

**Veränderungen in der
Zusammensetzung von
Bakterioplankton-
Gemeinschaften durch Inkubation mit
den Süßwasser Makrophyten
Iris pseudacorus und *Mentha aquatica***

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

zur Erlangung des Grades und Titels einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Dissertation

von

Annette Grathoff

geboren am 24.04.1980 in Nürnberg

tempus fugit

Erstprüfer: Prof. Dr. Tilmann Harder

Zweitprüferin: Dr. Luise Berthe-Corti

Tag der Disputation: 16.07.2009

Kurzfassung

Die limnischen aquatischen Makrophyten *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* führten in 7 Tage-Inkubationsansätzen zu qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Zusammensetzung einer Gemeinschaft planktonischer Teichwasserbakterien. Untersuchungen wurden Kultur-unabhängig durch Amplifikation bakterieller 16S rDNS durchgeführt. Gewinnung und Amplifikation bakterieller DNS erfolgte durch Filter PCR. Bei Analyse der Bandenprofile auf DGGE Gelen zeigten sich signifikante Veränderungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaft des Bakterioplanktons bei Inkubationsansätzen mit jeder der Pflanzen gegenüber der Nullkontrolle. Veränderungen gegenüber der Nullkontrolle waren sowohl anhand von neu gebildeten, als auch durch nicht mehr vorhandenen (deletierte) Banden zu sehen. Deletierte Banden zeigten Phylotypen des Teichwasserbakterioplankton an, welche spezifisch in Inkubationsansätzen mit Pflanzen abgestorben und lysiert waren. Neubildungen von Banden in Inkubationsversuchen mit steril aufgewachsenen Pflanzen deuteten auf in unbehandeltem Probenwasser nicht detektierbare Stadien. In mit Pflanzen inkubiertem Probenwasser wurden diese durch Sterilfiltrierung detektierbar. Außerdem zeigten Inkubationsversuche mit steril aufgewachsenen Pflanzen eine wichtige Bedeutung assoziierter Bakterien für eine antibakterielle Wirkung von *Iris pseudacorus*. Im Gegensatz dazu war die Elimination von Phylotypen des Probenwassers bei Inkubation steril aufgewachsener *Mentha aquatica* im Vergleich zu der von nicht steril aufgewachsenen Pflanzen nicht verschlechtert. Zwei Banden des Bakterioplanktons, welche in Gemeinschaftsprofilen des natürlichen Teichwassers vorkamen, wurden durch DNS-Sonden markiert. Diese Banden wurden in Inkubationsversuchen in Anwesenheit der Pflanzen pflanzenartspezifisch deletiert. Dadurch bestätigte sich die in Parallelversuchen mit beiden Pflanzenarten festgestellte pflanzenartspezifische Beeinflussung von Veränderungen der Gemeinschaftszusammensetzung des Bakterioplanktons im Probenwasser. In nur einem der durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Wirkung der Exsudate von *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica* in Abwesenheit der Pflanzen zeigten sich signifikante Veränderungen der Bandenmuster gegenüber der Nullkontrolle. Diese waren ebenfalls für die Pflanzenart in Inkubationsansätzen spezifisch. Demnach kam es in Anwesenheit der Pflanzen zur Abgabe von Stoffen, welche die Zusammensetzung des Bakterioplanktons in der Nähe beeinflussten. Die Wirksamkeit der Exsudate war allerdings abhängig von der Gemeinschaftszusammensetzung planktonischer Bakterien. Diese unterschied sich für verschiedene Entnahmezeitpunkte

des Probenwassers deutlich. Ein Inkubationsversuch mit Kulturen potentiell phytopathogener *Pseudomonas* spp. mit einem 10-fach Konzentrat der Exsudate von *Iris pseudacorus* wies auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirksamkeit abgegebener Wirkstoffe der Pflanze hin. Es kam zu einer signifikanten Wachstumshemmung von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* und *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Schlagwörter: Limnische aquatische Makrophyten, Gießwasser, Süßwasser-Bakterioplankton, DGGE Gemeinschaftsprofil, Filter-PCR, *Iris pseudacorus*, *Mentha aquatica*.

Abstract

The composition of the planktonic bacterial community affected by incubation with the aquatic macrophytes *Iris pseudacorus* and *Mentha aquatica*, respectively, was found to differ distinctly from that of the bacterioplankton in natural pondwater. Reductions concerning the amount of DNA-bands as well as additional DNA-bands compared to the uncultured pond water control occurred in samples of plant conditioned pondwater. Sampling and amplification of bacterial 16 S rDNA was conducted by filter PCR. Deleted DNA bands pointed to natural phylotypes of natural pondwater bacterioplankton, which died and were lysed specifically in presence of plants in incubation experiments. Additional bands potentially stemmed from cells, which were not detectable by sterile filtration due to entering states of starvation because of inappropriate living conditions. In presence of plants, those phylotypes became detectable. Experiments with aseptically cultured plants suggested the importance of associated bacteria of *Iris pseudacorus* for an antibacterial effect. In contrast, the ability of *Mentha aquatica* to eliminate phylotypes of pondwater was not affected negatively in experiments conducted with sterile compared to non-sterile plants. Two of the bands in bacterioplankton profiles that occurred in samples of natural pondwater were tracked using marker DNA. Deletion of recurring bands depended on the species of aquatic macrophyte used in incubation experiments. Parallel experiments with *Iris pseudacorus* and *Mentha aquatica* treatments also produced specific band deletions for each of the plant incubation assays as well as plant specific new bands. One of the conducted incubation experiments with plant exudates in absence of plants showed an impact on banding patterns of pondwater bacterioplankton. As well as for incubation experiments in the presence of plants, the effect of plant exudate-loaded water on phylotypes of the bacterioplankton community was specific for the plant species used in incubation assays. According to that, plants exuded substances, which affected the composition of planktonic bacteria in close proximity. Effectivity of exudates seemed to be depending on the bacterial community present in pondwater. Community composition varied distinctly between sampling times. Incubation experiments with potentially phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *phaseolicola* showed significant growth inhibition of 10 fold concentrated exudates from *Iris pseudacorus*. Results pointed to a concentration dependent effectiveness of exuded agents.

Keywords: freshwater aquatic makrophyte, wetland plant, irrigation water, planktonic freshwater bacteria, DGGE community profile, *Iris pseudacorus*, *Mentha aquatica*.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	III
Abstract	V
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
<hr/>	
1. Einleitung	10
1.1 Nutzung aquatischer Makrophyten zur Klärung von Gewässerverschmutzungen	10
1.2 Interaktion zwischen Makrophyten und Bakterien in der sie direkt umgebenden Umwelt	10
1.2.1 Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Makrophyten und Bakterien in limnischen Ökosystemen aus Untersuchungen zur Funktion von Pflanzenkläranlagen (constructed wetlands)	10
1.2.2 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in terrestrischen Lebensräumen	12
1.2.3 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in natürlichen aquatischen Lebensräumen	15
1.3 Zielstellung	19
1.4 Versuchsdesign	22
1.5 Versuchsobjekte	23
1.5.1 Allgemeine Auswahlgründe für Testpflanzen im gewählten Untersuchungsverfahren	23
1.5.2 Spezielle Auswahlkriterien und kurze Beschreibung der Testpflanzen	24
2. Material & Methoden	27
2.1 <i>Iris pseudacorus</i> und <i>Mentha aquatica</i>	27
2.2 Herkunft aller Teichwasserproben	28
2.3 Gewinnung von Wasserproben und Messung wasserchemischer Parameter	30
2.4 Verwendung von Gießwasser für Untersuchungen des Bakterioplankton-Gemeinschaftsprofils	31
2.4.1 Untersuchung des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton in Proben des Probenwasserteichs	31

2.4.2 Untersuchung von Veränderungen im natürlichen Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons bei Inkubation mit Pflanzen (Pflanzen-Versuche)	31
2.4.3 Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton durch Inkubation mit an pflanzlichen Exsudaten angereichertem Probenwasser (Sekundärmetaboliten-Versuche).....	36
2.5 Qualitative und quantitative Analysen des Bakterioplanktons im Probenwasser.....	37
2.5.1 Filterung des Probenwassers	37
2.5.2 Präparation und mikroskopische Betrachtung von Filtersegmenten zur quantitativen Analyse des Bakterioplanktons aus Inkubationsversuchen von Probenwasser mit Pflanzen	38
2.5.3 Amplifikation und gelgestützte Analyse der DNS für qualitative Analysen des Bakterioplanktons	38
2.5.4 Ausschneiden ausgewählter Banden und Re-Amplifikation der enthaltenen DNS zur Herstellung von DNS-Sonden und zur Sequenzanalyse	40
2.6 Untersuchung antibakterieller Effekte des PKW von <i>Iris pseudacorus</i>	43
2.7 Statistische Analyse	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Saisonaler Wandel der Zusammensetzung der Gemeinschaft planktonischer Bakterien in unbehandeltem Teichwasser	45
3.2 Qualitative und quantitative Charakterisierung von Bakterioplankton in Inkubationsansätzen von Teichwasser mit <i>Iris pseudacorus</i> und <i>Mentha aquatica</i>	47
3.2.1 Qualitative Charakterisierung des Bakterioplanktons in Inkubationsansätzen von Teichwasser mit wild aufgewachsenen Pflanzen im Jahresverlauf	47
3.2.2 Zelldichte in Proben von Bakterioplankton des Probenwassers bei Inkubation mit wild aufgewachsenen <i>I. pseudacorus</i> Pflanzen	62
3.3 Veränderungen im Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons durch Inkubation des Probenwassers mit von Pflanzen konditioniertem Probenwasser.....	62
3.4 Qualitative Charakterisierung der Bakterioplankton-Gemeinschaft in mit steril aufgewachsenen <i>Iris pseudacorus</i> bzw. <i>Mentha aquatica</i> - Pflanzen inkubiertem Probenwasser	75
3.5 Grobe taxonomische Einordnung der durch Inkubation mit Makrophyten beeinflussten planktonischen Bakterien im Probenwasser	83
3.5.1 Sequenzanalysen der DNS ausgeschnittener Banden.....	84
3.5.2 Amplifikation der DNS aus Proben von mit <i>Iris pseudacorus</i> inkubiertem Probenwasser mithilfe von <i>Pseudomonas</i> spezifischen Primern.....	87
3.6 Effekte von durch <i>Iris pseudacorus</i> -Inkubation potentiell an Wirkstoffen angereichertem PW auf das Wachstum phytopathogener Bakterien	93
4. Diskussion	94
4.1 Natürliche Variabilität der Zusammensetzung von Bakterioplankton	94

4.2 Einfluss von <i>Iris pseudacorus</i> bzw. <i>Mentha aquatica</i> auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft des Bakterioplanktons	95
4.2.1 Bandendeletionen in Pflanzen konditioniertem Probenwasser (PKW) gegenüber der Nullkontrolle	95
4.2.2 Bandenneubildungen in mit Pflanzen konditioniertem PW (PKW) gegenüber der Nullkontrolle.....	99
4.2.3 Unterschiedliche Mechanismen der Beeinflussung von Phylotypen des Bakterioplankton durch <i>I. pseudacorus</i> bzw. <i>M. aquatica</i>	104
4.2.4 Spezifizierung der durch Inkubation mit <i>I. pseudacorus</i> bzw. <i>M. aquatica</i> deletierten Banden.....	112
4.3 Effekt exsudierter Sekundärmetabolite (SM) von <i>Iris pseudacorus</i> bzw. <i>Mentha aquatica</i> auf das inkubierte Bakterioplankton und inkubierte Bakterien.....	115
4.4 Diskussion der Methoden.....	119
Literaturverzeichnis	126
5. Danksagung.....	139
6. Lebenslauf	142
ERKLÄRUNG	146
7. Anhang.....	147
7.1 Charakteristik des Probenwassers	147
7.2 DGGE Gele des Düngereperiments und der 3T Versuche.....	149
7.3 Abbildungen zu den in Kapitel 3 gezeigten Versuchen mit Angaben der zur Analyse verwendeten Banden.....	151
7.4 Abbildungen zu den in Kapitel 3 angesprochenen Markergelen zur Überprüfung von Bandenpositionen.....	163

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wurzellänge von <i>Iris pseudacorus</i> betrug mehr als 30 cm	24
Abb. 2: <i>Mentha aquatica</i> . Verschiedene Blattmorphologie von emers und submers wachsenden Stolonen	25
Abb. 3: Ort der Probenentnahme am Sammelteich	30
Abb. 4: Probenglas mit <i>Iris pseudacorus</i>	33
Abb. 5: Probenglas mit <i>Mentha aquatica</i>	34
Abb. 6: Aufbau mit Probengläsern der Inkubationsansätze.....	34
Abb. 7: Beispiel eines DGGE Gels zur Überprüfung der Amplikons	41
Abb. 8: Probenwasser2008-Gel.	46
Abb. 9: Dendrogramm des Probenwasser2008-Gels	47
Abb. 10: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris 1-Versuchs.	50
Abb. 11: Dendrogramm des Iris 1-Gels.....	51
Abb. 12: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 1-Versuchs.	52
Abb. 13: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris 2-Versuchs	53
Abb. 14: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris 2-Gels.....	54
Abb. 15: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris 3-Versuchs	55
Abb. 16: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris 3-Gels.....	56
Abb. 17: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 2-Versuchs.	58
Abb. 18: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris & Mentha 2-Gels.....	58
Abb. 19: Ausschnitt des DGGE Profils der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Mentha-Versuchs.....	59
Abb. 20: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Mentha-Gels	60
Abb. 21: Mittlere Bakterienzahl im Probenwasser eines 7T Inkubationsversuchs mit Iris.....	62
Abb. 22: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 1-SM-Versuchs.....	64
Abb. 23: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 1-Versuchs	65
Abb. 24: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris 2-SM-Versuchs.....	66
Abb. 25: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris 2-SM Gels	67
Abb. 26: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris 2-Versuchs	67
Abb. 27: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 2-SM-Versuchs.....	69

Abb. 28: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris & Mentha 2-SM-Gels	70
Abb. 29: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris & Mentha 2-Versuchs	70
Abb. 30: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Mentha-SM-Versuchs.....	72
Abb. 31: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Mentha-SM-Gels	73
Abb. 32: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Mentha-Versuchs	73
Abb. 33: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Iris Steril-Versuchs	77
Abb. 34: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Iris Steril-Gels.....	77
Abb. 35: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des Mentha-Versuchs	79
Abb. 36: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Mentha-Gels	80
Abb. 37: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Mentha-SM-Versuchs.....	82
Abb. 38: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des Mentha-SM-Gels	83
Abb. 39: Similaritätsmatrix der Sequenzen "Bande 2"	84
Abb. 40: Similaritätsmatrix der Sequenzen "Bande 1"	86
Abb. 41: Amplifikation von Proben des Iris 1-Versuchs mit <i>Pseudomonas</i>-spezifischen Primern	88
Abb. 42: Dendrogramme basierend auf den Ähnlichkeitsmatrizes der Bandenmuster der Proben in beiden Teilen des in Abb. 32 dargestellten Gels des Iris 1-Versuchs	89
Abb. 43: Gel der Amplifikation von PW 7T- und „Iris“-Proben des Iris & Mentha 2-Versuchs	91
Abb. 44: Dendrogramme basierend auf den Ähnlichkeitsmatrizes der Bandenmuster der Proben in beiden Teilen des in Abb. 40 dargestellten Gels zur Analyse der Bandenmuster von Iris-Proben des Iris & Mentha 2-Versuchs	92
Abb. 45: Fluoreszenzintensität der Bakterienansätze	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Benennung und Entnahme-Zeitpunkt von Wasserproben.....	31
Tab. 2: Überblick über die durchgeführten Pflanzeninkubationsversuche.....	35
Tab. 3: Überblick über die Versuche zur Beeinflussung planktonischer Bakterien	37
Tab. 4: Überblick über ausgebildete Banden in Pflanzenversuchen	61
Tab. 5: Überblick über ausgebildete Banden in Sekundärmetabolitenversuchen	74
Tab. 6: Überblick über ausgebildete Banden in Sterilversuchen.....	80
Tab. 7: Übereinstimmungen der Konsensussequenz "Bande 2"	85
Tab. 8: Übereinstimmungen der Konsensussequenz "Bande 1"	86
Tab. 9: Vorkommen und Deletion der wiederkehrenden Banden „Bande 1“ bzw. „Bande 2“ in Inkubationsversuchen	110
Tab. 10: Zusammenfassung der Zahl deletierter Banden in Sekundärmetaboliten-Versuchen im Vergleich zu den vorausgegangenen Pflanzen-Versuchen	118
Tab. 11: Zusammenfassung der relativen Übereinstimmung von „PW“ und „PKW“ Berücksichtigung des Anteils deletierter Banden an der Gesamtzahl von Banden in der Nullkontrolle und der Pflanzengröße	123
Tab. 12: Überblick über pH Wert und anorganische Nährstoffe des Probenwassers	147

Abkürzungsverzeichnis

16S rRNS	16 Svedberg messende – nicht-codierende ribosomale RNS der kleinen Ribosomenuntereinheit bei Procaryoten.
16S rDNS	Gen der 16S rRNS
Abb.	Abbildung
ANOSIM	Analyse der Übereinstimmung (<i>analysis of similarity</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare (<i>basepairs</i>)
CFB	<i>Cytophaga/Flavobacteria Bacteroidetes</i>
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (<i>denaturing gradient gelelectrophoresis</i>)
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (<i>dissolved organic carbon</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	Und andere (<i>et alii</i>)
Exp.	Experiment/ Experimente
IKW	Durch Inkubation mit <i>Iris pseudacorus</i> konditioniertes Probenwasser
ITS I	Internal Transcribed Spacer I; zwischen dem 16 S und 23 S rRNS-Gen
LAM	Limnische aquatische Makrophyten
MKW	Durch Inkubation mit <i>Mentha aquatica</i> konditioniertes Probenwasser
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGPR	Rhizobakterien, die das Pflanzenwachstum begünstigen (<i>plant-growth promoting rhizobacteria</i>)

PKA	Pflanzen Kläranlage
PKW	Durch Inkubation mit Pflanzen (<i>I. pseudacorus</i> und/ oder <i>M. aquatica</i>) Konditioniertes Probenwasser
PKW-W	Durch PKW inkubiertes Probenwasser (in Sekundärmetaboliten Tests)
PW	Probenwasser
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient; 1S = 10^{-13} sec)
St	DNS Standard als Positivkontrolle der PCR und als Positionsmarkierung für Banden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDTA (Puffer)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
TW	Teichwasser
VBNC	Wachstumsfähig, aber nicht kultivierbar (<i>viable but nonculturable</i>)

1 Einleitung

1.1 Nutzung aquatischer Makrophyten zur Klärung von Gewässerverschmutzungen

Bei der Selbstreinigung natürlicher Gewässer von organischen Verschmutzungen spielen Mikroorganismen aber auch aquatische Makrophyten (Angiospermen und Makroalgen) eine wichtige Rolle (Johnston, 1993; Wetzel, 1993). Die Nutzung von Pflanzen-unterstützten Abwasserreinigungssystemen begann bereits früh. Die historische Überlieferung reicht zurück bis zur ersten Verwendung von Feuchtgebieten zur Abwassereinleitung in China und Ägypten (Brix, 1995). Ab Beginn der 60er Jahre setzte die Pionierin der modernen Pflanzenkläranlagen (PKA), Käthe Seidel, ihre im Labor gewonnenen Erkenntnisse zur Reinigungswirkung höherer Pflanzen in den Bau von Wasseraufbereitungs-Anlagen im technischen Maßstab um (Seidel, 1966). Seither gibt es kontroverse Diskussionen, die sich um die Frage drehen, wie groß der Anteil der Pflanzen bei der Reinigung organischer Verschmutzungen im Wasser im Vergleich zur Abbauleistung aquatischer Mikroorganismen ist. Die Diskussion hier wiederzugeben, würde den Rahmen bei weitem sprengen. Stattdessen soll an dieser Stelle ein Zitat von Stottmeister (2003) die im Wesentlichen anerkannte Theorie zur multifaktoriellen Wirkungsweise von Biokläranlagen darstellen: *„Die aktive Reaktionszone von Pflanzenkläranlagen ist der Wurzelraum (Rhizosphäre). Dort finden physikochemische und biologische Prozesse statt, die durch die Interaktion von Pflanzen, Mikroorganismen, Bodenkörper und Schadstoffen induziert werden.“*. Pflanzen können einen (positiven) Einfluss auf Abbauleistungen von Bakterien haben (Moormann, 2001).

1.2 Interaktion zwischen Makrophyten und Bakterien in der sie direkt umgebenden Umwelt

1.2.1 Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Makrophyten und Bakterien in limnischen Ökosystemen aus Untersuchungen zur Funktion von Pflanzenkläranlagen (constructed wetlands)

Ergebnisse von Untersuchungen zur Rolle aquatischer Makrophyten für die Klärwirkung in Pflanzenkläranlagen (PKA) lassen vermuten, dass Pflanzen dort im Prinzip eine ähnliche Funktion erfüllen, wie ein Katalysator (Neemann, 2000).

Vergleichende Versuche mit emergenten Makrophyten wie z. B. Helophyten (Sumpfpflanzen) und gleich aufgebauten unbepflanzten Systemen zeigten eine verbesserte Reinigungswirkung bepflanzter Anlagen (Camacho *et al.*, 2007). Bei Versuchen mit verschiedenen Helophyten wurde eine signifikant größere Eliminierung von *Salmonella* (Rivera *et al.*, 1995; Hill & Sobsey, 2001), *Escherichia coli* und parasitischen Helminthen (Rivera *et al.*, 1995) in bepflanzten Systemen beobachtet. Da unumstritten ist, dass die Abbauleistung in Kläranlagen von Mikroorganismen bewirkt wird (Wetzel, 1993), ist es von Bedeutung, Interaktionen zwischen Makrophyten und Mikroorganismen zu verstehen. Wie bewirkt die Anwesenheit der Pflanze ein für Mikroorganismen vorteilhaftes Milieu?

Studien zeigten im Wesentlichen, a) dass Helophyten unmittelbar die Wurzeln umgebende sauerstoffhaltige Mikrozonon erzeugen (Reddy *et al.*, 1990; Wetzel, 1993; Sorrell & Armstrong, 1994; Brix, 1997; Vymazal *et al.*, 1998) und auf diese Weise der Produktion giftiger Stoffwechselprodukte durch Gärung entgegenwirken. b) dass Helophyten durch Exsudation (Cardenas, 1975; Moormann 2001) eine Reihe organischer Stoffe über die Wurzeln abgeben. Für den terrestrischen Lebensraum sind Beispiele erforscht (Kent & Triplett 2002; de Boer *et al.*, 2006), die zeigen, dass es eine Vielzahl von Mechanismen für eine solche Beeinflussung gibt (1.2.2). Weiterhin wird diskutiert, ob Pflanzen die Effektivität von PKA steigern, indem sie c) durch das Wurzelwerk physikalisch die Kolmatation (Verstockung) von Bodenfiltern verhindern. Außerdem dienen Pflanzen in PKA möglicherweise d) als Speicher von Kohlenstoff und Nährstoffen (Wetzel, 1993).

