

Umweltforschung in Baden-Württemberg

Abschlussbericht

**Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch
veränderten Organismen in Baden-Württemberg –
Methodenetablierung und Aufnahme der „Baseline“**

Doreen Benter, Jenny Hafner, Liliane Rueß,
Dagmar Tscherko, Ellen Kandeler

Universität Hohenheim
Institut für Bodenkunde und Standortlehre
Fachbereich: Bodenbiologie

Förderkennzeichen: L75 24002
Laufzeit: 1.10.2004 – 31.12.2006

Die Arbeiten dieses Projekts wurden mit Mitteln
des Landes Baden-Württemberg durchgeführt

Juni 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Methoden	5
3.1	Untersuchungsflächen	5
3.2	Probennahme	5
3.3	Chemische und biologische Bodenanalysen	6
3.4	Mikrobiologische Analysen	6
3.5	Statistik.....	7
4	Darstellung der Ergebnisse und Diskussion	9
4.1	Mikrobiologische und chemische Charakterisierung der Vegetationseinheiten	9
4.1.1	<i>Funktionale Diversität von Bodenmikroorganismen</i>	9
4.1.2	<i>Boxplotdarstellung chemischer und bodenbiologischer Parameter</i>	11
4.1.3	<i>Phospholidfettsäuren und Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese</i> ...	23
4.1.4	<i>Bt-Endotoxine</i>	31
4.2	Bewertung der Methoden	32
4.2.1	<i>Enzymaktivitäten</i>	32
4.2.2	<i>Enzymaktivitätenmuster der verschiedenen Vegetationseinheiten</i>	33
4.2.3	<i>PLFA- und DGGE-Analysen</i>	34
5	Literatur	36

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lage der Grünlandflächen in Baden-Württemberg, verändert nach KLINK & PISTORIUS-KLINK (2003)	6
Abb. 2: Darstellung der Kanonischen Diskriminanzfunktion Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	9
Abb. 3: pH-Werte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	11
Abb. 4: Trockensubstanzgehalte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	12
Abb. 5: Potentielle Nitrifikation Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	13
Abb. 6: Organischer Kohlenstoffgehalt Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	14
Abb. 7: Ninhydrin-reaktiver Stickstoff Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	14
Abb. 8: β -D-Glucosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	16
Abb. 9: α -D-Glucosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	16
Abb. 10: N-Acetyl-Glucosaminidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	18
Abb. 11: Cellobiosidaseaktivität Herbst 2004(links) und Frühjahr 2005 (rechts)	18
Abb. 12: Xylosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	19
Abb. 13: saure Phosphataseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	19
Abb. 14: L-Tyrosinaminopeptidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	20
Abb. 15: Proteaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	21
Abb. 16: Invertaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	21
Abb. 17: Dendrogramm (Ward-Methode) der PLFA-Muster, Herbst 2004	24
Abb. 18: Dendrogramm (Ward-Methode) der PLFA-Muster, Frühjahr 2005	24
Abb. 19: Gesamtgehalte [nmol/ g TS] der pilzlichen Indikator-PLFAs	26
Abb. 20: PLFA-Gesamtgehalte (%), Herbst 2004	28
Abb. 21: PLFA-Gesamtgehalte (%), Frühjahr 2005	28
Abb. 22: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Herbst 2004, Gel 1 (26.08.2005)	29
Abb. 23: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Herbst 2004, Gel 2 (30.08.2005)	29
Abb. 24: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Frühjahr 2005, Gel 1 (23.09.2005)	29
Abb. 25: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Frühjahr 2005, Gel 2 (28.09.2005)	29

Abb. 26: Vergleich der Streuung der Enzymaktivitäten (Microplate Reader) über alle Flächen Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	32
Abb. 27: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Apfelberg und Kaiserberg Herbst 2004 und Frühjahr 2005	33
Abb. 28: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Mönchsteig Herbst 2004 und Frühjahr 2005	33
Abb. 29: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Kappelberg und Irndorfer Hardt Herbst 2004 und Frühjahr 2005	33

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zuordnung der Vegetationseinheiten mit den zugehörigen Flächen und Probennummern, verändert nach KLINK & PISTORIUS-KLINK (2003).....	6
Tab. 2: Standardisierte kanonische Diskriminanzfunktionskoeffizienten Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts).....	10
Tab. 3: Eigenwerte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)	10
Tab. 4: Zusammenfassung der Phospholipidfettsäuren-Gesamtgehalte, Herbst 2004 und Frühjahr 2005	23

1 Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes ist die Definition einer „Baseline“ zu bodenmikrobiellen Eigenschaften von 18 Grünlanddauerbeobachtungsflächen Baden-Württembergs als Grundlage zum Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen (GVO). Daneben sollen Methoden etabliert werden, um künftig ein praktikables und kostengünstiges Verfahren des Umweltmonitorings zu ermöglichen. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die funktionelle Charakterisierung (Bodenenzymaktivität) der Mikroorganismengemeinschaft des Bodens gelegt. Es wurden die Aktivitäten von der β - und \bullet -D-Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, Xylosidase, Cellobiosidase, sauren Phosphatase, L-Leucin- und L-Tyrosinaminopeptidase mittels Fluoreszenz-Methode bestimmt. Mithilfe dieser angewandten Fluoreszenz-Methode können gleichzeitig mehrere Bodenenzyme aus dem Kohlenstoff-, Phosphor- und Stickstoffkreislauf analysiert werden. Zudem lieferte diese elegante und zeitsparende Methode, ebenso wie die kolorimetrischen Bestimmungen der Invertase-, Xylanase- und Proteaseaktivität, gut reproduzierbare Daten. Die Variationskoeffizienten für beide Methoden bezüglich der analytischen Wiederholung lagen im üblichen Bereich für Bodenanalysen. Mittels Diskriminanzanalyse erfolgte die funktionelle Charakterisierung der Bodenmikroflora der unterschiedlichen Vegetationsgruppen. Die „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“ sowie die „versauerten Halbtrockenrasen“ zeigen deutliche Übereinstimmung. Die „beweideten Magerrasen“ stehen den Halbtrockenrasen nahe, zeigen aber Unterschiede aufgrund der Düngeeffekte durch Beweidung. Von diesen drei Gruppen separieren sich deutlich die „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ und die „Borstgrasrasen“. Diese Auftrennung der Vegetationseinheiten erfolgt hauptsächlich durch den pH-Wert und die Xylosidaseaktivität. Im Allgemeinen bestätigen Boxplots einzelner mikrobieller Eigenschaften diese Clusterbildung der verschiedenen Vegetationstypen.

Im zweiten Projektteil werden zur Aufklärung der strukturellen Diversität die Phospholipidfettsäuren (PLFA) und die DNA (anhand der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)) untersucht und mithilfe der hierarchischen Clusteranalyse als Dendrogramme dargestellt. Weitere Probennahmen ermöglichen einen zuverlässigen Vergleich der Methoden und die Charakterisierung der „Baseline“ im zeitlichen Verlauf. Zur ökologischen Bewertung der Vegetationseinheiten für umweltpolitische Entscheidungen (z.B. Risikoabschätzung) wird ein Fuzzy Logic Verfahren vorgeschlagen.

Summary

The objective of this project is to assess a „baseline“ of microbiological properties in 18 different longterm grassland sites in Baden-Württemberg. Additionally, methods should be established, in order to ensure a practicable and economical procedure of the environmental monitoring in the future, particularly with regard to genetically modified organisms (GMOs). The studies focus on the functional characteristics (soil enzyme activities) of soil microbial communities. The activities of α - and β -D-glucosidase, N-acetyl-glucosaminidase, xylosidase, cellobiosidase, acid phosphatase, L-leucin and L-tyrosinaminopeptidase were measured using the fluorescence-method. This method yields reproducible data, comparable to the colorimetric analyses of invertase-, xylanase- and protease activities. Both approaches result in coefficients of variation in the common range of variance in soil analyses.

The functional characterisation of the microbial communities according to the vegetation unit was evaluated by discriminant function analysis. The units 1 („Halbtrockenrasen“) and 2 („versäumte Halbtrockenrasen“) were very similar. The unit 3 („beweidete Magerrasen“) matches well with type 1 and 2, but showed tendencies to a transitional position between the first 2 units and the types 4 and 5 („Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ and „Borstgrasrasen“). The latter 2 groups were clearly separated from the other vegetation units. The separation of the different vegetation types is mainly based on the soil pH and the activity of the enzyme xylosidase.

The phospholipid fatty acid (PLFA) and DNA pattern was analysed to characterize the structural diversity of the soil microbial community. It is recommended to continue these analyses to account for spatial as well as temporal variation of microbial properties. In addition, the application of fuzzy logic will allow to classify different sites.

2 Einleitung

Im Zuge der voranschreitenden Entwicklung immer neuer gentechnisch veränderter Organismen (GVO), kommt dem Umweltmonitoring bezüglich deren Freisetzung eine wachsende Bedeutung zu. Die Notwendigkeit des Monitorings ergibt sich beispielsweise beim nachbarschaftlichen Anbau von GVO und GVO-freien Nutzpflanzen. Derzeit wird in Deutschland versucht, rechtliche Regelungen zu erstellen, um eine Koexistenz der verschiedenen Anbaumethoden zu ermöglichen (BARTH et al., 2003).

Voraussetzung dafür ist jedoch ein einheitlicher Nachweis und eine einheitliche Bewertung des GVO-Einflusses auf die Umwelt. Praxisorientiert umsetzbare und für eine dauerhafte Beobachtung geeignete Parameter müssen mit einfachen Methoden bestimmbar sowie zeit- und kostengünstig einsetzbar sein. Die ausgewählten Methoden sollten eine Beurteilung erlauben, ob und in welcher Weise Veränderungen im Boden selbst und innerhalb der Biozönose stattfinden und inwieweit diese auf den Einfluss von gentechnisch veränderten Pflanzen zurückzuführen sind. Eine Grundvoraussetzung zur Beurteilung hierzu ist die Beschreibung des Zustands vor der Freisetzung von GVO („Baseline“) durch die Erhebung von Basisdaten. Derzeit findet ein Monitoring bezüglich gentechnisch veränderter Pflanzen zumeist in der Art statt, dass die Verbreitung des Genmaterials (Auskreuzung) überwacht wird. Die Mikrofloragemeinschaft wird meist als Summenparameter (z. B. DNA-Fingerprint mittels T-RFLP, DGGE) erfasst (BECKER et al., 2005). Die Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Bodenmikroorganismen (strukturelle Charakterisierung) insbesondere in Verbindung mit deren Aktivitäten (funktionelle Charakterisierung) sind weitgehend ungeklärt. HEISSENBERGER et al. (1999) weisen auf verschiedene Ansätze für das Monitoring transgener Pflanzen hin und schließen auch die Bestimmung der Aktivität von Bodenzymen ein.

Im Rahmen dieses Projektes wird der Ist-Zustand („Baseline“) von 18 Grünlanddauerbeobachtungsflächen in Baden-Württemberg charakterisiert. Es werden umfassende mikrobiologische Eigenschaften aufgenommen und durch chemische und biologische Bodenanalysen ergänzt. Die verschiedenen Parameter und Analysemethoden sollen auf ihre Aussagekraft hin beurteilt werden, um deren Eignung für den dauerhaften Einsatz im Umweltmonitoring abzuschätzen. Die funktionelle Charakterisierung erfolgt anhand der Enzymaktivitäten der β - und α -D-Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, Xylosidase, Cellobiosidase, sauren

Phosphatase, L-Leucinaminopeptidase und L-Tyrosinaminopeptidase mittels Fluoreszenz-Methode. Parallel dazu finden kolorimetrische Bestimmungen der Enzymaktivitäten von Invertase, Xylanase und Protease statt, die photometrisch quantifiziert werden. Als weitere Eigenschaften der Bodenmikroorganismen werden die potentielle Nitrifikation (ebenfalls kolorimetrisch) und der sog. Ninhydrin-reaktive Stickstoff, welcher Schlüsse auf den mikrobiellen Kohlenstoff (C_{mik}) zulässt, bestimmt. Zur allgemeinen Charakterisierung des Bodens werden der pH-Wert und der Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org}) gemessen. Die Bestimmung der Basalatmung und der substratinduzierten Respiration (SIR) erfolgt an der Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW) in Karlsruhe. Ein weiterer Teil dieses Projektes ist die Erstellung eines Methodenhandbuches, worin die Analysemethoden in Form von Laboranleitungen beschrieben werden. Zudem wird weiterführend im zweiten Projektteil die strukturelle Charakterisierung der Mikroorganismengemeinschaften anhand von Phospholipidfettsäuren im Boden sowie molekularbiologischen Methoden (Polymerase Chain Reaction (PCR) mit anschließender Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)) untersucht.

Grundlage für den vorliegenden Endbericht bilden die Analysedaten der ersten Probenahme im Oktober 2004 sowie die der zweiten Probenahme im April 2005 von 18 ausgewählten Grünlanddauerbeobachtungsflächen in Baden-Württemberg.

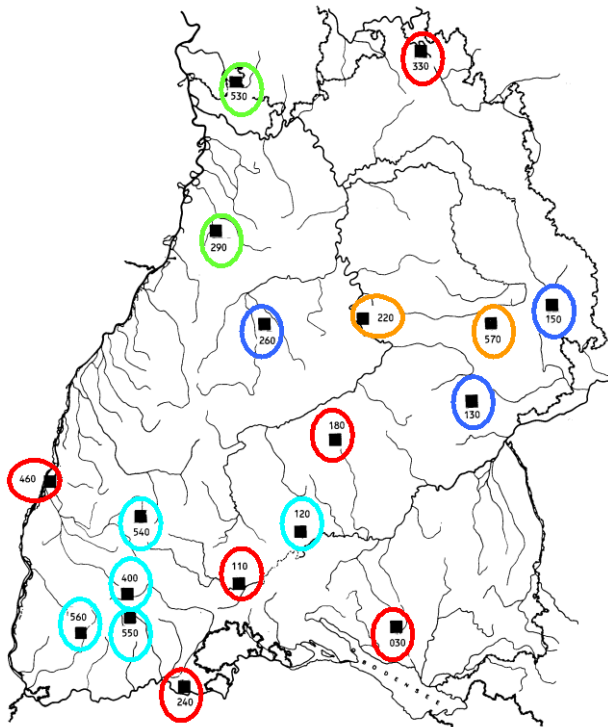
3 Methoden

3.1 Untersuchungsflächen

Für dieses Projekt wurden Bodenproben von 18 Grünlanddauerbeobachtungsflächen in Baden-Württemberg entnommen. Im Jahr 2003 wurde eine vegetationskundliche Untersuchung dieser Flächen durch Klink & Partner, Büro für Landschaftsökologie angefertigt, wobei eine Einteilung der Grünlandflächen in 5 verschiedene Vegetationseinheiten erfolgte (KLINK & PISTORIUS-KLINK 2003). Diese bilden die Grundlage für die statistischen Auswertungen in diesem Projekt. Die Abbildung 1 zeigt die Lage der Flächen in Baden-Württemberg. Die Flächen Falkenhalde, Hörnekopf, Filsenberg, Küßnach, Apfelberg und Taubergießen gehören zur Kategorie der „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“ (Gruppe 1). Zu den „versauerten Halbtrockenrasen“ (Gruppe 2) zählen die Flächen Kaiserberg und Sulzbach. Die Flächen Mönchsteig, Dellenhäule und Büchelberg sind „beweidete Magerrasen“ (Gruppe 3) und zu den „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ (Gruppe 4) gehören Kappelberg und Rauhe Wiese. Die Kategorie der „sonstigen Magerrasen (Borstgrasrasen)“ (Gruppe 5) wird durch die Flächen Irndorfer Hardt, Bisten, Rohrhardsberg, Feldberg und Belchen gebildet. Eine detaillierte Übersicht zu dieser Einteilung gibt die Tabelle 1. Bei der statistischen Auswertung der Daten ist die Vegetationseinheit „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ (Gruppe 4) der Probenahme im Herbst 2004 nur durch die Fläche Kappelberg repräsentiert, da die Proben der Fläche Rauhe Wiese durch den vorherrschenden Hochmoortorf nicht reproduzierbar waren. Im Frühjahr 2005 fließen allerdings bei der Gruppe 4 die Analysedaten der Flächen Kappelberg und Rauhe Wiese mit ein.

3.2 Probennahme

Die erste Probenahme fand im Herbst 2004 im Monat Oktober statt. Die zweite Probenahme folgte im April 2005. Von jeder Fläche wurden vier Bodenmischproben mittels Stechzylinder genommen. Je Mischprobe wurden 10 Stechzylinder der oberen 15 cm beprobt, gut gemischt, gesiebt (<2 mm) und bei -20°C gelagert.



Gruppe/ Vegetationseinheit			
Standortcode	Fläche	Probennr. Herbst 2004	Probennr. Frühjahr 2005
Gruppe 1: „Halbtrockenrasen mit viel <i>Bromus erectus</i>“			
030	Falkenhalde	251 - 254	327 - 330
110	Hörnekopf	259 - 262	331 - 334
180	Filsenberg	275 - 278	347 - 350
240	Küßnach	283 - 286	355 - 358
330	Apfelberg *	295 - 298	367 - 370
460	Taubergießen	303 - 306	375 - 378
Gruppe 2: „versaumte Halbtrockenrasen“			
290	Kaiserberg *	291 - 294	363 - 366
530	Sulzbach	307 - 310	379 - 382
Gruppe 3: „beweidete Magerrasen“			
130	Mönchsteig *	267 - 270	339 - 342
150	Dellenhäule	271 - 274	343 - 346
260	Büchelberg	287 - 290	359 - 362
Gruppe 4: „Magerrasen mit dominierend <i>Molinia caerulea</i>“			
220	Kappelberg *	279 - 282	351 - 354
570	Rauhe Wiese	323 - 326	395 - 398
Gruppe 5: „sonstige Magerrasen (Borstgrasrasen)“			
120	Irndorfer Hardt *	263 - 266	335 - 338
400	Bisten	299 - 302	371 - 374
540	Rohrhardsberg	311 - 314	383 - 386
550	Feldberg	315 - 316	387 - 390
560	Belchen	319 - 323	391 - 394

* ausgewählte Fläche je Vegetationseinheit für PLFA- und DGGE-Analysen

Tab. 1: Zuordnung der Vegetationseinheiten mit den zugehörigen Flächen und Probennummern, verändert nach KLINK & PISTORIUS-KLINK (2003)

Abb. 1: Lage der Grünlandflächen in Baden-Württemberg, verändert nach KLINK & PISTORIUS-KLINK (2003)

3.3 Chemische und biologische Bodenanalysen

Die Bodenproben wurden vor Analysenbeginn mindestens 2 Tage bei +4°C aufgetaut.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte nach der Methode von ÖHLINGER, beschrieben bei SCHINNER et al. (1993). Der prozentuale Anteil an organisch gebundenem Kohlenstoff (C_{org}) wurde mittels LECO CN-2000 ® gemessen, wobei das Bodenmaterial für diese Messungen zuvor luftgetrocknet und gemörsert wurde.

3.4 Mikrobiologische Analysen

Die Bestimmung der Basalatmung und der substratinduzierten Respiration wurde an der Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW) in Karlsruhe durchgeführt.

Die Invertaseaktivität und Xylanaseaktivität wurden nach VON MERSE und SCHINNER kolorimetrisch quantifiziert, die Proteaseaktivität nach KANDELER ist ebenfalls eine kolorimetrische Reaktion, beschrieben in SCHINNER et al. (1993). Die Aktivität der Enzyme β -D-Glucosidase, α -D-Glucosidase, N-Acetylglucosaminidase, Xylosidase, Cellobiosidase, saure Phosphatase, L-Leucinaminopeptidase und der L-Tyrosinaminopeptidase wurden mittels Microplate Fluorescence Reader FLx800® der Firma Bio-Tek Instruments inc. analysiert. Dazu wird der Abbau der verschiedenen Substrate über mehrere Stunden Inkubationszeit gemessen. Diese sind jeweils mit einer fluorogenen Gruppe (4-Methylumbelliferon (MUF) oder 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)) assoziiert, die beim Abbau freigesetzt wird. Diese Fluoreszenz wird im Microplate Reader gemessen und über das Softwareprogramm KC4 v 3.0 with PowerReports® der Firma Bio-Tek ausgewertet. Die Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten werden ausführlich im Methodenhandbuch beschrieben.

Des Weiteren werden von einer ausgewählten Fläche pro Vegetationstyp zur Aufklärung der strukturellen Diversität die Phospholipidfettsäuren- und die DGGE-Fingerprints untersucht. Zudem erfolgte mittels der QuickStix™ Strips für Cry1Ab/Ac der Firma EnviroLogix® ein Schnelltest zum Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Bt-Endotoxin im Boden.

3.5 Statistik

Alle statistischen Analysen und deren Darstellungen wurden mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS® 12.0G for Windows durchgeführt.

Die Diskriminanzanalyse wurde zur Identifizierung der fünf Vegetationseinheiten basierend auf ihren chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften (pH-Wert, Trockensubstanz, potentielle Nitrifikation, Ninhydrin-reaktiven Stickstoff, organischen Kohlenstoff sowie Enzymaktivitäten) angewendet. Die Bedeutung jeder Variable für die Diskriminierung der Vegetationseinheiten wurde berechnet. Als Gruppenvariable wurde die Vegetationseinheit und Multivariate Wilks' Lambda zur schrittweisen Selektion der Variablen ausgewählt.

Der pH-Wert, der Trockensubstanzgehalt, die potentielle Nitrifikation, der organische Kohlenstoffgehalt, der Ninhydrin-reaktive Stickstoff sowie die Enzymaktivitäten der fünf Vegetationseinheiten werden als Boxplots dargestellt. Dabei stellen die Boxgrenzen (Quartile) das 25- und 75-ste Perzentil dar und der Median (50-tes Perzentil) ist als Balken eingezeichnet. Des Weiteren werden der niedrigste und der höchste Wert dargestellt (Whiskers

zeigen diese Spannweite). Die Extremwerte sind dadurch definiert, dass sie um das 1,5- bis 3-fache der Boxhöhe über dem 75%- bzw. unter dem 25%-Perzentil liegen und sind als Kreise dargestellt. Die Ausreißer werden durch Sternchen gekennzeichnet und deren Abstand zum 25. oder 75. Perzentil beträgt um mehr als das 3-fache der Boxhöhe (BROSIUS, 2002).

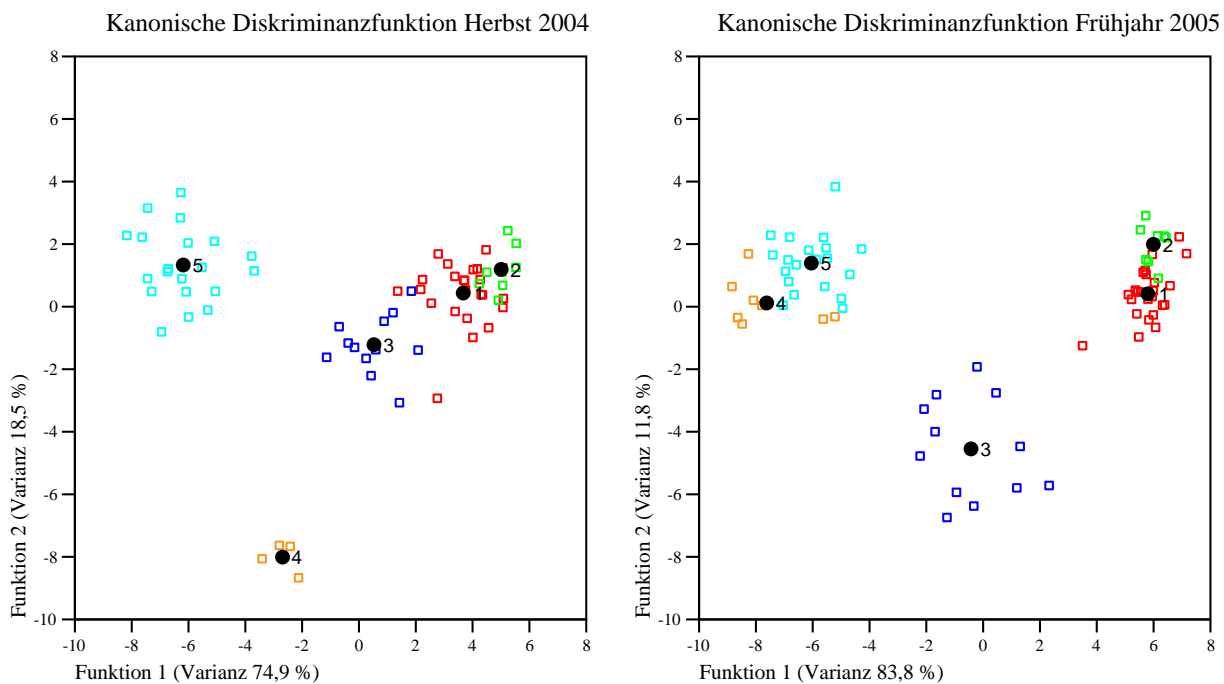
Für die Auswertung der Phospholipidfettsäuren- und DGGE-Muster wird die hierarchische Clusteranalyse angewendet. Mit diesem Verfahren wird versucht, relativ homogene Vegetationseinheiten zu identifizieren. Hierbei wird ein Algorithmus genutzt, der für jeden Fall einen separaten Cluster bildet und die Cluster so lange kombiniert, bis nur noch einer zurückbleibt. Als Cluster-Methode wurde in diesem Fall die Ward-Methode gewählt, wobei als Maß hierfür das Intervall der quadrierten euklidischen Distanz zum Einsatz kam. Mithilfe der Dendrogramme werden die Schritte der hierarchischen Clusteranalyse dargestellt. (SPSS INC., 2003)

4 Darstellung der Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mikrobiologische und chemische Charakterisierung der Vegetationseinheiten

4.1.1 Funktionale Diversität von Bodenmikroorganismen

Die kanonische Diskriminanzanalyse erfolgte auf der Grundlage der Daten zu pH-Wert, Trockensubstanz, potentielle Nitrifikation, Ninhydrin-reaktiven Stickstoff, organischen Kohlenstoff sowie Enzymaktivitäten.



- Gruppe 1 „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“
- Gruppe 2 „versauzte Halbtrockenrasen“
- Gruppe 3 „beweidete Magerrasen“
- Gruppe 4 „Magerasen mit dominierend *Molinia caerulea*“
- Gruppe 5 „sonstige Magerrasen (Borstgrasrasen)“

Abb. 2: Darstellung der Kanonischen Diskriminanzfunktion Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Die Abbildung 2 zeigt, dass sich sowohl im Herbst 2004 als auch im Frühjahr 2005 die beiden Halbtrockenrasengesellschaften (Gruppe 1 und 2) bezüglich der funktionellen Parameter sehr ähnlich sind. Im Herbst 2004 weichen die „beweideten Magerrasen“ (Gruppe 3) davon nur leicht ab, da durch die Beweidung ein Düngeneffekt auftritt, so dass die funktionelle Charakterisierung der „beweideten Magerrasen“ eher denen der Halbtrockenrasen ähnelt. Im Frühjahr 2005 allerdings nimmt die Gruppe 3 eher eine Mittelstellung zwischen den Gruppen 1 und 2 sowie 4 und 5 ein, da wahrscheinlich über die Wintermonate der Düngeneffekt durch wenig bis keine Beweidung nicht so stark ausgeprägt ist. Die „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ (Gruppe 4) und die „Borstgrasrasen“ (Gruppe 5) trennen sich relativ deutlich von den ersten drei Gruppen. Die Gruppe 4 ist im Herbst 2004 nur durch eine Fläche repräsentiert, so dass die Darstellung auf ihre Separierung lediglich Hinweise gibt. Im Frühjahr 2005 ist die Gruppe 4 allerdings durch zwei Flächen vertreten, hier zeigt sich dann auch eine große Ähnlichkeit der Gruppen 4 und 5 bezüglich der funktionellen Parameter.

