

Zeitschrift: Berichte der St. Gallischen Naturwissenschaftlichen Gesellschaft
Band: 89 (2000)

Artikel: Mikroorganismen im Boden : Funktion - Bedeutung - Nachweis
Autor: Neff, Andrea
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-832589>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 13.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Mikroorganismen im Boden Funktion – Bedeutung – Nachweis

Andrea Neff

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	289
1. Einleitung	290
2. Funktion und Bedeutung von Mikroorganismen im Boden	290
3. Grenzen beim Nachweis von Mikroorganismen im Boden	293
4. Nachweismethoden der Bodenmikrobiologie	294
5. Nachweis der mikrobiellen Aktivitäten	295
6. Nachweis der mikrobiellen Diversität	296
6.1 Kultivierung von Mikroorganismen im Labor	296
6.2 Quantifizierung ohne vorhergehende Kultivierung	297
6.3 Identifizierung bekannter Mikroorganismen	298
6.4 Neue Möglichkeiten dank Poly- merase-Ketten-Reaktion (PCR) .	299
7. Nachweis der Mikroorganismen bei Abbauersuchen in Erde und Kompost	300
8. Schlussfolgerung	302
Literaturverzeichnis	302

Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit möchte ich den Leser mit den Mikroorganismen im Boden bekannt machen: auf ihre Bedeutung und ihre Funktionen in den grossen Stoffkreisläufen eingehen; ihren vielfältigen Stoffwechsel beschreiben und damit verbunden auf ihre Abbauleistungen sowie ihre positiven Einflüsse auf Pflanzenwachstum und Bodenfruchtbarkeit hinweisen.

Die Bedeutung einer ‹funktionierenden› Bodenmikroflora mit ihren vielfältigen Leistungen ist beim Schutz des Bodens unumstritten. Deshalb ist es notwendig, dass geeignete mikrobiologische Methoden zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe potentielle Gefahren für die Bodenmikroorganismen erkennbar sind.

Es sind eine Reihe von Methoden vorhanden, die es erlauben, Veränderungen der Mikroorganismen im Boden zu erkennen und zu quantifizieren. Bei diesen Methoden handelt es sich um Messungen von Aktivitäten (Funktionen) und Bestimmungen von mikrobiellen Diversitäten (Differenzierung mikrobieller Populationen). Diese Arbeit zeigt, was beachtet werden muss, wenn mit Bodenproben gearbeitet wird. Sie gibt einen Überblick über Nachweismethoden in der Bodenmikrobiologie. Eine ‹Standardmethode›, die alle Fragen auf einmal beantwortet,

tet, gibt es nicht. Es stehen vielmehr verschiedene Methoden zur Auswahl, mit welchen die Mikroorganismen im Boden von verschiedenen Seiten betrachtet werden können.

Beim Nachweis der mikrobiellen Aktivität werden Parameter, welche mit dem Stoffwechsel von Mikroorganismen zusammenhängen, bestimmt und verglichen (zum Beispiel Enzymaktivität, Sauerstoffverbrauch oder Kohlendioxidproduktion der Mikroorganismen). Konventionelle Methoden für den Nachweis der mikrobiellen Diversität beruhen auf der Kultivierung, Anreicherung und Isolierung der Mikroorganismen im Labor. Methoden ohne vorhergehende Kultivierung werden für die quantitative Biomassebestimmung herangezogen (zum Beispiel die Fumigations- und Respirationmethoden oder die Bestimmung von Biomarkern). Die Anwendung von molekulargenetischen Methoden haben die Bodenmikrobiologie einen grossen Schritt vorwärts gebracht. Fluoreszierende Antikörper, Gen-Sonden, Reporter-DNA, PCR und TTGE werden eingesetzt. Was sich hinter diesen Schlagwörtern versteckt, wird in dieser Arbeit erläutert.

1. Einleitung

Im Rahmen meiner Dissertation mache ich an der Eidgenössischen Materialprüfungs- und Forschungsanstalt (EMPA) St.Gallen Abbauprobungen mit biologisch abbaubaren Werkstoffen. Biologisch abbaubare Werkstoffe sind natürliche oder synthetische Polymere, die kunststoffähnliche Eigenschaften aufweisen. In geeigneter Umgebung (Kompost, Erde, Abwasser) werden sie in kleinere Fragmente gespalten, welche von Mikroorganismen aufgenommen und umgesetzt werden können. Die Vollständigkeit des biologischen Abbaus und die Kompostierbarkeit dieser Werkstoffe muss nachgewiesen werden. Dazu haben wir zwei Laboranlagen entwickelt. Mit ihnen ist es möglich, den aeroben Abbau (Abbau in Anwesenheit

von Sauerstoff) in Erde und Kompost zu verfolgen. Wenn die Mikroorganismen den Werkstoff umsetzen, veratmen sie ihn zu Kohlendioxid oder bilden eigene Biomasse. Für die Kohlenstoffbilanz und für die Bestimmung der Vollständigkeit der biologischen Abbaubarkeit ist es wichtig, diese zwei Umwandlungsprodukte zu erfassen. Das freigesetzte Kohlendioxid kann im Gasstrom nachgewiesen werden. Für die Zunahme der Biomasse musste eine Methode gefunden werden, mit welcher es möglich ist, die Biomasse in der Erde beziehungsweise im Kompost nachzuweisen. Während des Abbauprozesses soll zudem die mikrobielle Diversität bestimmt werden. Wir wollen wissen, welche Mikroorganismen an den verschiedenen Phasen des Abbauprozesses beteiligt sind. Aus diesem Grund beschäftige ich mich mit dem Nachweis von Mikroorganismen im Boden. Als erstes möchte ich aber einen Einblick in die Funktion und Bedeutung von Mikroorganismen im Lebensraum Boden geben.

2. Funktion und Bedeutung von Mikroorganismen im Boden

Zu den Mikroorganismen zählen alle mikroskopisch kleinen, ein- oder wenigzelligen Organismen: also Bakterien, tierische Einzeller und ein Grossteil der Algen und Pilze. Wenn in dieser Arbeit von den Mikroorganismen im Boden die Rede ist, sind damit die Bodenbakterien, inklusive Actinomyceten, und die mikroskopisch kleinen Pilze und Algen gemeint, welche der Zahl und dem Umfang ihrer Tätigkeit nach innerhalb des Bodenlebens dominieren. Die Bakterien des Bodens sind kleinste (0,5–1 µm), einzellige Organismen mit prokaryotischer Zellstruktur (Procyte mit geringer Kompartimentierung). Die einzelligen, mycelbildenden Strahlenpilze (Actinomyceten) sind pilzähnlich wachsende Bakterien. Sie bilden nämlich wie Pilze oft ein weit verzweigtes Mycel, haben aber die Zellstruktur der Bakterien. Pilze

(Abbildung 1) durchziehen den Boden mit ihrem Mycel (Pilzfäden) und bilden sporentragende Organe. Sie sind Vertreter der Eukaryoten. Die eukaryotische Zelle (Eucyte) ist durch Organellen stärker kompartimentiert und hat einen etwa zehnfach grösseren Zelldurchmesser als die Bakterienzelle.

Die verhältnismässig grosse Zelloberfläche zum Zellvolumen und die unmittelbaren Kontakte zum umgebenden Medium ermöglichen einen hohen Stoffaustausch und dadurch hohe Stoffwechsel- und Wachstumsraten (kurze Generationszeiten). Zudem sind Mikroorganismen ubiquitär (allgegenwärtig) verbreitet, besitzen wirkungsvolle Überlebensmechanismen und eine hohe Anpassungsfähigkeit.