Über die Interaktion limnischer, aquatischer Makrophyten und emers wachsender Makrophyten wie Helophyten mit Bakterien in Rhizosphäre und umgebendem Wasser ist die Literatur lückenhaft. Aufgrund der breiten Anwendung in Pflanzenkläranlagen wurden Studien in erster Linie auf eine verbesserte Reinigungswirkung von bepflanzten Bodenfiltern gegenüber unbepflanzten Wasserreinigungssystemen ausgerichtet. Zahlreiche Mechanismen können zu einer Reduktion pathogener (und nicht-pathogener) Bakterien führen (1.2.2). Nachgewiesene antibakterielle Wirkungen von Helophyten für Pflanzenkläranlagen wurden nicht weiter spezifiziert (Wetzel, 1993; Brix, 1997; Tanner, 2001; Camacho *et al.*, 2007). Die Effektivität einer Bepflanzung wurde anhand der Eliminationsleistung bezüglich organischer Giftstoffe (Phenolverbindungen etc.) und bezüglich prokaryotischer Indikatororganismen für Abwasser (z. B. Coliforme, *Escherichia coli*, *Salmonella*) gemessen.

Um die Mechanismen, mit welchen Pflanzen in limnischen Ökosystemen mit Mikroorganismen interagieren, zu verstehen, sind Vergleiche mit besser erforschten Ökosystemen wie zum Beispiel terrestrischen Lebensräumen geeignet (1.2.2, 1.2.3.1).

Hier finden Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen in entscheidendem Maß an den Wurzeln der Pflanze im Boden statt. Dabei kann der Teil des Wassers im Boden temporär und lokal Schwankungen unterliegen. Im Gegensatz dazu ist das Medium, das aquatische Makrophyten direkt – vollständig oder zum entscheidenden Teil – umgibt das Wasser.

1.2.2 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in terrestrischen Lebensräumen

In terrestrischen Ökosystemen ist die Erforschung der Interaktionen zwischen Rhizosphäre und pro- sowie eukaryotischen Bodenmikroben in den letzten 100 Jahren weit vorangeschritten. Hiltner (1904) prägte den Begriff der Rhizosphäre und schrieb vermehrte Bakterienzahlen in dieser verglichen mit dem umgebenden Boden dem sogenannten „Rhizosphäreneffekt“ zu (Bais *et al.*, 2008). Neuere Studien zeigen, dass die Bakteriengemeinschaft in der Rhizosphäre qualitativ und quantitativ abhängig ist von der untersuchten Pflanzenart und von dem Artenspektrum der Bodenbakterien am Standort der Pflanze (Grayston *et al.* 1996; Miethling *et al.*, 2000; Mansouri *et al.*, 2002). Die Zusammensetzung der Rhizosphäre wird durch abiotische und pflanzenbürtige Faktoren sowie auch durch Nährstoffe und Sekundärmetabolite pro- und eukaryotischer Mikroorganismen gesteuert (Hirsch *et al.* 2003). Exsudate umfassen zelluläre Primärmetabolite, organische Säuren und spezielle Sekundärmetabolite, wie Alkaloide, Glykoside, verschiedene seltene Zucker sowie Enzyme, Hormone und nicht-proteinogene Aminosäuren (Kickuth, 1970; Kent & Triplett 2002). Der Ausbildung einer Pflanzenart-spezifischen Rhizosphäre aufgrund spezifischer Exsudate können mehrere Wirkprinzipien zu Grunde liegen. Wirkprinzipien, wie die im Folgenden aufgelisteten, kommen selten isoliert vor, vielmehr überschneiden sie sich in der Natur oft (Karlovsky, 2008).

Durch Exsudate werden selektiv spezialisierte Bakterien angereichert, welchen die betreffenden Stoffe als Nährsubstrate dienen. Die Veränderung der Konkurrenzsituation zwischen Mikroorganismen begünstigt bestimmte, möglicherweise symbiontische Bakterien. Entsprechend spezialisierte Bakterien sind jedoch in der Lage, nahezu jeden exsudierten Stoff als Nahrung zu verwenden. Daher wird die Nährstoffzufuhr – als eine Form der Beeinflussung von Bakterien durch Pflanzenexsudate - übergreifend an den Anfang gestellt und nicht einzeln aufgeführt. Sicher dienen Substanzen mit nachfolgend aufgeführten Wirkmechanismen spezialisierten Organismen auch als Nährstoffzufuhr.

1. Durch Exsudation von Säuren bzw. Basen verändert sich der pH Wert in der Rhizosphäre. Die Milieuveränderungen führen zu einer Selektion unter den Bodenbakterien.
2. Durch Exsudation von Signalstoffen werden symbiotische Bakterien angereichert. Diese verbessern das Wachstum der Pflanze.
3. Durch Exsudation antibiotisch wirksamer Sekundärmetabolite werden selektiv Bodenbakterien eliminiert.
4. Durch Exsudation von Sekundärmetaboliten mit Signalfunktion werden Bakterien angereichert, welche antibiotisch wirksame Sekundärmetabolite produzieren. Durch diese werden selektiv Bodenbakterien eliminiert.

Die Exsudation und die Beeinflussung von Mikroorganismen sind den Pflanzen durch direkte und indirekte Reduktion von Pathogenen/Schadorganismen selbst von Nutzen.

Die komplexe biochemische Interaktion zwischen Pflanzen und den sie umgebenden Mikroben ist *in situ* schwer zu erforschen (Karlovsky, 2008). In den letzten Jahren wiesen Studien zu diesem Thema auf eine große Bandbreite von Wirkmechanismen hin. Es muss allerdings in den meisten Fällen noch erwiesen werden, inwieweit die bisher gewonnene Information auch die Interaktionen zwischen Organismen in der Natur wiedergeben (Hirsch *et al.* 2003). Einige Beispiele werden im Folgenden besprochen. Die Auswahl erfolgte unter dem Gesichtspunkt, oben aufgeführte Wirkprinzipien veranschaulichen zu können:

Über die Abgabe von Nährstoffen und/oder die Beeinflussung der Zugänglichkeit von Nährstoffen für Mikroorganismen (siehe 1.) verbessert sich der Versorgungsstatus von Rhizosphären-Bakterien im Vergleich zu denen der Bakterien des umgebenden Bodens. Gemessen wurde dies anhand einer Vergrößerung mikrobieller Biomasse bzw. verstärkter Stoffwechselftigkeit. (Yahai *et al.*, 2002; Ström *et al.*, 2005; Giesler *et al.*, 2007). Außerdem führen die Abgabe komplexer Substrate (Oger *et al.*, 2004) und Veränderungen des pH Wertes durch exsudierte Säuren (Kickuth, 1970) (siehe 2.) zu Selektion unter den Bodenbakterien. Ein Beispiel für den direkten Einfluss von Pflanzen auf symbiotische Bakterien über Exsudate (siehe 3.) gibt die Induktion der Nodulation in N-fixierenden Rhizobien durch Leguminosen. Peters und Long (1988) beschreiben die Exsudation von Flavonoiden als Induktoren der Nodulationsgene in *Rhizobium meliloti* durch Alfalfa- (*Medicago sativa*)-Wurzeln. Phenolische Komponenten, wie Phenylpropanoide - zu denen die Flavonoide gehören - spielen bei Pflanzen eine wichtige Rolle (z. B. für Pigmente in Blüten). Sie werden häufig bei der Kommunikation mit Mikroorganismen eingesetzt (Dixon, 2001; Hirsch *et al.*, 2004). Bais *et al.* (2004) vermuteten, dass ein *Bacillus subtilis* Stamm, welcher *Arabidopsis*

Wurzeln vor Infektion durch *Pseudomonas* spp. schützt, diesen Schutz durch Aufbau eines stabilen, ausgedehnten Biofilms bewirkt (siehe 3.). Die Produktion und Abgabe antibiotisch wirksamer Exsudate (siehe 4.) durch Pflanzen wurde nur vereinzelt in ökologisch relevanten Studien nachgewiesen: Bais *et al.* (2002; 2005) schildern die Abgabe antibiotisch wirksamer Rosmarinsäure und anderer antimikrobiell wirksamer Stoffe über Pflanzenwurzeln in die Rhizosphäre. Es ist zu erwarten, dass auch unter volatilen Substanzen vegetativer Pflanzenorgane Stoffe mit antibakterieller Wirkung gefunden werden, auch wenn es bisher nur Beweise für antibakteriell aktive Blütenduftstoffe gibt (Dudareva *et al.*, 2004). Ein wichtiger Mechanismus für antibakterielle Wirksamkeit von Pflanzenexsudaten ist die Beeinflussung des prokaryotischen „*Quorum sensing*“ Kommunikationssystems. Über dieses wird in Abhängigkeit von der Populationsdichte das Verhalten der Zellen gesteuert (Fuqua *et al.*, 1994; Miller, Basseler, 2001). Über pflanzenbürtige Mimikrysubstanzen ist dieses System beeinflussbar. Nach der Entdeckung bei einer marinen Makroalge (*Delisea pulchra*) (Givskov *et al.*, 1996; Manefield *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000) wurde dies auch für höhere Pflanzen beschrieben (Teplitski *et al.*, 2000; Mathesius *et al.*, 2002; Bais *et al.*, 2008). Ein *Pseudomonas*-Rhizosphären-Bakterium, welches antibiotisch wirksame Stoffe gegen eine Reihe phytopathogener Pilze produziert (5), wurde aus der Rhizosphäre von Baumwoll-Setzlingen isoliert (Howell & Stipanovic, 1979). Unter fluoreszenten *Pseudomonas* spp. konnten etliche Vertreter isoliert und beschrieben werden, welche das Pflanzenwachstum durch Mechanismen, wie die Schädigung von Pathogenen oder Erleichterung der Verfügbarkeit von Nährstoffen begünstigen (*plant-growth promoting rhizobacteria*) (O’Sullivan & O’Gara, 1992; Ferluga *et al.*, 2008).

Für terrestrische Lebensräume konnten demnach in den letzten Jahren Beweise erbracht werden, dass Pflanzen in vielfältiger Weise mit Bakterien in ihrer nahen Umgebung über Exsudate interagieren. Es ist aber zu vermuten, dass diese Beweise nur einen kleinen Teil der tatsächlich in der Rhizosphäre stattfindenden Kommunikation und Interaktion erfassen. Die Interaktion zwischen terrestrischen Pflanzen und Bakterien betreffend, gibt es auch Studien über spezialisierte Zellen, welche von der Pflanze an Wurzelspitzen abgeschieden werden und die mit speziellen Rezeptorproteinen für bakterielle Botenstoffe ausgestattet sind (sogenannte „*border cells*“ und „*border-like cells*“, Hawes *et al.*, 2000; Vicré, M., 2005). Im terrestrischen Bodenökosystem hat außerdem auch oft die Interaktion zwischen eukaryotischen Pilzen und der Pflanze (Mykorrhiza) einen wichtigen Einfluss auf die Rhizosphäre und die Exsudation der Pflanzen (de Boer *et al.*, 2006). Im aquatischen Lebensraum sind Makrophyten sowie Bakterien anderen Bedingungen ausgesetzt.

1.2.3 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in natürlichen aquatischen Lebensräumen

Auch im Wasser haben sich bei Makrophyten Verteidigungsmechanismen gegen Nährstoffkonkurrenten und potentiell schädliche Mikroorganismen entwickelt. Eine große Konkurrenz für aquatische Makrophyten bildet das ebenfalls phototrophe Phytoplankton. Gross (1996) schildert die Produktion eines hydrolysierbaren Polyphenols (Tellimagrandin II) für den limnischen aquatischen Angiospermen *Myriophyllum spicatum* (Ähren-Tausendblatt). *In vitro* wurde für dieses eine allelopathische Wirkung gegenüber Cyanobakterien und Algen gefunden. Allerdings basierte diese Entdeckung auf einem Extrakt der Pflanze und die Abgabe konnte nur für einen Teil hydrolysierbarer Phenole gezeigt werden. Die Produktion von Tellimagrandin II konnte für andere aquatische Hydrophyten bewiesen werden, die Exsudation des Stoffes allerdings nicht. Dies könnte für einen raschen mikrobiellen Abbau sprechen (Glomski *et al.*, 2002). Der schnelle Abbau und die Verdünnung stellen im Wasser ein großes Problem dafür dar, physiologisch wirksame Konzentrationen an exsudierten Sekundärmetaboliten zu erreichen (Gross, 2003). Im marinen Lebensraum wurde eine Reihe von Anpassungen aquatischer Makrophyten an dieses Problem entdeckt. Einerseits wurden Speicher für Wirkstoffe ausgebildet und andererseits entwickelten sich zahlreiche Wirkstoffe mit unpolarem Charakter, was eine Verdünnung erschwert und folglich hohe lokale Konzentrationen an exponierten Geweben ermöglicht (1.2.3.1). Obgleich es einzelne Beschreibungen über Interaktionen zwischen limnischen aquatischen Makrophyten und Mikroorganismen gibt (Blotnick *et al.*, 1980; King, 1994; Čížkova *et al.*, 1999; Lalke-Porczyk & Donderski, 2001; Huss & Wehr, 2004; Ruiz-Rueda *et al.*, 2009), stammt das aktuelle Wissen zum großen Teil von marinen Makroalgen (Brandt & Koch 2003, Croft *et al.* 2005, Matsuo *et al.* 2005).

1.2.3.1 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in marinen Lebensräumen

Im Meer führt die ubiquitäre Verbreitung potentiell sessiler (benthischer) Bakterien und frei treibender Verbreitungsstadien benthischer Mikro- und Makro-Organismen (z. B. Sporen, Larven) zu einem stetigen Besiedelungsdruck auf freie Flächen. Davon sind unbelebte Flächen (fouling) in gleichem Maße betroffen, wie freie Oberflächen von Organismen. Bakterien sind in der Foulingsequenz die ersten Organismen, die nach biochemischer Konditionierung auf Oberflächen siedeln. Fortgesetzt wird das

Biofouling von einzelligen Eukaryoten, bis hin zu vielzelligen Makrofoulingorganismen (Wahl, 1989) wie z. B. Balaniden (Seepocken). Biofouling ist in Form der Epibiose (*epibiosis*), also der Kolonisierung von Oberflächen eukaryotischer Lebensformen, oftmals von Nachteil für Wirtsorganismen (Basibionten) (Harder, 2008). Epiphytische Bakterien können ihren Wirtsorganismen einerseits durch Verursachung von Krankheiten schaden. Andererseits reduzieren sie die Photosynthese-Leistung und bilden die Grundlage für die Besiedlung durch Makrofouling-Organismen. Die Verhinderung der Epibiose oder des Wachstums epibiontischer Bakterien durch aquatische Makrophyten stellt daher einen potentiellen evolutionsbiologischen Vorteil dar. Zum Beispiel deutet die beobachtete periodische Abscheidung der äußeren Epidermisschicht bei *Himantalia elongata* und anderen marinen Makroalgen (Russel & Veltkamp, 1984) auf einen physikalischen Verteidigungsmechanismus gegen Epibiose. Es sind jedoch auch Beispiele für symbiontische Beziehungen zwischen Bakterien und marinen Makrophyten bekannt (Steinberg *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2005). Bei Untersuchung von chemischen Interaktionen zwischen Basibionten und Epibionten wurden sowohl Substanzen gefunden, welche eine Besiedlung verstärken (Induktoren) als auch solche, die Besiedlung unterbinden (Inhibitoren) (Wahl, 1989). Die Beispiele bekannt gewordener Strukturen von Induktoren betreffen Stoffe prokaryotischen Ursprungs in Bakterien-Biofilmen zur Besiedelung durch Larven höherer Eukaryoten (Rodriguez *et al.*, 1993; Harder *et al.*, 2002). Jedoch wurden keine Strukturen pflanzenbürtiger Allomone zur Anreicherung symbiontischer Bakterien beschrieben. Kürzlich wurden allerdings Hinweise gefunden, dass epiphytische Bakterien speziesspezifisch auf marinen Makroalgen siedeln. Dies deutet auf speziesspezifische Signale der Algen (Lachnit *et al.*, 2009) die möglicherweise die selektive Ansiedlung bestimmter Bakterien aus dem Bakterioplankton begünstigen. Chemische Inhibitoren der bakteriellen Epibiose wurden bereits gefunden und in einigen Fällen wurde ihre Struktur aufgeklärt. Die Beeinflussung prokaryotischer Kommunikation über „*Quorum sensing*“ durch pflanzenbürtige Mimikrysubstanzen wurde bereits unter 1.2.2 genannt. Der Mechanismus des AHL- (Acyliertes Homoserin Lakton)- gestützten Kommunikationssystems sowie auch die Inhibition der Zellkommunikation durch pflanzliche Mimikrysubstanzen wurde erstmals im marinen Habitat beschrieben (Fuqua *et al.*, 1994; Miller, Basseler, 2001). Erstmals wurden von einer Pflanze produzierte Mimikrysubstanzen (halogenierte Furanone) für AHL-Signale von Bakterien bei der marinen Makroalge *Delisea pulchra* gefunden (Givskov *et al.*, 1996; Manefield *et al.*, 1999). Durch halogenierte Furanone können eine Reihe prokaryotischer AHL-gesteuerter Phänotypen verhindert werden. Darunter z. B. das Ausschwärmen einzelner Zellen aus Biofilm-Zellverbänden - als eine Voraussetzung

für Besiedlung neuer Oberflächen (Rasmussen *et al.*, 2000) - oder die Stabilität von Biofilmen (Dworjany *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2002) fanden heraus, dass halogenierte Furanone bei *D. pulchra* in oberflächennahen Drüsenzellen von Blättern lokalisiert sind. Die Konzentration antibakteriell wirksamer Sekundärmetabolite in spezialisierten, oberflächennahen Drüsenzellen (Paul *et al.*, 2006) erscheint sinnvoll, um zur Abwehr möglicher Prädatoren wie z. B. Herbivoren eingesetzt zu werden.

Verdünnung von Wirkstoffen ist ein großes Problem in aquatischen Lebensräumen und die Produktion von Sekundärmetaboliten kostenintensiv. Daher haben sich Mechanismen entwickelt, ressourcensparend physiologisch wirksame Konzentrationen an Wirkorten zu erzielen. Bei der Erforschung der Interaktionen zwischen Makrophyten und Mikroorganismen (bzw. Bakterien) in terrestrischen Habitaten und im Seewasser haben sich unterschiedliche Schwerpunkte herausgebildet. Zum großen Teil liegt das vermutlich an natürlich gegebenen Eigenheiten der beiden unterschiedlichen Lebensräume. So scheint z. B. die Exsudation bei den die marinen Makrophyten dominierenden Makroalgen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die stetige aktive Abgabe gelöster organischer Materie durch unversehrte Makroalgen wurde zwar beschrieben (Sieburth, 1969), jedoch auch in Frage gestellt und auf mögliche Artefakte beim Hantieren zurückgeführt (Moebus & Johnson, 1974; Carlson & Carlson, 1984). Im Gegensatz dazu wurde sie für Makrophyten terrestrischer Ökosysteme nachgewiesen (1.2.2). Theoretisch könnte auch eine Ausrichtung der Grundlagenforschung auf wirtschaftlich anwendbare Ergebnisse der Grund für Forschungsschwerpunkte sein. So spielt das Verständnis symbiontischer Beziehungen zwischen Bodenmikroorganismen und Agrarpflanzen eine wichtige Rolle (Bosse & Frenzel 1997; Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Durch Eingriffe in die Interaktionen von Rhizosphäre und Bodenbakterien könnte zukünftig eine Effizienzsteigerung der Bodennutzung durch Pflanzen erzielt werden (Oger *et al.*, 2004). Bei der Erforschung mariner Sekundärmetaboliten von Makroalgen und/oder assoziierten Bakterien liegt der Schwerpunkt eher auf der Entdeckung antibiotisch wirksamer Stoffe (z. B. Lima-Filho *et al.*, 2002; Choudhury *et al.*, 2005) und Stoffen zur Hemmung des „fouling“ (z. B. Hellio *et al.*, 2000; Hellio *et al.*, 2001). Erstere werden hauptsächlich für pharmakologische Anwendungen gesucht. Letztere finden Anwendung z. B. in der Schifffahrt. Allerdings spricht gegen die Theorie, dass die anwendungsorientierte Ausrichtung der Forschung zu den beobachteten unterschiedlichen Schwerpunkten geführt haben könnte, das Beispiel mariner Angiospermen in der Gattung *Zostera* (Seegräser). Bei diesen Pflanzen sind Rhizome ausgebildet. Es wurden in Experimenten von der Photosyntheseaktivität von *Zostera noltii* abhängige bakterielle

N-Fixierungsraten in der Rhizosphäre gemessen (Welsh *et al.*, 1997). Dies ist ein starker Hinweis auf eine Exsudation in die Rhizosphäre dieser Pflanze. Aufgrund einer Stickstofflimitierung der Primärproduktion in marinen Küstengewässern (Eppley *et al.*, 1979) ist eine Symbiose zwischen N-Fixierern und Pflanzen wahrscheinlich. Ein Sauerstofftransport in das Wurzel-Rhizom System und eine Sauerstofffreisetzung über die Wurzeln in die Rhizosphäre wurde für *Zostera marina* beschrieben (Smith *et al.*, 1984). Pflanzen, welche Wurzeln und eine Rhizosphäre ausbilden könnten diesem Beispiel nach zu schließen in unterschiedlichen Habitaten vergleichbare Prinzipien der Interaktion mit Mikroorganismen entwickelt haben. Obgleich davon auszugehen ist, dass sich die Bakterienspezies in den Habitaten unterscheiden.

1.2.3.2 Interaktionen zwischen Makrophyten und Bakterien in natürlichen limnischen Lebensräumen

Es ist nicht bekannt, inwieweit in limnischen Ökosystemen die Vermeidung der Besiedlung durch Aufwuchsorganismen eine Triebkraft für Allelopathie darstellt. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass Epibiose bei Makrophyten zu einer Verringerung der Photosyntheseleistung führt (Gross, 2003). Wie groß die Rolle der Wurzeln und der Rhizosphäre bei im Wasser stehenden emergenten Makrophyten (*emergent Makrophytes*) wie Helophyten ist, ist nicht bekannt. Da allerdings bei vielen der Helophyten ein ausgeprägtes Wurzelwerk gebildet wird ist es wahrscheinlich, dass auch bei diesen Symbiosen mit benignen Bakterien zum Schutz und zur Versorgung der Rhizosphäre und der Pflanze gebildet werden. Ein signifikanter Unterschied der Bakteriengemeinschaft in der Rhizosphäre des submersen aquatischen Makrophyten *M. heterophyllum* im Vergleich zu der des umgebenden Bodens wurde nachgewiesen (Blotnick *et al.*, 1980). Für *Mentha aquatica* und einige Helophyten wurden bereits Hinweise auf symbiontische methanotrophe Bakterien an Wurzeln/im Rhizom gefunden (King, 1994).

