Bernhard Hofbauer

Kompost auf dem Weg zur Terra Preta

Molekularbiologischer und Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich von Kompostvarianten

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Magister

der Studienrichtung Biochemie und Molekularbiologie
erreicht an der

Technischen Universität Graz

Univ.-Prof. Dr. Gabriele Berg
Institut für Umweltbiotechnologie
Technische Universität Graz

2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am …… …….....

(Unterschrift)

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

date…… ……

(signature)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriele Berg für die Möglichkeit diese Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen bedanken. Des weiteren danke ich Herrn Gerald Dunst, der das Vertrauen hatte in diese Arbeit zu investieren.

Ich danke Dr. Christin Zachow, dass sie mich durch diese Arbeit geleitet und begleitet hat. Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Umweltbiotechnologie für die Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und Freundin, die mich in jeglicher Hinsicht während meines gesamten Studiums unterstützt haben.

Kurzfassung

Kunstdüngung und intensive Bodenbearbeitung haben längerfristig negative Auswirkungen auf den Boden, dessen Biologie und senkt die Trinkwasserqualität. Deshalb gewinnen Maßnahmen zur Wiederbelebung der Böden immer mehr an Bedeutung. Eine außerordentlich fruchtbare schwarze Erde, entdeckt von Archäologen im Amazonasbecken, bietet eine Alternative zu Kunstdüngung und intensiven Bodenbearbeitung, weil Mineralien und der Nährstoffbedarf gedeckt sind sowie eine lockere Bodenstruktur erhalten bleibt. Die sogenannte Terra Preta wurde von einer Hochkultur, ansässig im Amazonasgebiet, entwickelt. Ein Schlüsselelement ist die beigefügte Holzkohle. Bei laufenden Versuchen der Firma Sonnenerde wird versucht, eine Erde mit ähnlichen Eigenschaften zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde vorwiegend die mikrobielle Gemeinschaft von Kompostvarianten und Terra Preta untersucht. Ziel war es, mit kultivierungsunabhängigen Analysen wie der Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Elektrophorese der 16S rDNA Genregion von Bakterien und der internal transcription spacers Region (ITS) von Pilzen, und der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) von Gammaproteobakterien, Firmicutes und nif-Genen, sowie mit kultivierungsabhängigen Methoden einen Überblick über die Mikroorganismengemeinschaft zu bekommen. Die Kultivierung und Anreicherung von Bakterien und Pilzen auf Selektivmedien und deren Zellzahlbestimmungen sollte Aufschluss über die Struktur und Diversität geben. Eine Ähnlichkeitsbestimmung der Kompostvarianten gegenüber der Terra Preta wurde durch die Erstellung von mikrobiellen Profilen taxonomischer Gruppen durchgeführt werden. In einem Gewächshausversuch wurde der Biomassezuwachs von Weidelgras in den Kompostvarianten gemessen. Zusätzlich wurde mit dem Konfokalen Laser Scan Mikroskop (CLSM) die Bakterienakkumulation in der Rhizosphäre visualisiert.

Die SSCP-Analysen zeigten, dass sich die Kompostvarianten mit Steigerung von Biokohle- und Gesteinsmehlanteil an die Terra Preta annähern. Eine quantitative Erhöhung der Mikroorganismen-DNA bei erhöhtem Biokohleanteil ist mit qPCR nachgewiesen und eine abundante Bakterienkolonisierung an Weidelgrasrhizosphäre mit CLSM visualisiert worden.

Es kann geschlussfolgert werden, dass Biokohle ein Schlüsselelement bei der Entwicklung eines Terra Preta ähnlichen Bodens ist und dass die Kohle ein Milieu schafft, in dem sich die untersuchten Mikroorganismen besser entwickeln können.

Abstract

Artificial fertilizers and intensive cultivation have long term negative impact on the soil and its biology and decreases the quality of drinking water. Therefore, measures to revitalize the soil get more and more important. An extremely fertile black earth, discovered by archaeologists in the Amazon Basin, offers an alternative to artificial fertilizers and intensive tillage. Nutrients and minerals are well charged and the structure of the soil is received loose. The so-called Terra Preta was developed by an advanced civilization, located in the Amazon region. A key element is the enclosed charcoal. In ongoing attempts by the company Sonnenerde is trying to develop a soil with similar properties. In this work, mainly the microbial community of compost treatments and Terra Preta was studied. The aim was to analyses the microbial communities with culture-independent and -dependent methods to get an overview about the microorganism community in soil. The single strand conformation polymorphism and quantitative real time PCR were used methods for not cultivable microorganisms. The cultivation and enrichment of bacteria and fungi on selective media and their cell counts shed light on the structure and diversity of the microorganisms. A similarity determination of the compost treatments compared to Terra Preta was done to create profiles of microbial taxonomic groups. In a greenhouse experiment the increase of the biomass of grass cultivated in different compost variants was measured. In addition, the accumulation of bacteria in the rhizosphere was visualized with the confocal laser scanning microscope (CLSM).The SSCP-analysis showed that the compost treatments converge with increase of biochar and rock flour to Terra Preta. A quantitative increase in microbial DNA in biochar was detected by qPCR and an abundant bacteria colonization on rhizosphere of grass with CLSM has been visualized.

It can be concluded that biochar is a key element for the development of Terra Preta soil and that the char creates a habitat in which the tested microorganisms can develop better.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 6

1. Einleitung 8

2. Material und Methoden 14

2.1 Übersicht 14

2.2 Herstellernachweis 15

2.3 Zusammensetzungen der Nährmedien 15

2.4 Probenahme 19

2.4.1 Probenaufarbeitung 20

2.5 Kultivierungsabhängige Analyse der Mikroorganismen 21

2.6 Kultivierungsunabhängige Analyse von Mikroorganismen 21

2.6.1 Extraktion der DNA 21

2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR 22

2.6.3 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 23

2.6.4 Quantitative Real-Time PCR 30

2.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Konfokale Laser Scan Mikroskopie 34

2.7.1 Paraformaldehyd Fixierung 34

2.7.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) 34

2.7.3 Confocal laser-scanning microscopy (CLSM) 35

2.8 Biomassezuwachs von Weidelgras 36

2.8.1 Durchführung 36

2.9 Statistik 37

3. Ergebnisse 38

3.1 Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Analyse der Mikroorganismen 38

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl 38

3.1.2 Analyse der Mikroorganismengemeinschaft in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP 41

3.2 Ergebnisse der qPCR 50

3.2.1 Visualisierung unterschiedlicher Bakteriengemeinschaften auf Rhizosphäre aus Kompostvariante I 60

4. Diskussion 65

5. Literaturverzeichniss 70

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
CFU	Colony Forming Units
Ct	Cycle Threshold
deion.	deionisiert
DES	DNase/Pyrogen-Free Water (DNase/Pyrogen freies Wasser)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
HCl	Salzsäure
Kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
LB	Luria-Bertani-Medium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MPN	most probable number (statistisches Verfahren zur Abschätzung der Anzahl von Mikroorganismen)
NA	Nähragar
NaOH	wie wäre es mit Natriumhydroxid?
NB	Nährbouillon
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Potato Dextrose Agar (gehört aber in die Medienabteilung inkl. Des Herstellernachweises)Kartoffelextrakt – Glukose-Bouillon
pH	pH-Wert; negative dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
qPCR	quantitative Real-Time PCR
rcf	relative centrifuge force
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Units
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WA	Waksman Agar
wt/vol	Gewichtsanteil / Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
µL	Mikroliter
16S rDNA	16S rRNA kodierender Genabschnitt (Bakterien)
18S rDNA	18S rRNA kodierender Genabschnitt (Pilze)

1. Einleitung

Das bestehende Potential zur Ertragssteigerung durch intensive Landnutzung ermuntern land- und forstwirtschaftliche Betriebe zu trügerischen Maßnahmen. Diese ertragssteigernden Techniken wie zum Beispiel, Kunstdüngung, intensive Bodenbearbeitung, Monokulturen und Schädlingsbekämpfung durch Pestizide, wirken sich längerfristig negativ auf den Boden und dessen Biologie aus. Monokulturen zerstören durch ihre einseitige Wurzelmasse die mikrobiologische Vielfalt im Boden (Forest et al., 2011). Dadurch werden die Abbaumöglichkeiten von organischem Material eingeschränkt und der Humusaufbau gestoppt. Folglich kommt es zur intensiven Bodenbearbeitung, die den Lebensraum der Mikrobiologie und der Kleintiere stört. Das Hauptproblem ist die wendende Bodenbearbeitung mit dem Pflug. Die Bodenschichtung wird dadurch zerstört und der erhöhte Sauerstoffeintrag fördert den Nährstoffabbau (Balesdenta et al., 2000). Mögliche Konsequenzen sind eine wasserlösliche Mineraldüngung, die jedoch die Salzkonzentration einzelner Nährstoffe auf ein unnatürlich hohes Niveau anhebt und die Bodenbiologie aus dem Gleichgewicht bringt. Die Ausbringung von Gülle die nicht aufbereitet wurde, hat eine ähnliche Wirkung wie wasserlösliche Mineraldüngung und enthält zusätzlich toxische Faulstoffe. Eingesetzte Pestizide stören das Gleichgewicht im Boden, sind zum Teil schwer abbaubar und können wie wasserlösliche Mineraldünger und Gülle ins Grundwasser vordringen (Hai, et al 2009).

Eine Alternative zur intensiven Bodenbearbeitung, die dessen Biologie längerfristig stark reduziert, ist der Aufbau eines Dauerhumus, durch einen schonenden und konservierenden Ackerbau. Dabei wird im Gegensatz zur konventionellen Bodenbearbeitung der Boden nicht gewendet sondern organisches Material oberflächlich eingearbeitet (Nitzsche et al 2004). Humus ist die Gesamtheit der organischen Bodensubstanz. Man unterscheidet dabei zwischen Dauerhumus und Nährhumus. Dauerhumus besteht aus Humusstoffen die von Mikroorganismen durch fortdauernde Auf-, Um,- und Abbauvorgänge hergestellt wurden. Nährhumus setzt sich aus Stoffen zusammen die Mikroorganismen verwerten können. Als Nebenprodukte können lebenswichtige Substanzen für Pflanzen freigesetzt werden (Dunst, et al 2012).

Die natürliche Humusentstehung basiert auf dem Abbau von abgestorbener Biomasse durch Mikroorganismen. Die Humusanreicherung variiert je nach Pflanzenbesiedelung und klimatischen Einflüssen. In der Abbildung 1 ist die weltweite Anreicherung von Humus dargestellt. Es wird gezeigt, dass in kalten Regionen wie, Nordamerika, Skandinavien Schottland und Sibirien eine höhere Humus Akkumulierung als in Steppen, in denen sandige Böden mit einem Humusgehalt von unter 1% vorherrschen, stattfindet. Auch die Gebiete um den Amazonas sind für ihre humusarmen Böden (Oxisole) bekannt. Neben den Eintrag von abbaubarer Biomasse ist ein Hauptgrund für diese Humusverteilung die durch das Klima beeinflusste biologische Aktivität von Mikroorganismen (Stevenson, et al., 1994).

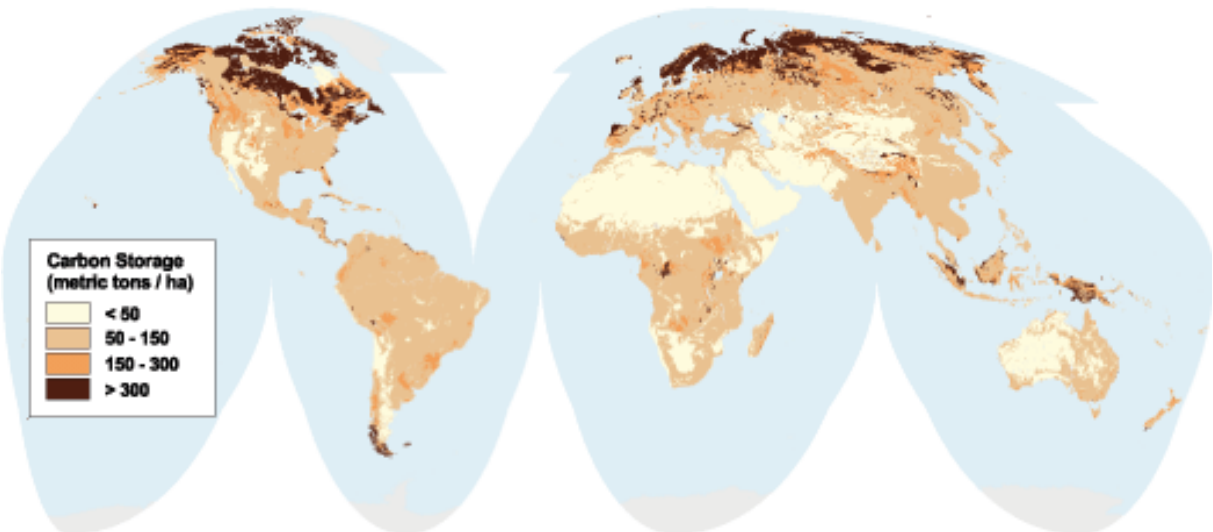

Abb.1: Weltweite Humusanreicherung. Nur 2% der weltweiten Erdoberfläche ist reich an Humus. Quelle: Batjes, 1996, FAO. 1995

Für die Entwicklungshilfe von Humus ist eine Beimpfung von Boden mit schadstoffarmem Kompost die sicherste und billigste Variante. In empirischen Versuchsdurchführungen wurde festgestellt, dass sich die Einarbeitung von Kompost positiv auf die Bodenbeschaffenheit auswirkt (Cogger,. et al., 2005). Die Grundlage von Kompost sind organische Abfälle, die sowohl in kommunalen (Haushalten) wie auch in land- und forstwirtschaftlichen Bereichen und deren nachgeschalteten Gewerbe anfallen. Das erhebliche Potential an Nährstoffen und Energie führt bei umweltschonender Nutzung dieser Rohstoffe zu einer langfristigen Anreicherung von Nährstoffen im Boden.

Die Kompostierung erfolgt in einer Miete in der die Rohstoffe möglichst gut durchmischt vorliegen und die Luftzufuhr durch regelmäßiges Umsetzen und teilweise zusätzlicher Belüftung gewährleistet wird . Die Transformation der organischen Substanzen unterliegt biochemischen Reaktionen. Der Kompostierungsprozess kann in 4 Phasen eingeteilt werden, die sich durch die Mietentemperatur und vorherrschenden Mikroorganismen unterscheiden. (Dunst, et al 2012). Während der ersten Phase wuchert eine facettenreiche Population von mesophilen Bakterien und Pilzen. Es werden vorwiegend leicht abbaubare Nährstoffe umgesetzt und die Temperatur auf 45°C angehoben. Bei diesem Punkt stoppt die Vegetation der Zellen, dadurch zerfallen diese und nur hitzeresistente Sporen überleben. Nach einer kurzen Verzögerung kommt es zu einem erneuten Temperaturanstieg. Die zweite Phase ist durch die Entwicklung thermophiler mikrobieller Population gekennzeichnet die aus einigen Bakterienspezies, Actinomyceten und Pilzen besteht. Das Temperaturoptimum dieser Organismen liegt zwischen 50°C und 65° und ihre Aktivität wird bei 70-80°C gestoppt. Die dritte Phase wird als stationäre Phase bezeichnet, wo keine signifikanten Temperaturwechsel stattfinden. Die mikrobielle Wärmeproduktion und die Dissipation gleichen sich aus. Die thermophilen Mikroorganismen bleiben bestehen. Die vierte Phase ist charakterisiert durch einen graduellen Temperaturverlust und wird als Reifungsphase bezeichnet. Mesophile Mikroorganismen, die die Hitze überlebt haben oder von den äußeren kühleren Schichten eindringen, ersetzten die thermophilen Mikroorganismen und führen den Abbauprozess fort. (Neklyudov et al., 2006; Smith & Collins et al., 2007).

Derzeit laufen Forschungen zur Optimierung des Kompostiervorganges und dem folgenden Humusaufbau. Eine Anregung zu diesem Projekt war unter anderem die Entdeckung von extrem fruchtbarer humusreicher Erde im Amazonasbecken. Archäologen stießen im 20. Jahrhundert auf das Phänomen der Terra Preta (schwarze Erde). Es handelt sich dabei um eine nachhaltig fruchtbare Erde, die für die ortsbezogenen tropischen Verhältnisse und der dort vorherrschenden gelben, unfruchtbaren Verwitterungsböden (Oxisole) untypisch ist. Ungefähr 10% Amazoniens sind von Terra Preta bedeckt. Erste Hinweise lieferten Aufzeichnungen des Konquistador Francisco Orellana, der als erster Europäer eine Expedition in den Amazonas im 16 Jahrhundert unternahm (Bertelsmann Lexikon Band II, 1985). Seit den 1990er Jahren wird die Zusammensetzung der Terra Preta und das Geheimnis ihrer Entstehung von Bodenkundlern erforscht. Ein Team der Universität Bayreuth um den Wissenschaftler Dr. Bruno Glaser konnte beweisen, dass die Terra Preta von Menschenhand entwickelt wurde. Die Böden sind zwischen 500 und 3000 Jahre alt und sind auch ohne Mineraldüngung außerordentlich fruchtbar (Glaser et al., 2004). Die Wasserspeicherfähigkeit ist enorm und sie hat eine hohe Pufferkapazität. Die Dissimilation von Biomasse ist stark reduziert, stattdessen

kommt es zum Aufbau von Dauerhumus mit hohem Nährstoffgehalt. Im Rahmen von Strukturanalysen wurden Tonscherben und Kohlestaub in der Erde gefunden (Glaser et al., 2001).

Forschungen in Japan und den USA haben gezeigt, dass Kohle die Aktivität einiger in der Agrarkultur wichtiger Mikroorganismen stimuliert und einen positiven Effekt auf die Erdeigenschaften hat (Ogawa et al., 1986; Pietikäinen et al. 2000). Die porenreiche Struktur von Kohle bietet ein geeignetes Habitat für Mikroorganismen indem sie Schutz vor Prädation und Austrocknung bietet. Die Adsorption von lösbaren organischen Stoffen, Gasen und anorganischen Mineralstoffen fördert Kolonisierung, Wachstum und Reproduktion von Mikroorganismen.

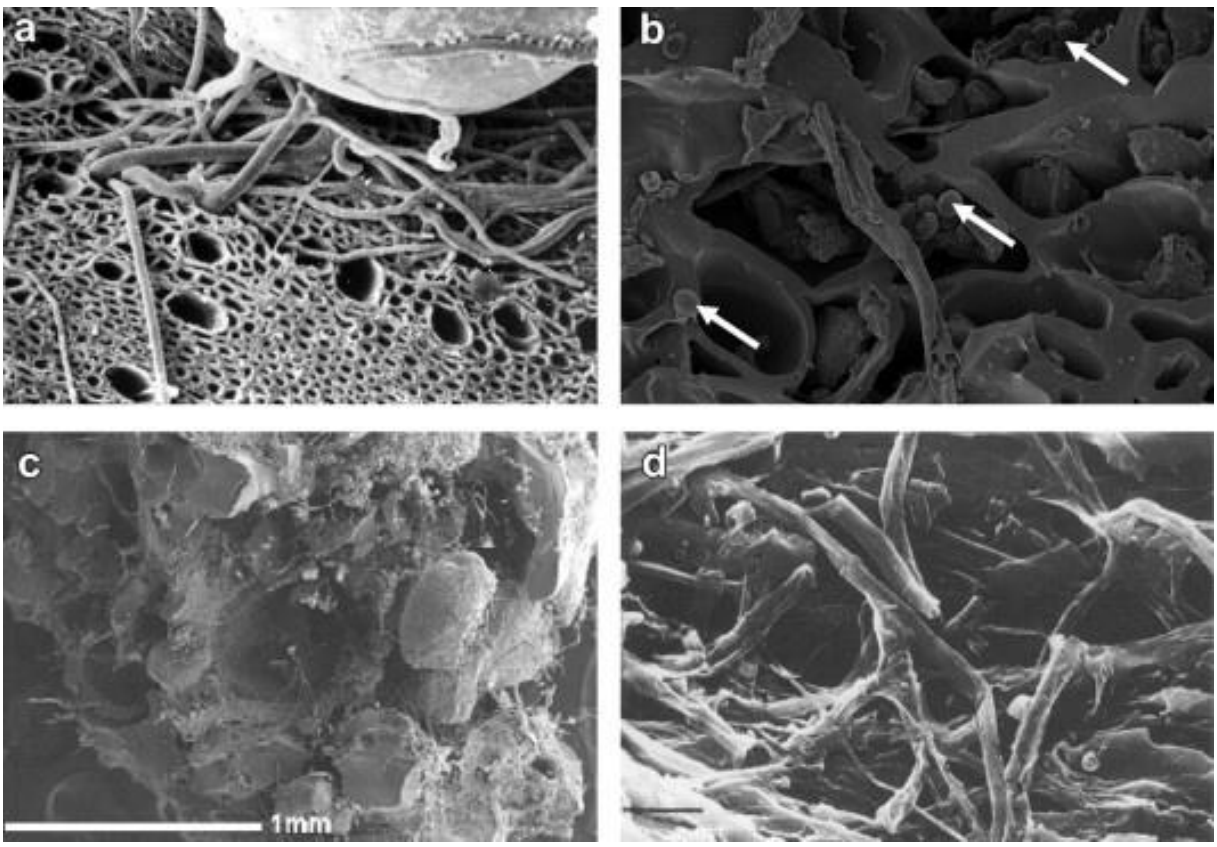

Abb.: 2. Visualisierung der Assoziation und Kolonisation von Mikroorganismen auf Biokohle. (a) *Mykorrhiza Pilzhyphen* wachsen in Biokohleporen (Lehmann und Joseph, 2009); (b) Biokohlekorn zeigt Mikroorganismen in Poren (Jin, 2010). (c) 100-Jahre-alte Kohle entstanden bei einem Waldbrand isoliert (Hockaday et al., 2007); (d) 350 Jahre alte Kohle die durch einen Waldbrand entstand (Zackrisson et al., 1996).

