
- eine eingeschränkte Wiederfindung der Zellen basierend auf
  - einer unvollständigen Extraktion durch Adsorption von Zellen an Bodenbestandteilen (z.B. Tonmineralen),
  - dem Übergang der *E. coli*-Zellen in ein dormantes oder nicht kultivierbares Stadium,

## Diskussion

---

- dem Verlust des Plasmids von *E. coli*, der ein Wachstum im Selektivmedium der Anreicherungskultur der MPN-Methode ausschließen würde und
- *Antibiotic Masking*, d.h. einem gehemmten Wachstum der antibiotikaresistenten *E. coli*-Zellen im Selektivmedium der Anreicherungskultur der MPN-Methode.

Ein dormantes oder nicht kultivierbares Stadium der verwendeten *E. coli*-Zellen wurde allerdings, aufgrund des Ausbleibens biolumineszenter *E. coli*-Zellen nach verlängerter Anreicherungskultur der Bodenextrakte über eine Woche ausgeschlossen. Zudem konnte in Kulturexperimenten kein Verlust des *high-copy* Plasmids (*lux*-Gen) beobachtet werden. Im Gegenteil: Die *E. coli*-Zellen behielten auch nach Kultivierungsserien in antibiotikafreien LB- und Mineralmedien ihr Plasmid und ihre Fähigkeit zur Biolumineszenz. Dies entspricht den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass *E. coli*-Zellen ihre Plasmid-DNA in Umweltproben behalten, so z.B. *E. coli* K12 im Boden (Sorensen et al., 1999) und drei andere *E. coli*-Stämme in Seewasser (bis 3 a; Byrd and Colwell, 1993). Diese Erklärungen sind daher eher unwahrscheinlich.

Allerdings könnte der temporäre Verlust der Fähigkeit von Bakterien, in der Anwesenheit von spezifischen Konzentrationen von Antibiotika zu wachsen (McInroy et al., 1996), zu einer Unterschätzung der Zellzahl bei kultivierungsabhängigen Methoden führen. Dieser Effekt wird *Antibiotic Masking* genannt und beschreibt, die Unfähigkeit antibiotikaresistenter Bakterien aus Boden auf antibiotikahaltigen Medien zu gedeihen. Sie können aber auf diesen Medien wachsen, nachdem sie zuvor auf antibiotikafreien Medien, z.B. Agarplatten, angezogen wurden (Nairn and Chanway, 2002). Diese Einschränkung des Wachstums kann bereits wenige Stunden nach dem Einbringen von Zellen in Boden eintreten (Bengtsson et al., 2004). Das *Antibiotic Masking* konnte von uns nicht ausgeschlossen werden, da der Einsatz des Antibiotikums im Medium der Anreicherungskultur (MPN-Methode) für die Unterdrückung des Wachstums von indigenen Mikroorganismen des Bodens, die das Wachstum von *E. coli* beeinflusst hätten, unumgänglich war. Vorversuche zur Wiederfindung der *E. coli*-Zellen im Boden zeigten aber, dass dieser Effekt eine eher untergeordnete Rolle spielt. Daher sind die wesentlichen Gründe für die Differenz zwischen zugegebener *E. coli*-Zellzahl und detektierter Zellzahl die erschwerte Extraktion aufgrund von Wechselwirkungen der Zellen mit Bodenkomponenten

(Courtois et al., 2001; Maron et al., 2006; Mayr et al., 1999) und die Zerstörung der Zellen durch Scherkräfte während des Einbringens der Zellen in den Boden. Zu dieser Annahme führt die Beobachtung, dass nach der Inokulierung 40 % der *E. coli*-bürtigen Phospholipidfettsäuren nicht mehr in der lebenden Biomasse gebunden waren. Die Menge der zugeführten *E. coli*-Zellen von  $1,3 \times 10^8$  Zellen  $g^{-1}$  Boden wird allerdings durch die Menge an *E. coli*-bürtigen,  $^{13}C$ -markierten Fettsäuren im Boden, die einer Zellzahl von  $1,2 \times 10^8$  Zellen  $g^{-1}$  Boden entspricht, bestätigt. Zudem entspricht die mit den *E. coli*-Zellen zugeführte  $^{13}C$ -Menge zu Inkubationsbeginn 94 % des theoretischen *E. coli*-Kohlenstoffs.

Die relative Abnahme der Zellzahl erlaubt eine Aussage über den zeitlichen Verlauf des Absterbens von *E. coli*, da die Rate des Absterbens von Zellen unabhängig von der Inokulumgröße ist (Sorensen et al., 1999). Folglich hat auch die geringer detektierte Zellzahl keinen Einfluß auf die Abnahmerate.

In den ersten vier Wochen (28 d) der Inkubation sank die *E. coli*-Zellzahl im Boden um mehr als 99 %. Dies ist vergleichbar mit der Absterberate anderer *E. coli*-Stämme, deren Zellzahlen in weniger als vier Wochen um 99 % sinken (Avery et al., 2004; Cools et al., 2001; Sorensen et al., 1999; Topp et al., 2003). Mögliche Erklärungen für eine derartige Abnahme der Lebendzellzahl während der Inkubation sind:

- I. das Eintreten von *E. coli* in ein dormantes Stadium oder aber dass die Zellen noch leben, aber nicht kultivierbar (*viable but not culturable*; VBNC) sind,
- II. der Verlust des *high-copy* Plasmids der *E. coli*-Zellen und folglich der Verlust der Fähigkeit zur Biolumineszenz während der Inkubation, was die Detektierbarkeit der Zellen unmöglich machen würde,
- III. Prädation durch Bakterien, Pilze (Lueders et al., 2006) und Protozoen (Sorensen et al., 1999) bzw.
- IV. der Zelltod und Zellyse aufgrund suboptimaler Bedingungen für *E. coli* im Boden (z.B. Nährstofflimitation).

Da Punkt I und II bereits während der Erörterung der eingeschränkten Wiederfindung ausgeschlossen werden konnten, stellen die letzten beiden Punkte die wahrscheinlichsten Erklärungen dar.

Beispielsweise konnten nach sieben Tagen bakterielle Prädatoren und Konsumenten von *E. coli* identifiziert werden (vergleiche Punkt III), da der *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$  in deren RNA angereichert war (siehe 4.3). Diese Metabolisierung des *E. coli*-Kohlenstoffs wird durch den Tod der *E. coli*-Zellen erst ermöglicht. Der Zelltod (vergleiche Punkt IV) von *E. coli* beruht auf der Unfähigkeit der Zellen, bei hohen Temperaturen ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ihre metabolische Aktivität zu reduzieren, wenn die Verfügbarkeit verwertbarer Kohlenstoffquellen im Boden erschöpft ist (Sorensen et al., 1999). Folglich liegen die Hauptgründe der Abnahme der Lebendzellzahl von *E. coli* in der Prädation sowie im Zelltod durch Nährstoffmangel.

Da die *E. coli*-Population nach 105 Tagen im Boden nicht mehr physiologisch aktiv war, kann der Kohlenstoff dieser Zellen ( $> 99,99\%$ ) nicht mehr in den anfänglichen, zellulären Strukturen gebunden vorliegen. Der *E. coli*-Kohlenstoff wurde dann zu  $\text{CO}_2$  mineralisiert, in mikrobielle Biomasse des Bodens integriert und in die tote organische Bodensubstanz eingebaut.

### 4.2 Metabolisierung und Mineralisierung des bakteriellen Kohlenstoffs

Im Gegensatz zum Überleben der *E. coli*-Zellen im Boden ist die Persistenz des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs im Boden wesentlich höher. So war nach acht Monaten (224 d) noch annähernd die Hälfte (44 % des detektierten  $^{13}\text{C}$ ) des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  im Boden nachweisbar.

Während der Inkubation nahm die *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$ -Menge im Boden ab und die Menge an emittiertem  $^{13}\text{CO}_2$  zu. Die Ab- bzw. Zunahmerate verlangsamte sich dabei mit der Zeit. Die Summe der *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$ -Stoffmenge im emittierten  $\text{CO}_2$  und im Boden-Kohlenstoff betrug nach dem Start der Inkubation konstant  $3,31\text{ mmol kg}^{-1}$  Boden. Dies zeigt eine gute Wiederfindung im benutzten Reaktorsystem mit reproduzierbarer und repräsentativer Probenahme.

Die sterbende *E. coli*-Population kann als komplexes Substrat für die indigene Biomasse des Bodens angesehen werden, da sie sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen zusammensetzt. Aus diesem Grund wurde für die kinetischen Berechnungen ein Zwei-Pool-Transformationskinetik-Modell (Qualls and Haines, 1992) herangezogen. Die Betrachtung von *E. coli* als „komplexes Substrat“ wird neben der sehr guten Übereinstimmung der modellierten Daten und der

Meßwerte durch die unterschiedliche Umsetzung der einzelnen Substanzklassen gestützt (vergleiche 4.4). Der *E. coli*-Kohlenstoff wird nach dem Modell in zwei Pools unterteilt, die jeweils einem exponentiellen Abbau unterliegen und eine unterschiedliche Stabilität aufweisen. Dies äußert sich in unterschiedlichen Abbauraten der Pools, bzw. in einer unterschiedlich starken Mineralisierung ( $^{13}\text{CO}_2$ -Emission) des Kohlenstoffs.

Der Abbau des „labilen“ Kohlenstoffpools dominiert in den ersten sechs Wochen der Inkubation und fällt damit in den gleichen zeitlichen Rahmen wie das Absterben von > 99,9 % der Zellen. Die *E. coli*-Zellen lysieren nach ihrem Tod im Boden sehr schnell, wodurch ihr Kohlenstoff für die indigene Biomasse sehr gut verfügbar ist. Der  $^{13}\text{C}$  wird innerhalb dieser Zeit schnell von einer zunehmenden Anzahl von Mikroorganismen assimiliert (siehe 4.3; Lueders et al., 2006). Die Aktivität der indigenen Biomasse wird dabei durch die Temperaturerhöhung (20°C), die Befeuchtung und Durchmischung des Bodens sowie durch die Zufuhr des *E. coli*-Kohlenstoffs stimuliert. Die Halbwertszeit des „labilen“ Kohlenstoffpools (7 d) entspricht der beobachteten Abnahme gut verstoffwechselbarer Substanzen in Boden, wie z.B. Kohlenhydraten (Baldock et al., 1989; Hamer and Marschner, 2002;2005), Aminosäuren (Hamer and Marschner, 2005) und Lipiden (Tollefson and McKercher, 1983). Dabei ist die Halbwertszeit des Kohlenstoffs vermutlich noch geringer, da die Verfügbarkeit des Kohlenstoffs für die indigene Biomasse erst nach dem Tod der *E. coli*-Zellen ihr Maximum erreichen wird. So ist in dieser Phase das Absterben der *E. coli*-Population der limitierende Schritt für die Kohlenstoffverwertung durch die indigene Biomasse.

Die langsamere Mineralisierung ( $^{13}\text{CO}_2$ -Freisetzung) des „stabilen“  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffpools aus *E. coli* beginnt ab der sechsten Woche zu dominieren, nachdem die Menge der labilen Substanzen erschöpft ist. Nun scheinen zum einen schwer abbaubare Reststrukturen und Metabolite der *E. coli*-Biomasse verstoffwechselt zu werden, die der toten OBS zuzuordnen sind. Zum anderen wird der *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$ , der bereits von der indigenen Mikroflora assimiliert wurde, nach deren Zelltod weiter im mikrobiellen Nahrungsnetz des Bodens verwertet. Der „stabile“ Pool weist dabei eine Halbwertszeit von 1,3 a auf, was Halbwertszeiten der mikrobiellen Biomasse im Boden entspricht (1,05 a nach Jenkinson and Parry, 1989; 1,69 a nach Jenkinson and Rayner, 1977). Die Halbwertszeit des *E. coli*-bürtigen

Kohlenstoffs kann unter natürlichen Bedingungen abweichen, da die mikrobielle Aktivität temperaturabhängig ist und die Durchschnittstemperatur in einem natürlichen Boden deutlich weniger als 20°C beträgt. Der mikrobielle Kohlenstoff im Boden zählt dennoch eher zur den labilen Substanzen (Jenkinson and Rayner, 1977), da der stabile (refraktäre) Kohlenstoffpool der OBS Halbwertzeiten von > 1000 a besitzt (Haider, 1999).

Nach acht Monaten (224 d) lag noch ca. die Hälfte (44 %) des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in einer verhältnismäßig „stabilen“ Konzentration (im Vergleich der Halbwertzeit zu labilen Substanzen; 1,3 a zu 7 d) in der OBS oder in der mikrobiellen Biomasse im Boden vor. Dies entspricht etwa der Größe des stabilen Pools (48 %), der mittels des Zwei-Pool-Modells (Gleichung 2) auf der Basis der Mineralisierung berechnet wurde.