Zur Aufklärung der Mechanismen limnischer aquatischer Makrophyten (LAM) auf aquatische Bakterien besteht noch Forschungsbedarf. Auf diesem Gebiet sind hauptsächlich Fortschritte zur Erklärung der Funktionalität von Pflanzenkläranlagen gemacht worden (1.2.1). Dabei standen meist die physikalische Wirkung des Bodenfilters und die Entwicklung von Bakterien-Keimzahlen im Vordergrund. Bezeichnend für diese Untersuchung ist, die Betrachtung des Wurzelraums von Pflanzen mit assoziierten Mikroorganismen als „Black Box“ (Johnston, 1993; Kuschik *et al.*, 2008).

Es wurde gezeigt (1.2.1,1.2.2,1.2.3.1), dass für LAM-Bakterien eine große Zahl möglicher Mechanismen der Interaktion mit Bakterien besteht. Daher sind Forschungsergebnisse aus den 3 genannten Forschungsgebieten (Funktion von Pflanzenkläranlagen, Rhizosphärenbiologie und marine Epibiose bzw. Epibiose-Vermeidungsstrategien) notwendig zur Aufklärung der Wirkung von aquatischen Makrophyten auf das sie umgebende Phytoplankton. Wichtig ist zunächst die direkte Beobachtung der Interaktion ausgewählter limnischer, aquatischer Makrophyten mit ökologisch relevanten Bakterien aus deren Umwelt. Zur Beschreibung empirisch beobachteter antibakterieller Wirkungen von LAM in Systemen zur Wasseraufbereitung sollte die Betrachtung der Interaktion mit Bakterien direkt innerhalb des Teichwassers aus der Anlage erfolgen. Kulturunabhängige Untersuchungsmethoden zur Beschreibung von Veränderungen innerhalb von Bakteriengemeinschaften haben sich bewährt (1.4). Durch diese ist es möglich, Wirkungen von Faktoren – wie möglicher Exsudate von LAM isoliert zu betrachten. Eine Kultur-bedingte Verfälschung der natürlichen Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften wird dabei vermieden.

1.3 Zielstellung

Ziel der Arbeit war, Interaktionen zwischen ausgewählten limnischen aquatischen Makrophyten (LAM) und dem Bakterioplankton in Teichwasser nachzuweisen und zu spezifizieren. Für das Verständnis dieser Interaktionen in der Pflanzen-gestützten Wasserreinigung (z. B. durch Pflanzenkläranlagen (PKA)) war es von Bedeutung, eine Wirkung von Pflanzen auf Gemeinschaften planktonischer Bakterien in unmittelbarer Nähe zu Wurzeln und Rhizosphäre nachzuweisen (0). Die Rhizosphäre ist bei terrestrischen Pflanzen der Teil, welcher unmittelbar mit Bakterien in Kontakt kommt. Auf viele LAM wie z. B. Helophyten trifft dies auch zu. *Iris pseudacorus* ist ein Helophyt mit umfangreichem Wurzelwerk. Daher und aufgrund der in 1.5.2.1 genannten Kriterien – unter anderem der nachgewiesenen Eignung zur Keimreduktion in PKA – wird sie als Versuchspflanze verwendet. Sollte sich die antibakterielle Wirkung von *Iris pseudacorus* im Versuch gegenüber planktonischen Bakterien des natürlichen Teichwassers (Probenwasser (PW)) bestätigen, so wäre es denkbar, dass diese möglicherweise durch assoziierte Bakterien der Rhizosphäre verursacht wird (1.2.2). LAM wie die zum Teil untergetaucht (submers) wachsende *Mentha aquatica* (1.5.2.2), welche keine ausgeprägte Rhizosphäre ausbilden und für die dennoch in der Literatur antimikrobielle Eigenschaften beschrieben werden (Seidel, 1971; Cossu *et al.*, 2003), eignen sich als Untersuchungsobjekte für einen Vergleich mit *Iris pseudacorus*. *M. aquatica* besitzt im Vergleich zu *I. pseudacorus* wenig bewurzelte Triebe und die gesamte Pflanze kommt unmittelbar in Kontakt mit umgebendem Wasser und

Bakterioplankton. Etherische Öle von *M. aquatica* enthalten polare Substanzen und es wurde eine antibakterielle Wirkung des Öls beschrieben (Mimica-Dukić *et al.*, 2003). *I. pseudacorus* und *M. aquatica* sollen beide in Einzel- und Parallelansätzen auf eine mögliche antibakterielle Wirkung gegenüber planktonischen Bakterien des Teichwassers untersucht werden. Aufgrund der leichten Verdünnung und/oder dem raschen Abbau der potentiell wirksamen Sekundärmetabolite von Pflanzen/Pflanzen-assoziierten Mikroorganismen ist die Form des direkten Nachweises von Wirkstoffen über Extraktion nicht immer zielführend; Oft gelingt es nicht, für den Nachweis notwendige Wirkstoffkonzentrationen zu isolieren (Glomski *et al.*, 2002). Für einen indirekten Nachweis von Wirksubstanzen über deren Wirkung auf planktonische Bakterien im PW ist eine große Empfindlichkeit der Methode Voraussetzung, um auch geringe Veränderungen innerhalb nah verwandter Gruppen zu detektieren. Um eine Verfälschung der natürlichen Zusammensetzung des Bakterioplanktons im PW so weit wie möglich zu vermeiden, wird eine Kultur-unabhängige Methode zur Bestimmung von Profilen planktonischer Bakterien verwendet. Molekularbiologische Methoden, welche mit sehr hoher (Muyzer, 1993; Fischer & Lerman, 1983) Empfindlichkeit kleine qualitative Veränderungen in Gemeinschaftsprofilen von Bakterien sichtbar machen, sind sogenannte „*fingerprint*“ – Methoden. Ähnlich dem „genetischen Fingerabdruck“ (Jeffreys *et al.*, 1985) werden durch selektive Amplifikation Bakterien-spezifischer ribosomaler DNS (16S rDNS) und Entwicklung von DNS Profilen mittels Gelelektrophorese Bandenmuster von DNS Fragmenten erzeugt, welche einzigartig für die jeweilige Zusammensetzung der Gemeinschaft von Phylotypen sind (Profil). Zur Analyse von Gemeinschaftsprofilen planktonischer Bakterien eignet sich aufgrund großer Empfindlichkeit die DGGE (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese; *denaturing gradient gel electrophoresis*) gestützte Analyse von 16S rRNS Gen-Amplikons (z. B.: Muyzer, 1993; Kawai *et al.*, 2002; Kumaraswamy *et al.*, 2005; de Wever, 2005; Lam & Harder, 2007; Temudo *et al.*, 2008). Um durch DNS-Extraktion entstehende Artefakte (v. Wintzingerode *et al.*, 1997; Spiegelmann *et al.*, 2005) zu vermeiden, wird die DNS durch Filter-PCR (Kirchmann *et al.*, 2001) direkt aus dem Filterkuchen von steril filtriertem Teichwasser gewonnen.

Um trotz der Gefahr der raschen Verdünnung von Wirkstoffen nach potentieller Abgabe über Wurzeln/Rhizosphäre oder submerse Pflanzenteile Effekte auf das Bakterioplankton erkennen zu können, werden Inkubationsansätze für die Untersuchung verwendet. Pflanzen werden dem Bakterioplankton in PW für einen Zeitraum, welcher in Vorversuchen ermittelt wird (Versuchszeitraum) exponiert. Beide Pflanzen werden den Bakterien des PW in der Weise ausgesetzt, wie es in ihrem natürlichen Lebensraum der Fall ist. Daher wird *I. pseudacorus* ausschließlich mit

ihrem Rhizom bis zum Blattansatz unter Wasser getaucht; *M. aquatica* dagegen wird je nach Ausbildung der Triebe (submers bzw. emers spezialisiert; 1.5.2.2) vollständig bzw. mit den Wurzeln bis zum Blattansatz dem PW exponiert. Auf diese Weise wird eine potentiell vorhandene verändernde oder auch antibakterielle Wirkung der Pflanzen auf Bakterien mit dem Bakterioplankton des PW untersucht. Die Nullkontrolle von unbehandeltem PW wird über den Versuchszeitraum unter denselben Bedingungen, wie Versuchsansätze mit Pflanzen inkubiert. Durch Verwendung desselben Probenwassers für alle Ansätze und Abgleich der Veränderungen im Bandenmuster mit der Nullkontrolle wird der Einfluss der Anwesenheit von Pflanzen auf planktonische Bakterien des PW sichtbar. Ein in Anwesenheit der Pflanze potentiell bewirkter Effekt auf die Zusammensetzung des Bakterioplanktons lässt sich so ermitteln. Es soll untersucht werden, ob sich *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* in der Beeinflussung von Profilen der Bakterioplankton-Gemeinschaft spezifisch voneinander unterscheiden. Dafür werden Proben aus Parallel- und Kombinationsinkubationsansätzen mit der oben beschriebenen molekularbiologischen Analyseverfahren verglichen. Um die Abhängigkeit der Pflanzen von assoziierten Bakterien zu überprüfen, werden Inkubationsexperimente mit gleichem Aufbau wie die genannten an steril aufgewachsenen Pflanzen durchgeführt. In einem Versuch mit steril aufgewachsenen *M. aquatica* wird die Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung von assoziierten Bakterien bei *M. aquatica* mit der von *I. pseudacorus* verglichen. Dabei wird die Hypothese überprüft, dass assoziierte Bakterien bei *M. aquatica* von geringerer Bedeutung für eine antibakterielle Wirkung sind, als bei *I. pseudacorus*. Weiterhin wird die Wirkung von durch Pflanzen konditioniertem PW (PKW) in Abwesenheit der Pflanzen untersucht. Dadurch soll festgestellt werden, ob eine potentiell vorhandene antibakterielle Wirksamkeit in Anwesenheit von einer Pflanze auch in deren Abwesenheit vorhanden ist. Sollte sich dies bestätigen, so wäre unter anderen Wirkmechanismen (wie Nährstoff-Exsudation oder Exsudation Milieu-verändernder Stoffe) auch eine Wirkung über antibakterielle Sekundärmetabolite denkbar. Anhand der oben geschilderten rDNS-gestützten molekularbiologischen Analyse von Proben lassen sich potentielle Wirkmechanismen nicht spezifizieren. Jedoch wird durch Einsatz Bakterien- bzw. Bakteriengattungs-spezifischer Primer eine möglicherweise nur gegenüber bestimmten Bakterien vorhandene antibakterielle Wirkung untersucht. Eine potentiell phytopathogene Bakteriengattung, gegenüber der durch Einsatz spezifischer Primer in molekularbiologischen Analysen eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen wird (sensible Bakteriengattung) soll in Kulturversuchen getestet werden. Durch Inkubation von nachweislich phytopathogenen Stämmen der sensiblen Bakteriengattung mit PKW wird überprüft, ob es durch pflanzliche Exsudate in

Abwesenheit der Pflanzen zu einer Beeinflussung des Wachstums kommt. Die Eliminierung möglicherweise im Gießwasser angereicherter Phytopathogene ist eine wichtige Funktion von Pflanzen-gestützten Wiederaufbereitungssystemen für gebrauchtes Gießwasser. Falls durch Exsudate der Versuchspflanzen eine Reduktion/Wachstumshemmung bei phytopathogenen und anderen planktonischen Bakterien bewirkt würde, wäre die weitere Untersuchung möglicher Mechanismen für die antimikrobielle Wirkung ein vielversprechendes Forschungsgebiet für zukünftige Arbeiten.

1.4 Versuchsdesign

Iris pseudacorus und *Mentha aquatica* werden verwendet, um die Beeinflussung von Bakterien in nächster Nähe zu limnischen aquatischen Makrophyten (LAM) sichtbar zu machen. Das Versuchsdesign beinhaltet die Erfassung von Veränderungen innerhalb von Gemeinschaften planktonischer Bakterien in Inkubationsansätzen mit den Pflanzen im Vergleich zu unbehandeltem Probenwasser (PW). Dabei wird der Helophyt *Iris pseudacorus* dem Bakterioplankton im PW mit seiner Wurzelregion und Rhizosphäre exponiert, während die zum Teil submers wachsende *Mentha aquatica* den planktonischen Probenwasserbakterien nahezu vollständig ausgesetzt wird. Der Einfluss der Pflanzen/Pflanzenexsudate auf Bakterien des Bakterioplanktons bei Inkubationsversuchen wird durch Analyse der DNS Profile von Segmenten des ribosomalen RNS Gens untersucht.

Experimentelles Design für die Zielstellung

1. Inkubationsversuche mit verschiedenen LAM, die dem Bakterioplankton des Probenwassers (PW) in natürlicher Weise und mit natürlicherweise assoziierten Bakterien im Vergleich zu einer Nullkontrolle aus unbehandeltem PW ausgesetzt werden. Mit diesen Versuchen soll eine potentielle antibakterielle Wirksamkeit von LAM in direkter Nähe der Pflanzen untersucht werden. Dies geschieht anhand von Vergleichen der Bandenprofile der Gemeinschaft des inkubierten Bakterioplankton. Deletierte Banden im PKW gegenüber der Nullkontrolle werden durch DNS Sonden markiert und auf diese Weise in verschiedenen Gelen verfolgt.
2. Inkubationsversuche (wie in 1.) mit steril aufgewachsenen Individuen verschiedener LAM ohne die natürlicherweise assoziierten Bakterien im Vergleich zu wild aufgewachsenen Individuen. Mit diesen Versuchen wird die Abhängigkeit der antibakteriellen Wirksamkeit von assoziierten Bakterien der LAM überprüft. Außerdem wird untersucht, ob steril aufgewachsene Pflanzen

im Gegensatz zu wild aufgewachsenen keine Bandenneubildungen im PKW verursachen

3. Inkubationsversuche (wie in 1.) des durch Inkubation mit verschiedenen LAM potentiell an Wirkstoffen angereicherten Probenwassers (mit Pflanzen konditioniertes Probenwasser (PKW)) (aus 1.) mit Bakterioplankton des Probenwassers. Durch diese Versuche wird eine antibakterielle Wirksamkeit in Abwesenheit der Pflanzen untersucht. Dabei wird die Konzentration von Exsudaten nicht durch Extraktionsverfahren erhöht.
4. Verwendung des PKW (aus 1.) für Biotests mit phytopathogenen Bakterien. Bei diesen Versuchen wird die Wirksamkeit von Konzentraten der Pflanzenexsudate aus Inkubationsversuchen an potentiell phytopathogenen Bakterien getestet. Möglicherweise besteht eine Konzentrationsabhängigkeit potentieller LAM-/LAM-assoziiertes Wirkstoffe.
5. Selektive Amplifikation der ribosomalen DNS aus durch Inkubationsversuche gewonnenen Proben von Bakterioplankton (von 1.). Anhand der Amplifikation von Proben DNS aus Inkubationsversuchen wird die taxonomische Zugehörigkeit von Phylotypen welche Banden repräsentieren, die deletiert wurden untersucht. Durch Sequenzierung deletierter Banden wird die Zugehörigkeit der Phylotypen weiter spezifiziert.

1.5 Versuchsubjekte

1.5.1 Allgemeine Auswahlgründe für Testpflanzen im gewählten Untersuchungsverfahren:

- Robustes Wachstum auch unter schwächeren Lichtverhältnissen und keine speziellen Ansprüche an die Wasserqualität
- Ausgedehntes Verbreitungsgebiet und gute Verfügbarkeit
- Mehrjährigkeit
- Gutes Wachstum auch ohne Nährstoffversorgung über ein Substrat
- Die Möglichkeit, Pflanzen aus sterilisierten Samen aufzuziehen
- Unterbringung der Pflanzen in 2 L Probengläsern möglich. Daher Pflanzen nicht wesentlich höher als 40 cm
- Begründete Vermutung einer antibakteriellen Wirksamkeit

1.5.2 Spezielle Auswahlkriterien und kurze Beschreibung der Testpflanzen

1.5.2.1 *Iris pseudacorus* L. (Iridaceae)

Die Sumpfschwertlilie (*Iris pseudacorus* L.), ist ein mehrjähriger, in Europa heimischer Helophyt (Sumpfpflanze). Sie bildet ein Rhizom aus, und wurzelt typisch für eine Sumpfpflanze unter Wasser oder an stark durchnässten Standorten. Die Rhizome ausgewachsener Pflanzen erreichen Durchmesser von 1- 4 cm und dienen unter anderem zur Speicherung von Reservestoffen. *I. pseudacorus* ist sehr robust und auch an halbschattige Standorte angepasst. Die Blätter wachsen zum größten Teil (etwa 4/5) über der Wasseroberfläche und erreichen eine Gesamtlänge von 40-150 cm (Sutherland, 1990). Die von Sutherland (1990) beschriebene Wurzellänge von 10-20 cm bis 30 cm wurde bei den verwendeten Versuchspflanzen übertroffen (Abb. 1). Einzelne Wurzeln waren mehr als 100 cm lang und übertrafen die Länge der Blätter um das 1,5 – fache.



Abb. 1 Wurzellänge von *Iris pseudacorus* betrug mehr als 30 cm (vgl. Sutherland, 1990). Im Versuch bis zu >100 cm. Auf dem Bild bis > 50 cm. Auf dem Bild ist die Unterseite des Styroporschwimmers zu sehen, in dessen Löchern die Pflanzen wuchsen.

Spezielle Gründe für die Auswahl von *Iris pseudacorus* als Versuchspflanze:

- Beschreibung der Keimreduktion durch *I. pseudacorus* in der Literatur (Seidel, 1973)
- Erfolgreiche Nutzung in keimreduzierenden Pflanzenkläranlagen (Camacho *et al.*, 2007)
- Aufgrund der ausgeprägten Rhizosphäre möglicherweise Träger potentiell antimikrobiell wirksamer assoziierter Bakterien.

1.5.2.2 *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae)

Die Wasserminze (*Mentha aquatica* L.) ist europaweit verbreitet und mehrjährig. Wie *I. pseudacorus* bildet die Wasserminze dicht über dem Boden wachsende Sproßachsenmetamorphosen ähnlich Rhizomen, aus. Bei *M. aquatica* werden diese jedoch als Stolone bezeichnet. Sie dienen der Pflanze in erster Linie zur vegetativen Vermehrung und nicht zur Speicherung von Reservestoffen. Gattungstypisch produziert *M. aquatica* etherische Öle, die an die Umgebung abgegeben werden (Lawrence, 2007). In der Gattung *Mentha* kommt es leicht zu Hybridisierungen von Arten. *M. aquatica* und *M. spicata* L. (Speer-Minze) bilden die beiden Stammarten des Hybriden *M. x piperita* L. (Pfefferminze). *M. aquatica* kann sowohl oberhalb der Wasseroberfläche emers, als auch submers (untergetaucht) wachsen und bildet für die beiden Lebensräume unterschiedlich gestaltete Blätter aus (Enríquez & Sand-Jensen, 2003) (Abb. 2).

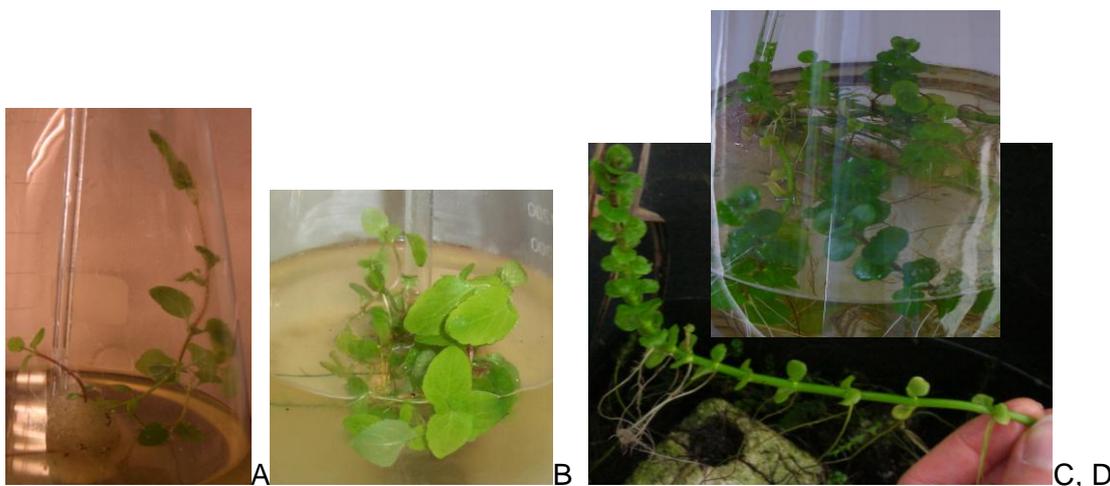


Abb. 2: *Mentha aquatica*. Verschiedene Blattmorphologie von emers (A, B) und submers (C, D) wachsenden Stolonen und Blättern der Pflanzen in der

Akklimatisierungskultur. Die Glaspipette (etwa 1 cm dick) dient in A, B und D als Größenmaßstab.

Spezielle Gründe für die Auswahl von *Mentha aquatica* als Versuchspflanze:

- Beschreibung der Keimreduktion durch *Mentha aquatica* in der Literatur (Seidel, 1971; Cossu *et al.*, 2003).
- Aufgrund der Produktion etherischer Öle (Jercovic & Mastelic, 2001; Deans, 2007; Lawrence, 2007) potentiell antimikrobielle Wirksamkeit.