Zurzeit wird in der Firma Sonnenerde an der Entwicklung einer Terra Preta ähnlichen Erde gearbeitet. Ein Schlüsselelement in dieser Erde ist die Kohle. Anstatt Holzkohle wird

Biokohle verwendet. Sie kann aus Abfällen hergestellt werden und die Holzkohle hundertprozentig ersetzen (Schmidt et al 1996).

Bei laufenden Versuchsreihen der Firma Sonnenerde soll die optimale Menge an Biokohle und der richtige Zeitpunkt der Biokohle-Zugabe während der Kompostierung ermittelt werden. Die hergestellten „Terra-Preta-Komposte“ werden anschließend in Topfversuchen getestet und mikrobiologisch analysiert.

Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Kompostvarianten und originaler Terra Preta. Dafür wurden Kompostproben der Firma Sonnenerde und Proben einer Terra Preta, die von der Uni Leipzig zu Verfügung gestellt wurde, untersucht. Es wurde der Einfluss von Gesteinsmehl und Kohle in Komposten untersucht und mit Terra Preta verglichen.

Bei den kultivierungsabhängigen Methoden, wurden Bakterien und Pilze auf Selektivmedien kultiviert und angereichert und die Zellzahl bestimmt.

Zur weiteren Untersuchung wurden die kultivierungsunabhängige Methoden, Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) der 16S rDNA Genregion der Bakterien und der internal transcription spacers (ITS) Region der Pilze und quantitative Real-Time PCR (qPCR) der Gammaproteobakterien, Firmicutes und nif-Gene genutzt. Die Ähnlichkeit bzw. Diversität zwischen den einzelnen Kompostvarianten und Terra Preta wurde mittels Erstellung mikrobieller Profile verschiedener taxonomischen Gruppen (Bakterien, Pilze, Firmicutes, Gammaproteobakterien und *Pseudomonas*) und anschließender Auswertung mit dem Computerprogramm GelCompar® II analysiert.

Weiters wurde die Kolonisierung von Bakterien, Alphaproteobakterien und Gammaproteobakterien auf Wurzeln von Weidelgras, das während eines Gewächshausversuches in den Kompostvarianten kultiviert wurde, mit FISH-CLSM (engl. Fluorescence-*in-situ*-hybridisation and confocal laser scanning microscopy) visualisiert. Der Biomassezuwachs von Weidelgras in den Kompostvarianten und handelsüblicher Anzuchterde wurde in einem im Rahmen eines Gewächshausversuches bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Im folgenden Flussschema (siehe Abb. 3) kann der Arbeitsverlauf nachverfolgt werden.

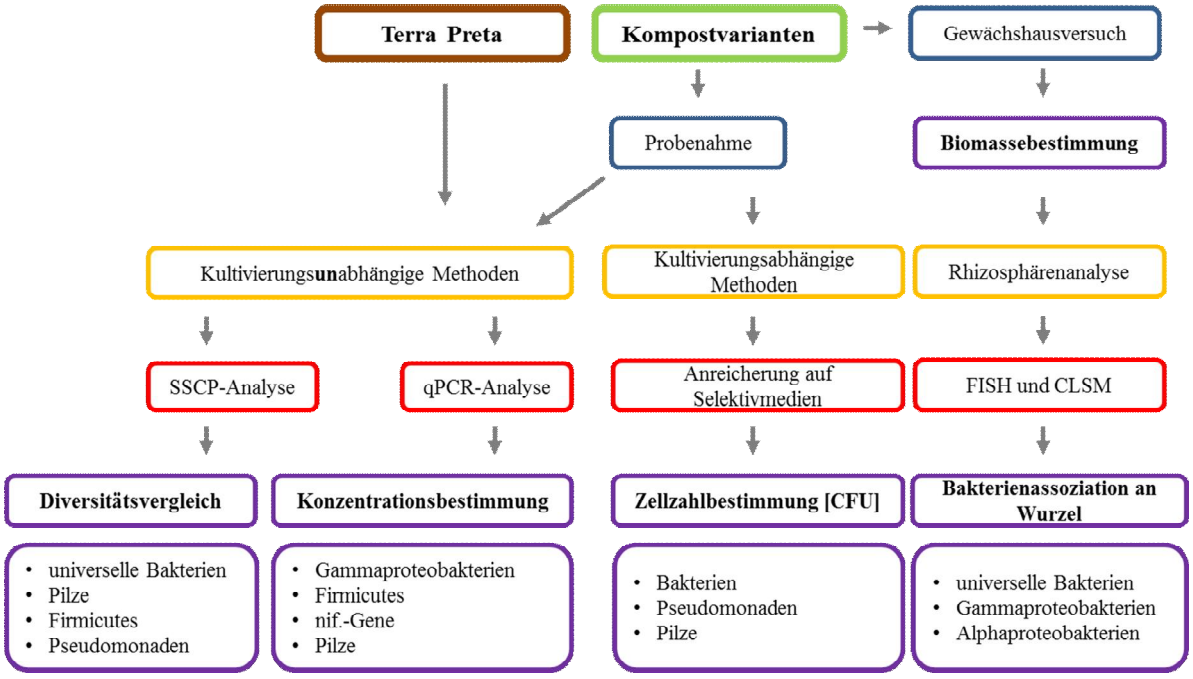

Abb. 3: Übersicht vom Arbeitsverlauf mit den verwendeten Methoden und untersuchten Mikroorganismen

2.2 Herstellernachweis

Alle verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applied Biosystems (Foster City, USA), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Lofer, Österreich), Lactan (Graz, Österreich), Merck (Darmstadt, Deutschland), MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland), SIFIN (Berlin, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Qiagen (Wien, Österreich), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.3 Zusammensetzungen der Nährmedien

Alle verwendeten Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Ausnahmen sind im Arbeitsprotokoll angegeben.

<u>Nährmedien:</u>

PDA-Agar: (1 L)

26,5g Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon (Roth)
15g Agar
auf einen Liter mit deion. Wasser auffüllen

Pilzkonservierungsmedium:

120mL Glycerin
40mL 50% Glukose
20mL 20% Pepton
20mL 10% Hefeextrakt
alle Lösungen extra autoklavieren

R2A-Agar: (1 L)

18,1g R2A Fertigmedium (Roth)

Nystatin: 50mg/L

auf einen Liter mit deion. Wasser auffüllen

S.O.C.-Medium:

2% Pepton

0,5% Hefeextrakt

10mM Natriumchlorid

10mM Magnesiumchlorid

2,5mM Kaliumchlorid

10mM Magnesiumsulfat

10mM Natriumchlorid

20mM Glucose

Lösungen:

Crush and Soak: (50,0mL)

105,7mg Magnesiumacetat

1,9g Ammoniumacetat

18,5mg EDTA (pH 8,0)

250µL 20% SDS

auf 50,00mL mit Wasser UVclear auffüllen

0,5 M EDTA-Stammlösung: (pH 8,0, 180ml)

37,3g Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

12,0g 10 M NaOH

8,0g 1M NaOH

auf 18,0mL mit deion.Wasser auffüllen

DNA-Extraktionspuffer für SSCP: (200ml)

2,40g 100 mM Tris

7,45g 100 mM EDTA Chelaplex III mit H2O

1,17g 100 mM NaCl

2,00g 1% Polyvinylpyrrolidone (PVPP)

20,00mL von 20% SDS 2% SDS

auf 200mL mit deion. Wasser auffüllen und autoklavieren

Ladepuffer 6×: (nach Sambrook / Fritsch / Manatio, 1989)

30% Glycerin in deion. Wasser

0,25% Bromphenolblau (300-500 bp)

0,25% Xylencyanol (4000-5000 bp)

Farbstoff nach Augenmaß zugeben

3 M Natriumacetat-Lösung: (pH 5,2)

4,9g Natriumacetat

4,5mL 1 N HCl

15,5mL deion. Wasser

50× TAE Puffer: (1L)

242g Tris (99,9%)

57mL Eisessig

100mL 0,5 M EDTA

auf 1L mit deion. Wasser auffüllen

für geringere Konzentrationen dementsprechend verdünnen

50× TAE Puffer: (1L)

242g Tris (99,9%)

57mL Eisessig

100mL 0,5 M EDTA

auf 1L mit deion. Wasser auffüllen

für geringere Konzentrationen dementsprechend verdünnen

5× TBE Puffer: (1 L)

54g Tris HCl

27,5g Borsäure

20mL 0,5 M EDTA

auf 1L mit deion. Wasser auffüllen

1 M Tris-HCl-Stammlösung: (pH 8,5)

24,2g Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

9,6mL konz. HCl

190,4mL deion. Wasser

2.4 Probenahme

Es wurden Mischproben von neun Kompostvarianten bei der Firma Sonnenerde **(Versuchreihe „E“ der Firma Sonnenerde, Riedlingsdorf, Österreich)** entnommen. Die untersuchten Komposte wurden mit unterschiedlichen Mengen an Holzkohle und Gesteinsmehl zu Rottenbeginn beaufschlagt. Das Rohmaterial war Milchschlamm und Grünschnitt im Volumenverhältnis 1:1. Die Komposte wurden am 05.August 2010 aufgesetzt und zweimal wöchentlich umgesetzt. Nach acht Wochen Rottendauer wurde auf 15 mm gesiebt und für die weitere Lagerung im Freien mit Flies abgedeckt. Zu der homogenisierten Ausgangsmischung wurden verschiedene Mengen an Zuschlagstoffen zugegeben (Tab. 1).

Tab. 1: Zusammensetzung der untersuchten Kompostvarianten

Kompost	Holzkohle	Gesteinsmehl
A	0%	0%
B	0%	5%
C	0%	10%
D	10%	0%
E	10%	5%
F	10%	10%
G	20%	0%
H	20%	5%
I	20%	10%

Die Bodenproben von originaler Terra Preta (TP) aus dem Amazonasgebiet wurden von verschiedenen Schichttiefen entnommen (20cm, 40cm und 70cm) und von der Universität Leipzig vom Institut für Bakteriologie und Mykologie zu Verfügung gestellt. Als Vergleichsboden wurde eine Probe von einem Sportplatz (S) entnommen.

Rhizosphäre wurde im Rahmen eines Gewächshausversuches, mit verschieden Kompostvarianten, isoliert. Mit einem Stahlrohr wurde aus der Mitte des Topfes Rhizosphäre ausgestochen und transportfähig verpackt.

Abb. 4: Probenahme der Rhizosphäre von Weidelgras, das in den verschiedenen Kompostvarianten gezogen wurde.

2.4.1 Probenaufarbeitung

Rhizosphäre & Bodenproben:

Bei der Probenaufarbeitung wurde unter semisterilen Bedingungen 20g Wurzel- bzw. 5g Kompostmaterial in 50ml Röhrchen eingewogen, mit 45ml steriler 0,85% NaCl-Lösung versetzt und durch 3min vortexen homogenisiert. Anschließend wurden 2mL der Suspension entnommen, für 20min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zentrifugation wiederholt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei -70°C eingefroren. Bei den Terra Preta Proben wurden dieselben Arbeitsschritte durchgeführt jedoch wurden aufgrund der geringen

Probenmenge nur 2g Erdmaterial eingewogen. und mit 45ml 0,85%tiger NaCl-Lösung versetzt.

2.5 Kultivierungsabhängige Analyse der Mikroorganismen

Strukturelle und funktionelle Parameter von Mikroorganismen wurden durch eine Kombination verschiedener Techniken erfasst. Im Allgemeinen, unterscheidet man zwischen kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden. Kultivierungsabhängige Analysen haben den Nachteil, dass nur ein sehr geringer Anteil an Mikroorganismen erfasst werden kann (Stanley und Konopka, 1985).

Die kultivierbaren Mikroorganismen wurden auf Selektivmedien angereichert und morphologisch sowie quantitativ analysiert.

2.6 Kultivierungsunabhängige Analyse von Mikroorganismen

Mit der kultivierungsabhängigen Methode kann nur ein geringer Anteil aller Mikroorganismen kultiviert werden. Aus diesem Grund lag das Hauptaugenmerk bei dieser Arbeit auf kultivierungsunabhängigen Methoden, wie dem Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) und der quantitativen Real-Time PCR (qPCR).

2.6.1 Extraktion der DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte zum größten Teil nach dem Hersteller-Protokoll von Fast DNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich), allerdings mit einigen Veränderungen:

- Das gesamte abzentrifugierte Pellet wurde mit 900µL anstatt der vorgeschriebenen 978µL Sodium Phosphate-Puffer in das Schraubgefäß transferiert und mit 120µL MT-Puffer versetzt.
- Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

- Nachdem die DNA an die Binding Matrix Suspension gebunden hat, wurden anstatt 500 µL, 600 µL der oberen Flüssigkeit vorsichtig dekantiert.

2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung von definierten DNA-Abschnitt eingesetzt. Die wichtigsten Komponenten hierfür sind neben dem Template eine thermostabile DNA-Polymerase und spezifisch bindende Primer. Die Polymerase kopiert die DNA-Sequenz des Templates (Original-DNA) ausgehend von einem Primer. Der replizierende Bereich wird von 2 Primer (forward und reverse) begrenzt und bestimmen den Startpunkt der Polymerase (Saiki et al., 1988).

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden jeweils 3µL der Ansätze mit Loading Dye [6 ×] auf einem 0,8%igen Agarosegel, in 1 × TAE-Puffer aufgetrennt (Laufzeit ca. 20min bei 100V). Die Färbung des Gels erfolgte für ca. 15min in einem Ethidiumbromid-Bad [0,01%] und wurde anschließend unter UV-Licht visualisiert. Der Tabelle 2 sind die eingesetzten Primer für die jeweiligen Mikroorganismen zu entnehmen.

Tab. 2: Sämtliche Primer für SSCP- , qPCR und FISH

Primer-Name	Primer-Sequenz	Ziel -Organismus	PCR-Programm
Unibac-II-515f	5' GTG CCA GCA GCC GC 3'	Eubakterien	UnibacL
Unibac-II-927rP	5' CCC GTC AAT TYM TTT GAG TT 3'	Eubakterien	UnibacL
1492r	5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	Eubakterien	Eubac
F311Ps	5' CTG GTC TGA GAG GAT GAT CAG T 3'	*Pseudomonas*	Pseu
1459rPs	5' AAT CAC TCC GTG GTA ACC GT 3'	*Pseudomonas*	Pseu
Gamma395f	5' CMA TGC CGC GTG TGT GAA 3'	Proteobakterien	Gamma
Gamma871rP	5' ACT CCC CAG GCG GTC DAC TTA 3'	Proteobakterien	Gamma
ITS1f	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'	Fungi	ITS Touc
ITS4rP	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	Fungi	ITS Touc
ADF681F	5' AGT GTA GAG GTG AAA TT 3'	Proteobakterien	Alpha
BLS 342f	5' CAG CAG TAG GGA ATC TTC 3'	Firmicutes	Bac
BACr 833P	5' CTA ACA CTT AGC ACT CAT 3'	Firmicutes	Bac

2.6.3 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Mit Hilfe der SSCP-Analyse können neben den kultivierbaren auch nicht kultivierbare Mikroorganismen untersucht und verglichen werden. Hierfür werden DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenzen verwendet, die durch eine PCR amplifiziert werden.

Bei Bakterien sowie Pilzen werden Abschnitte der 16S rDNA-Gene amplifiziert, wobei einer der beiden Primer am 5' Ende phosphoryliert sein muss. Der phosphorylierte Strang des resultierenden PCR-Produkts wird mit Hilfe einer Lambda-Exonuklease abgebaut. Anschließend erfolgt eine Denaturierung des verbleibenden Einzelstranges durch Hitze und Formamid. Die Faltung des komplementären Stranges ist sequenzspezifisch und bildet Sekundärstrukturen die unterschiedliche Laufweiten im nicht denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese-Nachweis zeigen (Tebbe et al., 2001; Rochelle, 2001).

Es können Primer gewählt werden, welche spezifisch für eine spezielle Organismengruppe sind. Durch einen Vergleich der Bakterien- und Pilzprofilen von den Kompostvarianten und Terra Preta Proben wurden ein Überblick von der Mikroorganismengemeinschaft geschaffen.

Dendrogramme mit dem Computerprogramm GelCompar® II ermöglichten gegenüber dem menschlichen Auge eine sensitivere Auswertung.

2.6.3.1 SSCP-PCR

Die verwendeten Primer für die Ampifikation der 16S rDNA sind in Tabelle 2 aufgelistet

<u>Gesamte Bakterien-Gemeinschaft:</u>

Um die 16S rDNA einer bakteriellen Gemeinschaft zu erhalten, wurde eine sogenannte „nested“ PCR (verschachtelte PCR) durchgeführt. Dabei wird das Produkt der ersten PCR als Template in eine zweite Reaktion eingesetzt, das zweite Amplifikat stellt einen kürzeren Abschnitt des ersten Produkts dar. Mit diesem Verfahren kann die Sensitivität einer PCR erhöht werden, so dass auch kleine Mengen an Template-DNA eine Ausbeute an Produkt liefern und eine Analyse ermöglichen.

Reaktionsansatz für Unibac-PCR (1. PCR):

Taq-&GO™ [5 ×]	2,0µL
Primer 27f [10 pmol/µL]	0,1µL
Primer 1492r [10 pmol/µL]	0,1µL
PCR-Wasser	6,8µL
DNA-Template	1,0µL
Gesamtvolumen	10µL

Temperaturprogramm:

95°C 5min
95°C 30s
54°C 30s
72°C ..... 90s } 30 ×
72°C 5min
15°C ..... end

Bei den Proben, in denen im 0,8%igen Agarosegel kein Produkt zu erkennen war, wurde das Amplifikat unverdünnt in die nachfolgende PCR eingesetzt. War eine Bande sichtbar, wurde das PCR-Produkt je nach Stärke der Bande 1:10 – bzw. 1:100 – verdünnt und in die 2. PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz für Unibac-PCR (2. PCR):

Taq-&GO™ [5 ×]	12,0 µL
Primer Unibac-II-515f [10 pmol/µL]	0,6 µL
Primer Unibac-II-927r^{P} [10 pmol/µL]	0,6 µL
PCR-Wasser	40,8 µL
DNA-Template	6,0 µL
Gesamtvolumen	60,0 µL

Temperaturprogramm:

95°C 5min
95°C 20s
60°C 15s
72°C ..... 30s } 32 ×

72°C ..... 10 min
15°C ..... end

Anschließend erfolgte eine weitere Kontrolle der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.

2.6.3.2 Reinigung der PCR-Produkte

Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden vor dem Einzelstrang-Verdau für die SSCP-Analyse mit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) laut Hersteller-Protokoll gereinigt. Es wurde in 35 µL Elutionspuffer eluiert und die gereinigten PCR-Produkte bei -20°C gelagert.

2.6.3.3 Lambda-Exonuklease Verdau

Der Verdau des am 5'-Ende phosphorylierten Einzelstranges wurde mit der Lambda-Exonuklease (New England Biolabs) durchgeführt. Es wurde eine Reaktionslösung mit 2,4 µL Lambda-Exonuklease (12U) und 3,6 µL 10x Lambda Exonuklease Reaktionspuffer pro 30 µL - Ansatz hergestellt. 6 µL Reaktionslösung wurden zu jedem 30 µL - Ansatz hinzugegeben. Der Einzelstrangverdau erfolgte innerhalb einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C.

2.6.3.4 Denaturierung und Faltung des Einzelstranges

Nach dem Verdau wurde den Proben jeweils 30 µL Ladepuffer zugesetzt und so denaturiert.

Der Ladepuffer setzt sich wie folgt zusammen:

- 950 µL Formamid (95%)
- 5 µL Bromphenolblau-Lösung (0,025%)
- 4 µL 2,5 mM NaOH-Lösung (10 mM)
- 41 µL Aqua dest.

Die Proben wurden exakt für 2 min bei 95°C erhitzt. Zur Einzelstrangfaltung wurden die Proben anschließend sofort für mindestens 5min auf Eis gestellt.

2.6.3.5. Herstellung des Polyacrylamidgels

Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels erfolgt nach folgendem Protokoll:

1. Grund- und Abdeckplatte mit 70% EtOH und fusselfreien Tüchern reinigen
2. Einige Tropfen deion. Wasser auf der Abdeckplatte verteilen
3. Trägerfolie auf die Abdeckplatte legen, Luftblasen vermeiden bzw. entfernen
4. Abstandshalter (Spacer) auf der Glasplatte platzieren.
5. Abdeckplatte auf die Grundplatte legen
6. Das Sandwitch in DGGE-Vorrichtung einführen und anschrauben
8. Gellösung im Becherglas ansetzen (siehe unten)
9. Mit motorisierter Pumpe oder Spritze vorsichtig zwischen Trägerfolie und Grundplatte das Gel gießen
10. Mit EtOH vorsichtig überschichten
11. Ca. 1 – 1,5 h auspolymerisieren lassen

Der Vernetzungsgrad des Gels und die Laufzeit wurden je nach der zu auftrennenden Größe des DNA-Fragments gewählt (siehe Tab. 4). Zur Auftrennung der bakteriellen Unibac-Fragmente (413 bp) mit unterschiedlicher Sekundärstruktur wurden 8%ige Polyacrylamidgele verwendet. Für IST-Pilz spezifische Fragmente (155 bp) wurde ein 9,5%iges Gel eingesetzt (siehe Tab 2.). Die Laufzeit der 8%igen Gele betrugt 26 h, jenes der 9,5%igen Gele 7,5 h.