Standardisierte kanonische Diskriminanzfunktionskoeffizienten Herbst 2004					Standardisierte kanonische Diskriminanzfunktionskoeffizienten Frühjahr 2005				
	Funktion					Funktion			
	1	2	3	4		1	2	3	4
pH	1,064	,321	-,311	-,428	pH	1,359	,139	,050	-,144
TS	,367	-,271	,486	,280	TS	-,250	,161	,214	1,017
potNi	,208	-,053	,470	,601	potNi	,031	,070	-,110	,402
ninN	,516	,003	-,006	,407	ninN	-,003	-,253	,371	,654
Corg	-,333	,125	,173	,456	Corg	-,232	-,895	,586	1,331
β-Glu	,381	,499	,138	,402	β-Glu	-,661	-1,023	-,342	-,284
a-Glu	-,109	-,339	-,787	-,137	a-Glu	,004	,195	,754	,438
N-Ac	-,255	-,048	-,849	,093	N-Ac	,297	-,843	,204	,080
Xyl	,034	1,838	-,423	-,242	Xyl	,834	1,104	,397	-,554
Cello	-,521	-,607	,109	,944	Cello	,208	-,025	,433	-,151
Phos	,054	-1,401	,917	-,429	Phos	-,341	,602	-,679	,086
Leu	,362	-,769	1,344	-,213	Leu	,037	1,265	-1,831	-,657
Tyr	,400	,744	-,128	-,628	Tyr	-,584	-,674	,288	-,219
Protea	-,072	,124	-,057	,442	Protea	-,112	,299	,156	-,225
Invert	-,499	,711	,246	-,026	Invert	,487	,513	,977	,071
Xylana	-,113	-,394	-,247	-,189	Xylana	-,029	-,111	-,254	-,250

Tab. 2: Standardisierte kanonische Diskriminanzfunktionskoeffizienten Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Eigenwerte Herbst 2004					Eigenwerte Frühjahr 2005				
Funktion	Eigenwert	% der Varianz	Kumulierte %	Kanonische Korrelation	Funktion	Eigenwert	% der Varianz	Kumulierte %	Kanonische Korrelation
1	20,975 ^a	74,9	74,9	,977	1	34,205 ^a	83,8	83,8	,986
2	5,166 ^a	18,5	93,4	,915	2	4,820 ^a	11,8	95,6	,910
3	1,114 ^a	4,0	97,4	,726	3	1,389 ^a	3,4	99,0	,763
4	,736 ^a	2,6	100,0	,651	4	,418 ^a	1,0	100,0	,543

a. Die ersten 4 kanonischen Diskriminanzfunktionen werden in dieser Analyse verwendet.

a. Die ersten 4 kanonischen Diskriminanzfunktionen werden in dieser Analyse verwendet.

Tab. 3: Eigenwerte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Betrachtet man die standardisierten Funktionskoeffizienten der kanonischen Diskriminanzanalyse (Tabelle 2), zeigt sich sowohl bei den Proben von Herbst 2004 als auch vom Frühjahr 2005 der pH-Wert als Haupteinflussfaktor. Im Herbst 2004 ist die Funktion 1 mit einem Eigenwert von 20,9 für 74,9 % der Varianz verantwortlich (Tabelle 3), während im Frühjahr 2005 die Funktion 1 mit einem Eigenwert von 34,2 für 83,8 % der Varianz verantwortlich ist. In Abbildung 2 ist die Auftrennung der Gruppen aufgrund des pH-Wertes auf der x-Achse dargestellt. Die Auftrennung der Gruppen infolge der Xylosidaseaktivität zeigt die Funktion 2 auf der y-Achse. Die Funktion 2 hat im Herbst 2004 einen Eigenwert von 5,2 und ist für 18,5 % der Varianz maßgebend, indessen hat diese im Frühjahr 2005 einen Eigenwert von 4,8 und ist für 11,8 % der Varianz verantwortlich (Tabelle 3).

4.1.2 Boxplotdarstellung chemischer und bodenbiologischer Parameter

Die Betrachtung der mikrobiologischen und chemischen Eigenschaften für die fünf Vegetationseinheiten lässt erkennen, dass einige von ihnen sehr gut das Bild der kanonischen Diskriminanzanalyse widerspiegeln, bei anderen sind keine Unterschiede zwischen den Vegetationseinheiten feststellbar. Im Folgenden sind überwiegend die Boxplots der Eigenschaften dargestellt, die gut mit der kanonischen Diskriminanzanalyse übereinstimmen.

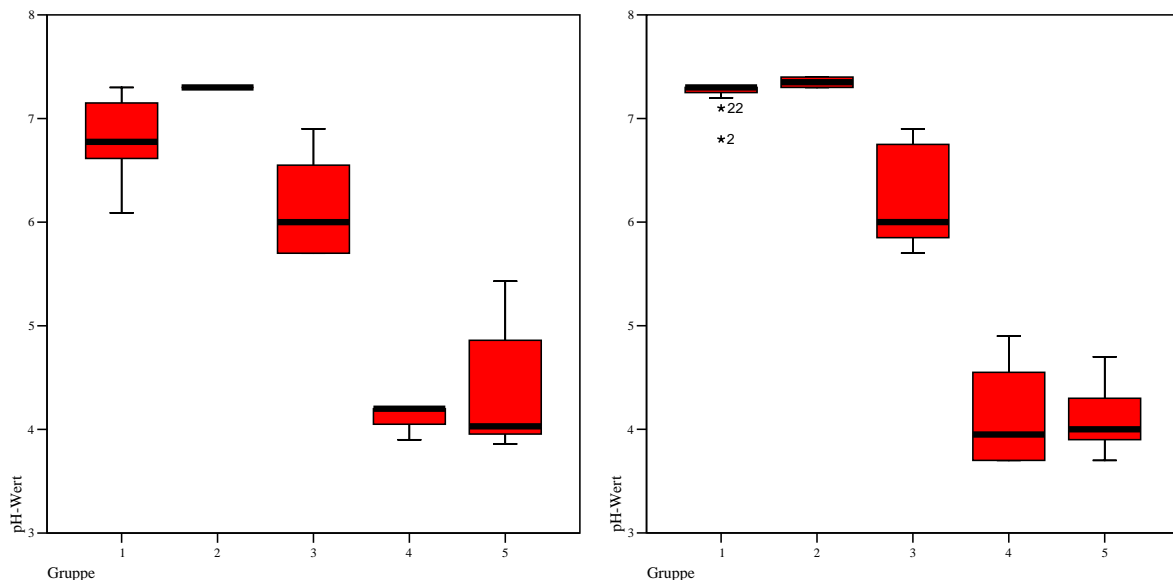


Abb. 3: pH-Werte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Die Halbtrockenrasen und „beweideten Magerrasen“ (Gruppen 1, 2 und 3) weisen sowohl im Herbst 2004 als auch im Frühjahr 2005 einen pH-Wert im Bereich von 5,7 bis 7,4 auf (Abbildung 3). Deutlich niedriger als die Werte der ersten drei Gruppen liegen die pH-Werte der Gruppen 4 („Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“) und 5 („sonstige Magerrasen“) mit pH-Werten von <4 bis 5,5, hier sind die Puffermöglichkeiten des Bodens deutlich eingeschränkt. Die „beweideten Magerrasen“ (Gruppe 3) zeigen eine leichte Tendenz zu einer Mittelstellung im pH-Bereich um 6 zwischen den Gruppen 1 & 2 und 4 & 5. Der pH-Wert ist laut kanonischer Diskriminanzanalyse der wichtigste Faktor, der zur Trennung der Gruppen führt, dies wird durch die Boxplot-Darstellung sehr deutlich bestätigt. Wie in der Bodenschutzfachinformation (LFU 1999) angegeben, liegt das Optimum der meisten Bodenmikroorganismen im neutralen pH-Wert-Bereich, wobei die Bakterien wesentlich weniger säuretolerant sind als die Pilze. Insofern können sich zum Beispiel die Bakterien bei einer pH-Wert-Erhöhung (d. h. neutrale bis schwach saure Bedingungen) ungehindert vermehren und die Aktivität der Pilze übernehmen, während die Pilze durch schwach bis stark saure Bedingungen gefördert werden. (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996; DUNGER & FIEDLER, 1997). In Bezug auf den pH-Wert herrschen daher vermutlich bei den Gruppen 1 bis 3 optimale Bedingungen für Bakterien vor, während die Gruppen 4 und 5 mit einem niedrigen pH-Wert eher optimale Bedingungen für Pilze bieten.

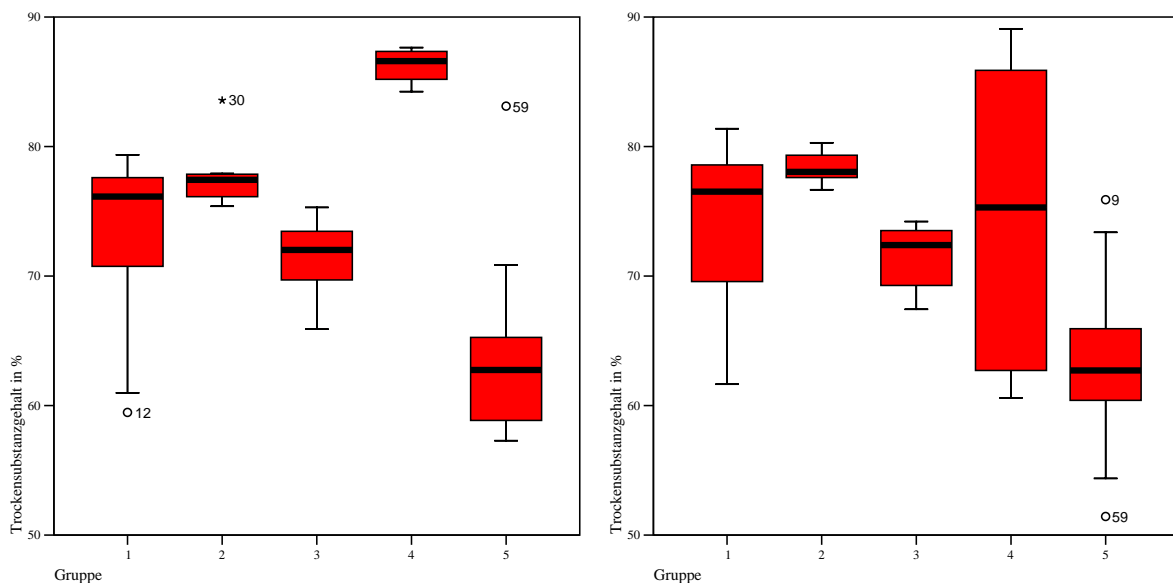


Abb. 4: Trockensubstanzgehalte Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Betrachtet man die Trockensubstanzgehalte (Abb. 4), fällt die deutliche Separation der Magerrasen auf. Während die Gruppe 4 im Herbst 2004 mit ca. 85 % Trockensubstanz deutlich trockener ist, unterscheidet sich die Gruppe 5 bei beiden Probenahmen durch tendenziell feuchteren Boden (Trockensubstanzgehalte zwischen 50 % und 70 %) von den Gruppen 1 bis 3, die mittlere Trockensubstanzgehalte von 60 % bis 80 % aufweisen. Im Frühjahr 2005 zeigt sich die Gruppe 4 mit ca. 75 % Trockensubstanz wesentlich weniger trocken, wobei hier der Einfluss der zweiten mitbetrachteten Fläche Rauhe Wiese eine große Rolle spielt.

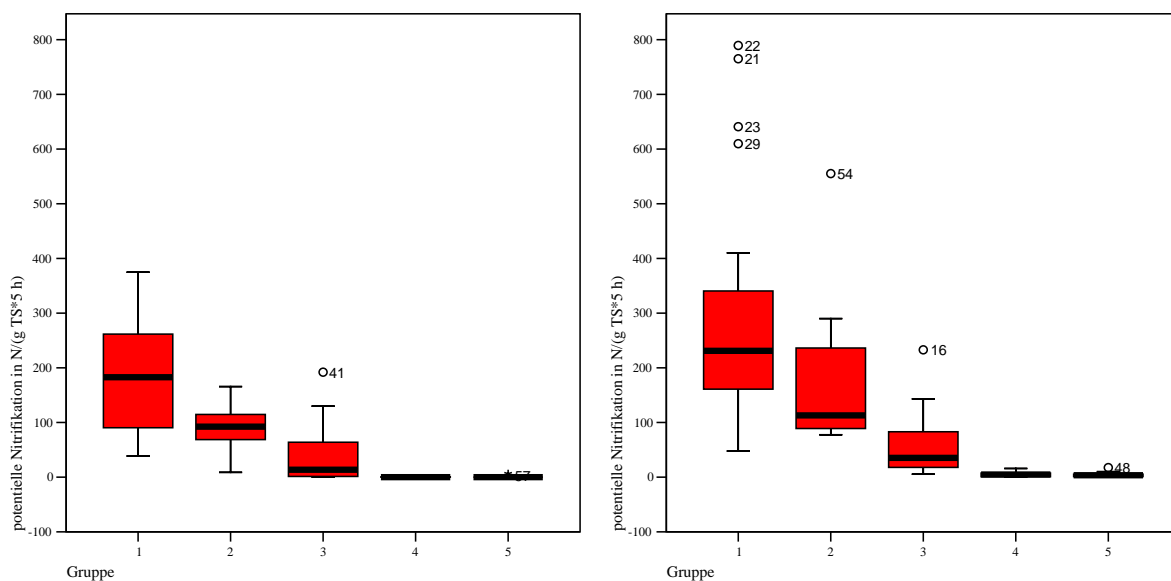


Abb. 5: Potentielle Nitrifikation Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Die potentielle Nitrifikation (Abb. 5) ist abhängig vom pH-Wert des Bodens, so kann bei Werten unter 5 keine chemoautotrophe Nitrifikation stattfinden. Folglich spiegelt die potentielle Nitrifikation sowohl im Herbst 2004 als auch im Frühjahr 2005 das Muster für den pH-Wert auf den untersuchten Flächen wider. Dementsprechend weisen die Gruppen 4 und 5 keine bzw. nur eine geringe potentielle Nitrifikation auf, während die Gruppen 1 und 2 mit einem pH-Wert über 5 auch eine höhere potentielle Nitrifikation zeigen. Die Gruppe 3 bleibt auch hier in der Mittelstellung.

Den organischen Kohlenstoffgehalt der einzelnen Gruppen zeigt die Abbildung 6. Zwischen den beiden Probenahmeterminen zeigen sich kaum Unterschiede der C_{org} -Gehalte. Lediglich die Streuung der Gruppe 4 ist im Frühjahr 2005 höher, wobei dies auf den Einfluss der im Frühjahr 2005 mitbetrachteten Fläche Rauhe Wiese zurückzuführen ist. Bei beiden Probenahmeterminen weisen die Gruppen 1 & 2 (Median zwischen 2,5 und 4) einen kleineren

Gehalt an organischem Kohlenstoff auf, als die Gruppen 3 & 5 (Median zwischen 5,4 und 7,5). Insbesondere im Frühjahr 2005 weist die Gruppe 3 eher einen der Gruppe 5 zuzuordnenden C_{org} -Gehalt auf. Anhand des geringen organischen Kohlenstoffgehalts separiert sich in diesem Fall die Gruppe 4 eindeutig von der Gruppe 5.

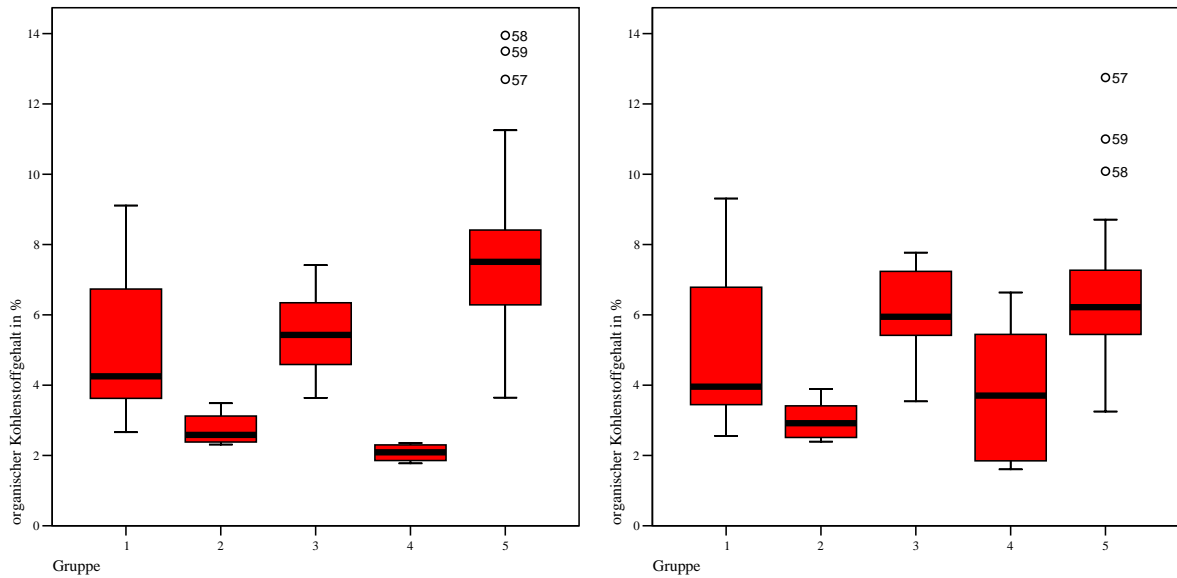


Abb. 6: Organischer Kohlenstoffgehalt Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

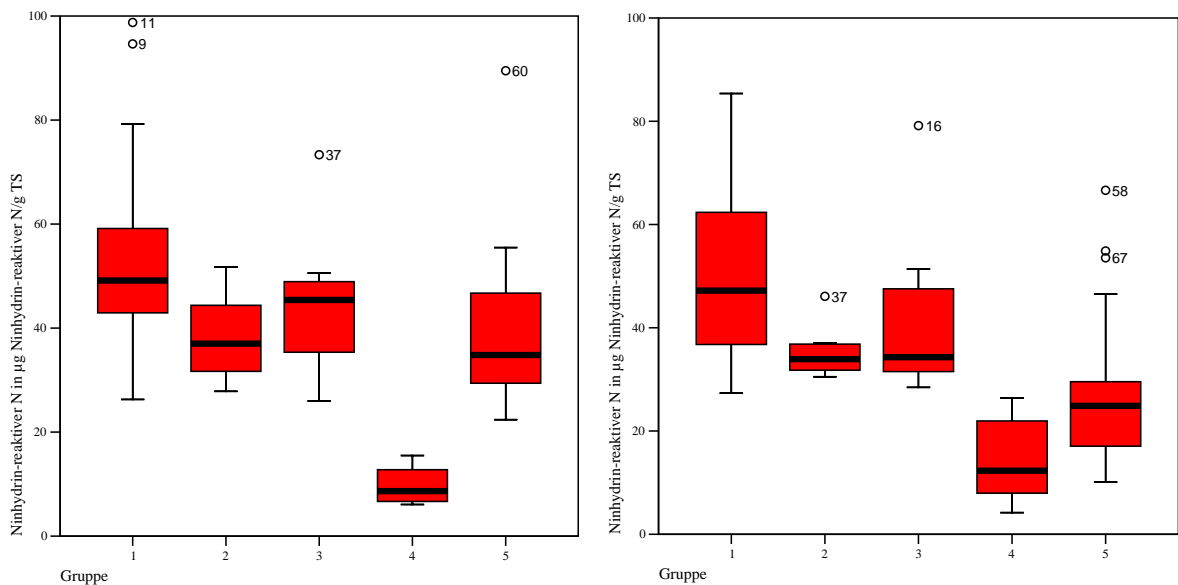


Abb. 7: Ninhydrin-reaktiver Stickstoff Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Die Boxplot-Verteilungen des Ninhydrin-reaktiven Stickstoffs (Abbildung 7) sind sich bei beiden Probenahmeterminen sehr ähnlich. Lediglich die Mediane der Gruppen 3 und 5 haben sich geringfügig nach unten verschoben. Außerdem liegen in diesem Fall die Gruppen 1 und 2 in ihrer Verteilung ebenfalls klar beieinander, wobei hier aber auch deutlich die Gruppe 3 zu deren Verteilmuster tendiert. Davon separiert zeigen sich dementsprechend die Gruppen 4 und 5. Anhand der ermittelten Ergebnisse für den Ninhydrin-reaktiven Stickstoff kann für jede Probe nach SCHINNER et al. (1993) eine Umrechnung auf Biomasse-C bzw. Biomasse-N erfolgen, wobei folgende Faktoren gelten: Biomasse-C [$\mu\text{g/g TS}$] = $21 \cdot [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver N/g TS}]$ sowie Biomasse-N [$\mu\text{g/g TS}$] = $3,1 \cdot [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver N/g TS}]$. Die Ergebnisse dazu sind in den jeweiligen Ergebnislisten für Herbst 2004 und Frühjahr 2005 angeführt, werden hier jedoch nicht extra dargestellt.

Nach SCHINNER UND SONNLEITNER (1996) geben Bodenenzymaktivitätsmessungen einen Einblick in die biochemische Leistungsfähigkeit eines Bodens und erlauben den Nachweis von Veränderungen infolge natürlicher und anthropogener Einflüsse auf den Boden. Ebenfalls wird in DICK UND KANDELER (2005) einleitend angeführt, dass biologisch und biochemisch vermittelte Prozesse im Boden grundlegend für die terrestrischen Ökosystemfunktionen sind. Letztlich sind Mitglieder aller trophischen Niveaus im Ökosystem auf den Boden angewiesen, zum einen als Nährstoff- und Energiequelle und zum anderen wegen dessen Verminderungs- und Kreislauffunktion von komplexen organischen Verbindungen. Bodenenzyme spielen in diesen Prozessen eine zentrale Rolle, indem sie unzählige Reaktionen im Boden katalysieren, die globale biochemische Bedeutung haben. Nachfolgend sind die Ergebnisse der enzymatischen Messungen dargestellt, wobei zunächst die mittels Microplate Reader gemessenen Enzymaktivitäten betrachtet werden. Dabei sind, wie in KANDELER UND DICK (2006) angegeben, β - und α -D-Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, Cellobiosidase und die Xylosidase Enzyme des Kohlenstoffkreislaufs. Die Enzyme L-Leucinaminopeptidase und die L-Tyrosinaminopeptidase gehören zum Stickstoff- sowie die saure Phosphatase zum Phosphorkreislauf.

Die Abbildung 8 zeigt die Boxplot-Verteilung der β -D-Glucosidaseaktivität, wobei sich im Herbst 2004 die Halbtrockenrasen und die „beweideten Magerrasen“ (Gruppen 1 bis 3) deutlich von den anderen beiden Gruppen unterscheiden. Die Mediane der Gruppen 1 bis 3 liegen hauptsächlich im Bereich von 400 bis $500 \text{ nmol g TS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, während der Median der Gruppe 4 deutlich niedriger bei ca. $150 \text{ nmol g TS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sowie der Median der Gruppe 5 bei

300 nmol g TS⁻¹ h⁻¹ ist. Im Frühjahr 2005 bildet sich eine sehr ähnliche Boxplot-Verteilung der β -D-Glucosidaseaktivität ab. Die Gruppe 3 mit einem Median bei ca. 1000 nmol g TS⁻¹ h⁻¹ separiert sich deutlich von den anderen Gruppen, während sich die Gruppen 1 & 2 und die Gruppen 4 & 5 ähnlich sind.

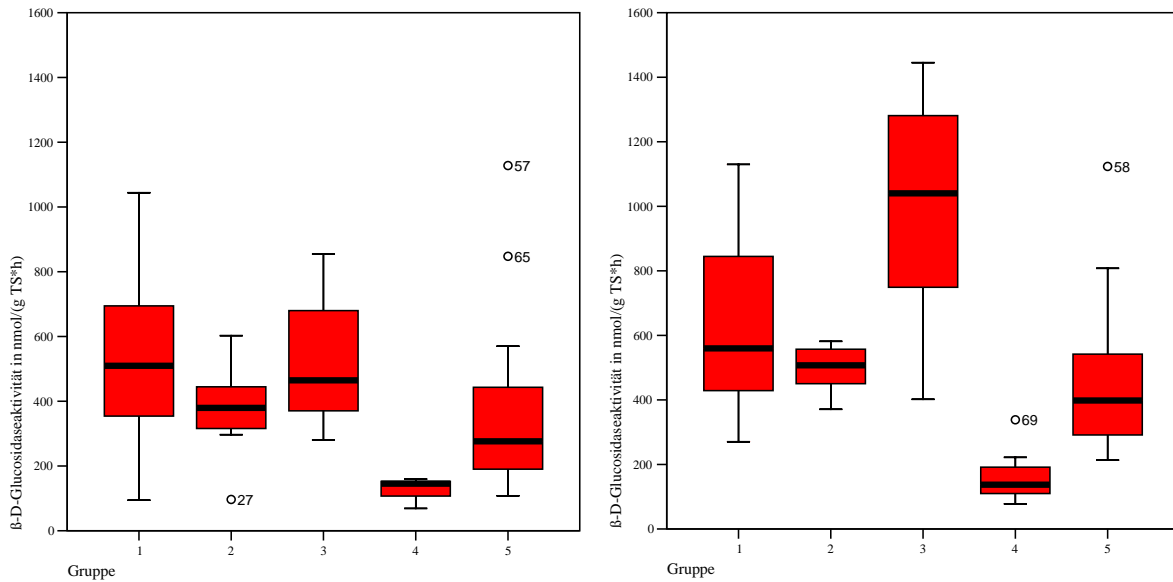


Abb. 8: β -D-Glucosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

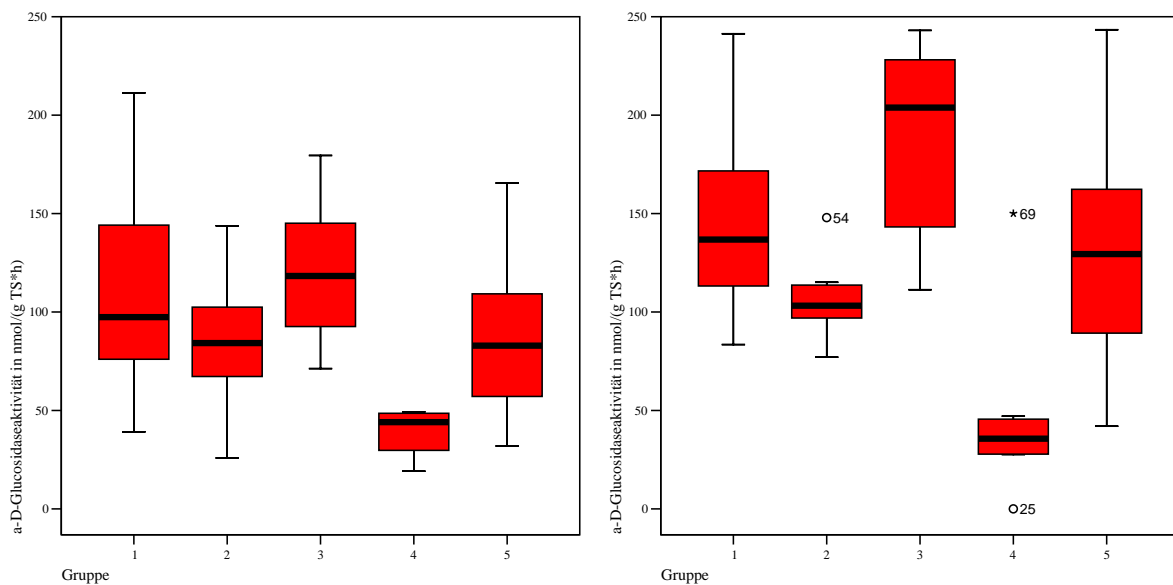


Abb. 9: α -D-Glucosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Bei beiden Probenahmen weist die α -D-Glucosidaseaktivität (Abb. 9) im Vergleich mit der β -D-Glucosidaseaktivität (Abb. 8) ein sehr ähnliches Bild in der Boxplot-Verteilung auf, mit dem Unterschied dass die Aktivität der α -D-Glucosidase geringer ausfällt. Während jedoch im Herbst 2004 die Halbtrockenrasen und die „beweideten Magerrasen“ (Gruppen 1 bis 3) sowie die Magerrasen (Gruppe 4 & 5) in ihrer Boxplot-Verteilung beieinander liegen, separiert sich im Frühjahr 2005 die Gruppe 3 sichtlich von den anderen Gruppen. Die Aktivität der Gruppe 5 ist zunehmend höher als jene der Gruppe 4. Im Herbst 2004 liegen somit die Mediane der Gruppen 1 bis 3 vorwiegend im Bereich von etwa 80 bis 150 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$, während die Gruppe 4 einen Median bei ca. 50 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ und die Gruppe 5 bei ca. 80 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ aufweist. Insgesamt fallen die α -D-Glucosidaseaktivitäten im Frühjahr 2005 gegenüber denen im Herbst 2004 etwas höher aus. Besonders auffällig ist im Frühjahr 2005 der Median der Gruppe 3, der mit ca. 200 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ beinahe doppelt so hoch ist wie im Herbst 2004.