2 Material & Methoden

2.1 *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica*

Individuen beider Arten wurden aus naturbelassenen Teichen bzw. Wassergräben in Oldenburg entnommen. Die Pflanzen wurden nach Erhalt durch das Abspülen größerer Partikel und anhängender Mikrofauna und -flora mit Aqua bidest. (autoklaviert) gereinigt. Im Anschluss an die Reinigung wurden die Pflanzenwurzeln und die Rhizome mit autoklavierter, synthetischer Filterwatte für Aquarien (Symec; JBL GmbH & Co. KG, Neuhofen) umwickelt. Dadurch bekamen sie einen Substratersatz und die Verankerung wurde erleichtert. Die Pflanzen wurden für die Dauer des Forschungsprojektes in einem Gewächshaus unter gleichbleibenden Bedingungen (Wassertemperatur 18-25°C; gleichmäßige Belüftung über einen Luftfilter; natürliches Sonnenlicht durch Glasdach) in einem 500 L Wasserbottich gehältert. Um die Pflanzen trotz fehlenden Substrates in der natürlichen Tauchtiefe im Wasser zu verankern, wurden *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* auf Styroporplatten (50 x 45 cm) mit 50 Löchern für Töpfe á 5 cm Ø gesetzt. Auf diese Weise wurden *I. pseudacorus* bis etwa 2 cm über dem Blattansatz und die Wurzelbereiche von *M. aquatica* unter Wasser gehalten. Durch das Untertauchen von Trieben im Verlauf der Akklimatisierung wurden *M. aquatica* zur Ausbildung von submersen Blättern (Abb. 2 C, D) stimuliert. Dabei verfärbten sich die Blätter gelblich und wurden abgeworfen. Nachdem sich die Pflanzen nach Anpassung der Blätter submerser Stolone durch Neubildung adaptiert hatten, wurden sie für die ersten Vorversuche und 3T Inkubationsversuche verwendet. Die Zeit zur Akklimatisierung vor Versuchsbeginn betrug mindestens zwei Wochen. Die Kultur zur Akklimatisierung der Pflanzen wurde im April 2006 mit *I. pseudacorus* aufgebaut und Anfang Juli 2006 durch *M. aquatica* und etwa 20 weitere *I. pseudacorus* Pflanzen ergänzt. Im Juli und Oktober 2008 wurden die Bestände durch neue Wildpflanzen beider Arten aufgefüllt. Pflanzen zur Wiederauffüllung wurden in derselben Weise gereinigt und akklimatisiert, wie oben beschrieben. Pflanzen der Akklimatisierungskultur entwickelten sich gesund und produzierten nach besagter Eingewöhnungsphase von mindestens 2 Wochen kräftig grüne Blätter bzw. Triebe. Die für Versuche ausgewählten *I. pseudacorus* Pflanzen (2.4.2.1) gehörten zu den kleineren Individuen. Kulturen wurden aufgefüllt, um den Verbrauch zu kompensieren und keine der Pflanzen wurde mehrmals getestet. Pflanzen für die Experimente mit wild aufgewachsenen Individuen wurden aus der Akklimatisierungs-Kultur entnommen

(**Wildpflanzen**). Für die Untersuchungen mit Pflanzen, die keine mit ihnen assoziierten Mikroorganismen hatten, wurden Individuen beider Spezies aus sterilisierten Samen auf sterilem Bewurzelungsmedium aufgezogen (**Sterilpflanzen**). Die Sterilisation der Samen und die keimfreie Aufzucht wurden von Mitarbeitern der kooperierenden Baumschule **piccoplant** in Anlehnung an ein Standardverfahren nach Yeoman und McLeod (1977) durchgeführt. Eine oberflächliche Sterilisation der Samen wurde durch 30 minütiges Einlegen in eine 10 % (w/v) $\text{CaCl}(\text{OCl})_2$ Lösung vorgenommen. Für die Keimlingsbewurzelung wurden von der kooperierenden Gärtnerei Kulturschälchen, die mit 250 ml Bewurzelungsmedium (Rezept von Gärtnerei nicht freigegeben) zu $\frac{1}{4}$ des Gesamtvolumens gefüllt wurden, verwendet. Sterile Individuen beider Pflanzenarten erreichten eine maximale Wuchshöhe von 10 cm und wurden ab dieser Größe zurückgeschnitten, um im Sterilraum der Kulturschale genügend Platz zu haben. Ein Rhizom wurde innerhalb des Projektzeitraums von keiner der steril aufgewachsenen Pflanzen ausgebildet. Die Wurzeln konnten eine Länge von bis zu 15 cm erreichen, waren aber in geringerer Anzahl vorhanden und dünner, als bei den nicht sterilen Kontrollpflanzen. Die Sterilpflanzen wurden etwa ab einer Kulturzeit von 14 Wochen für Experimente eingesetzt. Für Versuche im Labor wurden Pflanzen unmittelbar vor Einbringung in 2L Erlenmeyerkolben aus den Bewurzelungsschalen genommen und das an Wurzeln haftende Medium mit Aqua bidest. steril abgespült. Auch alle steril aufgewachsenen Pflanzen wurden jeweils nur für einen Versuch verwendet.

2.2 Herkunft aller Teichwasserproben

Der Teich aus dem alle untersuchten Teichwasserproben entnommen wurden, ist einer von 2 Sammelteichen der Gießwasser-Wiederaufbereitungsanlage der bei der Durchführung des Projektes kooperierenden Baumschule **piccoplant** in Oldenburg. Die gesamte Freiluftanlage setzt sich zusammen aus 8 Gewässern verschiedener Größe und den sie verbindenden Gräben. Zwei der Teiche sind Sammelteiche, in denen das gebrauchte Gießwasser der angrenzenden Felder zusammenfließt und aus denen das Wasser am dem Einlauf gegenüber gelegenen Ende in die Klärungsteiche geleitet wird. Auf den Feldern wurden während des Projektzeitraums Rhododendron- und Fliederbüsche kultiviert. Die Klärungsteiche sind reich mit Iris- und anderen Sumpfpflanzen bewachsen. Nachdem das Wasser diese passiert hat, gelangt es biologisch geklärt in einen der Entnahmeteiche, aus denen es nach Bedarf abgepumpt und wiederum als Probenwasser verwendet werden kann. Abhängig vom Probenwasserverbrauch variiert die Fließgeschwindigkeit des Systems an Zu- und Abläufen von wenigen Litern in der Stunde bis zu etwa 2 L/min. Die Quelle für gebrauchtes Probenwasser des untersuchten Sammelteichs sind direkt die

beschriebenen angrenzenden Felder. Der Sammelteich hat eine Ausdehnung von etwa 90 x 40 m und ist durchschnittlich 2 - 2,5 m tief, wobei die Uferbereiche flach sind und zur Mitte langsam abfallen. An der tiefsten Stelle sind ungefähr 3,5 m zu messen. Die gesamte Anlage inklusive des Versuchsteichs entstand im Jahr 1995. Der Teich war im Versuchszeitraum - also von Mai 2006 bis Dezember 2008 - wenig bewachsen und es kamen hauptsächlich Vertreter der Gattung *Elodea* (Tannwedel) im Wasser vor. Die Uferzonen waren ebenfalls spärlich bewachsen mit Binsengewächsen (*Juncaceae*), vornehmlich mit kleinen Horsten der Flatterbinse (*Juncus effusus*) (siehe Abb. 3, Vordergrundbewuchs rechts im Bild). *I. pseudacorus* kam in diesem Gewässer nicht vor, allerdings war dies für die Beschaffenheit des untersuchten Teichwassers wenig ausschlaggebend, da die Beprobung des Gewässers stets direkt an den oder in unmittelbarer Nähe der Einlaufrohre der Gießwassersammelgräben stattfand. Entnommen wurden Wasserproben für die direkte Untersuchung saisonaler Schwankungen der Zusammensetzung des Bakterioplanktons und um Veränderungen in der Gemeinschaft planktonischer Bakterien des Teichwassers in Inkubationsexperimenten zu untersuchen. Getestet wurde auf Veränderungen des Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton aufgrund des Einflusses von Versuchspflanzen (**Pflanzen**-Versuche, 2.4.2) oder aufgrund der Wirkung von durch die Pflanzen potentiell an wasserlöslichen Sekundärmetaboliten angereichertem Wasser (**Sekundärmetaboliten**-Versuche, 2.4.3). Es wurde darauf geachtet, dass zwischen Probennahmen aus dem Teich und außergewöhnlichen Ereignissen wie einer Düngung der Felder oder anhaltendem Regen mindestens ein Abstand von einer Woche lag. Dadurch wurde der Einfluss anderer Parameter als der natürlichen Belichtung und herkömmlicher Temperaturschwankungen minimiert.



Abb. 3: Ort der Probenentnahme am Sammelteich mit einleitenden Rohren für das gebrauchte Probenwasser aus den Sammelgräben an der Einlaufstelle. Uferbewuchs mit *Juncus effusus*.

2.3 Gewinnung von Wasserproben und Messung wasserchemischer Parameter

Probenwasser wurde an der Einlaufstelle (Abb. 3) mit einem sterilen 25 L Kanister entnommen und direkt im Anschluss an die Entnahme im Labor verwendet. Erfolgte eine Untersuchung der Zusammensetzung des Bakterioplanktons zum aktuellen Zeitpunkt der Entnahme, so wurden 400 ml des Probenwassers direkt nach Ankunft im Labor gefiltert (2.5.1) und die Probe erhielt den Zusatz „0 T“ für 0 Tage Inkubationsdauer des Probenwassers. Die Konzentration von gelösten Stickstoffverbindungen (Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-)), sowie von Phosphorverbindungen (Phosphat- (PO_4^{3-})) und der pH-Wert wurden mithilfe von Testsets der Aquaristik (Sera GmbH, Heinsberg, Deutschland) bestimmt. Wasser für Inkubationsversuche (2.4.2 und 2.4.3) wurde innerhalb einer Stunde nach der Entnahme steril in die Probengläser abgefüllt. Es wurde entweder mit einem Versuchsobjekt (einer Pflanze (2.4.2)) oder Versuchswasser (durch Inkubation mit Pflanzen konditioniertem Probenwasser (2.4.3)) versetzt- oder unverändert als Nullkontrolle in den Versuchsaufbau integriert (2.4).

2.4 Verwendung von Gießwasser für Untersuchungen des Bakterioplankton-Gemeinschaftsprofils

2.4.1 Untersuchung des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton in Proben des Probenwasserteichs

Um die natürliche, saisonale Variabilität des Gemeinschaftsprofils der planktonischen Bakterien des Probenwassers zu bestimmen, wurden im Jahr 2008 sechs Proben (Tab. 1) wie unter 2.3 beschrieben entnommen, gefiltert und molekularbiologisch untersucht (2.5.3).

Tab. 1: Benennung und Entnahme-Zeitpunkt von Wasserproben.

Probenname	Tag der Probennahme
05	28.05.2008
06	26.06.2008
07	14.07.2008
09	19.09.2008
10	21.10.2008
12	13.12.2008

2.4.2 Untersuchung von Veränderungen im natürlichen Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons bei Inkubation mit Pflanzen (Pflanzen-Versuche)

Versuche wurden sowohl mit Einzelansätzen einer Pflanzenart, als auch mit Parallelansätzen von *I. pseudacorus* und *M. aquatica* durchgeführt (Abb. 6), nach den benutzten Pflanzen (Kurzform; z. B. Mentha für *M. aquatica*) benannt und durchnummeriert. Versuchsnummern sind im Text durch Fettdruck hervorgehoben. Pro Probenglas wurden 1-5 Pflanzen - abhängig von der Spezies - angesetzt. Jeder Ansatz bestand aus 3 Replikaten (Probengläsern). Auf Abweichungen von diesem Standard in Einzelfällen wird gesondert hingewiesen. Für ein Probenglas wurde ein 2 L Erlenmeyer Kolben mit 800 ml Probenwasser („PW“ siehe 2.3) gefüllt und die Pflanze - am unteren Ende einer Pasteurpipette mit Filterwatte und Zahnstocher fixiert - in diesen eingebracht. Zur Untersuchung des Zusammenwirkens beider Pflanzen auf das Gemeinschaftsprofil des Teichwasser-Bakterioplankton wurden Versuche mit Kombinationsansätzen durchgeführt (2.4.2.3). Als Nullkontrolle diente ein Ansatz mit

800 ml unbehandeltem Probenwasser, welcher ohne Pflanze unter gleichen Temperatur- und Lichtverhältnissen wie die Pflanzenansätze in einem 2 L Erlenmeyer Kolben kultiviert wurde. Anfangs wurden in Versuchen (in denen dies bei der Auswertung extra erwähnt wird) 2 verschiedene Ansätze zur Nullkontrolle (jeder Ansatz bestehend aus 3 Replikaten) verwendet. Die Nullkontrolle „PW xT+Filter“ (wobei das x für die Inkubationsdauer von 3 oder 7 Tagen steht) bestand aus 800 ml ungefiltertem Probenwasser und einem Bausch autoklavierter Filterwatte, der von der Größe dem der bei den **Pflanzen**-Versuchen verwendeten entsprach und anstelle der Pflanze an der Pipettenbasis befestigt war. Alle beschriebenen Glasmaterialien waren durch Autoklavieren (121°C, 1 bar, 20 min) sterilisiert worden. Probengläser wurden mit Parafilm so abgedeckt, dass nur die Auslauföffnung der Pasteurpipette herausragte, an welcher ein Belüftungsschlauch befestigt wurde. Eine handelsübliche Aquarium-Luftpumpe sorgte für die Belüftung. Angesaugte Luft wurde über einen Filter aus eng gewickelter, sterilisierter Baumwollwatte geleitet. Beleuchtet wurden die Ansätze über 12 h mit zwei Leuchtstoffröhren ($310 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Die Wirkung der Pflanze auf Gemeinschaftsprofile planktonischer Bakterien im Probenwasser wurde zunächst in 3 Tage dauernden Inkubationsversuchen untersucht. Nachdem sich eine Verlängerung der Versuchsdauer auf sieben Tage als vorteilhaft erwiesen hatte, wurden alle folgenden Experimente für eine Dauer von sieben Tagen konzipiert. Es wurde ein Versuch durchgeführt, in dem eine Pflanzeninkubation vergleichsweise mit und ohne Düngerzugabe über 7 T getestet wurde. Der Aufbau des Versuches erfolgte bis auf die Zugabe von Universol Orange (Scotts International B.V., Geldermalsen, Niederlande) in einer Konzentration von 0,1 g/L (Herstellerempfehlung: 0,5 - 1,5 g/L) in gleicher Weise, wie unter 2.4.2 beschrieben. Es wurden je 2 Gläser der Ansätze mit Nullkontrollen (PW 7T, PW 7T + Filter) und 2 Gläser der Pflanzenansätze mit Dünger versetzt.

2.4.2.1 Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton bei Inkubation mit *Iris pseudacorus* Pflanzen

Irispflanzen (*I. pseudacorus*) hatten eine Blattlänge von etwa 20-30 cm (10 cm bei Versuchen mit Sterilpflanzen) ab Blattansatz und eine vergleichbare Länge der Wurzeln ab Rhizom. Blätter die zu lang waren, um in die Versuchsgefäße zu passen, wurden vorsichtig gebogen. Da Exsudate verletzter Wurzeln zur Vermehrung von planktonischen Bakterien führen können (Seidel, 1964), wurde bei Ansatz der Versuche besonders darauf geachtet, Verletzungen zu vermeiden. Die Pflanzen

wurden so an der Belüftungspipette (2.4.2) befestigt, dass Rhizom und Wurzeln vollständig unter Wasser und die Blätter ab 1-2 cm oberhalb des Blattansatzes über dem Wasserspiegel lagen (Abb. 4).



Abb. 4: Probenglas mit *Iris pseudacorus*, wie in Versuchsansätzen verwendet

2.4.2.2 Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton bei Inkubation mit *Mentha aquatica* Pflanzen

Die Bestückung von Probengläsern eines Ansatzes mit *M. aquatica* Pflanzen erfolgte analog wie für *I. pseudacorus*-Versuche beschrieben (2.4.2.1). Unterschiede bestanden in der Zahl der verwendeten Individuen, da es bei den teilweise über 50 cm langen Stolonen der Wasserminze unmöglich war, Einzelpflanzen ohne Verletzung der Sprosse zu trennen. Es wurden drei bis fünf Stolone von 30 bis 50 cm Länge vorsichtig zusammengefasst und mit Filterwatte an der Belüftungspipette befestigt. Sie wurden so angeordnet, dass sich alle Wurzeln und submers ausgebildeten Blätter unter und emers entwickelte Pflanzenteile über der Wasseroberfläche im Versuchskolben befanden (Abb. 5).



Abb. 5: Probenglas mit *Mentha aquatica* im Versuchsansatz.



Abb. 6: Aufbau mit Probengläsern der Inkubationsansätze von *Iris pseudacorus* (links, Mitte) und *Mentha aquatica* (rechts) und zwei Nullkontrollen im Hintergrund.

2.4.2.3 Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton bei Inkubation von *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* Pflanzen im Kombinationsansatz

Für eine Untersuchung des Zusammenwirkens beider Pflanzen auf das Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons im Probenwasser wurden Versuche mit Kombinationsansätzen durchgeführt. In jedes Probenglas mit 800 ml Probenwasser (2.3) wurde eine 30-50 cm lange *I. pseudacorus* Pflanze mit 7-10 cm langem Rhizom zusammen mit 3 bis 4 Stolonen von *M. aquatica* eingebracht. Der Aufbau der Ansätze erfolgte analog wie für die *I. pseudacorus*-Einzelversuche beschrieben (2.4.2.1). Zusätzlich zum Kombinationsansatz, wurden Parallelansätze mit je 2 Probengläsern von *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* einzeln über denselben Zeitraum untersucht, um die Wirkung der verschiedenen Pflanzen und deren Zusammenwirken vergleichen zu können. Der Ansatz für die Nullkontrolle war analog wie bei 2.4.2.1 beschrieben.

Eine Benennung und grobe Beschreibung aller Versuche, welche zur Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton bei Inkubation mit Pflanzen durchgeführt wurden, gibt die folgende Übersichtstabelle (Tab. 2).

Tab. 2: Überblick über die durchgeführten Pflanzeninkubationsversuche. Kursiv gedruckt sind die Entnahmetage des Probenwassers bei Versuchen, in denen steril aufgewachsene Pflanzen (steril) im Vergleich mit natürlich aufgewachsenen (wild)-Pflanzen in ihrer Fähigkeit untersucht wurden, die Zusammensetzung der Bakterioplankton-Gemeinschaft zu beeinflussen. Fett hervorgehoben sind die Entnahmetage bei Versuchen, bei denen mit konditioniertem Probenwasser im Anschluss eine Untersuchung potentieller Sekundärmetabolite (2.4.3) durchgeführt wurde. Kombinationsans. = Kombinationsansatz.

Versuch	Entnahmetag des Probenwassers	Verwendete Pflanzenansätze
Iris 1	23.08.2006	<i>Iris pseudacorus</i> (wild)
Iris & Mentha 1	18.03.2008	<i>I. pseudacorus</i> (wild); <i>Mentha aquatica</i> (wild)
Iris 2	07.07.2008	<i>I. pseudacorus</i> (wild)
Iris 3	30.07.2008	<i>I. pseudacorus</i> (wild)
Iris & Mentha 2	09.09.2008	<i>I. pseudacorus</i> (wild); <i>M. aquatica</i> (wild); <i>I. pseudacorus</i> (wild) und <i>M. aquatica</i> (wild) (Kombinationsans.)
Iris steril	21.06.2007	<i>I.pseudacorus</i> (wild); <i>I. pseudacorus</i> (steril)
Mentha (steril)	15.01.2008	<i>M. aquatica</i> (wild); <i>M. aquatica</i> (steril)

2.4.3 Untersuchung von Veränderungen des natürlichen Gemeinschaftsprofils von Bakterioplankton durch Inkubation mit an pflanzlichen Exsudaten angereichertem Probenwasser (Sekundärmetaboliten-Versuche)

Die Experimente zur Inkubation frisch gewonnenen Probenwassers (PW) mit Pflanzen-konditioniertem Probenwasser (PKW) (**Sekundärmetaboliten**-Versuch) wurden jeweils direkt an einen Versuch zur Untersuchung von Veränderungen in der Zusammensetzung planktonischer Bakteriengemeinschaften in Anwesenheit von Pflanzen (Pflanzenversuch) (2.4.2) angeschlossen. Die Benennung erfolgte unter Verwendung Namens vom vorausgegangenen Pflanzenversuch durch Anhängen der Abkürzung „-SM“ (Sekundärmetabolite). Von 800 ml PKW wurden 400 ml zur vollständigen Filterung bis zur Gewinnung der bakteriellen DNS für molekularbiologische Analysen verwendet (siehe Beschreibung unter 2.5). 400 ml des PKWs wurden nach dem bei 2.5 beschriebenen Vorfiltern (Filterkaskade bis zum 1 µm Filter) für den Sekundärmetabolitenversuch zum Test der Wirkung potentieller Sekundärmetabolite steril (ISOPORE Membranfilter, Millipore, Billerica USA; Kat. Nr. GTTP09030; Ø 90 mm) filtriert und mit 400 ml frischem Probenwasser (siehe 2.3) vermischt. Die Probengläser wurden ohne Pflanze und ohne Filterwatte aber ansonsten unter den bei 2.4.2 beschriebenen Bedingungen für 7 Tage (7T) kultiviert. Pro Ansatz wurden drei Replikate erstellt. Als Nullkontrolle für die Anreicherung durch Sekundärmetabolite diente steril filtriertes, unbehandeltes PW 7T aus dem jeweilig vorausgegangenen Pflanzenversuch, welches ebenso wie das PKW der Pflanzen zu gleichen Teilen mit frischem Probenwasser vermischt und für 7 Tage unter den genannten Bedingungen (2.4.2) inkubiert wurde.

Die **Sekundärmetaboliten**-Versuche, welche zur Untersuchung von Veränderungen im natürlichen Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons bei Inkubation mit an potentiell antibakteriellen Exsudaten angereichertem PW durchgeführt wurden, werden im Überblick in Tab. 3 genannt.

Tab. 3: Überblick über die Versuche zur Beeinflussung planktonischer Bakterien durch Inkubation mit PKW aus einem vorausgegangenen Pflanzenversuch (siehe „verwendetes PKW“).

Versuch	Entnahmetag des Probenwassers zur Inkubation mit PKW	Verwendetes PKW
Mentha-SM	23.01.2008	Mentha
Iris & Mentha 1-SM	26.03.2008	Iris & Mentha 1
Iris 2-SM	16.07.2008	Iris 2
Iris & Mentha 2-SM	19.09.2008	Iris & Mentha 2

2.5 Qualitative und quantitative Analysen des Bakterioplanktons im Probenwasser

2.5.1 Filterung des Probenwassers

400 ml Probenwasser oder konditionierten Probenwasser (2.4) wurden in einer sterilen Vakuumfiltereinheit zuerst über einen 12 – 15 µm Papierfilter (Sartorius, Göttingen, FT-3-101-055, Ø 50 mm) grob, dann über zwei Nitrozellulose Membranen (Whatman GmbH, Dassel; Ø 47 mm) von 3 µm (Kat. Nr. 7193-004) und 1 µm (Kat. Nr. 7190-004) fein vorgefiltert. Nachdem auf diese Weise neben größeren Partikeln auch Algen und andere eukaryotische Einzeller, deren Plastiden 16SDNS enthalten können entfernt wurden, folgte die Feinfiltration. Für diese wurden 60 ml des Filtrates über 0,22 µm Polykarbonat-Membranen (Osmonics Inc., GE Waters and Process Technologies, Hørsholm, Dänemark, K02BP02500; Ø 25 mm) zur Gewinnung der bakteriellen DNS gefiltert. Die anschließende Amplifikation ausgewählter Abschnitte der 16S und der ITS 1 Region (zwischen 16S und 23S rRNS des Gens) des rRNS Gens erfolgte durch Filter PCR (Kirchmann *et al.*, 2001). Wie in 2.5.3 (molekularbiologische Analyse) beschrieben wurden die 0,22 µm Membranfilter für diese, von einer chemischen Extraktion der DNS unabhängigen Methode, nach dem Filtern sofort mit steriler Schere

zerteilt und die gewonnenen 8 Segmente einzeln in 0,2 ml Eppendorf-Gefäßen bei – 20° C eingefroren.