Tab. 3: Konzentration und Mengenangaben der SSCP-Gellösungen

Konzentration	**8%**	**9,5%**
Deion. Wasser	21,4mL	19,7ml
2 × MDE-Lösung	18,2mL	21,6ml
5 × TBE-Buffer	12,1mL	10,4ml
TEMED	24,3µL	27,5µL
10% APS	243µL	275,0µL

2.6.3.6 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die Pufferkammer wurden mit je 10L 1x TBE Puffer befüllt
2. Die Apperatur in das Pufferbecken gestellt Pumpe und Stromversorgung angeschlossen
3. Vorlauf: 10 min, 240 V, 50 mA, 20°C
4. Schließlich wurden 10 µL pro Probe und links und rechts je 3 µL kb Gene Ruler TM DNA Ladder auftragen

Programm: 240 V, 50 mA, 26°C, je nach Fragmentgröße, 413 bp, 26 h und 155 bp, 20 h

2.6.3.7 Silberfärbung

Um die Banden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen wurde das Gel noch einer Färbung unterzogen.

Fixierung	300ml Essigsäurelösung [10%]	30min
Waschen	3 × 5min mit je etwa 300ml Aqua dest.	15min
Silberfärbung:	300ml Silbernitratlösung [0,1%] (frisch angesetzt) + 1,5ml Formaldehyd [37 w/v%] (Schale abgedunkelt)	30min
Waschen:	unter fließendem Aqua dest. abspülen	10s
Entwickeln:	500ml NaOH-Lösung [3%] + 2ml Formaldehyd [37w/v%] (Schale abgedunkelt) erst mit 200ml kurz spülen, dann mit restlicher Lösung entwickeln bis Banden erscheinen	
Stoppen:	300ml Essigsäurelösung [10%]	30min
Konservieren:	300ml Ethanol [10%] + Glycerol [13%]	30min

Vor dem Konservierungsschritt wurde mit einem Flachbettscanner mit Durchlichtfunktion noch ein Bild des Gels angefertigt, welches später zur graphischen Auswertung herangezogen wurde.

<u>Auswertung der SSCP-Gele mittels GelCompar® II</u>

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms GelCompar® II (Applied Maths). Dabei wurden aus den Ähnlichkeiten der einzelnen Gelbahnen Dendrogramme erstellt, wobei folgende Einstellungen verwendet wurden:

Dendrogram type: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)

Similarity coefficient: Band based: Pearson correlation

Position tolerances: Optimization: 0%

Position tolerance: 1%

2.6.4 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (q-PCR) ermöglicht spezifische DNA-Fragmente, in sehr geringen Konzentrationen einer Probe, zu quantifizieren. Diese Methode beruht auf dem gleichen Prinzip wie eine herkömmliche PCR. Die Quantifizierung erfolgt jedoch durch den Zusatz eines fluoreszierenden Markierung, welcher während der PCR vermessen wird. Neben den üblichen Komponenten eines PCR- Ansatzes wird noch eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonde hinzugegeben, welche während des PCR-Laufs vermessen wird. Das fluoreszierende Signal ist direkt proportional zur Anzahl des generierten PCR-Produkts (Applied Biosystems, 2003).

2.6.4.1 Vorversuch Auswahl des Systems

Um das System mit der höchsten Effizienz zu finden wurden Vorversuche mit verschiedenen Polymerasen durchgeführt. Die verwendeten Polymerasen lauten:

1. Tag&Go inclusive SYBR Green
2. Kapa-Polymerase von Peqlab

Für die Experimente wurden folgende Ansätze verwendet.

<u>Real-Time PCR:(10µl Ansatz)</u>

0,5µL Template – DNA

2,0µL Tag&Go (QBiogen)
Je 0,5µL Primer (10 pmol/µL)
0,2µl $MgCl_2$
0,3µl SYBR Green (400facher Stock 14,7fach verdünnt in DMSO)
5,5µl H_2O (Roth)

<u>Real-Time PCR für Tag&Go (QBiogen): (10 µL Ansatz)</u>

0,8µL Template – DNA

Je 0,12µL Primer (10 pmol/µL)

5,0µL KAPA SYBR green (Peqlab)

3,76µL H_2O (Roth)

Real-Time PCR-Programm:

Das PCR-Programm erfolgte nach der dreistufigen PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse:

Temperaturprogramm:

95°C ..... 10 min
95°C ..... 30 s
52°C ..... 30 s
72°C ..... 60 s } 40 ×
72°C ..... .
15°C .... } Schmelzpunktanalyse

Die höchste Effizienz wies die Kapa-Polymerase von Peqlab auf. Diese wurde für die Erstellung der Eichreihe und Analyse der Proben verwendet.

2.6.4.2 Erstellung einer Eichreihe

Um die benötigte Eichreihe für eine Real-Time PCR herstellen zu können, wurde sowohl von die genomische DNA aus einem Bakterium bzw. Pilz isoliert. Das Fragment, welches mit Hilfe der entsprechenden Primer in einer PCR amplifiziert wurde, konnte anschließend in den Vektor pGEM-T easy kloniert und mit den beiden Primern usp und rsp reamplifiziert werden.

Klonierung:

Die Klonierung erfolgte mit dem Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System von Promega. Zuvor wurde für die jeweiligen Mikroorganismen eine spezifische PCR durchgeführt, um das jeweilige gewünschte Fragment zu erhalten (verwendete Primer siehe Tab.3).

Reaktionsansatz für PCR:

Taq-&GO™ [5 ×]	5µL
Primer vorwärts	1µL
Primer rückwärts	1µL
PCR-Wasser (Roth)	17µL
DNA-Template	1µL
Gesamtvolumen	25µL

Temperaturprogramm:

94°C ..... 2 min
94°C ..... 30 s
58°C ..... 30 s
72°C ..... 30 s 35 ×
72°C ..... 7 min
15°C ..... end

Nach erfolgter Überprüfung des Fragments auf einem Agarosegel wurde das PCR-Produkt mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt und die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop vermessen. Die anschließende Ligation erfolgte nach dem Protokoll vom pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System, jedoch mit einer Änderung: die benötigte Konzentration des PCR-Produktes für die Ligation wurde verdoppelt.

Die Transformation erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Der Ligationsansatz wurde zu 60µL chemisch kompetenter Zellsuspension DH5αTM (InvitrogenTM) hinzupipettiert (auf Eis auftauen) und vorsichtig mit der Spitze gemischt
2. Inkubation auf Eis für 30min
3. Hitzeschock: 20s bei 42°C
4. Abkühlung für 2min ebenfalls auf Eis
5. Hinzugabe von 950µl S.O.C-Medium
6. Inkubation von 1 h bei 37°C und 230rpm
7. Schließlich wurden 100µL der Suspension auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert

Selektivplatten:

LB-Platten: 1 L: 25g LB, 15g Agar

Nach Autoklavierung erfolgte die Zugabe von 100µg/mL Ampicillin und anschließender Ausplattierung von 50µL X-Gal Stocklösung (20mg/mL in N,N-Dimethylformid) auf jeder Platte.

Durch eine Blau-Weiß Färbung der Kolonien erfolgte eine Selektion der Transformanten. Ob tatsächlich das gewünschte Insert im Plasmid transformiert wurde, ist mit Hilfe einer PCR der Primer usp und rsp (siehe Tab. 2) sowie einer anschließenden Gelelektrophorese bestätigt worden. Der Nachweis des jeweiligen Fragments von positiven Mikroorganismen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Je vier weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 50 µL deion. Wasser resuspendiert

1. Zusätzlich wurde der Zahnstocher noch auf Selektivmedium ausgestrichen
2. Die Zellen wurden für 5min bei 98°C aufgekocht und anschließend bei 13.000 rpm für 5min und 4°C zentrifugiert
3. Überstand in ein neues Eppi überführen
4. Kontroll-PCR:

Reaktionsansatz für Kontroll-PCR:

Taq-&GO™ [5]	5µL
Primer usp [10 pmol/µL]	1µL
Primer rsp [10 pmol/µL]	1µL
PCR-Wasser	13µL
DNA-Lösung	5µL
Gesamtvolumen	25µL

Beispiel für ein Temperaturprogramm:

95°C 5min
95°C 20s
54°C 15s
72°C ..... 30s 32 ×
72°C ..... 10 min
15°C ..... end

Anschließend erfolgte eine Überprüfung der PCR mit einem 0,8%igen Agarosegel und eine. Aufreinigung der PCR-Produkte sowie die Sequenzierung beider Fragmente.

Real-Time PCR Eichreihe:

Für die jeweiligen Eichreihen wurde eine Verdünnungsreihe der klonierten Fragmente hergestellt.

2.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Konfokale Laser Scan Mikroskopie

2.7.1 Paraformaldehyd Fixierung

Kleine Stücke der Rhizospähre würden mit PBS-Pufferlösung (*phosphate buffered saline)* gewaschen und anschließend in einer 3:1 Mischung aus Paraformaldehyd (PFA) und PBS 4% für 6 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt, 4 mal mit PBS gewaschen und in einer 1:1 Mischung von PBS/96%/Ethanol bei -20°C gelagert.

2.7.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

FISH wurde laut Lo Piccolo et al. (2010) mit Modifikationen durchgeführt. Die Rhizosphäre wurde mit eiskaltem 50µl-PBS gewaschen und auf ein poly-L lysine bedecktes Deckglas (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) platziert. PBS wurde mittels Luftgebläse entfernt. 50 µl von 0.5 $mgml^{-1}$ Lysozym- Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) wurden auf die Wurzelstücke getropft. Nach 10min inkubieren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mittels Gebläse entfernt und mit 50µl eisgekühltem PBS gewaschen. Mit einer Ethanolserie (50%, 80% and 96%; jeweils 3min) wurde den Proben das rückständige Wasser entzogen. Nachdem Ethanol verdampf war wurde ein Gemisch von 27µl Hybridisierungspuffer (360µl 5 M NaCl, 40µl 1 M Tris at pH 7,4, 300µl Formamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 2 µl 2% SDS, ddH_2O 2ml) und 3µl der fluorochrom markierten Sonde (50 ng/µl) auf die Wurzeln getropft. Die Hybridisierung erfolgte im abgedunkelten Wasserbad für 2h bei 45°C.Die universelle Bakterien Sonde EUB338MIX

(Cy3-markiert), die Gammaproteobakterien-spezifische Sonde GAM42a (Cy5-markiert) und die Alphaproteobakterien-spezifische Sonde ALF-968 (Cy5-markiert) wurden simultan verwendet (alle FISH Sonden wurden von genXpress, Wiener Neudorf, Austria bezogen).
Nach der Inkubation wurde der Hybridisierungspuffer entfernt und das Deckglas in einen vorgeheizten (47°C) Waschpuffer 3,18ml 5 M NaCl,1ml 1 M Tris pH 7.4, ddH_2O auf 50ml) gegeben und 15-20 min inkubiert. Danach wurde ein Tropfen eiskaltes Wasser auf die Wurzel gegeben und mit Druckluft langsam getrocknet. Die Wurzelstücke wurden bedeckt mit ProLong Gold antifadent (Molecular probes, Eugene, USA), bei Raumtemperatur und Dunkelheit 12-16h inkubiert und mit CLSM betrachtet. Tabelle 4 listet die eingesetzten Sonden auf.

Tab 4: Sonden für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Name	Sequence 5'-3'	Target	Formamide conc.%	Reference
EUB338*	5„-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3„	Bakterien	10-20	Amann et al. (1990)
EUB338II*	5„-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3„	Planctomyceten	10-20	Daims et al. (1990)
EUB338III*	5„-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3	Verrucomicrobiales	10-20	Daims et al. (1990)
GAM42a*	5„-GCCTTCCCACATCGTTT-3„	Gammaproteobakterienen	35	Manz et al. (1992)
BET42***	5„-GCCTTCCCACTTCGTTT-3„	Betaproteobakterien	35	Manz et al. (1992)
ALF968	5„-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3„	Alphaproteobakterien	35	Neef et al. (1997)

2.7.3 Confocal laser-scanning microscopy (CLSM)

FISH-markierte Proben wurden mit Leica TCS SPE konfokal Laser-Scann Mikroskop (Leica Microsystem, Mannheim, Germany) visualisiert. Bis zu drei konfokale Lichtkanale wurden sequentiellbenutzt und zusätzliche eine Hellfeldbeleuchtung eingesetzt. Durch Anpassung der Filtereinstellungen wurde das Signal optimiert und ein Rauschen umgangen. Eine Maximum Projektion einer ausgewählten Anzahl optischer Schnitte wurden zur Visualisierung der Wurzel Sektionen (konfokal Block) eingesetzt. Die Z-Stufen waren 0,15-0,6µm, abhängig von der Vergrößerung und der Objektivwahl. Für die Bearbeitung der der Bilder wurde die Software Imaris 7.3 Bitplane, Zürich, Schweiz verwendet.

2.8 Biomassezuwachs von Weidelgras

2.8.1 Durchführung

Die Durchführung erfolgte im Gewächshaus. Der Biomassezuwachs von Weidelgras auf den einzelnen Kompostvarianten wurde untereinander und mit Anzuchterde verglichen wurde.Das Kompostsubstrat wurde 1:1 mit grobkörniger (ca. 1cm) Lava abgemischt. Als Vergleich diente eine gängige Anzuchterde aus dem Baumarkt von der ebenfalls 4 Wiederholungen gemacht wurden. In jedem Topf wurde eine definierte Menge von 5g Weidelgrassamen ausgebracht und mit der gleichen Wassermenge gegossen. Es wurden pro Variante und Anzuchterde 4 Wiederholungen hergestellt. Die Kompostmischungen wurden in 5 Liter Töpfe abgefüllt und im Gewächshaus inkubiert. Es erfolgte eine wöchentliche Randomisierung, um den klimatischen Einfluss auszuschließen. Die Probenahme erfolgte im Abstand von 3 Wochen, wobei die Grashalme abgeschnitten und gewogen wurden.

Abb.4: Im Gewächshaus gezüchtetes Weidelgras. Pro Kompostvariante wurden 4 Töpfe bepflanzt und der durchschnittliche Biomassezuwachs des Grases ermittelt.

2.9 Statistik

In Statistiken wird Scheffés Verfahren, benannt nach dem amerikanischen Statistiker Henry Scheffé, zum Erstellen von Signifikanzniveaus in einer linearen Regressionsanalyse unter Berücksichtigung für multiple Vergleiche verwendet. Es ist besonders nützlich bei der Analyse der Varianz, und der simultanen Konstruktion von Konfidenzbanden für Regressionen mit Basisfunktionen (Scheffé,. et al 1959).

Mit dieser Methode wird die Homogenität der quantitativen Bestimmungen von Mikroorganismen-DNA (qPCR) in den Kompostvarianten und Terra Preta herausgefiltert .

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Analyse der Mikroorganismen

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl [CFU/g] der Bakterien zu bestimmen wurden 100µL Suspension auf R2A-Medium, ein nährstoffarmes Minimalmedium spezifisch für Bakterien, ausplattiert und 5 Tage inkubiert. Für die Bestimmung von Pseudomonaden wurde das Selektivmedium King's B-Medium verwendet und für Pilze SNA-Medium. Zellzahl und Standardabweichung wurden für die einzelnen Kompostvarianten berechnet. Die Zellzahl der Bakterien, Pseudomonaden und Pilze sind den Abbildungen 5-7 zu entnehmen.

In Abbildung 5 sind die kultivierbaren Bakterien der einzelnen Kompostvarianten dargestellt [CFULog$_{10}$/g Kompost]. Im Durchschnitt konnten 10^5 Bakterien pro Gramm Kompost kultiviert werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Kompostvarianten sind allerdings nicht vorhanden.

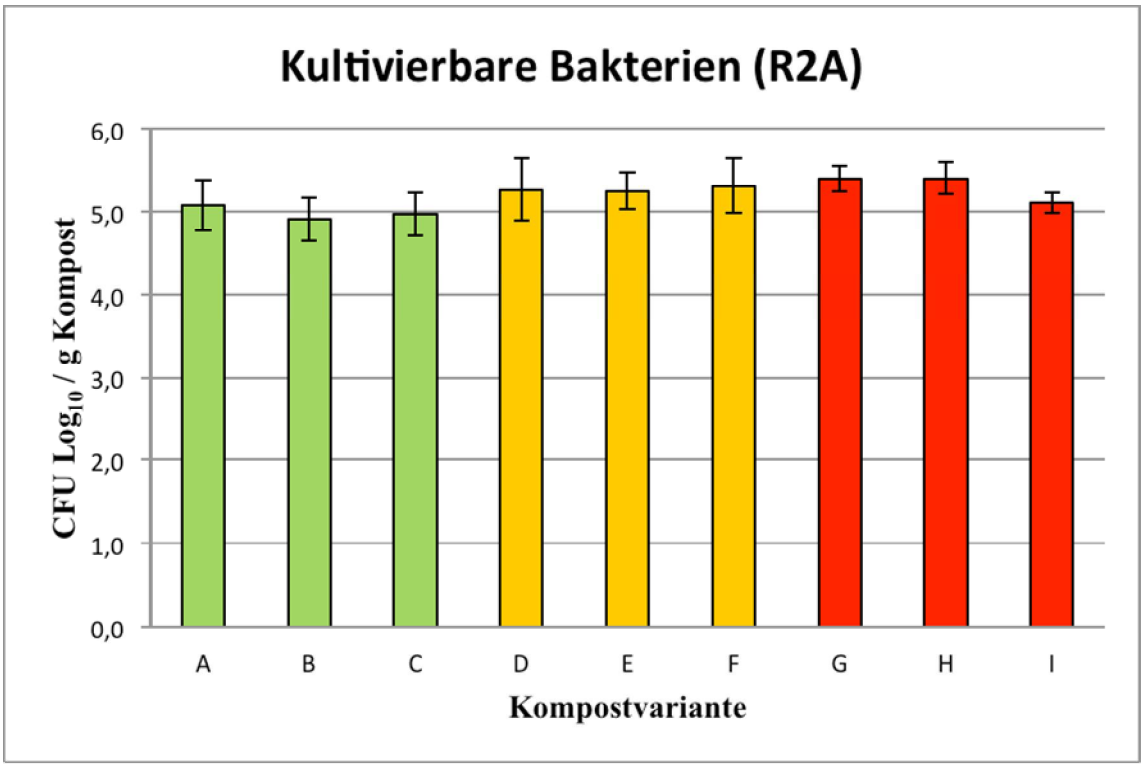

Abb. 5: **Ergebnisse der Kultivierung von Bakterien aus Kompostvarianten auf dem Selektivmedium R2A**. Die Zusammensetzung der Komposte ist aus Tab.1 zu entnehmen.

In Abbildung 6 sind die Zellzahlen der kultivierbaren Pseudomonaden dargestellt. Die durchschnittliche Zellzahl der Pseudomonaden in den Kompostvarianten liegt bei 10^3 [CFU/g Kompost]. Eine Ausnahme bildet Kompostvariante E, aus der 10mal mehr Pseudomonaden kultiviert werden konnten.

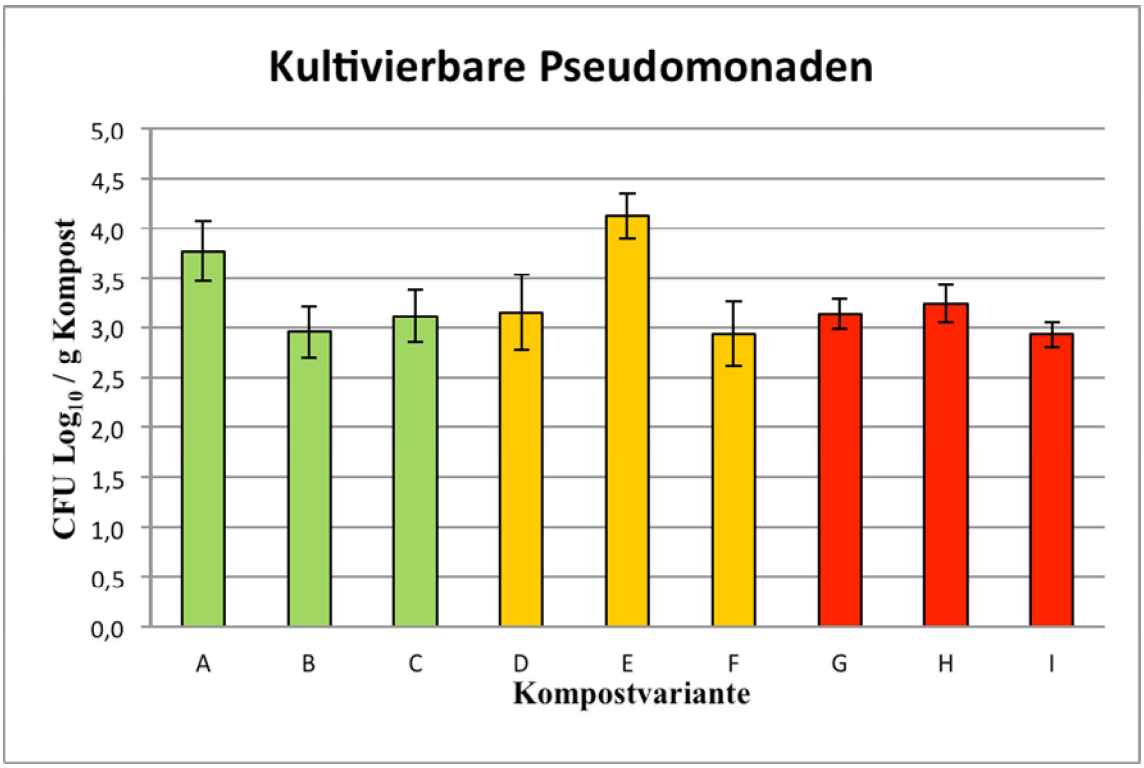

Abb. 6: **Ergebnisse der Kultivierung von Pseudomonaden aus Kompostvarianten auf dem Selektivmedium King´s B.** Die Zusammensetzung der Komposte ist aus Tab.1 zu entnehmen.

Im Vergleich zu den beiden anderen Mikroorganismen konnten am wenigsten Pilze kultiviert werden. Der Durchschnittswert liegt bei $10^{1,8}$ Pilzen pro Gramm Kompost (siehe Abb.: 7). Auch bei den Pilzen konnten keine signifikanten Unterschiede der Anzahl zwischen den verschiedenen Varianten festgestellt werden.