Mikroorganismen haben eine Vielfalt des Stoffwechsels herausgebildet. Während die höheren Organismen im Verlauf der Evolution eine grosse morphologisch-anatomische Differenzierung erreichten, besitzen die Mikroorganismen, vor allem die Bakterien, eine ausgeprägte biochemische Differenzierung. Darauf beruht ihre grosse Bedeutung in den Stoffkreisläufen. Den Mikroorganismen stehen vielfältige Wege zur Energiegewinnung und -konservierung zur Verfügung, was im Kohlenstoffkreislauf veranschaulicht werden kann (Abbildung 2).

Nur wenige Bodenmikroorganismen vermögen wie die grünen Pflanzen organische Verbindungen aus Kohlendioxid und Wasser zu bilden (C-autotroph). Von diesen erhalten die phototrophen Organismen (Algen, einige chlorophyllhaltige Bakterien) die dafür nötige Energie durch das Sonnenlicht (Photosynthese), die chemolithotrophen Bakterien durch die Oxidation anorganischer Verbindungen (zum Beispiel Ammonium oder Schwefel). Der grösste Teil der Mikroorganismen im Boden lebt aber von organisch gebundenem Kohlenstoff (C-heterotroph): einige von lebenden Pflanzenteilen (Phytophagen), andere von gefangenen Tieren (Zoophagen), die meisten von toter organischer Substanz (Saprophyten). Sie decken ihren Kohlenstoff- und Energiebedarf durch

den Abbau von energiereichem totem pflanzlichen und tierischen Material, wie Ernterückstände und Hofdünger. Das Endergebnis dieser Abbauvorgänge sind die Mineralisation und die Bildung bodeneigener Restprodukte (Humus), deren weiterer Abbau nur noch langsam vor sich geht. Bei der Mineralisation wird aus organischen Stickstoffverbindungen (wie Proteine, Harnsäure) Ammonium und Nitrat freigesetzt; der organische Kohlenstoff wird meistens zu Kohlendioxid oxidiert und organisch gebundene Mineralien werden als Ionen freigesetzt. Diese Endprodukte bilden die Nähr-

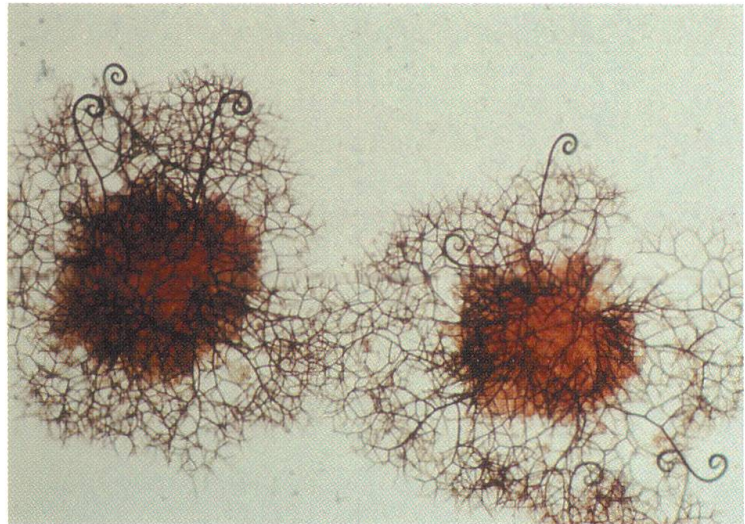


Abbildung 1:
Pilze unter dem Lichtmikroskop betrachtet.
Oben: Myxotrichum (Kerndurchmesser 240 μm).
Unten: Keimende Schimmelpilzspore (Pilzfadendurchmesser 3 μm).

stoffe für pflanzliches Wachstum. Tiere und Menschen wachsen, indem sie Pflanzen oder Tiere fressen, die sich zuvor von Pflanzen ernährten. So schliesst sich der Kreislauf (Abbildung 2). Tiere und Menschen leben innerhalb des Kreislaufes parasitisch. Ihre Anwesenheit ist nicht unbedingt nötig und ihr Verschwinden würde kaum Effekte auf das Funktionieren des Kreislaufes haben. Der totale Zusammenbruch des Kreislaufes würde aber durch das Verschwinden von Bakterien und Pilzen herbeigeführt. Die grünen Pflanzen müssten ihre Kohlendioxid-Fixierung bald einstellen, wenn Mikroorganismen nicht durch fortwährende Mineralisation für eine Regeneration des Kohlendioxids sorgen würden.

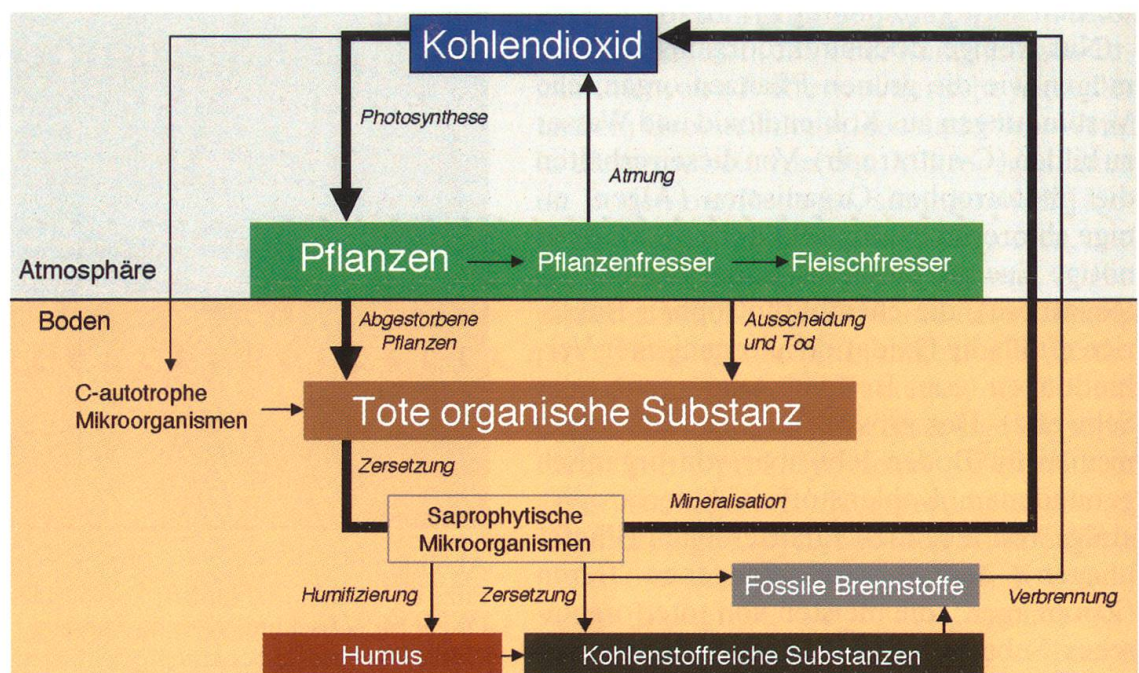
Obwohl die grünen Pflanzen seit vielen Millionen Jahren aus Kohlendioxid organische Verbindungen synthetisieren, hat sich keine dieser Substanzen in nennenswertem Masse angehäuft. Lediglich ein geringer Bruchteil ist in Form der stark reduzierten kohlenstoffreichen Substanzen wie Erdöl, Erdgas und Kohle unter Luftabschluss erhalten geblieben. Unter aeroben Bedingungen (in Anwesenheit von Sauerstoff) sind alle biosynthetisch entstandenen Verbindun-

gen abbaubar. Zusätzlich können Mikroorganismen eine Vielzahl der umfangreichen anthropogenen – von der chemischen Industrie synthetisierten – Verbindungen umsetzen.