2.5.2 Präparation und mikroskopische Betrachtung von Filtersegmenten zur quantitativen Analyse des Bakterioplanktons aus Inkubationsversuchen von Probenwasser mit Pflanzen

Für quantitative Analysen des Einflusses von Pflanzen auf die Gemeinschaft planktonischer Bakterien im Probenwasser wurden 2 – 3 der gewonnenen Filtersegmente (2.5.1) eingesetzt. Die Filtersegmente wurden vorsichtig in bereits mit 100 µl einer Formaldehyd Lösung [3 %] befüllte 0,2 ml-Gefäße eingebracht und über Nacht bei 8°C gelagert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit SYBRGreen® I (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe) mit einer 1:40 Verdünnung des SYBRGreen® I mit Moviol als Trägersubstanz und Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel (Lunau, 2005; Lunau, 2006). 5 µl der Färbelösung wurden mittig auf ein Deckglas aufgetropft, und mit diesem sofort auf ein ebenfalls mittig auf einem Objektträger platziertes Filterachtel gebracht. Anschließend wurde das Präparat für 20 min im Kühlschrank entwickelt. Bei einer 1000- fachen Vergrößerung (Zeiss Axioskop2, Carl Zeiss, Göttingen mit HBO 50 Fluoreszenzlampe, λ_{Ex} 450 - 490 nm) wurden die Zellen in etwa 50 (genaue Angaben in der jeweiligen Beschreibung des Versuchs) Sichtfeldern ausgezählt und das arithmetische Mittel für jede Probe errechnet.

2.5.3 Amplifikation und gelgestützte Analyse der DNS für qualitative Analysen des Bakterioplanktons

Für eine Filter PCR wurde ein Segment der Filtermembran (gewonnen wie bei 2.5.1 beschrieben) in ein Gefäß mit 50 µl einer PCR Generalmischung ("mastermix") gegeben und dabei darauf geachtet, dass das Segment vollständig eingetaucht war. Die PCR Generalmischung bestand aus 5 µl BSA [1%] (Albumin Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe), 5 µl MgCl₂ (25 mM; Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim), 2 µl von jedem Primer (10 µM), 7,5 µl dNTP mix (10 µM von jedem dNTP) 0,2 µl Polymerase (5 U/µl, TaqPolymerase BioTherm™, Gene Craft) und 5 µl PCR Puffer (10x). Die Sequenzen der Primer lauteten wie folgt vorwärts:

5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCTACGGGAGG CAGCAG-3' (mit GC-Klammer), rückwärts: 5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3'. Sie waren erstmals verwendet worden von Muyzer (Muyzer *et al.*, 1993) bzw. Amann (1992). Ein Fragment von 566 Basenpaaren (bp) wurde mit Hilfe einer Primus advanced PCR Maschine (Peqlab, Erlangen) wie folgt amplifiziert: Denaturierung bei 95°C, 3 min; 37 Zyklen je 30 s, 94°C; dann 54°C je 30 s und 72°C, 1 min sowie einer

abschließenden Verlängerungsphase bei 72°C für 10 min („NORM_PCR“). Bevor dieses Standard Programm verwendet wurde, erfolgte für Proben aus 3 täglichen (3 T) Versuchsansätzen (siehe 3.2.1 und 7.2) die Amplifikation durch ein alternatives, als „TOUCHDOWN_PCR“ bezeichnetes Programm: Denaturierung bei 95°C, 3 min; 10 Zyklen je 30 s 94°C; dann 65°C *annealing* Temperatur (Temperatur zur Bindung des Primers an sein Substrat) je 30s - wobei die *annealing* Temperatur in jedem Zyklus um 1°C gesenkt wurde (= „*touchdown*“). Zum Abschluss jedes Zyklus wurden 1 min lang 72°C gehalten. Nach Abschluss der 10 Zyklen folgen 20 Zyklen mit 94°C je 30s, 55°C „*annealing*“ Temperatur je 30s und abschließenden 72°C je 1min. Die finale Verlängerungsphase entsprach der von NORM_PCR. Dieses Programm war weniger gut als das NORM_PCR Programm zur Analyse von 7 T-Versuchen geeignet und wurde ab dem 2. 7 T-Versuch „Iris 1“ nicht mehr verwendet. Parallel zu den beschriebenen unspezifischen eubakteriellen Primern erfolgte die Anwendung von Primern, die spezifisch an DNS Sequenzen binden, die typisch für eine Bakteriengattung mit vielen phytopathogenen Vertretern sind (2.6). DNS der Gattung *Pseudomonas* - und innerhalb dieser von Stämmen der Art *Pseudomonas syringae* - wurde amplifiziert durch das ITS 1 Region-Primerpaar D21-F/D22-R (Manceau, 1997). Die Sequenzen dieser Primer lauteten: vorwärts:

5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCAGCCGTAGGGGAACCTG
CGG-3' (mit GC-Klammer) und rückwärts: 5'-TGACTGCCAAGGCATCCACC-3'. Die korrekte Amplifikation von wurde durch Elektrophorese von Amplikons in 1% Agarose Gel in TAE Puffer (2 M Tris, 1 M Natrium Acetat, 50 mM EDTA, pH 7,4) überprüft. PCR Amplikons wurden auf einem 6% (wt/vol) Polyacrylamidgel (Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1) mit denaturierendem Gradienten von 35-75% (100% enthalten 40% Formamid und 7 M Harnstoff) in TAE Puffer laufen gelassen. Die Gele (25,4 x 21,0 x 0,75 cm) wurden mit 35 µl Probe und 12 µl Ladepuffer bestückt und über 18 Stunden bei einer Spannung von 100 V entwickelt in einer INGENY PhorU-2x2 Gel Kammer (Ingeny International BV, Niederlande). Eine Mischung von DNS aus 7 verschiedenen eubakteriellen Isolaten (2 γ -Proteobakterien: *Vibrio* sp. & *Pseudoalteromonas* sp., 1 Flavobacteriaceae/Salegentibacter (*Salegentibacter nodsonii*) und 4 Bacillaceae (*Bacillus mycoides*, *Bacillus* sp. YY, *Bacillus* sp. VAN04, *Bacillus* sp. TP1) wurden als PCR Positivkontrolle und als DNS-Standard benutzt. Für die Amplifikation mit *Pseudomonas*- spezifischen Primern wurde analog zum eubakteriellen Standard ein *Pseudomonas*- DNS-Standard (auch PCR Positivkontrolle) aus einer DNS Mischung der 3 im Labor etablierten *Pseudomonas* Stämmen erstellt (*P. syringae* pv. *syringae* DSM Nr. 10604 und *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* DSM Nr. 50287 und *P. fluorescens*. (Siehe auch 2.6). Die Färbung der Gele erfolgte in SYBRGreen® I (Invitrogen Molecular

Probes, Karlsruhe) und die Entfärbung in reinem TAE Puffer. Zur fotografischen Dokumentation wurde ein Bildgewinnungssystem (AlphaInnotech, San Leandro, CA, USA) eingesetzt.

2.5.4 Ausschneiden ausgewählter Banden und Re-Amplifikation der enthaltenen DNS zur Herstellung von DNS-Sonden und zur Sequenzanalyse

2.5.4.1 Ausschneiden ausgewählter Banden, Re – Amplifikation der enthaltenen DNS und Überprüfung der DNS-Amplikons

Banden, welche in vielen DGGE Gelen von Proben (2.4) wiederholt zu sehen und die bei Inkubationsansätzen im konditionierten Wasser im Vergleich zur Nullkontrolle wiederholt deletiert waren („wiederkehrende Banden“) wurden ausgeschnitten. Die DNS wurde aus den gewonnenen Gelstücken eluiert, amplifiziert und für Untersuchungen verwendet. Ausgeschnitten wurden Banden mittig mit einem sterilen Skalpell aus einem DGGE Gel und in ein steriles 0,2 ml – Eppendorfgefäß mit 50 µl PCR Wasser (Ampuwa aqua ad injectabilia, Fresenius, Bad Homburg) transferiert. Die DNS wurde bei 8°C über 14 Tage eluiert und anschließend über NORM_PCR (2.5.3) reamplifiziert. Im Gegensatz zum unter 2.5.3 geschilderten Vorgehen wurde das PCR Wasser (23,3 µl) durch Banden-Eluat ersetzt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Gewinnung und Reamplifikation von Banden–DNS für DNS-Sonden wurden PCR-Amplikons mit bereits positiv geprüften Amplikons („Markierenden Proben“, 2.5.4.2) und dem DNS-Standard (2.5.3) in extra zu diesem Zweck erstellten DGGE Gelen (welche in derselben, bei 2.5.3 beschriebenen Weise hergestellt und entwickelt wurden, wie die Gele, aus deren Banden die Amplikons zur Überprüfung stammten) überprüft (Abb. 7). DNS von Banden, deren Position auf Gelen mit den Bandenpositionen „markierender Proben“ übereinstimmte, wurde wiederum für die Herstellung von DNS-Sonden („markierenden Proben“)(2.5.4.2) oder zur Sequenzierung (2.5.4.3) verwendet.

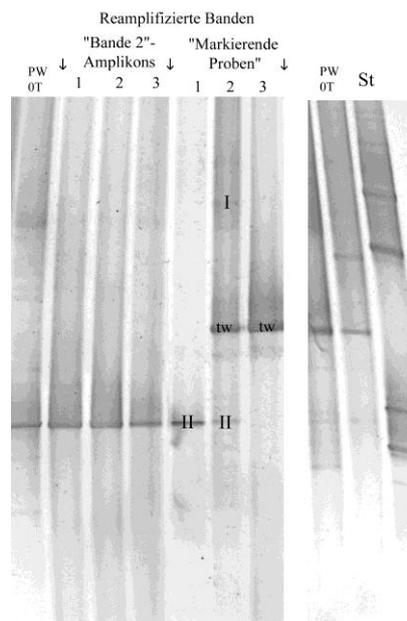


Abb. 7: Beispiel eines DGGE Gels zur Überprüfung der Amplikons von aus ausgeschnittenen Banden reamplifizierter DNS. Im abgebildeten Gel wurden die korrekten Positionen von Sonden-DNS aus „wiederkehrenden Banden“ („Bande 2“, „tw“) (2.5.4.2) kontrolliert. „Markierende Proben“ 1, 2, 3 sind bereits überprüfte DNS-Sonden (2.5.4.1) für (in diesem Beispiel) 1: „Bande 2“ (II); 2: „Bande 1“ (I), „Bande 2“, „tw“ (tw); 3: „tw“. PW OT Proben sind Amplikons aus frisch gefiltertem (0 T inkubiertem) Probenwasser des Gießwasserteichs verschiedener Tage (2.3) zur Verifikation der untersuchten Bandenpositionen durch eine Naturprobe. St bezeichnet den DNS-Standard (2.5.3).

2.5.4.2 Herstellung von DNS-Sonden zur Identifikation wiederkehrender Banden in Gelen

Überprüfte DNS-Sonden (2.5.4.1) wurden in Gelen zur Analyse der Bandenmuster von Proben (2.4) als „markierende Proben“ verwendet und auf den Gelbildern als solche gekennzeichnet. Es wurden auch Mischungen von überprüften Amplikons der DNS von 3 wiederkehrenden Banden (vom Autor benannt als „Bande 1“, „Bande 2“, „tw“) in TAE Puffer als „markierende Proben“ eingesetzt (Abb. 7). Gele, die zu einem Zeitpunkt erstellt wurden, zu dem keine DNS-Sonde der beschriebenen Art zur Verfügung stand, oder in denen verwendete „markierende Proben“ nicht zur Ausprägung kamen wurden auf den in 2.5.4.1 beschriebenen Gelen zur Überprüfung aufgetragen. Mit den DNS-Sonden war es nachträglich möglich zu prüfen, ob in Proben eines Versuches an

Positionen wiederkehrender Banden tatsächlich Banden ausgebildet wurden, oder ob die Position nicht mit denen geprüfter Marker übereinstimmte.

2.5.4.3 Sequenzierung von reamplifizierter DNS aus ausgeschnittenen Banden

Die Konzentration der DNS wurde analog Martens-Habbena und Sass (2006) bestimmt. Mithilfe eines λ -DNS Standards (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe) wurde in einer Fluoreszenzmessung mit dem FLUOstar OPTIMA Lesegerät (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg) nach Anfärben der DNS mit SYBRGreen® I (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe) die Menge an DNS in jeder Probe ermittelt. Hierfür wurde die Dichte der einzelnen Proben mit einer Fluoreszenzlampe mit Wellenlängen Filter ($\lambda_{\text{ex}} = 485$) bei $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm gemessen und mithilfe des Standards daraus die Menge und letztendlich die Konzentration der DNS in ng/ μ l errechnet. Die DNS-Dichte einzelner Proben wurde darauf unter Nutzung der oben genannten Wellenlänge mit demselben Filter bestimmt. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. DNS sowie SYBRGreen wurden für die Messungen in TE-Puffer (20 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Endkonzentration der DNS in Proben wurde mit TE-Puffer auf 20 ng/ μ l eingestellt. Zur Sequenzierung wurden die Proben an SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH geschickt. Dort erfolgte eine Reinigung der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese, gefolgt von einer halbautomatischen Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977). Für die Sequenzierung wurden Proben der „Bande 1“ und der „Bande 2“ ausgewählt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des BioEdit Sequence Alignment Editors (Copyright ©1997-2005 Tom Hall) in ein *alignment* gebracht. Gaps wurden gewertet als „*mismatch*“. Aus mehreren Sequenzen mit Homologien von mehr als 400 bp wurden Konsensus Sequenzen erstellt und mit der NCBI Eubacteria Datenbank im Netz abgeglichen:

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi).

2.6 Untersuchung antibakterieller Effekte des PKW von *Iris pseudacorus*

Die Untersuchung wurde mit PKW von *I. pseudacorus* (IKW) und mit der Probenwasser-Nullkontrolle (PW 7T) des **Iris & Mentha 2**-Versuchs durchgeführt. Als Testkulturen wurden die phytopathogenen Pseudomonaden *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* DSM Nr. 10604 und *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* DSM Nr. 50287 eingesetzt. Jeweils 3 Proben der beiden Ansätze (IKW und PW 7T) wurden in je einer sterilen Schottflasche gesammelt (~ 1200 ml je Ansatz) und über 0,22 µm (Polykarbonatfilter, siehe 2.5.1) steril filtriert. Aus jedem Ansatz wurden 300 ml in einer sterilen 500 ml- Schottflasche bei leicht geöffnetem Deckel und – 20°C über Nacht in die Tiefkühltruhe gestellt. Am nächsten Tag wurden Exsudate im Probenwasser durch Lyophilisation (CHRIST Alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) aufkonzentriert. Nachdem das Volumen auf etwa 2 ml eingeeengt worden war, wurde er in 30 ml sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und die Mischung nochmals über 0,22 µm (2.5.1) steril filtriert. Die Testkulturen, mit denen der Biotest durchgeführt wurde, wurden aus gefriergetrockneten Kulturen der DSMZ Stämme etabliert. Die Kultivierung beider Stämme erfolgte im Schüttelkolben in DSMZ Medium 1 („Nutrient Agar“: 5 g Pepton; 5 g Fleischextrakt pro 1 L Wasser für Flüssigmedium; pH 7,0) bei 30°C im Brutschrank. Es wurden neue Cryokulturen von beiden Stämmen erstellt. Hierzu wurden je 5 ml aus jeder Kultur mit 1 ml 86 % Glycerin verdünnt und bei -80°C gelagert.

Zum Test auf eine Wachstumshemmung mit dem beschriebenen Exsudat-Konzentrat (IKW) im Vergleich zu der Nullkontrolle (PW 7T) und einer Positivkontrolle (Antibiotikum Zeocin [75 µg/ml]) wurden aus den Cryokulturen wachsende Kulturen etabliert. Inkubation von je 3 Kulturen beider Bakterienstämme erfolgte für 48 h bei 30°C unter kontinuierlichem Schütteln in 50 ml DSMZ Medium 1. Vor Versuchsstart wurde die optische Dichte jeder Kultur auf 0,6 eingestellt (OD bei 600 nm). Aus jeder Kultur wurden 4 ml entnommen und pelletiert (42.000 g (Rotor A 20.1) 22 min; 40°C; Avanti J-25; Beckman Coulter, Inc.; USA). Die verdichteten Zellen wurden gewaschen und für Ansätze in 4 ml des jeweiligen Substrates (IKW, PW 7T, Antibiotikum) wiederaufgenommen. Als Antibiotikum zur Positivkontrolle der Wachstumshemmung wurde Zeocin (Invivogen, Toulouse, Frankreich) in Probenwasserkonzentrat (PW 7T) mit einer Endkonzentration von 75 µg/ml verwendet. Nach Inkubation von weiteren 48 h unter den oben geschilderten Bedingungen in 50 ml Erlenmeyerkolben wurde die Dichte der Proben aus den Ansätzen in dem bei 2.5.4.3 beschriebenen

Fluoreszenzspektrometer (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg) gemessen. Je 150 μ l in den Konzentrationen 1:1; 1:10; 1:100 aus 3 Kulturen wurden pro Ansatz eines Stammes in schwarze „96-well“ Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Essen) pipettiert. Die Färbung der Bakterienzellen erfolgte durch jeweilige Zugabe von 50 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreen[®] I (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe) [Endkonzentration: 1x] in TE-Puffer (20 mM Tris, 50 mM EDTA, pH: 8,0). Die Dichte der Kulturen in den einzelnen Vertiefungen („wells“) wurde mit einer Fluoreszenzlampe mit Wellenlängen Filter ($\lambda_{\text{ex}} = 485$) bei $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm gemessen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Die Mittelwerte aus 3 Messungen von 3 Kulturen (Replikaten) abzüglich der Nullkontrolle wurden bestimmt und die Werte durch Vergleich mit den 1:10 und 1:100 Verdünnungen jedes Ansatzes verifiziert.

2.7 Statistische Analyse

Für die Analyse der Banden in DGGE Gelen wurde aus Bandenmustern verschiedener Proben eines Geles eine Boole'sche Matrix (bestehend aus 0 für Bande fehlt und 1 für Bande vorhanden in der betreffenden Spur) erstellt. Mit dem Programm PRIMER-E Version 5 (PRIMER-E Ltd, Plymouth, England) wurden die Daten statistisch ausgewertet. Hierfür wurde eine Bray-Curtis Clusteranalyse mit Transformation über die Quadratwurzel durchgeführt. Mithilfe der Clusteranalyse wurden Dendrogramme erstellt, welche die Ähnlichkeiten im Bandenmuster visualisierten. Eine einseitige Analyse der Ähnlichkeit (Analysis of Similarity bezeichnet als ANOSIM) gab Auskunft über die statistische Signifikanz der Clusteranalyse. Die Normalverteilung von Proben des Biotests wurde mit Hilfe von Shapiro-Wilk's W-Test überprüft. Die Nullhypothese für die Übereinstimmung von Ergebnissen der Filterauszählung (2.5.2) wurde mit dem Student's t-Test für unabhängige Variablen getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Saisonaler Wandel der Zusammensetzung der Gemeinschaft planktonischer Bakterien in unbehandeltem Teichwasser

Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf des Jahres 2008 gezogenen Proben des Probenwassers zeigten variable Bandenmuster (Abb. 8), die vom Jahresverlauf abhängig waren. Es bildeten sich in Bezug auf Übereinstimmungen im Bandenmuster 3 dominante *cluster* (Gruppen) aus (Abb. 9). Die Juni-Probe bildete dabei eine von den Proben anderer Sammelzeitpunkte isolierte Gruppe und stimmte im Bandenmuster mit den anderen nur zu 42 % überein. Die anderen beiden Gruppen, welche sich aufgrund von relativen Übereinstimmungen im Bandenmuster von 66 %, bzw. 65 % gebildet hatten bestanden aus den im Mai, Oktober, Dezember- bzw. den im September, Juli gezogenen Gießwasserproben. Im Untersuchungszeitraum variierte die Anzahl der in Probenwasserproben ausgebildeten Gelbanden von 9 (im Mai) bis 13 (im Juli). Aufgrund von Übereinstimmungen im Schmelzverhalten bildeten sich 2 Banden in allen Proben an derselben Stelle. Dies wurde mithilfe der markierenden Sonden (siehe Abschnitt 2.5.4.2), die in allen Gelen zum Einsatz kamen, verifiziert (Abb. 7). Die beiden Banden werden im Folgenden als „Bande 2“ und „tw“ bezeichnet. Zum Vergleich von bakteriellen Gemeinschaftsprofilen durch Similaritätsanalyse (ANOSIM) wurden insgesamt 22 Bandenpositionen verwendet. Die Analyse resultierte in einem pauschalen

R-Wert von 1,0 bei einem Signifikanzintervall von 0,1 %.