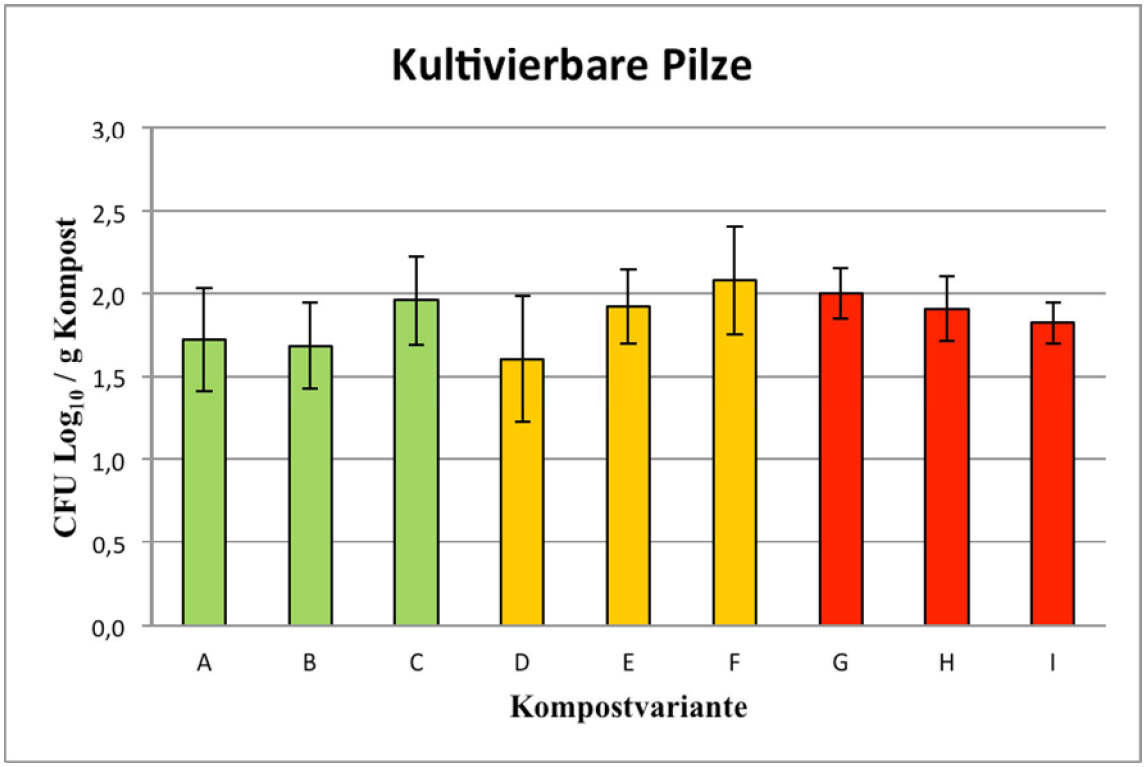

Abb. 7: **Ergebnisse der Kultivierung von Pilzen aus Kompostvarianten auf dem Selektivmedium SNA**. Die Zusammensetzung der Komposte ist aus Tab.1 zu entnehmen.

Die Zugabe von Gesteinsmehl sowie Biokohle hatte keine nachweisbaren Effekte auf die Zellzahl der kultivierten Mikroorganismen.

3.1.2 Analyse der Mikroorganismengemeinschaft in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP

Analysiert wurden die Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP. Um die Ähnlichkeit der mikrobiellen Profile innerhalb der Kompostvarianten und im Vergleich mit Terra Preta festzustellen, wurden Dendrogramme mit dem Programm GelCompar® II erstellt. Es wurde ein Überblick von universellen Bakterien, Gammaproteobakterien, Pseudomonaden, Firmicutes und Pilzen erstellt.

Zur Visualisierung der Bakterienfragmente wurde das SSCP-Verfahren mittels DGGE-Apparatur durchgeführt. Dadurch konnten die Bandenmuster auf einem Gel dargestellt werden.

Abbildung 8 zeigt den Vergleich von Bakterien-DNA, die charakteristisch für einzelne Bakterienspezies ist. Während die Bandenmuster der Kompostvarianten keinen sichtbaren Unterschied aufwiesen, zeigten die Bandenmuster der Terra Preta keine Übereinstimmung zu jenen der Komposte. Bei genauerer Betrachtung kann man jedoch erkennen, dass die abundanten Banden der Terra Preta Proben auch in den Kompostvarianten mit geringerer Intensität vorhanden sind.

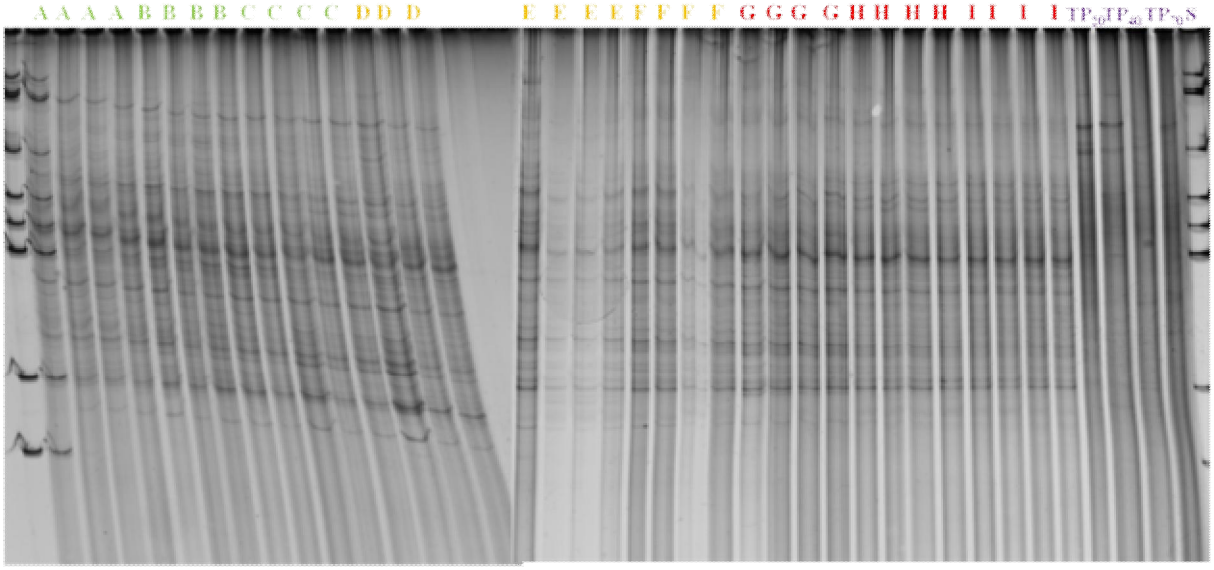

Abb. 8: Diversitätsvergleich von universellen Bakterien (Unibac) in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP-Analyse. Die DNA von Bakterien wurde mittels Unibac-PCR amplifiziert und durch SSCP visualisiert. Dargestellt sind Proben der Kompostvarianten (A-I), der Terra Preta (TP) und einer brasilianischen Vergleichsprobe. Die Zusammensetzung der Kompostvarianten ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

Das Dendrogramm ausgehend von der SSCP-Analyse zeigt die Interpretation der Bandenmuster von universellen Bakterien durch eine Computersoftware, welche die Ähnlichkeit der Banden aufgrund ihrer Lage und Intensität vergleicht. Übereinstimmende Bandenmuster werden in Clustern zusammengefasst und ihre Ähnlichkeit in Prozent angegeben.

Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, dass die Bandenmuster der universellen Bakterien abhängig vom Biokohleanteil in den Kompostvarianten Ähnlichkeiten von 50-60% aufweisen. Mit Zunahme des Biokohleanteils kommt es zu einer erhöhten Übereinstimmung der Bandenmuster mit Terra Preta. Interessanterweise ist die Übereinstimmung mit Terra Preta in der Kompostvariante am höchsten, die neben 20% Biokohle- auch 10% Gesteinsmehlanteil enthält. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster liegt hier bei 60%.

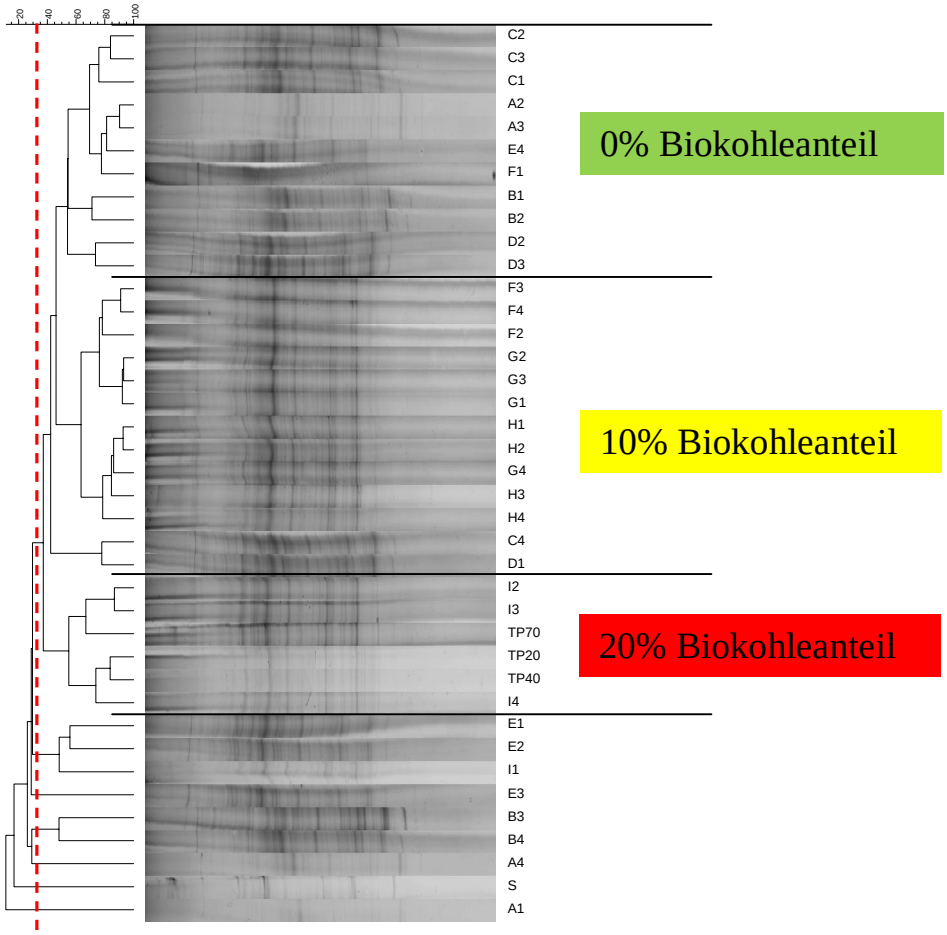

Abb. 9: Auswertung taxonomischer Profile der universellen Bakteriengemeinschaft in Komposten , Terra Preta und brasilianischer Vergleichsprobe. Das Dendrogramm wurde, ausgehend von den SSCP-Profilen, mit GelComparII erstellt. Die Clusterbildung basiert auf dem agglomerativen Verfahren.

Abbildung 10 stellt die Auftrennung von Pilzfragmenten der Kompostvarianten sowie Terra Preta Proben und der Vergleichsprobe mittels SSCP-Technik dar. Die breit gestreuten Banden lassen auf eine hohe Diversität schließen. Mit Zunahme des Biokohleanteils kommt es zu einer Verschiebung der abundanten Banden. Die Kompostvarianten weisen zwar untereinander ähnliche Profile auf, jedoch sind die Bandenintensitäten unterschiedlich. Im Vergleich zu den Kompostvarianten ist die Intensität der Bandenmuster der Terra Preta Proben schwach und die Diversität nimmt mit Zunahme der Schichttiefe der Erdproben ab.

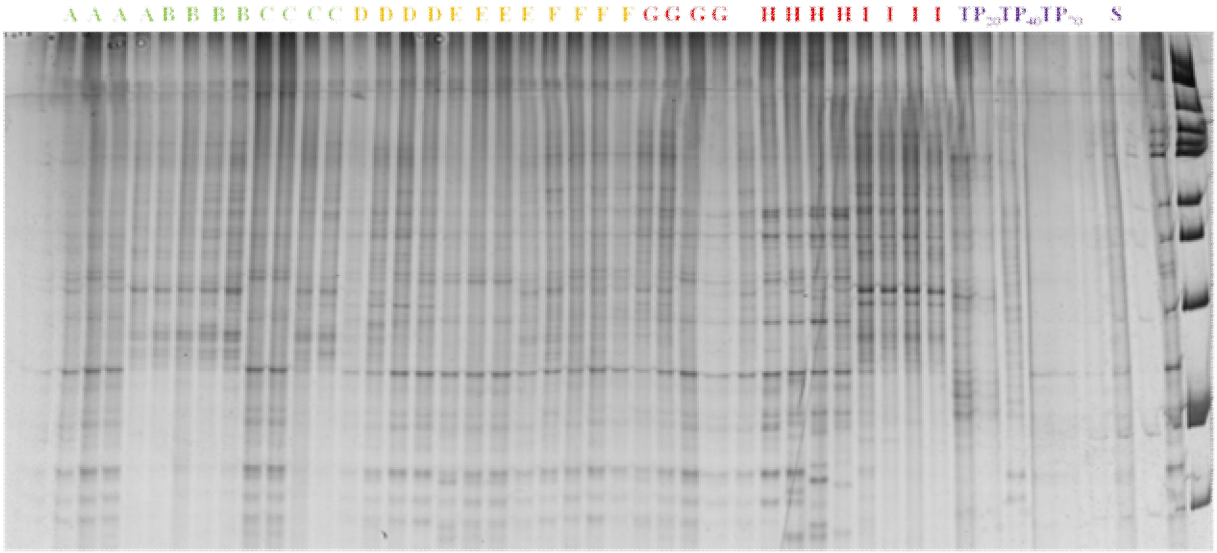

Abb. 10: Diversitätsvergleich von Pilzen(ITS) in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP-Analyse. Die DNA von Pilzen wurde mittels ITS-PCR amplifiziert und durch SSCP visualisiert. Dargestellt sind Proben der Kompostvarianten (A-I), der Terra Preta (TP) und einer brasilianischen Vergleichsprobe. Die Zusammensetzung der Kompostvarianten ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

In Abbildung 11 wird die Softwareanalyse des SSCP-Gels von Pilzen dargestellt. Es zeigt die Ähnlichkeit der Pilzmuster von Kompostvarianten, Terra Preta und der Vergleichserde aus Brasilien. Innerhalb der schwarzen Abgrenzungen sind jene Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil und rechter Hand des rocht strichlierten Balken sind die gebildeten Cluster. Die Analyse der Pilze zeigt, dass eine Übereinstimmung von 90% aller untersuchten Varianten und Terra Preta gegeben ist. Zusätzlich kommt es zu einer weiteren Annäherung der Komposte an Terra Preta, wenn 10% Gesteinsmehl und 20% Biokohle im Kompost sind. Die Bandenmuster der Bodenproben der schwarzen Erde aus den Schichttiefen von 20cm und 40cm stimmen mit dem Kompost I zu 95% überein.

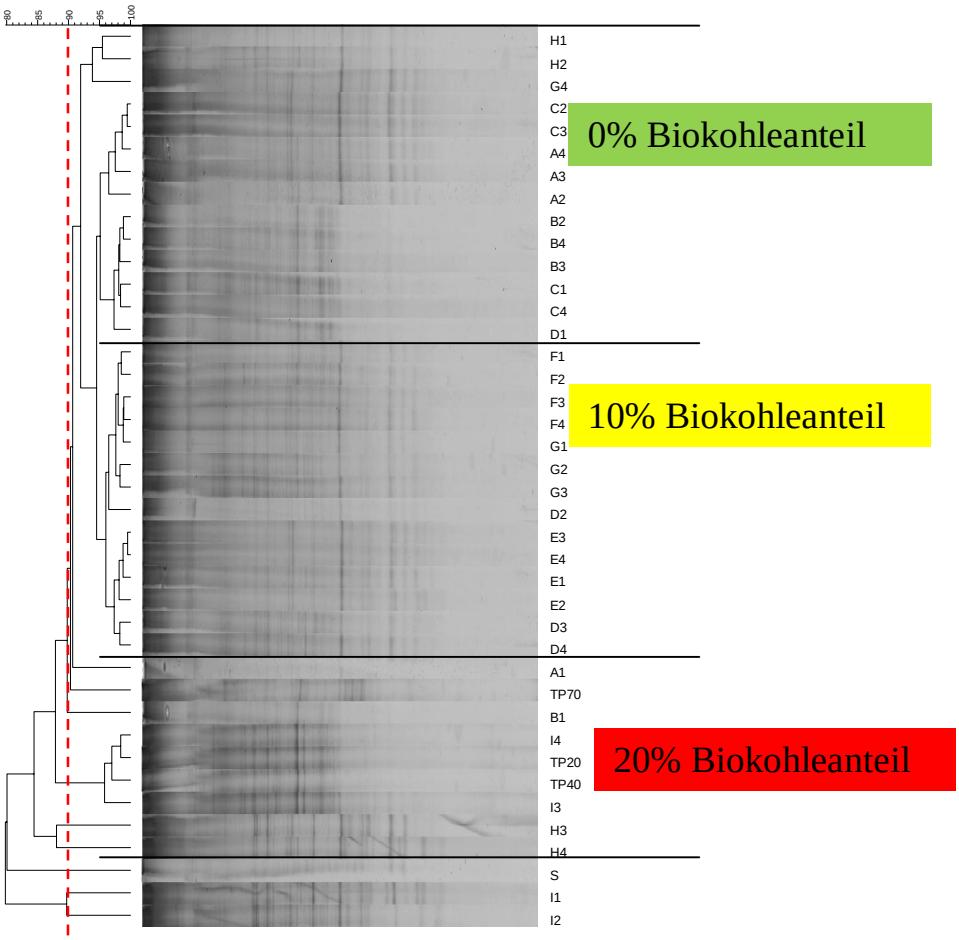

Abb. 11: Auswertung taxonomischer Profile der Pilzgemeinschaft in Komposten, Terra Preta und brasilianischer Vergleichsprobe. Das Dendrogramm wurde, ausgehend von den SSCP-Profilen, mit GelComparII erstellt. Gewählt wurde das agglomerative Verfahren zur Clusterbildung.

Um einen besseren Überblick von der Mikroorganismengemeinschaft in den Kompostvarianten und Terra Preta zu gewinnen wurden weitere SSCP-Analysen von spezifischen Bakteriengruppen durchgeführt.

In Abbildung 12 sind die Bandenmuster der Firmicutes Bakterien dargestellt. Spezies der Firmicutes finden in der Biokontrolle ihre Anwendung indem sie Antibiotika produzieren und Pathogene schädigen. Die Auftragung erfolgte wie bei der Analyse der universellen Bakterien und Pilze. Es sind keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Bandenmustern der Kompostvarianten erkennbar. Auffallend ist allerdings jene Bande, die nicht nur in den Kompostvarianten abundant ist sondern auch in den Terra Preta Proben mit einer hohen Intensität hervorsticht.

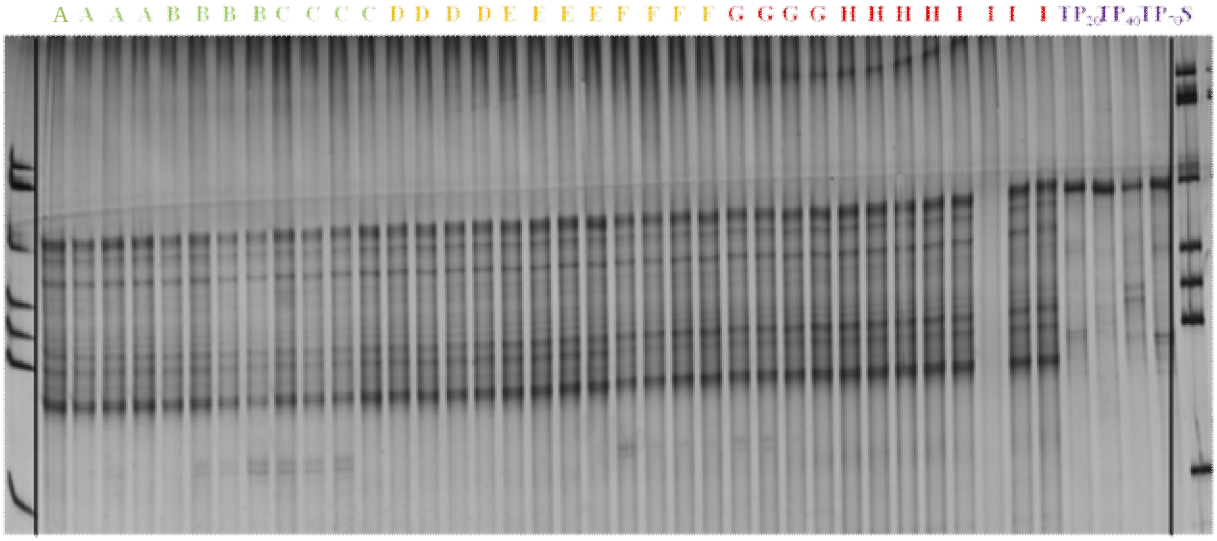

Abb. 12: Diversitätsvergleich von Firmicutes in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP-Analyse. Die DNA von Pilzen wurde mittels BAC-PCR amplifiziert und durch SSCP visualisiert. Dargestellt sind Proben der Kompostvarianten (A-I), der Terra Preta (TP) und einer brasilianischen Vergleichsprobe. Die Zusammensetzung der Kompostvarianten ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die gebildeten Cluster der Softwareanalyse geben Aufschluss über die Ähnlichkeit der unterschiedlichen Bandenmuster von Firmicutes-Fragmenten, die mit SSCP-Technik aufgetrennt wurden (siehe Abb. 13). Die Kompostvarianten A-E weisen eine 50%ige Ähnlichkeit zu Terra Preta auf. Durch die Gesteinsmehlanteilssteigerung nähert sich der Kompost mit 10% Biokohle an Terra Preta an, und weist eine Ähnlichkeit von ca. 70% auf. Die Bandenmuster von Firmicutes der Kompostvariante I stimmen zu 93% mit denen der Terra Preta überein. Die Deckungsgleichheit der Bandenmuster von Kompostvariante I und Terra Preta ist bei Firmicutes höher als bei den universellen Bakterien.