Welche Verbindungen ein Organismus verwerten kann, wird durch die Art der extra- und intrazellulären Enzyme bestimmt, die er zu erzeugen vermag. Bei Abbauvorgängen wirken meistens verschiedene Mikroorganismenarten nacheinander (Sukzession). Jeder Mikroorganismus ist auf die Verwertung bestimmter Stoffgruppen spezialisiert. Nach deren Verbrauch wird er durch Organismen abgelöst, die die entstandenen Umwandlungsprodukte, oder die toten oder lebenden Zellen ihrer Vorgänger zum Leben benötigen, bis auch sie wieder abgelöst werden.

Die Bedeutung der Mikroorganismen in den Stoffkreisläufen beschränkt sich nicht auf ihr Abbaupotential. Durch symbiontische Wechselbeziehungen mit Pflanzen sind sie auch für die Primärproduktion von Bedeutung. Die Bindung des Luftstickstoffs wie auch die Phosphatversorgung vieler Pflanzen gehen auf Symbiose (zum Beispiel Rhizosphäreneffekt, Mykorrhiza) zurück.

Abbildung 2:
Funktion der Mikroorganismen im Kohlenstoffkreislauf des Bodens.



Zudem können viele Schritte in den Stoffkreisläufen nur von Mikroorganismen ausgeführt werden (zum Beispiel die Bildung von Humus, also fruchtbaren Bodens) und unter extremen Bedingungen (zum Beispiel in heissen Quellen oder sauerstoffarmer Umgebung) sind nahezu alle biochemischen Veränderungen auf die Tätigkeit von Mikroorganismen zurückzuführen.

3. Grenzen beim Nachweis von Mikroorganismen im Boden

Will man Mikroorganismen im Boden nachweisen, muss man sich als erstes bewusst sein, dass diese nicht gleichmässig verteilt sind. Da Mikroorganismen sehr klein sind, sind auch ihre Habitate sehr klein. Ein Mikrobiologe muss deshalb lernen «klein zu denken», wenn er die Mikroorganismen in ihrer Umgebung studiert. Für ein 1 µm-langes Stäbchenbakterium ist eine Distanz von 1 mm dasselbe, wie für einen Menschen eine Distanz von 2 km. Auf kleinstem Raum können chemische, physikalische und biologische Gradienten sowohl örtlich wie zeitlich rasch ändern. Dies kann mit der Veränderung der Sauerstoffkonzentration, einem wichtigen mikrobiellen Parameter, veranschaulicht werden. MADIGAN et al. (1997) haben die Sauerstoffkonzentration in einem Bodenpartikel mit einer Mikroelektrode gemessen. Von der gesättigten Oberfläche (21 % Sauerstoff) führen verschiedene Zonen in den Kernbereich, welcher anaerob ist (0 % Sauerstoff) (örtliche Unterschiede). Eine zeitliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration kann während des Abbaus von toter organischer Substanz oder bei der Zunahme des Bodenwassers (Überschwemmung) beobachtet werden. Bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen können physiologisch gesehen sehr verschiedene Typen von Mikroorganismen vorkommen. Deshalb müssen genügend Einzelproben genommen und zu Mischproben vermengt werden (Ausgleich von örtlichen Unterschieden) und die Proben sollten unter möglichst

ähnlichen Umweltbedingungen (Witterung, Jahreszeit) genommen werden (Ausgleich von zeitlichen Unterschieden).

Werden Messungen nicht direkt am Ort (in situ) vorgenommen so besteht die Gefahr, dass nicht alle Mikroorganismen im Boden auch in der Probe repräsentativ vertreten sind. Transport und Lagerung können zudem sowohl die mikrobielle Aktivität als auch die mikrobielle Diversität beeinflussen. Unter neuen Umweltbedingungen gibt es immer Mikroorganismen, die auf Kosten der anderen wachsen und solche, die in einen Ruhezustand übergehen oder absterben.

Im Labor werden die Bodenproben weiter bearbeitet. Zuerst werden sie gesiebt: Größere Partikel, Pflanzenwurzeln oder Bodentiere werden abgetrennt. Mikroorganismen, welche sich an diesen Oberflächen befinden werden also später nicht mitbestimmt. Es gibt Nachweismethoden bei denen die ganze gesiebte Bodenprobe verwendet werden kann und solche, bei denen die Mikroorganismen zuerst aus dem Boden isoliert werden müssen (Extraktion). Ein Teil der Zellen befindet sich in der Bodenlösung oder im Porenvolumen, der weitaus grösste Teil ist aber mehr oder weniger fest an Huminstoffe und Ton adsorbiert und muss losgelöst werden. Falls die Extraktion schädlich oder selektiv ist, besteht hier wiederum die Gefahr, dass ein Teil der Mikroorganismen nicht mitbestimmt oder abgetötet wird. Der letzte Schritt, bei welchem Mikroorganismen «verloren gehen können» ist die Kultivierung im Labor. Die meisten Mikroorganismen sind heute im Labor nicht kultivierbar, wachsen zu langsam oder nicht unter Konkurrenz. Die Gründe hierfür liegen zum einen darin, dass zu wenig über die Wachstumsbedürfnisse der entsprechenden Organismen bekannt ist. Hieraus ergeben sich insbesondere Schwierigkeiten, die genauen Bedingungen für das Wachstum einzelner Mikroorganismen einzustellen.

Beim Nachweis von Mikroorganismen muss deshalb davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Organismen nicht erfasst

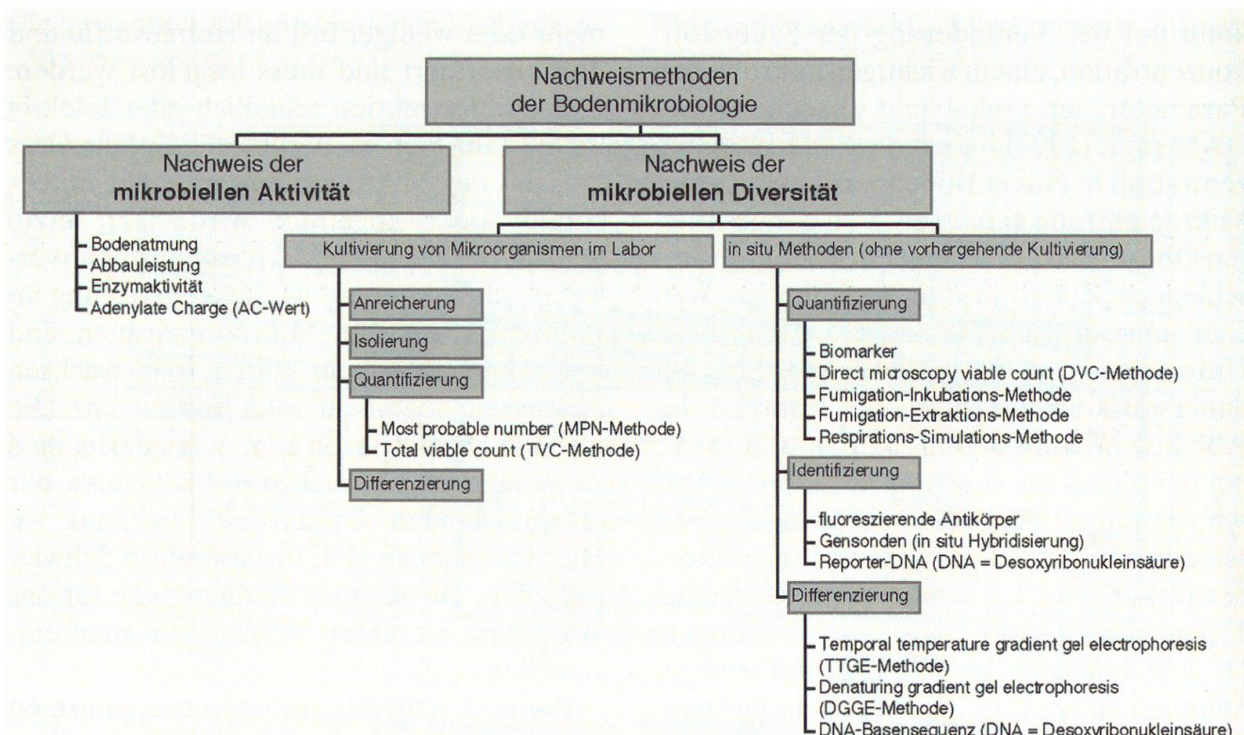
wird, obwohl diese vielleicht häufig im Boden vorkommen und für bestimmte Funktionen relevant sind. Dieses Problem kann entschärft werden, wenn man das Experiment gut plant. Bei der Probenahme, beim Transport und bei der Weiterbearbeitung im Labor sollten die Bedingungen für die Mikroorganismen, welche man nachweisen will, ideal sein.