Der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff stellt somit nicht nur ein „komplexes“ Substrat, sondern eine gut verfügbare und leicht abbaubare Kohlenstoffquelle für die Bodenmikroorganismen dar. Dies wird auch durch den ableitbaren Ertragskoeffizienten bestätigt, welcher dem Quotienten aus gebildeter Zelltrockenmasse und verbrauchtem Substrat entspricht. Da der *E. coli*-Kohlenstoff als Substrat genutzt wird und der im Boden verbleibende <sup>13</sup>C theoretisch bis zu 100 % in neue Biomasse inkorporiert sein kann, ergibt sich ein Ertragskoeffizient von < 0,5. Dieser Wert entspricht einem durchschnittlichen Ertragskoeffizienten zwischen 0,3 (Chen and Strevett, 2003) und 0,6 (Chen and Strevett, 2003; Han et al., 2002) für leicht abbaubare Substrate, die durch Reinkulturen verwertet wurden.

Da die chemische Zusammensetzung aller Gram-negativen Bakterien ähnlich der von *E. coli*-Zellen ist, kann man für alle sterbenden, Gram-negativen Mikroorganismen bzw. deren Kohlenstoff einen ähnlichen Turnover bzw. eine vergleichbare Umsetzungskinetik annehmen. Die Voraussetzung dafür – eine Umsetzung durch andere Mikroorganismen bzw. ein mikrobielles Nahrungsnetz und eine sorbierende Oberfläche zur Stabilisierung der Substanzen – ist in jedem Boden gegeben. Der im Boden verbleibende Kohlenstoff eines lysierten Mikroorganismus wird dabei allerdings substanzspezifisch zwischen der lebenden mikrobiellen Biomasse und der toten organischen Substanz verteilt, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

### 4.3 Identifizierung der *E. coli*-verwertenden Bakterien und Pilze

Durch Einsatz von RNA-stable isotope probing konnte der Einbau des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in Organismen des mikrobiellen Nahrungsnetzes im Boden verfolgt werden. Dies war möglich, obwohl nur 0,2 % des organischen Kohlenstoffs im Boden als *E. coli*- $^{13}\text{C}$  zugesetzt wurden. Eine Beeinflussung der Ergebnisse der Bakterien durch eine mögliche gleiche Schwimmdichte von rRNA mit einem hohen GC-Gehalt und  $^{13}\text{C}$ -angereicherter rRNA war auszuschließen, da

- die Gefahr von GC-Effekten in rRNA-Gradienten gering ist im Vergleich zu DNA-Gradienten (Lueders et al., 2004a),
- keine systematische Anreicherung von rRNA-Molekülen mit hohem GC-Gehalt in den rRNA-Klonbibliotheken der „schweren“ Gradientenfraction nachgewiesen werden konnte (berechneter GC-Gehalt für Bakterienklone  $56,2 \pm 2,8$ ; für die Gleiter  $54,1 \pm 2,2$ ) und
- die bakteriellen Gesellschaften nach 56 d Inkubation eine verhältnismäßig gleiche Zusammensetzung zwischen der „leichten“ und „schweren“ Fraktion zeigten, was die Verteilung des  $^{13}\text{C}$  in der indigenen mikrobiellen Biomasse beweist und das Auftreten von GC-Effekten als vernachlässigbar einstuft.

Zudem sind alle Mikroorganismen, die in diesem Experiment nachgewiesen wurden (außer *E. coli*), auch Mitglieder der indigenen, mikrobiellen Gemeinschaft des nativen Bodens. Die identifizierten Organismen assimilierten den  $^{13}\text{C}$  der zugesetzten, sterbenden *E. coli*-Biomasse. Folglich stellen diese Mikroorganismen die primären Konsumenten oder Prädatoren im Boden dar, die auf sterbenden Zellen Gram-negativer Biomasse gedeihen.

#### 4.3.1 Gleitende Bakterien

Zu Beginn des Experimentes war das terminale Restriktionsfragment (T-RF), das für die *E. coli*-16S-rRNA-Gene charakteristisch ist, eindeutig in der „schweren“ rRNA-Fraktion nachweisbar und dominant. Dies spiegelt die Zugabe der  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen zum Boden wider und deckt sich mit dem Ergebnis der PLFS-Analyse. Nach einer Woche nimmt die Dominanz des *E. coli*-T-RF-Peaks ab. Währenddessen etabliert sich im Boden eine diverse mikrobielle Gesellschaft, die mehrere, für die „schwere“ rRNA-Fraktion spezifische T-RF-Peaks aufweist. Folglich sind die indigenen Populationen, die diese T-RF bilden, spezifische Konsumenten des *E. coli*-

bürtigen  $^{13}\text{C}$ . Sie wurden als Spezies der *Myxococcales*, der *Xanthomonadaceae* und der *Bacteroidetes* identifiziert. Unter den identifizierten Mikroorganismen ist die Fähigkeit zu gleitender Bewegung deutlich ausgeprägt (McBride, 2001). Viele Mitglieder dieser Bakterienordnungen wurden bereits als Mikroprädatoren beschrieben, die die Fähigkeit zur aktiven Lyse ihrer lebenden, bakteriellen Beute aufweisen (Reichenbach, 1992a;b;c). Trotzdem scheinen sie eine organotrophe Lebensweise zu besitzen und durch verschiedenen Exoenzyme aktiv Biomakromoleküle abzubauen. Von den Mitgliedern dieser Ordnungen wird bereits früher vermutet, dass sie beim Umsatz der Biomasse und anderer labiler, organischer Materialien im Ökosystem Boden eine Schlüsselrolle spielen (Reichenbach, 1999), obwohl dafür bis heute direkte oder kultivierungsabhängige Beweise ausblieben.

Aufgrund der reinen 16S-rRNA-Sequenzen der Klone ist es nicht direkt möglich auf funktionelle Eigenschaften wie das Gleiten zu schließen. Allerdings kann man von verschiedenen Szenarien ausgehen, die die spezifische und direkte Beteiligung der drei Bakterienordnungen beim Abbau der  $^{13}\text{C}$ -markierten Biomasse erklären könnten. Eine Erklärung wäre, dass die Mitglieder der drei bakteriellen Ordnungen auf die bevorzugte Aufnahme und die effektive Umsetzung von Biomassekomponenten (z.B. Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren) spezialisiert sind. Dadurch würden sie sich hinsichtlich der Umsetzung dieser Substratquelle gegenüber anderen Bodenbakterien durchsetzen, was, bezogen auf die  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen als Substrat, zu einem verstärkten Einbau des  $^{13}\text{C}$ -Markers in die Biomasse dieser Mikroorganismen führen würde. Ein Beweis für solch eine Spezialisierung ist allerdings in der Literatur noch unerwähnt. Demgegenüber könnte eine gemeinsame, funktionelle Eigenschaft diese Mikroorganismen mit dem bevorzugten Zugriff (Prädation) auf das Substrat (*E. coli*-Zellen) ausstatten, so dass der notwendige, kompetitive Vorteil gegenüber anderen Organismen die drei Linien trotz ihrer phylogenetischen Diversität zu einer ökologischen Gruppe vereinigen würde. Die Mobilität im Boden, insbesondere die Gleitfähigkeit, stellt eine solche Eigenschaft dar. Diese Bakterien können dadurch mit höherer Wahrscheinlichkeit – nach aktiver Lyse der zugesetzten,  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen oder durch Abbau der abgestorbenen Zellen – selektiv den  $^{13}\text{C}$  des zugesetzten, organischen Zellmaterials in ihre Biomasse einbauen. Folglich kommt ihnen eine Schlüsselrolle beim Einbau

leicht abbaubarer, organischer Substanzen ins mikrobielle Nahrungsnetz und letztendlich in die tote OBS zu.

Zu späteren Zeitpunkten der Inkubation (zwei bis acht Wochen) weist das T-RFLP-Muster der „schweren“ und „leichten“ rRNA-Fraktionen eine zunehmende Ähnlichkeit auf. Dies impliziert eine fortschreitende Verteilung des  $^{13}\text{C}$  in der gesamten mikrobiellen Gesellschaft. Die Verdünnung und Verteilung des  $^{13}\text{C}$  in der mikrobiellen Biomasse verhindert eine Identifizierung potentieller Sekundärkonsumenten des Substrates *E. coli*, z.B. via Sequenzanalyse der „schweren“ rRNA späterer Probenahmen. Offensichtlich sind aber viele indigene Bodenmikroorganismen fähig Kohlenstoff zu verwerten, der von anderen Organismen ausgeschieden oder nach deren Zelltod freigesetzt wird. Allerdings gibt es Unterschiede in der Geschwindigkeit der Verwertung. Die Gründe dafür sind die unterschiedliche metabolische Aktivität der Bodenmikroorganismen und die unterschiedliche Bioverfügbarkeit eines Substrates für verschiedene Mikroorganismen. Beispielsweise wird es für einen unbeweglichen Mikroorganismus ein Problem darstellen, ein nicht-diffusibles, komplexes Substrat im Boden zu erreichen.

#### 4.3.2 Pilze

Im Gegensatz zu den Bakterien konnte die Integration des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in die Pilzbiomasse nicht eindeutig belegt werden. Allerdings zeigten *Petriella*-verwandte Pilze eine sehr schnelle Reaktion auf die Zugabe der *E. coli*-Biomasse zum Boden. Bereits eine Stunde nach Inokulation des Bodens war eine Steigerung ihrer rRNA-Konzentration zu beobachten, was die sehr reaktive und dynamische Rolle der Pilze beim Abbau verfügbarer Biomasse im Boden veranschaulicht. Die *Microascaceae* sind meist opportunistische Pathogene (Summerbell et al., 1989), über deren ökologische Funktion in natürlichen Habitaten wenig bekannt ist (April et al., 1998). Wie die Bakterien durch ihre Gleitfähigkeit, könnten sich die Pilze durch ihr Hyphenwachstum einen Vorteil hinsichtlich der Erschließung von Substrates (in diesem Fall *E. coli*) verschaffen. Der experimentelle Beweis für die Verwertung des *E. coli*-Kohlenstoffs durch die Pilze bleibt allerdings aus, da zum einen die Pilz-rRNA auch im Kontrollboden mit unmarkierten *E. coli*-Zellen „schwerer“ ist als die bakterielle rRNA. Zum anderen führt die Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat (*E. coli*-Zellen) zu keiner Steigerung der Schwimmdichte der Pilz-rRNA. Im

Widerspruch dazu ergaben RNA-SIP-Untersuchungen mit unmarkierter *Fusarium* sp.-rRNA Schwimmdichten, die mit denen unmarkierter bakterieller rRNA vergleichbar sind (Lueders et al., 2004a). Zudem wurden Verschiebungen in den rRNA-Dichtegradienten der Pilzbiomasse nach einer  $^{13}\text{C}$ -Markierung beobachtet (Lueders et al., 2004b). Der Grund für die „seltsamen“ Effekte der Pilz-RNA des beimpften Bodens in der Dichtegradientenzentrifugation bleibt allerdings unklar. Es scheint, dass die gesamte, indigene Pilzgesellschaft durch die *E. coli*-Substanzen stimuliert wird, insbesondere die *Microascaceae* und die *Chaetomiaceae*. Trotzdem zeigen sie keinen Einbau des  $^{13}\text{C}$ -Markers, der einen eindeutigen Unterschied zur Kontrolle aufweist.

Im Allgemeinen verstoffwechseln Pilze wie Bakterien tote Biomasse. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch indigene Bakterien bereits nach einer Stunde „schwere“ rRNA gebildet hatten, die jedoch in der T-RFLP-Analyse aufgrund der sehr großen Menge „schwerer“ *E. coli*-rRNA zu diesem Zeitpunkt überdeckt wurden. Die Analyse erlaubte aber die Identifizierung der Organismen, die den Kohlenstoff toter mikrobieller Biomasse als erste verwerten und so die Schlüsselposition bei der Festlegung und Verteilung des Kohlenstoffs in die lebende mikrobielle Biomasse und die tote OBS einnehmen.

#### **4.4 Transformation des Biomasse-Kohlenstoffs und dessen Verteilung zwischen mikrobieller Biomasse und toter OBS**

##### *4.4.1 Fettsäurekohlenstoff*

###### *a) Mineralisierung und Einbau in die indigene Biomasse*

Fettsäuren sind im Allgemeinen ein leicht und ubiquitär abbaubares Substrat. So werden auch – zumindest teilweise – die *E. coli*-bürtigen Fettsäuren der sterbenden  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Population im Boden durch die indigenen Mikroorganismen verwertet. Dies zeigt sich während der achtmonatigen Inkubation

- I. zum einen an der Änderung des PLFS-Musters und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den PLFS, was eine Veränderung der Zusammensetzung der Bodenflora demonstriert, und
- II. zum anderen an der Abnahme der Menge und des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes der Fettsäuren im Boden, was auf die Verstoffwechslung des *E. coli*-Kohlenstoffs durch die indigene Biomasse zurückzuführen ist.