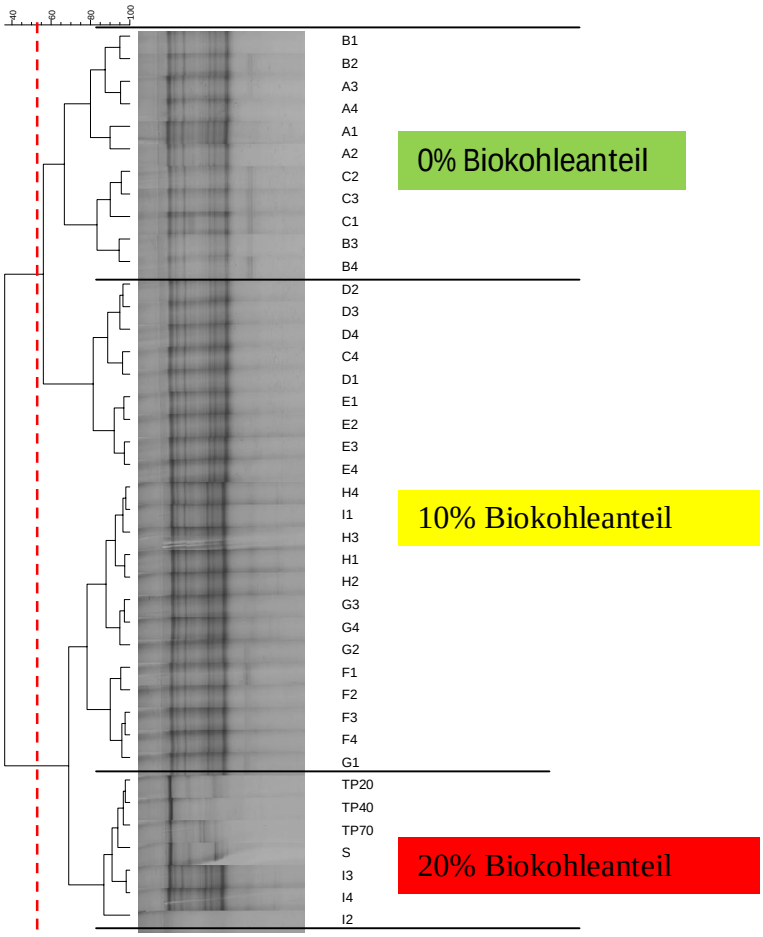

Abb. 13: Auswertung taxonomischer Profile von Firmicutes in Komposten , Terra Preta und brasilianischer Vergleichsprobe. Das Dendrogramm wurde, ausgehend von den SSCP-Profilen, mit GelComparII erstellt. Die Clusterbildung basiert auf dem agglomerativen Verfahren.

Wie Spezies von Firmicutes werden auch verschiedene Pseudomonaden in der Biokontrolle eingesetzt. Die Untersuchung von Pseudomonaden zeigte (siehe Abb.14), dass die Komposte mit keinem Biokohleanteil eine höhere Diversität aufweisen als die Restlichen. Ansonsten zeigen nur die Terra Preta Proben ein anderes Bandenmuster, wobei sie sich nur in der Bandenintensität unterscheiden.

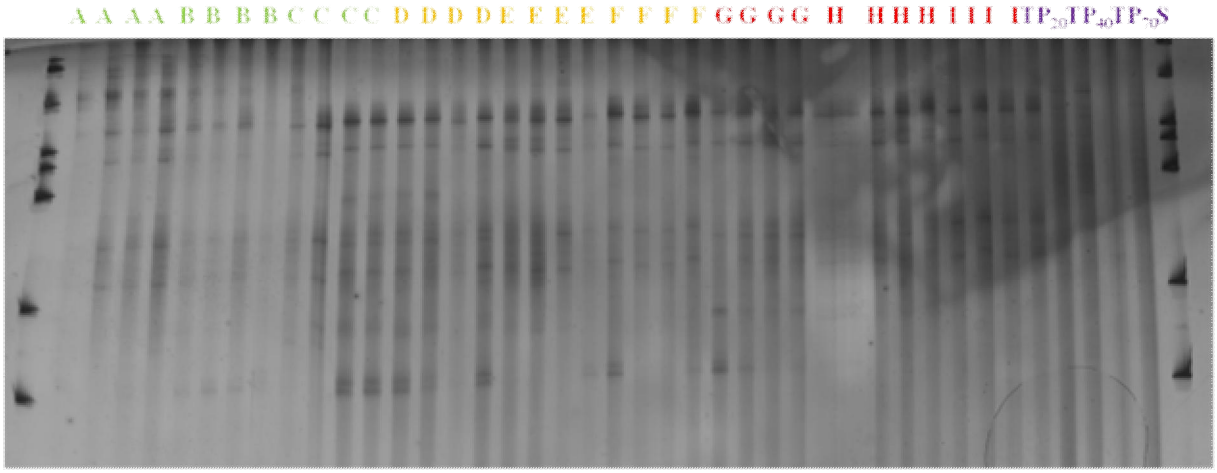

Abb. 14: Diversitätsvergleich von Pseudomonaden in Kompostvarianten und Terra Preta mittels SSCP-Analyse. Die DNA von Pilzen wurde mittels PSEU-PCR amplifiziert und durch SSCP visualisiert. Dargestellt sind Proben der Kompostvarianten (A-I), der Terra Preta (TP) und einer brasilianischen Vergleichsprobe. Die Zusammensetzung der Kompostvarianten ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

Abbildung 15 stellt die Auswertung der Bandenmuster des SSCP-Gels der Pseudomonaden mittels Computersoftware dar. Die Pseudomonadenanreicherung in den Kompostvarianten A-E weist eine Ähnlichkeit von 40% zu jener der Terra Preta auf. Durch die Steigerung des Biokohleanteils auf 20% nähern sich die Komposte an die Terra Preta an, wobei jene mit 0-5% Gesteinsmehlanteil eine Ähnlichkeit von ca. 55% aufweisen. Eine auffallend hohe Ähnlichkeit von 85% zur Terra Preta hat die Kompostvariante mit 20% Biokohle- und 10% Gesteinsmehlanteil.

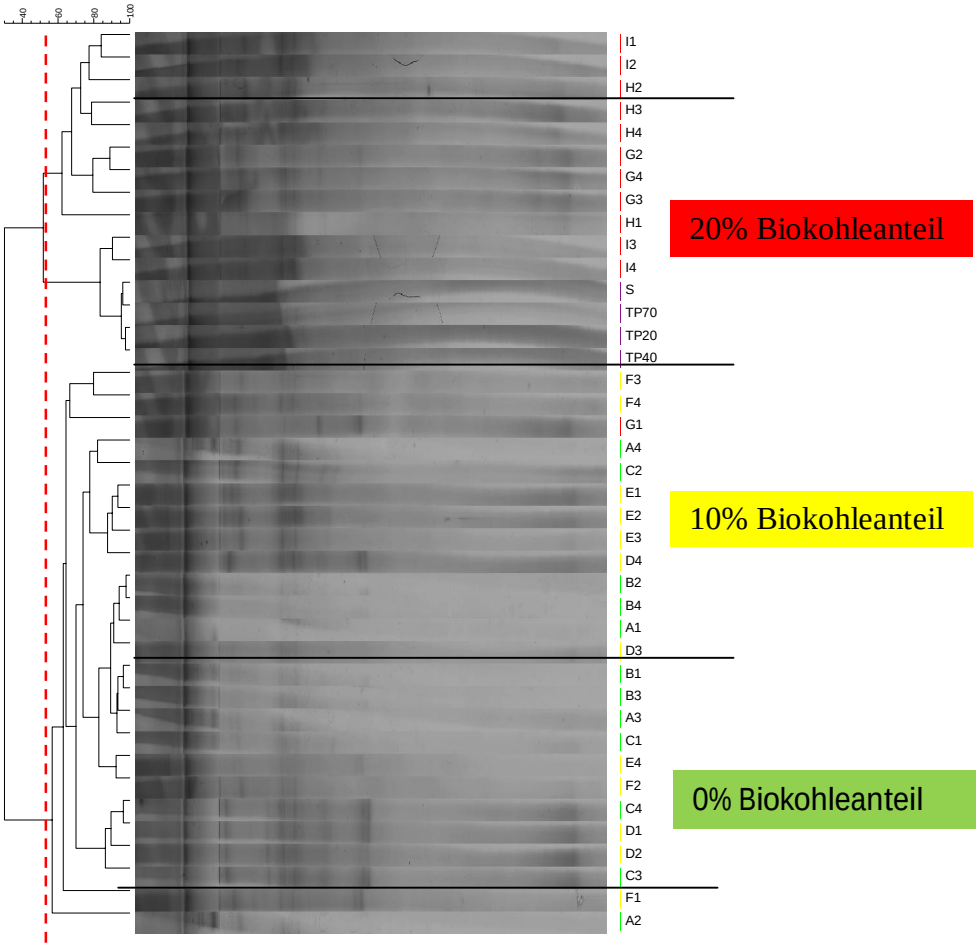

Abb. 15: Auswertung taxonomischer Profile von Pseudomonaden in Komposten , Terra Preta und brasilianischer Vergleichsprobe. Das Dendrogramm wurde, ausgehend von den SSCP-Profilen, mit GelComparII erstellt. Die Clusterbildung basiert auf dem agglomerativen Verfahren.

3.2 Ergebnisse der qPCR

Die Abundanz von Gammaproteobakterien, Firmicutes und nif-Genen wurde mit qPCR ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Fluoreszenzsignale der Kompostvarianten und Terra Preta mit einer Eichreihe.
Proben, deren Ct-Wert über einem bestimmten Wert liegen wurden für die Analyse ausgeschlossen. Dieser Wert wurde anhand der Negativkontrolle festgelegt, da oberhalb dieses Wertes keine korrekte Quantifizierung mehr sichergestellt werden konnte.

Die Proben der Kompostvarianten und Terra Preta wurden 3 Mal vermessen, der Mittelwert der Kopien/g Kompost berechnet und mittels Scheffe Prozedur eine statistische Auswertung erstellt. Abbildung 16 zeigt, dass die Zugabe von Gesteinsmehl zu einer Steigerung der DNA-Replikate von Gammaproteobakterien führt. Eine signifikant höhere Abundanz der DNA-Kopien/ g Boden wurde in der Kompostvariante mit dem höchsten Gesteinsmehl- und Biokohleanteil gemessen. In den Terra Preta Proben gab es keine quantitativen Änderungen der Gammaproteobakterien-DNA mit zunehmender Schichttiefe.

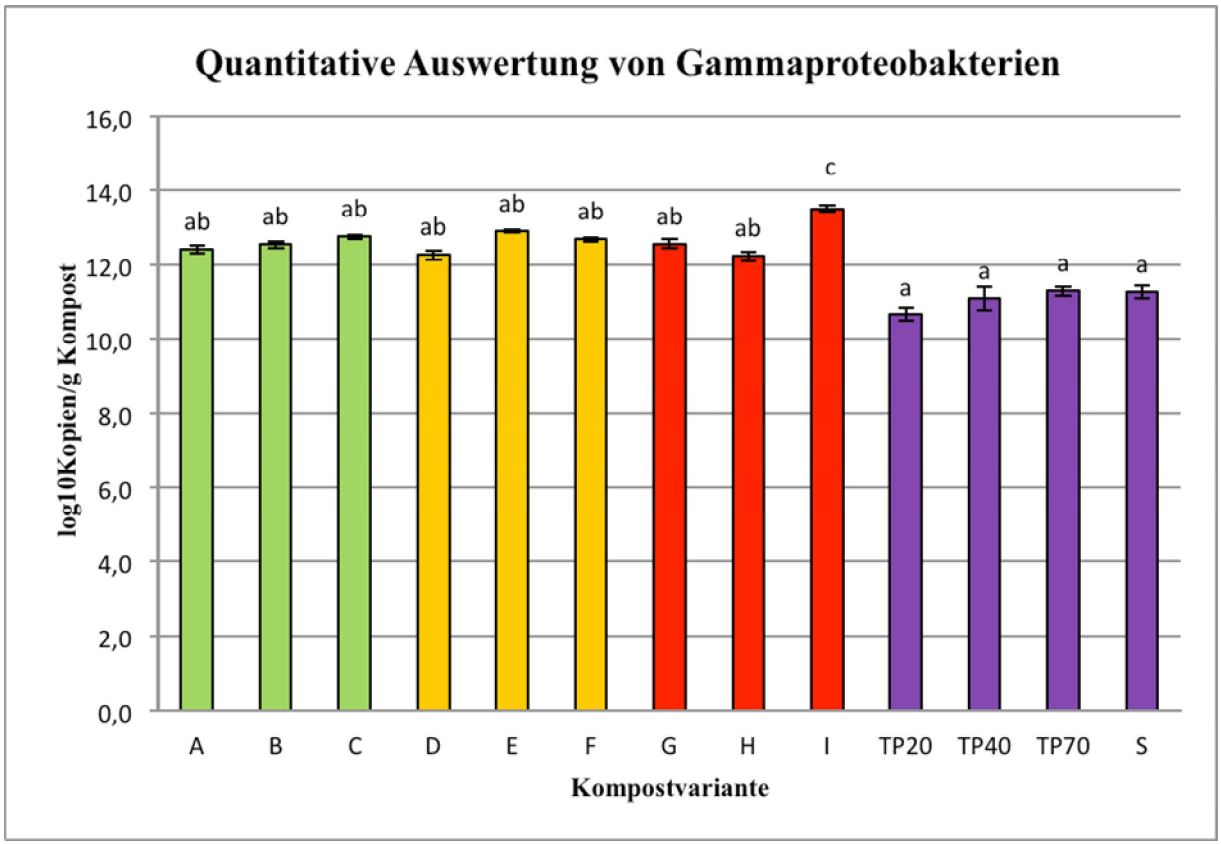

Abb. 16: Abundanz von Gammaproteobakterien in verschiedenen Kompostvarianten (A-I, siehe Tab.1) und Terra Preta (TP, S). Die Anzahl der spezifischen Genkopien (Gamma Prot) wurde in einem q-PCR Ansatz bestimmt. Als statistischer Nachweis wurde die Scheffe Prozedur angewandt. Die Messwerte werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander den Gruppen a,b oder c zugeordnet.

In Abbildung 17 werden die Mittelwerte der Gammaprotobakterien-DNA-Kopien der Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil, ausgehend von den einzelnen q-PCR Messungen, dargestellt und somit die Auswirkung von Biokohle auf die Anreicherung von Gammaproteobakterien-DNA verdeutlicht. Aus dem Balkendiagramm kann entnommen werden, dass mit der Zunahme von Biokohle im Kompost die Gammaproteobakterien-DNA um 2% zunimmt, dies entspricht einer Anzahl von $1{,}8\times10^{12}$ DNA-Replikaten.

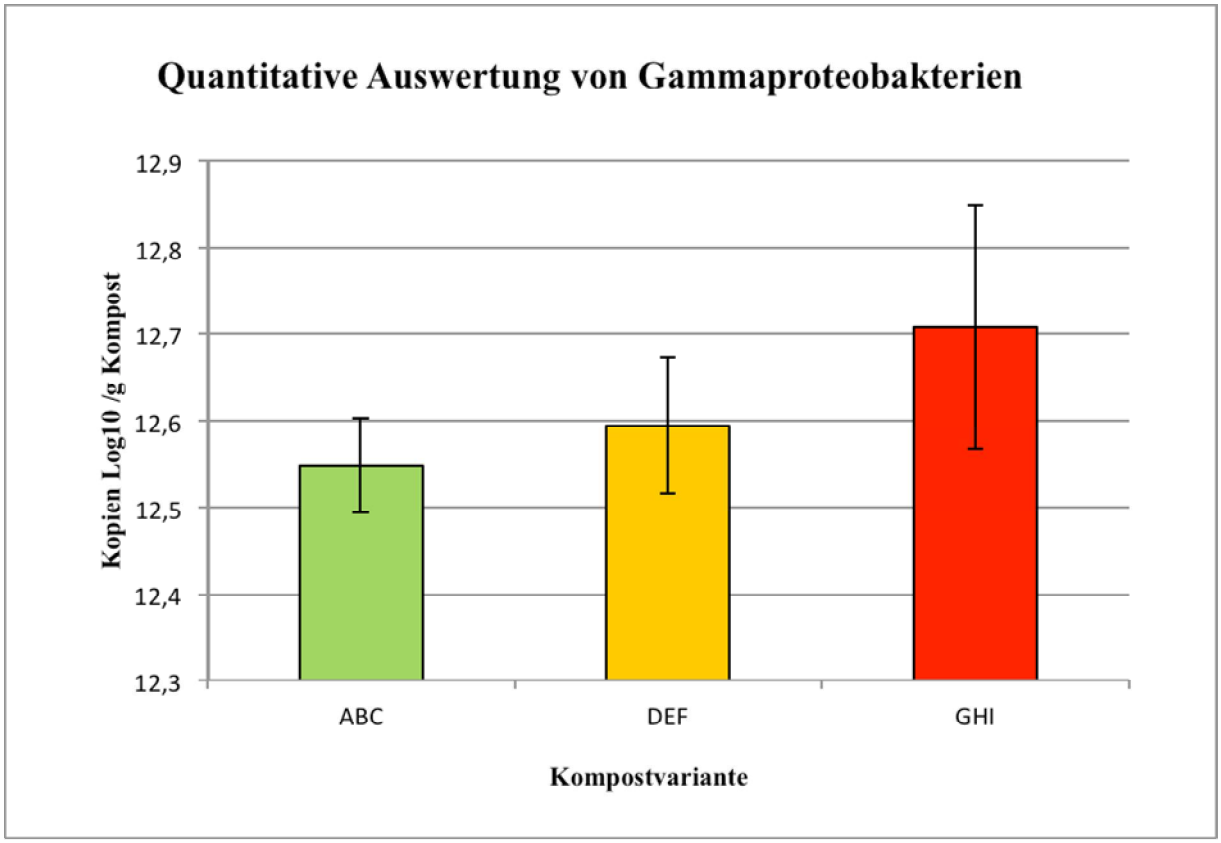

Abb. 17: Mittelwerte der Gammaproteobakterien-DNA-Abundanz in Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil. Aus den einzelnen Messungen der q-PCR wurde der Mittelwert der Kompostvarianten mit dem gleichem Biokohleanteil gebildet. **ABC:** 0% Biokohleanteil; **DEF:**10% Biokohleanteil; **GHI:** 20% Biokohleanteil. **.**

Von den in der Biokontrolle relevanten Firmicutes wurde eine quantitative Bestimmung gemacht. Aus Abbildung 18 kann die Abundanz der Firmicutes DNA/g Kompost und Terra Preta sowie Vergleichserde entnommen werden. Innerhalb der Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil steigt die Abundanz der Firmicutes-DNA mit Zunahme des Gesteinsmehlanteils durchschnittlich um den Faktor 10^5 an. Durch die Steigerung des Biokohleanteils kommt es zu einem weiteren Anstieg der Abundanz (siehe Abb.19). Die Statistische Auswertung zeigt, dass sich die Kompostvarianten H und I signifikant von den restlichen Varianten unterscheiden. In den Terra Preta Proben kommt es mit zunehmender Schichttiefe zu einer Abnahme der Kopien von Firmicutes-DNA um 19%, was $2{,}4\times10^8$ DNA-Replikaten entspricht.

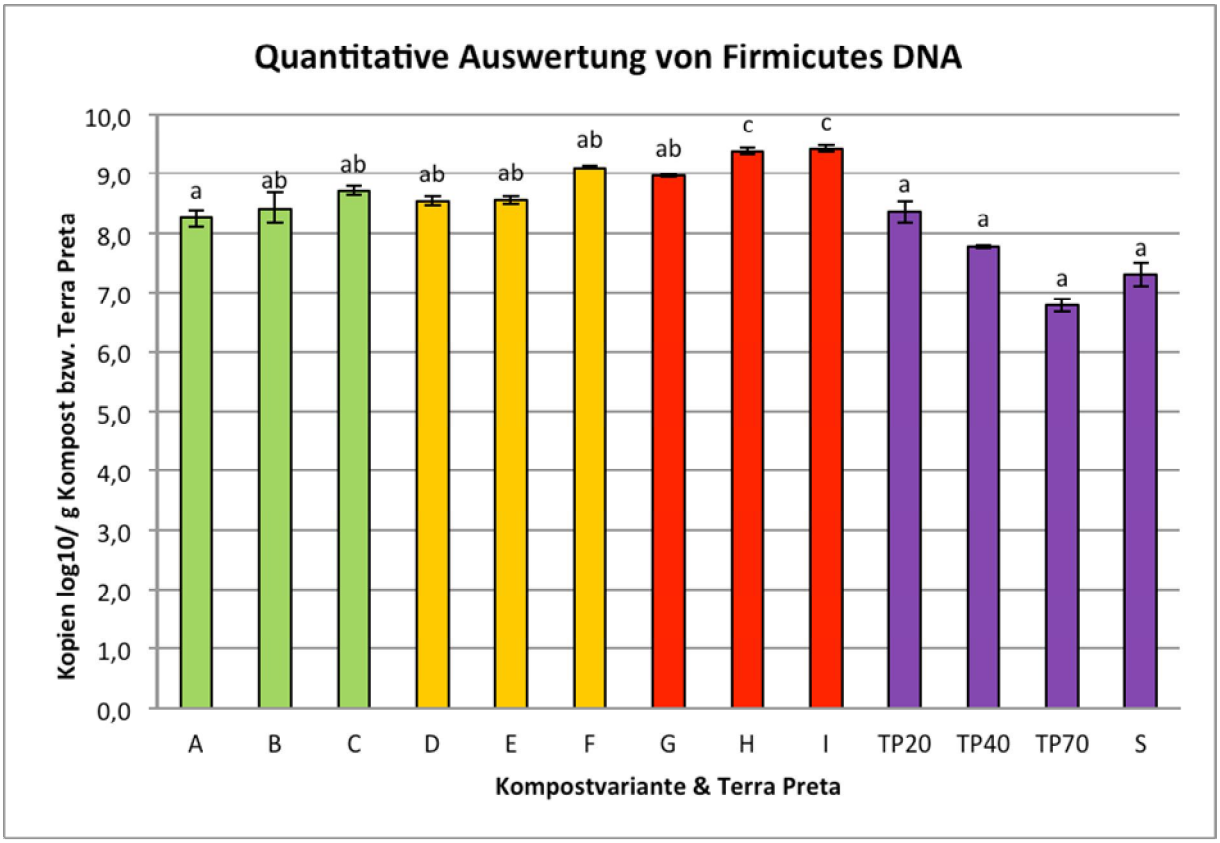

Abb. 18: Abundanz von Gammaproteobakterien in verschiedenen Kompostvarianten (A-I, siehe Tab.1) und Terra Preta (TP, S). Die Anzahl der spezifischen Genkopien (BAC) wurde in einem qPCR Ansatz bestimmt. Als statistischer Nachweis wurde die Scheffe Prozedur angewandt. Die Messwerte werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander den Gruppen a,b oder c zugeordnet.