Betrachtet man des weiteren die Aktivitäten der N-Acetyl-Glucosaminidase in Abbildung 10 sowie der Cellobiosidase in Abbildung 11 zeigt sich ebenfalls eine sehr ähnliche Boxplot-Verteilung im Hinblick auf die eben betrachteten β - und α -D-Glucosidaseaktivitäten. Daher werden diese beiden Enzymaktivitäten an dieser Stelle gemeinsam besprochen. Dabei entsprechen sich im Herbst 2004 die Gruppen 1 bis 2 in ihren Medianen einander annähernd und auch die Gruppe 3 tendiert zu diesen beiden Gruppen der Halbtrockenrasen. Außerdem liegen wieder die Gruppen 4 und 5 eng beisammen. Im Vergleich dazu sondert sich im Frühjahr 2005 die Gruppe 3 eindeutig von den ersten beiden Gruppen ab. Ansonsten trennt sich im Frühjahr 2005 insbesondere bei der Cellobiosidaseaktivität die Gruppe 5 wieder klarer von der Gruppe 4.

Obwohl die Xylosidase ebenso wie die eben betrachteten Enzyme β - und α -D-Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase und Cellobiosidase zum Kohlenstoffkreislauf gehört, zeigt sich für diese ein gegensätzliches Aktivitätsmuster (Abb. 12). Die Gruppe 5 weist als einzige Gruppe eine deutlich erhöhte Aktivität auf. Der Median liegt im Herbst 2004 bei etwa 200 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ bzw. im Frühjahr 2005 bei 300 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$. Alle anderen Gruppen weisen bei beiden Probenahmen lediglich Aktivitäten um 100 $\text{nmol g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ auf.

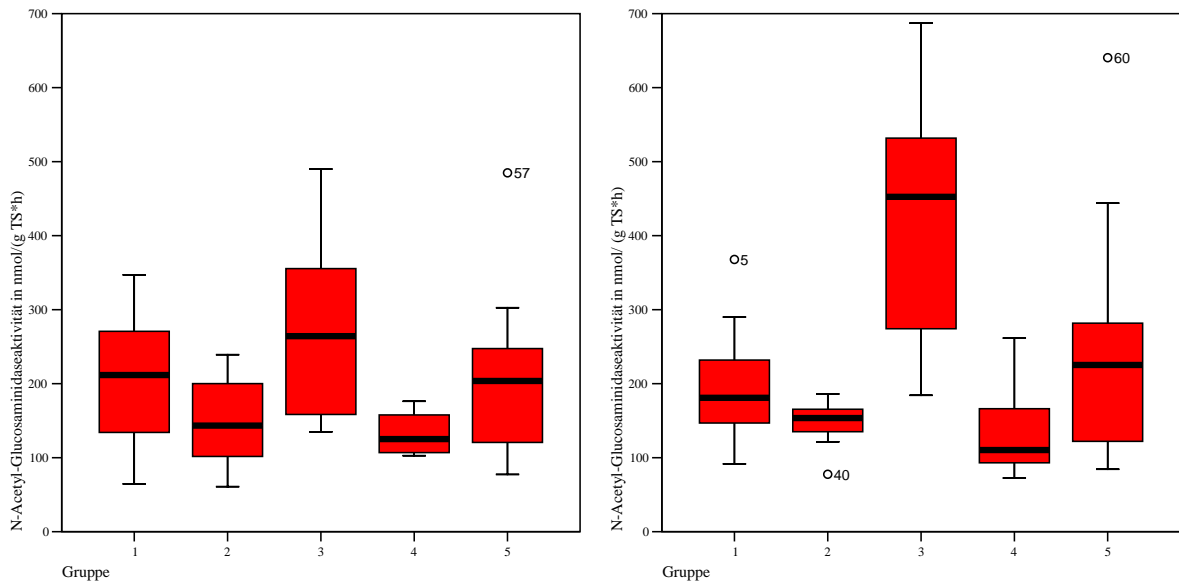


Abb. 10: N-Acetyl-Glucosaminidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

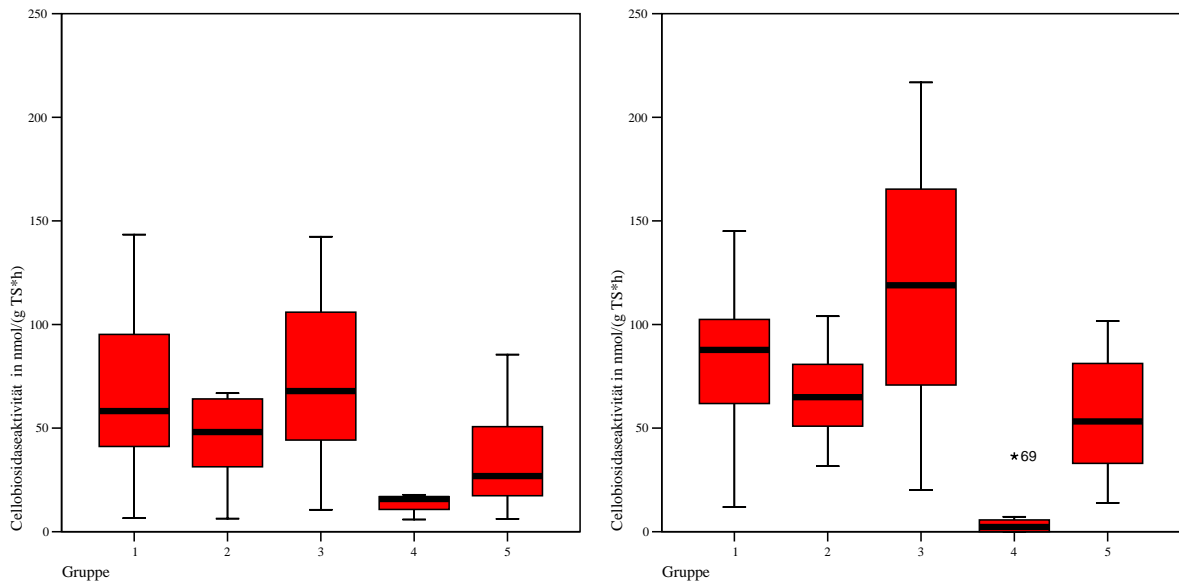


Abb. 11: Cellobiosidaseaktivität Herbst 2004(links) und Frühjahr 2005 (rechts)

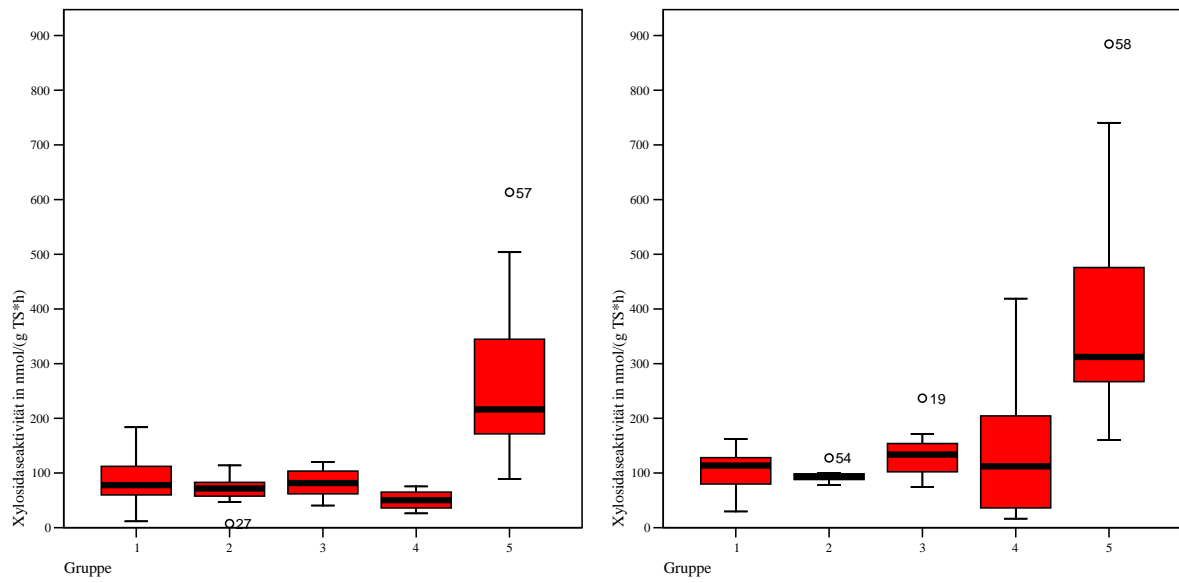


Abb. 12: Xylosidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

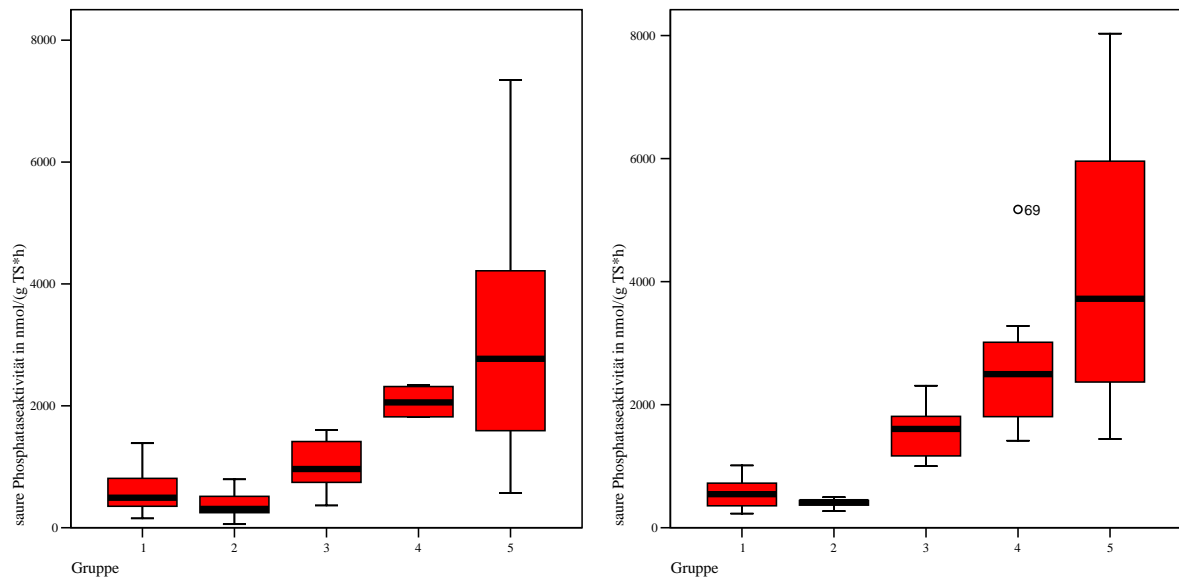


Abb. 13: saure Phosphataseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Sowohl im Herbst 2004 als auch im Frühjahr 2005 streuen die Werte der sauren Phosphataseaktivität (Abb. 13) in Gruppe 5 sehr stark. Außerdem sind im Herbst 2004 die Absolutwerte bei Gruppe 4 und 5 höher als bei den Gruppen 1, 2 und 3. Die Böden der Gruppen 4 und 5 sind vom pH-Wert deutlich saurer, so dass hier der Einfluss saurer Phosphatase pilzlichen Ursprungs eine Rolle zu spielen scheint, da sich ideale Bedingungen für Pilze bieten. Im Frühjahr 2005 zeigt sich wie im Herbst 2004 eine sehr ähnliche Verteilung der sauren Phosphataseaktivität.

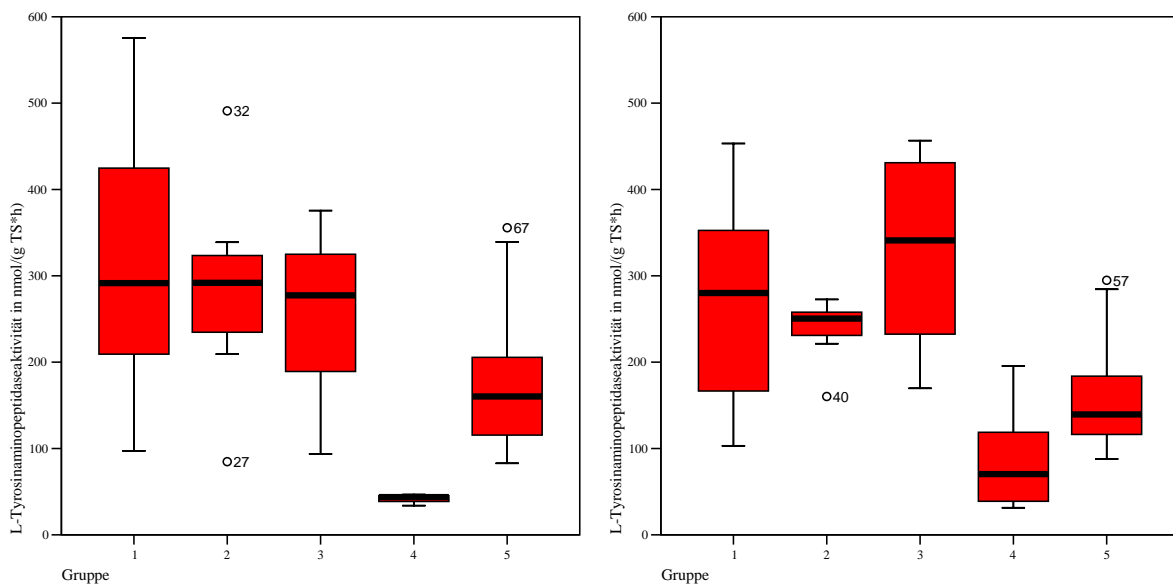


Abb. 14: L-Tyrosinaminopeptidaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

In Abbildung 14 wird die L-Tyrosinaminopeptidaseaktivität der Proben von Herbst 2004 und Frühjahr 2005 dargestellt. Die Boxplots der L-Leucinaminopeptidaseaktivität zeigen ein vergleichbares Muster, so dass dieses nicht separat dargestellt ist. Bei beiden Probenahmen separieren sich die Halbtrockenrasen und „beweidete Magerrasen“ (Gruppen 1 bis 3) stark von der Gruppe 4 (Median bei ca. 50 nmol Tyrosin g TS⁻¹ h⁻¹). Die „Borstgrasrasen“ (Gruppe 5) nehmen dagegen eine Mittelstellung mit einem Median bei 150 nmol Tyrosin g TS⁻¹ h⁻¹ ein.

Es folgen die Darstellungen der kolorimetrisch gemessenen Enzymaktivitäten. Die Protease wurde stellvertretend für die Enzyme des Stickstoffkreislaufs ausgewählt. Die Invertase und auch die Xylanase sind Enzyme des Kohlenstoffkreislaufs. Auf die Grafik zur Xylanaseaktivität wird verzichtet, da sich die Vegetationseinheiten bezüglich dieser Enzymaktivität nicht unterscheiden. Andere Untersuchungen von Grünlandflächen, z. B. von TSCHERKO & KANDELER (1999) zeigen ähnliche Ergebnisse der Xylanaseaktivität.

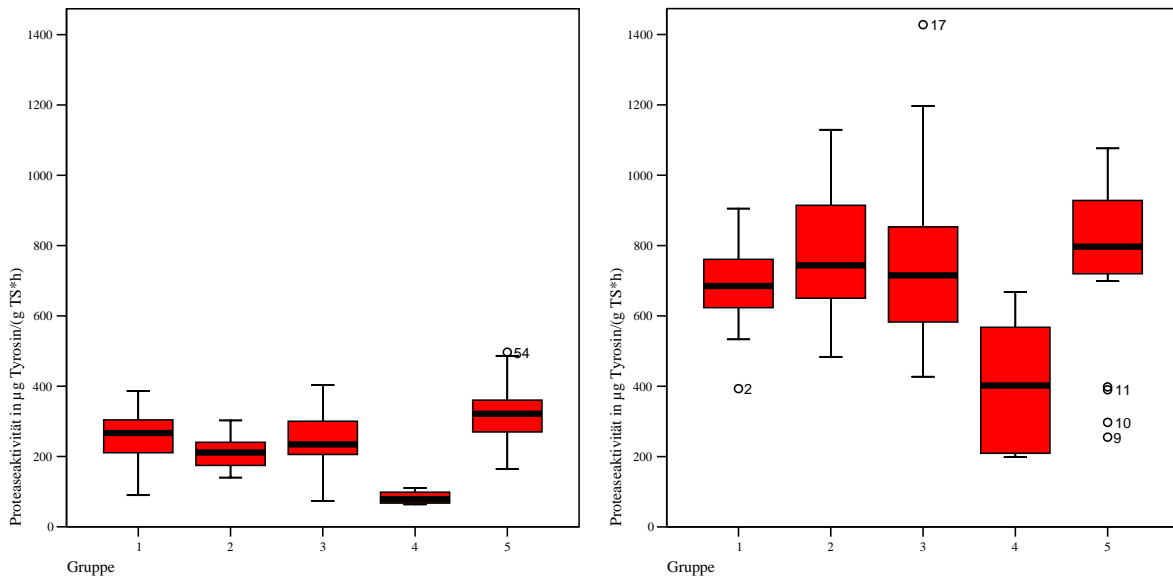


Abb. 15: Proteaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

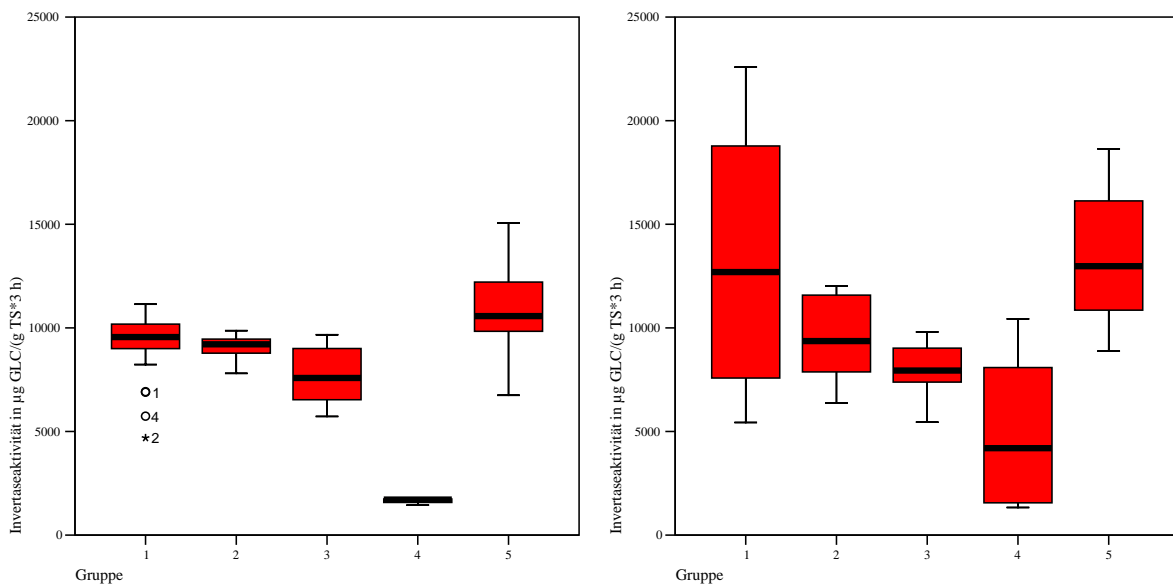


Abb. 16: Invertaseaktivität Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Die Proteaseaktivität, ersichtlich in Abbildung 15 trennt im Herbst 2004 erneut die Halbtrockenrasen und „beweideten Magerrasen“ (Gruppen 1 bis 3) mit mittleren Werten um 200 bis 300 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ von den Magerrasen (Gruppen 4 & 5) mit deutlich geringerer Aktivität (um 100 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$) ab. Die „Borstgrasrasen“ (Gruppe 5) zeigen die höchste Aktivität (der Median liegt über 300 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$). Im Frühjahr 2005 zeigt sich ein vergleichbares Muster der Boxplot-Verteilung mit dem Unterschied, dass die Aktivitäten höher sind. Die Halbtrockenrasen und „beweideten Magerrasen“ (Gruppen 1 bis 3) sind mit einem Median von ca. 700 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ in Bezug auf die Protease aktiver als die Magerrasen (Gruppe 4) (ca. 200 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$). Da bei der Gruppe 5 der Median annähernd bei 800 $\mu\text{g Tyrosin g TS}^{-1} \text{h}^{-1}$ liegt, zeigt sich hier ebenfalls wieder im Gegensatz zu den restlichen Gruppen die tendenziell höchste Aktivität. In HEISSENBERGER et al. (1999) ist dargelegt, dass der vorwiegende Teil des organisch gebundenen Stickstoffs im Boden in Form von Proteinen vorkommt. Diese werden durch Proteasen in Poly- und Oligopeptide und auch Aminosäuren gespalten, wobei die entstehenden Spaltprodukte von den Zellen aufgenommen, weiter abgebaut bzw. zur Proteinsynthese verwendet werden. Dementsprechend wird die Proteaseaktivität durch Inkubation mit Zugabe von Proteinen (in diesem Fall Casein) und der darauffolgenden Messung der Reaktionsprodukte (Aminosäuren) bestimmt.

Die Invertaseaktivität der verschiedenen Gruppen weist in Abbildung 16 ein ähnliches Muster auf, wie die Proteaseaktivität. Allerdings treten die Unterschiede zwischen den Gruppen 1 bis 3 und den Gruppen 4 und 5 noch deutlicher hervor. Vergleicht man die Aktivitäten der beiden Probenahmen streuen die Werte für die Invertaseaktivität im Frühjahr 2005 gegenüber denen vom Herbst 2004 stärker, insbesondere bei der Gruppe 1 („Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“), wobei die Mediane nahezu gleich bleiben. Da die Invertase ein Enzym des Kohlenstoffkreislaufs ist, spiegelt sich auch hier das Muster des organischen Kohlenstoffgehaltes wider. Die Aktivität der Invertase der Gruppe 4 ist im Gegensatz zu den Aktivitäten der anderen Vegetationsgruppen wesentlich geringer, was auch durch dessen geringeren Kohlenstoffgehalt erklärbar ist.

4.1.3 Phospholipidfettsäuren und Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese

Im zweiten Projektteil wurden von je einer Fläche pro Vegetationstyp zur Aufklärung der strukturellen Diversität der Bodenmikroorganismen die Phospholipidfettsäuren (PLFA) untersucht und eine Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) durchgeführt. Dabei wurde stellvertretend für die Gruppe 1, die nach KLINK & PISTORIUS-KLINK (2003) zur Kategorie der „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“ gehört die Fläche Apfelberg, für die Gruppe 2 („versäumte Halbtrockenrasen“) die Fläche Kaiserberg, für die Gruppe 3 („beweidete Magerrasen“) die Fläche Mönchsteig, für die Gruppe 4 („Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“) die Fläche Kappelberg sowie für die Gruppe 5 („sonstige Magerrasen (Borstgrasrasen)“) die Fläche Irndorfer Hardt ausgewählt. Die Analysen wurden pro Fläche jeweils an den vorhandenen vier parallelen Bodenmischproben der ersten Probenahme (Herbst 2004) und der zweiten Probenahme (Frühjahr 2005) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der hierarchischen Clusteranalyse (Ward-Methode) mit dem Programm SPSS ausgewertet und sind als Dendrogramme dargestellt. Zur besseren Orientierung sind in den Dendrogrammen, die zu einer Gruppe gehörenden Flächen farblich gleich markiert (Farbmarkierung siehe auch Tab. 1).

	Gruppe/Standort	1) APFELBERG „Halbtrockenrasen mit viel <i>Bromus erectus</i> “	2) KAISERBERG „versäumte Halbtrockenrasen“	3) MÖNCHSTEIG „beweidete Magerasen“	4) KAPPELBERG „Magerrasen mit dominierend <i>Molinia caerulea</i> “	5) IRNDORFER HARDT „sonstige Magerrasen (Borstgrasrasen)“
HERBST 2004	Gesamtgehalte PLFAs * ¹ [nmol g ⁻¹ TS]	194,1	176,3	238,1	87,3	226,6
	Gesamtgehalte bakterielle PLFAs [nmol g ⁻¹ TS] * ²	103,6	99,8	138,1	44,3	127,4
	Gesamtgehalte pilzliche PLFAs [nmol g ⁻¹ TS] * ³	26,1	21,2	26,7	7,0	20,4
	Verhältnis pilzliche/ bakterielle PLFAs	0,25	0,21	0,19	0,16	0,16
FRÜHLAHR 2005	Gesamtgehalte PLFAs * ¹ [nmol g ⁻¹ TS]	164,4	138,9	240,9	66,0	207,9
	Gesamtgehalte bakterielle PLFAs [nmol g ⁻¹ TS] * ²	87,4	76,1	138,5	33,1	115,1
	Gesamtgehalte pilzliche PLFAs [nmol g ⁻¹ TS] * ³	22,7	17,7	28,9	6,4	20,6
	Verhältnis pilzliche/ bakterielle PLFAs	0,26	0,23	0,21	0,19	0,18

*¹ Phospholipidfettsäuren unter 1% am Gesamtgehalt wurden nicht miteinbezogen

*² Bakterielle Indikator-PLFAs: i15:0, a15:0, i16:0, 16:1•7, i17:0, cy17:0, 18:1•7/18:1•9t, cy19:0

*³ Pilzliche Indikator-PLFAs: 16:1•5, 18:2•6,9

Tab. 4: Zusammenfassung der Phospholipidfettsäuren-Gesamtgehalte, Herbst 2004 und Frühjahr 2005

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Dendrogramme der PLFA-Muster im Herbst 2004 und Frühjahr 2005. Diese Dendrogramme dienen zur Visualisierung der Clusteranalyse der multivariaten Statistik. Bei der angewandten hierarchischen Clusteranalyse repräsentiert die Wurzel einen einzigen Cluster, der die gesamte Datenmenge enthält. Die untersuchten Proben werden dann nach Ähnlichkeit der Merkmalsausprägung zu Clustern gruppiert. Je ähnlicher diese Teilmengen sind, desto kürzer sind die vertikalen Linien im Dendrogramm. Für beide Probenahmeterminale zeigt sich eine gute Auftrennung der einzelnen Vegetationsgruppen anhand der PLFA-Muster.