Zu Beginn der Inkubation sind die Fettsäuren mit der größten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung *E. coli*-spezifische Fettsäuren (vergleiche Punkt I), wie das PLFS-Muster des Stammes in Übereinstimmung mit der Literatur (Zelles, 1997) belegt. Zudem entspricht die Menge an zusätzlichem  $^{13}\text{C}$  in den Fraktionen der t-FS und PLFS der dem Boden zugeführten Fettsäuremenge der *E. coli*-Zellen (nach Green and Scow, 2000; vergleiche 3.4.1). Während der Inkubation nimmt die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der *E. coli*-typischen PLFS ab, wobei ein gleichmäßiger Einbau des  $^{13}\text{C}$  in eine Vielzahl gesättigter, ungesättigter und verzweigter PLFS zu beobachten ist (durchschnittlich 4 atom%  $^{13}\text{C}$  pro Fettsäure). Diese Musterverschiebung zeigt, dass der *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$  durch Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Actinomyceten (DeGroot et al., 2005; Vestal and White, 1989; siehe 3.4.1) verwertet wird, was wiederum die Komplexität des mikrobiellen Nahrungsnetzes darlegt (vergleiche 4.3). Neben der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den *E. coli*-typischen PLFS nimmt auch die Konzentration der *E. coli*-typischen PLFS an sich ab, mit Ausnahme von 16:0. Diese Fettsäure ist im gesamten Organismenreich ubiquitär (Zelles, 1997) und wird daher auch von anderen Mikroorganismen im Boden gebildet. Da der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt dieser Fettsäure sinkt, müssen für die Synthese alternative Kohlenstoffquellen zur *E. coli*-Biomasse verwendet werden.

Die Verwertung des *E. coli*-bürtigen Fettsäurekohlenstoffs durch die Bodenflora zeigt einen zwei-phasigen Verlauf (vergleiche Punkt II). Während der ersten Phase (28 d) dominiert die Metabolisierung des *E. coli*-bürtigen Fettsäurekohlenstoffs. In diesem Zeitraum sterben mehr als 99 % der *E. coli*-Zellen (siehe 4.1) und stellen so ein leicht zugängliches Substrat dar, das durch eine zunehmende Anzahl indigener Mikroorganismen (Lueders et al., 2006; siehe 4.3) verstoffwechselt wird. Der *E. coli*-bürtige Fettsäurekohlenstoff ( $^{13}\text{C}$ -markierte t-FS) zeigt im Boden in diesem Zeitraum eine Abnahme um 70 % mit einer Halbwertszeit von 4,7 d und in der PLFS-Fraktion der lebenden Mikroorganismen eine Abnahme um 55 % mit einer Halbwertszeit von 2,7 d. Diese Werte veranschaulichen das Ausmaß der Metabolisierung sowie die Schnelligkeit und Effizienz der indigenen Biomasse bei der Metabolisierung der *E. coli*-Fettsäuren. In einem vergleichbar aufgebauten System, das den Abbau der Fettsäuren von Algen in Sedimenten untersuchte, wurden gemittelte Abbaukonstanten von  $0,187 - 0,135 \text{ d}^{-1}$  nachgewiesen (Ding and Sun, 2005). Die entsprechenden Halbwertszeiten von 3,7 – 5,1 d decken sich mit den Werten der

*E. coli*-Fettsäuren und bestätigen den schnellen Abbau von Biomassefettsäuren innerhalb weniger Tage bis Wochen.

Die Halbwertszeiten der beiden *E. coli*-Fettsäurefraktionen in der ersten Phase sind geringer als die Halbwertszeit des Gesamt- $^{13}\text{C}$  von *E. coli* (7 d; Siehe 4.2), was die gute Verwertbarkeit der *E. coli*-Fettsäuren belegt. Die kürzere Halbwertszeit des *E. coli*-Kohlenstoffs in den lebenden Zellen (PLFS) deutet dabei auf eine bessere Bioverfügbarkeit der Fettsäuren in den sterbenden *E. coli*-Zellen gegenüber den freien Fettsäuren in der OBS.

Die Metabolisierung des leicht verfügbaren *E. coli*-Fettsäurekohlenstoffs in das mikrobielle Nahrungsnetz des Bodens ist aber nur eine vorübergehende Erscheinung. Da 99 % der *E. coli*-Zellen nach dem ersten Monat tot sind und sich in Folge der mikrobiellen Aktivität ihre Biomassekomponenten erschöpfen, verlangsamen sich die Abnahmeraten des  $^{13}\text{C}$  der Fettsäuren. Dieser Verlauf wurde auch für reine Lipide im Boden (Tollefson and McKercher, 1983) und für Algenbürtige Fettsäuren (Ding and Sun, 2005) beobachtet. Die Halbwertszeit des in den PLFS stabilisierten *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  zeigt sich in der zweiten Phase (nach Tag 28) und beträgt 0,47 a. Die Halbwertszeit in den t-FS beläuft sich auf 2,15 a. Untersuchungen in Sedimentproben zeigten Abbauraten von Fettsäuren zwischen  $2,56 - 1,46 \text{ a}^{-1}$  (Sun et al., 2000). Die resultierenden Halbwertszeiten der Sediment-Fettsäuren von 0,27 – 0,47 a zeigen eine Übereinstimmung mit der Halbwertszeit des PLFS-Kohlenstoffs im mit *E. coli*-Zellen inkubierten Boden. Der Unterschied zu den t-FS liegt wahrscheinlich in der unterschiedlich starken Stabilisierung der Fettsäuren aufgrund der Zusammensetzung und Milieubedingungen des Sedimentes und des Bodens.

Die längere Halbwertszeit der PLFS-Fraktion in der zweiten Phase repräsentiert die langsame  $^{13}\text{C}$ -Metabolisierung der PLFS der lebenden indigenen Biomasse des Bodens. Der kontinuierliche Ab- und Aufbau dieser Cytoplasmamembran-Fettsäuren innerhalb der mikrobiellen Biomasse führt zu einer gleichmäßigen Verteilung des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes und zu einer kontinuierlichen Abnahme des  $^{13}\text{C}$  in den PLFS. Letzteres ist auf den Einbau des  $^{13}\text{C}$  in andere Substanzen und die Emission als  $^{13}\text{CO}_2$  (vergleiche 4.2.) zurückzuführen. Da die Gesamtmenge an PLFS während der zweiten Phase konstant bleibt (vergleiche 3.4.1), impliziert der sinkende  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der PLFS eine Neusynthese

von PLFS, die den Kohlenstoffverlust durch Mineralisierungsprozesse ausgleicht. Die Synthesen finden wahrscheinlich besonders stark während Zellteilungen statt. Da die PLFS-Menge proportional zur Menge der Bodenbiomasse ist, entspricht der reziproke Wert der Halbwertszeit einer Näherung der Wachstumsrate der indigenen Biomasse des Bodens im Experiment (siehe 3.4.1). Sie beträgt  $2,1 \text{ a}^{-1}$  und stimmt mit den Literaturwerten von  $1 - 2 \text{ a}^{-1}$  (Kästner, 2000) und  $2,5 \text{ a}^{-1}$  (Schink, 1999) überein. Aufgrund des biologischen Umsatzes sinkt der Gehalt an *E. coli*-bürtigem  $^{13}\text{C}$  in der mikrobiellen Biomasse des Bodens kontinuierlich. Nach 224 d Inkubation ist die Menge des *E.coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den PLFS auf 20 % der Ausgangsmenge gesunken, dennoch repräsentieren sie zu Inkubationsende 45 % des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in den gesamten Fettsäuren (t-FS) des Bodens. D.h. 45 % des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in Fettsäuren sind in der lebenden mikrobiellen Biomasse gebunden.

### *b) Stabilisierung in der toten OBS*

Die Stabilisierung mikrobieller Fettsäuren in der toten OBS zeigt sich bereits am unbeimpften Boden (Leerwert). Nur 25 % der kurzkettigen t-FS stellten PLFS lebender Mikroorganismen dar. Folglich waren im Leerwertboden zu Beginn der Inkubation 75 % der kurzkettigen t-FS der toten OBS zugehörig. Dieser Prozentsatz wird natürlich von der Bodenzusammensetzung und Umweltbedingungen beeinflusst. So wiesen Drenovsky et al. (2004) für Böden unter sieben verschiedenen landwirtschaftlichen Anbauvarianten nach, dass ca. 15 % der t-FS PLFS waren. Ein Großteil der Fettsäuren im Boden gehört demnach zur toten OBS und ist gegenüber Fettsäuren aus lebender Biomasse stark stabilisiert. Dies zeigte sich an der Abnahme der Fettsäuremengen auf eine Konzentration, die unabhängig von der Zugabe der *E. coli*-Zellen war. Durch die Stimulation der mikrobiellen Aktivität der indigenen Biomasse durch die *E. coli*-Biomasse als Substrat (vergleiche 4.3) fand kein verstärkter Abbau der stabilisierten Fettsäuren statt. In den beimpften Böden wurde lediglich die Menge an Fettsäuren mehr als im unbeimpften Boden verstoffwechselt, die durch die *E. coli*-Zellen zugesetzt wurde.

## Diskussion

---

Spezifische Beweise für die Stabilisierung mikrobieller Fettsäuren in der toten OBS ergaben sich aus diesem Inkubationsexperiment. So zeigte sich,

- I. dass *E. coli*-bürtige Fettsäurefragmente im Boden vorliegen, die nicht bzw. nur in geringen Mengen in der PLFS-Fraktion lebender Zellen nachweisbar sind,
- II. dass der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff in der t-FS-Fraktion wesentlich stabiler vorliegt als in der PLFS-Fraktion der Biomasse, in der der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff relativ schnell abnimmt und
- III. dass nur ein Teil des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den Fettsäuren der PLFS-Fraktion lebender Zellen vorlag.

Während der Inkubation fanden aufgrund der mikrobiellen Aktivität Änderungen in der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der t-FS statt (vergleiche Punkt I). Diese Änderungen weisen zum Teil Ähnlichkeiten zu den Musterverschiebungen der PLFS auf. Die Gründe dafür sind, dass die Analyse der t-FS auch die PLFS erfasst und dass Fettsäuren der toten OBS durch Mikroorganismen gebildet worden sein können. So nahm die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von 16:0 ab und von den meisten anderen gesättigten Fettsäuren (12:0 ... 20:0) sowie i15:0 und a15:0 zu (Tab. 16, S. 71). Die Änderungen sind allerdings im Vergleich zu denen der PLFS weniger signifikant, da der Pool der t-FS die vierfache Größe des PLFS-Pools aufweist und inerte ist. In den t-FS ist ein signifikanter Anstieg des  $^{13}\text{C}$  in den Fettsäuren 12:0 und 14:0 zu verzeichnen, welche nicht signifikant in der PLFS-Fraktion lebender Zellen nachweisbar waren. Folglich stellen diese Fettsäuren Abbauprodukte der *E. coli*-bürtigen Fettsäuren dar, die somit die direkte stoffliche Beteiligung der mikrobiellen Biomasse an der Bildung der OBS belegen.

Nachdem der  $^{13}\text{C}$  der *E. coli*-Biomasse durch die indigene Biomasse größtenteils verstoffwechselt wurde (nach 28 d), liegt also ein Teil des  $^{13}\text{C}$  stabilisiert in Fettsäuren der OBS vor. Die Halbwertszeit des  $^{13}\text{C}$  in der t-FS-Fraktion beträgt 2,15 a. Da diese Halbwertszeit fünfmal größer ist als die des  $^{13}\text{C}$  in den PLFS der lebenden Mikroorganismen und doppelt so groß wie die des *E. coli*-bürtigen Gesamtkohlenstoffs im Boden während dieser zweiten Phase, veranschaulicht sie die starke Stabilisierung des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in Fettsäuren der toten OBS (vergleiche Punkt II). Aus dem Unterschied zwischen den Halbwertszeiten des *E. coli*- $^{13}\text{C}$  in den PLFS und den t-FS (Tab. 15, S. 67) ist zu schließen, dass sich der verfügbare *E. coli*-bürtige Kohlenstoff in den lebenden Mikroorganismen relativ

schnell erschöpft, da die Größe der mikrobiellen Gesellschaft bzw. des PLFS-Pools nach dem ersten Monat konstant bleibt. Dagegen wird er in nicht-biologisch-gebundenen Fettsäuren entsprechend länger im Boden vorliegen. Der Grund für die Festlegung und Protektion der mikrobiellen Fettsäuren in der OBS ist die Stabilisierung des Materials durch Wechselwirkungen mit Bodenkomponenten (Krull et al., 2003; von Lützow et al., 2006). Nach 224 d Inkubation ist die Menge *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den t-FS auf 25 % der Ausgangsmenge gesunken. Von diesen 25 % sind ca. 55 % in der toten OBS stabilisiert (vergleiche Punkt III). Damit ist eine *E. coli*-bürtige  $^{13}\text{C}$ -Menge in Fettsäuren der OBS stabilisiert, die etwa 15 % des anfänglichen Fettsäurekohlenstoffs der *E. coli*-Zellen entspricht.