In Abbildung 19 werden die Mittelwerte der Firmicutes-DNA-Replikate in Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil, ausgehend von den einzelnen q-PCR Messungen, dargestellt und die Auswirkung von Biokohle auf die Anreicherung von Firmicutes-DNA visualisiert. Aus dem Balkendiagramm kann entnommen werden, dass durch die Steigerung des Biokohleanteils in den Komposten die DNA-Menge von Firmicutes Bakterien ansteigt. In den Komposten mit 20% Biokohleanteil wurden um 1,3 Milliarden mal mehr Firmicutes-DNA Kopien nachgewiesen als in den Komposten ohne Biokohle.

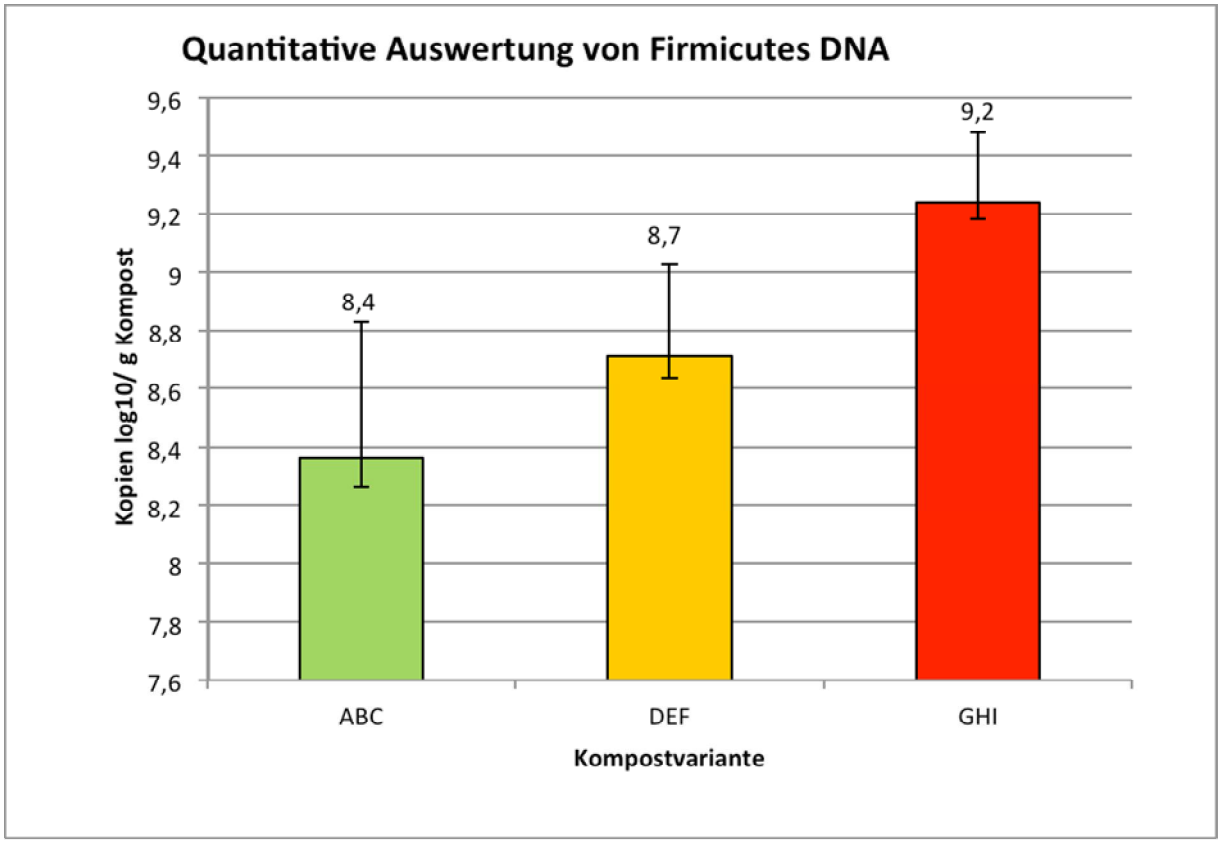

Abb. 19: Mittelwerte der Firmicutes-DNA-Abundanz der Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil. Aus den einzelnen Messungen der q-PCR wurde der Mittelwert der Kompostvarianten mit dem gleichem Biokohleanteil gebildet. **ABC:** 0% Biokohleanteil; **DEF:**10% Biokohleanteil; **GHI:** 20% Biokohleanteil.

Nif-Gene kodieren für Mikroorganismenenzyme, die die Stickstoffumwandlung katalysieren. Abbildung 20 zeigt, dass Gesteinsmehl und Biokohle einen Einfluss auf die Akkumulierung von nif-Gensequenzen im Kompost hat. Durch die Steigerung von Gesteinsmehl in den Komposten kommt es zu einem Anstieg von 9×10^5 nif-Genen pro Gramm Kompost. In der Variation mit 10% Gesteinsmehl und 20% Biokohleanteil konnte eine Steigerung von nif-Genen um den Faktor 10^7 gegenüber dem Kompost ohne Zusätze gemessen werden. Diese Variante (Kompost I) unterscheidet sich signifikant von den anderen Komposten. In den Terra Preta Proben wurde ein Abfall der nif-Gen-Abundanz um 12% in einer Schichttiefe von 70cm gegenüber der Schichttiefe von 20cm gemessen.

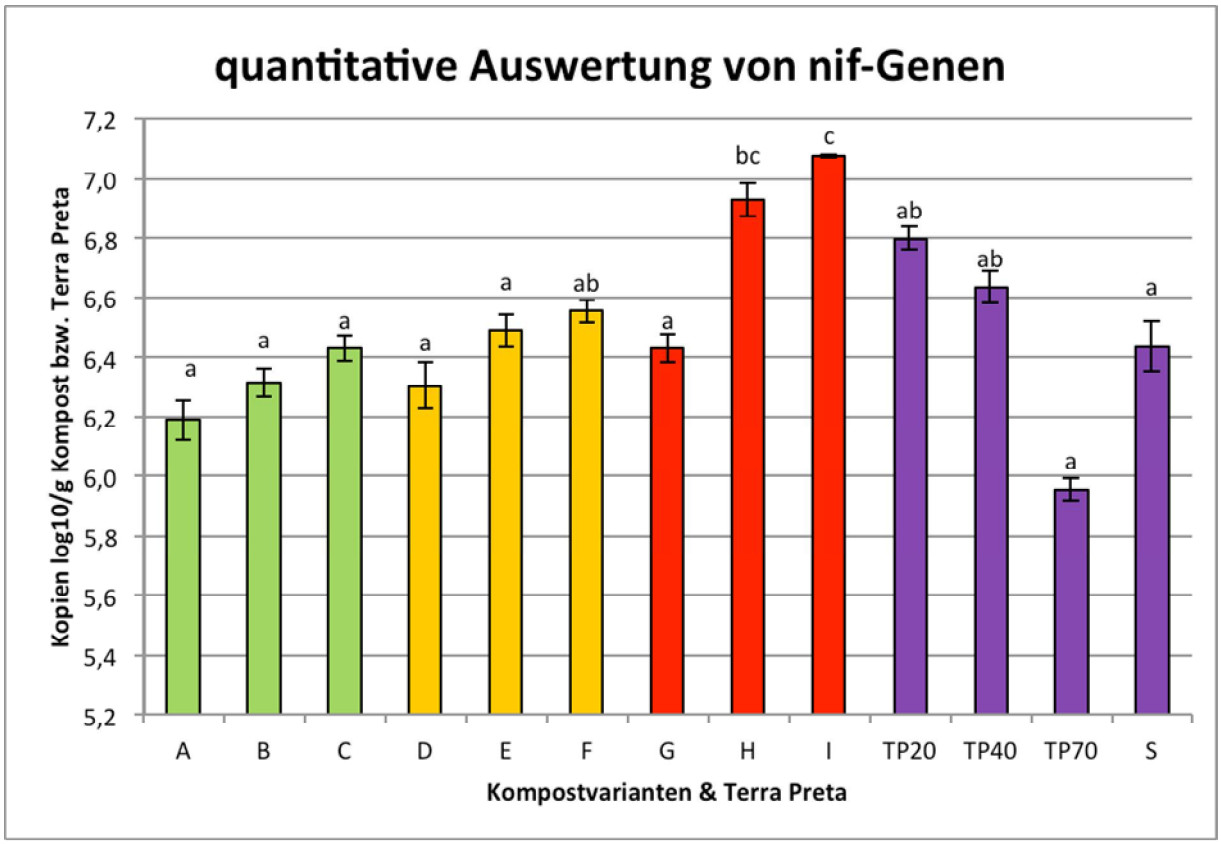

Abb. 20: Abundanz von nif-Genen in verschiedenen Kompostvarianten (A-I, siehe Tab.1) und Terra Preta (TP, S). Die Anzahl der spezifischen Genkopien (BAC) wurde in einem q-PCR Ansatz bestimmt. Als statistischer Nachweis wurde die Scheffe Prozedur angewandt. Die Messwerte werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander den Gruppen a,b oder c zugeordnet.

.

In Abbildung 21 werden die Mittelwerte der nif-Gensequenzen, ausgehend von den einzelnen q-PCR Messungen, dargestellt und die Auswirkung von Biokohle auf die Anreicherung von nif-Gen enthaltenden Mikroorganismen visualisiert. Aus dem Balkendiagramm kann entnommen werden, dass durch eine Steigerung des Biokohleanteils in den Komposten die nif-Gen kodierende DNA-Menge steigt. In den Komposten mit 20% Biokohleanteil wurde um 4,3 Millionen mal mehr nif-Gen kodierende DNA nachgewiesen als in den Komposten ohne

Biokohle.

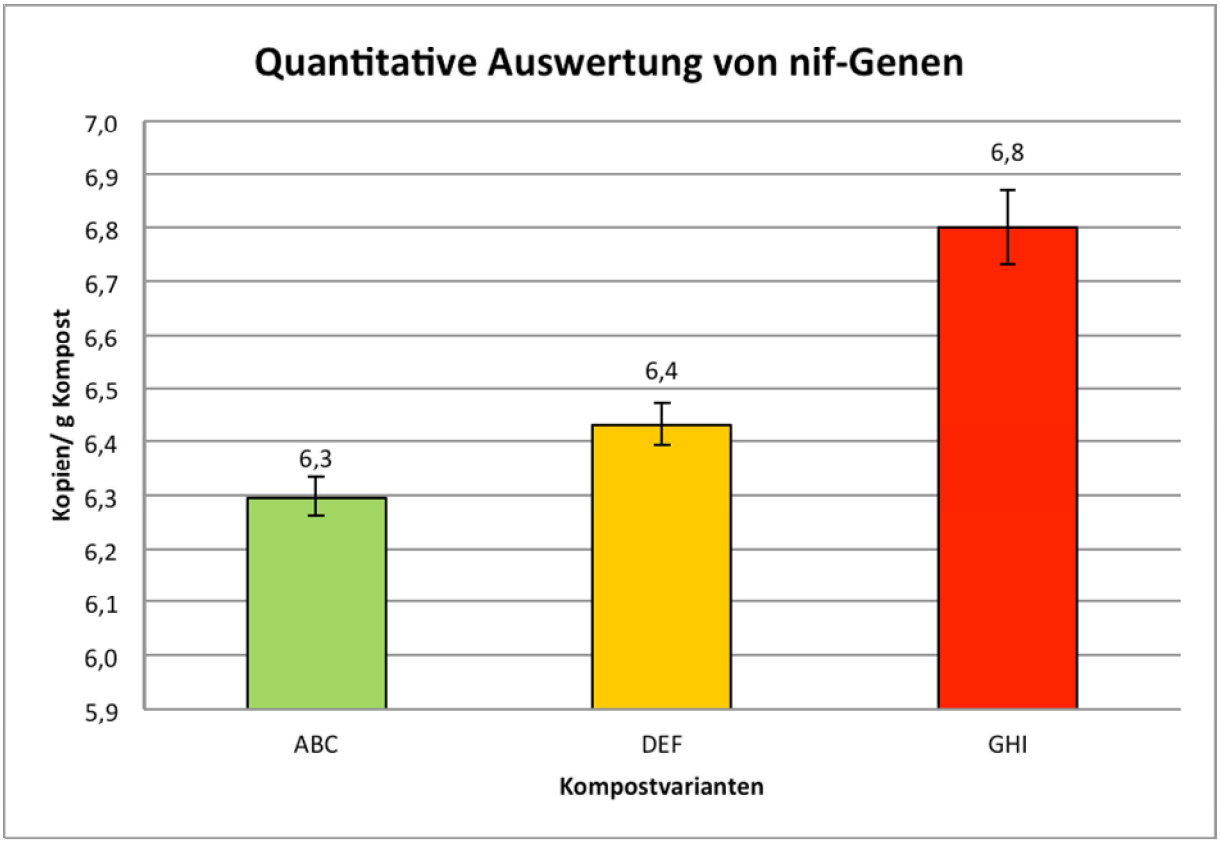

Abb. 21: Mittelwerte der nif-Gen-Abundanz in Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil. Aus den einzelnen Messungen der q-PCR (nif) wurde der Mittelwert der Kompostvarianten mit dem gleichem Biokohleanteil gebildet. **ABC:** 0% Biokohleanteil; **DEF:**10% Biokohleanteil; **GHI:** 20% Biokohleanteil.

Pilze konnten in den Kompostvarianten und Terra Preta nicht quantitativ bestimmt werden da die DNA-Menge unter der Detektionsgrenze der Apparatur lag. Darum wurde Rhizosphäre von den Kompostvarianten zur quantitativen Bestimmung von Pilzen verwendet.

Durch die Steigerung von Gesteinsmehl in den Komposten kommt es zu einem Anstieg von Pilz-DNA (siehe Abb. 22). Ist der Gesteinsmehlanteil von 10% kombiniert mit Biokohle im Kompost kommt es zu einer weiteren Steigerung der Pilz-DNA-Menge. Die Kompostvariante I weist den höchsten DNA-Wert auf der bei $10^{8,7}$ liegt und unterscheidet sich signifikant von den übrigen Kompostvarianten.

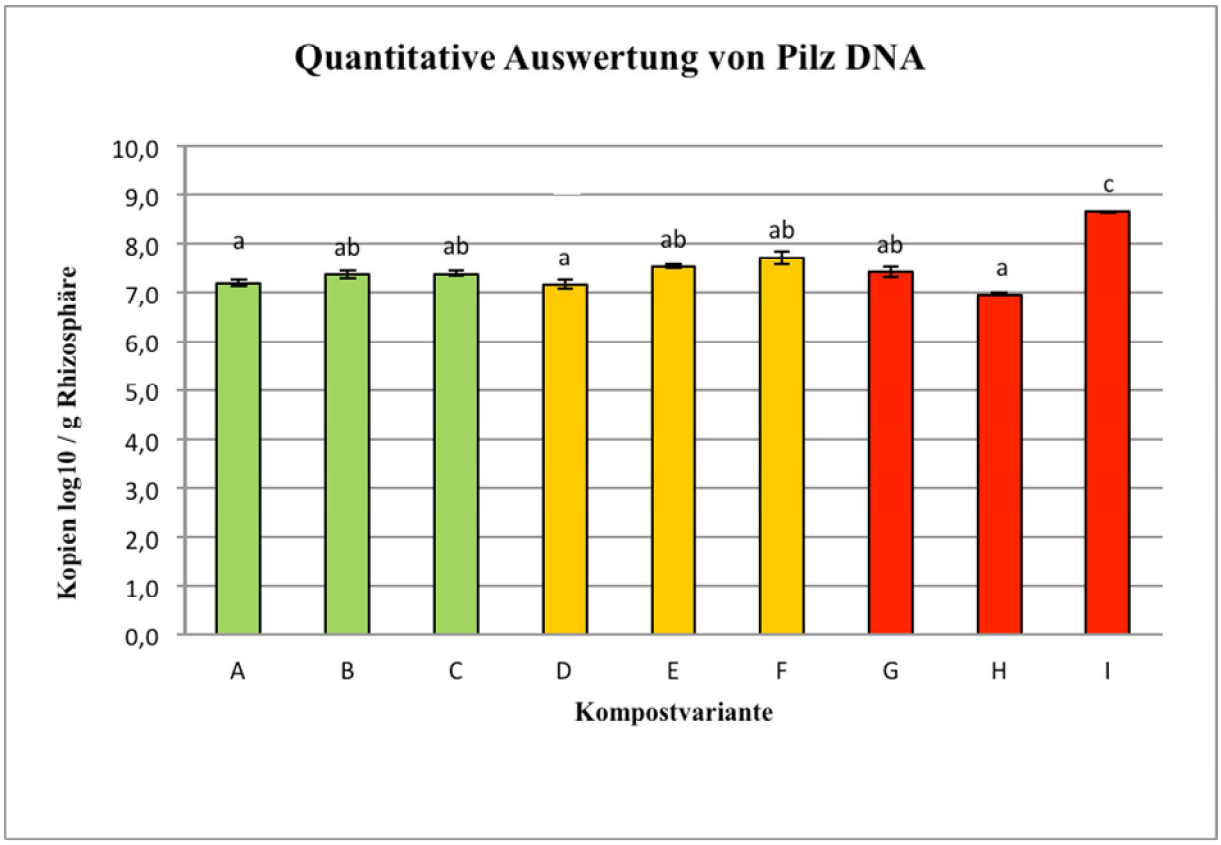

Abb.22: Abundanz von Pilzen in verschiedenen Kompostvarianten (A-I, siehe Tab.1). Die Anzahl der spezifischen DNA-Kopien (ITS) wurde in einem q-PCR Ansatz bestimmt. Als statistischer Nachweis wurde die Scheffe Prozedur angewandt. Die Messwerte werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander den Gruppen a,b oder c zugeordnet.

In Abbildung 23 werden die Mittelwerte der Pilz-DNA-Replikate, ausgehend von den einzelnen q-PCR Messungen, dargestellt und die Auswirkung von Biokohle auf die Anreicherung von Pilz-DNA visualisiert. Aus dem Diagramm kann entnommen werden, dass durch eine Steigerung des Biokohleanteils in den Komposten die DNA-Menge von Pilzen ansteigt. In den Komposten mit 20% Biokohle wurden $3{,}2 \times 10^7$ mehr Pilz-DNA Replikate nachgewiesen als in den Komposten ohne Biokohle.

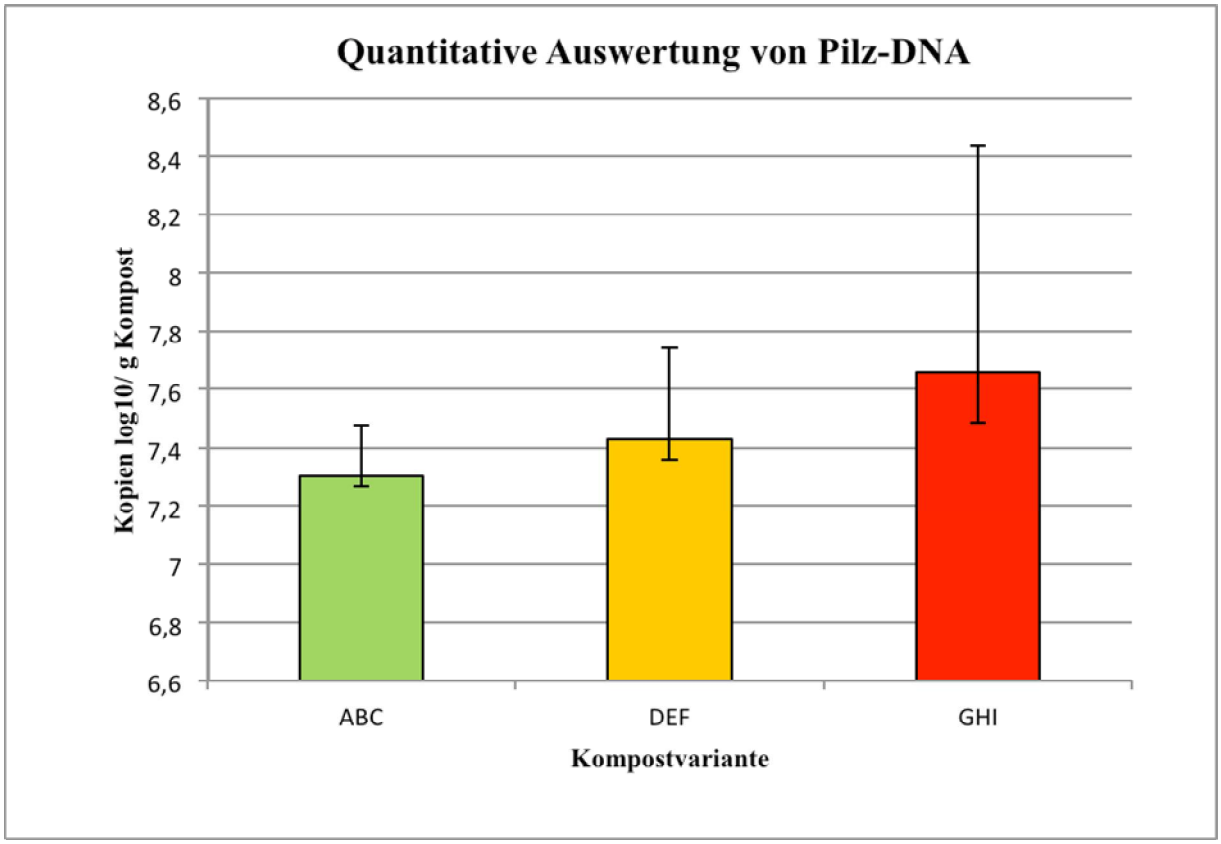

Abb.23: Mittelwerte der Pilz-Abundanz der Kompostvarianten mit gleichem Biokohleanteil. Aus den einzelnen Messungen der q-PCR (nif) wurde der Mittelwert der Kompostvarianten mit dem gleichem Biokohleanteil gebildet. **ABC:** 0% Biokohleanteil; **DEF:**10% Biokohleanteil; **GHI:** 20% Biokohleanteil.