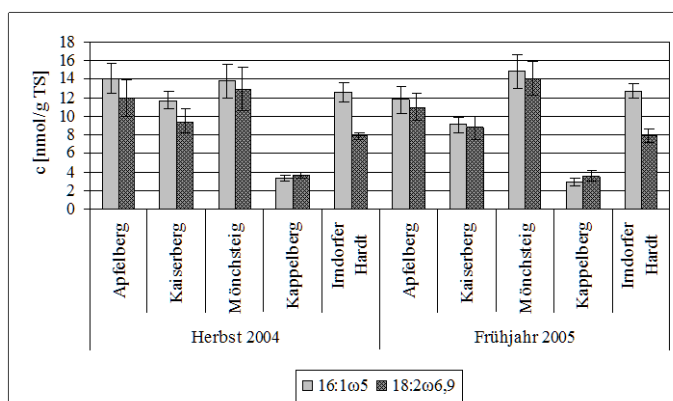
Im Herbst 2004 (Abb. 17) sind die Flächen Apfelberg (Gruppe 1) und Kaiserberg (Gruppe 2) besonders ähnlich, d. h. es besteht eine hohe Vergleichbarkeit der „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“ (Vertreter: Apfelberg) mit den „versauerten Halbtrockenrasen“ (Vertreter: Kaiserberg). Ebenso gruppieren die Flächen Mönchsteig (Gruppe 3) und Irndorfer Hardt (Gruppe 5) zusammen. Die Gruppen 1 & 2 sowie 3 & 5 sind daraufhin miteinander verbunden und zuletzt erfolgt eine Vereinigung dieser mit der Gruppe 4 (Vertreter: Kappelberg). Demnach grenzt sich die Gruppe 4 („Magerrasen mit dominierend *Molinia carulea*“), mit deren nebeneinander liegenden vier Parallelen, eindeutig von den anderen Gruppen ab.

Auf den ersten Blick zeigt sich in Abbildung 18 eine beinahe identische Verteilung der Cluster auf Grundlage der PLFA-Muster im Frühjahr 2005. Beim näheren Betrachten zeigen sich jedoch einige Unterschiede. Gleichermäßen gruppieren aber die Flächen Apfelberg (Gruppe 1) und Kaiserberg (Gruppe 2) zusammen. Zudem sind sich ebenfalls die Flächen Mönchsteig (Gruppe 3) und Irndorfer Hardt (Gruppe 5) besonders ähnlich, dabei liegen die Parallelproben von der Fläche Mönchsteig nicht zu viert beieinander, sondern zwei der Proben bilden einen separaten Cluster. Die Untersuchungsfläche Kappelberg, welche bei der Probenahme im Herbst deutlich abgetrennt war, zeigt nun eine Ähnlichkeit zu den Flächen Kaiserberg und Apfelberg.

Darüber hinaus zeigt sich in Tabelle 4 gleichermäßen die Abgrenzung der Fläche Kappelberg (Gruppe 4), sowohl im Herbst 2004 als auch im Frühjahr 2005, durch die geringsten PLFA-Gesamtgehalte im Vergleich zu den anderen Gruppen. Auffallend ist ebenfalls, dass die Gesamtgehalte der Phospholipidfettsäuren, mit Ausnahme der Fläche Mönchsteig im Herbst 2004, insgesamt höher als im Frühjahr 2005 ausfallen. Diese beruht darauf, dass im Frühjahr 2005 insbesondere der Anteil der bakteriellen Indikator-PLFAs verringert war.

Beim Vergleich des Pilz-Bakterien Verhältnisses der PLFAs aller ausgewählten Standorte zeigen alle Flächen einen niedrigen Quotienten, wobei der Quotient dieses Verhältnis an beiden Probenahmeterminen bei den Gruppen 4 & 5 noch niedriger als derjenige der Gruppen 1 bis 3 ist. Dieses niedrige Verhältnis deutet auf einen deutlich höheren Bakterienanteil hin, so dass hier die Pilze den Boden eindeutig weniger dominieren, wie es auch für Grünlandflächen zu erwarten war. Ersichtlich ist dies ebenfalls beim Vergleich der Gesamtgehalte der bakteriellen und der pilzlichen Indikator-PLFAs.

Folgende PLFAs wurden zusammengefasst, um die Gesamtheit der bakteriellen Biomasse anzugeben: i15:0, a15:0, i16:0, 16:1•7, i17:0, cy17:0, 18:1•7, cy19:0 (FROSTEGÅRD et al. 1993). Die methylverzweigten Formen i15:0, a15:0, i16:0 und i17:0 stehen davon nach ZELLES (1999) für Gram+ Bakterien, und die cyclischen Fettsäuren cy17:0 und cy19:0 für Gram- Bakterien. Fettsäuren des „Vaccenic-Typ“ mit der Doppelbindung am •7 Atom (16:1•7, 18:1•7) treten in beiden Bakteriengruppen auf (HAUBERT et al. 2006). Als Marker für die pilzliche Biomasse wurde die Fettsäure 18:2•6,9 verwendet (FROSTEGÅRD & BÅÅTH 1996; PAUL & CLARK 1996). In einigen Untersuchungen wird teilweise die Fettsäure 18:1•9 ebenfalls als Marker der pilzlichen Biomasse herangezogen. Diese kann gleichermaßen in Pflanzen und Pilzen vorkommen. Da allerdings in den hier betrachteten Bodenproben nicht auszuschließen ist, dass Wurzelteile oder andere pflanzliche Reste enthalten waren, kann diese hier nicht als Pilzmarker herangezogen werden. Die Fettsäure 16:1 charakteristisch für vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze (OLSSON 1999). Die gesonderte Darstellung der Gesamtgehalte der einbezogenen pilzlichen Indikator-PLFAs zeigt die Abbildung 19, dabei ist 16:1•5 wie schon ~~aber~~ ein Indikator v. a. für Mykorrhiza, während 18:2•6,9 v. a. für Ektomykorrhizapilze und Streuzersetzer steht. Letztere dürften in den untersuchten Standorten dominieren.



In Abbildung 19 wird noch mal deutlich, dass sich die Gehalte der pilzlichen Biomasse im Vergleich beider Probenahmetermine nur geringfügig verändern. Das Verhältnis der Fettsäuren 16:1•5 und 18:2•6,9 ist an beiden Zeitpunkten bei den ersten vier Flächen sehr einheitlich.

Abb. 19: Gesamtgehalte [nmol/ g TS] der pilzlichen Indikator-PLFAs

Allerdings ist bei der Fläche Irndorfer Hardt sowohl im Herbst 2004 und Frühjahr 2005 der Gehalt der Fettsäure 16:1•5 deutlich höher als der Gehalt der Fettsäure 18:2•6,9. Auffällig ist außerdem im Vergleich der Flächen der sehr geringe Anteil an Pilzen bei der Fläche Kappelberg, die als Vertreter für die Vegetationseinheit der „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ gewählt wurde. Betrachtet man in Tabelle 4 zusätzlich die Gesamtgehalte der bakteriellen PLFAs dieser Fläche, zeigt sich, im Vergleich mit den anderen Gruppen, ein eindeutig geringer Anteil an Bakterien. Hier ist offensichtlich das mikrobielle Wachstum gehemmt, was sich auch schon durch die zumeist gering ausfallenden Enzymaktivitäten der Gruppe 4 äußerte.

Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die prozentualen Gesamtgehalte der Phospholipidfettsäuren zum einen für die Probenahme im Herbst 2004 und zum anderen für die Probenahme im Frühjahr 2005. Diese dienen noch einmal zur besseren Übersicht über alle miteinbezogenen Phospholipidfettsäuren. Dabei ist hier anzumerken, dass PLFAs mit einem Gesamtgehalt unter 1 % nicht in die Auswertung einfließen. Neben den obengenannten Fettsäuren, die als bakterielle bzw. pilzliche Marker dienen, ist hier außerdem die Fettsäure 20:0 ersichtlich, die den Tieren zugeordnet wird sowie die Fettsäuren 22:0 und 24:0, die pflanzlichen Ursprungs sind. Die PLFAs 16:0 sowie 18:0 werden nicht als spezieller Biomarker verwendet, da sie in vielen Organismen vorkommen. Insbesondere 16:0 spielt bei der Fettsäuresynthese eine wichtige Rolle. Insgesamt fällt die Verteilung der PLFA-Muster im Herbst 2004 und Frühjahr 2005 sehr einheitlich aus. Zu beiden Probenahmezeitpunkten nehmen die Phospholipidfettsäuren, die als Marker für Bakterien (i15:0, a15:0, i16:0, 16:1•7, i17:0, cy17:0, 18:1•7, cy19:0) gelten, den größten Anteil am Spektrum ein. Demgegenüber ist ersichtlich, dass bei beiden Probenahmen der Anteil der PLFAs, die charakteristisch für Pilze (16:1•5; 18:2•6,9) sowie für Tiere (20:0) und Pflanzen (22:0; 24:0) sind weit geringer ausfällt. Obwohl aufgrund des pH-Wertes bei den Gruppen 1 bis 3 optimale Bedingungen (neutral bis schwach sauer) für Bakterien sowie bei den Gruppen 4 und 5 optimale Bedingungen (schwach bis stark sauer) für Pilze vorherrschen, lässt sich dies nicht anhand der bakteriellen sowie pilzlichen Indikator-PLFAs bestätigen.

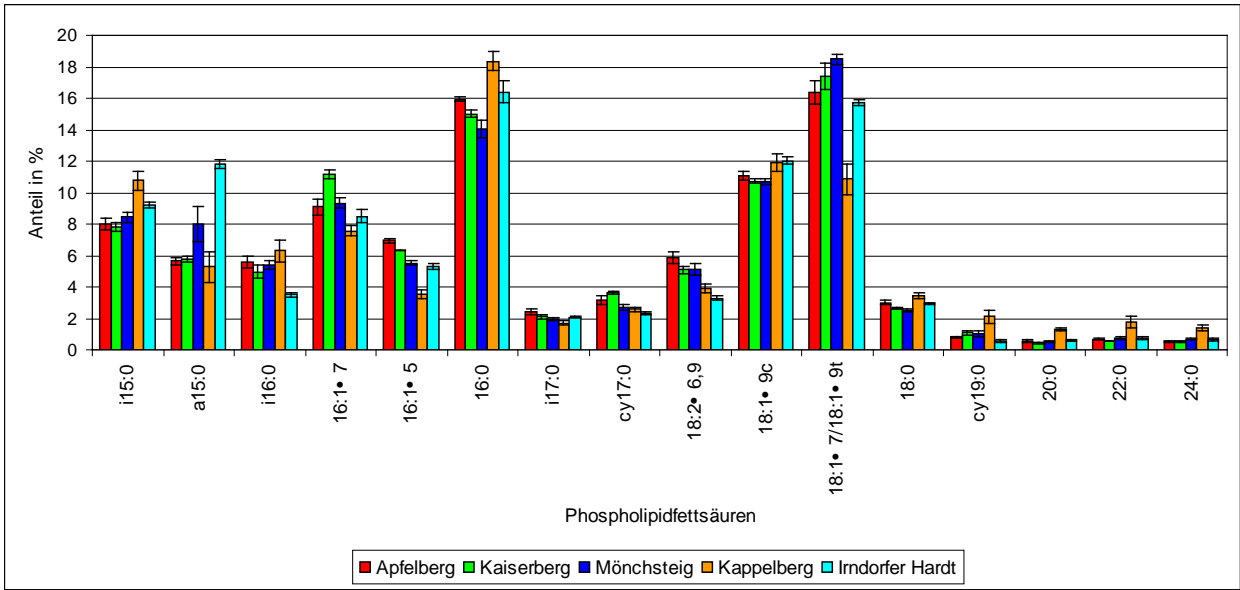


Abb. 20: PLFA-Gesamtgehalte (%), Herbst 2004

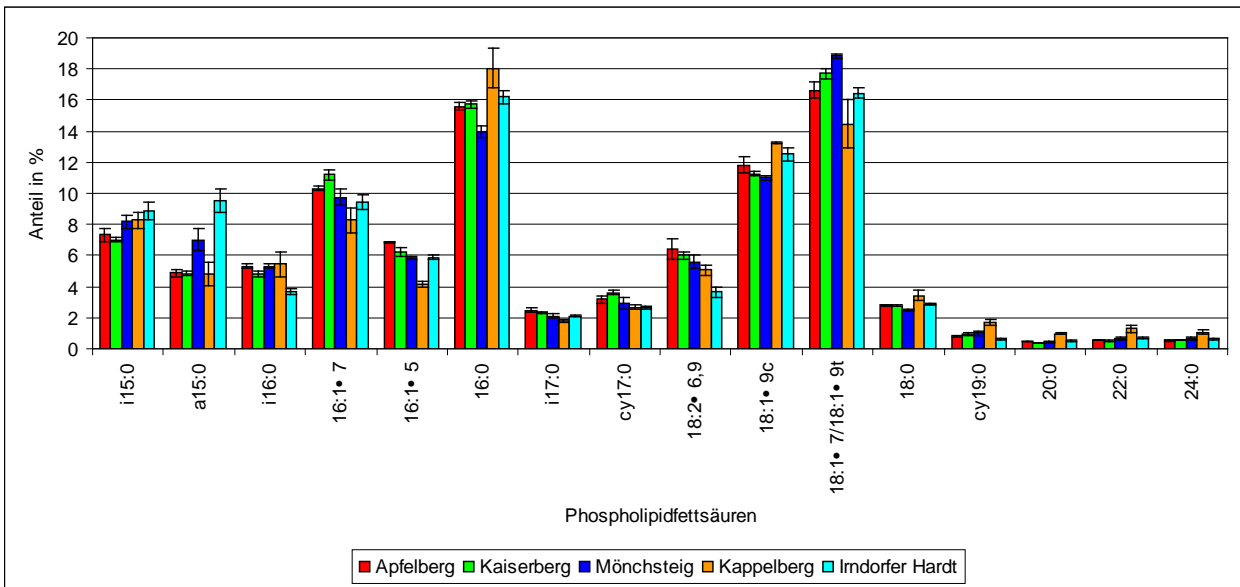


Abb. 21: PLFA-Gesamtgehalte (%), Frühjahr 2005

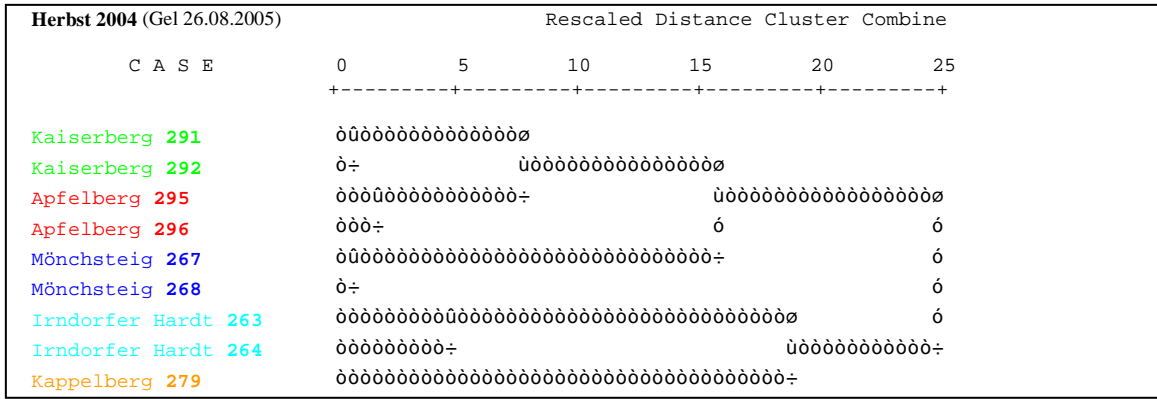


Abb. 22: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Herbst 2004, Gel 1 (26.08.2005)

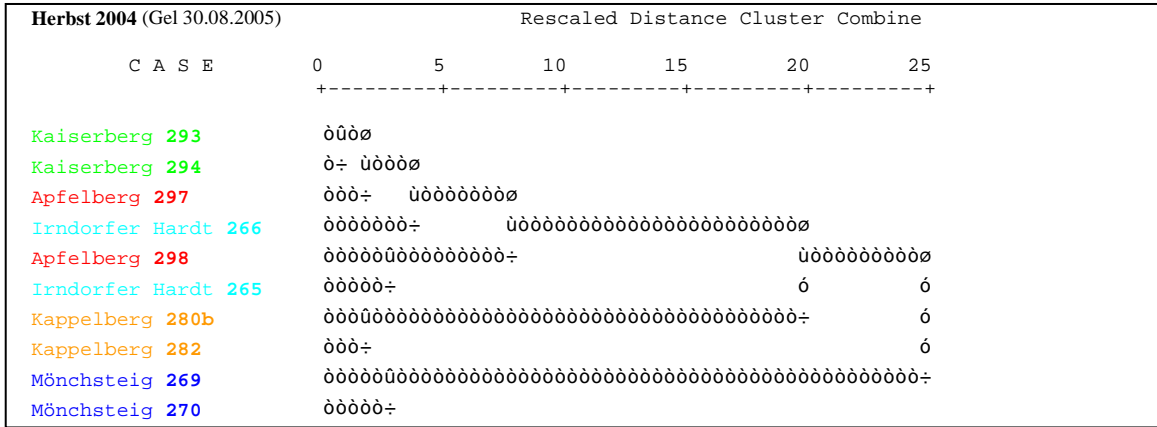


Abb. 23: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Herbst 2004, Gel 2 (30.08.2005)

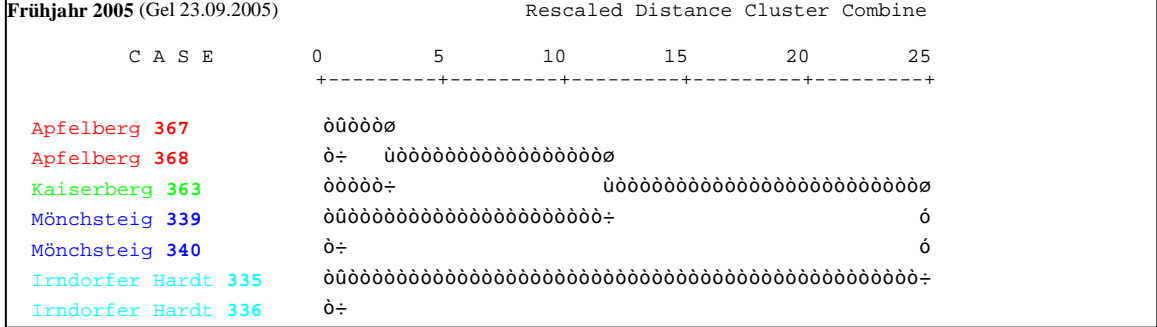


Abb. 24: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Frühjahr 2005, Gel 1 (23.09.2005)

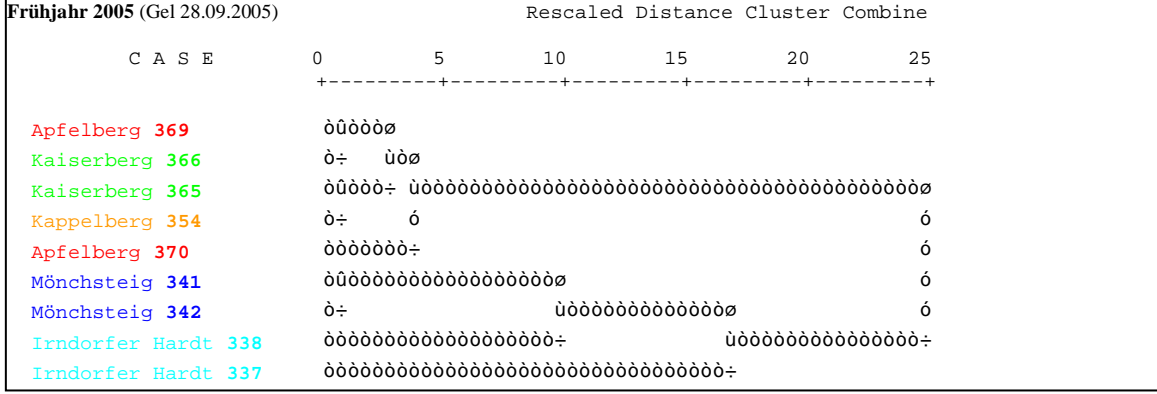


Abb. 25: Dendrogramm (Ward-Methode) der DGGE-Muster, Frühjahr 2005, Gel 2 (28.09.2005)

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Dendrogramme der Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) der Proben von Herbst 2004 sowie die Abbildungen 24 und 25 von Frühjahr 2005. Mit diesem Elektrophoreseverfahren werden die Reaktionsprodukte aus der vorangegangenen Polymerase Chain Reaction (PCR) aufgetrennt, so dass eine hohe Auflösung der Bandenmuster ermöglicht wird. Diese kann dann als Fingerprintmuster interpretiert werden und ist für die Diversität der mikrobiellen Population in der jeweiligen Bodenprobe charakteristisch. Da auf ein DGGE-Gel immer nur 10 Proben (+ 2 Standards) passen, wurden jeweils zwei Gele pro Probenahme angefertigt. Wie schon erwähnt, wurden für die DGGE-Analysen genauso wie für die PLFA-Analysen die Flächen Apfelberg (Gruppe 1), Kaiserberg (Gruppe 2), Mönchsteig (Gruppe 3), Kappelberg (Gruppe 4) sowie Irndorfer Hardt (Gruppe 5) ausgewählt. Pro Fläche wurden die Analysen jeweils an den vorhandenen vier Parallelproben der ersten Probenahme (Herbst 2004) und der zweiten Probenahme (Frühjahr 2005) durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils von einer Gruppe immer zwei der parallelen Mischproben auf einem Gel aufgetragen werden, damit eine Vergleichbarkeit der Gruppen trotz der zwei angefertigten Gele pro Probenahme gewährleistet ist. Die entstandenen Gelbilder mit deren spezifischem Bandenmuster wurden eingescannt und mit dem Programm Quantity One der Firma BIO-RAD ausgewertet. Letztlich gibt der Report dieses Programms die Peakhöhe und Peakposition aller Banden der Lanes in Form einer Tabelle aus. Nach deren Bearbeitung in Excel bildet diese Tabelle die Grundlage für die Auswertung der Bandenmuster mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse (Ward-Methode) mit SPSS. Für jedes Gelbild wurde somit ein einzelnes Dendrogramm erzeugt. Da allerdings nicht immer einwandfreie auswertbare Bandenmuster entstanden, beinhaltet nicht jedes Dendrogramm auch die jeweils 2 Proben pro Vegetationseinheit.

Die erste Probenahme im Herbst 2004 wird, wie schon erwähnt, durch die Abbildungen 22 und 23 repräsentiert. Dabei sind sich beim ersten Gel vom 26.08.2005 die Flächen Kaiserberg (Gruppe 2) und Apfelberg (Gruppe 1) besonders ähnlich, während sich diesen beiden die Fläche Mönchsteig (Gruppe 3) anschließt. Darüber hinaus gruppieren die Flächen Kappelberg (Gruppe 4) und Irndorfer Hardt (Gruppe 5) zusammen und verbinden sich mit dem höchsten Wert des Distanzkoeffizienten daraufhin mit den Gruppen 1, 2 und 3. Bei dem zweiten Gel vom 30.08.2005 sind auch zunächst die Gruppen 2 und 1 miteinander verbunden, daran schließt sich aber danach die Gruppe 5 an. Mit einem Wert des Distanzkoeffizienten von 20 ist die Gruppe 4 den Gruppen 1,2 und 3 noch ähnlicher als die Gruppe 3 mit dem höchsten Wert des Distanzkoeffizienten von 25.

Die Abbildungen 24 und 25 zeigen die Dendrogramme für die zweite Probenahme im Frühjahr 2005. Bei dem ersten Gel vom 23.09.2005 ist diesmal die Fläche Kappelberg (Gruppe 4) nicht vertreten sowie die Fläche Kaiserberg (Gruppe 2) nur durch eine Probe repräsentiert. Aber auch hier sind sich die Flächen Apfelberg (Gruppe 1) und Kaiserberg (Gruppe 2) besonders ähnlich, während sich diesen beiden die Flächen Mönchsteig (Gruppe 3) anschließt. Die Gruppe 5 (Irndorfer Hardt) ist deutlich verschieden im Vergleich zu den ersten drei Gruppen. Eine dementsprechende Clusterverteilung zeigt auch das zweite Dendrogramm (Gel 2 vom 28.09.2005) für die Probenahme im Frühjahr 2005. Eine hohe Ähnlichkeit zeigen ebenfalls die Flächen Apfelberg (Gruppe 1) und Kaiserberg (Gruppe 2), mit dem Unterschied, dass hier die Fläche Kappelberg (Gruppe 4) mit einer Probe ebenso diesen beiden Gruppen gleicht. Außerdem gruppieren darüber hinaus zunächst die Flächen Mönchsteig (Gruppe 3) und Irndorfer Hardt (Gruppe 5) zusammen und sind mit dem höchsten Wert des Distanzkoeffizienten den Gruppen 1, 2 und 4 am unähnlichsten.

In dieser Untersuchung wurde die Diversität von Bakterienpopulationen im Boden mithilfe molekularbiologischer Methoden, wie der Polymerase Chain Reaction (PCR) und Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) durchgeführt. Dadurch erhält man einen „Fingerprint“ der bakteriellen Populationsstruktur, allerdings werden keine Bakterienspezies identifiziert. Insbesondere die Fläche Kappelberg, die als Vertreter für die Vegetationseinheit der „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ ausgewählt wurde, zeigte hier ein blasses und wenig ausgeprägtes Bandenmuster. Im Vergleich dazu wurden aber auch wie bereits zuvor geschildert bei den Bodenproben der Fläche Kappelberg nur ein geringer Anteil an Bakterien-Indikator-PLFAs festgestellt. Insofern gibt auch die DGGE gleichermaßen Hinweise darauf, dass hier die bakterielle Struktur nur wenig ausgeprägt ist. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von KANG & MILLS (2006) anzuführen, die den Effekt der verwendeten Probengröße in Untersuchungen zur mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur im Boden berücksichtigen.

4.1.4 Bt-Endotoxine

Zum Nachweis des Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxine wurde das QuickStix™ Kit Cry1Ab/Ac der Firma EnviroLogix® verwendet (ausführliche Erläuterung siehe Methodenhandbuch, Kapitel 7). Alle Bodenproben beider Probenahmen von Herbst 2004 und Frühjahr 2005 wurden mit dem Schnelltest untersucht, wobei insgesamt alle negativ ausfielen. Dies bedeutet, dass in den Bodenproben der einzelnen Flächen keine

Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxine nachgewiesen wurden. Dieser Negativ-Nachweis ist insofern von Bedeutung, dass bei einem späteren möglichen Anbau von GVO-Nutzpflanzen auf angrenzenden Flächen ausgeschlossen werden kann, dass die Bt-Endotoxine schon vorher im Boden vorlagen. Einen Überblick über Auswirkungen von gentechnisch veränderten Pflanzen auf die mikrobielle Gemeinschaft und die Prozesse im Boden geben BRUINSMA et al. (2003). Insbesondere für weiterführende Untersuchungen ist der Artikel von HOPKINS & GREGORICH (2003) interessant, der die Bestimmung sowie den Zerfall von Bt-Endotoxinen im Boden beschreibt, allerdings von einem Standort, wo bereits seit vier Jahren Bt-Mais angebaut wird.

4.2 Bewertung der Methoden

4.2.1 Enzymaktivitäten

Vergleicht man die Streuung der Enzymaktivitäten (Abb. 26), die mittels Microplate Reader gemessen werden, über alle Flächen, fällt die starke Streuung der Phosphataseaktivität bei beiden Probenahmeterminen auf. Die Betrachtung der Darstellung der Enzymaktivitäten für je eine Fläche in 4.2.2, einschließlich des Vergleichs der zugehörigen Standardabweichungen lässt den Schluss zu, dass die große Streuung durch die verschiedenen Flächen entstehen und nicht durch die Streuung der Replikate innerhalb einer Fläche.