#### 4.4.2 Aminosäurekohlenstoff

Die Aminosäuren, welche nach saurer Hydrolyse aus dem Boden bzw. der mikrobiellen Biomasse extrahiert wurden, repräsentieren zu einem großen Teil Proteine bzw. Peptide und weniger freie Aminosäuren. So sind Proteine ein nachgewiesener Bestandteil der toten OBS (Kögel-Knabner, 2002), die Halbwertszeit freier Aminosäuren im Boden ist allerdings kurz ( $1,7 \pm 0,6$  h bei  $18^\circ\text{C}$ ; Jones, 1999). Der Abbau und die Synthese der Peptide sind universell für alle Lebewesen. Aminosäuren können von Mikroorganismen abgebaut und synthetisiert werden, sie können allerdings auch in unveränderter Form aufgenommen und zur Proteinbiosynthese verwendet werden. Dass dieser Fall für den mit  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen inkubierten Boden zutrifft, zeigt sich an der konstanten Isotopenzusammensetzung aller mikrobiellen und gesamten Aminosäuren im Boden während der Inkubation mit Ausnahme der ersten Woche (siehe Ergebnisse). In der ersten Woche war eine leichte Abnahme des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes ( $< 0,7$  atom%) der Aminosäuren zu verzeichnen. Die schnelle Lyse der Zellen und der Abbau der Peptide zu Aminosäuren im Boden, z.B. durch Proteasen (Leprince and Quiquampoix, 1996; Zhang et al., 2005), können zum Vorliegen freier Aminosäuren führen. Deren geringe Stabilität im Boden (Jones, 1999; siehe oben) erklärt den leichten Abfall des  $^{13}\text{C}$ -Gehaltes in den Aminosäuren während der ersten Woche.

Die beobachtete Abnahme der mikrobiellen Aminosäuren ( $\text{AS}_{\text{mik}}$ ) verläuft in den verbleibenden 217 d der Inkubation proportional zur Abnahme der  $^{13}\text{C}$ -Menge in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$ . Da auf diese Weise jede  $\text{AS}_{\text{mik}}$  ihren  $^{13}\text{C}$ -Zusammensetzung behält, wird

impliziert, dass die Aminosäuren nicht abgebaut und resynthetisiert werden. Zudem bleibt das Muster der  $AS_{mik}$  während der Inkubation mehr oder weniger konstant, nur die Aminosäuremengen nehmen ab. Dies impliziert, dass keine Aminosäure bevorzugt, sondern alle in einem festen Verhältnis zueinander durch die Bodenflora verwertet werden. Das bedeutet, dass ganze Peptide von den indigenen Mikroorganismen verwertet oder in der toten OBS stabilisiert werden müssen. Der mikrobielle Umsatz ganzer Peptide wird durch die Beobachtungen von Fan (2004) gestützt. Nach einmaliger Zugabe von  $^{13}C$ -markierter Glucose zu Boden werden entweder vollständig  $^{13}C$ -markierte oder vollständig unmarkierte mikrobielle Peptide in Huminstoffe eingebaut. Da selbst nach achtmonatiger Inkubation eine vernachlässigbare Durchmischung  $^{13}C$ -markierter und unmarkierter Aminosäuren in den Peptiden vorlag, können nur ganze Peptide von den Mikroorganismen verwertet werden, um neue Peptide zu synthetisieren. Diese Beobachtung unterstreicht gleichzeitig die Stabilisierung von Peptiden in der Huminstofffraktion. Die Bindung und Stabilisierung von Proteinen an Bodenkomponenten wurde bereits häufig belegt (Knicker and Hatcher, 1997; Kögel-Knabner, 2002; Leprince and Quiquampoix, 1996). Insgesamt liegen mehr als 80 % des organischen Stickstoffs des Bodens in Amidbindungen von Peptiden vor (Knicker et al., 1993). Der hier detektierte Umsatz der Aminosäuren durch die indigene Biomasse bzw. deren Stabilisierung in der toten OBS entspricht also dem bzw. der von Peptiden.

Die Stabilisierung von Aminosäuren bzw. Peptiden in der toten OBS scheint allerdings im Vergleich zu den Fettsäuren weitaus stärker und umfassender zu sein. Ein erster Hinweis darauf ist, dass bereits zu Beginn der Inkubation nur ca. 10 % der gesamten Aminosäuren ( $AS_{total}$ ) im Boden (Leerwert) in der mikrobiellen Biomasse ( $AS_{mik}$ ) lokalisiert sind. Dieser Prozentsatz ist weit geringer als bei den Fettsäuren und deutet auf eine stärkere Stabilisierung (> 90 %) von Aminosäuren bzw. Peptiden in der toten OBS hin, z.B. durch Adsorption an Tonmineralen (Ding and Henrichs, 2002).

### *a) Einbau in die indigene Biomasse*

Die Metabolisierung der *E. coli*-Biomasse durch die indigene Biomasse des Bodens während des ersten Monats der Inkubation kann in Übereinstimmung mit den Fettsäuren (vergleiche 4.4.1) und dem gesamten *E. coli*- $^{13}C$  (vergleiche 4.2) auch an

den mikrobiellen Aminosäuren verfolgt werden. Die Menge der *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren im Boden des  $^{13}\text{C}$ -Ansatzes ( $9 \mu\text{g g}^{-1}$  Boden) entspricht zu Inkubationsbeginn einer Wiederfindung von 50 % der Aminosäuren der zugegebenen Biomasse ( $36 \mu\text{g g}^{-1}$  Boden), wenn man von einem durchschnittlichen Proteinanteil von 50 % der Biomasse (TM; Schlegel, 1992) ausgeht. Die Mengen der unmarkierten Gesamtaminosäuren im Boden sind für einen landwirtschaftlich genutzten Boden durchschnittlich (Scheller, 1996).

Die Mengen an  $^{13}\text{C}$  in der  $\text{AS}_{\text{mik}}$ -Fraktion zeigen in allen drei Bodenansätzen als Reaktion auf veränderte Umweltparameter ( $20^\circ\text{C}$ ; 60 % WHK; siehe 4.2.) eine biphasige Abnahme. Da der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der Aminosäuren konstant bleibt, entspricht diese Abnahme der Abnahme der  $\text{AS}_{\text{mik}}$  bzw. der Peptide der mikrobiellen Biomasse (siehe oben). Dies impliziert eine Abnahme der mikrobiellen Biomasse in den inkubierten Böden, der sich weitestgehend auf den ersten Monat beschränkt. In diesem Zeitraum sterben auch 99 % der *E. coli*-Biomasse ab (vergleiche 4.1). Die Aminosäuren bzw. Peptide werden dabei schnell aus der sterbenden *E. coli*-Biomasse freigesetzt und durch die indigenen Mikroorganismen metabolisiert. Dies wird durch die Abnahme der durch *E. coli* zugesetzten  $^{13}\text{C}$ -Menge in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$  im  $^{13}\text{C}$ -Ansatz veranschaulicht, die innerhalb der ersten 28 d mit einer Halbwertszeit von 4,3 d auf ca. 25 % der Ausgangsmenge sinkt. Die Halbwertszeit ist mit der Umsetzung des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den Gesamtfettsäuren und des Gesamt- $^{13}\text{C}$  während der ersten Phase vergleichbar. Sie ist allerdings langsamer als die des  $^{13}\text{C}$  in den PLFS, was auf einen langsameren mikrobiellen Abbau der in den *E. coli*-Zellen oder Zellfragmenten gebundenen  $\text{AS}_{\text{mik}}$  deutet. Der Grund dafür liegt in der Energiebilanz. So ist es zum einen energieeffizienter den Abbau von Zuckern und Fettsäuren gegenüber dem Abbau von Proteinen zu bevorzugen, wie es unter Nährstofflimitation innerhalb bakterieller Zellen zu beobachten ist (Hood et al., 1986; Vrede et al., 2002). Zum anderen wird für die Aufnahme von Aminosäuren zusätzliche Energie benötigt (Vinolas et al., 2001). Folglich werden von einem Mikroorganismus unter Nährstofflimitierenden Bedingungen, wie sie im Boden herrschen, erst Kohlenhydrate oder Fettsäuren und später Peptide verwertet. Ebenso kann dies auch auf den Schutz von Peptiden innerhalb ihrer zellularen Umgebung zurückzuführen sein.

Nach den ersten 28 Tagen (zweite Phase) ist die Abnahmerate des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$  wesentlich geringer, da die sterbende *E. coli*-Biomasse von der indigenen Mikroflora vollständig umgesetzt wurde. Dabei wurden etwa 25 % der anfänglichen Menge des  $^{13}\text{C}$  in den *E. coli*-Aminosäuren wahrscheinlich als ganze *E. coli*-Aminosäuren von der indigenen Biomasse assimiliert. Die Halbwertszeit des  $^{13}\text{C}$  in den  $\text{AS}_{\text{mik}}$  der indigenen Biomasse beträgt zwischen dem zweiten und achten Monat der Inkubation 2,79 a, wodurch sich die Menge des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den mikrobiellen Aminosäuren bis zum Ende der Inkubation nicht signifikant ändert. Die Halbwertszeit stimmt mit der von mikrobiellen Kohlenstoff im Boden überein (Jenkinson and Rayner, 1977) und zeigt, dass der *E. coli*-bürtige mikrobielle Aminosäurekohlenstoff in den Peptiden des indigenen Nahrungsnetzes des Bodens relativ langsam umgesetzt wird.

### *b) Stabilisierung in der toten OBS*

Die Stabilisierung der mikrobiellen Aminosäuren bzw. Peptide in der toten OBS zeigt sich:

- I. an der Differenz der in Aminosäuren gebundenen *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$ -Menge zu der in der indigenen Biomasse,
- II. an der Abnahme der Peptide im unbeimpften Boden im Vergleich zu den beimpften Böden und
- III. am „refraktären“ Charakter der *E. coli*-bürtigen Peptidreste im Boden.

Während der achtmonatigen Inkubationszeit bleibt die Menge der *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren im Boden ( $^{13}\text{C}\text{-AS}_{\text{total}}$ ) konstant während die Menge  $^{13}\text{C}$ -markierter Aminosäuren in der indigenen mikrobiellen Biomasse ( $^{13}\text{C}\text{-AS}_{\text{mik}}$ ) nach dem Umsatz der *E. coli*-Biomasse (Tag 28 – 224) konstant ca. 25 % der Ausgangsmenge beträgt (vergleiche Punkt I). Die daraus resultierende Differenz *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  der Aminosäuren von 75 % stellt eindeutig *E. coli*-bürtige Aminosäuren dar, welche in der toten OBS stabilisiert sein müssen. Diese Festlegung geschieht in Form von Peptidresten (Fan et al., 2004; Knicker et al., 1993; Kögel-Knabner, 2002; Leprince and Quiquampoix, 1996; vergleiche oben).

Im Vergleich zur nicht signifikanten Abnahme der Gesamtaminosäuren ( $\text{AS}_{\text{total}}$ ) in den beimpften Böden ist im unbeimpften Boden, eine Abnahme der Peptide im Boden zu verzeichnen (vergleiche Punkt II). Die daraus resultierende Differenz ließe

sich auf ein Wachstum der indigenen Biomasse zurückführen. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da die Mengen mikrobieller PLFS (vergleiche 4.4.1) und mikrobieller Aminosäuren im Boden nicht zunehmen. Somit stellt die Stabilisierung der Peptide mit *E. coli*-bürtigen Aminosäuren im Boden den wahrscheinlicheren Grund dar, insbesondere da die Mikroorganismen für die Aufnahme der AS im Gegensatz zur Umsetzung von Fettsäuren und Kohlenhydraten Energie aufwenden müßten (Vinolas et al., 2001). Im unbeimpften Boden werden also alle Nährstoffquellen (auch die Aminosäuren) von der indigenen mikrobiellen Biomasse unter den gegebenen Bedingungen (Nährstofflimitation, 20°C) verstoffwechselt. In den beimpften Böden wurden durch die Zugabe der *E. coli*-Zellen offenbar ausreichend Nährstoffe zugegeben, um eine Umsetzung der Peptidreste der OBS durch die Mikroflora zu verhindern.