3.2.1 Visualisierung unterschiedlicher Bakteriengemeinschaften auf Rhizosphäre aus Kompostvariante I

Für die Visualisierung von Bakterienkolonien auf Wurzeln wurden die FISH-Sonden für Gammaproteobakterien Alphaproteobakterien und eine universelle Bakteriensonde in Kombination für CLSM verwendet. Das Gras wurde in einer Mischung aus der Kompostvariante mit höchstem Gesteinsmehl und Biokohleanteil und Lavagranulat gezogen. Die folgenden Abbildungen (24-27) zeigen die Kolonisation von Bakterien an den Wurzeln, wobei einige auch in endophytischer Lage visualisiert wurden. Neben der überwiegenden Anzahl an universellen Bakterien (rot) sind Alphaproteobakterien stark vertreten (gelb). Einen sehr geringen Anteil bilden Gammaproteobakterien (pink).

In Abbildung 24 ist mittels Konfokalem Laser Scanning Mikroskop die Struktur einer Weidelgraswurzel dargestellt. Die abgegrenzten Felder stellen die einzelnen Zellen der Wurzel dar.

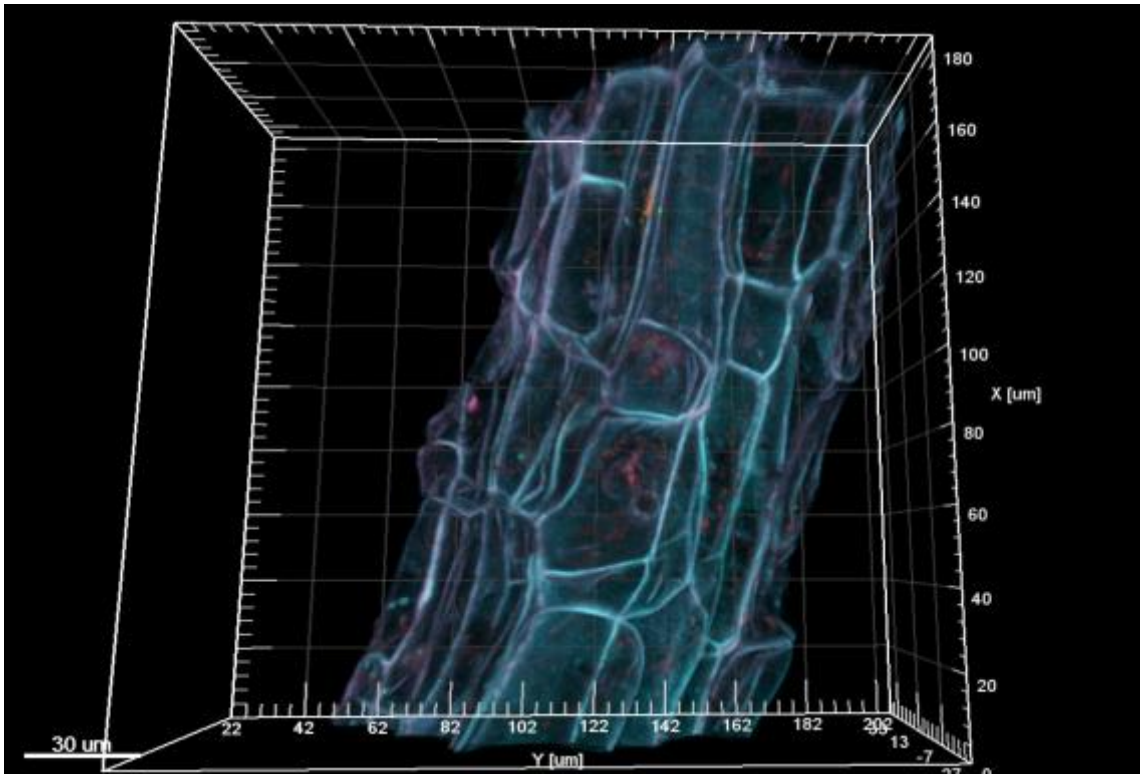

Abb. 24: Das Volume Rendering visualisiert die Wurzelstruktur von Weidelgras. Die Aufnahme wurde mittels CLSM gemacht.

Auf dem CLSM-Bild (siehe Abb.: 25) sind die an einer Wurzel von Weidelgras angereicherten Bakterien visualisiert. Es handelt sich dabei um allgemeine Bakterien, spezifisch um Alpha- und Gammaproteobakterien.. Auf Abbildung 25 ist zu sehen, dass eine Assoziation zwischen Bakterien und Pflanze stattfindet. Dominant sind die universellen Bakterien und Alphaproteobakterien. Gammaproteobakterien sind hingegen nur vereinzelt sichtbar.

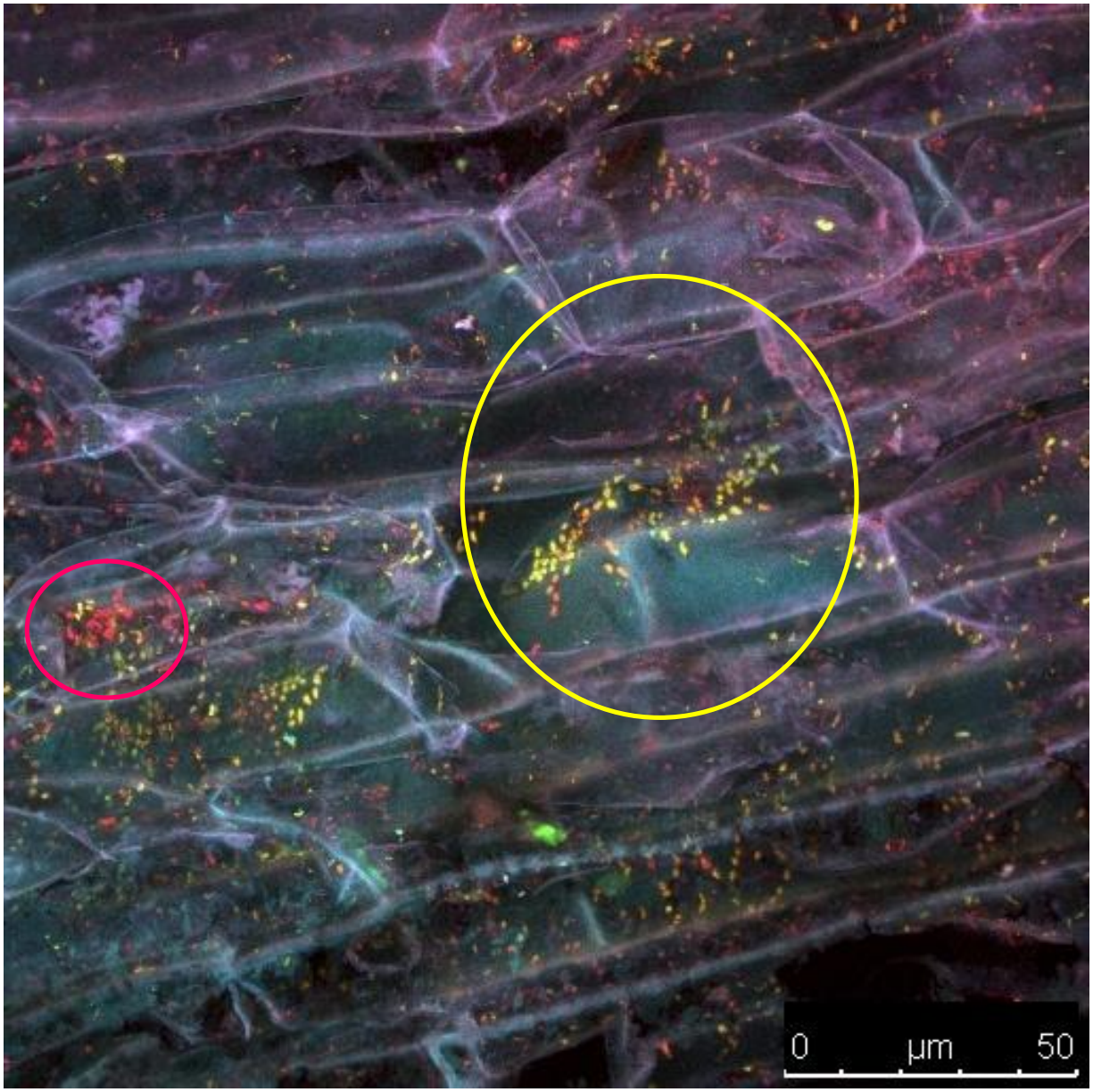

Abb. 25: Die Konfokale Laserscanning Mikroskopie zeigt die Lokalisation von Bakterien (rot), Alphaproteobakterien (gelb) und Gammaproteobakterien (pink) auf einer Weidelgraswurzel . Die gelbe Umrandung kennzeichnet Alphaproteobakterien und die

in pink gehaltene die Gammaproteobakterien. Die Floureszenzmarkierung erfolgte durch die *in situ* Hybridisierung mit bakterienspezifischen Fluoreszenzmarkern (Tab. 3)

Bei dem Volume Rendering (Abb. 26) wird eine Vielzahl von Schnitten gemacht, die danach übereinander gelegt ein 3 dimensionales Bild ergeben. Es ist erkennbar, dass die Kolonisierung der Bakterien auf unterschiedlichen Ebenen stattgefunden hat und die universellen- sowie Alphaproteobakterien stärker vertreten sind als Gammaproteobakterien.

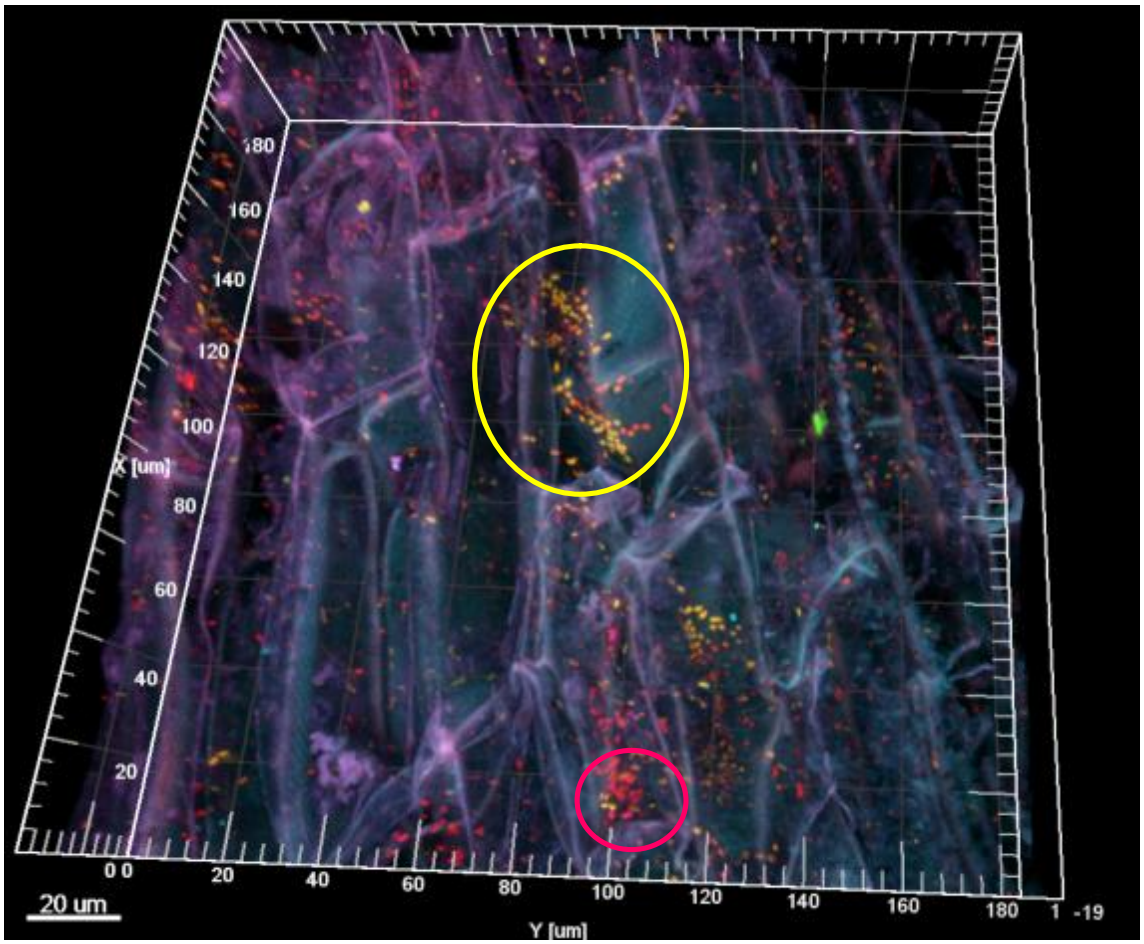

Abb. 26: Das Volume Rendering zeigt die Wurzel von Weidelgras und die Kolonisierung von Bakterien (rot), Alphaproteobakterien (gelb) und Gammaproteobakterien (pink). Die gelbe Umrandung kennzeichnet die Lokalisation der Alphaproteobakterien und die in pink gehaltene die der Gammaproteobakterien. Die Floureszenzmarkierung erfolgte durch die *in situ* Hybridisierung mit bakterienspezifischen Fluoreszenzmarkern (Tab. 3)

Abbildung 27 zeigt eine einzelne Ebene aus einer Serie von Aufnahmen von einem CLSM-Bild einer Wurzel von Weidelgras. Dieses Bild zeigt die Kolonisierung von Bakterien in einer endophytischen Region. Die endophytische Lage kann eine symbiotische Interaktion der Pflanze mit den Bakterien bedeuten. Auffallend ist, dass sich vorwiegend Alphaproteobakterien in dieser Region angesiedelt haben.

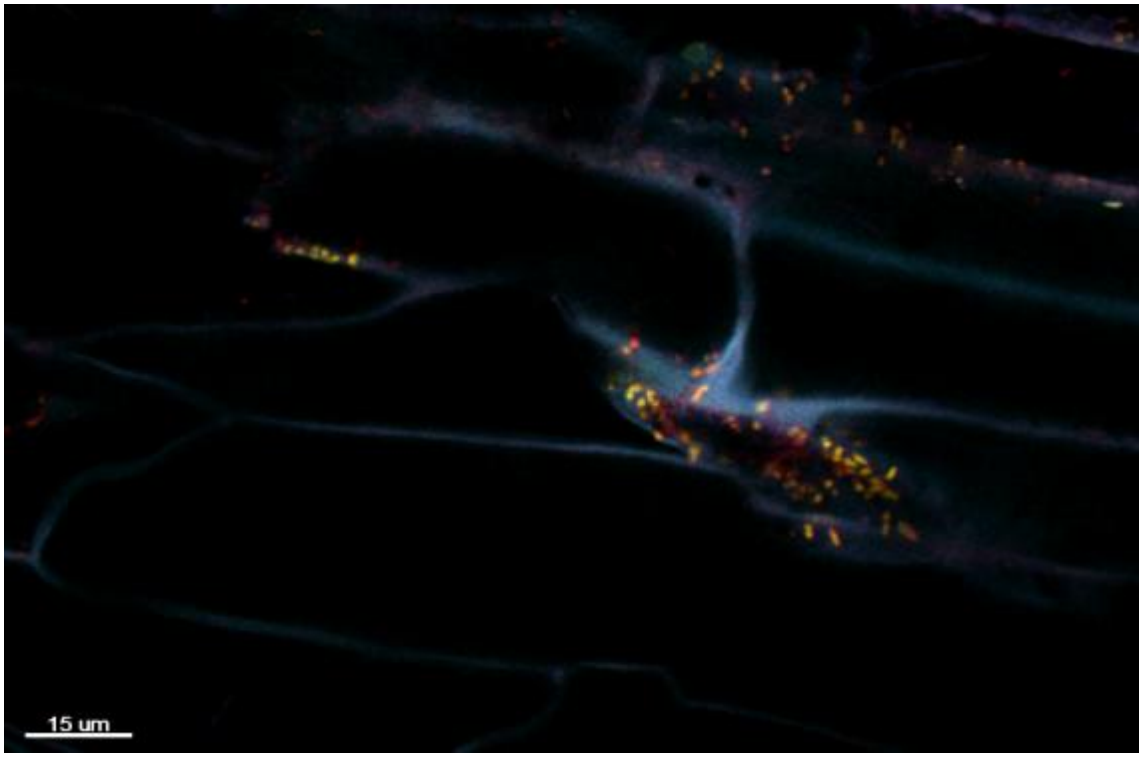

Abb. 27: Eine Ebene von einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskopbild von einer Weidelgraswurzel stellt die endophytische Lage von Bakterien dar. Die Floureszenzmarkierung erfolgte durch die *insitu* Hybridisierung mit bakterienspezifischen Fluoreszenzmarkern (Tab. 3)

3.2.2 Ergebnisse des Gewächshausversuchs

Der Biomassezuwachs von Weidelgras auf den Kompostvarianten und Anzuchterde wurde durch Abwiegen der geernteten Grashalme erfasst. Im folgenden Diagramm (siehe Abb.28) sind die Mittelwerte der Biomasse aus je 4 Töpfen mit identer Substratmischung und deren Standardabweichung dargestellt. Der Versuch lief über 6 Monate, wobei die Biomasse alle 3 Wochen gewogen wurde.

Abbildung 28 zeigt den durchschnittlichen Biomassezuwachs von Weidelgras, das in den Kompostvarianten gemischt mit Lavagranulat sowie in einer Anzuchterde gezogen wurde. Der Durchschnittswert der Kompostvarianten liegt bei 30g jedoch variiert der Biomassezuwachs nur um 2g innerhalb der Varianten. Bei der Anzuchterde liegt der durchschnittliche Biomassezuwachs bei 10g.

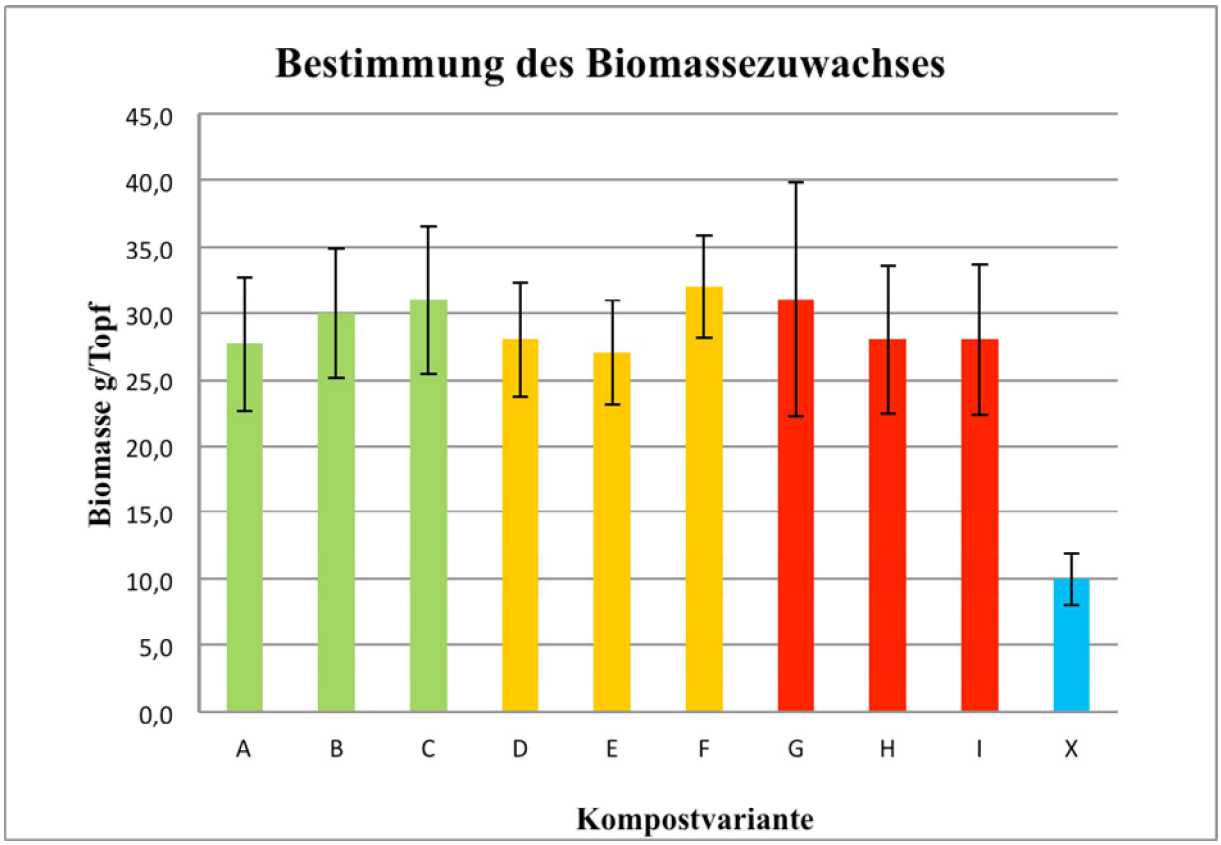

Abb. 28: Durchschnittlicher Biomassezuwachs von Weidelgras in verschiedenen Kompostvarianten und Anzuchterde. Im Rahmen des Gewächshausversuchs wurde Weidelgras in Kompostvarianten und Anzuchterde gezogen und die Biomasse alle 3 Wochen vermessen. Die Zusammensetzung der Kompostvarianten A-I ist in Tabelle 1 aufgelistet. Eine handelsübliche Anzuchterde war das Vergleichsmedium.