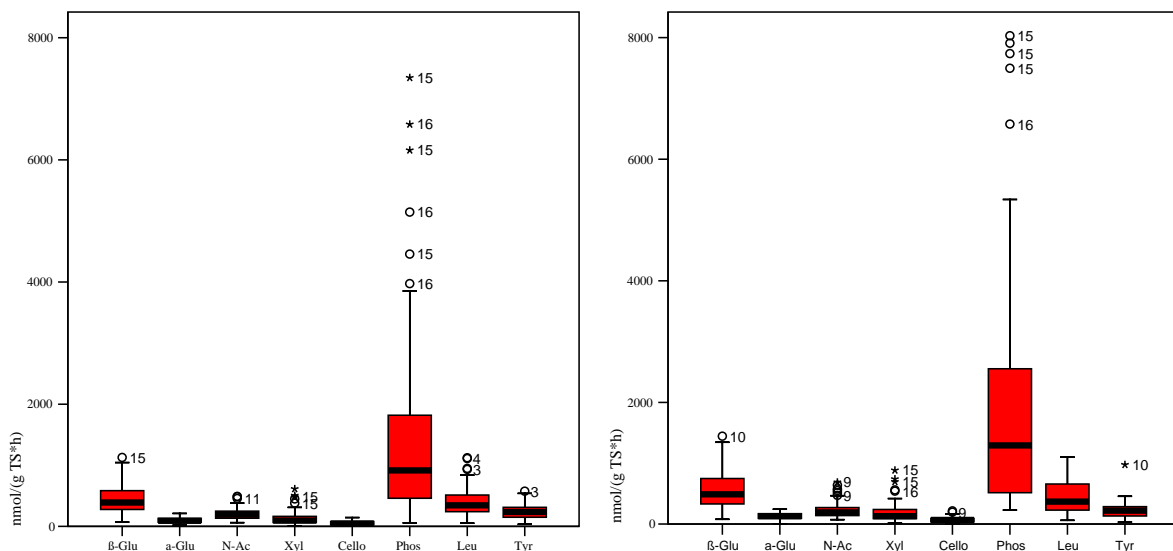


Abb. 26: Vergleich der Streuung der Enzymaktivitäten (Microplate Reader) über alle Flächen Herbst 2004 (links) und Frühjahr 2005 (rechts)

Insgesamt eignen sich die bodenenzymatischen Untersuchungen (sowohl Fluoreszenz-Methode als auch kolorimetrische Bestimmung) besonders gut für die Beurteilung des Einflusses von Wirkstoffen auf Böden, weil diese Methoden sowohl vom Zeit- als auch vom Analysenaufwand gut reproduzierbar sind und somit dementsprechend gute Voraussetzungen für Vergleichsuntersuchungen bieten.

4.2.2 Enzymaktivitätenmuster der verschiedenen Vegetationseinheiten

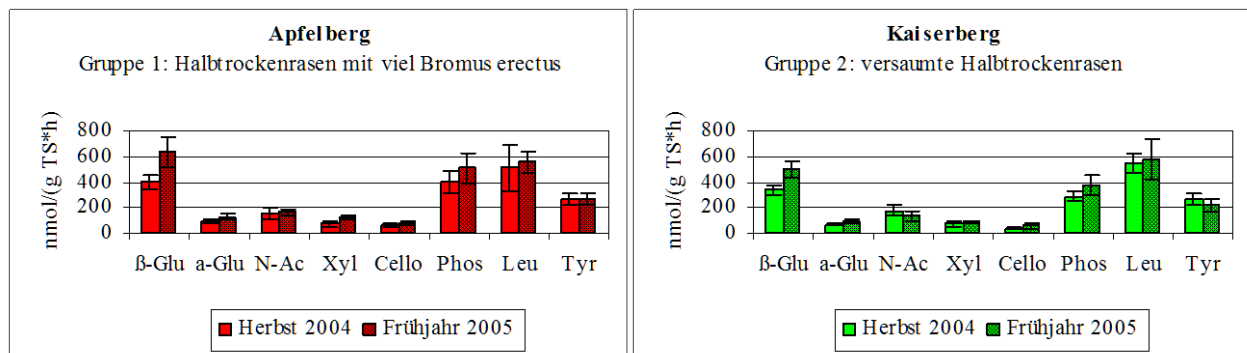


Abb. 27: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Apfelberg und Kaiserberg Herbst 2004 und Frühjahr 2005

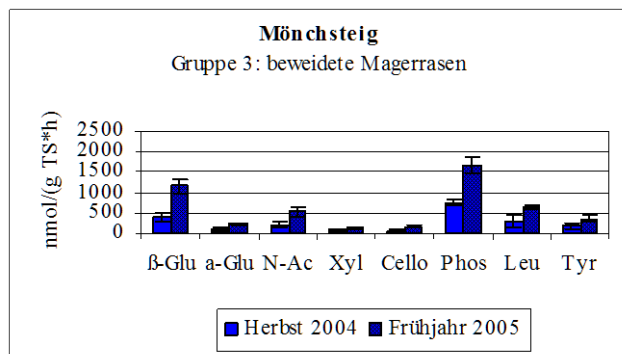


Abb. 28: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Mönchsteig Herbst 2004 und Frühjahr 2005

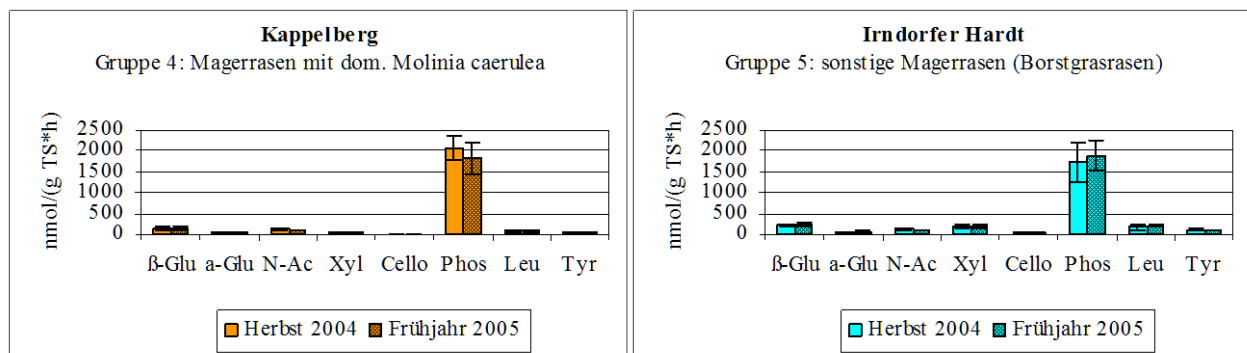


Abb. 29: Muster der Enzymaktivitäten (MUF) für Kappelberg und Irndorfer Hardt Herbst 2004 und Frühjahr 2005

Das Enzymaktivitätenmuster (Fluoreszenz-Methode) wird exemplarisch für jede der fünf Vegetationseinheiten mit einer Fläche dargestellt. Dabei wurde die Flächendarstellung an die für die Bestimmung der Phospholipidfettsäuren- und die DGGE-Fingerprints gewählten Vertreter angelehnt. Auf die Darstellung der restlichen Flächen wurde verzichtet, da sie sehr stark dem Muster der ausgewählten Gruppenvertreter ähneln.

Die Aktivitätsmuster, die mittels Microplate Reader ermittelt wurden, spiegeln die Ergebnisse der kanonischen Diskriminanzanalyse wider. Erneut ist die Ähnlichkeit in den funktionellen Gruppen der Bodenmikroorganismengemeinschaften der „Halbtrockenrasen mit viel *Bromus erectus*“ (Vertreter: Apfelberg) und der „versauerten Halbtrockenrasen“ (Vertreter: Kaiserberg) in Abbildung 27 erkennbar. Die „Magerrasen mit dominierend *Molinia caerulea*“ (Vertreter: Kappelberg) und die „Borstgrasrasen“ (Vertreter: Irndorfer Hardt) zeigen ein gänzlich anderes Muster (Abbildung 29). Die Gruppe 3, also die „beweideten Magerrasen“ (Vertreter: Mönchsteig), nimmt auch bezüglich der Enzymaktivitätsmuster eine Mittelstellung ein (Abb. 28). Insgesamt ist die zeitliche Variabilität der Enzymaktivitäten konstant. Wichtig im Umweltmonitoring ist, dass die natürliche Variabilität gering ist, um anthropogene Veränderungen zu erkennen. Je geringer die natürliche Variabilität ist, umso sensibler ist die Methode.

4.2.3 PLFA- und DGGE-Analysen

Zur Aufklärung der strukturellen Diversität wurden die PLFA- und die DGGE-Fingerprints von je einer Fläche pro Vegetationseinheit untersucht. Im Vergleich dieser beiden Methoden bezüglich ihrer Eignung zum dauerhaften Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Organismen erscheint die Analyse der Phospholipidfettsäuren vorerst geeigneter, da sich diese Methode bereits etabliert hat, gut reproduzierbar ist und der Zeitaufwand sich in Grenzen hält. Zudem erfolgte anhand der PLFA-Muster und Gehalte eine gute Auftrennung der unterschiedlichen Vegetationseinheiten. Zusätzlich zur Bestimmung der PLFAs nach Frostegård, sollten die Probenextrakte bei weiterführenden Untersuchungen nicht nur am Gaschromatographen gemessen, sondern anschließend ebenfalls am Massenspektrometer überprüft werden.

In HEISSENBERGER et al. (1999) ist geschildert, dass die Grundlage der DNA-Fingerprintmethoden die Amplifikation von DNA-Abschnitten mithilfe der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) sowie die Auftrennung von Reaktionsprodukten nach deren Größe mittels Gelelektrophorese ist. Dabei werden durch die Elektrophorese Bandenmuster bewirkt, durch die es möglich wird Veränderungen in der Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erkennen. Allerdings ist einschränkend zu dieser Methode anzuführen, dass durch die hohe Diversität dieser Gemeinschaften zumeist ein sehr komplexes Bandenmuster entsteht, welches es erschwert geringfügige Änderungen zu erfassen. Im Bereich der DGGE-Fingerprint-Techniken wäre im Vergleich zu PLFA-Analyse erst einmal noch ein höherer Zeit- und Kostenaufwand und auch apparativer Aufwand nötig, um das Verfahren mit seinen verschiedenen Arbeitsschritten weiter zu optimieren. Insbesondere bei der Auswertung und Darstellung müssten beispielsweise andere Softwareprogramme herangezogen werden, die es ermöglichen mehrere Gele gleichzeitig zu beurteilen. Somit würde sicherlich die Auftrennung der unterschiedlichen Vegetationseinheiten anhand der Bandenmuster eindeutig hervortreten und übersichtlicher darstellbar.

5 Literatur

BARTH, R., BRAUNER, R., HERMANN, A., HERMANOWSKI, R., NOWACK, K., SCHMIDT, H. & B. TAPPESER (2003): Genetic Engineering and organic Farming. Research Report 201: 94-107. Umweltbundesamt. Berlin.

BECKER, R., BECKER, S., PLATEN, R. & A. ULRICH (2005): Evaluierung von Kriterien für das Monitoring transgener Kartoffelpflanzen mit Änderungen im Grundstoffwechsel. Bundesamt für Naturschutz. Bonn.

BROSIUS, F. (2002) SPSS 11, 1. Auflage. mitp Verlag. Bonn.

BRUINSMA, M., KOWALCHUK, G. A. & J. A. VAN VEEN (2003): Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils* 37: 329-337.

DICK, R. P. & E. KANDELER (2005): *Enzymes in soils*. Elsevier Ltd.: 448-456.

DUNGER, W. & H. J. FIEDLER (1997): *Methoden der Bodenbiologie*. Gustav Fischer Verlag. Jena Stuttgart Lübeck.

FROSTEGÅRD, Å., BÅÅTH, E. & A. TUNLID (1993): Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 723-730.

HAUBERT, D., HÄGGBLOOM, M. M., SCHEU, S. & L. RUESS (2006): Trophic shift of stable isotopes and fatty acids in bacterial based soil food chains. *Soil Biology and Biochemistry*. in press.

HEISSENBERGER, A., UNGER, G., WOTTAWA, A. & J. SCHMIDT (1999): Möglichkeiten zum Monitoring des Einflusses transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen. Umweltbundesamt GmbH. Wien.

HOPKINS, D. W. & E. G. GREGORICH (2003): Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science* 54: 793-800.

KANDELER E. & R. P. DICK (2006): Soil Enzymes: Spatial Distribution and Function in agroecosystems. in press.

KANG, S. & A. L. MILLS (2006): The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *Journal of Microbiological Methods* 66: 242-250. in press, available online january 2006.

KLINK, R. & B. PISTORIUS-KLINK (2003): Vegetationskundliche Untersuchungen auf Grünlanddauerbeobachtungsflächen in Baden-Württemberg 2003. Merdingen.

LFU: LANDESANSTALT FÜR UMWELTSCHUTZ BADEN-WÜRTTEMBERG (HRSG.) (1999): Bodendauerbeobachtung in Baden-Württemberg 2: Untersuchungen ausgewählter organischer Schadstoffe und mikrobiologische Charakterisierung der Standorte. Abrufbar unter <http://www.xfaweb.baden-wuerttemberg.de/bofaweb/index.html> (Stand 11.05.2006).

OLSSON, P. A. (1999): Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 303-310.

PAUL, E. A. & F. E. CLARK (1996): Soil microbiology and biochemistry. Academic Press. New York.

SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. & R. MARGESIN (1993): Bodenbiologische Arbeitsmethoden, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

SCHINNER, F. & R. SONNLEITNER (1996): Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik Band I: Grundlagen, Klima, Vegetation und Bodentyp. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

SPSS INC. (2003): SPSS® Base 12.0 Benutzerhandbuch. Irland.

TSCHERKO, D. & E. KANDELER (1999): Classification and monitoring of soil microbial biomass, N-mineralisation and enzyme activities to indicate environmental changes. *Die Bodenkultur* 50 (4): 215-226.

ZELLES, L. (1999): Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility in Soils* 29: 111-129.

Umweltforschung in Baden-Württemberg

Methodenhandbuch

zum Projekt:

**Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten
Organismen in Baden-Württemberg – Methodenetablierung und
Aufnahme der „Baseline“**

Doreen Benter, Jenny Hafner, Ellen Kandeler

Institut für Bodenkunde und Standortslehre

Fachbereich: Bodenbiologie

Universität Hohenheim

Förderkennzeichen: L75 24002

Laufzeit: 1.10.2004 – 31.12.2006

Die Arbeiten dieses Projekts wurden im Auftrag
des Landes Baden-Württemberg durchgeführt.

Mai 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	Multisubstratassay (MUF u. AMC) – Bestimmung mehrerer Bodenzymaktivitäten mittels Fluoreszenz-Methode	1
1.1	Prinzip	1
1.2	Material und Geräte	3
1.3	Ausführung und Bestimmung	7
1.4	Anmerkungen	9
1.5	Berechnung der Ergebnisse	10
1.6	Literatur	14
2	Bestimmung der Aktivität der Invertase und der Aktivität der Xylanase	15
2.1	Prinzip	15
2.2	Material und Geräte	15
2.3	Ausführung und Bestimmung	17
2.4	Berechnung der Ergebnisse	20
2.5	Anmerkungen	21
2.6	Literatur	21
3	Bestimmung der Aktivität der Protease	22
3.1	Prinzip	22
3.2	Material und Geräte	22
3.3	Ausführung und Bestimmung	24
3.4	Berechnung der Ergebnisse	26
3.5	Anmerkungen	27
3.6	Literatur	27
4	Phospholipidfettsäuren (PLFA) – Bestimmung in Böden	28
4.1	Prinzip	28
4.2	Material und Geräte	28
4.3	Ausführung und Bestimmung	29
4.4	Berechnung der Ergebnisse	33
4.5	Anmerkungen	33
4.6	Literatur	34

5	Bestimmung der Potentiellen Nitrifikation.....	35
5.1	Prinzip	35
5.2	Material und Geräte.....	35
5.3	Ausführung und Bestimmung	36
5.4	Berechnung der Ergebnisse	38
5.5	Anmerkungen	39
5.6	Literatur.....	39
6	Bestimmung des Ninhydrin-reaktivem Stickstoff nach Fumigation-Extraktion	40
6.1	Prinzip	40
6.2	Material und Geräte.....	40
6.3	Ausführung und Bestimmung	42
6.4	Berechnung der Ergebnisse	45
6.5	Anmerkungen	46
6.6	Literatur.....	46
7	ELISA – Nachweis von Bt-Toxin in Bodenproben.....	47
7.1	Prinzip	47
7.2	Material und Geräte.....	47
7.3	Ausführung und Bestimmung	48
7.4	Interpretation der Ergebnisse	49
7.5	Anmerkungen	50
7.6	Literatur.....	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Beispiel für 7-Amino-4-Methylcoumarin-assoziiertes Substrat (STEMMER 2002)	1
Abb. 2: Beispiele für 4-Methylumbelliferon-assoziierte Substrate (STEMMER 2002)	2
Abb. 3: Pipettierschema der Bodenplatten	8
Abb. 4: Pipettierschema der Standardplatten	9
Abb. 5: Benutzung des „Tissue Extractors“	49

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Substrate, deren Molare Masse sowie deren zugehörigen Puffer	6
Tab. 2: Ergebnisbeispiel einer Bodenprobe für einen MUF- und einen AMC-Standard zur Messzeit 0	11
Tab. 3: Beispielübersicht einer Bodenprobe für die Steigung von MUF- und AMC-Standard zu den unterschiedlichen Messzeiten	11
Tab. 4: Ergebnisbeispiel einer Bodenprobe für ein MUF-Substrat (β -Glu) und ein AMC-Substrat (L-Tyr)	13
Tab. 5: Beispiel einer Endergebnisübersicht einer Bodenprobe für die einzelnen gemessenen Enzyme	14
Tab. 6: Herstellung der Eichreihe für die Invertase- bzw. Xylanase-Aktivität	19
Tab. 7: Herstellung der Eichreihe für die Protease-Aktivität	25
Tab. 8: Herstellung der Eichreihe für die potentielle Nitrifikation	38
Tab. 9: Herstellung der Eichreihe für die Bestimmung des ninhydrin-reaktiven N	44

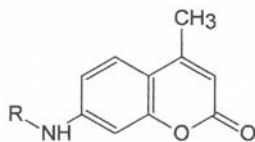
1 Multisubstratassay (MUF u. AMC) – Bestimmung mehrerer Bodenzymaktivitäten mittels Fluoreszenz-Methode

1.1 Prinzip

Die mikrobielle Biomasse produziert im aktiven Zustand intrazelluläre und extrazelluläre Enzyme verschiedenster Art. Kenntnisse über die Abbauleistungen verschiedener Enzyme ganz besonders in Kombination zueinander und in zeitlicher Abfolge können Auskunft über Veränderungen in der Zusammensetzung der Bodenorganismen geben.

Durch den Einsatz eines Microplate Reader (z. B. Microplate Fluorescence Reader FLx800® der Firma Bio-Tek Instruments inc.) wird die gleichzeitige Analyse mehrerer Bodenzyme möglich. Es werden verschiedene Substrate zugesetzt, die jeweils mit 4-Methylumbelliferon (MUF) oder 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) assoziiert sind (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Kommt es zum Abbau der Substrate, wird fluoreszierendes MUF oder AMC frei. Die Fluoreszenz wird mittels Microplate Reader gemessen, durch den Vergleich mit Standardkonzentrationen wird eine Quantifizierung der Bodenzymaktivitäten ermöglicht.

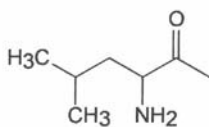
7-Amino-4-Methylcoumarin-Grundstruktur



R = H

7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)

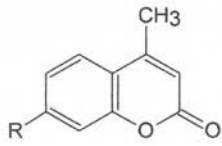
Substrate (R =)



L-Leucin-4-Methylcoumarinylamid

Abb. 1: Beispiel für 7-Amino-4-Methylcoumarin-assoziiertes Substrat (STEMMER 2002)

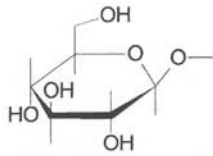
4-Methylumbelliferon-Grundstruktur



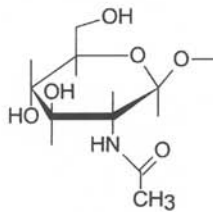
R = OH

4-Methylumbelliferon (MU)

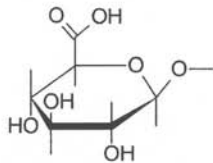
Substrate (R =)



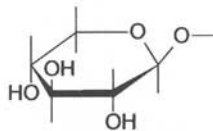
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid



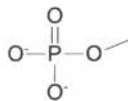
4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid



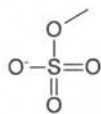
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid



4-Methylumbelliferyl- β -D-Xylopyranosid



4-Methylumbelliferyl-Phosphat



4-Methylumbelliferyl-Sulfat

Abb. 2: Beispiele für 4-Methylumbelliferon-assoziierte Substrate (STEMMER 2002)

Beispiele für Enzyme (STEMMER 2002)

- β -Glucosidasen (IUBMB Enzyme Nomenklatur E.C. 3.2.1.21): katalysieren die Abspaltung endständiger Glucose aus 1-4- β -glucosidischen Bindungen (z. B. aus Cellulose), werden hauptsächlich von Pilzen ausgeschieden
- β -Xylosidasen (E.C. 3.2.1.37): Teil der Xylanasen-Enzymkomplexe, notwendig zum Abbau von Xylan (pflanzliches Polysaccharid), sind weit verbreitet
- N-Acetyl- β -Glucosaminidasen (E.C. 3.2.1.52): entscheidende Rolle im Abbau von Chitin (Pilze) und Murein (bakterieller Zellwandbestandteil)
- Leucin-Aminopeptidasen (E.C. 3.4.11.x): spalten als Exopeptidase (Protease) endständige Aminosäuren von Peptidketten (Proteinen) ab, notwendig für den Abbau von Proteinen
- Phosphatesterasen (sauer E.C. 3.1.3.2; basisch E.C. 3.1.3.1): Zusammensetzung im Boden aus Enzymen mit alkalischem (bakteriell) und saurem (pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs) pH-Optimum

1.2 Material und Geräte

Autoklavieren von Geräten und Lösungen

Nachfolgend sind Geräte und Lösungen aufgeführt, die vor Versuchsbeginn zu autoklavieren sind, je nach Autoklav-Typ muss dies getrennt geschehen.

Autoklavieren von Glaswaren und Pipettenspitzen (je Analyse)

- 1 Becherglas (100 ml oder 150 ml) je Probe
- 50 ml Vollpipette
- 2 x 10 ml Messpipetten
- 1 Abdampfschale je Puffer (hier 2)
- 1 Kasten 200 μ l Pipettenspitzen
- 1 ml Pipettenspitzen (1 je Substrat und je Standard für die elektronische Pipette)

Autoklavieren von Wasser und Lösungen

- MES-Puffer (hier insgesamt ca. 130 ml für 32 Proben) :
 - 1) für die Arbeitslösung der Substrate: 9 ml Puffer je Substrat (hier 6 Substrate) für 32 Proben (45 ml Puffer je Substrat für 160 Proben)
 - 2) für die Standardplatte: 620 μ l Puffer je Standardreihe und Probe

- 3) für die Bodenplatte: 150 µl Puffer je Substrat (hier 6 Substrate) und Probe
- TRIZMA-Puffer (hier insgesamt ca. 80 ml für 32 Proben) :
- 1) Für die Arbeitslösung der Substrate: 9 ml Puffer je Substrat (hier 2 Substrate) für 32 Proben (45 ml Puffer je Substrat für 160 Proben)
 - 2) Für die Standardplatte: 620 µl Puffer je Standardreihe und Probe
 - 3) Für die Bodenplatte: 150 µl Puffer je Substrat (hier 2 Substrate) und Probe
- 50 ml deionisiertes Wasser je Probe (hier ca. 1800 ml für 32 Proben)

Weitere Geräte

- zur Aufbewahrung der Substratlösungen: sterile Zentrifugenröhrchen mit Stehrand (sterile PP-Test-Tubes, 50 ml)
- PP-Reaktionsgefäße mit Deckel (PP-Tubes, 1,5 ml)
- Elektronische Pipette (50-1000 µl; optional)
- Mehrkanalpipette (5-50 µl)
- Pipette (10-100 µl; 100-1000 µl)
- Microplate Reader (360/460 nm) mit PP-Mikroplatten (schwarz, 96 wells)
- Brutschrank (30 °C)
- Ultraschallstab
- Autoklav
- Magnetrührer
- Zeitmesser

Herstellung der Puffer

Die Puffer müssen nicht steril hergestellt werden.

0,1 M MES-Puffer:

Die entsprechende Menge MES-Puffer (Wassergehalt beachten!) in einen 1 l Messkolben einwiegen und mit deionisiertem Wasser auffüllen. Bei Verwendung des MES-Puffers ($C_6H_{13}NO_4SN_{0,5}$) mit einem Molekulargewicht von 206,73 g/mol werden zur Herstellung der 0,1 M Lösung demnach 20,673 g in einem 1 l Messkolben gegeben und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

0,05 M TRIZMA-Puffer:

0,985 g TRIZMA-Base (•- • - • -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin A.C.S. Reagenz; 0,016 M) und 2,66 g TRIZMA-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid Buffer Substance; 0,036 M) in einen 500 ml Messkolben geben und mit deionisiertem Wasser auffüllen.

Herstellung der Standards

Die Standards müssen nicht steril hergestellt werden.

10 mM MUF-Vorratslösung:

In einen 100 ml Messkolben werden 0,1762 g 4-Methylumbelliferon sowie 50 ml Methanol gegeben. Nachdem sich das 4-Methylumbelliferon vollständig im Methanol gelöst hat, wird auf 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. (Volumenkontraktion!)

5 mM AMC-Vorratslösung:

0,0875 g 7-Amino-4-Methylcoumarin in einen 100 ml Messkolben einwiegen und 50 ml Methanol hinzugeben. Erst wenn das 7-Amino-4-Methylcoumarin gänzlich im Methanol gelöst ist, wird auf 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. (Volumenkontraktion!)

10 µM MUF-Arbeitslösung:

100 µl der MUF-Vorratslösung werden 900 µl MES-Puffer in einem PP-Tube hinzugegeben (1 mM), daraus wird ein Aliquot von 500 µl entnommen, in einen 50 ml Messkolben gegeben und mit 49,5 ml MES-Puffer aufgefüllt.

10 µM AMC-Arbeitslösung:

200 µl der AMC-Vorratslösung werden 800 µl TRIZMA-Puffer in einem PP-Tube zugegeben (1 mM), daraus wird ein Aliquot von 500 µl entnommen, in einen 50 ml Messkolben gegeben und mit 49,5 ml TRIZMA-Puffer aufgefüllt.

Die MUF- und AMC-Arbeitslösungen sind ca. 2 Monate im Kühlschrank haltbar. Allerdings ist beim AMC-Standard das Pulver bei der Herstellung der Vorratslösung schwer löslich und fällt im Kühlschrank sehr leicht wieder aus. Daher sollte die AMC-Vorratslösung bei Bedarf immer frisch hergestellt werden bzw. sollten gleich je nach Anzahl der zu bearbeitenden Proben aus der frisch hergestellten AMC-Vorratslösung mehrere AMC-Arbeitslösungen

gewonnen werden. Analysiert man nur wenige Proben, sollte man die Menge der MUF- und AMC-Vorratslösung entsprechend verringern.

Herstellung der Substrate

Die Substrate müssen steril hergestellt werden.

10 mM Substrat-Vorratslösungen:

Jeweils 1/10000 des Substratmolgewichts (evtl. Wassergehalt bzw. Chloridgehalt beachten!) werden in die sterilen PP-Test-Tubes eingewogen und in 300 µl Dimethyl Sulfoxid (DMSO) (C₂H₆SO) gelöst. Danach werden 9,7 ml steriles Wasser zugegeben.

Substrat	Verwendete Abkürzung	Formel	Molare Masse [g/mol]	Puffer
4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucoside	β-Glu	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,31	MES
4-Methylumbelliferyl-•-D-Glucoside	•-Glu	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,31	MES
4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide	N-Ac	C ₁₈ H ₂₁ NO ₈	379,36	MES
4-Methylumbelliferyl-β-D-Xylopyranoside	Xyl	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	308,28	MES
4-Methylumbelliferyl-β-D-Cellobioside	Cello	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₃	500,45	MES
4-Methylumbelliferyl-Phosphate	Phos	C ₁₀ H ₇ O ₆ PNa ₂	300,11	MES
L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride	L-Leu	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃ *HCl	324,81	TRIZMA
L-Tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin	L-Tyr	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	338,36	TRIZMA

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Substrate, deren Molare Masse sowie deren zugehörigen Puffer

1 mM Substrat-Arbeitslösung:

Pro Enzymsubstrat werden 5 ml Aliquot aus der jeweiligen 10 mM Substrat-Vorratslösung mit 45 ml sterilem Puffer vermischt (MES-Puffer bei MUF-Substraten und TRIZMA-Puffer bei AMC-Substraten, siehe Tab. 1).