Die konstante Größe der  $AS_{\text{total}}$ -Fraktion impliziert, dass der  $AS_{\text{total}}-^{13}\text{C}$  wesentlich stärker im Boden stabilisiert wird als die Menge *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den Fettsäuren oder der *E. coli*-bürtige Gesamt- $^{13}\text{C}$  im Boden. Das deutet daraufhin, dass alle Peptide, die nicht in der mikrobiellen Biomasse gebunden sind, stabilisiert in der toten OBS vorliegen. Da im zeitlichen Rahmen der Inkubation keine signifikante Abnahme der Bodenaminosäuren beobachtet werden konnte, ist der *E. coli*-Kohlenstoff der Aminosäuren im Boden potentiell „refraktär“, wie bereits durch Fan (2004) postuliert wurde. Dieser Stabilisierung von Aminosäuren kann eine Reihe möglicher Schutzmechanismen zu Grunde liegen:

- so können Proteine wie Aminosäuren schnell und stabil an Ton sorbieren, was größtenteils auf ionischen Wechselwirkungen beruht (Ding and Henrichs, 2002; Ladd, 1985; Loll and Bollag, 1983; von Lützwow et al., 2006),
- ganze Proteine können durch Einkapselung (Zang et al., 2000) oder Wasserstoffbrücken (Schulten and Schnitzer, 1997) im Boden stabilisiert werden,
- Proteine werden durch van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen im Boden stabilisiert (von Lützwow et al., 2006) und
- Aminosäuren werden durch Wechselwirkungen mit anderer OBS oder durch Einkapselung in der OBS stabilisiert (Knicker and Hatcher, 1997).

#### 4.5 Funktionalität der in der OBS festgelegten Substanz am Beispiel der Marker-DNA

Im Vergleich zu den *E. coli*-Zellen sind deren Komponenten länger in biologisch aktiver Form im Boden nachweisbar. So konnte replizierbare *E. coli*-DNA (*lux*-Gen) noch etwa sechs Monate (168 d) nach der letzten Detektion lebender *E. coli*-Zellen (Ende des Inkubationsversuches) und damit mehr als doppelt so lang durch PCR-Amplifikation nachgewiesen werden. Die Menge an DNA entsprach dabei der DNA von mehr als 1000 Zellen g<sup>-1</sup> Boden. Die so nach acht Monaten (224 d) nachgewiesene Menge ist zwar gering im Vergleich zum Ausgangswert, allerdings impliziert diese Tatsache, dass mikrobielle Substanzen in biologisch aktiver (amplifizierbarer) und unveränderter Form im Boden festgelegt werden. Diese hohe Persistenz der DNA kann (1) durch das Vorliegen dormanter *E. coli*-Zellen, (2) durch die Stabilisierung der freien DNA an Bodenkomponenten und/oder (3) durch Transformation des *lux*-Plasmids erklärt werden. Ein dormantes Stadium der *E. coli*-Zellen konnte, wie bereits im Kapitel 4.1 erläutert, ausgeschlossen werden.

Die Bindung von DNA an Bodenkomponenten wurde im Bezug auf eine Risikoabschätzung von genetisch veränderten Mikroorganismen in der Umwelt bereits häufig untersucht und beobachtet. So bindet DNA an einzelnen Bodenkomponenten wie Quarz (Lorenz and Wackernagel, 1990), Sand, Ton und Huminsäuren (Lorenz and Wackernagel, 1987; Paget and Simonet, 1994;1997). Ebenso kann sie an sterilisierten Bodenpartikeln (Paget and Simonet, 1997) und an mineralischem Umgebungsmaterial (Chamier et al., 1993) sorbieren. Die Menge an DNA im Boden zeigt dabei eine zweiphasige Abnahmekinetik (Recorbet et al., 1993). Dennoch wurde die Persistenz von DNA im Boden im Bereich von Monaten und Jahren nachgewiesen (Tab. 19), wobei die Persistenz von der Textur des Bodens abhängig ist (Romanowski et al., 1991).

Tabelle 19: Persistenz von *E. coli*-DNA im Boden.

DNA	Zeitraum der Detektion	Literatur
<i>E. coli</i> -DNA	40 d	Recorbet et al. (1993)
Plasmid-DNA	10 – 60 d	Romanowski et al. (1992)
	> 2 Monate	Romanowski et al. (1993)
	Einige Monate; < 3 a	Paget et al. (1998)
Plasmid-DNA	> 224 d	Kindler et al. (2006)

Während der Sorption der DNA bleibt zum einen die Funktionalität der DNA erhalten (Holben and Ostrom, 2000), was anschaulich an der Amplifizierbarkeit der *lux*-Gene gezeigt werden konnte, zum anderen wird sie, wenn auch nur partiell (bis 15 kbp; Paget et al., 1992), vor einem Abbau geschützt (Dell'Anno et al., 2002; Lorenz and Wackernagel, 1994; Paget et al., 1992; Paget and Simonet, 1994; Romanowski et al., 1991). Somit erklärt die Sorption die Wiederfindung der DNA nach 224 d Inkubation. Trotzdem kann eine Transformation nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Sorption von DNA deren Verfügbarkeit für kompetente Zellen nicht ausschließt (Chamier et al., 1993; Paget and Simonet, 1994; Sikorski et al., 1998). Beispielsweise wurden Transformationen an Sand- (Lorenz and Wackernagel, 1990) und Tonmaterial (Khanna and Stotzky, 1992; Paget et al., 1992) beobachtet. Die Transformationen nach Zugabe der Zellen zu Boden treten schnell auf (innerhalb von 2 d; Sorensen et al., 1999). Allerdings zeigen diese natürlich auftretenden Transformationen eine geringe Häufigkeit (Nielsen et al., 1997; Paget et al., 1998) von ca.  $10^{-6}$  Transformanten pro Donororganismus (Sorensen et al., 1999) und sind für Plasmid-DNA in einigen Fällen überhaupt nicht nachweisbar (Chamier et al., 1993). Recorbet et al. (1993) fand als einzigen Weg der Genübertragung im Boden nur die Konjugation. Der Nachweis transformierter Stämme im Boden, insbesondere die aktuelle Verteilung der Gene in VNBC-Bakterien ist allerdings auch durch kultivierungsabhängige und/oder hybridisierungsabhängige Analysen nur eingeschränkt nachweisbar (Smalla et al., 1993).

Der Stamm wurde vor der Zugabe der Zellen zum Boden laut Literatur (Sorensen et al., 1999) so vorbehandelt, dass eine Transformation unterdrückt wird. Folglich erscheint eine Transformation eher unwahrscheinlich. Eine Stabilisierung durch Sorption der DNA an Bodenkomponenten in biologisch aktiver Form ist daher die wahrscheinlichste Erklärung für die Persistenz.

#### **4.6 Das Schicksal mikrobieller Biomasse im Boden (Synthese der Daten)**

Nach dem Einbringen der *E. coli*-Zellen in den Boden beginnt das Absterben und eine schnelle, mikrobielle Verwertung der Zellen, die einerseits zu einer Festlegung der mikrobiellen Substanzen in die mikrobiellen Biomasse und andererseits zu einer Stabilisierung in der toten OBS führen.

Die in den Boden eingebrachten,  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen sterben aufgrund der limitierenden Bedingungen, die im Boden herrschen, und werden durch indigene Mikroorganismen in kürzester Zeit als Substrat erschlossen. *Microascaceae*-Pilze, die eine nahe Verwandtschaft zu *Petriella* und *Pseudallescheria* aufweisen, zeigen bereits eine Stunde nach der Inokulation eine drastische Erhöhung ihres rRNA-Gehaltes, was offensichtlich auf einer Stimulation ihrer Aktivität durch *E. coli*-bürtige Substanzen als Substrat beruht. Bakterielle Mikroprädatoren der Stämme *Myxococcales*, *Xanthomonadaceae* und *Bacteroidetes* erschließen den *E. coli*-Kohlenstoff innerhalb weniger Tage. Nach einer Woche zeigen sie eine signifikante  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in ihrer rRNA. Ob die Bakterien allerdings als Mikroprädatoren die *E. coli*-Zellen als Beute erschließen oder deren Komponenten nach der Zellyse von *E. coli* organotroph verwerten, konnte nicht differenziert werden. Diese Mikroorganismen stellen allerdings die Schlüsselrolle für den Einbau des *E. coli*-Kohlenstoffs in das mikrobielle Nahrungsnetz des Bodens dar, wie anhand der T-RFLP-Muster und der  $^{13}\text{C}$ -Inkorporation in die Phospholipidfettsäuren bereits nach acht Wochen zu erkennen ist.

Die Komponenten der *E. coli*-Biomasse werden dabei in Abhängigkeit ihrer Energieeffizienz und Zugänglichkeit unterschiedlich schnell von der indigenen Biomasse im Boden verwertet. So werden die PLFS der Cytoplasmamembran schneller durch die Bodenmikroorganismen erschlossen als die Aminosäuren der Proteine.

Nach ca. einem Monat zeigt die  $^{13}\text{C}$ -Mineralisierung eine starke Verlangsamung. Auch die Abnahme des *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  in den mikrobiellen Fettsäuren und Aminosäuren verlangsamt sich dramatisch. Während bis zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich  $^{13}\text{C}$  aus Komponenten mit einer Halbwertszeit von wenigen Tagen freigesetzt wurde, dominiert zwischen dem zweiten und achten Monat der Inkubation (zweite Phase) der Abbau eines stabileren Pools mit Halbwertszeiten von Monaten bis Jahren. Da es sich aber vor und nach diesem Zeitpunkt um die gleichen Substanzgruppen handelt – mit gleicher chemischer und biologischer Stabilität – kennzeichnet die schnelle  $^{13}\text{C}$ -Abnahme in den Biomassekomponenten und im Boden den Abbau der leicht verfügbaren *E. coli*-Biomasse durch die Bodenmikroorganismen. Die Reststrukturen der sterbenden *E. coli*-Zellen stellen also einen labilen Substanzpool für Organismen dar. Dabei kann die Verwertung der

Biomassekomponenten durch das Überleben der *E. coli*-Zellen (z.B. während Synthesen) in diesem Zeitraum limitiert werden. Die langsamere Abnahme des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in den Komponenten der Biomasse während der zweiten Phase entspricht zum einen der Metabolisierung von stabileren oder weniger verfügbaren *E. coli*-Reststrukturen. Zum anderen wird der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff durch langsame, aber kontinuierliche Ab- und Aufbauprozesse innerhalb der mikrobiellen Biomasse des Bodens recycelt und dabei nach und nach mineralisiert, was sich beispielhaft an den PLFS der mikrobiellen Cytoplasmamembran zeigte.

Nach acht Wochen fällt die Zahl der lebenden *E. coli*-Zellen im Boden unter das Detektionslimit. Allerdings ist nach achtmonatiger Inkubation noch ca. die Hälfte des *E. coli*-Kohlenstoffs im Boden nachweisbar. Dieser Kohlenstoff wird bis zu diesem Zeitpunkt substanzabhängig unterschiedlich stark mineralisiert und verteilt sich dabei ebenfalls substanzabhängig zwischen der lebenden Biomasse und der toten OBS. Die im Boden vorhandenen *E. coli*-bürtigen Fettsäuren und Aminosäuren sind z.T. durch die Zerstörung von Zellen während der Inokulierung, aber hauptsächlich durch das Absterben und die aktive Lyse von Zellen durch die Bodenmikroorganismen während der ersten Inkubationstage und -wochen in tote OBS gelangt. Der Vergleich der zeitlichen Verläufe der  $^{13}\text{C}$ -Menge in den Fettsäuren im gesamten Boden und in der lebenden, mikrobiellen Biomasse zeigt, dass nach acht Monaten der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt in den beiden Fraktionen auf annähernd den gleichen Prozentsatz gefallen ist. Der *E. coli*-bürtige Kohlenstoff verteilt sich dabei mengenmäßig etwa gleichmäßig zwischen diesen beiden Fraktionen, wobei er in den Fettsäuren der lebenden Biomasse eine viel schnellere Abnahme zeigt als in den Bodenfettsäuren. Das impliziert eine zunehmende Stabilisierung von Fettsäuren mit *E. coli*-bürtigem Kohlenstoff in der toten OBS.

Die Stabilisierung der Aminosäuren im Boden ist allerdings weitaus signifikanter. Sie nehmen in der mikrobiellen Biomasse mit einer den Fettsäuren entsprechenden Rate ab, wobei die Abnahme hauptsächlich in den ersten Wochen der Inkubation – während der Erschließung von *E. coli* als Substrat – stattfindet. Im Boden ist allerdings keine signifikante Abnahme der  $^{13}\text{C}$ -markierten Gesamt-Aminosäuremenge zu beobachten. Dies legt eine starke Stabilisierung mikrobieller Aminosäuren, vermutlich als Peptidreste, in der toten OBS nahe (ca. 75 % der *E. coli*-AS). Die im Boden verbleibende Hälfte (Abb. 16) des anfänglich zugesetzten

## Diskussion

---

*E. coli*-Kohlenstoffs wird daher hauptsächlich durch Aminosäuren bzw. Peptide repräsentiert.