4. Diskussion

Die Agrarwirtschaft bildet einen wesentlichen Bestandteil unserer Versorgung mit Grundnahrungsmitteln. Die Weiterentwicklung von Bodenbearbeitungs- und Düngemethoden ermöglicht es heute der österreichischen Landwirtschaft mit weniger Personal auf weniger Fläche mehr Agrarprodukte als je zuvor zu erzeugen. Die negativen Auswirkungen davon auf den Boden zeigen sich erst nach Jahrzehnten und werden in den meisten Fällen durch intensive Bodenbearbeitung und Überdüngung ausgeglichen. „Alle menschlichen Eingriffe in das Ökosystem Boden beeinflussen mindestens einen Parameter direkt und damit verbundene Eigenschaften oder Zustände indirekt. Lockernde, mischende und wendende Bodenbearbeitung verändert das natürliche Gefüge völlig und schafft dadurch neue Voraussetzungen für das Edaphon. Biochemische Umsetzungsprozesse werden in der Folge entsprechend der Art des Eingriffs begünstigt oder gehemmt. Durch die Bearbeitung liegt der Boden zumindest zeitweise offen und ist mechanischen und chemischen Einflüssen wie Erosion oder Immission verstärkt ausgesetzt“ (Kuntze et al., 1994).

Eine Alternative zur intensiven Bodenbearbeitung und Kunstdüngung ist eine konservierende Bodenbearbeitung sowie der Eintrag von organischen Nährstoffen durch Kompost. Eine Möglichkeit haben Ureinwohner aus dem Amazonasgebiet geliefert indem sie durch Kompostierung nachhaltige Humusböden etablieren konnten, die sogenannte Terra Preta. „Zufuhr organischer Substanz stabilisiert den Humusgehalt im Boden, aktiviert das Bodenleben und fördert dadurch sämtliche Nährstoffumsetzungen. Außerdem stabilisiert sie das Bodengefüge, erhöht Porenanteil, Wasserinfiltrations- und Speicherkapazität des Bodens, schützt vor Austrocknung und Erosion und stellt den größten Stickstoffspeicher im Boden dar“ (Amberger, 1979). Mit der Optimierung eines organischen Substrats, das zur Bodenbelebung beitragen soll, beschäftigt sich Gerald Dunst mit seinem Team von der Firma Sonnenerde (Riedlingsdorf AUT). Dabei handelt es sich um eine Versuchsreihe von Komposten mit unterschiedlichem Gesteinsmehl- und Biokohleanteil. Aufgrund der Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft in Böden war ein Ziel dieser Arbeit einen Überblick von ausgewählten Mikroorganismen, die sich in den Kompostvarianten aus der Versuchsreihe E und Terra Preta Proben etabliert haben, zu schaffen.

Zu den ausgewählten Mikroorganismen zählten universelle Bakterien, spezifische Bakterien, die in der Biokontrolle (Berg, et al 2009) relevant sind und Pilze. Es wurde festgestellt, dass sich die Bandenmuster der SSCP-Gele aller untersuchten Mikroorganismen mit zunehmendem Biokohle- und Gesteinsmehlanteil an jene Bandenmuster der Terra Preta annähern. Bei der SSCP-Analyse von den untersuchen Mikroorganismen konnte beobachtet werden, dass es durch die Steigerung des Biokohleanteils zu keiner Diversitätszunahme kam, sondern dass abundante Banden an Intensität gewinnen konnten. Besonders auffällig war dieser Effekt bei der Analyse von Firmicutes bei denen interessanterweise eine Zunahme der Firmicutes-DNA mit Biokohleanteilssteigerung mittels quantitativer Analyse (q-PCR) nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung ist ein Hinweis, dass die Biokohle ein strukturgebendes sowie schutzbietendes Element darstellt, das die willkürliche Ausbreitung von Mikroorganismen unterbindet und die Anreicherung ausgewählter Mikroorganismen fördert. Die poröse Struktur von Biokohle sowie ihre große Oberfläche und die Fähigkeit lösliche organische Stoffe, Gase und anorganische Nährstoffe zu absorbieren, sind Eigenschaften die sie zu einem geeigneten Lebensraum für Mikroorganismen macht. Die Poren bilden ein schützendes Habitat, wo Mikroorganismen vor natürlichen Räubern geschützt sind (Saito und Muramoto, 2002; Warnock et al, 2007). Mit der Zunahme der Schichttiefe der Terra Preta Proben konnte eine DNA-Abnahme von Firmicutes und nif-Genen gemessen werden. Dies bestätigt, dass es in tieferen Schichten der Erde zu einer signifikanten Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft und zu einer Abnahme der Biomasse kommt. Eine Veränderung des Nährstoffangebots und die unterschiedlichen Erdeigenschaften sind die auslösenden Faktoren (Fierer et al., 2002).

Es kann geschlussfolgert werden, dass sich durch die Veränderung des Habitats auch die Mikroorganismengemeinschaft verändert und sich das Komposthabitat durch die Zuschlagstoffe jenem der Terra Preta annähert. Bestätigt wird diese Erkenntnis durch eine Forschungsreihe deren Schluss war, dass die Grundlage für die Entwicklung einer mikrobiellen Gemeinschaft das passende Habitat ist. (Lehmann und Joseph et al., 2009).

Die angewandten Analysen liefern keine Garantie, dass das komplexe Netzwerk der mikrobiellen Gemeinschaft der Terra Preta Böden im Zuge dieser Versuchsreihe nachgebildet werden konnte. Im Vergleich mit höher entwickelten Techniken kann mit der eingesetzten SSCP-Analyse nur ein Bruchteil der Mikroorganismen erfasst werden. Die Tatsache, dass Mikroorganismen ihren Stoffwechsel an die gegeben Bedingungen anpassen können bedeutet, dass zwar eine ähnliche Mikroorganismengemeinschaft akkumuliert, aber verschiedene

Stoffwechselwege eingeschlagen werden könnten. Zum Beispiel ist eine wichtige Eigenschaft von Bakterien die enzymatische Umwandlung von elementarem Stickstoff. In unserer Atmosphäre besteht das gesamte Stickstoffvorkommen zu 78% aus der am wenigsten reaktiven Verbindung N_2 und ist nicht direkt verwertbar für Pflanzen. In Bezug auf das Pflanzenwachstum und den Ernteertrag stellt Stickstoff in Form von Nitrat oder Ammonium ein limitierendes Element im Boden dar (Hooper & Johnson, 1999; Marschner, 1995). Die inerte Form von Stickstoff kann durch Lichteinfluss, menschliche Aktivität oder Bakterien die in Symbiose mit Leguminosen leben, (Bradic et al.,2003; Vance, 1998) wurzelassoziiert sind oder frei in Erde vorkommen umgewandelt werden (Vadakattu &Paterson, 2006).

Für diese Arbeit relevant waren die Möglichkeiten von Bakterien den elementaren Stickstoff umzuwandeln. Das Enzym Nitrogenase katalysiert die Umwandlung von N_2 in eine für Pflanzen verwertbare Form, die von Bakterien im Habitat fixiert wird (Newton, 2007). Die mittels qPCR nachgewiesenen nif-Gen Sequenzen zeigen, dass es bei einem erhöhten Biokohleanteil zu einer vermehrten Anreicherung von Bakterien kommt, die die Voraussetzungen für eine Nitrogenaseexpression haben. Daraus kann geschlossen werden, dass im Falle der Translation dieser Gensequenzen eine größere Stickstofffixierung stattfindet. Eine weiterführende interessante Möglichkeit um ein besseres Verständnis der Stickstofffixierung und des komplexen Netzwerks der Bodenmikrobiologie zu erlangen wäre eine Analyse mittels Microarray. Es ermöglicht die Veränderungen der Genexpression zu erfassen und mögliche Veränderungen von Stoffwechselwegen können nachverfolgt werden. Auch die Verfolgung des Nährstofftransfers könnte symbiontisches Verhalten von Mikroorganismen untereinander oder mit Pflanzen aufdecken.

Zusätzlich zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft der Komposte wurden Versuche mit Rhizosphäre von Weidelgras, welches in den Kompostvarianten gezogen wurde durchgeführt. Da die quantitative Bestimmung von Pilz-DNA in Komposten nicht möglich war wurde sie mit Rhizosphäre wiederholt. Waren die Werte bei der Kompostanalyse noch unter dem Detektionsminimum konnten bei der Analysen der Rhizosphäre Werte im Bereich von 10^7 DNA-Replikate pro Gramm Rhizosphäre gemessen werden. Erst durch das Pflanzenvorkommen in den Komposten entwickelte sich eine mit qPCR nachweisbare Konzentration von Pilz-DNA. Es könnte sein, dass Pilze in gereiften trockenen Komposten ihre Stoffwechselaktivität auf ein Minimum einschränken (Sporen) um die Überlebenschance zu erhöhen und somit die Pilz-DNA in nicht nachweisbaren Konzentrationen vorliegen und erst durch das Vorkommen von Weidelgraswurzeln in einen aktiven Zustand übergehen und somit die Konzentration der Pilz-DNA nachweisbar steigt. Unterstützt wird diese Annahme

durch die Tatsache, dass einige Pilze eine Mykorhizza (Pilzwurzel) mit Pflanzen entwickeln können.
In den Kompostvarianten konnte mikrobielle DNA nachgewiesen werden, zusätzlich ermöglichte die Kultivierung von Weidelgras die Visualisierung von assoziierten Bakterien auf Wurzeln. Die mittels FISH-CLSM durchgeführten Experimente zeigten eine abundante Bakterienkolonisierung auf der Rhizosphäre von der Kompostvariante I. Die Kolonisierung von Alphaproteobakterien war gegenüber der von Gammaproteobakterien um ein Vielfaches höher was angesichts der hohen Abundanz von Gammaproteobakterien laut der quantitativen Bestimmung mit qPCR nicht erwartet wurde.. Möglicherweise gab es Probleme bei der Markierungsmethode oder Gammaproteobakterien assoziieren weniger an Wurzeln und bevorzugen das Erdhabitat.

Die CLSM-Analyse einzelner Wurzelschichten lässt auf eine endophytische Lage der Bakterien schließen. Eine solche Lage könnte ein Hinweis auf ein symbiotisches Verhältnis zwischen Bakterien und Pflanzen sein oder ist eine durch die Pflanze getroffene Auswahl bestimmter Mikroorganismen die sich daher anreichern. Der Pflanzenwachstumsversuch gab Aufschluss über den Biomassezuwachs und somit über die Auswirkungen von Gesteinsmehl- und Biokohlezugabe auf das Pflanzenwachstum.

Die Kompostvarianten zeigten über den Versuchszeitraum keinen Unterschied im Biomassezuwachs. Einen signifikanten Unterschied der Biomasse gab es nur zwischen den Kompostvarianten und der handelsüblichen Anzuchterde, die als Vergleichssubstrat verwendet wurde. Das Mittel der Biomasse der Komposte war um 35% höher als die der Anzuchterde. Da die Komposte ein hohes Nährstoffangebot haben, ist möglicherweise erst nach einer längeren Versuchsdauer ein Effekt von Biokohle auf das Pflanzenwachstum nachweisbar. Die Entwicklung und die Produktivität von Paprika- und Tomatenpflanzen im erdfreien Medium mit und ohne Biokohle, wurde von einer israelischen Forschungsgruppe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Pflanzen in den Medien mit Biokohle eine größere Blatt- und Fruchtausformung haben (Graber, et al 2010). Damit ähnliche Effekte gezeigt werden können müssten möglicherweise Pflanzen mit einem hohen Nährstoffbedarf ausgewählt werden und der Versuch über einen längeren Zeitraum laufen. Positiv ist dass gezeigt werden konnte, dass Pflanzen sich auf dem Kompost/Lavasand Substrat ohne zusätzliche Düngung entwickeln und jene die auf Anzuchterde gezogen wurden nach wenigen Wochen ihr Wachstum einstellen. Daraus kann Schlussgefolgert werden, dass

Komposteintrag die verbreitete Kunstdüngung ersetzten kann und im Beisein von Biokohle Nährstoffe im Boden besser gespeichert werden können (Schmidt, H. et al 2011).

Ausblick :

Auf dem Sektor der Forschung mit Biokohleanteil in Komposten und die Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft sind noch viele Fragen ungeklärt. Ein Feldversuch bei dem über einen mehrjährigen Zeitraum die Entwicklung der Bodenbiologie in Bezug auf das Habitat beobachtet wird, könnte Klarheit schaffen. Dabei würde sich anbieten Böden, die intensiv bearbeitet und mit synthetisch hergestellten Düngern behandelt werden mit solchen zu vergleichen, die schonend behandelt werden, einen gewissen Biokohleanteil aufweisen und mit Kompost gedüngt werden, zu vergleichen. Weiters ist der Zusammenhang von den gefundenen Tonscherben in Terra Preta und Biokohle sowie Mikroorganismen noch nicht gänzlich geklärt. Auch der optimale Zeitpunkt der Beimengung von Biokohle zum Kompost und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft sind noch unerforscht. Ein Vergleich der Mikroorganismen von Kompost mit Biokohleanteil und einer Terra Preta mittels „deep sequenzing“ Technik würde einen Überblick der gesamten Bakteriengemeinschaft schaffen und Unterschiede könnten herausgefiltert werden.

Schlussendlich trifft die Aussage zu, dass wir mehr über die Bewegung der Himmelskörper wissen als über die Erde unter unseren Füßen (Leonardo da Vinci).

5. Literaturverzeichniss

Amberger, A., (1979) Pflanzenernährung. Ökologische und physiologische Grundlagen. *Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart*

Balesdenta, J., Chenub, C., Balabaneb, M.,(2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage53, 215–230

Berg, G., and Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere, *FEMS Microbiology Ecology 68*, 1-13.

Berg, G. (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture, *Applied Microbiology 84*, 11-18.

Bradic, M., Sikora, S., Redzepovic, S. & Stafa, Z. (2003). Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous Sinorhizobium meliloti field population. *Food Technology and Biotechnology* 41, 69-75.

Braun-Howland, E. B., Vescio, P. A., and Nierzwicki-Bauer, S. A. (1993) Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental isolates, *Applied and Environmental Microbiology 59*, 3219-3224.

Cardinale, M., Vieira de Castro, J., Mueller, H., Berg, G., Grube, M.(2008). In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria *FEMS Microbiology Ecology* 66 (1):63–71

Cogger, C. G. (2005) Potential compost benefits for restoration of soils disturbed by urban development,*Compost Science and Utilization*, 13, 4, 243–251.

Dunst, G. (2011) Humusaufbau Chance für die Landwirtschaft und Klima, *Ökoregion Kaindorf*

Dunst, G. (2011) Kompostierung - Anleitung für: Hausgarten, bäuerlichen und kommunalen Bereich, *Leopold Stocker Verlag*

Fierer, N., Schimel, J. P., and Holden, P. A.(2003)Variations in microbial community composition through two soil depth profiles,*Soil Biology & Biochemistry 35,167–176*

Fontoura, R., Whalen, JK. (2010)Soil microbial respiration and nitrogen mineralization in a biochar-amendend soil frem Quebec, Candada ,*International Biochar Conference*

Forest, I., Calcagno, V. Hector, A., Connolly, J.,; Harpole, W. S., Reich, P. B.,Scherer-Lorenzen, M.,Schmid, B., Tilman, D., van Ruijven, J., Weigelt, A., Wilsey, B. J., Zavaleta, E. S., Loreau,M., (2011) High plant diversity is needed to maintain ecosystem services,*NATURE*

Glaser, B., Haumaier, L., Guggenberger, G., and Zech, W., (2001) The 'TerraPreta' phenomenon: A model for sustainable agriculture in the humidtropics. *Naturwissenschaften* 88:37–41.

Glaser, B., Lehman, J. and zech, w. (2002) Ameliorating physical and chemical properties of hifhly weathered soils in the tropics with charcoal- a review. Bil.Tertil. Soils 35,219-230

Graber, E.R., Meller Harel, Y., Kolton, M., Cytryn, E., Silber, A., Rav David, D., Tsechansky, L., Borenshtein, M., Elad, Y. (2010) Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. Plant & Soil 337, 481-496

Haas, D., and Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* ssp. and relevance for biological control of plant disease, *Annual review of phytopathology 41*, 117-153.

Hai, B.(2009) , Impact of Environmental Factors on Key Functional Groups involved in Nitrogen, Disserdation Cycling in Agricultural Ecosystems

Hooper, D. U. & Johnson, L. (1999). Nitrogen limitation in dryland ecosystems: Responses to geographical and temporal variation in precipitation. *Biogeochemistry* **46**, 247-293.

Hockaday, W.C., Grannas, A.M., Kim, S., Hatcher, P.G., (2007) The transformation and mobility of charcoal in a fire-impacted watershed. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 3432-3445.

Jin, H., 2010. Characterization of microbial life colonizing biochar and biocharamended soils. *PhD Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.*

Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Thirup, L., and Torsvik, V. (1999) Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots, *Applied and Environmental Microbiology 65*, 1786-1788.

Johnson, L. C. & Matchett, J. R. (2001). Fire and grazing regulate belowground prodcesses in tallgrass prairie. *Ecology* **82**, 3377-3389.

Kolton, M., Harel, M.Y., Pasternak, Z., Graber R. E., Elad Y., and Cyrtyn E. (2011) Impact of Biochar Application to Soil on the Root-Associated Bacterial Community Structure of Fully Developed Greenhause Pepper Plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 4924-4930

Kuntze**,** H., Roeschmann, G., Schwerdtfeger, G. (1994) Bodenkunde. *Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart*

Lo Piccolo, S., Ferraro, V., Alfonzo, A., Settanni, L., Ercolini, D., Burruano, S., and Moschetti, G., (2010) Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Ann Microbiology* 60, 161-167

Nitzsche, O., Krück, S., Zimmerling, B.,Schmidt, W. (2004): Innovative Bodenbearbeitungsverfahren zur Minderung von Bodenerosion und Nährstoffeinträgen. *BECKER,*

Newton, W. E. (2007). Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. *Biology of the Nitrogen Cycle: Cost Edition*, 109-129.

Müller, H. (2006) Novel concepts in biological plant protection on the basis of the biological control agent *Serratia plymuthica* HRO-C48, *Dissertation*.

Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, London, UK: Academic Press.

Marschner, B. & Flessa, H. (2006): Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *European Journal of Soil Science*, Vol. 57, 426–445.

Neklyudov, A. D.; Fedotov, G. N. & Ivankin, A. N. (2006): Aerobic Processing of Organic Waste into Composts. In: Applied *Biochemistry & Microbiology* 42 (4), 341–353.

Ogawa, M. (1994) symbiosis of people and nature in the tropics, *Farmin Japan 28, 10-34*

Ogawa,M. and Yamabe, Y. (1986) Effects of charcoal on VA mycorrhizae and nodule formation of soybeans, Bulletin of the Green Energy Programme Group II, no 8 , Ministry of agriculture, *Foresty and Fisheries,Japan,108-133*

Pietikäinen,J., Kiikkilä, O. and Fritze, H (2000) Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underling humus, *Oikos 89,231-242*

Pini, R., Bretzel, F., Sparvoli, E., Pezzarossa, B., and Scatena M., (2011) ArticleCompost and Wildflowers for the Management of Urban Derelict Soils ,*Applied and Environmental Soil Science*

Saito, M. and Marumoto, T., (2002) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi: The status quo in Japan and the future prospechts, *Plant and Soil*, vol 244,273-279

Schmalenberger, A. Schwieger, F. Tebbe, C. (2001) Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarliy Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling, *Applied and Environmental Microbiology*

Schmidt, M., W., I., Noack, A., G., (2000) Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogegeochem* Cycles 14: 777-793

Skjemstad, J., O.,Clarke P., Taylor, J., A., oades, J., M.., McClure S., G., (1996) The chemistry and nature of protected carbon in soil. Aust j Soil Res 34:251-271

Scheffé, H. (1959). *The Analysis of Variance*. Wiley, New York. (reprinted 1999, ISBN 0-471-34505-9)

Smith, J.L.; Collins, H.P.; Bailey V.L. (2010). The effect of young biochar on soil respiration, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 42, Issue 12, pp. 2345-2347

Stanly, J.T., & Konopka, A., (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosyntetic microorganisms in aquativ an terrestrial habitats, *Annu. Rev. Microbiol*. 39:321-346

Stevenson, F.J. (1994) Humus Chemistry: Genesism, Composition, Reaction. John Wiley Sons, New York

Suzuki, M., and Giovannoni, S. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Applied and Environmental Microbiology 62*, 625-630

Töwe,S., Kleineidam, K., Schloter, M. (2010) Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples, *Journal of Microbiological Methods 82 ,338–341*

Vadakattu, G. & Paterson, J. (2006). Free-living bacteria lift soil nitrogen supply. *Farming Ahead* 169, 40.

Walker, N. (2002) A technique whose time has come, *Science 296*, 557-5

Zackrisson, O., Nilsson, M.C., and Wardle. D.A., (1996). Key ecological function of charcoal from wildfi re in the boreal forest. *Oikos* 77:10–19.