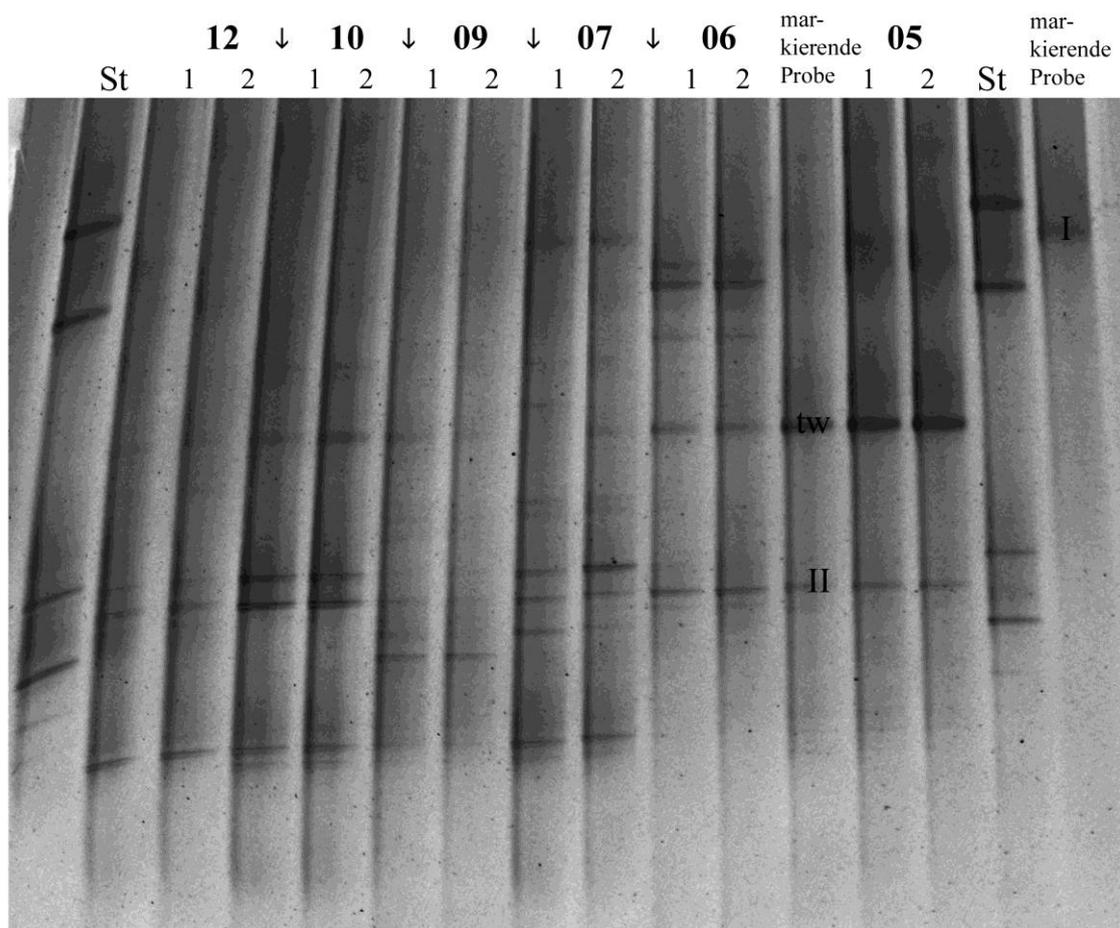


Abb. 8: Bandenmuster der amplifizierten 16S rDNS von Proben im untersuchten Teich, welche aus Wasserproben stammt, die zu verschiedenen Monaten des Jahres 2008 genommen wurden. Benennung erfolgte nach Sammelmonat (z. B. 12 für Sammelmonat Dezember usw.). St bezeichnet eine Mischung eubakterieller DNS Isolate, die als Marker und als Positivkontrolle der PCR diente. Markierende Proben zeigen Positionen wiederkehrender Banden in diesem Gel für die „Bande 1“ (I im Bild), „Bande 2“ (II) und „tw“.

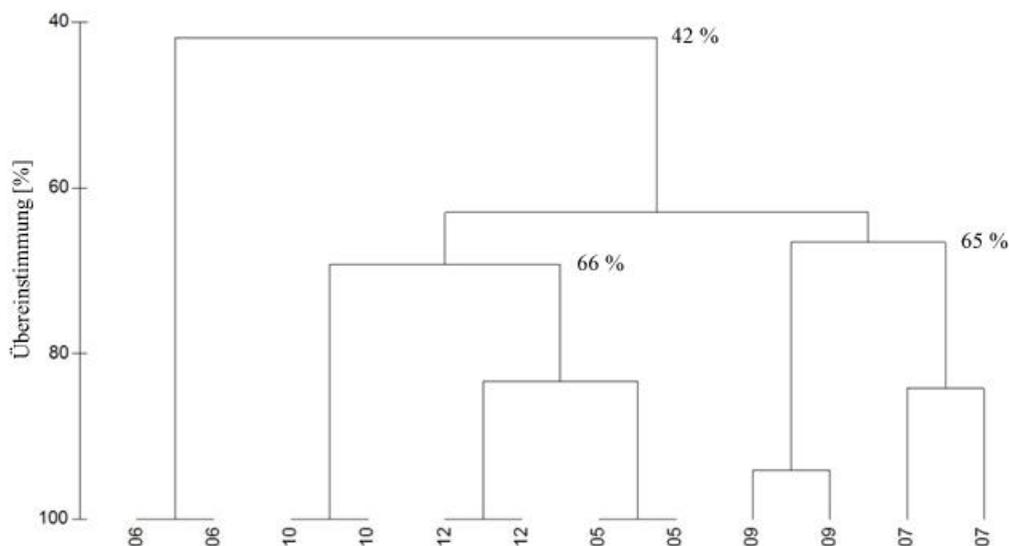


Abb. 9: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Probenwasser2008**-Gels (Abb. 8). Proben wurden nach Sammelmonat benannt (z. B. 12 für Monat Dezember usw.). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

3.2 Qualitative und quantitative Charakterisierung von Bakterioplankton in Inkubationsansätzen von Teichwasser mit *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica*

3.2.1 Qualitative Charakterisierung des Bakterioplanktons in Inkubationsansätzen von Teichwasser mit wild aufgewachsenen Pflanzen im Jahresverlauf

Insgesamt zeigten sich bei allen Probenwasserteich-Proben, welche über 7 Tage (7T) mit potentiell antimikrobiellen Sekundärmetaboliten in Anwesenheit von Wildpflanzen¹ der untersuchten aquatischen Makrophyten *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* inkubiert wurden, eindeutige Veränderungen im Bandenmuster gegenüber der Nullkontrolle aus unbehandelt über 7T inkubierten Probenwasserteich-Proben. Die Zahl der Banden, welche im Vergleich zur Nullkontrolle in mit Pflanzen inkubierten Proben nicht ausgebildet wurden, war jedoch stark abhängig von der Zahl insgesamt im unbehandelten Probenwasser vorhandener Banden. Diese Zahl war bei dem gewählten Versuchsteich im Laufe des Projektzeitraums von 3 Jahren saisonal variabel und schwankte von 15 Banden in Wasserproben der Monate Januar (Abb. 10) und

August (Abb. 19) bis zu 2 ausgebildeten Banden in Proben des Monats März (Abb. 12). Dennoch waren in jedem der durchgeführten Versuche mit Pflanzen der Arten *I. pseudacorus* und *M. aquatica* in Inkubationsansätzen Banden, welche in Proben der Nullkontrolle ausgebildet waren, nicht vorhanden. Die Konzentration der betreffenden DNS war in den Ansätzen so stark reduziert, dass es auch nach der PCR nicht möglich war diese nachzuweisen. Im Folgenden wird das Verschwinden von Banden in Probenansätzen im Vergleich zur Nullkontrolle auch als „Bandendeletion“ bezeichnet. Die Zahl insgesamt ausgebildeter Banden war in den Proben des unbehandelten Probenwassers nicht immer größer, als in den Proben der Inkubationsansätze mit Pflanzen. In den meisten Versuchen entstanden zusätzliche Banden im mit Exsudaten von *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* angereicherten Probenwasser. Drei mithilfe der beschriebenen „markierenden Proben“ (2.5.4.2) in allen Versuchen verfolgte Banden wurden in den meisten der unbehandelten Probenwasserproben nachgewiesen. Ihr Erscheinen bzw. ihre Deletion wurde in mit Pflanzen über 7 Tage inkubiertem Probenwasser untersucht. Es zeigte sich, dass eine – mit dem Namen „Bande 1“ benannte - Bande in allen Versuchen in Anwesenheit von Pflanzen deletiert wurde, wenn sie im in diesem Versuch eingesetzten unbehandelten Teichwasser ausgebildet war. Die in 4 von 6 Experimenten in Proben der Probenwasser-Nullkontrolle sichtbare „Bande 2“ wurde von *Iris pseudacorus* in Inkubationsansätzen immer, von *Mentha aquatica* jedoch nie deletiert. Dies wurde insbesondere bei Versuchen mit Inkubationsansätzen beider Pflanzenarten im Vergleich und im Vergleich zur Nullkontrolle deutlich (Abb. 17). Die dritte verfolgte Bande, die „tw Bande“ war im 7 Tage alten unbehandelten Teichwasser deutlich seltener sichtbar, als im frisch nach Probennahme gefilterten Probenwasser. Diese Bande wurde durch die Anwesenheit von Pflanzen im Probenwasser nicht beeinflusst. Der pH Wert und der Gehalt an gelösten Stickstoff (Nitrat, Nitrit)- und Phosphor (Phosphat)-Verbindungen im Wasser blieben über die Dauer der Inkubationsversuche mit Pflanzen stabil (pH 6,5 - 7; $\text{NO}_3^- \leq 5$; $\text{NO}_2^- \leq 0,1$; $\text{PO}_4^{3-} \leq 0,5$; siehe 7.1). Es waren anhand der angegebenen N- und P-Verbindungen keine Anzeichen von Nährstoffzehrung beobachtbar. Der Testversuch mit *M. aquatica* zur Erhöhung der löslichen Nährsalze im Probenwasser durch Düngung (trotz 5 x unter der vom Hersteller empfohlenen Konzentration) (siehe 2.4.2) führte nicht zu einem deutlichen Unterschied der gedüngten zu den ungedüngten Proben (7.2). Da zudem die Vorfiltration des Wassers dieser Vorversuche aufgrund verstärkten Algenwachses dreimal so lange dauerte, wie bei den Versuchen ohne Düngereinsatz, wodurch die Kontaminationsgefahr durch DNS

¹ Wie unter 2.1 zur Pflanzenkultivierung beschrieben, wurden „Wildpflanzen“ der Akklimatisierungskultur für gereinigte Wildpflanzen entnommen, während „Sterilpflanzen“ aus

der Algen-Plastiden unverhältnismäßig stark stieg wurde auf eine künstliche Gabe von N- und P- Nährsalzen in den Ansätzen verzichtet. Die Inkubationszeit von 7T für Versuche hat sich bewährt, um Veränderungen im Bandenmuster des Probenwasser-Bakterioplankton in Inkubationsansätzen mit *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* zu beobachten. In Versuchen mit Inkubationszeiten von 3 Tagen ergaben sich in den Proben von mit Pflanzen inkubiertem Probenwasser gegenüber der Nullkontrolle (PW 3T) keine Veränderungen im Bandenmuster (7.2).

Iris 1 (Entnahme des Probenwassers: 08/2006)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des Versuchs waren in Proben des unbehandelten 7T-Probenwassers (PW), der Nullkontrolle für das durch Inkubation mit *I. pseudacorus* behandelte Probenwasser, 15 Banden sichtbar. Im durch Inkubation mit *I. pseudacorus* konditionierten Probenwasser (IKW) zeigten sich Veränderungen im Bandenmuster gegenüber der Nullkontrolle (Abb. 10). Die „Bande 1“ ist eine von 6 in IKW Proben im Gegensatz zur Nullkontrolle nicht vorhandenen Banden. Alle in folgenden Gelen verwendeten „Bande 1“- Marker gehen auf die aus dem DGGE Gel dieses Versuches (**Iris 1**) ausgeschnittene und reamplifizierte Bande zurück (gemäß dem in 2.5.4.1 beschriebenen Verfahren).

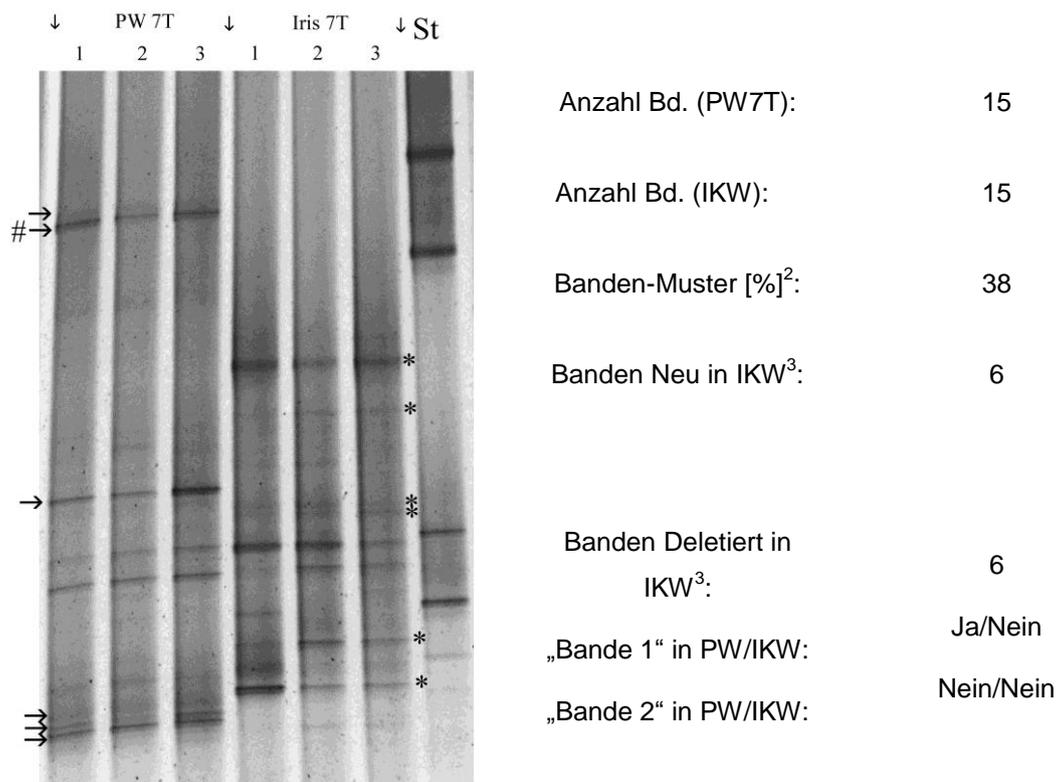


Abb. 10: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 1**-Versuchs. PW 7T bezeichnet Proben der Probenwasser-Nullkontrolle; Iris 7T sind die Proben des mit *I. pseudacorus* inkubierten Probenwassers. St bezeichnet den DNS-Standard. Pfeile (→) kennzeichnen Banden, welche in Proben des IKW im Gegensatz zu denen des unbehandelten Probenwassers (PW 7T) nicht ausgebildet wurden. „*“ markiert im Gegensatz zur Nullkontrolle neu gebildete Banden. „#“ neben dem Pfeil kennzeichnet die danebenstehende, im Iris-Ansatz deletierte Bande als wiederkehrende, durch „markierende Proben“ verfolgte Bande (Hier „Bande 1“).

Aufgrund der geringen Zahl verglichener Ansätze, resultierte die ANOSIM in einem allgemeinen R-Wert von 1 und einem Signifikanzintervall von 10% und war damit statistisch nicht relevant. Dennoch wird das Dendrogramm gezeigt, um die in den Gelbildern vorhandenen Unterschiede im Bandenmuster übersichtlich darzustellen (Abb. 11).

² Relative Übereinstimmung der Bandenmuster in PW und IKW in Prozent

³ Im Vergleich zu Proben des unbehandelten Probenwassers in Proben des IKW neu entstandene, bzw. deletierte Banden.

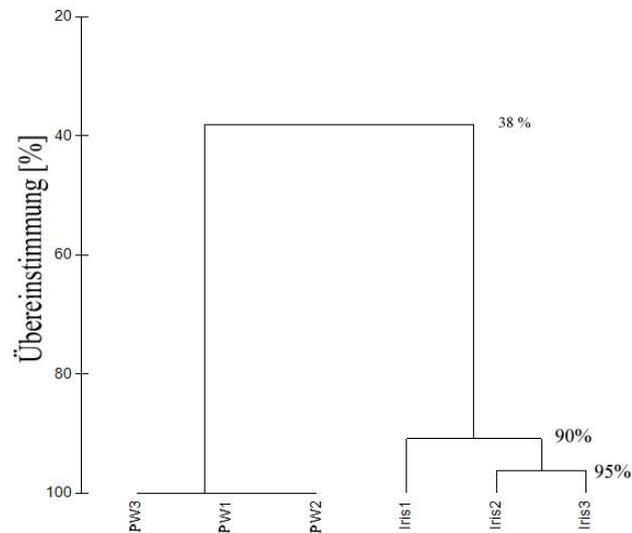


Abb. 11: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris 1**-Gels (Abb. 10). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Iris & Mentha 1 (Entnahme des Probenwassers: 03/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 1**-Versuchs bildeten sich in der Nullkontrolle (PW 7T) 2 Banden aus. Im durch Inkubation mit Pflanzen konditionierten Probenwasser (PKW) wurde im Ansatz mit *M. aquatica* (MKW) eine dieser Banden, im Inkubationsansatz mit *I. pseudacorus* (IKW) wurden beide Banden deletiert (Abb. 12). Innerhalb eines Wiederholungslaufs von Proben aus den PW 7T und Iris 7T Ansätzen des **Iris & Mentha 1**-Versuchs wurde gezeigt, dass die oberste der deletierten Banden nicht der „Bande 1“ aus **Iris 1** entsprach (siehe 7.4 a). Die zweite, deutliche Bande, welche im Vergleich zum unbehandelten Giesswasser im IKW fehlte, wurde ausgeschnitten. Die daraus eluierte DNS wurde nach Reamplifikation in späteren Gelen als Marker eingesetzt und als „Bande 2“ bezeichnet.

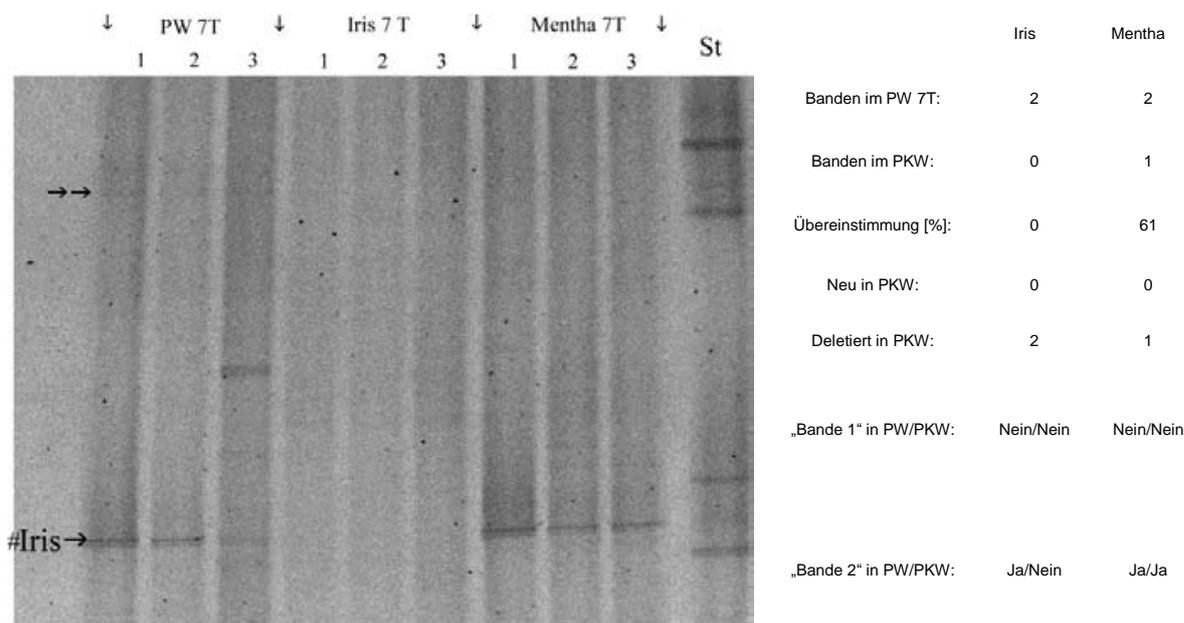


Abb. 12: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha-1** Versuchs. Die durch Doppelpfeil („→→“) gekennzeichnete Bande erschien in keinem der beiden Pflanzen- Inkubationsansätze (Iris 7T, Mentha 7T) im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (PW 7T). Die durch „#Iris→“ kenntlich gemachte Bande wurde nur im Iris-Ansatz ausgeschaltet. Das „#“ kennzeichnet sie als wiederkehrende Bande (hier „Bande 2“).

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern in diesem Versuch ergab ein Signifikanzintervall von 10 % und einen pauschalen R-Wert von 1.

Iris 2 (Entnahme des Probenwassers: 07/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 2**-Versuchs kamen in der Nullkontrolle (PW 7T) 8 Banden vor (Abb. 13). Die erste der Banden fehlte in allen 6 Proben aus dem IKW-Ansatz im Vergleich zur Nullkontrolle. Durch einen wiederholten Gellauf der PW 7T Proben dieses Ansatzes mit „markierenden Proben“ (2.5.4.2) wurde die Übereinstimmung der im IKW deletierten Bande mit der wiederkehrenden „Bande 1“ aus dem **Iris 1**-Versuch verifiziert (7.4 b). In Gegenwart

von *I. pseudacorus*-Pflanzen kam es demnach in diesem Versuch zur Deletion der „Bande 1“.

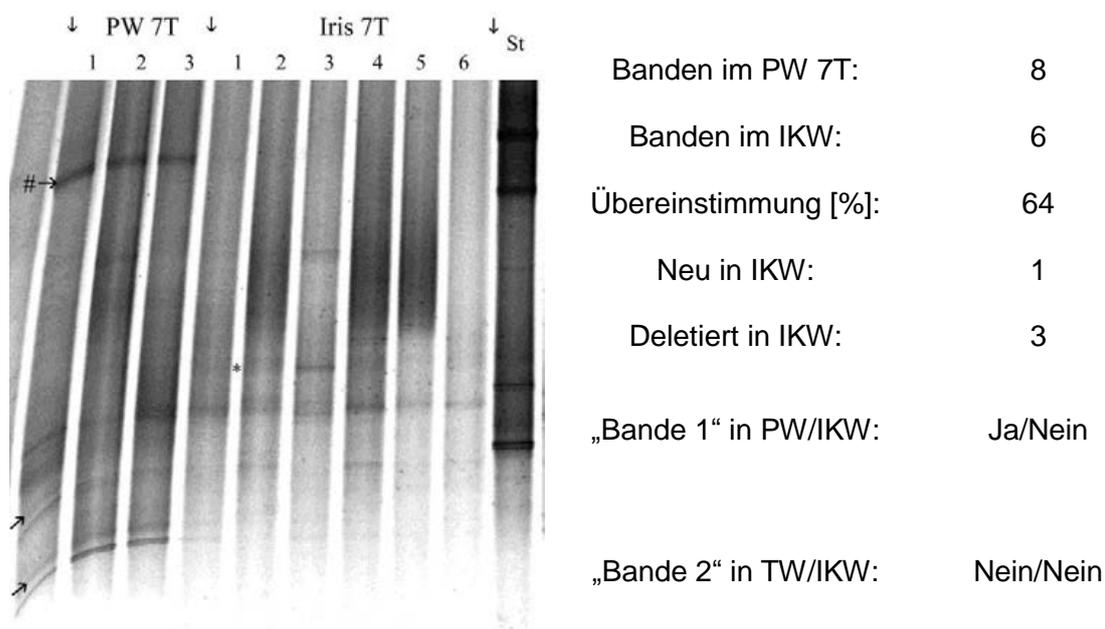


Abb. 13: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 2**-Versuchs. Mit „#→“ wurde die mit der wiederkehrenden „Bande 1“ übereinstimmende Bande gekennzeichnet. Mit „*“ wurde eine Bande als spezifisch für Proben des PKW (hier IKW) bezeichnet. „→“ kennzeichnet Banden, die in Proben aus dem Iris-Inkubationsansatz im Gegensatz zum unbehandelten TW nicht zu sehen sind. Aufgrund der Verzerrung im Gelbild wurden die Pfeile der schräg abgebildeten Banden der Richtung der Bande die sie markieren angeglichen.