Ausgehend davon,

- dass 50 % der Trockenmasse eines Bakteriums aus Proteinen und 10 % aus Lipiden besteht (Schlegel, 1992) und
- dass etwa 75 % der mikrobiellen Aminosäuren und etwa 15 % der *E. coli*-bürtigen Fettsäurekohlenstoffs in der toten OBS stabilisiert werden,

kann man schlußfolgern, dass nach acht Monaten Inkubation etwa 40 % des *E. coli*-Kohlenstoffs als Bestandteil der toten organischen Substanz im Boden vorliegen (Abb. 16). Dieser Wert stimmt gut mit der Menge des im Boden verbliebenen, *E. coli*-bürtigen  $^{13}\text{C}$  (44 %) überein (Abb. 16). Da der *E. coli*-Kohlenstoff in den Fettsäuren und Aminosäuren der toten OBS relativ stabil ist (Halbwertszeit der t-FS 2,15 a;  $\text{AS}_{\text{total}}$  womöglich refraktär), ist dies der Beweis für einen hohen mikrobiellen Beitrag zur Bildung der (refraktären) OBS. Die mikrobiellen Substanzen werden, wie anhand des *lux*-Gens nachgewiesen werden konnte, zum Teil als intakte und funktionsfähige (in diesem Fall amplifizierbare) Moleküle für unbestimmte Zeit in der toten OBS stabilisiert.

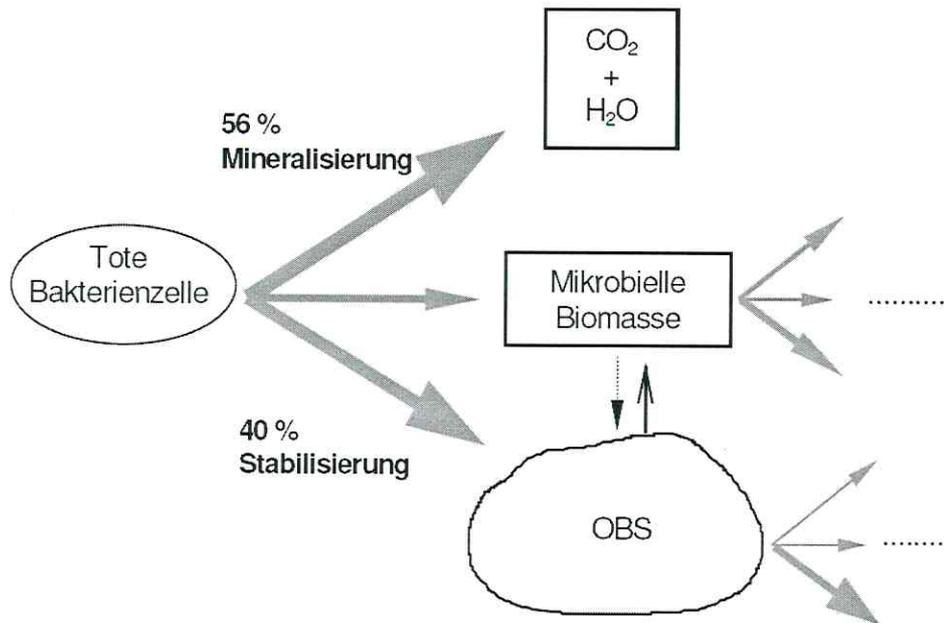


Abbildung 16: Beitrag der mikrobiellen Biomasse zur Bildung der OBS. Verteilung des Kohlenstoffs von *E. coli*-Zellen nach achtmonatiger Inkubation in Boden.

Durch die Pflanzen wird jährlich eine Menge an organischem Kohlenstoff in den Boden eingetragen, die etwa 200 % des mikrobiellen Kohlenstoffpools entspricht. Davon wird allerdings mindestens die Hälfte mineralisiert und in die mikrobielle Biomasse eingebaut. So verbleibt nach Jentkinson & Rayner (1977) nach einem Jahr nur ein Drittel des Pflanzenkohlenstoffs im Boden. Fließbach (2000) beobachtete, dass nach 177 d mit abnehmender Mineralisierungsrate 50 – 58 % des Kohlenstoffs von Stroh im Boden mineralisiert worden sind, also 42 – 50 % des Pflanzenmaterials im Boden verbleibt. Selbst Gemische aus Pflanzenresten und Klärschlamm, tierischem Mist, städtischem Abfall oder Industrieabfällen werden in 70 d in ihrer unkompostierten Form im Boden nur zu 60 – 70 % mineralisiert (Bernal et al., 1998). Folglich kann nur eine Kohlenstoffmenge, die der des mikrobiellen Pools entspricht, durch die Pflanzen in die tote OBS eingetragen werden. Unter der Annahme, dass sich die mikrobielle Biomasse im Boden mindestens zweimal pro Jahr verdoppelt (Kästner, 2000; Schink, 1999; vergleiche 3.4.1) und der Beobachtung, dass der Biomassepool im Durchschnitt eine konstante Größe aufweist, werden folglich mindestens zwei Generationen mikrobieller Biomasse pro Jahr als mikrobielle

Zellreste in den Boden eingetragen. Diese liegen nach dem Zelltod und der Erschließung der Zellreste als Substrat teilweise stabilisiert in der toten OBS vor und werden auch unter optimalen Bedingungen (20 °C; 60 % WHK) nur langsam von der Biomasse im Boden abgebaut (Halbwertszeit > 2 a). Werden von jeder mikrobiellen Generation 40 % in der toten OBS stabilisiert, ließe sich daraus schlußfolgern, dass beinahe die Hälfte des Kohlenstoffs der OBS mikrobiellen Ursprungs ist. Der eigentliche mikrobielle Beitrag zur Bildung der OBS ist eine Funktion der Zusammensetzung der mikrobiellen Gesellschaft, des Generationswechsels und verschiedener Umweltparameter. Der mikrobielle Beitrag kann also in Abhängigkeit von der Bewirtschaftung, der Bodentextur (Cools et al., 2001; Ogden et al., 2001; Topp et al., 2003), der OBS (Cools et al., 2001), der Temperatur (Cools et al., 2001; Ogden et al., 2001; Sorensen et al., 1999; Topp et al., 2003), der Feuchtigkeit (Cools et al., 2001; Ogden et al., 2001) und des jeweiligen Bakterienstammes variieren. Dabei ist unter natürlichen Bedingungen (Bodentemperatur < 20 °C, Bodenfeuchte < 60 % WHK) eher eine geringere mikrobielle Aktivität und damit ein größerer mikrobieller Beitrag zur Bildung der OBS zu vermuten.

## 5 Zusammenfassung

Die hier vorliegenden Ergebnisse geben einen Einblick in den Kohlenstoffkreislauf des Bodens, insbesondere in den Verbleib des Kohlenstoffs Gram-negativer Biomasse, über den bisher keine Daten vorlagen. Die auftretenden Prozesse – das Absterben der Zellen, die Erschließung, der Einbau und die teilweise Mineralisierung des mikrobiellen Kohlenstoffs durch die mikrobielle Biomasse sowie die substanzabhängige Verteilung und Stabilisierung biologischer Bausteine in der lebenden Biomasse und in der toten OBS – sind allgemein gültige und grundlegende Prozesse. Diese werden zwar in Abhängigkeit von den Bodencharakteristika, den Umweltbedingungen und den Mikroorganismen variieren, dennoch werden diese Prozesse generell in allen Böden zu beobachtet sein.

In dem hier untersuchten Boden wurde nach dem Tod der Gram-negativen Modellorganismen ca. die Hälfte des Kohlenstoffs mineralisiert. Die Biomasse starb zunächst aufgrund suboptimaler Lebensbedingungen im Boden und der aktiven Lyse durch bakterielle gleitende Prädatoren (*Myxococcales*, *Xanthomonadaceae* und *Bacteroidetes*). Mit dem Tod der *E. coli*-Biomasse wurde die Grundlage für den Einbau des Biomassekohlenstoffs in die Nahrungsnetze der Bodenmikroflora und die Festlegung in der toten OBS geschaffen. Energiereiche Substanzen, wie die mikrobiellen Fettsäuren werden dabei wesentlich effektiver verstoffwechselt als weniger energiehaltige Komponenten wie Proteine bzw. Aminosäuren. Letztere werden wesentlich stärker in der toten OBS stabilisiert. Nach achtmonatiger Inkubation war die Menge des *E. coli*-bürtigen Kohlenstoffs in Fettsäuren im Boden auf ca. 25 % gesunken, wobei sich die Fettsäuren gleichmäßig auf die lebende Biomasse und die tote OBS verteilten. Die Menge *E. coli*-bürtigen Aminosäurekohlenstoffs zeigte im Boden keine signifikante Abnahme, wohl aber in der Biomasse, was eine Stabilisierung von ca. 75 % des Aminosäurekohlenstoffs in der toten OBS vermuten läßt. Diese Stabilisierung mikrobieller Substanzen kann in Form intakter und funktionell aktiver Moleküle erfolgen und legt die Vermutung nahe, dass letztendlich etwa die Hälfte der toten organischen Substanz im Boden mikrobiellen Ursprungs ist. Damit hätten die Mikroorganismen neben ihrer Funktion als Nährstoffquelle und als Transformatoren für den Umsatz der durch Pflanzen eingetragenen Substanzen einen erheblichen stofflichen Einfluß auf die

## Zusammenfassung

---

Zusammensetzung und die Eigenschaften des Bodens. Dieser mikrobielle Beitrag stellt eine Funktion der Umweltparameter, der Bodeneigenschaften und der mikrobiellen Biomasse selbst dar, was ein wichtiges Untersuchungsfeld für die nächsten Jahrzehnte darstellt. Das daraus resultierende Wissen über die Bildung und Stabilisierung der OBS würde die gezielte Beeinflussung von Bodeneigenschaften über ein nachhaltiges Bodenmanagement ermöglichen. Damit könnte die Sicherung und Erschließung fruchtbarer Böden für die Ernährung der Menschheit gewährleistet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F. and Ingelmo, F., 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology* 77, 109-114.
- Allard, B., 2006. A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit - Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions. *Geoderma* 130, 77-96.
- Amelung, W., 1997. Zum Klimaeinfluß auf die organische Substanz nordamerikanischer Prärieböden. *Bayreuther Bodenkundliche Berichte* 53, 140 + Anhang.
- Amelung, W., Miltner, A., Zhang, X. and Zech, W., 2001. Fate of microbial residues during litter decomposition as affected by minerals. *Soil Science* 166, 598-606.
- Anderson, D.W., Saggar, S., Bettany, J.R. and Stewart, J.W.B., 1981. Particle-Size Fractions and Their Use in Studies of Soil Organic-Matter .1. The Nature and Distribution of Forms of Carbon, Nitrogen, and Sulfur. *Soil Science Society of America Journal* 45, 767-772.
- Anderson, T.-H. and Joergensen, R.G., 1997. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1033 - 1042.
- April, T.M., Abbott, S.P., Foght, J.M. and Currah, R.S., 1998. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasceae). *Canadian Journal of Microbiology* 44, 270-278.
- Avery, L.M., Hill, P., Killham, K. and Jones, D.L., 2004. *Escherichia coli* O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 2101-2103.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassallo, A.M. and Wilson, M.A., 1989. Incorporation of Uniformly Labelled <sup>13</sup>C-Glucose Carbon into the Organic Fraction of Soil. Carbon Balance and CP/MAS <sup>13</sup>C NMR Measurements. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 725-746.
- Bengtsson, G., Fossum, A. and Lindqvist, R., 2004. Persistence of plasmid RP4 in *Pseudomonas putida* and loss of its expression of antibiotic resistance in a groundwater microcosm. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 999-1008.
- Bernal, M.P., Sanchez-Monedero, M.A., Paredes, C. and Roig, A., 1998. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. *Agriculture Ecosystems & Environment* 69, 175-189.
- Berthelet, M., Whyte, L.G. and Greer, C.W., 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiology Letters* 138, 17-22.
- Beuch, S., Boelcke, B. and Belau, L., 2000. Effect of the organic residues of *Miscanthus x giganteus* on the soil organic matter level of arable soils. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 184, 111-119.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.