Für 32 Proben genügen 10 ml Arbeitslösung (1 ml Aliquot + 9 ml steriler Puffer).

Die Vorratslösungen der Substrate halten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren ca. 6 Monate. Die Substrat-Arbeitslösungen sind im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 3 Wochen haltbar.

1.3 Ausführung und Bestimmung

Probenaufbereitung

Es werden 1 g feuchter Boden in ein 100 ml Becherglas eingewogen und mittels Vollpipette 50 ml steriles Wasser zugegeben (bei größeren Einwaagen 100 ml steriles Wasser). Jede der Proben wird mit einem Ultraschallstab 2 min lang aufgeschlossen. Dabei muss unbedingt die Verschleppung der Bodenproben am Stab vermieden werden, indem dieser zwischendurch mit deionisiertem Wasser gespült und abgetrocknet wird. Der Ultraschallstab sollte bei einer Leistung von 35 % betrieben werden und etwa 1-1,5 cm in die Bodenlösung eintauchen.

Pipettieren der Bodenplatten

Es werden 4 Proben je Mikroplatte angeordnet. Für einen Analysendurchgang mit 16 Bodenproben benötigt man demnach 4 Platten, die mit Boden 1-4; Boden 5-8; Boden 9-12 und Boden 13-16 beschriftet werden. Je Probe und Substrat sind 3 analytische Wiederholungen erforderlich. Die Bodenlösung wird während des Pipettierens auf einem Magnetrührer gerührt. Verschleppungen von einer Probe zur anderen über Rührfische und Rührfischfänger vermeiden, daher zwischendurch immer mit deionisiertem Wasser spülen und abtrocknen.

Es werden je Probe 3 Mal nachfolgende Komponenten in ein Well pipettiert, wobei die 3 Wiederholungen als 3 Spalten anzuordnen sind (siehe Abb. 3):

- 50 μl Bodensuspension (Mehrkanalpipette mit 3 Spitzen)
- 50 μl MES- bzw. TRIZMA-Puffer je nach Substrat (elektronische Pipette)
- 100 μl Substrat (elektronische Pipette)

		Boden 1			Boden 2			Boden 3			Boden 4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
β-Glu	Puffer: MES	A											
α-Glu		B											
N-Ac		C											
Xyl		D											
Cello		E											
Phos		F											
L-Leu	TRIZMA	G											
L-Tyr		H											
Boden in µl		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Puffer in µl		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Substrat in µl		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Abb. 3: Pipettierschema der Bodenplatten

Pipettieren der Standardplatten

Für einen Analysendurchgang mit 16 Bodenproben benötigt man 2 Mikroplatten, die mit Standard 1-8 und Standard 9-16 beschriftet werden. Zunächst werden 8 Bodenproben je Platte innerhalb von Zeilen für MUF und AMC angeordnet. Dabei werden die Konzentrationen für den MUF-Standard innerhalb der Spalten 1-6 angeordnet und die des AMC-Standard innerhalb der Spalten 7-12. Standard und Puffer werden zuletzt zugegeben (siehe Abb. 4):

- 50 µl Bodensuspension (Mehrkanalpipette mit 3 Spitzen)
- MUF- bzw. AMC-Standard in der Reihenfolge: 0, 10, 20, 50, 80, 120 µl (Mehrkanalpipette mit 4 Spitzen, elektronische Pipette)
- MES- bzw. TRIZMA-Puffer in der Reihenfolge: 150, 140, 130, 100, 70, 30 µl (Mehrkanalpipette mit 4 Spitzen, elektronische Pipette)

	Standard: MUF Puffer: MES						Standard: AMC Puffer: TRIZMA						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Boden 1	A												
Boden 2	B												
Boden 3	C												
Boden 4	D												
Boden 5	E												
Boden 6	F												
Boden 7	G												
Boden 8	H												
Boden in µl		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
Standard in µl		0	10	20	50	80	120	0	10	20	50	80	120
Puffer in µl		150	140	130	100	70	30	150	140	130	100	70	30
ergibt folgende Konzentration in pikomol/well		0	120	200	500	800	1200	0	100	200	500	800	1200

Abb. 4: Pipettierschema der Standardplatten

Die Bodenplatten und Standardplatten werden bei 30 °C im Brutschrank (möglichst ohne Umluft) 30 min vorinkubiert, um eine lineare Steigung zu gewährleisten. Insbesondere bei Brutschränken mit Umluft sollte auf die mögliche Austrocknung der Wells geachtet werden, daher evtl. Parafilm oder eine zusätzliche Platte zum Abdecken nutzen. Im Anschluss an die Vorinkubation erfolgt die Messung der Platten im Microplate Reader bei 360/460 nm Wellenlänge nach einer Zeit von 0, 30, 60, 120 und 180 min. Die Dateien werden in Form einer KC4-Tabelle sowie in Form einer Excel-Tabelle abgespeichert. Zwischen den Messungen verbleiben die Boden- und Standardplatten im Brutschrank bei 30 °C.

1.4 Anmerkungen

Aufgrund der sehr geringen eingewogenen Probenmenge muss unbedingt auf eine möglichst sorgfältige Homogenisierung der Bodenprobe geachtet werden. Der Boden sollte gut durchmischt und <2 mm gesiebt vorliegen. Auf die Ultraschallbehandlung und auf das Rühren während des Pipettierens kann nicht verzichtet werden. Ein Ultraschallbad bringt schlechtere Ergebnisse.

1.5 Berechnung der Ergebnisse

Die Auswertung der Messungen erfolgt über das Softwareprogramm KC4 v 3.0 with PowerReports® der Firma Bio-Tek. Eventuell muss eine Umrechnung auf [nmol Substrat gTS⁻¹ h⁻¹] erfolgen.

Die einzelnen bei der Messung entstandenen Excel-Tabellen werden als Teilarbeitsblätter in einer einzigen Excel-Arbeitsmappe je Analyse zusammengefasst. Pro Analysendurchgang mit 16 Bodenproben sind in der Arbeitsmappe dementsprechend einzelne Arbeitsblätter für die Standardplatten 1-8 und 9-16 sowie für die Bodenplatten 1-4, 5-8, 9-12 und 13-16 jeweils zu den Zeiten der Messungen (0, 30, 60, 120, 180 min) enthalten. Zur besseren Übersicht wird dann jeweils für die Standardplatten sowie für die Bodenplatten ein neues Arbeitsblatt erstellt, in dem die jeweiligen Ergebnisse der analysierten Proben zu den unterschiedlichen Messzeiten ersichtlich sind.

Auswertung der Standardplatten:

MUF-Standard/ AMC-Standard:

- 1) Steigung der MUF- bzw. AMC-Standardkonzentrationen des Bodens für jede der Messzeiten (0, 30, 60, 120, 180 min) errechnen
- 2) Mittelwert aus den erhaltenen Steigungen bilden

Rechenbeispiel (siehe Tabelle 2 und 3):

MUF-Standard:

- 1) Steigung der MUF-Standardkonzentrationen des Bodens für jede der Messzeiten (0, 30, 60, 120, 180 min) errechnen:

0 min: $b_1 = \text{Steigung} (\{0;100;200;500;1200\}; \{219;870;1505;2544;5280;8003\})$ ergibt 6,4203

30 min: $b_2 = \text{Steigung} (\{\dots\}; \{\dots\})$ ergibt 6,1945

60 min: $b_3 = \text{Steigung} (\{\dots\}; \{\dots\})$ ergibt 6,0339

120 min: $b_4 = \text{Steigung} (\{\dots\}; \{\dots\})$ ergibt 5,7698

(180 min: $b_5 = \text{Steigung} (\{\dots\}; \{\dots\})$ • hier nicht vorhanden)

- 2) Mittelwert aus den erhaltenen Steigungen bilden

$X_{\text{Boden 1, MUF-Std, } \beta\text{-Glu}} = \text{Mittelwert} (b_1; b_2; b_3; b_4; \dots)$ ergibt 6,10

AMC-Standard:

1) Steigung der AMC-Standardkonzentrationen des Bodens für jede der Messzeiten (0, 30, 60, 120, 180 min) errechnen

0 min: $b_1 = \text{Steigung} (\{0;100;200;500;1200\};\{306;5072;13677;31336;46688;70415\})$

ergibt 58,3184

30 min: $b_2 = \text{Steigung} (\{...\};\{...\})$ ergibt 55,8137

60 min: $b_3 = \text{Steigung} (\{...\};\{...\})$ ergibt 53,2296

120 min: $b_4 = \text{Steigung} (\{...\};\{...\})$ ergibt 51,8556

(180 min: $b_5 = \text{Steigung} (\{...\};\{...\})$ • hier nicht vorhanden)

2) Mittelwert aus den erhaltenen Steigungen bilden

$X_{\text{Boden 1,AMC-Std, L-Tyr}} = \text{Mittelwert} (b_1;b_2;b_3;b_4;...)$ ergibt 54,64

Name	Well	M 360/460	Nb	Mean
1 muf 0	A1	219	1	219
1 muf 100	A2	870	1	870
1 muf 200	A3	1505	1	1505
1 muf 500	A4	2544	1	2544
1 muf 800	A5	5280	1	5280
1 muf 1200	A6	8003	1	8003
1 amc 0	A7	306	1	306
1 amc 100	A8	5072	1	5072
1 amc 200	A9	13677	1	13677
1 amc 500	A10	31336	1	31336
1 amc 800	A11	46688	1	46688
1 amc 1200	A12	70415	1	70415

Steigung: 6,420

Steigung: 58,318

Tab. 2: Ergebnisbeispiel einer Bodenprobe für einen MUF- und einen AMC-Standard zur Messzeit 0

Boden		0	30	60	120	Mittelwert Steigung
1	MUF	6,4203	6,1945	6,0339	5,7698	6,10
1	AMC	58,3184	55,8137	53,2296	51,8556	54,64

Tab. 3: Beispielübersicht einer Bodenprobe für die Steigung von MUF- und AMC-Standard zu den unterschiedlichen Messzeiten

Auswertung der Bodenplatten:

MUF-Substrate/ AMC-Substrate:

- 1) Steigung für jede der 3 Wiederholungen zu den jeweiligen Echtzeiten des Bodens errechnen
- 2) Mittelwert aus den 3 erhaltenen Steigungen bilden
- 3) Errechnen der Fluoreszenz in pmol/well*min :

$$y = mx$$

$$\frac{y}{m}$$

umgestellt nach x: $x = \frac{y}{m}$

y Mittelwert Steigung je Boden und Substrat

m Mittelwert Steigung je MUF- bzw. AMC-Substrat

x Konzentration des jeweiligen Enzyms in [pmol/well*min]

- 4) Errechnen der Fluoreszenz in nmol/g TB*h

Rechenbeispiel (siehe Tabelle 4 und 5):

MUF-Substrate:

- 1) Steigung für jede der 3 Wiederholungen zu den jeweiligen Echtzeiten des Bodens errechnen

1. Wdh.: $b_1 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{2381;3114;3771;5394\})$ ergibt 24,85

2. Wdh.: $b_2 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{2444;3002;3757;5518\})$ ergibt 25,79

3. Wdh.: $b_3 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{2692;3470;4254;6122\})$ ergibt 28,43

- 2) Mittelwert aus den 3 erhaltenen Steigungen bilden

$X_{\text{Boden 1, } \beta\text{-Glu}} = \text{Mittelwert} (24,85;25,79;28,43)$ ergibt 26,36

- 3) Errechnen der Fluoreszenz in pmol/well*min

$$\frac{X_{\text{Boden 1, } \beta\text{-Glu}}}{X_{\text{Boden 1, MUF-Std}}}$$

$$= y_{\text{Boden 1, } \beta\text{-Glu}} [\text{pmol/well*min}]$$

- 4) Errechnen der Fluoreszenz in nmol/g TB*h

$$y_{\text{Boden 1, } \beta\text{-Glu}} [\text{pmol/well*min}] * 100$$

$$\frac{\quad}{\text{EW [g]} * \text{TS [\%]}}$$

$$= y_{\text{Boden 1, } \beta\text{-Glu}} [\text{nmol/g TB*h}]$$

AMC-Substrate:

1) Steigung für jede der 3 Wiederholungen zu den jeweiligen Echtzeiten des Bodens errechnen

1. Wdh.: $b_1 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{8556;14196;20377;34158\})$ ergibt 212,81

2. Wdh.: $b_2 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{8400;14404;20281;34038\})$ ergibt 212,13

3. Wdh.: $b_3 = \text{Steigung} (\{0;30;60;121\};\{8386;14836;21407;36376\})$ ergibt 231,86

2) Mittelwert aus den 3 erhaltenen Steigungen bilden

$\bar{X}_{\text{Boden 1, L-Tyr}} = \text{Mittelwert} (212,81;212,13;231,86)$ ergibt 218,93

3) Errechnen der Fluoreszenz in pmol/well*min

$\bar{X}_{\text{Boden 1, L-Tyr}}$

$\frac{\bar{X}_{\text{Boden 1, L-Tyr}}}{\bar{X}_{\text{Boden 1, AMC-Std}}} = [\text{pmol/well*min}]$

4) Errechnen der Fluoreszenz in nmol/g TB*h

$y_{\text{Boden 1, L-Tyr}} [\text{pmol/well*min}] * 100$

$\frac{\text{EW [g]} * \text{TS [\%]}}{\text{EW [g]} * \text{TS [\%]}} = y_{\text{Boden 1, L-Tyr}} [\text{nmol/g TB*h}]$

Boden	t [min]	Echtzeiten				Steigung	R ²	MW Stgg
		0	30	60	121			
β-glu	2381	3114	3771	5394	0	24,85	0,998	26,36
	2444	3002	3757	5518	0	25,79	0,992	
	2692	3470	4254	6122	0	28,43	0,998	
Tyr	8556	14196	20377	34158	0	212,81	0,998	218,93
	8400	14404	20281	34038	0	212,13	0,999	
	8386	14863	21407	36376	0	231,86	0,999	

Tab. 4: Ergebnisbeispiel einer Bodenprobe für ein MUF-Substrat (β-Glu) und ein AMC-Substrat (L-Tyr)

Boden- probe	MUF/ AMC- Substrate	Steigung MW	Stabw	CV [%]	R ² MW	Einwaage [g]	TS [%]	pmol/ well*min	nmol/ g TB*h
1	β-D-Glucosid	26,36	1,86	7,04	1,00	1,006	62,89	4,317	409,41
347	α-D-Glucosid	8,74	0,84	9,60	0,98	1,006	62,89	1,431	135,70
	N-Ac	12,21	2,84	23,29	0,99	1,006	62,89	2,001	189,73
	Xylosid	7,29	0,42	5,71	0,98	1,006	62,89	1,195	113,28
	Cellobiosid	6,41	0,46	7,10	0,97	1,006	62,89	1,051	99,65
	Phosphat	51,17	7,17	14,01	0,98	1,006	62,89	8,382	794,87
	L-Leucin	564,93	36,60	6,48	1,00	1,006	62,89	10,340	980,52
	L-Tyrosin	218,93	11,20	5,12	1,00	1,006	62,89	4,007	379,99

Tab. 5: Beispiel einer Endergebnisübersicht einer Bodenprobe für die einzelnen gemessenen Enzyme

1.6 Literatur

MARX, M.-C., WOOD, M. & S.C. JARVIS (2001): A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1633-1640.

STEMMER, M. (2002): Entwicklung und Einsatz eines Multi-Substrat Enzymassays (MSEA) zur Bestimmung von bodenenzymatischen Umsetzungsraten unter in-Situ Verhältnissen. Institut für Bodenforschung der Universität für Bodenkultur Wien.

STEMMER, M. (2004): Multiple-substrate enzyme assays: a useful approach for profiling enzyme activity in soils?. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 519-527.

2 Bestimmung der Aktivität der Invertase und der Aktivität der Xylanase

2.1 Prinzip

Die Aktivität der Invertase (auch Saccharase genannt) und der Xylanase werden mit der gleichen Verfahrensweise ermittelt, lediglich das zugegebene Substrat ist ein anderes. Bei Invertase ist es Saccharose, bei Xylanase Xylan. Zudem unterscheidet sich die Inkubationszeit, wobei diese bei der Invertase 3 h beträgt und bei der Xylanase 24 h. Während der Inkubation entsteht Zucker, der in alkalischer Lösung das K-Hexacyanoferrat-III zu K-Hexacyanoferrat-II reduziert. Letzteres reagiert in saurer Lösung mit Fe-III-Ammoniumsulfat zu einem Fe-III-Hexacyanoferrat-II-Komplex (Berliner Blau). Die Farbintensität wird photometrisch gemessen.

2.2 Material und Geräte

- Kulturröhrchen (für Einwaage)
- 50 mm Filtertrichter
- 9 mm oder 11 mm Faltenfilter
- kleine Reagenzgläser (für Filtrat, Verdünnung und Eichreihe)
- große Reagenzgläser (für Anfärbung und Eichreihe)

- Magnetrührer mit Heizplatte und Temperaturfühler
- Vortex
- Schüttelwasserbad
- Photometer

Herstellung der Lösungen

2 M Natriumacetat-Lösung (Lösung 1):

272,16 g Natriumacetat * 3 H₂O (MG: 136,08 g/mol) oder 164,06 g wasserfreies Natriumacetat (MG: 82,03 g/mol) werden in einem Becherglas mit ca. 900 ml deionisiertem Wasser gelöst, in einen 1 l Messkolben überführt und weiter bis zur Marke aufgefüllt.

12 %ige Essigsäure (Lösung 2):

Es werden 300 ml deionisiertes Wasser in einem 500 ml Messkolben vorgelegt und 60 ml Essigsäure (Eisessig) zugegeben. Anschließend den Kolben bis zur Marke mit deionisiertem Wasser auffüllen.

2 M Acetatpuffer-Lösung (pH 5,5):

Für diese Pufferlösung werden 1000 ml der Lösung 1 (2 M Natriumacetat-Lösung) in ein 2 l Becherglas vorgelegt und mit der Lösung 2 (12 %ige Essigsäure) auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. (Richtwert ca.170 ml 12 %ige Essigsäure)

Reagenz A:

43,20 g Natriumcarbonat * 10 H₂O (MG: 286,14 g/mol) und 0,9 g Kaliumcyanid (MG: 65,12 g/mol) (**Vorsicht: sehr toxisch**) werden im 1 l Messkolben zu 1000 ml mit deionisiertem Wasser gelöst. Im Kühlschrank ist die Lösung längere Zeit haltbar.

Reagenz B:

0,5 g Kaliumhexacyanoferrat (MG: 329,26 g/mol) werden mit deionisiertem Wasser in 1000 ml gelöst. Da die Lösung lichtempfindlich ist, sollte sie in einer braunen Flasche aufbewahrt werden. Im Kühlschrank ist die Lösung längere Zeit haltbar.

Reagenz C:

1,5 g Ammoniumeisen-III-Sulfat * 12 H₂O (MG: 482,19 g/mol) und 1,0 g SDS/Natriumlaurylsulfat werden in einen 1 l Messkolben eingewogen, mit 900 ml deionisiertem Wasser und mit 4,2 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und die Lösung nach dem Abkühlen mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Im Kühlschrank ist die Lösung längere Zeit haltbar.

Glukose-Stammlösung (250 µg/ml) (für Eichreihe):

Dafür werden 0,250g D(+)-Glukose (MG: 180,16 g/mol, wasserfrei) in einem 1 l Messkolben zu 1000 ml mit deionisiertem Wasser gelöst. Im Kühlschrank ist die Lösung längere Zeit haltbar.

Glukose-Gebrauchslösung (25 µg/ml) (für Eichreihe):

Diese wird durch 1: 10 Verdünnung hergestellt, d. h. 10 ml der Glukose-Stammlösung (250 µg/ml) werden im 100 ml Messkolben mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Gebrauchslösung muss täglich frisch hergestellt werden.

Substratlösungen:

Diese müssen am Versuchstag jeweils frisch angesetzt werden.

Für die Invertaseaktivität: 50 mM Saccharoselösung:

5,99 g Saccharose (MG: 342,3 g/mol) werden in einem Becherglas eingewogen und in 350 ml (Messzylinder) 2 M Acetatpuffer-Lösung gelöst.

Für die Xylanaseaktivität: 1,7%ige (w/v) Xylan-Substratsuspension:

5,95 g Xylan aus Haferspелzen werden in einem Becherglas eingewogen, mit 350 ml (Messzylinder) 2 M Acetatpuffer-Lösung versetzt und unter Rühren etwa 2 h lang auf der Heizplatte bei 45 °C (Temperaturfühler verwenden!) gelöst.

2.3 Ausführung und Bestimmung

Die Bodenproben müssen zwei Tage vor der Analyse aus dem Tiefkühlschrank genommen und im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut und ggf. noch auf <2 mm gesiebt werden. Die Proben können bis zu 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, ansonsten müssen sie wieder bei -20°C eingefroren werden. Am besten taut man nur die für alle Enzymmessungen benötigte Probenmenge auf und behält eine Reserve bei dauerhaft -20°C.

In große Kulturröhrchen werden 0,3 g naturfeuchte Bodenprobe (je Boden zwei Parallelen als Vollproben und eine Leerprobe) eingewogen.

Alle Vollproben werden:

- für die Invertaseaktivität: mit 5,0 ml 50 mM Saccharose-Substratlösung bzw.
- für die Xylanaseaktivität: mit 5,0 ml 1,7%iger Xylan-Substratsuspension

- und 5,0 ml 2 M Acetatpuffer-Lösung (pH 5,5) versetzt.

Zu den Leerproben werden:

- nur 5,0 ml 2M Acetatpuffer (pH 5,5) zugefügt.

Die Proben werden auf dem Vortex kurz geschüttelt, mit Schraubkappen verschlossen und bei 50 °C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert:

- *für die Invertaseaktivität:* Inkubationszeit von 3 h
- *für die Xylanaseaktivität:* Inkubationszeit von 24 h

Nach Abschluss der Inkubation werden zu den Leerproben:

- *für die Invertaseaktivität:* je 5,0 ml 50 mM Saccharose-Substratlösung bzw.
- *für die Xylanaseaktivität:* je 5,0 ml 1,7%ige Xylan-Substratsuspension pipettiert.

Alle Proben werden kurz auf dem Vortex geschüttelt und dann sofort durch Faltenfilter in kleine Reagenzgläser abfiltriert. Anschließend werden jeweils 0,5 ml des Filtrates in kleine Reagenzgläser überführt und 4,5 ml deionisiertes Wasser zugefügt (entspricht einer 1:10 Verdünnung). Dieser Verdünnungsschritt kann auch mit dem Dilutor „microlab 500“ durchgeführt werden.

Im vorliegenden Projekt wurde eine 1:20 Verdünnung des Filtrates bei den Probendurchgängen gewählt, d. h. mithilfe des Dilutors werden jeweils 0,25 ml des Filtrates in kleine Reagenzgläser überführt und 4,75 ml deionisiertes Wasser zugefügt. (siehe auch Kapitel 2.5 Anmerkungen)

Für die Farbreaktion werden dann in großen Reagenzgläsern

- 1 ml des verdünnten Filtrates mit
- 1 ml Reagenz A (**Vorsicht: toxisch**) und
- 1 ml Reagenz B versetzt.

Die Reagenzgläser werden mit Schraubkappen verschlossen, kurz auf dem Vortex geschüttelt und 15 min ins kochende Wasserbad (100 °C) gestellt. (Achtung: Das Wasserbad benötigt etwa eine Stunde, um eine Temperatur von 100 °C zu erreichen.) Danach werden die Proben etwa 5 min in einem weiteren Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Zuletzt werden zu den Proben je 5 ml Reagenz C pipettiert und die Lösungen wieder kurz auf dem Vortex gemischt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Herstellung der Eichreihe:

Für die Erstellung der Eichwerte wird wie folgt in große Reagenzgläser pipettiert:

Glukose-Gebrauchslösung [ml]	2 M Acetatpuffer [ml]	H ₂ O _{dest.} [ml]
0,00	0,10	0,90
0,10	0,10	0,80
0,20	0,10	0,70
0,30	0,10	0,60
0,40	0,10	0,50
0,50	0,10	0,40
0,60	0,10	0,30

Tab. 6: Herstellung der Eichreihe für die Invertase- bzw. Xylanase-Aktivität

Es ergeben sich so folgende Eichpunkte:

0 - 2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 - 12,5 und 15,0 [µg] Glukose/Ansatz.

Anschließend wird weiter verfahren, wie bei der Probenbehandlung beschrieben: Für die Farbreaktion werden dann je

- 1 ml Reagenz A (**Vorsicht: toxisch!**) und
- 1 ml Reagenz B zugefügt.

Die Reagenzgläser werden mit Schraubkappen verschlossen, kurz auf dem Vortex geschüttelt und 15 min ins kochende Wasserbad (100°C) gestellt. Anschließend werden die Proben etwa 5 min in einem weiteren Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Zuletzt werden zu den Proben je 5 ml Reagenz C pipettiert und die Lösungen wieder kurz auf dem Vortex gemischt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Messung:

Nach 60 min kann die photometrische Messung bei 690 nm (Programm: XYLANASE, denn die Eichgerade ist bei der Invertase- und bei der Xylanase-Bestimmung die gleiche) erfolgen, wobei der blaue Farbkomplex noch weitere 30 min stabil ist.

2.4 Berechnung der Ergebnisse

$$\text{Invertaseaktivität:} \quad \frac{(\text{Probe}) \times 10 \times 10 \times 100}{\text{EW} \times \text{TS} [\%]} = [\mu\text{g}] \text{GLC}/(\text{g TS} \times 3 \text{ h})$$

$$\text{Xylanaseaktivität:} \quad \frac{(\text{Probe}) \times 10 \times 10 \times 100}{\text{EW} \times \text{TS} [\%]} = [\mu\text{g}] \text{GLC}/(\text{g TS} \times 24 \text{ h})$$

Durch die Verdünnung des Filtrates ergeben sich folgende Formeln:

$$\text{Invertaseaktivität:} \quad \frac{(\text{Probe}) \times 10 \times 20 \times 100}{\text{EW} \times \text{TS} [\%]} = [\mu\text{g}] \text{GLC}/(\text{g TS} \times 3 \text{ h})$$

$$\text{Xylanaseaktivität:} \quad \frac{(\text{Probe}) \times 10 \times 20 \times 100}{\text{EW} \times \text{TS} [\%]} = [\mu\text{g}] \text{GLC}/(\text{g TS} \times 24 \text{ h})$$

GLC	Glukoseäquivalent
Probe	Probe [μg] Glukose/ Ansatz
10	Volumen des Inkubationsansatzes [ml]
10 bzw. 20	Verdünnungsfaktor
EW	Einwaage an feldfrischem Boden
100/TS [%]	Umrechnung auf Trockenboden

Abschließend muss vom Mittelwert der Vollproben der Messwert der Leerproben abgezogen werden.