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern ergab in diesem Versuch ein Signifikanzintervall von 1 % und einen pauschalen R-Wert von 1,2. Die relative Übereinstimmung zwischen den 3 PW 7T und den IKW- Proben betrug 84 % (relativer Unterschied: 16 %). Die Bandenmuster der Proben 1, 2, 3 und 4, 5, 6 des IKW stimmten untereinander jeweils zu mindestens 92 % bzw. 91 %, insgesamt aber zu 88 % relativ überein (relativer Unterschied: 12 %) (Abb. 14).

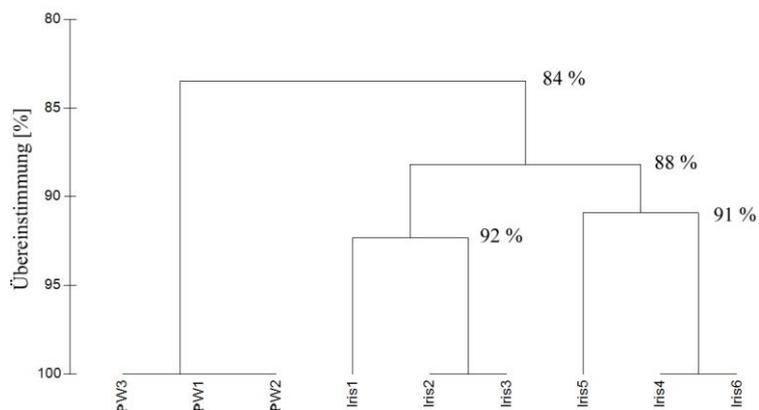


Abb. 14: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris 2**-Gels (Abb. 13). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Iris 3 (Entnahme des Probenwassers:07/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 3**-Versuchs waren 13 Banden in der Nullkontrolle (PW 7T) erkennbar (Abb. 15). Durch direkt auf das Gel aufgetragene „markierende Proben“ (2.5.4.2) war die Identifikation wiederkehrender Banden im Versuch möglich. Beim Vergleich des unbehandelten 7 Tage alten Probenwassers (PW 7T) mit 2 Proben des am Tag der Probenahme frisch gefilterten Probenwassers (PW 0T) zeigte sich ein Alterungseffekt. Die Proben aus dem frisch gefilterten PW wiesen auf dem Gel 3 Banden mehr auf, als die Nullkontrolle. Darunter war auch die „tw“ Bande (aufgrund geringerer Intensität als in der „markierenden Probe“ schwer auf dem gedruckten Bild zu erkennen).

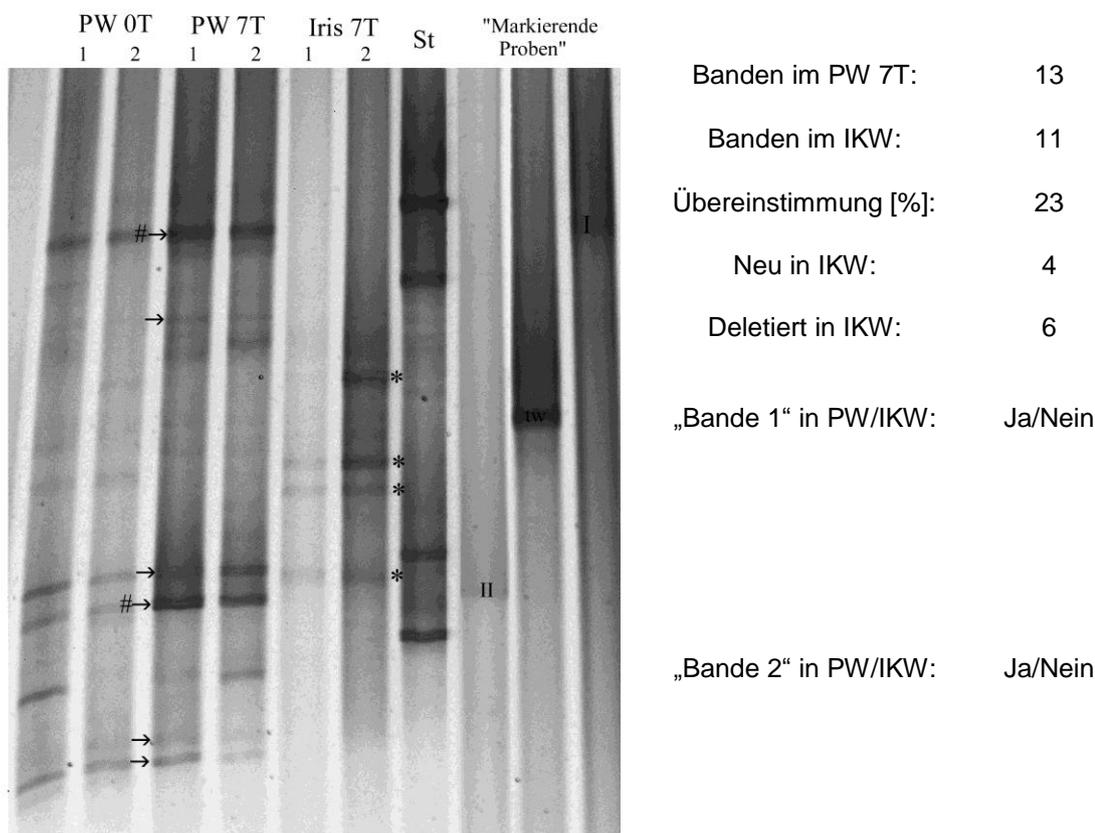


Abb. 15: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 3**-Versuchs. Im Vergleich zur Nullkontrolle in Proben aus IKW-Ansätzen zusätzlich entstandene Banden wurden durch das Symbol „*“ gekennzeichnet. Das Symbol „→“ weist auf Banden, welche in Proben aus IKW im Vergleich zu Proben aus PW 7T fehlten. „wiederkehrende Banden“ wurden zusätzlich durch ein Kreuz „#“ markiert. „Markierende Proben“ zeigen die Positionen der wiederkehrenden Banden „Bande 1“ (I), „Bande 2“ (II), „tw“ (tw) an.

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern ergab einen pauschalen R-Wert von 1 und ein Signifikanzintervall von 6,7 %. Im Vergleich der Proben aller Ansätze aus unbehandeltem Probenwasser (PW 0T und PW 7T) mit denen aus Ansätzen von IKW ergab sich eine relative Übereinstimmung der Bandenmuster von 23 % (Abb. 16). Zur Analyse der relativen Ähnlichkeit von Bandenmustern wurden die Proben aus dem frisch gefilterten Teichwasser mit einbezogen, um den durch den Alterungseffekt entstandenen Unterschied zwischen PW 7T und PW 0T Proben zu erfassen.

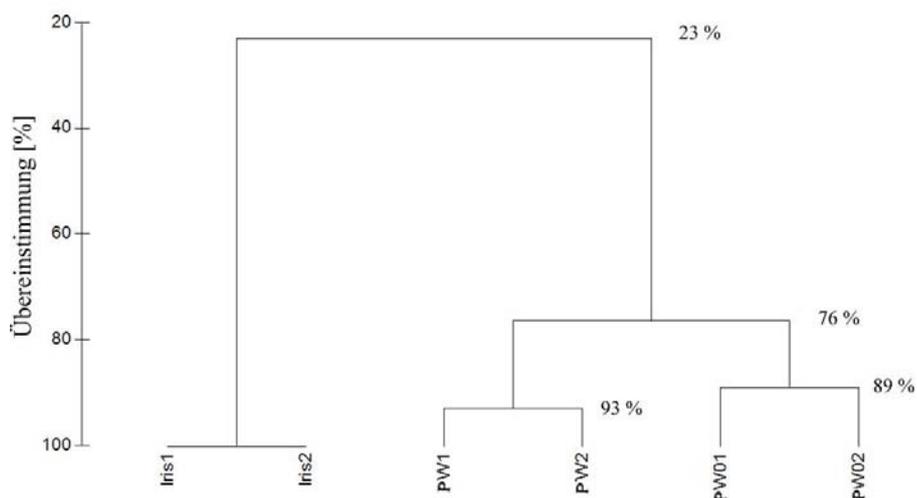
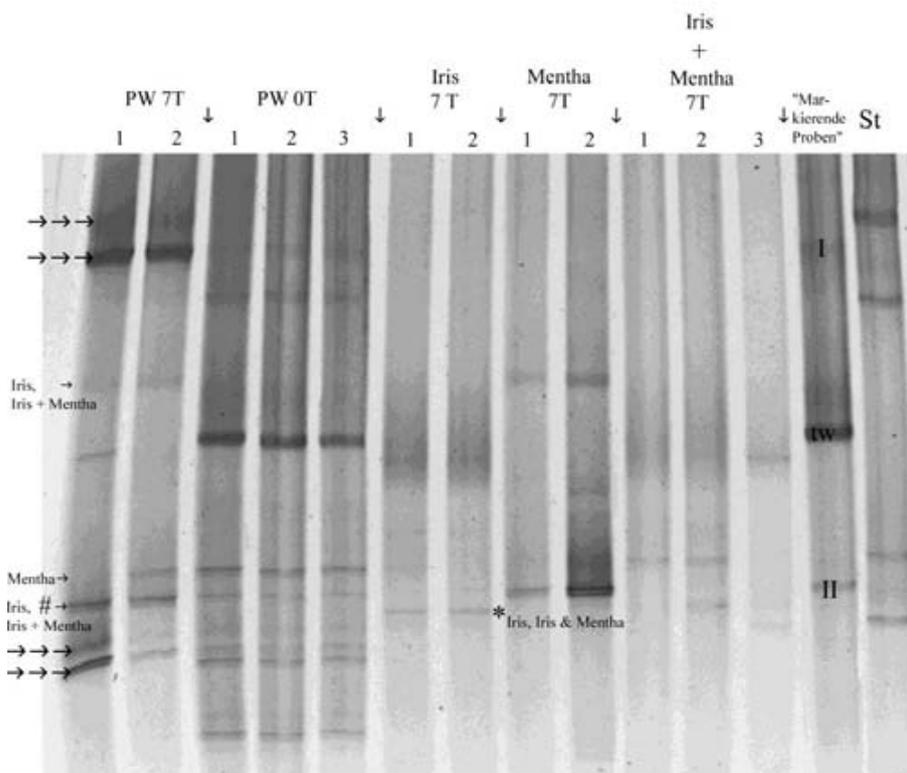


Abb. 16: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris 3**-Gels (Abb. 15). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Iris & Mentha 2 (Entnahme des Probenwassers: 09/2008)

Vor dem zweiten Versuch zum Test der Auswirkung der Pflanzen-Inkubation des Bakterioplanktons im Probenwasser mit beiden Pflanzenarten wurde mittels DGGE sichergestellt, dass die planktonische Bakteriengemeinschaft des untersuchten Teichs mehr als 2 Banden ausbildete (Vgl. **Iris & Mentha 1**, Abb. 12). Im PW 7T waren 8 Banden zu sehen (Abb. 17). Alle Positionen wiederkehrender Banden wurden durch „markierende Proben“ (2.5.4.2) im PW 7 T des Versuchs gekennzeichnet. Die „Bande 2“ des PW 7T war von den 3 verschiedenen Pflanzenansätzen („Iris“- , „Mentha“- Einzelansätze und „Iris + Mentha“- Kombinationsansatz mit beiden Pflanzen in einem Inkubationsglas) ausschließlich im „Mentha“-Einzelansatz zu sehen. In diesem Versuch wurde die Bande nur in Anwesenheit von *I. pseudacorus*- Pflanzen deletiert. Eine weitere Bande war ebenso wie die „Bande 2“ nur in Anwesenheit einer *I. pseudacorus*-Pflanze im Ansatz („Iris“, „Iris + Mentha) deletiert, gehörte aber nicht zu den wiederkehrenden Banden. Die 3 PW 0T Proben stimmten im Bandenmuster überein.

Beim Vergleich der 7T und 0T alten Probenwasserproben war ein Unterschied in der Bandenverteilung sichtbar.



	Iris ⁴	Mentha ⁴
Banden im PW 7T:	8	8
Banden im PKW:	3	3
Übereinstimmung [%]:	7,5	25
Neu in PKW:	1	0 ⁵
Deletiert in PKW:	6	5
„Bande 1“ in PW/PKW:	Ja/Nein	Ja/Nein
„Bande 2“ in PW/PKW:	Ja/Nein	Ja/Ja ⁶

⁴ Zusammengefasst sind Daten von Pflanzen-Ansätzen, in denen *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* sowohl in Einzelansätzen, als auch im gemeinsamen Ansatz „Iris & Mentha“ (Kombinationsansatz) im Probenwasser inkubiert wurden.

⁵ Die Bande war im Kombinationsansatz beider Pflanzen „Iris & Mentha“ zu sehen, im „Mentha“-Einzelansatz jedoch nicht.

⁶ Zur Deletion dieser Bande kam es nur, wenn *I. pseudacorus* im Ansatz anwesend war. Im „Mentha“- Einzelansatz ist die Bande zu sehen, im „Iris & Mentha“- Ansatz hingegen nicht.

Abb. 17: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 2**-Versuchs. Drei Pfeile („→→→“) markieren Banden, welche in allen 3 Inkubationsansätzen mit Pflanzen deletiert wurden. Erfolgte die Deletion nur in manchen der Ansätze, so wurde dies durch Namenskürzel neben dem Pfeil angegeben („Iris, Iris + Mentha →“; „Mentha →“). „Markierende Proben“ kennzeichnen die Lage von „Bande 1“ (I) und „Bande 2“ (II) sowie die der „tw“ Bande. Waren in PKW-Proben deletierte Banden „wiederkehrende Banden“, wurden sie durch ein zusätzliches „#“ vor dem Pfeil gekennzeichnet. St bezeichnet den DNS-Standard. Eine spezifisch in Pflanzenansätzen sichtbare Bande wurde durch das Symbol „*“ markiert, rechts neben diesem stehen die Namen der Ansätze auf die das Vorkommen der Bande beschränkt war.

Bei der statistischen Auswertung des abgebildeten Gels (Abb. 17) wurde ein pauschaler R-Wert von 1 bei einer statistischen Signifikanz von 0,1 % errechnet. Für die Erstellung der dem Dendrogramm zu Grunde liegenden Similaritätsmatrix wurden die Werte des Bandenmusters der 3. „Iris + Mentha“- Spur nicht mit einbezogen. Beim Vergleich der PW 7T- und der PW 0T- Proben zeigte sich ein Unterschied von 30 % im Bandenmuster (Vgl. 24 % in Abb. 16, **Iris 3**-Versuch).

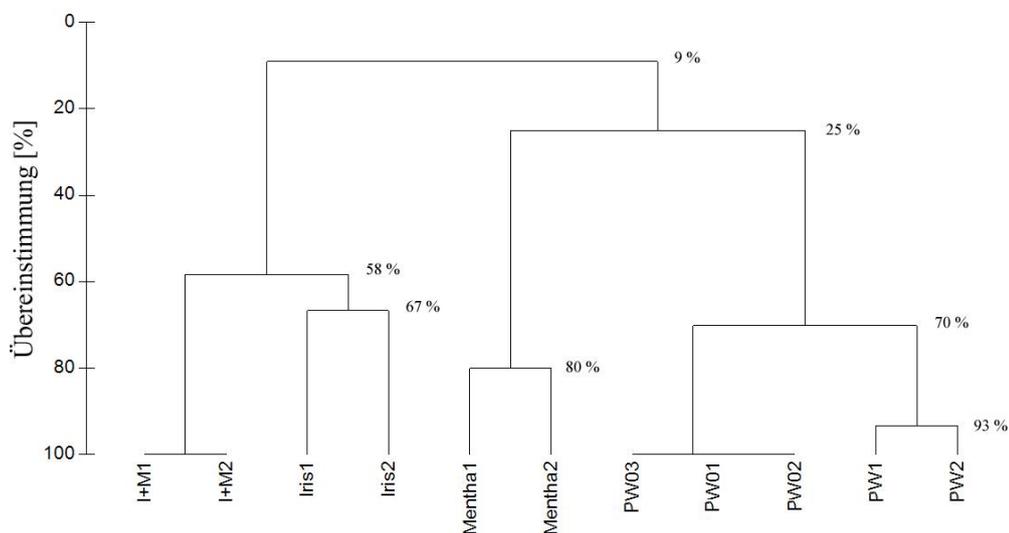


Abb. 18: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris & Mentha 2**-Gels (Abb. 17). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent. PW 0 entspricht PW 0T, PW entspricht PW 7T. I+M bezeichnet Proben des Ansatzes „Iris + Mentha“.

Mentha (Entnahme des Probenwassers: 01/2008)

Anmerkung: Aus dem Gel des Versuchs wird der Teil mit den Proben aus *M. aquatica*- Inkubation von Probenwasser gezeigt, welcher durch wild aufgewachsene Mentha-Pflanzen gewonnenen wurde. Die Analyse des Gesamtgels inklusive des durch Inkubation mit steril aufgewachsenen *M. aquatica*- Pflanzen gewonnenen MKW folgt in Abschnitt 3.4.

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs waren 15 Banden im PW 7T sichtbar (Abb. 19). Die PW 0T Probe war in einem separaten Gel für Probenwasserproben mit markierenden Banden geprüft worden (7.4 c) und diente im vorliegenden Versuch als „Markierende Probe“ für die Banden „Bande 1“, „Bande 2“ und „tw“ (2.5.4.2). Die „tw“ Bande kam im **Mentha**-Versuch nur im PW 0T und in keiner der PW 7T- Proben vor. Die „Bande 2“ war im PW (0T und 7T) ausgebildet und wurde in keinem der Ansätze mit *M. aquatica*- Pflanzen deletiert. Die „Bande 1“ kam nicht vor.

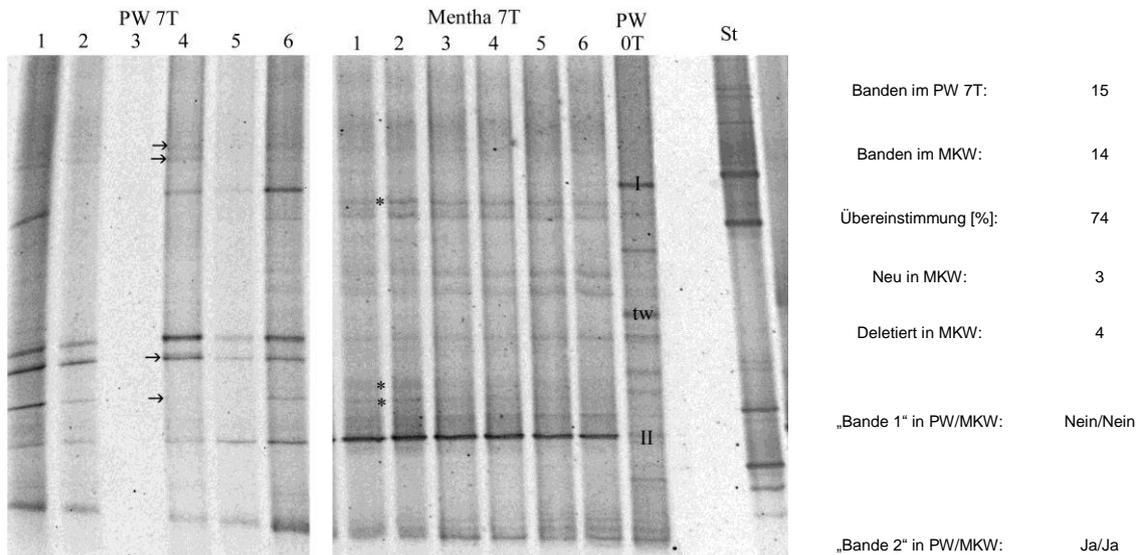


Abb. 19: Ausschnitt des DGGE Profils der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs. Banden, welche in Proben des „Mentha“- Ansatzes ausgeschaltet wurden, sind durch Pfeile „→“ gekennzeichnet. Das Symbol „*“ bezeichnet ausschließlich in Proben des Mentha Ansatzes vorkommende Banden. PW 0T diente als Marker für die Banden „Bande 1“(I), „Bande 2“(II) und „tw“. St ist der DNS-Standard.

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern ergab einen pauschalen R-Wert von 1 bei einer statistischen Signifikanz von 0,2 %. In der Clusteranalyse stimmte das Bandenmuster von PW (7T) mit Proben des „Mentha“-Ansatzes zu 74 % überein (Abb. 20). Proben gleicher Ansätze zeigten eine relative Ähnlichkeit der Bandenmuster von mindestens 94 %.

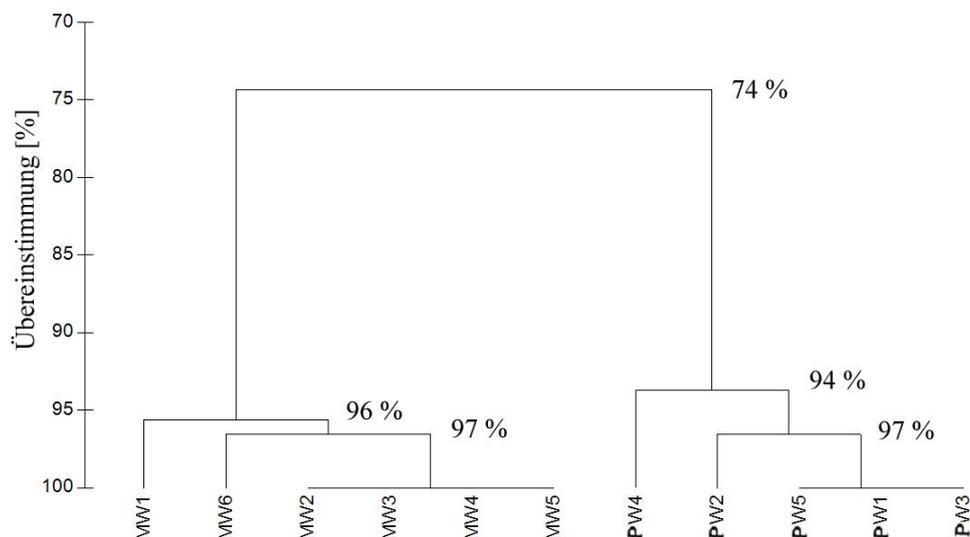


Abb. 20: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Mentha**-Gels (Abb. 19). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent. MW bezeichnet MKW, PW steht für PW 7T.