4. Nachweismethoden der Bodenmikrobiologie

Die Bodenmikrobiologie hat zwei eigentliche Schwerpunkte (Abbildung 3): der Nachweis der mikrobiellen Aktivität und der Nachweis der mikrobiellen Diversität. Die Nachweismethoden der mikrobiellen Diversität setzen sich mit den verschiedenen Mikroorganismenarten und physiologischen Gruppen sowie den Interaktionen zwischen

diesen Gruppen auseinander. Sie werden herangezogen beim Vergleich von Ökosystemen oder beim Festhalten von zeitlichen Veränderungen eines Ökosystems sowie bei Untersuchungen über den Einfluss einzelner Faktoren (wie Bodentyp und Klima) auf die Biomasse. Die Belastung der Böden kann anhand der Erfassung von mikrobiellen Populationen verfolgt werden. Quantitative Biomassebestimmungen werden als Parameter und für das Validieren von Stoffflussmodellen gebraucht sowie für die Bilanzierung bei Abbaustudien (zum Beispiel von organischen Chemikalien und Abfällen). Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität geben Auskunft über den physiologischen Zustand und über die Funktionen der Mikroorganismen, ohne dass diese zuvor identifiziert werden müssen. Die mikrobielle Aktivität wird bestimmt, um verschiedene Standorte zu vergleichen, um Abbauleistungen von Mikroorganismen zu ermitteln und um den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren (zum Beispiel Schadstoffeinflüsse), Bodenbearbeitungs- und Kultivierungsme-

Abbildung 3:
Nachweismethoden der Bodenmikrobiologie.



thoden zu beurteilen. Die mikrobielle Aktivität ist ein Parameter für die Bodenfruchtbarkeit.

5. Nachweis der mikrobiellen Aktivitäten

Der Nachweis der mikrobiellen Aktivität hat mit den Stoffwechsellleistungen zu tun: dem Abbau von Substraten, der Kohlendioxidproduktion beziehungsweise der Sauerstoffkonsumation bei der Bodenatmung, den Enzymaktivitäten oder der Bestimmung der Energieträger in der Zelle (Adenosinphosphate).

Eine der ältesten und immer noch am häufigsten gemessenen Parameter ist die Bestimmung der Bodenatmung. Man unterscheidet die Basal- (ohne Zusatz irgendeines Substrates) und die substratinduzierte Atmung (SIR aus dem englischen *substrate induced respiration*). Gemessen wird der bei der Atmung konsumierte Sauerstoff oder das produzierte Kohlendioxid. Die mikrobielle Aktivität kann auch über die Substratabnahme oder die Produktzunahme oder sogar die während der chemischen Reaktion freigesetzte Wärme (englisch *Heat output*) bestimmt werden. Zucker oder Cellulose wird oft als Substrat eingesetzt. Es kann aber auch die Abbauleistung jedes anderen Substrats bestimmt werden. So sind die Reduktion von Dimethylsulfoxid (DMSO-Methode) oder die Arginin-Ammonifikation empfindliche und billige Methoden zur Messung der mikrobiellen Aktivität im Boden (ALEF 1991). Wenn Arbeit und Kosten nicht gescheut werden, können für spezifische mikrobielle Prozesse auch radioisotopisch markierte Substrate eingesetzt werden. Es handelt sich dann um äusserst sensitive Nachweismethoden.

Ideale Parameter für den Nachweis der mikrobiellen Aktivität sind die Enzymaktivitäten. Enzyme übernehmen eine wichtige Funktion innerhalb des Stoffwechsels. Es gibt Enzyme, welche von allen Mikroorganismen gebildet werden können und somit

ein Parameter für die generelle Aktivität sind (z. B. Dehydrogenase, Phosphatase) und andere, welche Parameter für die spezifische Aktivität sind, das heisst nur von spezifischen Gruppen gebildet werden (z. B. Lignase von holzabbauenden Organismen). Nachweismethoden sind für alle wichtigen enzymatischen Stoffumsetzungen innerhalb der biogeochemischen Kreisläufe beschrieben (SCHINNER et al. 1993). BECK (1984) hat die empirische bodenmikrobiologische Kennzahl (BMK) als Parameter für die gesamtmikrobiologischen Aktivitäten im Boden vorgeschlagen. Diese Zahl beruht auf der Bestimmung der Enzyme Dehydrogenase, Katalase, alkalische Phosphatase, Protease, Saccharase und Amylase sowie der Biomasse.

Eine oft benutzte Methode zum Nachweis der mikrobiellen Aktivität beruht auf der Messung der Adenosinphosphate (Adenosinmonophosphat [AMP], Adenosindiphosphat [ADP] und Adenosintriphosphat [ATP]), welche zum intrazellulären Stoffwechsel gehören. Die Adenosinphosphate sind die universellen Energieträger in den lebenden Zellen. Das Verhältnis dieser drei Adenylate zueinander (AC-Wert vom englischen *Adenylate Charge*: $[ADP + ATP] / [AMP + ADP + ATP]$) ist ein Massstab für den physiologischen und metabolischen Status von Mikroorganismen. VAN ELSAS et al. (1997) fand folgende Werte: 0,8–0,9 AC erreichen metabolisch aktive Zellen, 0,5–0,8 AC erreichen inaktive Zellen und AC-Werte unter 0,5 sterbende Zellen. Als dimensionslose Grösse für die im Adenylatpool gespeicherte Energie ist dies ein empfindlicher Massstab für die Reaktion der Bodenmikroorganismen auf veränderte Umweltbedingungen (SCHINNER et al. 1993).