- Bogosian, G., Sammons, L.E., Morris, P.J.L., Oneil, J.P., Heitkamp, M.A. and Weber, D.B., 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4114-4120.
- Brye, K.R., Norman, J.M., Bundy, L.G. and Gower, S.T., 2001. Nitrogen and carbon leaching in agroecosystems and their role in denitrification potential. *Journal of Environmental Quality* 30, 58-70.
- Byrd, J.J. and Colwell, R.R., 1993. Long-Term Survival and Plasmid Maintenance of *Escherichia-Coli* in Marine Microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 12, 9-14.
- Chamier, B., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1993. Natural Transformation of *Acinetobacter-Calcoaceticus* by Plasmid DNA Adsorbed on Sand and Groundwater Aquifer Material. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1662-1667.
- Chen, G. and Strevett, K.A., 2003. Impact of carbon and nitrogen conditions on *E-coli* surface thermodynamics. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 28, 135-146.
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K. and Verhaegen, J., 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* 17, 53-62.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. and Simonet, P., 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology* 3, 431-439.
- Dashman, T. and Stotzky, G., 1986. Microbial Utilization of Amino-Acids and a Peptide Bound on Homoionic Montmorillonite and Kaolinite. *Soil Biology & Biochemistry* 18, 5-14.
- de Man, J.C., 1975. The Probability of Most Probable Numbers. *Journal of Applied Microbiology* 1, 67-68.
- DeGroot, S.H., Claassen, V.P. and Scow, K.M., 2005. Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1427-1435.
- Dell'Anno, A., Bompadre, S. and Danovaro, R., 2002. Quantification, base composition, and fate of extracellular DNA in marine sediments. *Limnology and Oceanography* 47, 899-905.
- Ding, H. and Sun, M.-Y., 2005. Biochemical degradation of algal fatty acids in oxic and anoxic sediment-seawater interface systems: effects of structural association and relative roles of aerobic and anaerobic bacteria. *Marine Chemistry* 93, 1-19.
- Ding, X.L. and Henrichs, S.M., 2002. Adsorption and desorption of proteins and polyamino acids by clay minerals and marine sediments. *Marine Chemistry* 77, 225-237.
- Dong, Z. and Layzell, D.B., 2001. H<sub>2</sub> oxidation, O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> fixation in hydrogen treated soils. *Plant and Soil* 229, 1-12.
- Drenovsky, R.E., Elliott, G.N., Graham, K.J. and Scow, K.M., 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1793-1800.
- Dumont, M.G. and Murrell, J.C., 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* 3, 499-504.
- Fan, T.W.M., Lane, A.N., Chekmenev, E., Wittebort, R.J. and Higashi, R.M., 2004. Synthesis and physico-chemical properties of peptides in soil humic substances. *Journal of Peptide Research* 63, 253-264.

- Flessa, H., Ludwig, B., Heil, B. and Merbach, W., 2000. The origin of soil organic C, dissolved organic C and respiration in a long-term maize experiment in Halle, Germany, determined by C-13 natural abundance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 157-163.
- Fliessbach, A., Mader, P. and Niggli, U., 2000. Mineralization and microbial assimilation of C-14-labeled straw in soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1131-1139.
- Friedel, J.K. and Scheller, E., 2002. Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 315-325.
- Gleixner, G., Poirier, N., Bol, R. and Balesdent, J., 2002. Molecular dynamics of organic matter in a cultivated soil. *Organic Geochemistry* 33, 357-366.
- Gottschalk, G., 1986. *Bacterial Metabolism*. Springer, New York.
- Green, C.T. and Scow, K.M., 2000. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal* 8, 126-141.
- Haider, K., 1999. Von der toten organischen Substanz zum Humus. *Z. Pflanzenernährung und Bodenkunde* 162, 363-371.
- Hamer, U. and Marschner, B., 2002. Priming effects of sugars, amino acids, organic acids and catechol on the mineralization of lignin and peat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 165, 261-268.
- Hamer, U. and Marschner, B., 2005. Priming effects in different soil types induced by fructose, alanine, oxalic acid and catechol additions. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 445-454.
- Han, L., Doverskog, M., Enfors, S.-O. and Haggstrom, L., 2002. Effect of glycine on the cell yield and growth rate of *Escherichia coli*: evidence for cell-density-dependent glycine degradation as determined by C-13 NMR spectroscopy. *Journal of Biotechnology* 92, 237-249.
- Holben, W.E. and Ostrom, P.H., 2000. Monitoring bacterial transport by stable isotope enrichment of cells. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4935-4939.
- Hood, M.A., Guckert, J.B., White, D.C. and Deck, F., 1986. Effect of Nutrient Deprivation on Lipid, Carbohydrate, DNA, Rna, and Protein-Levels in *Vibrio-Cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 788-793.
- Hopkins, D.W., Odowd, R.W. and Shiel, R.S., 1997. Comparison of D- and L-amino acid metabolism in soils with differing microbial biomass and activity. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 23-29.
- Jackson, L.E., Stivers, L.J., Warden, B.T. and Tanji, K.K., 1994. Crop Nitrogen-Utilization and Soil Nitrate Loss in a Lettuce Field. *Fertilizer Research* 37, 93-105.
- Jacobsen, C.S., 1995. Microscale Detection of Specific Bacterial-DNA in Soil with a Magnetic Capture-Hybridization and PCR Amplification Assay. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3347-3352.
- Jambu, P., Ambles, A., Jacquesy, J.C., Secouet, B. and Parlanti, E., 1993. Incorporation of Natural Alcohols from Plant Residues into a Hydromorphic Forest-Podzol. *Journal of Soil Science* 44, 135-146.
- Jandl, G., Leinweber, P., Schulten, H.R. and Ekschmitt, K., 2005. Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1033-1041.

- Jenkinson, D.S. and Parry, L.C., 1989. The Nitrogen-Cycle in the Broadbalk Wheat Experiment - a Model for the Turnover of Nitrogen through the Soil Microbial Biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 21, 535-541.
- Jenkinson, D.S. and Rayner, J.H., 1977. Turnover of Soil Organic-Matter in Some of Rothamsted Classical Experiments. *Soil Science* 123, 298-305.
- Johnson, P., 2005. Total Midyear Population for the World: 1950-2050. <http://www.census.gov/ipc/www/worldpop.html> U.S. Census Bureau.
- Jones, D.L., 1999. Amino acid biodegradation and its potential effects on organic nitrogen capture by plants. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 613-622.
- KansasStateUniversity, 2004. What Is Carbon Cycle. <http://www.oznet.ksu.edu/ctec/Carbon/carboncycle.htm> Kansas State University.
- Kästner, A., 1996. Untersuchung ökologischer und methodischer Faktoren beim Nachweis rekombinanter Mikroorganismen im Boden, TU Hamburg-Harburg, Thesis, Hamburg.
- Kästner, M., 2000. "Humification" process or formation of refractory soil organic matter. In: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler and P. Stadler (Editors), *Biotechnology, 2nd Edition, Vol. 11b: Environmental Processes II*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 89 - 125.
- Kästner, M., Lotter, S., Heerenklage, J., Breuer-Jammali, M., Stegmann, R. and Mahro, B., 1995. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 1128-1135.
- Keeney, D.R. and Bremner, J.M., 1964. Effects of cultivation on nitrogen distribution in soil. *Soil Science of America Proceedings* 28, 653-656.
- Khanna, M. and Stotzky, G., 1992. Transformation of *Bacillus-Subtilis* by DNA Bound on Montmorillonite and Effect of DNase on the Transforming Ability of Bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1930-1939.
- Kielland, K., 1994. Amino-Acid-Absorption by Arctic Plants - Implications for Plant Nutrition and Nitrogen Cycling. *Ecology* 75, 2373-2383.
- Kindler, R., Miltner, A., Richnow, H.H. and Kästner, M., 2006. Fate of gram-negative bacterial biomass in soil - mineralization and contribution to SOM. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 2860-2870.
- Kindler, R., Miltner, A., Richnow, H.H. and Kästner, M., in prep. Fate of microbial biomass compounds (fatty acids, amino acids) in soil and contribution to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*.
- Kleber, M., Hong, J.P. and Stahr, K., 1998. Microbial biomass C- and N-dynamics in grassland soil amended with liquid manure. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 161, 87 - 92.
- Knicker, H., Frund, R. and Ludemann, H.D., 1993. The Chemical Nature of Nitrogen in Native Soil Organic-Matter. *Naturwissenschaften* 80, 219-221.
- Knicker, H. and Hatcher, P.G., 1997. Survival of protein in an organic-rich sediment: Possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften* 84, 231-234.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 139-162.
- Kowalenko, C.G., 1978. Organic nitrogen, phosphorous and sulfur in soil. In: M. Schnitzer and S.U. Khan (Editors), *Soil Organic Matter. Developments in Soil Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 95 - 136.

- Krull, E.S., Baldock, J.A. and Skjemstad, J.O., 2003. Importance of mechanisms and processes of the stabilisation of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Functional Plant Biology* 30, 207-222.
- Kuzuyakov, Y., Friedel, J.K. and Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1485-1498.
- Ladd, J.N., 1985. Soil enzymes. In: D. Vaughan and R.E. Malcolm (Editors), *Soil organic matter and biological activity*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Dordrecht, pp. 175-221.
- Lal, R., 2003. Soil erosion and the global carbon budget. *Environment International* 29, 437-450.
- Lampkin, N., 1997. Europe - the development of organic farming between 1985 and 2004. <http://www.organic.aber.ac.uk/statistics/europe05.shtml>.
- Leprince, F. and Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Lichtfouse, É., Berthier, G., Houot, S., Barriuso, E., Bergheaud, V. and Vallaey, T., 1995. Stable carbon isotope evidence for the microbial origin of C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> *n*-alkanoic acids in soil. *Organic Geochemistry* 23, 849-852.
- Lichtfouse, E., Chenu, C., Baudin, F., Leblond, C., Da Silva, M., Behar, F., Derenne, S., Largeau, C., Wehrung, P. and Albrecht, P., 1998. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Organic Geochemistry* 28, 411-415.
- Loll, M.J. and Bollag, J.M., 1983. Protein transformation in soil. *Advances in Agronomy* 36, 351-382.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1987. Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2948-2952.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1990. Natural Genetic-Transformation of *Pseudomonas-Stutzeri* by Sand-Adsorbed DNA. *Archives of Microbiology* 154, 380-385.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1994. Bacterial Gene-Transfer by Natural Genetic-Transformation in the Environment. *Microbiological Reviews* 58, 563-602.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K.H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32, 1363-1371.
- Lueders, T., Chin, K.J., Conrad, R. and Friedrich, M., 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* 3, 194-204.
- Lueders, T. and Friedrich, M.W., 2002. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2484-2494.

- Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M.W. and Kaestner, M., 2006. Identification of Bacterial Micropredators Distinctively Active in a Soil Microbial Food Web. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5342-5348.
- Lueders, T., Manefield, M. and Friedrich, M.W., 2004a. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* 6, 73-78.
- Lueders, T., Pommerenke, B. and Friedrich, M.W., 2004b. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5778-5786.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P. and Friedrich, M.W., 2004c. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* 6, 60-72.
- Lynch, J.M., 1982. Limits to Microbial Growth in Soil. *Journal of General Microbiology* 128, 405-410.
- Macko, S.A., Fogel, M.L., Hare, P.E. and Hoering, T.C., 1987. Isotopic Fractionation of Nitrogen and Carbon in the Synthesis of Amino-Acids by Microorganisms. *Chemical Geology* 65, 79-92.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I. and Bailey, M.J., 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5367-5373.
- Maron, P.A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.M., Lensi, R. and Nazaret, S., 2006. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology* 42, 65-73.
- Mayr, C., Winding, A. and Hendriksen, N.B., 1999. Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method. *Journal of Microbiological Methods* 36, 29-33.
- McBride, M.J., 2001. Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Review of Microbiology* 55, 49-75.
- McInroy, J.A., Musson, G., Wei, G. and Kloepper, J.W., 1996. Masking of antibiotic-resistance upon recovery of endophytic bacteria. *Plant and Soil* 186, 213-218.
- Miltner, A., Kopinke, F.-D., Kindler, R., Selesi, D., Hartmann, A. and Kästner, M., 2004a. Non-phototrophic CO<sub>2</sub> fixation by soil microorganisms. *Plant and Soil* 269, 193-203.
- Miltner, A., Richnow, H.-H., Kopinke, F.-D. and Kästner, M., 2004b. Assimilation of CO<sub>2</sub> by soil microorganisms and transformation into soil organic matter. *Organic Geochemistry* 35, 1015-1024.
- Miltner, A., Richnow, H.-H., Kopinke, F.-D. and Kästner, M., 2004c. Incorporation of carbon originating from CO<sub>2</sub> into different compounds of soil microbial biomass and soil organic matter. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, in press.
- Monreal, C.M. and McGill, W.B., 1985. Centrifugal Extraction and Determination of Free Amino-Acids in Soil Solutions by Tlc Using Tritiated 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene. *Soil Biology & Biochemistry* 17, 533-539.
- Nairn, J.D. and Chanway, C.P., 2002. Temporary loss of antibiotic resistance by marked bacteria in the rhizosphere of spruce seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 40, 167-170.