2.5 Anmerkungen

- Kaliumcyanid ist sehr toxisch und Einwaagen dieser Chemikalien müssen unter dem Abzug geschehen!
- Pro Analysentag lassen sich etwa 20 Bodenproben (bei 2 Vollproben und 1 Leerprobe also insgesamt 60 Proben) bearbeiten.
- Sollte die Einwaage aufgrund einer sehr niedrigen Aktivität erhöht werden (bis zu 1 g), sollten alle zu vergleichenden Proben mit derselben Einwaage analysiert werden, da es zu unterschiedlichen Ergebnissen (bis zu 20 %) kommen kann.
- Sollte die Anfärbung bei den Proben eine intensivere dunkle Färbung ergeben, als der höchste Wert der Eichreihe, sollte eine 1:20 Verdünnung bei allen Probendurchgängen gewählt werden, d. h. jeweils 0,25 ml des Filtrates werden in kleine Reagenzgläser überführt und 4,75 ml deionisiertes Wasser zugefügt. Allerdings muss dieser Verdünnungsschritt später bei der Berechnung berücksichtigt werden.
- Im Buch „Bodenbiologische Arbeitsmethoden“ wird die Glukose-Eichreihe ohne Zusatz von Acetatpuffer angesetzt. Da Eichreihen mit Acetatpuffer jedoch zu ca. 3% niedrigeren Messwerten führen als Eichreihen ohne Pufferzusatz, empfiehlt es sich ggf. der Probenmatrix entsprechend auch Acetatpuffer-Lösung zuzusetzen, wodurch sich das oben angeführte Pipettierschema ergibt.
- Alle Kaliumcyanid-Abfälle müssen gesammelt und getrennt entsorgt werden. Die Abfälle müssen neutralisiert werden (mit 2 M NaOH vorsichtig von pH 2 auf pH 10 einstellen).

2.6 Literatur

SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. & R. MARGESIN (1993): Bodenbiologische Arbeitsmethoden. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 390 S.

3 Bestimmung der Aktivität der Protease

3.1 Prinzip

Zur Messung der Protease-Aktivität wird eine 2%ige Casein-Substratsuspension zur jeweiligen Bodenprobe hinzugefügt. Nach der zweistündigen Inkubation bei 50 °C werden durch die Zugabe von Trichloressigsäure die gebildeten Aminosäuren extrahiert und das überschüssige Substrat gefällt. Die freigesetzten aromatischen Aminosäuren können nach der Färbung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz kolorimetrisch im Photometer bestimmt werden. Diese Methode basiert auf einer Beschreibung von LADD UND BUTLER (1972).

3.2 Material und Geräte

- Kulturröhrchen (für Einwaage, Anfärbung und Eichreihe)
- 50 mm Filtertrichter
- 9 mm oder 11 mm Faltenfilter
- kleine Reagenzgläser (für Filtrat und Eichreihe)
- Erlenmeyerkolben für die Eichreihe

- Magnetrührer mit Heizplatte und Temperaturfühler
- Vortex
- Schüttelwasserbad
- Photometer

Herstellung der Lösungen

Haltbare Lösungen, die bereits am Vortag herstellbar sind:

0,1 M Natriumhydroxid-Lösung

Durch 1:10 Verdünnung aus 1 M Natriumhydroxid-Lösung herstellen, d. h. 100 ml der 1 M NaOH im 1 l Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke auffüllen.

Für die Alkalireagenz:

Lösung 1: 0,47 M Natriumcarbonat-Lösung:

125,09 g Natriumcarbonat * 10 H₂O (MG: 286,14 g/mol) werden in einen 1 l Messkolben eingewogen und in 60 ml 0,1 M Natriumhydroxidlösung und 600 ml deionisiertem Wasser

gelöst. Anschließend wird bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung ist einige Wochen im Kühlschrank haltbar.

Lösung 2: 20 mM Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat-Lösung:

1,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (MG: 249,68 g/mol) werden in einem 250 ml Messkolben mit etwas deionisiertem Wasser gelöst und dann bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Im Kühlschrank ist die Lösung ca. zwei Wochen haltbar.

Lösung 3: 35 mM Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat-Lösung:

2,5 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (MG: 282,23 g/mol) werden in einem 250 ml Messkolben mit etwas deionisiertem Wasser gelöst und dann weiter bis zur Marke aufgefüllt. Im Kühlschrank ist die Lösung ca. zwei Wochen haltbar.

1 M Salzsäure:

Diese Lösung wird zur pH-Einstellung genutzt. Entweder man bezieht bereits 1 M HCl aus dem Fachhandel bzw. stellt diese aus 37%iger HCl her. Hierfür in einem 1 l Messkolben etwa 500 ml deionisiertes Wasser vorlegen und dann 16 ml 37%ige HCl dazupipettieren (Abzug!). Anschließend mit deionisiertem Wasser bis zur Marke auffüllen.

0,05 M Trispuffer-Lösung (pH 8,1):

6,06 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (MG: 121,14 g/mol) werden in 800 ml deionisiertem Wasser in einem großen Becherglas gelöst. Der pH-Wert von 8,1 wird mittels 1 M Salzsäure eingestellt. (Man benötigt ca. 20-25 ml der 1 M HCl). Anschließend füllt man mit deionisiertem Wasser auf 1 l auf. Im Kühlschrank lässt sich die Lösung längere Zeit aufbewahren.

Tyrosin-Stammlösung (250 µg/ml)(für Eichreihe):

0,05 g L-Tyrosin (MG: 181,19 g/mol) in einen 100 ml Messkolben einwiegen und 80 ml 0,05 M Trispuffer hinzufügen. Diese Suspension muss unter Rühren auf ca. 50 °C erwärmt werden, damit sich das Tyrosin löst. Nach dem Abkühlen mit 0,05 M Trispuffer auffüllen. Diese Lösung ist im Kühlschrank ca. 14 Tage haltbar.

Täglich frisch herzustellende Lösungen:

2%ige (w/v) Casein-Substratlösung:

8,0 g Casein werden im Becherglas mit 400 ml 0,05 M Trispuffer (Messzylinder) versetzt und unter Rühren auf der Heizplatte bei 50 °C (Temperaturfühler verwenden!) gelöst.

0,92 M Trichloressigsäure (TCA):

75 g TCA (CCl_3COOH) (MG: 163,40 g/mol) in einem 500 ml Messkolben zunächst mit etwas deionisiertem Wasser lösen und auf 500 ml bis zur Marke mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die 0,92 M TCA-Lösung entspricht einer 15%igen TCA-Lösung.

Alkalireagenz:

Dieses Reagenz, welches täglich frisch hergestellt werden muss, setzt sich aus drei verschiedenen Lösungen zusammen, die miteinander vermischt werden:

- 500 ml 0,47 M Natriumcarbonat-Lösung (s. o.)
- +10 ml 20 mM Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat-Lösung (s. o.)
- +10 ml 35 mM Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat-Lösung (s. o.)

Folin-Ciocalteu-Reagenz:

Da man nur 350 ml für 20 Bodenproben (bei 20*2 Vollproben und 20*1 Leerprobe, also insgesamt 60 Proben) braucht, setzt man zweimal 200 ml an (es gibt keinen 400 ml Messkolben). Dafür werden 20 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (Abzug!) in einen 200 ml Messkolben pipettiert und anschließend mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

3.3 Ausführung und Bestimmung

Die Lösungen sollten auf Raumtemperatur gebracht werden.

Der <2 mm gesiebte Boden sollte, falls er gefroren vorliegt, zuvor zwei Tage im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut und gelagert werden. Am besten taut man nur die für alle Enzymmessungen benötigte Probenmenge auf und behält eine Reserve bei dauerhaft -20°C.

In die Kulturröhrchen werden 0,3 g naturfeuchter Boden (je Boden 2 parallele Vollproben sowie 1 Leerprobe) eingewogen. Nun gibt man zu jedem Kulturröhrchen 5 ml 0,05 M Trispuffer (pH 8,1) und zu den Vollproben zusätzlich 5 ml der erwärmten 2%igen Casein-

Substratlösung. Die Röhren werden mit Schraubkappen verschlossen, kurz auf dem Vortex durchmischt und daraufhin für 2 h bei 50 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation fügt man auch zu den Leerproben je 5 ml der erwärmten 2%igen Casein-Substratlösung hinzu. Alle Proben werden dann mit 5 ml 0,92 M Trichloressigsäure versetzt und gevortext. Es bilden sich weiße flockige Ausfällungen, die über Faltenfilter in kleine Reagenzgläser abfiltriert werden. Man entnimmt 5 ml des Filtrats und überführt sie in neue Kulturröhren, in denen sich bereits 7,5 ml Alkalireagenz befinden. 5 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz kommen dann zu allen Röhren dazu und werden danach kurz auf dem Vortex geschüttelt.

Bei kalkreichen Böden bildet sich eventuell ein Niederschlag. In diesem Fall werden die entsprechenden Lösungen nochmals 1 h nach Folin-Zugabe filtriert. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Herstellung der Eichreihe

Für die Herstellung der Eichreihen werden die Lösungen, wie in Tabelle 7 aufgelistet, in 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Es ist wichtig die Reihenfolge der Zugabe (Tyrosinlösung • Trispuffer • Casein-Substratlösung • TCA -Lösung) einzuhalten, sonst könnte die Bildung der Präzipitation unvollständig sein.

Tyrosinlösung [ml]	0,05 M Trispuffer [ml]	2%ige Casein-Substratlösung [ml]	0,92 M TCA-Lösung [ml]
0	5	5	5
0,125	4,875	5	5
0,25	4,75	5	5
0,5	4,5	5	5
1	4	5	5
----- evtl. 2	3	5	5
evtl. 3	2	5	5

Tab. 7: Herstellung der Eichreihe für die Protease-Aktivität

Es ergeben sich folgende Konzentrationen als Messpunkte:

0 - 62,5 – 125 – 250 – 500 (– 1000 – 1500) [µg] Tyrosin/ Ansatz.

Anschließend wird weiter verfahren, wie bei der Probenbehandlung beschrieben: Die weiße flockige Ausfällung wird in kleine Reagenzgläser abfiltriert. Für die Farbreaktion werden

daraufhin 5 ml der Filtrate in Kulturröhrchen übertragen (7,5 ml Alkalireagenz vorlegen) und 5 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz zugesetzt. Hinterher wird kurz auf dem Vortex geschüttelt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Messung:

Genau 90 min nach Zugabe der Folin-Ciocalteu-Reagenz wird der blaugraue Farbkomplex photometrisch bei 700 nm gemessen (Programm Protease). Der Farbkomplex ist ca. weitere 90 min stabil.

3.4 Berechnung der Ergebnisse

(Probe) x 100

$$\text{EW x TS[\%]} = [\mu\text{g Tyrosin}/(\text{g TS x 2 h})]$$

Tyrosin	Tyrosinäquivalent
Probe	[μg Tyrosin/Ansatz]
EW	Einwaage an feldfrischem Boden [g]
100/TS[%]	Umrechnungsfaktor auf Trockenboden

Abschließend muss vom Mittelwert der jeweiligen Vollproben der Messwert der Leerproben subtrahiert werden.

3.5 Anmerkungen

- Proteasen gehören zu den instabileren Enzymen und sollten daher bei einer Reihenanalyse möglichst schnell gemessen werden.
- Pro Analysentag lassen sich etwa 20 Bodenproben (bei 2 Vollproben und 1 Leerprobe also insgesamt 60 Proben) bearbeiten.
- Erhöht man die Einwaage (auf bis zu 1 g) aufgrund sehr niedriger Aktivität, sollten alle Proben mit derselben Einwaage analysiert werden, da es ansonsten zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann.
- Bei zu hoher Enzymaktivität ist es möglich die Filtrate mit 0,05 M Trispuffer (pH 8,1) zu verdünnen, oder die Inkubationszeit von zwei auf eine Stunde zu reduzieren.
- Die Filtrate können bei 4 °C bis zu 5 h aufbewahrt werden.
- Die Abfälle sind halogenhaltig und sollten dementsprechend entsorgt werden, wobei eine Neutralisation nicht nötig ist.

3.6 Literatur

LADD, J. N. & J.H.A. BUTLER (1972): Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 4: 19-30.

SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. & R. MARGESIN (1993): *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 390 S.

4 Phospholipidfettsäuren (PLFA) – Bestimmung in Böden

4.1 Prinzip

Im Boden befindet sich eine Vielzahl an Lipiden. Nach einer Methode von Frostegård werden verschiedene Fraktionen isoliert und können dann quantifiziert werden. Die Bodenlipide werden mit einer Einphasenmischung aus Chloroform, Methanol und wässrigem Citratpuffer (sog. Bligh and Dyer-Reagenz) aus dem Boden extrahiert. Durch eine anschließende Phasentrennung werden sie isoliert und über Festphasenextraktion in neutrale, Glyco-, und Phospholipide aufgetrennt. Die Phospholipide werden dann durch eine alkalische Methanolyse in Fettsäuremethylester überführt, die mittels GC/FID bestimmt werden können.

4.2 Material und Geräte

- Pasteurpipetten
- Silica-Säulen für die Festphasenextraktion: 500 mg, 3 ml; Cat.no.:12102037 von Varian
- 25 ml und 10 ml Glaszentrifugenröhrchen
- 10 ml Glasröhrchen zum Einfrieren der Probenextrakte
- Apparatur zum Einengen der Proben und für die Methanolyse: Probenkonzentrator mit Heizblock (Techne sample concentrator DRI-BLOCK® DB·3D)
- Apparatur für die Lipidfraktionierung: Baker-System mit Vakuumpumpe und 10 ml Kölbchen zum Auffangen der Eluate
- Vortex

Herstellung der Lösungen

0,15 M Citratpuffer (pH 4):

31,52 g Citronensäure werden in 1 l Wasser gelöst und mit NaOH-Plätzchen (ca. 38 Plätzchen werden benötigt) auf pH 4 eingestellt. Der Puffer ist im Kühlschrank ca. 2 Monate haltbar, darf aber nicht geflockt sein, denn sonst werden die darin entstandenen Pilze bei der Analyse mitbestimmt.

Extraktionslösung (Bligh and Dyer-Reagenz):

Chloroform, Methanol und Citratpuffer werden im Verhältnis 1:2:0,8 (v/v/v) gemischt.

Aceton (für die Chromatographie)

Hexan-Chloroform-Lösung:

im Mischungsverhältnis 4:1 (v/v)

Methanol-Toluol-Lösung:

Im Mischungsverhältnis 1:1 (v/v)

0,2 M methanolische Kaliumhydroxid-Lösung

5,61 g KOH-Plättchen werden in 500 ml Methanol gelöst. Am Tag der Analyse herstellen, anschließend im Kühlschrank lagern, dort ist diese bei ca. 5 °C 1-2 Wochen haltbar.

1 M Essigsäure:

5,72 ml 100 %ige Essigsäure werden mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Interner Standard: Methylnondecanoat (C19:0), c= 230,8 µg/ml:

Zur Herstellung des internen Standards werden 5,770 mg Methylnondecanoat in 25 ml Isooctan gelöst.

Waschlösung für die Säulen:

Chloroform und Methanol werden im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt.

4.3 Ausführung und Bestimmung

Vorbereitungen zur Analyse

Die Reagenzgläser und sonstigen Glaswaren, die zur PLFA-Bestimmung benötigt werden, müssen unbedingt vor Gebrauch mit deionisiertem Wasser und anschließend mindestens zweimal mit Chloroform gespült werden. Zu diesem Zweck kann man die Multipipette nutzen, damit 2 x 1,75 ml Chloroform in die Reagenzgläser geben und mittels Vortex schütteln.

Einwaage

Nun wiegt man die Bodenproben ein. Es ist möglich gefrorenen Boden zu verwenden, wenn dieser zuvor gut homogenisiert und gesiebt wurde.

Bei humusreichen Böden werden 0,5 g und bei Mineralböden 1,5 g bis 2 g Boden in 25 ml Glaszentrifugenröhrchen eingewogen. Gleichzeitig werden vier Blindproben ohne Boden mitgeführt und der gleichen Prozedur unterworfen. (Von Pflanzenmaterial werden 0,15 g bis 0,3 g eingewogen.)

A) Lipidextraktion

Zu den Proben werden 1,5 ml Citratpuffer; 1,9 ml Chloroform; 3,8 ml Methanol und 2,0 ml Bligh and Dyer-Reagenz zugegeben und mit dem Vortex gut durchmischt. (*Anmerkung: In diesem Fall sind Citratpuffer, Chloroform und Methanol bereits als Bligh and Dyer Reagenz vermengt, daher werden zu den Proben insgesamt 9,2 ml Bligh and Dyer Reagenz gegeben.*)

Bei sehr wasserhaltigen Proben, z. B. Fraktionen ist der Wassergehalt einzubeziehen, d. h. dementsprechend weniger Citratpuffer hinzufügen.

Danach werden die Proben 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und alle 20 min mit dem Vortex durchmischt. Am Ende der Extraktionszeit werden die Proben nochmals gevortext und dann bei 2500 rpm 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues 25 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt und der Bodenrückstand mit 2,5 ml Bligh and Dyer-Reagenz gewaschen (vortexen, zentrifugieren (2500 rpm 10 min) und Überstand wie zuvor überführen).

Auch zur Blindprobe werden 2,5 ml Bligh and Dyer-Reagenz zugegeben.

Phasentrennung:

Zur Phasentrennung werden 3,1 ml Chloroform und 3,1 ml Citratpuffer zum Überstand zugegeben. Danach werden die Proben 1 min lang auf dem Vortex durchmischt und bei 2500 rpm 10 min zentrifugiert. Von der unteren organischen Phase wird ein definiertes Volumen im Bereich von 1 bis **3 ml** mit einer Kolbenhubpipette entnommen. Die entnommene organische Phase wird in ein 10 ml Glasröhrchen (vorher 1x mit 1,75 ml Chloroform spülen) überführt und im Stickstoffstrom bei 40 °C (37 °C) bis zur Trockne eingedampft (ca. 20 min). Die Gläschen sollten unter dem Stickstoffstrom mit Gummistopfen verschlossen werden, da der Inhalt sauerstoffempfindlich ist.

Die Röhrchen mit dem eingedampften Extrakt können nun bei -20 °C eingefroren und die Bestimmung am nächsten Tag fortgesetzt werden.

B) Lipidfraktionierung

Vor der Lipidfraktionierung müssen zuerst die dafür verwendeten Extraktionssäulen mit 2 x 1 ml Chloroform konditioniert (aktiviert) werden.

Der eingengte Extrakt vom Vortag wird in 300 µl Chloroform gelöst (Vortex) und mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgegeben. Danach werden die Glasröhrchen nochmals mit 2 x 300 µl Chloroform gespült. (es kann die gleiche Pasteurpipette für die 2 Parallelen verwendet werden).

Zuerst werden die neutralen Lipide mit 5 ml Chloroform, dann die Glycolipide mit 20 ml Aceton und zum Schluss die Phospholipide mit 5 ml Methanol von der Säule eluiert (Baker-System). Die ersten beiden Eluate werden verworfen, sofern man diese nicht anderweitig analysieren möchte. Das Methanol-Eluat wird in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Danach wird es unter dem Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockne eingedampft (ca. 45 min). Anschließend werden die Gläschen bereits unter dem Stickstoffstrom mit Gummistopfen verschlossen, da der Inhalt sauerstoffempfindlich ist.

Die gebrauchten Säulen werden zuerst mit 2 x 2 ml Waschlösung (Chloroform-Methanol-Lösung) und dann mit 2 x 1 ml Chloroform gespült. Sie können so eventuell wieder verwendet werden. Jedoch ist es besser immer wieder frische Säulen zu verwenden, da die Blindwerte mit jeder weiteren Benutzung zunehmen.

C) Alkalische Methanolyse

Zu den eingengten Proben werden jeweils 30 µl interner Standard zugegeben. Es hat sich bewährt, die Pipettenspitze auf 4-stelliger Feinwaage zu überprüfen, um gute Ergebnisse zu erzielen. Die Proben werden anschließend in 1 ml Methanol-Toluol-Lösung (1:1, v/v) gelöst (Vortex).

Dann werden die Proben mit 1 ml 0,2 M methanolischer KOH versetzt und 15 min bei 37 °C im Probenkonzentrator (oder Wasserbad) inkubiert.

Nach erfolgter Methanolyse werden 2 ml Hexan-Chloroform-Lösung; 0,3 ml 1 M Essigsäure und 2 ml deionisiertes Wasser zugefügt. Die Proben werden auf dem Vortex gut durchmischt und bei 2500 rpm 10 min zentrifugiert. Die obere organische Phase wird vom Zentrifugenröhrchen in ein neues 10 ml Glasröhrchen mit Hilfe einer Pasteurpipette überführt. Der wässrige Rückstand wird ein weiteres Mal mit 2 ml Hexan-Chloroform-Lösung versetzt, auf dem Vortex durchmischt, zentrifugiert und der organische Überstand in das 10 ml Glasröhrchen überführt.

Die organische Phase wird im Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockne eingedampft. (Gläschen wieder unter dem Stickstoffstrom mit Gummistopfen verschließen.) Das getrocknete Probenextrakt kann bis zur Messung bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert werden.

D) Messung

Für die Messung im Gaschromatographen wird der Probenextrakt in 100 µl Isooctan gelöst und in die Probenfläschchen (Vials) überführt.

Zusätzlich wird 1 Vial nur mit 100 µl Isooctan befüllt, 1 Vial nur mit 100 µl Bacmix und ein Vial mit 100 µl 4er Standard.

Messmethode GC:

Kapillarsäule: HP-5: Quervernetztes 5 % Phenyl-Methylsilikon, Ø=0,2 mm,
Film=0,33 µm, Länge= 50 m

Trärgas: Helium 5.0
Durchflussgeschwindigkeit: 250 KPa (= ca. 20 cm/s)

Temperaturprogramm: 70 °C; Haltezeit 2 min
Anstieg 30 °C/min bis 160 °C
Anstieg 3 °C/min bis 280 °C; Haltezeit 15 min

Injektortemperatur: 260 °C

Split: 30.0

Detektor: FID (Flammenionisations-Detektor); T= 280 °C

Gase Detektor: Synth. Luft 5.0 (Kohlenwasserstofffrei); 450,0 ml/min
Wasserstoff 5.0; 45,0 ml/min

4.4 Berechnung der Ergebnisse

$$c[\text{nmol/g}] = \frac{F_{\text{FM}} \cdot c_{\text{IS}} \cdot 2 \cdot 1000 \cdot 100}{EW \cdot TS \cdot F_{\text{IS}} \cdot MG_{\text{FM}}}$$

Korrektur durch den Blindwert:

$$c[\text{nmol/g}] = \frac{\left(\left(\frac{F_{\text{FM}} \cdot c_{\text{IS}} \cdot 2 \cdot 1000}{F_{\text{IS}} \cdot MG_{\text{FM}}} \right) - c_{\text{BW}} \right) \cdot 100}{EW \cdot TS}$$

F_{FM} Fläche des Fettsäuremethylester

MG_{FM} Molekulargewicht des Fettsäuremethylesters in $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

C_{IS} Konzentration des internen Standards in μg

F_{IS} Fläche des internen Standards

EW Bodeneinwaage in g

TS Trockensubstanz des Bodens in % (\rightarrow Faktor 100)

2 Umrechnungsfaktor für die Entnahme von **3 ml** aus 6 ml org. Phase bei der Phasentrennung nach der Extraktion

1000 Umrechnungsfaktor auf nmol

c_{BW} Konzentration des Blindwertes in nmol

4.5 Anmerkungen

- Die Bestimmung der Konzentration des Fettsäuremethylesters kann hier über den zugesetzten internen Standard erfolgen. Über Vorversuche wurde bestätigt, dass bei allen mit dieser Methode zu bestimmenden Fettsäuren das Verhältnis Fläche zu Konzentration annähernd gleich ist. Es ist somit unabhängig von der Art der Fettsäure. Außerdem wird durch die Konzentrationsberechnung über den internen Standard gleichzeitig die nicht vollständig ablaufende Methanolyse korrigiert.
- Bei hohen Konzentrationen an Phospholipiden im Boden kann es sinnvoll sein eine längere Extraktionszeit bis zu 4 h oder über Nacht zu wählen, um eine möglichst vollständige Extraktion zu gewährleisten. (FROSTEGÅRD et al. (1991))

4.6 Literatur

FROSTEGÅRD, A, TUNLID, A. & E. BÅÅTH (1991): Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14: 151-163.

MALOSSO, E., ENGLISH, L., HOPKINS, D. W. & A. G. O'DONNELL (2004): Use of ¹³C-labelled plant materials and ergosterol, PLFA and NLFA analyses to investigate organic matter decomposition in Antarctic soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36(1):165-175.

ZELLES, L. (1997): Phospholipid Fatty Acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35: 275-294.

5 Bestimmung der Potentiellen Nitrifikation

5.1 Prinzip

Für diese Methodenbeschreibung wurde eine Vorschrift von BERG UND ROSSWALL (1985) modifiziert. Über einen Inkubationsversuch wird der Abbau von Ammoniumsulfat, das als Substrat dient, bzw. das entstehende Nitrit bestimmt. Um eine Oxidation von Nitrit zu verhindern, gibt man Natriumchlorat als Hemmstoff zu.

5.2 Material und Geräte

- Kulturröhrchen (für Einwaage)
- 50 mm Filtertrichter
- 9 mm oder 11 mm Faltenfilter
- kleine Reagenzgläser (für Filtrat)
- große Reagenzgläser (für Anfärbung und Eichreihe)
- 6 x 100 ml Messkolben (für Eichreihe)

- Vortex
- Schüttelwasserbad
- Photometer

Herstellung der Lösungen

10 mM Ammoniumsulfat-Lösung:

1,3214 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MG: 132,14 g/mol) mit deionisiertem Wasser im 1 l Messkolben zu 1000 ml lösen. Die Lösung ist längere Zeit haltbar.

1 mM Ammoniumsulfat -Lösung:

Die 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wird 1:10 verdünnt, d. h. 100 ml der 10 mM Ammoniumsulfat-Lösung werden im 1 l Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung muss jeden Tag frisch hergestellt werden

1,5 M Natriumchlorat-Lösung:

15,97 g NaClO₃ (MG: 106,44 g/mol) mit deionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Die Lösung ist im Kühlschrank längere Zeit haltbar.

2 M Kaliumchlorid-Extraktionslösung:

149,12 g Kaliumchlorid (MG: 74,56 g/mol) werden mit deionisiertem Wasser zu 1000 ml gelöst. Die Lösung ist längere Zeit haltbar.

0,19 M Ammoniumchlorid-Puffer (pH 8,5):

10,0 g NH₄Cl (MG: 53,49 g/mol) werden in ein großes Becherglas eingewogen und 900 ml deionisiertes Wasser werden zugegeben. Man stellt einen pH-Wert von 8,5 mittels 25%iger Ammoniaklösung ein (Abzug!). Man benötigt ca. 1,2 ml. Die Lösung in einen 1 l Messkolben umfüllen und bis zur Marke mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die Lösung ist im Kühlschrank längere Zeit haltbar.

Farbreagenz:

1,0 g Sulfanilamid (MG: 172,21 g/mol) und 0,05 g N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid (MG: 259,18 g/mol) werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit ca. 75 ml deionisiertem Wasser versetzt. 10 ml Phosphorsäure (85%ig) werden hinzupipettiert. Die Lösung muss unter dem laufendem Wasserhahn oder im Wasserbad abgekühlt werden. Anschließend füllt man auf 100 ml mit deionisiertem Wasser auf. Die Lösung muss farblos sein und täglich frisch hergestellt werden.

Eichreihen-Stammlösung (1 mg N/ml):

4,9257 g Natriumnitrit (NaNO₂;MG: 69,00 g/mol) werden in 1 l deionisiertem Wasser gelöst.

Eichreihen-Gebrauchslösung (0,01 mg N/ml):

Die Stammlösung wird 1:100 verdünnt, d. h. 1 ml Stammlösung auf 100 ml im Messkolben mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

5.3 Ausführung und Bestimmung

Die Lösungen sollten alle auf Raumtemperatur gebracht werden.

Der <2 mm gesiebte Boden sollte, falls er gefroren vorliegt, zuvor zwei Tage im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut und gelagert werden. Die Proben können bis zu 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, ansonsten müssen sie wieder bei -20°C eingefroren werden. Am besten taut man nur die für alle Messungen benötigte Probenmenge auf und behält eine Reserve bei dauerhaft -20°C.

Es werden 5 g naturfeuchter Boden eingewogen. Je Bodenprobe werden 2 Parallelen (Vollproben) angesetzt. Man gibt nun jeweils 20 ml 1 mM (NH₄)₂SO₄-Lösung als Substrat und 0,1ml 1,5 M Natriumchloratlösung dazu.