6. Nachweis der mikrobiellen Diversität

6.1 Kultivierung von Mikroorganismen im Labor

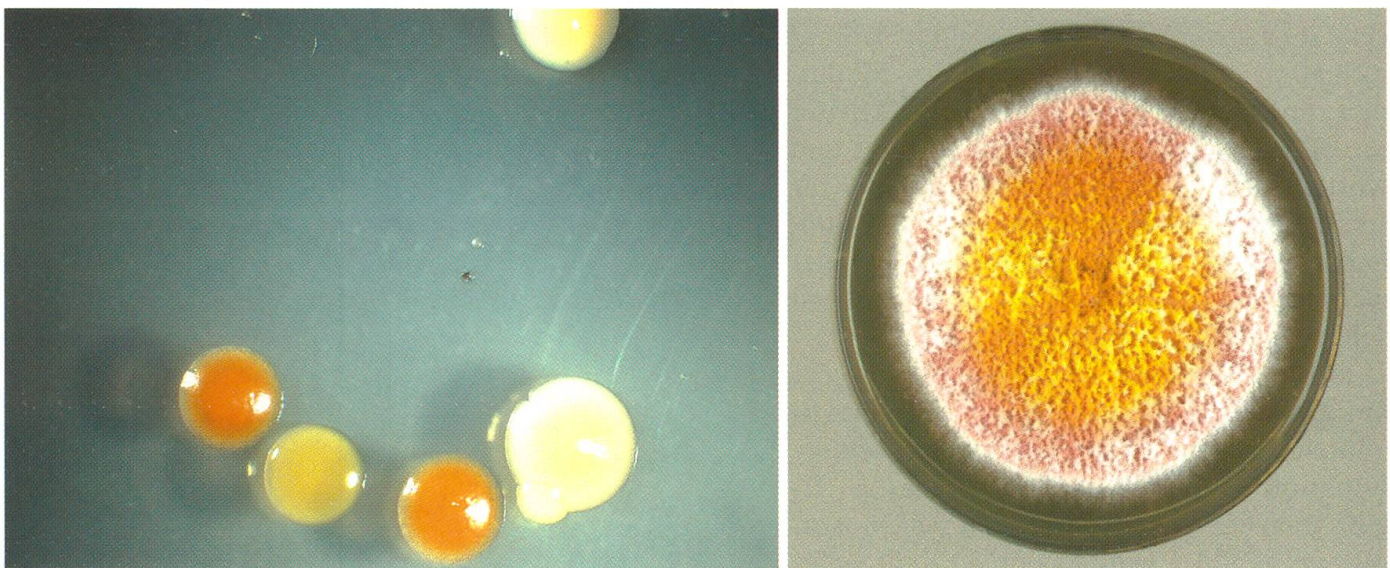
Der Nachweis der mikrobiellen Diversität in Bodenproben beinhaltet bei den konventionellen Methoden die Anreicherung und Quantifikation, die Isolation und die Identifikation der Mikroorganismen. Für die Kultivierung im Labor werden meistens Anreicherungs-nährlösungen verwendet. Will man die Anzahl kultivierbarer Mikroorganismen in der Probe bestimmen (Quantifikation), wählt man eine Nährlösung, auf welcher möglichst alle Mikroorganismen zu wachsen vermögen. Wenn die spezifischen Bedingungen für das Wachstum und Überleben einer bestimmten Mikroorganismenart bekannt sind, ist es möglich, die Bedingungen eines Nährmediums so festzulegen, dass das Wachstum dieser Art gefördert, und dasjenige der anderen Arten unterdrückt wird (selektive Nährlösungen). Beim bekanntesten Anreicherungsverfahren werden die Bodenproben in flüssige Nährmedien oder auf Agarplatten übertragen, damit sie unter Laborbedingungen wachsen (Kultivierung).

Durch mehrfache Übertragung auf die gleiche Nährlösung und Verteilen auf einen festen Nährboden derselben Zusammensetzung erhält man eine Reinkultur (Abbildung 4), das heisst eine Isolation des angereicherten Stamms. Es gibt unzählige Rezepte zur Herstellung verschiedener Nährböden, welche die Isolierung verschiedener Bakterien-, Actinomyceten- und Pilzarten erlaubt. Reinkulturen können identifiziert werden, was nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten erfolgt; je länger je mehr aber auch mit der Bestimmung der Genomfrequenz.

Die bekanntesten Methoden für die quantitative Bestimmung von im Labor kultivierbaren Mikroorganismen sind die TVC-Methode (Gesamtkeimzahl aus dem englischen *total viable count*) und die MPN-Methode (die wahrscheinlichste Zahl aus dem englischen *most probable number*). Mit den Bodenproben wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Bei der TVC-Methode wird ein Alliquot jeder Verdünnungsstufe auf eine Agarplatte ausgestrichen und anschliessend bebrütet. Aus den einzelnen Keimen entwickeln sich makroskopisch sichtbare Kolonien, die ausgezählt werden können.

Die Auszählung erfolgt in Form von CFU's (koloniebildende Einheiten aus dem engli-

Abbildung 4:
Kultivierung von Bakterienkolonien
(links) und Isolation einer Pilz-Reinkultur
(rechts) auf Agarplatten.



schen *colony forming units*) pro Gramm Boden. Bei der MPN-Methode wird aus mehreren aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen ein Alliquot mit Nährlösung versetzt und bebrütet. Wird die Nährlösung trüb, fand mikrobielles Wachstum statt (positiv), bleibt die Nährlösung klar, fand kein Wachstum statt (negativ). Für die Auswertung werden Wahrscheinlichkeitstabellen verwendet. Der grosse Nachteil bei diesen Methoden ist aber, wie schon erwähnt, dass nur ein Bruchteil der im Boden vertretenen Mikroorganismen erfasst und isoliert wird. ALEF & NANNIPIERI (1995) nahmen verschiedene Bodenproben und haben diese Methoden mit speziellen mikroskopischen Techniken verglichen; sie fanden lediglich 0,1 bis 10 Prozent der Bakterien wieder.

6.2 Quantifizierung ohne vorhergehende Kultivierung

Bei vielen Experimenten muss die mikrobielle Biomasse im Boden nur quantifiziert werden – die Mikroorganismen müssen weder kultiviert noch identifiziert werden. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Beim direkten Zählverfahren unter dem Mikroskop werden Mikroorganismenzellen ausgezählt und anschliessend mit einem Faktor die Biomasse. Mit der DVC-Methode (aus dem englischen *direct microscopy viable count*) können lebensfähige Mikroorganismen direkt in Bodenproben sichtbar gemacht werden. Es werden auch sehr kleine Zellen mitbestimmt. Den Proben wird ein Hefeextrakt als Nährstoffquelle und eine Substanz, welche die DNA-Synthese blockiert, beigegeben. So wachsen die Zellen, ohne dass sie sich vermehren. Sie können angefärbt, im Mikroskop sichtbar gemacht, ausgezählt und auf die Biomasse umgerechnet werden (VAN ELSAS et al. 1997).

Weit verbreitete schnelle Labormethoden sind die Fumigation-Inkubation-, die Fumigation-Extraktion- und die Respirations-Simulations-Methode. Bei den beiden ersten

Methoden werden die Mikroorganismen im Boden abgetötet (Begasung/Fumigation mit Chloroform). Bei der Fumigation-Inkubation wird anschliessend eine nicht behandelte Bodenprobe beigegeben (Neubesiedelung/Innokulation mit Mikroorganismen) und während zehn Tagen die Mineralisation der abgetöteten Mikroorganismen zu Kohlendioxid gemessen. Mit einem Umrechnungsfaktor wird auf die Biomasse der Bodenprobe geschlossen. Bei der Fumigation-Extraktion wird nach der Begasung der extrahierbare organische Kohlenstoff chemisch bestimmt und mit einer nichtfumigierten Bodenprobe verglichen. Die Differenz ist die lebende Biomasse in der Bodenprobe. Bei der Respirations-Simulations-Methode wird der Bodenprobe ein Glucosemedium beigegeben und anschliessend der Sauerstoffverbrauch, welchen die Mikroorganismen für die Veratmung der Glucose brauchen, während zehn Stunden gemessen. Es wurde ein mathematisches Modell entwickelt. Nach diesem besteht eine direkte Beziehung zwischen der Dauer der Wachstums-Anlaufphase (Lag-Phase), dem Sauerstoffverbrauch und der anfänglich vorhandenen aktiven Biomasse (SCHINNER et al. 1993).