- Nielsen, K.M., Gebhard, F., Smalla, K., Bones, A.M. and vanElsas, J.D., 1997. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 815-821.
- Oades, J.M., 1995. An overview of processes affecting the cycling of organic carbon in soils. In: R.G. Zepp and C. Sonntag (Editors), *Role of nonliving organic matter in the earths carbon cycle*. Wiley & Sons, pp. 293 - 303.
- Ogden, I.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J.A. and Lewis, D., 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International Journal of Food Microbiology* 66, 111-117.
- Paget, E., Lebrun, M., Freyssinet, G. and Simonet, P., 1998. The fate of recombinant plant DNA in soil. *European Journal of Soil Biology* 34, 81-88.
- Paget, E., Monrozier, L.J. and Simonet, P., 1992. Adsorption of DNA on Clay-Minerals - Protection against DNase I and Influence on Gene-Transfer. *Fems Microbiology Letters* 97, 31-39.
- Paget, E. and Simonet, P., 1994. On the Track of Natural Transformation in Soil. *Fems Microbiology Ecology* 15, 109-117.
- Paget, E. and Simonet, P., 1997. Development of engineered genomic DNA to monitor the natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil-like microcosms. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 78-84.
- Pelz, O., Abraham, W.R., Saurer, M., Siegwolf, R. and Zeyer, J., 2005. Microbial assimilation of plant-derived carbon in soil traced by isotope analysis. *Biology and Fertility of Soils* 41, 153-162.
- Pinkart, H.C., Ringelberg, D.B., Piceno, Y.M., Macnaughton, S.J. and White, D.C., 2002. Biochemical approaches to biomass measurements and community structure analysis. In: C.J. Hurst, R.L. Crawford, G.R. Knudsen, M.J. McInerney and L.D. Stetzenbach (Editors), *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp. 101-113.
- Qualls, R.G. and Haines, B.L., 1992. Biodegradability of dissolved organic matter in forest throughfall, soil solution and stream waters. *Soil Science Society of America Journal* 56, 578-586.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M.I., Espinosa-Urgel, M. and Segura, A., 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology* 4, 166-171.
- Rauch, T. and Dreves, J.E., 2004. Assessing the removal potential of soil-aquifer treatment systems for bulk organic matter. *Water Science and Technology* 50, 245-253.
- Recorbet, G., Picard, C., Normand, P. and Simonet, P., 1993. Kinetics of the Persistence of Chromosomal DNA from Genetically-Engineered *Escherichia-Coli* Introduced into Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4289-4294.
- Reichenbach, H., 1992a. The Genus *Lysobacter*. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 3256-3275.
- Reichenbach, H., 1992b. The *Myxobacteria*. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 3416-3487.

- Reichenbach, H., 1992c. The Order Cytophagales. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 3631-3675.
- Reichenbach, H., 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology* 1, 15-21.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Koning, M., Lüth, J.-C., Stegmann, R., Garms, C., Francke, W. and Michaelis, W., 2000. Tracing the transformation of labelled [1-<sup>13</sup>C]phenanthrene in a soil bioreactor. *Environmental Pollution* 108, 91 - 101.
- Richnow, H.H., Eschenbach, A., Mahro, B., Kästner, M., Annweiler, E., Seifert, R. and Michaelis, W., 1999. Formation of nonextractable soil residues: a stable isotope approach. *Environmental Science and Technology* 33, 3761 - 3767.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G., Sayler, G. and Wackernagel, W., 1992. Persistence of Free Plasmid DNA in Soil Monitored by Various Methods, Including a Transformation Assay. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3012-3019.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1991. Adsorption of Plasmid DNA to Mineral Surfaces and Protection against DNase-I. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1057-1061.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1993. Use of Polymerase Chain-Reaction and Electroporation of *Escherichia-Coli* to Monitor the Persistence of Extracellular Plasmid DNA Introduced into Natural Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3438-3446.
- Rozen, Y., Nejdat, A., Gartemann, K.-H. and Belkin, S., 1999. Specific detection of p-chlorobenzoic acid by *Escherichia coli* bearing a plasmid-borne *pcbA':lux* fusion. *Chemosphere* 38, 633-641.
- Ryden, J.C. and Lund, L.J., 1980. Nature and Extent of Directly Measured Denitrification Losses from Some Irrigated Vegetable Crop Production Units. *Soil Science Society of America Journal* 44, 505-511.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Monedero, M.A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L. and Roig, A., 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Management* 24, 325-332.
- Schachtschabel, P., Blume, H.-P., Hartge, K.H., Schwertmann, U., Brümmer, G. and Renger, M., 1984. *Lehrbuch der Bodenkunde / Scheffer/Schachtschabel*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 442 pp.
- Scheller, E., 1996. Aminosäuregehalte von Ap- und Ah-Horizonten verschiedener Böden und deren Huminsäuren- und Fulvosäuren-Fraktion. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 81, 201-204.
- Schink, B., 1999. Habitats of Prokaryotes. In: J.W. Lengeler, G. Drews and H.G. Schlegel (Editors), *Biology of the prokaryotes*. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 763-803.
- Schlegel, H.G., 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart;NewYork.
- Schlesinger, W.H., 1990. Evidence from chronosequence studies for a low carbon-storage potential of soils. *Nature* 348, 232 - 234.
- Schnitzer, M., Hindle, C.A. and Meglic, M., 1986. Supercritical Gas Extraction of Alkanes and Alkanoic Acids from Soils and Humic Materials. *Soil Science Society of America Journal* 50, 913-919.

- Scholes, R.J. and Scholes, M.C., 1995. The effect of land use on nonliving organic matter in the soil. In: R.G. Zepp and C. Sonntag (Editors), Role of nonliving organic matter in the earth's carbon cycle. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, New York, pp. 209-226.
- Schulten, H.R. and Schnitzer, M., 1997. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Science* 162, 115-130.
- Selivanovskaya, S.Y., Latypova, V.Z. and Artamonova, L.A., 2003. Use of sewage sludge compost as the restoration agent on the degraded soil of Tatarstan. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 38, 1549-1556.
- Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1998. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology-Sgm* 144, 569-576.
- Smalla, K., Vanoverbeek, L.S., Pukall, R. and Vanelsas, J.D., 1993. Prevalence of NptII and Tn5 in Kanamycin-Resistant Bacteria from Different Environments. *Fems Microbiology Ecology* 13, 47-58.
- Smit, E., Leeftang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D. and Wernars, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2614-2621.
- Sollins, P., Homann, P. and Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: Mechanisms and controls. *Geoderma* 74, 65-105.
- Sorensen, S.J., Schyberg, T. and Ronn, R., 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Applied Soil Ecology* 11, 79-90.
- Sowden, F.J., Chen, Y. and Schnitzer, M., 1977. Nitrogen Distribution in Soils Formed under Widely Differing Climatic Conditions. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 41, 1524-1526.
- Stevenson, F.J., 1982. Organic forms of soil nitrogen. In: F.J. Stevenson (Editor), Nitrogen in Agricultural Soils. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, pp. 67-114.
- Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry - Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons, Inc., New York, 496 pp.
- Stubner, S., 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection. *Journal of Microbiological Methods* 50, 155-164.
- Summerbell, R.C., Krajden, S. and Kane, J., 1989. Potted Plants in Hospitals as Reservoirs of Pathogenic Fungi. *Mycopathologia* 106, 13-22.
- Sun, M.Y., Shi, W. and Lee, R.F., 2000. Lipid-degrading enzyme activities associated with distribution and degradation of fatty acids in the mixing zone of Altamaha estuarine sediments. *Organic Geochemistry* 31, 889-902.
- Szajdak, L. and Osterberg, R., 1996. Amino acids present in humic acids from soils under different cultivations. *Environment International* 22, 331-334.
- Thiel, V., Peckmann, J., Richnow, H.H., Luth, U., Reitner, J. and Michaelis, W., 2001. Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry* 73, 97-112.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L. and Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109-122.

- Tollefson, T.S. and McKercher, R.B., 1983. The Degradation of C-14-Labeled Phosphatidyl Choline in Soil. *Soil Biology & Biochemistry* 15, 145-148.
- Topp, E., Welsh, M., Tien, Y.-C., Dang, A., Lazarovits, G., Conn, K. and Zhu, H., 2003. Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 303-308.
- Tunlid, A., Ringelberg, D., Phelps, T.J., Low, C. and White, D.C., 1989. Measurement of phospholipid fatty acids at picomolar concentrations in biofilms and deep subsurface sediments using gas chromatography and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods* 10, 139-153.
- Vainio, E.J. and Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104, 927-936.
- Van Kessel, C., Nitschelm, J., Horwath, W.R., Harris, D., Walley, F., Luscher, A. and Hartwig, U., 2000. Carbon-13 input and turn-over in a pasture soil exposed to long-term elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology* 6, 123-135.
- Vestal, J.R. and White, D.C., 1989. Lipid Analysis in Microbial Ecology. *BioScience* 39, 535-541.
- Vinolas, L.C., Healey, J.R. and Jones, D.L., 2001. Kinetics of soil microbial uptake of free amino acids. *Biology and Fertility of Soils* 33, 67-74.
- von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B. and Flessa, H., 2006. Stabilization for organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426-445.
- Vrede, K., Heldal, M., Norland, S. and Bratbak, G., 2002. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2965-2971.
- Weiß, M., Geyer, R., Russow, R., Richnow, H.H. and Kästner, M., 2004. Fate and metabolism of [15N]2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1852 - 1860.
- White, D.C., Bobbie, R.J., Herron, J.S., King, J.D. and Morrison, S.J., 1979a. Biochemical measurements of microbial biomass and activity from environmental samples. In: J.W. Costerton and R.R. Colwell (Editors), *Native aquatic bacteria: enumeration, activity, and ecology*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 69-81.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D. and Bobbie, R.J., 1979b. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 41, 51-62.
- Zang, X., van Heemst, J.D.H., Dria, K.J. and Hatcher, P.G., 2000. Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. *Organic Geochemistry* 31, 679-695.
- Zelles, L., 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35, 275-294.
- Zhang, Y.M., Wu, N., Zhou, G.Y. and Bao, W.K., 2005. Changes in enzyme activities of spruce (*Picea balfouriana*) forest soil as related to burning in the eastern Qinghai-Tibetan Plateau. *Applied Soil Ecology* 30, 215-225.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Professor Dr. Matthias Kästner für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seinem Department und die lehrreichen Diskussionen bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei meinem universitären Betreuer und Gutachter Prof. Hauke Harms.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Prof. Matthias Kästner, Dr. Anja Miltner und Dr. Hans-Hermann Richnow für die wissenschaftliche Betreuung und die konstruktiven Anregungen aller Art zukommen lassen.

Der DFG sei ein Dank für die Finanzierung der Projektes im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1090 „Boden als Quelle und Senke für CO<sub>2</sub>“ ausgesprochen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des UFZ, insbesondere Herrn Gehre, Frau U. Günther, Frau Flügel, Frau Haufe und Silke Woszidlo, bedanken.

Recht herzlich danke ich meinen Freunden, die z.T. stark auf die Verwirklichung der Arbeit Einfluß genommen haben. Namentlich erwähnt seien besonders: Kerstin, Ines, Kevin, Claudia, Stefan<sup>1</sup>, Grit<sup>2</sup>, Anko, Herki, Janett, Ilka, Nadja, Franzi, Srikanth, Jens, Katja, Kathleen<sup>3</sup>, Gabi, Nicole und Uwe.

Meinen Eltern danke ich für viele aufbauende Worte und ihre Zeit.

Anja möchte ich dabei für ihren unerschütterlichen Enthusiasmus danken.

Anne verdanke ich die Erfahrung, dass man immer wissen sollte, weshalb man etwas macht. Das wußte ich nicht immer. Danke dafür.

1 oder auch nicht; 2 irgend jemand mußte mir halt zuhören; 3 entschuldige, wenn ich mich manchmal zu lang mit Grit unterhielt

---

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Der Beitrag mikrobieller Biomasse zur Bildung der refraktären organischen Substanz im Boden“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus den Werken sinngemäß oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Leipzig, 26. Juni 2006

Reimo Kindler

---

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Reimo Kindler  
Wohnort: Straße des 18. Oktober 33/730, 04103 Leipzig  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1983 – 1990 W.I. Lenin-POS, Treuenbrietzen  
1990 – 1996 Gymnasium am Burgwall, **Abitur**, Treuenbrietzen

### **Studium**

Okt. 1996 – Juli 2001 Studium der Fachrichtung Biochemie an der Universität  
Potsdam, **Diplom**  
Okt. 2000 – Juni 2001 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema  
„Hochempfindlichen Detektion von Cholinesterase-  
inhibitoren“ am der Universität Potsdam

### **Promotion**

Aug. 2001 – Juni 2006 Doktorand im Department Bioremediation,  
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit zum Thema  
„Der Beitrag mikrobieller Biomasse zur Bildung der  
refraktären organischen Substanz im Boden“ unter  
Anleitung von Prof. Dr. Matthias Kästner