Die Röhren werden mit Schraubkappen verschlossen und 5 h im Wasserbad liegend bei 25 °C schüttelnd inkubiert. Um einen Wassereintritt in die Probe zu vermeiden, sollten die Röhren nicht direkt im Wasser liegen, sondern oberhalb der Wasseroberfläche. Daher muss das Wasserbad auf eine Temperatur von 27 °C eingestellt werden, um über der Wasseroberfläche die benötigten 25 °C zu erreichen.

Während die Vollproben inkubieren, werden die Leerproben eingewogen und diesen (am Ende der Inkubation der Vollproben) 20 ml 1 mM (NH₄)₂SO₄-Lösung und 0,1 ml 1,5 M Natriumchloratlösung zugefügt. Nun versetzt man alle Proben (Voll- und Leerproben) mit 5 ml 2 M Kaliumchlorid-Extraktionslösung und schüttelt kurz von Hand. Danach werden diese durch Faltenfilter in kleine Reagenzgläser abfiltriert (Vorsicht wegen Überlaufen!).

5 ml des Filtrates werden dann in ein großes Reagenzglas pipettiert. Man fügt 3 ml 0,19 M Ammoniumchlorid-Puffer hinzu. Anschließend werden alle Proben mit 2 ml Farbreagenz versetzt und auf dem Vortex geschüttelt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Herstellung der Eichreihen

Für die Eichreihe werden jeweils 0, 2, 4, 6, 8 und 10 ml der Gebrauchslösung in einen 100 ml Messkolben gegeben und mit 20 ml Kaliumchloridlösung versetzt. Dann füllt man auf 100 ml mit deionisiertem Wasser auf (siehe Tab. 8).

Gebrauchslösung (0,01mg N/ml) [ml]	2 M KCl-Extraktionslösung [ml]	H ₂ O dest. [ml]
0	20	80
2	20	78
4	20	76
6	20	74
8	20	72
10	20	70

Tab. 8: Herstellung der Eichreihe für die potentielle Nitrifikation

Die N-Standards haben die Konzentrationen: **0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 und 1,0 [µg] N/ml.**

Anschließend wird weiter verfahren, wie bei der Probenbehandlung beschrieben: Je 5 ml N-Standard werden dann in ein großes Reagenzglas pipettiert, mit 3 ml 0,19 M Ammoniumchlorid-Puffer sowie 2 ml Farbreagenz versetzt und auf dem Vortex geschüttelt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Messung

Nach 15 min sollte die photometrische Messung der Proben erfolgen. Es wird bei 520 nm (Programm: POTNI) gemessen. Der rot-violette Farbkomplex ist bis zu 4 h stabil.

5.4 Berechnung der Ergebnisse

$$\frac{(VP - LP) \cdot 25,1 \cdot 1000 \cdot 100}{EW \cdot 5 \cdot TS} = [ngN / (gBoden - TS \cdot 5h)]$$

VP Vollprobe [µg N/ml]

LP Leerprobe [µg N/ml]

25,1 Extraktionsvolumen [ml]

EW Einwaage an feldfrischem Boden [g]

1000 Umrechnungsfaktor von [µg] auf [ng]

5 Filtrataliquot [ml]

100/TS [%] Umrechnung auf Trockenboden

5.5 Anmerkungen

- Pro Analysentag lassen sich etwa 20 Bodenproben (bei 2 Vollproben und 1 Leerprobe also insgesamt 60 Proben) bearbeiten.
- Sollte bereits die Leerprobe nach Ammoniumsulfatzugabe eine rosa Färbung aufweisen, deutet dies darauf hin, dass nicht genügend Natriumchlorat-Lösung zur Stoppung der chemoautotrophen Oxidation von NO_2^- zu NO_3^- vorlag. In diesem Fall könnte eine Erhöhung der Natriumchlorat-Zugabe angezeigt sein, z. B. von 0,1 ml auf 0,2 ml. Diesen Umstand dann aber bei der Berechnung mit kalkulieren!
- Die Eichreihe muss nicht mit Ammoniumsulfatlösung (wie die Proben) angesetzt werden, sie kann mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ unter Zusatz von KCl-Lösung versetzt werden. Die Extinktion zeigt keine Unterschiede zwischen Eichreihe mit oder ohne Ammoniumsulfatlösung.

5.6 Literatur

BERG, P. & T. ROSSWALL (1985): Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two swedish arable soils. *Biology and Fertility of Soils* 1: 131-140.

SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. & R. MARGESIN (1993): *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 390 S.

6 Bestimmung des Ninhydrin-reaktiven Stickstoff nach Fumigation-Extraktion

6.1 Prinzip

Bodenproben werden mit Chloroform fumigiert, um die mikrobielle Biomasse abzutöten. Anschließend erfolgt eine Extraktion der organischen N-Verbindungen mit Kaliumchloridlösung. Ninhydrin bildet mit Molekülen, die •-Amino-Stickstoff enthalten, wie z. B. Aminosäuren oder Proteinen, sowie mit Ammonium einen violetten Farbkomplex. Somit kann nach der Extraktion eine photometrische Bestimmung des Ninhydrin-reaktiven Biomasse N erfolgen.

Die mikrobielle Biomasse ist Indikator für das Stoffwechsellpotential im Boden. Etwa 3-8% des organischen gebundenen Kohlenstoffs wird durch die mikrobielle Biomasse gestellt. Nach dem Absterben werden N, C, P etc. für die Pflanzen freigesetzt, eine weitere wichtige Eigenschaft der mikrobiellen Biomasse. Zur Quantifizierung des C_{mik} wird eine indirekte Bestimmung der Kohlenstoffmenge, die mittels Chloroform extrahiert werden kann, herangezogen. C_{mik} entspricht dem Mehr an Kohlenstoff, das nach Chloroformbegasung aus einer Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe extrahiert werden kann. Vorausgesetzt wird, dass alle Zellen gleich empfindlich gegenüber Chloroform sind und sofort in die Autolyse übergehen.

Statt des Kohlenstoffs wird der Einfachheit halber der extrahierbare Aminosäure-Stickstoff (sog. Ninhydrin-reaktiver N) gemessen. Mithilfe von Faktoren kann damit nach SCHINNER et. al. (1993) eine Umrechnung auf Biomasse-C bzw. Biomasse-N erfolgen.

6.2 Material und Geräte

- Kristallisierschalen (für Einwaage)
- Kulturröhrchen (für Einwaage)
- 50 mm Filtertrichter
- 9 mm oder 11 mm Faltenfilter
- kleine Reagenzgläser (für Filtrat und Verdünnung)
- große Reagenzgläser (für Anfärbung und Eichreihe)

- Vortex
- Magnetrührer
- Horizontalschüttler
- Photometer

Herstellung der Lösungen

2 M Kaliumchlorid-Extraktionslösung:

298,24 g Kaliumchlorid (MG: 74,56 g/mol) werden mit ca. 1800 ml deionisiertem Wasser in einem Becherglas gelöst, in einen 2 l Messkolben überführt und auf 2000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist längere Zeit haltbar.

0,4 M Natriumcitratlösung:

44,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (MG: 294,10 g/mol) werden zu 250 ml in deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung ist längere Zeit im Kühlschrank haltbar.

3 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0):

408,24 g Natriumacetat * 3 H₂O oder 246,09 g wasserfreies Natriumacetat (MG: 82,03 g/mol) werden in einem Becherglas in ca. 400 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 100 ml konzentrierter Essigsäure versetzt. Anschließend wird der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von weiterer konz. Essigsäure auf 5,0 eingestellt. Zum Schluss wird die Lösung in einen 1 l Messkolben umgefüllt und bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

0,1 M Salzsäure:

Durch 1:10 Verdünnung aus 1 M HCl herstellen, d. h. 100 ml 1 M HCl im 1 l Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke auffüllen.

50% (v/v) Ethanol:

50 ml 99%iges Ethanol werden mit 50 ml deionisiertem Wasser gemischt.

4%iges (w/v) Ninhydrin-Reagenz:

4 g Ninhydrin (MG: 178,15 g/mol) werden in 100 ml Ethylenglykolmonomethylether (auch als 2-Methoxyethanol bezeichnet) (**Vorsicht: toxisch!! Ansetzen der Lösung unter dem Abzug!!**) gelöst. Dieses Reagenz muss immer frisch hergestellt werden.

Chloroform, ethanolfrei

Zinnchlorid-Ninhydrin-Reagenzmischung:

0,160 g Zinn(II)chlorid-Dihydrat (MG: 225,63 g/mol) werden in einer Mischung aus 50 ml 3 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0), 100 ml 4%igem Ninhydrin-Reagenz und 50 ml deionisiertem Wasser in einem Becherglas gelöst. Diese Reagenzmischung immer frisch herstellen.

Eichreihen-Stammlösung (28 µg Ninhydrin-reaktiver-N/ml):

Es werden 0,262 g Leucin (MG: 131,18 g/mol) in 100 ml 0,1 M HCl gelöst und auf 1000 ml im 1 l Messkolben mit deionisiertem Wasser ergänzt.

Eichreihen-Gebrauchslösung (2,8 µg Ninhydrin-reaktiver-N/ml):

Diese wird durch 1:10 Verdünnung hergestellt, d. h. 10 ml der Stammlösung werden im 100 ml Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke ergänzt.

6.3 Ausführung und Bestimmung

Die Bodenproben müssen zwei Tage vor der Analyse aus dem Tiefkühlschrank entnommen und im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und ggf. noch gesiebt werden. Die Bestimmung sollte möglichst unverzüglich erfolgen und ein zweites Einfrieren vermieden werden. Am besten taut man nur die für alle Messungen benötigte Probenmenge auf und behält eine Reserve bei dauerhaft -20°C.

Je Probe werden 11 g naturfeuchtes Bodenmaterial in kleine Kristallisierschalen, die mit eingravierten Zahlen versehen sind, eingewogen und 24 h bei Raumtemperatur mit Chloroform fumigiert. Dazu einen Exsikkator mit feuchtem Filterpapier auslegen, auf den Boden ein Glasschälchen mit Siedesteinchen und ca. 50 ml Chloroform (Achtung: nur alkoholfreies Chloroform verwenden) stellen und die Schälchen mit den Proben auf dem Porzellanzwischenboden anordnen. Bei carbonatreichen Böden auch ein Schälchen mit Natronkalk mit in den Exsikkator stellen. Hierdurch wird entstehendes CO₂ sorbiert. Den Exsikkator dann vorsichtig mit dem Deckel verschließen (Achtung: Zum Fetten von Deckel und allen Schliffen nur Silicon-Paste verwenden, da alle anderen Fette nicht lösungsmittelbeständig sind.) und solange mit einer Pumpe, die für organische Lösungsmittel

geeignet ist, evakuieren, bis das Chloroform zu sieden beginnt (etwa 1 Minute sieden lassen). Dann den Glashahn schließen und den Exsikkator bei Raumtemperatur 24 h unter dem Abzug stehen lassen.

Die gesiebten Bodenproben werden bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt, da dann noch die entsprechenden Leerproben angesetzt werden.

Am nächsten Tag wird nach Abschluss der Inkubation der Exsikkator durch Öffnen des oberen Glashahnes belüftet. (Achtung: unter dem Abzug arbeiten!) Ca. 5-10 Mal muss dann evakuiert werden um das Chloroform zu entfernen, so dass kein Chloroformgeruch mehr feststellbar ist (Geruchsprobe!).

Für die Extraktion werden jeweils 5 g der fumigierten (2 Vollproben) bzw. der unfumigierten Bodenproben (Leerproben) in Kulturröhrchen eingewogen, mit 20 ml 2 M Kaliumchlorid-Extraktionslösung versetzt und 30 min auf dem Rotationsschüttler geschüttelt.

Anschließend werden alle Proben durch Faltenfilter abfiltriert. Für die Bestimmung des Ninhydrin-reaktiven Stickstoffs werden in einem Reagenzglas

- 1,0 ml Filtrat mit
- 1,0 ml H₂O_{dest.} zu 2ml ergänzt,
- 0,5 ml 0,4 M Natriumcitrat-Lösung zugesetzt und der Ansatz kurz gevortext, bevor dann noch
- 2,0 ml Zinnchlorid-Ninhydrin-Reagenzmischung zugegeben und nochmals gevortext wird.

Im vorliegenden Projekt wurde an dieser Stelle wie folgt verfahren (siehe auch 6. 5 Anmerkungen):

Anschließend werden alle Proben durch Faltenfilter abfiltriert. Daraufhin werden jeweils 1 ml des Filtrates in kleine Reagenzgläser überführt und 9 ml deionisiertes Wasser zugefügt (entspricht einer 1:10 Verdünnung). Für die Bestimmung des Ninhydrin-reaktiven Stickstoffs werden in einem Reagenzglas

- 2,0 ml des verdünnten Filtrats mit
- 0,5 ml 0,4 M Natriumcitrat-Lösung vermischt und der Ansatz kurz gevortext, bevor dann noch
- 2,0 ml Zinnchlorid-Ninhydrin-Reagenzmischung zugegeben und nochmals gevortext wird.

Alle Reagenzgläser werden dann mit Kappen verschlossen und für 30 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. (Achtung: Das Wasserbad benötigt ca. 1 h, um eine Temperatur von 100 °C zu erreichen!) Nachdem die Proben kurz in einem Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt wurden, werden jeder Probe 5,0 ml 50 %iges Ethanol zugesetzt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Herstellung der Eichreihe:

Für die Erstellung der Eichwerte wird wie folgt in große Reagenzgläser pipettiert:

Leucin-Gebrauchslösung (2,8 µg Ninhydrin-reaktiver-N/ml) [ml]	H ₂ O _{dest.} [ml]
0	2,00
0,25	1,75
0,50	1,50
1,00	1,00
1,50	0,50
2,00	0

Tab. 9: Herstellung der Eichreihe für die Bestimmung des ninhydrin-reaktiven N

Es ergeben sich dementsprechend die Eichpunkte:

0 – 0,70 – 1,40 – 2,80 – 4,20 und 5,60 [µg] Ninhydrin-reaktiver N/Ansatz.

Anschließend wird weiter verfahren, wie bei der Probenbehandlung beschrieben: Jeder Probe werden

- 0,5 ml 0,4 M Natriumcitrat-Lösung zugesetzt, kurz gevortext, danach
- 2,0 ml Zinnchlorid-Ninhydrin-Reagenzmischung zugefügt und nochmals gevortext.

Die Reagenzgläser werden dann mit Kappen verschlossen und für 30 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach kurzem Abkühlen in einem Wasserbad auf Raumtemperatur wird jeder Probe abschließend noch 5 ml 50%iges Ethanol zugesetzt. Die Messung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

Messung:

Die photometrische Messung bei 570 nm (Programm: NINHYD) muss innerhalb von einer Stunde erfolgen, da der violette Farbkomplex nicht länger stabil ist.

6.4 Berechnung der Ergebnisse

$$\frac{(\text{Probe}) \times 20 \times 100}{\text{EW} \times 1,0 \times \text{TS}[\%]} = [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver-N/g TS}]$$

Durch die Verdünnung des Filtrats ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{(\text{Probe}) \times 20 \times 10 \times 100}{\text{EW} \times 2,0 \times \text{TS}[\%]} = [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver-N/g TS}]$$

Probe	Probe [μg Ninhydrin-reaktiver N/Ansatz]
20	Extraktionsvolumen [ml]
1,0 bzw. 2,0	Filtrataliquot [ml]
EW	Einwaage an feldfrischem Boden [g]
100/TS [%]	Umrechnung auf Trockenboden
10	Verdünnungsfaktor

Zum Schluss muss vom Mittelwert der Vollproben der Messwert der Leerproben abgezogen werden.

Des weiteren kann nach *Schinner et al.* (1993) eine Umrechnung auf Biomasse-C bzw. Biomasse-N erfolgen. Dabei gilt:

$$\text{Biomasse-C } [\mu\text{g/g TS}] = 21 \times [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver-N/g TS}]$$

$$\text{Biomasse-N } [\mu\text{g/g TS}] = 3,1 \times [\mu\text{g Ninhydrin-reaktiver-N/g TS}]$$

6.5 Anmerkungen

- Pro Analysentag lassen sich etwa 20 Bodenproben (bei 2 Vollproben und 1 Leerprobe also insgesamt 60 Proben) bearbeiten.
- Leucin hat die Summenformel $C_8H_{13}NO_2$, d. h. 131,18 g/mol Leucin entsprechen 14,006 g/mol Stickstoff.
- In der Originalvorschrift in dem Buch „Bodenbiologische Arbeitsmethoden“ wird eine Inkubationszeit von 10 Tagen bei 25 °C angegeben.
- Die Filtrate sind im Kühlschrank auch über Nacht haltbar und der Ninhydrin-reaktive Stickstoff kann dann auch am nächsten Tag bestimmt werden.
- 1,0 ml Filtrat ist für Waldböden unter Streu und Grünland ausreichend, bei Ackerböden sollten 2,0 ml Filtrat und somit kein weiteres deionisiertes Wasser verwendet werden, bei Nadelstreu reichen hingegen schon 0,1 ml Filtrat aus, die dann mit 1,9 ml $H_2O_{dest.}$ entsprechend zu 2 ml ergänzt werden müssen.
- *Jørgensen* (1995) empfiehlt zur Umrechnung auf Biomasse-C: für Böden mit $pH > 5,0$ einen Faktor von 22,0 und für Böden mit $pH \leq 5,0$ einen Faktor von 35,3.
- Vergleichswerte aus der Literatur:
Jørgensen (1995) 110 verschiedene Böden 1,8 bis 139,2 [μg Ninhydrin-reaktiver N/g TS]; *Kandeler et al.* (1999) verschiedene Böden Bad Lauchstädt, 0-20 cm, 2,4 bis 10,3 [μg Ninhydrin-reaktiver N/g TS]
- Alle Ethylenglycolmonomethylether-Abfälle sowie die Chloroform-Reste müssen jeweils gesammelt und getrennt entsorgt werden.

6.6 Literatur

SCHINNER, F., ÖHLINGER, R., KANDELER, E. & R. MARGESIN (1993): Bodenbiologische Arbeitsmethoden. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 390 S.

7 ELISA – Nachweis von Bt-Toxin in Bodenproben

7.1 Prinzip

Mittels Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) wird Cry1Ab/Ac-Toxin nachgewiesen. Dabei kommt in diesem Fall zunächst nicht das QualiPlate Kit ® für Cry1Ab/Ac der Firma EnviroLogix® zum Einsatz, sondern ein Schnelltest der gleichen Firma. Das EnviroLogix® QuickStix™ Kit für Cry1Ab/Ac Leaf and Seed wurde entwickelt, um das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxine in Mais- und Baumwollblättern, Saatgut oder einzelnen Körnern auf den Niveaus, die typisch für genetisch modifizierte Pflanzen sind, zu ermitteln. In nachfolgender Methode wurde die Anwendung modifiziert, um einen Einsatz zur Untersuchung von Bodenproben zu ermöglichen.

Mais- und Baumwollpflanzen, die genetisch mit dem Bt-Gen modifiziert wurden, zeigen Bt-Endotoxine in ihrem Gewebe. Um diese Cry1Ab/Ac-Proteine mit den EnviroLogix® Cry1Ab/Ac QuickStix™ Strips zu ermitteln, müssen Gewebeproben extrahiert und die Endotoxine im Extraktionspuffer gelöst werden. Jeder QuickStix™ Strip hat am Ende eine saugfähige Auflage. Das Schutzband mit dem Pfeil zeigt das Ende des Streifens, welches in das PP-Reaktionsgefäß (PP-Tube) eingesetzt wird. Die Probe saugt sich am Membranstreifen herauf und wird an der Oberseite des Streifens in die größere Auflage absorbiert. Anhand des Streifenabschnitts zwischen dem Schutzband und der saugfähigen Auflage an der Oberseite des Streifens kann die Reaktion, wie im Kapitel 7.4 beschrieben gedeutet werden.

7.2 Material und Geräte

Die folgenden Materialien und Geräte sind im QuickStix™ Kit enthalten:

- 50 QuickStix™ Strips verpackt im Antikondensationsbeutel
- 50 sog. „Disposable Tissue Extractors“ bestehend aus Tubes (1,5 ml) mit Durchschlagsskappe und Pistill
- 2 Flaschen (je 16 ml) des Extraktionspuffers

Zusätzlich zum QuickStix™ Kit werden nachstehende Materialien und Geräte benötigt:

- Zeitmesser
- Pipette (500 µl) mit Pipettenspitzen (optional)
- evtl. Zahnstocher zum Abstützen der Strips

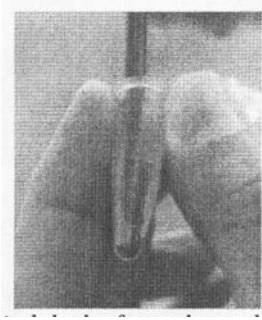
7.3 Ausführung und Bestimmung

Die QuickStix™ Strips und der Extraktionspuffer werden langsam auf Raumtemperatur gebracht (ca. 45 min). Erst wenn die Raumtemperatur erreicht ist, kann die benötigte Menge der QuickStix™ Strips entnommen werden. Nicht benötigte Strips verbleiben in der Packung, die nach der Entnahme sofort wieder verschlossen wird. Außerdem sollte das Verbiegen der Strips beim Herausnehmen vermieden werden.

Es werden 0,06 bis 0,1 g Boden in die Tubes (Probenbezeichnung mit wasserfestem Stift auf dem Tube kennzeichnen) eingewogen. Von Blatt- oder Wurzelproben werden ca. 5 bis 10 mm² (ca. 2 kreisförmige Gewebeproben durch Schließen der Kappe abreißen) bzw. ein einzelnes Samenkorn benötigt. Mithilfe des Pistills wird die Gewebeprobe durch kreisende Bewegungen (20-30 s) zerrieben bzw. das Samenkorn vorher mit einer Zange zerquetscht.

Danach wird der Probe die entsprechende Menge des Extraktionspuffers hinzugefügt:

- *bei Bodenproben oder Samenkörnern:* 0,5 ml Extraktionspuffer (entspricht etwa 20 Tropfen bzw. 500 µl mit Pipette)
- *bei Baumwollgewebe:* 0,35 ml Extraktionspuffer (15 Tropfen bzw. 350 µl)
- *bei Maisgewebe:* 0,25 ml Extraktionspuffer (10 Tropfen bzw. 250 µl)



Nach der Zugabe des Extraktionspuffers wird die Probe mit Hilfe des Pistills, wie in Abbildung 5 dargestellt, ca. 20 bis 30 s gemahlen bzw. wird die Kappe des Tubes fest verschlossen und 20 bis 30 s kräftig geschüttelt. Daraufhin das feste Material am Boden des Tubes absetzen lassen.

Abb. 5: Benutzung des „Tissue Extractors“

Anschließend wird die benötigte Menge der auf Raumtemperatur gebrachten QuickStix™ Strips dem Vorratsbehälter entnommen und in das jeweilige Tube mit dem „Proben-Extraktionspuffer-Gemisch“ eingesetzt (evtl. Zahnstocher zum Abstützen der Strips nutzen, wenn mehrere Proben auf einmal bearbeitet werden). Zur vollständigen Ausbildung muss die Versuchsanordnung 10 min stehen gelassen werden, dabei saugt die Probe sich am Membranstreifen herauf und entwickelt in jedem Fall eine Kontrolllinie und bei Vorhandensein der Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxine eine zweite rosafarbene Testlinie.

Die vorangegangenen Schritte werden für jede zu untersuchende Probe mit jeweils neuen „Disposable Tissue Extractors“ (Tube und Pistill) wiederholt, um eine Kontamination von Probe zu Probe, mit Pflanzengewebe, Flüssigkeiten oder Wegwerfteilen zu verhindern.

7.4 Interpretation der Ergebnisse

Die Entwicklung der Kontrolllinie innerhalb der 10 Minuten zeigt an, dass der QuickStix™ Strip richtig gearbeitet hat. Erscheint auf einem der Strips keine Kontrolllinie, sollte dieser ausgesondert und die Probe mit einem anderen Strip erneut getestet werden.

Wenn die Probe Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxin enthält, erscheint eine zweite Linie (Testlinie) auf dem Membranstreifen zwischen der Kontrolllinie und dem Schutzband innerhalb der 10 Minuten nach der Zugabe des Streifens. Die Resultate können dann als positiv für das Vorhandensein von Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxinen gedeutet werden. Jede deutlich erkennbare rosafarbene Testlinie gilt als positiv. Die Entwicklungszeit von 10 min sollte unbedingt eingehalten werden, zwar kann sich ein starkes positives Resultat bereits nach 2 min entwickeln, jedoch ist ein negatives Probenresultat erst nach Ablauf der vorgegebenen 10 min vertretbar.

Wenn nach den 10 min keine Testlinie erscheint, können die Resultate tatsächlich als negativ gedeutet werden. Dies bedeutet dann, dass die Probe weniger Cry1Ab/Ac Endotoxin enthält, als gewöhnlich in den Geweben von Bt-modifizierten Pflanzen vorhanden ist. **Achtung:** Ein negatives Resultat mit diesem Test schließt das Vorhandensein von genetisch modifizierten Materials in der Probe nicht immer unbedingt aus.

Falls der QuickStix™ Strip für die jeweilige Probe aufbewahrt werden soll, wird einfach der untere Abschnitt des Streifens, der durch das Pfeilklebeband umfasst wird abgeschnitten.

7.5 Anmerkungen

Kreuz-Reaktion

Die nachfolgenden Materialien wurden laut Herstellerangaben mit dem EnviroLogix® QuickStix™ Kit für Cry1Ab/Ac Leaf and Seed unter Verwendung der hierin spezifizierten Protokolle geprüft und haben keine falschen positiven Resultate auf dem ermittelbaren Niveaus verursacht (Konzentrationen in der Blattproben):

- Cry1C und Cry1F Proteine bei 100 ppm
- Herkömmlicher, StarLink®, Liberty Link® und Roundup Ready® Mais.
- Herkömmliche und Roundup Ready® Sojabohne.
- Herkömmliche und Roundup Ready® Zuckerrübe.
- Herkömmlicher und Roundup Ready® Raps.

Weitere Anmerkungen

- Das QuickStix™ Kit ist nur zum Feststellen des Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der Cry1Ab/Ac Bt-Endotoxine bestimmt und erhebt nicht den Anspruch einer quantitativen Bestimmung.
- Ähnlich wie bei allen anderen Tests, wird empfohlen, die Ergebnisse falls notwendig mit einer anderen Methode zu bestätigen.
- Ein negatives Resultat mit diesem QuickStix™ Kit bedeutet nicht, dass das geprüfte Gewebe nicht anders genetisch geändert worden ist.
- **Achtung:** ein starkes positives Resultat kann bereits nach 2 Minuten eintreten. Jedoch ist ein Probenresultat nicht eindeutig negativ, wenn nicht die vollen 10 Minuten bis zur Ausprägung der Testlinie abgewartet werden.
- Die Resultate, die durch den korrekten Gebrauch des QuickStix™ Kit erzeugt werden, reflektieren den Zustand der direkt geprüften Arbeitsprobe. Sollte bei richtiger Prüfung der Arbeitsprobe ein negatives Resultat erreicht werden, bedeutet dies nicht notwendigerweise, dass die entstehende Lage für den Parameter oder das Protein wirklich völlig negativ ist.
- Alle Bestandteile des QuickStix™ Kit sollten unbedingt vor extrem heißen oder kalten Temperaturen bewahrt, wenn diese nicht in Gebrauch sind. Das QuickStix™ Kit nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen bzw. im Fahrzeug belassen.

7.6 Literatur

HOPKINS, D. W. & E. G. GREGORICH (2003): Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science* 54: 793-800.

LYNCH, J. M., BENEDETTI, A., INSAM, H., NUTI, P., SMALLA, K., TORSVIK, V. & P. NANNIPIERI (2004): Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 40: 363-385.