Auch bei den Methoden, welche auf der quantitativen Bestimmung von Biomarkern (Tabelle 1) und deren Umrechnung auf die Biomasse beruhen, kann in situ bestimmt werden. Als Biomarker gelten alle biologischen Komponenten, welche gebraucht werden können, um ein nützliches Merkmal einer bestimmten mikrobiellen Art oder Gemeinschaft nachzuweisen und welche im Boden identifiziert und quantifiziert werden können. Sie beruhen auf der Annahme, dass die Konzentration in lebenden Zellen unter definierten Bedingungen konstant ist und dass sie in extrazellulärer Form rasch abgebaut werden.

Bei allen unter diesem Kapitel aufgeführten Methoden werden experimentell bestimmte Umrechnungsfaktoren für die quantitative Bestimmung der Biomasse einge-

setzt. Diese setzen ein konstantes Verhältnis zwischen den Zellen, Zellkomponenten oder physiologischen Merkmalen und der Biomasse voraus. Je nach physiologischem Zustand der Zellen können diese Verhältnisse aber in weiten Bereichen variieren. Wichtig ist bei diesen Methoden, dass die Umrechnungsfaktoren für jeden Boden neu bestimmt werden, und dass die Bestimmung bei ähnlichem physiologischen Zustand der Zellen erfolgen (zum Beispiel bei Substratknappheit).

Das Auszählen von Mikroorganismen unter dem Mikroskop ist mit Fehlern behaftet. Das Erkennen und Unterscheiden von Mikroorganismenzellen hängt vom Mikroskopierer ab und ist oft nicht präzise. Kleinere Zellen als das Auflösungsvermögen des Mikroskops bleiben nach wie vor unerkannt. Bei Anfärbetechniken und Fluoreszenzmarkierung muss damit gerechnet werden, dass nur ein Teil der Zielorganismen angefärbt beziehungsweise markiert wurde und dass unspezifisches Anfärben von anderen Organismen oder Bodenpartikeln erfolgte.

Chemische Verbindung	Biomarker für...
ATP (Energieträger in allen lebenden Zellen) Proteine Organisch gebundener Stickstoff	Gesamtbiomasse
Glucosamin Ergosterol	Pilze
Diamino-Pimilinsäure Muraminsäure Phospholipide	Bakterien
Lipopolysaccharide der Zellmembran	Gram-negative Bakterien
Teichonsäure	Gram-positive Bakterien
Chlorophyll	Algen und Cyanobakterien

Tabelle 1:
Beispiele von Biomarkern
(JÖRGENSEN et al. 1988).

Alle Variationen von Fumigation-Inkubation und substratinduzierter Respiration sind biologische Nachweismethoden. Sie hängen von der Aktivität der Bodenenzyme oder einer Wiederbesiedlung von mikrobiellen Populationen ab. Biologische Nachweismethoden können nicht gleich robust und reproduzierbar sein wie chemische, da alle Typen von biologischer Variabilität die Messungen beeinflussen können. Bei der Fumigation-Extraktion und den Biomarker-Methoden handelt es sich um chemische Bestimmungen, das heißt um zuverlässige, reproduzierbare Methoden.

6.3 Identifizierung bekannter Mikroorganismen

Wenn die gesuchten Mikroorganismen bekannt sind, ist es technisch möglich, diese *in situ*, das heißt direkt in der Bodenprobe ohne vorhergehende Kultivierung zu identifizieren. Es handelt sich hier um Methoden aus der Molekularbiologie, welche mit fluoreszierenden Antikörper, Gen-Sonden oder Reporter-DNA arbeiten. Bakterien, für die spezifische Antikörper oder Antiseren vorhanden sind, lassen sich aufgrund ihrer präzise definierten Antigenbindungsstelle in Bodenextrakten identifizieren und quantifizieren (SCHINNER et al. 1993). Bei der *in situ* Hybridisierung mit Gen-Sonden werden Gene als phylogenetische Biomarker benutzt, deren Sequenzen Organismen identifizieren und eindeutig unterscheiden können. Im Prinzip eignet sich eine ganze Reihe von Genen, doch werden vorzugsweise die ribosomalen RNAs beziehungsweise deren Gene eingesetzt. Als RNA-Sonden werden fluoreszenzmarkierte synthetische Oligonukleotide bezeichnet, welche mit den homologen Regionen der Mikroorganismen in der Probe – also mit morphologisch intakten Zellen (*whole cell hybridization*) – hybridisieren und unter dem Mikroskop sichtbar werden. Die DNA von Mikroorganismen, welche für Feldversuche freigesetzt werden, können mit Reporter-DNA markiert werden. Es werden

spezifische Gene in die DNA eingeschleust, anhand welcher man später die Mikroorganismen im Boden identifizieren kann. So können aus natürlich vorkommenden selbstleuchtenden (lumineszierenden) Organismen Gene kloniert werden, welche für die Lichtemission verantwortlich sind. Diese werden in das Genom der vorher kultivierten Mikroorganismen eingeschleust. Nach Zugabe eines bestimmten Substrates wird Luciferase produziert. Damit geht eine Lichtemission einher, welche visuell oder mit Luminometry oder Mikroskopie bestimmt werden kann. Die Lumineszenz ist proportional zu der Anzahl aktiver Zellen und diese ist wiederum proportional zur Biomasse (VAN ELSAS et al. 1997).

6.4 Neue Möglichkeiten dank Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Anwendung neu entwickelter Methoden aus der Molekularbiologie erlaubt die Differenzierung und Identifizierung von Mikroorganismen auf Genom-Basis ohne vorhergehende Kultivierung. Die technische Grundlage für diese Untersuchung ist die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion aus dem englischen *polymerase chain reaction*). Sie ermöglicht es, innerhalb weniger Stunden Millionen oder sogar Milliarden von Kopien bestimmter DNA-Sequenzen aus der Probe herzustellen. Vervielfältigt (amplifiziert) werden die DNA-Abschnitte zwischen den eingesetzten Primern. Es stehen universelle Primer (zum Beispiel für alle Prokaryoten) oder artspezifische Primer zur Verfügung. Nach der Vermehrung kann man den betreffenden DNA-Abschnitt durch Gelelektrophorese leicht von der nicht vermehrten Hauptmenge der DNA trennen. Die DNA-Sequenz der PCR-Produkte kann bestimmt werden (Abbildung 5). Diese wird in DNA-Datenbanken mit den Sequenzen bisher bekannter Mikroorganismen verglichen. Auf diese Weise ist eine Identifikation und phylogenetische Zuordnung zu den nächsten Verwandten möglich. Die Identifikation ist

eindeutig, wenn der Beweis erbracht wurde, dass die erhaltenen DNA-Sequenzen auch wirklich von Mikroorganismen aus der Probe stammen. Dazu werden spezifische Gensonden entworfen und synthetisiert, mit welchen die entsprechenden Zellen in der Ausgangsprobe identifiziert und gezählt werden können.

Ihre Geschwindigkeit, Einfachheit, Empfindlichkeit und Selektivität macht die PCR zu einem äusserst nützlichen Werkzeug bei Untersuchungen auf Genom-Basis, auch wenn als Ausgangsmaterial nur eine sehr geringe DNA-Menge zur Verfügung steht.

Möchte man Mikroorganismengesellschaften in verschiedenen Proben differenzieren, so wählt man universelle Primer. Als Resultat erhält man PCR-Produkte, die aufgrund der Primer-Wahl aus gleich grossen DNA-Fragmenten bestehen. Sie unterscheiden sich jedoch in den variablen Sequenzabschnitten – entsprechend den unterschiedlichen Mikroorganismen in der Probe. Diese gleich langen, aber verschieden strukturierten DNS-Moleküle werden mit DGGE (*de-*

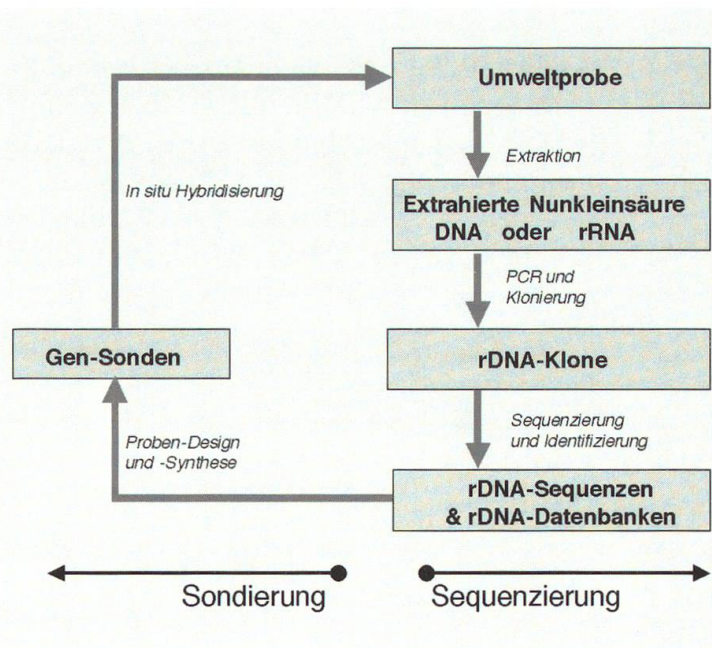


Abbildung 5: Prinzipielle Schritte bei der Mikroorganismenidentifizierung auf Genom-Basis (AMANN et al. 1995).

naturing gradient gel electrophoresis) oder (*temporal temperature gradient gel electrophoresis*) für die weitere Analyse voneinander getrennt (Abbildung 6). Beim DGGE wird mit einem chemischen Gradient, beim TTGE mit einem Temperaturgradient während der Gelelektrophorese gearbeitet. Positionen und Anzahl Banden auf dem Gel lassen Aussagen über die Mikroorganismen-diversität innerhalb der PCR-Produkte machen. Ein besonderer Vorteil der DGGE/TTGE besteht darin, dass in einem Gel mehrere Proben parallel aufgearbeitet werden können. Da jedes Fragment ein charakteristisches Laufverhalten hat, sind Banden in gleichen Positionen unterschiedlicher Proben in der Sequenz identisch: Sie stammen also vom gleichen Organismus. Damit wird es möglich, Bandenmuster unterschiedlicher Proben zu vergleichen. Die Banden können aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Sequenz, das heisst die Basenabfolge der DNS-Fragmente, bestimmt werden.

7. Nachweis der Mikroorganismen bei Abbaubersuchen in Erde und Kompost

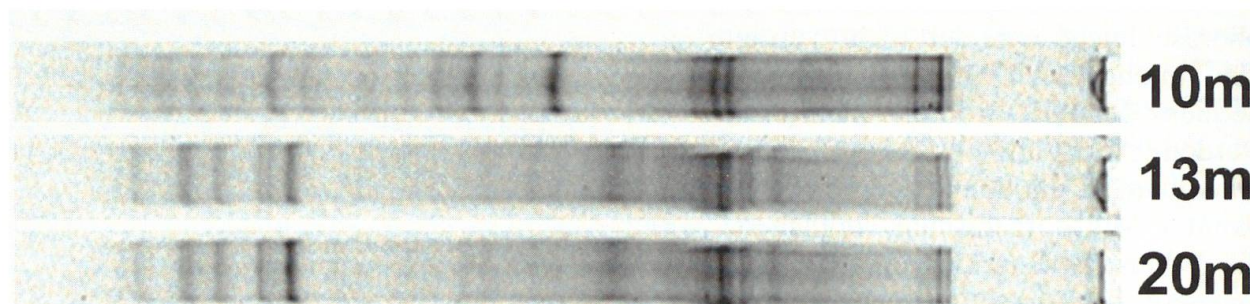
An der EMPA St.Gallen haben wir zwei Laboranlagen entwickelt, mit welchen es möglich ist, den mikrobiologischen Abbau von Prüfmaterialien in Erde und Kompost zu verfolgen. Für den Nachweis der Vollständigkeit des biologischen Abbaus wird eine Kohlen-

stoffbilanz erstellt (Abbildung 7). Mit chemischen Bestimmungsmethoden werden die einzelnen Terme quantifiziert. Beim biologischen Abbau setzen Mikroorganismen das eingebrachte Prüfmaterial um. Sie veratmen es zu Kohlendioxid (Mineralisation) oder bilden neue Biomasse (Assimilation). Das freigesetzte Kohlendioxid wird im Gasstrom mitgeführt und kann nachgewiesen werden. Für die quantitative Bestimmung der Biomasse musste eine Methode gefunden werden, welche den in den Mikroorganismen gespeicherten Kohlenstoff erfasst. Die Biomasse (lebende, tote und ruhende Mikroorganismen) muss sowohl bei Versuchsbeginn als auch bei Versuchsende quantitativ bestimmt werden.

Zur Auswahl standen die Nachweismethoden der Bodenmikrobiologie (Abbildung 2). In einem Vorversuch wurden folgende Methoden verglichen: TVC-Methode, Respirations-Simulations-Methode und der Nachweis der beiden Biomarker Protein und organisch gebundener Stickstoff. Mikrobiell aktive Erde wurde mit Glucose versetzt und die Biomasse bei Versuchsbeginn und nach fünf Tagen bestimmt. Bei allen Methoden wurde mit Umrechnungsfaktoren aus der Literatur auf den in der Biomasse gebundenen Kohlenstoff geschlossen.

Sowohl die TVC-Methode als auch die Respirations-Simulationsmethode waren zu wenig sensitiv für unser Experiment. Bei der Proteinbestimmung störten – auch bei starker Verdünnung – die Huminstoffe in den Bodenproben. Die Bestimmung des organisch gebundenen Stickstoffs (Kjeldahl-Auf-

Abbildung 6:
Auftrennung/Differenzierung von
PCR-Produkten mit der TTGE-Methode
(BOSSHARD et al. 1998).



schluss) lieferte gute Resultate. Eine Zunahme der Biomasse während des Versuches konnte beobachtet werden.

Die Methode wurde für unsere Abbauversuche validiert. Im Prüfmaterial selber ist kein Stickstoff enthalten. Es wird vorausgesetzt, dass der organisch gebundene Stickstoff bei den Laborversuchen aus der Biomasse stammt und dass sich die Biomasse bei Versuchsbeginn und -ende in ähnlichem physiologischen Zustand befindet (Hungerzustand). Mit dem Wert des organisch gebundenen Stickstoffs wird mit einem Umrechnungsfaktor auf den in der Biomasse gebundenen Kohlenstoff geschlossen. Der Umrechnungsfaktor C/N wurde mit Mikroorganismen aus reifer Komposterde experimentell bestimmt.

Der Kjeldahl-Aufschluss funktioniert folgendermassen: Die Proben werden durch Kochen mit konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart geeigneter Verbrennungskatalysatoren mineralisiert; dabei wird reduzierter Stickstoff quantitativ in Ammoniumsulfat übergeführt. Nach Zugabe von Lauge wird der freigesetzte Ammoniak im Wasserdampfstrom destilliert, in Borsäure aufgefangen und mit Salzsäure titriert. In Erde und Kompost ist Nitrat vorhanden. Dieses kann durch die organische Substanz während des Aufschlusses zu Ammonium reduziert und somit mitbestimmt werden. Die Proben werden nun mit Ozon vorbehandelt. Dabei wird das organische Material oxidiert und kann während des Aufschlusses nicht mehr reagieren.

Die Methode wurde bei mehreren Abbauversuchen angewendet. Sie liefert sehr gute Resultate. Die Kohlenstoffbilanz stimmt, das heisst die Terme auf der linken und rechten Seite sind gleich gross (Abbildung 7). Am Anfang des Versuches wird das Substrat (biologisch abbaubarer Werkstoff) vorwiegend in die Biomasse eingebaut. Nach zwei Monaten ist über 60% des Prüfmaterials umgesetzt: 66% wurde zu Kohlendioxid veratmet (Mineralisation), 33% in die Biomasse eingebaut (Assimilation). Nach drei

Monaten ist das Prüfmaterial vollständig umgesetzt: zwischen 80% und 90% wurden mineralisiert, der Rest wurde in der Biomasse wiedergefunden.

Für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität wurde die TTGE-Methode ausgewählt und an unseren Versuch angepasst. Vorversuche, welche mit Bodenproben aus den Erdsäulen bei Versuchsende vorgenommen wurden zeigen bereits positive Resultate. Die Beobachtung der mikrobiellen Populationen während des Abbaus ist das Ziel,

Kohlenstoffbilanz:

$$C_{PM-VB} + C_{MATRIX-VB} + C_{BIOMASSE-VB} = C_{PM-VE} + C_{MATRIX-VE} + C_{BIOMASSE-VE} + CO_2$$

Biologischer Abbau:

Abbaugrad [%] = $[CO_2 + \Delta C_{BIOMASSE} - \Delta C_{MATRIX}] / CO_{2\text{ THEORETISCH}}$

Dabei bedeutet:

C_{PM-VB}	Kohlenstoffgehalt des eingebrachten Prüfmaterials
$C_{MATRIX-VB}$	andere Kohlenstoffquellen der Matrix (Erde/Kompost ohne Biomasse) bei Versuchsbeginn
$C_{BIOMASSE-VB}$	Kohlenstoff, der bei Versuchsbeginn in der Biomasse gespeichert ist
C_{PM-VE}	Kohlenstoffgehalt des restlichen, nicht abgebauten Prüfmaterials
$C_{MATRIX-VE}$	andere Kohlenstoffquellen der Matrix (Erde/Kompost ohne Biomasse) bei Versuchsende
$C_{BIOMASSE-VE}$	Kohlenstoff, der bei Versuchsende in der Biomasse gespeichert ist
CO_2	Kohlendioxidproduktion während des Versuches
$\Delta C_{BIOMASSE}$	= $C_{BIOMASSE-VE} - C_{BIOMASSE-VB}$
ΔC_{MATRIX}	= $C_{MATRIX-VE} - C_{MATRIX-VB}$
$CO_{2\text{ THEORETISCH}}$	Kohlendioxidproduktion bei vollständigem Abbau des Prüfmaterials

Abbildung 7: Kohlenstoffbilanz und Abbaugrad beim Laborversuch.

welches mit dieser Methode erreicht werden soll. Schön wäre es, wenn wir eine Sukzession von Mikroorganismen während des Abbaus beobachten könnten.

8. Schlussfolgerung

Mit den heute bekannten Nachweismethoden können sehr viele verschiedene Aspekte von Mikroorganismen im Boden erforscht werden. Die Resultate, welche man bei der jeweiligen Nachweismethode erhält, müssen aber differenziert betrachtet und interpretiert werden. Vor allem müssen Grenzen der angewandten Methode erkannt werden. Der Boden ist ein äusserst komplexes Medium, das von vielen verschiedenen Umweltparametern beeinflusst wird. Dies hat Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit von Resultaten und ist auch der Grund, weshalb bei Experimenten, welche verschiedene Bodenproben untereinander vergleichen sollen, unter kontrollierten Laborbedingungen gearbeitet wird. Klug ist es auch, wenn man mehr als eine, voneinander unabhängige Nachweismethode heranzieht und bei unerwarteten Resultaten gründlich nachforscht, bevor man sie als richtige Werte akzeptiert. Die meisten Nachweismethoden betrachten die mikrobielle Biomasse als eine Einheit, obwohl verschiedene physiologische, morphologische und phylogenetische Mikroorganismengruppen im Boden miteinander vergesellschaftet sind. All diese Methoden versuchen deshalb einen annähernden Wert einer bis jetzt noch nicht bekannten Biomasse zu geben.

Alle Nachweismethoden der Bodenmikrobiologie können – und sei dies auch in stark zusammenfassender Form – in einem Übersichtsartikel nicht beschrieben werden. Wenn auch die eine oder andere Methode fehlt, so hoffe ich doch, dass der Leser einen Einblick in die Arbeit des Bodenmikrobiologen erhalten hat und dass er nun versteht, warum dieser die Erforschung der Mikroorganismen im Boden als wichtig und interes-

sant betrachtet. Wir sind auf die <neuen> Methoden auf molekulargenetischer Basis gespannt. Sie werden die mikrobiologischen Experimente und unser Wissen über das Ökosystem Boden in den nächsten Jahren bereichern.

Literaturverzeichnis

- ALEF, K. (1991): Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Aktivitäten/Biomasse/Differenzierung; – Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/Lech.
- ALEF, K. & NANNIPIERI, P. (1995): Methods in applied soil microbiology and biochemistry; – Academic Press limited, London.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; – Microbiological Reviews, Mar., 143–169.
- BECK, TH. (1984): Mikrobiologische und biochemische Charakterisierung landwirtschaftlich genutzter Böden. I. Mitteilung. Die Ermittlung einer bodenmikrobiologischen Kennzahl. II. Mitteilung. Beziehung zum Humusgehalt; – Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 147, 467–475.
- BOSSHARD, P.P., STETTLER R. & BACHOFEN R. (1998): Molecular characterization and spatial distribution of the bacterial populations in the meromictic Lake Cadagno. Documenta Ist. Ital. Idrobiol., 63, 53–56.
- JÖRGENSEN, R.G.; MÜLLER, T. & MEYER, B. (1988): Spezifische Zellkomponenten von Organismen in der organischen Substanz als Indikatoren der Zersetzung und zur Bestimmung der Biomasse, Anwendung auf eine Kompostierung von Weizenstroh; – Mitteilungen der Deutschen Bodenkundl. Gesellschaft, 56, 191–196.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & PARKER, J. (1997): Biology of Microorganisms. Eighth Edition; – Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R. (1993): Bodenbiologische Arbeitsmethoden. Zweite überarbeitete und erweiterte Auflage; – Springer-Verlag, Berlin.
- VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T. & WELLINGTON, E.M.H. (1997): Modern Soil Microbiology; – Marcel Dekker, Inc., New York.