Die Daten der Inkubationsexperimente in Anwesenheit von Pflanzen lassen eine geringfügig größere antibakterielle Effektivität der Ansätze mit *I. pseudacorus* (Deletierte Banden als Anteil der im PW vorhandenen Banden [%]) erkennen. Relative Übereinstimmungen von: Minimum: 38 % (**Iris 2**); Maximum: 100 % (**Iris & Mentha 1**) gegenüber den Ansätzen mit *M. aquatica*, (Deletierte Banden als Anteil der im PW vorhandenen Banden [%]) bei denen das Minimum 27 % (**Mentha**) und das Maximum 63 % (**Iris & Mentha 2**) betrug (Tab. 4).

Tab. 4: Überblick über ausgebildete Banden in siebentägigen Ko-Inkubationsversuchen mit Bakterioplankton aus Probenwasser und natürlich aufgewachsenen Pflanzen.

Tab. 4 a (Banden in Versuchen mit *Iris pseudacorus*)

	Iris 1	Iris & Mentha 1	Iris 2	Iris 3	Iris & Mentha 2
Banden im PW	15	2	8	13	8
Banden im IKW	15	0	6	11	3
Übereinstimmung [%]	38	0	64	23	7,5
Neu in IKW	6	0	1	4	1
Deletiert in IKW	6	2	3	6	6
Del. [%] (Del/Banden im PW)	40	100	38	46	75
„Bande 1“ in PW/IKW	Ja/Nein	Nein/Nein	Ja/Nein	Ja/Nein	Ja/Nein
„Bande 2“ in PW/IKW	Nein/Nein	Ja/Nein	Nein/Nein	Ja/Nein	Ja/Nein

Tab. 4 b (Banden in Versuchen mit *Mentha aquatica*)

	Iris & Mentha 1	Iris & Mentha 2	Mentha
Banden im PW	2	8	15
Banden im MKW	1	3	14
Übereinstimmung [%]	61	25	74
Neu in MKW	0	0	3
Deletiert in MKW	1	5	4
Del. [%] (Del/Banden im PW)	50	63	27
„Bande 1“ in PW/MKW	Nein/Nein	Ja/Nein	Nein/Nein
„Bande 2“ in PW/MKW	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja

3.2.2 Zelldichte in Proben von Bakterioplankton des Probenwassers bei Inkubation mit wild aufgewachsenen *I. pseudacorus* Pflanzen

Zusätzlich zum beschriebenen qualitativen Einfluss von *Iris pseudacorus* Pflanzen auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft planktonischer Bakterien im Probenwasser zeigte die Auszählung der Zellzahl auf den aus **Iris 1** gewonnenen 0,22 µm Filtern eine signifikante Abnahme der Dichte der Bakterien ($p^* < 0,05$, Student's t-Test) (Abb. 21).

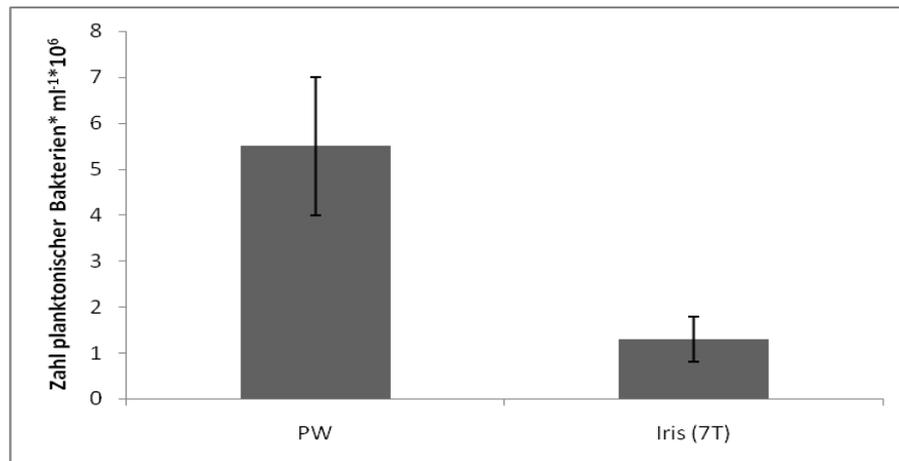


Abb. 21: Mittlere Bakterienzahl im Probenwasser eines 7T Inkubationsversuchs mit Iris. Dargestellt ist das arithmetische Mittel von den 3 Proben des PW- und des Iris 7T-Ansatzes. Für jede Probe wurde der Mittelwert einer Auszählung von jeweils 53 Sichtfeldern bei 1000x Vergrößerung gebildet.

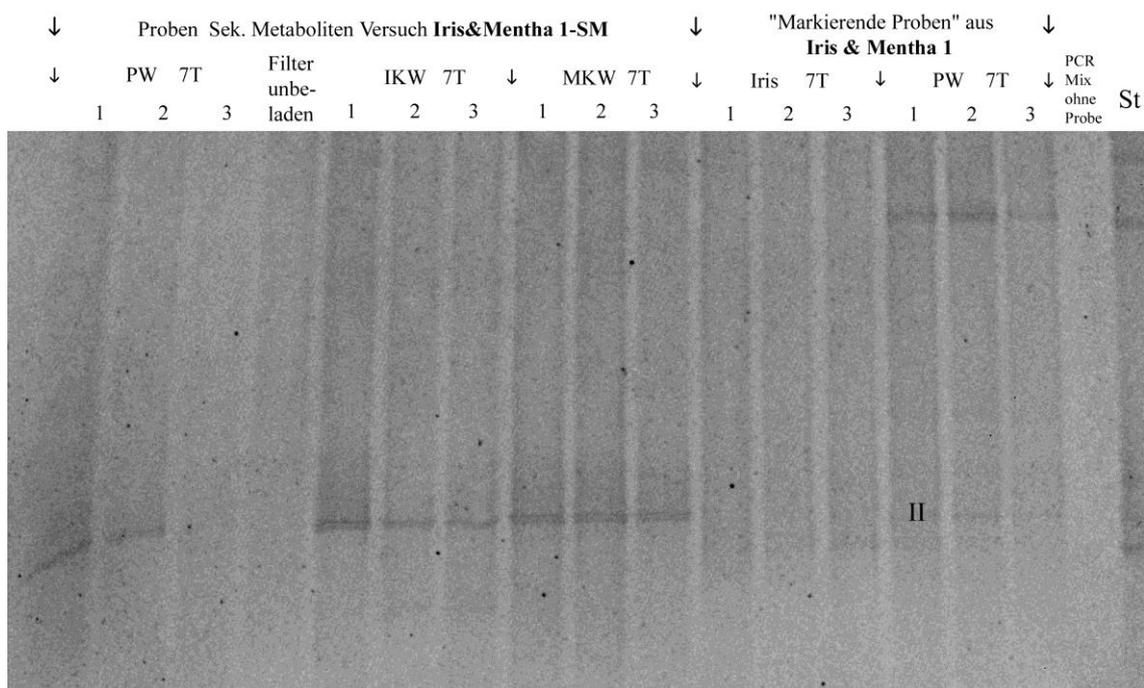
3.3 Veränderungen im Gemeinschaftsprofil des Bakterioplanktons durch Inkubation des Probenwassers mit von Pflanzen konditioniertem Probenwasser

Bei der Inkubation mit durch Pflanzen konditioniertem Probenwasser (PKW) veränderte sich das Bandenprofil in Proben des Bakterioplanktons im PW im Vergleich zu dem von Proben des Bakterioplanktons in der Nullkontrolle (mit PW 7T inkubiertem PW). Vergleichbar den Versuchen in Anwesenheit der Pflanzen (3.2) kam es auch bei der Inkubation des Probenwassers mit PKW sowohl zu Deletionen von Banden, als auch zu Neubildungen im Vergleich zur Nullkontrolle. Dies galt für Inkubationsversuche mit PKW von *Iris pseudacorus* (IKW) wie auch für solche in denen durch Inkubation mit *Mentha aquatica* gewonnenes PKW (MKW) verwendet wurde. Die Verfolgung der „Bande 1“ und der „Bande 2“ mit „markierenden Proben“ (2.5.4.2) führte zu dem Ergebnis, dass diese beiden wiederkehrenden Banden in keinem der PKW-Inkubationsversuche in Abwesenheit von Pflanzen deletiert wurden. Das traf auch

dann zu, wenn es im vorausgegangenen Pflanzenversuch, also in Anwesenheit der Pflanze zu einer Deletion gekommen war (siehe Tab. 4). Die Gesamtzahl ausgeprägter Banden im mit PW 7T- und im Vergleich dazu im mit PKW- inkubierten Probenwasser (PKW-W) wird im Folgenden wiedergegeben. Die Nullkontrolle bestehend aus mit PW 7T inkubiertem frischen Probenwasser wird weiterhin als PW 7T bezeichnet.

Iris & Mentha 1 – SM (Frisches Probenwasser entnommen: 03/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 1 – SM**-Versuchs (Abb. 22) trat in Proben aus der Nullkontrolle (PW 7T) eine Bande weniger auf, als in Proben der Nullkontrolle des vorausgegangenen **Iris & Mentha 1 – Pflanzenansatzes** (Abb. 23). In Proben des PW 7T- Ansatzes kam es wie in allen Proben beider Ansätze von mit PKW inkubiertem Probenwasser zur Ausbildung einer einzigen Bande. Als „Markierende Proben“ aufgetragene Proben des vorausgegangenen Pflanzenversuchs **Iris & Mentha 1** zeigten die Übereinstimmung der Position dieser Bande mit der von „Bande 2“. Daraus wurde ersichtlich, dass „Bande 2“ des PW 7T bei Koinkubation mit PKW des **Iris & Mentha 1**-Versuchs nicht deletiert wurde. Probe 3 des PW 7T bildete im Gel nicht wie Probe 1 bzw. 2 eine Bande aus. TW- Proben 1 und 2 stimmten im Bandenmuster mit Proben des Ansatzes PKW- inkubierten Probenwassers zu 100% überein.



	IKW	MKW
Banden im PW 7T:	1	1
Banden im PKW-W ⁷ :	1	1
Übereinstimmung [%]:	100 ⁸	100 ⁸
Neu in PKW-W:	0	0
Deletiert in PKW-W:	0	0
„Bande 1“ in PW/PKW-W:	Nein/Nein	Nein/Nein
„Bande 2“ in PW/PKW-W:	Ja/Ja	Ja/Ja

Abb. 22: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 1-SM**-Versuchs. Durch senkrechte Pfeile wurden die Bereiche der Proben des **Iris & Mentha 1-SM**- und des **Iris & Mentha 1**- („Iris 7T“, „PW 7T“)Versuchs zur Identifikation der „Bande 2“ (II) in den Proben des **Sekundärmetaboliten (SM)**-Versuchs gekenn-

⁷ PKW-W bezeichnet Proben von mit PKW inkubiertem Probenwasser.

⁸ 100% Übereinstimmung wurden nur im Vergleich mit TW Proben 1 und 2 erreicht. TW Probe 3 wurde für die Berechnung der Übereinstimmung im Bandenmuster nicht berücksichtigt.

zeichnet. „Filter unbeladen“ und „PCR Mix ohne Probe“ wurden als Kontrolle der Sauberkeit des Amplifikationsansatzes mit aufgetragen. St bezeichnet den DNS-Standard.

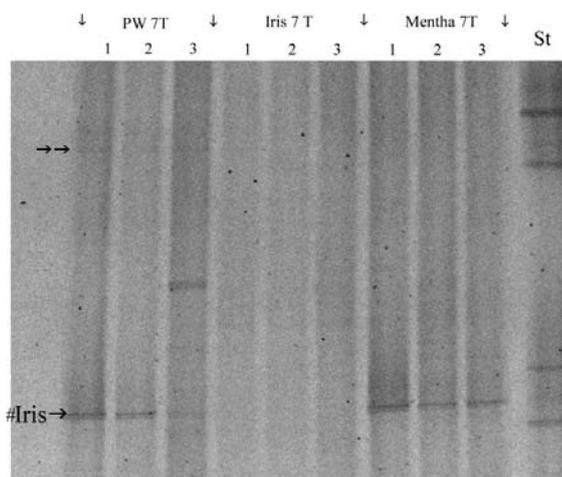


Abb. 23: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 1**-Versuchs zum Vergleich der Wirkung der Inkubation des Probenwassers mit Pflanzen mit der des oben beschriebenen PKW-Inkubationsversuchs (**Iris & Mentha 1-SM**).

Iris 2 – SM (Frisches Probenwasser entnommen: 07/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 2-SM**-Versuchs (Abb. 24) zeigte sich ein größerer Unterschied im Bandenmuster der Proben innerhalb eines Ansatzes, als zwischen den Proben verschiedener Ansätze (TW 7T, IKW). Die Bandenzahlen im PW 7T Ansatz waren 13 in PW 7T 1 bzw. 8 in PW 7T 2. Die Variabilität im Bandenmuster der einzelnen Proben eines Ansatzes war auch größer, als bei dem **Iris 2**-Versuch in Präsenz der Pflanzen (Abb. 26). Durch „markierende Proben“ war die Identifizierung der wiederkehrenden Banden möglich. Trotz im Bezug auf die Anzahl sichtbarer Banden voneinander abweichenden Proben im IKW- Ansatz, waren die wiederkehrenden Banden in allen Proben genau wie im PW 7T-Ansatz sichtbar. „Bande 2“ wurde wie „Bande 1“ nicht durch IKW deletiert. TW 0T war die Nullkontrolle für das frisch zugegebene Probenwasser vom Starttag. Bandenneubildungen gegenüber PW 7T waren in Proben von IKW-Ansätzen nicht nachweisbar.

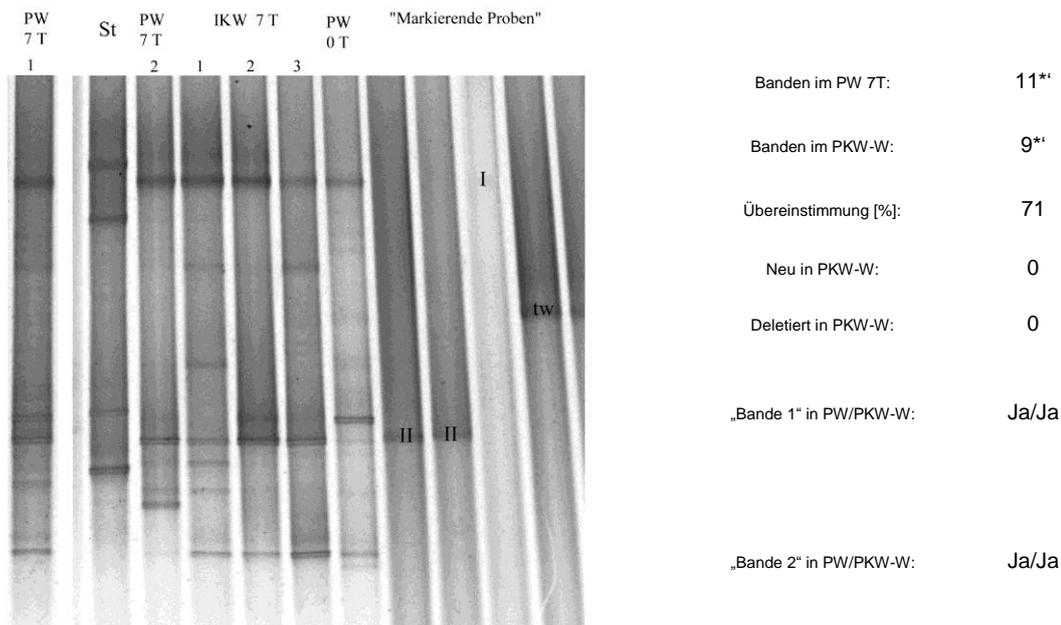


Abb. 24: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 2-SM**-Versuchs. St ist der DNS-Standard. IKW bezeichnet die Proben aus Ansätzen von frischem PW mit durch Iris konditioniertem Probenwasser. „Markierende Proben“ zeigen die Positionen der wiederkehrenden Banden „Bande 1“(I), „Bande 2“(II) und „tw“ an. ** Kennzeichnet arithmetische Mittelwerte mit St. Abw. ≥ 1 .

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern ergab einen pauschalen R-Wert von -0,1 bei einer statistischen Signifikanz von 75 %. In Bezug auf Übereinstimmungen im Bandenmuster der Proben bildeten sich gemischte Gruppen aus (Abb. 25). Der Versuch ist statistisch nicht relevant und wird nur wegen der in allen Proben sichtbaren wiederkehrenden Banden gezeigt.

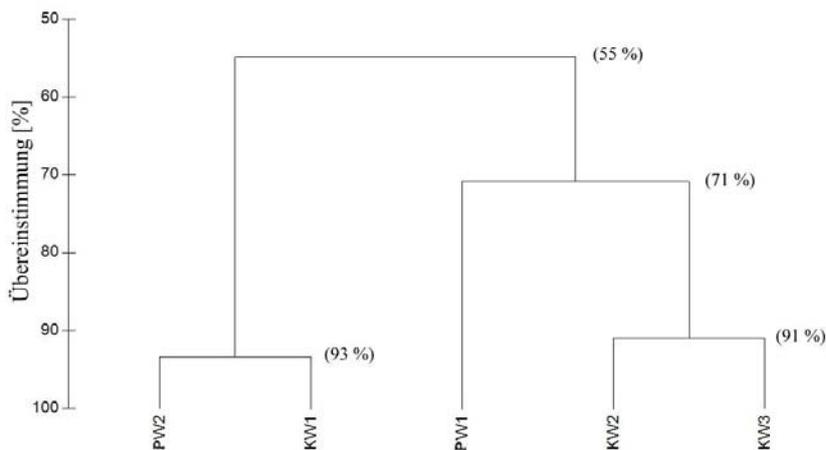


Abb. 25: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris 2-SM**-Gels (Abb. 24). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent. Werte stehen in Klammern, weil sie nicht statistisch begründet sind.

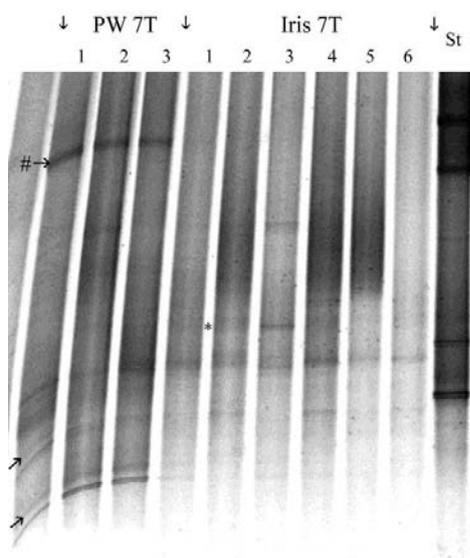


Abb. 26: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris 2**-Versuchs zum Vergleich der Wirkung der Inkubation des Probenwassers mit Pflanzen mit der des oben beschriebenen PKW- Inkubationsversuchs (**Iris 2-SM**).

	IKW	MKW
Banden im PW (7 T):	8	8
Banden im PKW-W:	10	10
Übereinstimmung [%]:	35	47
Neu in PKW-W:	6	5
Deletiert in PKW-W:	4	3
„Bande 1“ in PW/PKW-W:	Ja/Ja	Ja/Ja
„Bande 2“ in PW/PKW-W:	Ja/Ja	Ja/Ja

Abb. 27: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris & Mentha 2 – SM**-Versuchs. Der Bereich mit den Proben aus PKW wurde durch senkrechte Pfeile eingegrenzt. IKW, MKW bezeichnet die Proben aus Ansätzen von frischem PW mit durch *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* konditioniertem Probenwasser. „Iris & Mentha – KW“ bezeichnet die Proben aus dem mit Proben des Kombinationsansatzes inkubierten PW. PW 7T bezeichnet die Nullkontrolle, PW 0T die Probe von frisch gefiltertem Probenwasser. Banden, welche in Proben aus PKW-Ansätzen im Vergleich zur Nullkontrolle deletiert wurden sind durch Pfeile gekennzeichnet. Eine für bestimmte Ansätze spezifische Deletion wurde durch Kürzel der Versuchsansatznamen neben den Pfeilen angezeigt. In PKW-Ansätzen neu entstandene Banden (allgemein an „*“ zu erkennen) wurden mit dem Namen des Probenansatzes in dem sie spezifisch ausgebildet waren versehen. Die mit „PW 0T (Iris & Mentha)“ bezeichnete Spur ist eine Probe frisch gefilterten Probenwassers aus dem vorausgegangenen **Iris & Mentha 2**-Pflanzenversuch.

Die Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern ergab einen pauschalen R-Wert von 1 bei einer statistischen Signifikanz von 0,1 %. Die Ähnlichkeit im Bandenmuster zwischen PW 7T (Nullkontrolle) und den Proben aus PKW-Ansätzen betrug 38 % (Abb. 28).

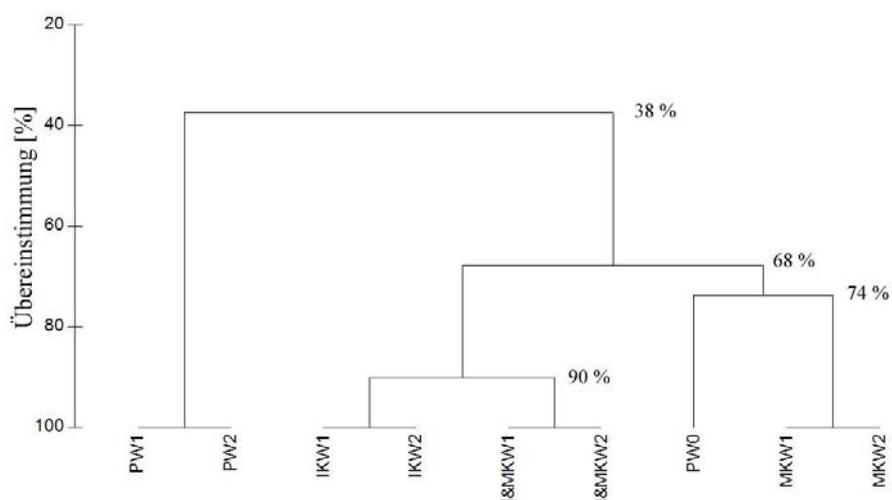


Abb. 28: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris & Mentha 2-SM**-Gels (Abb. 27). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

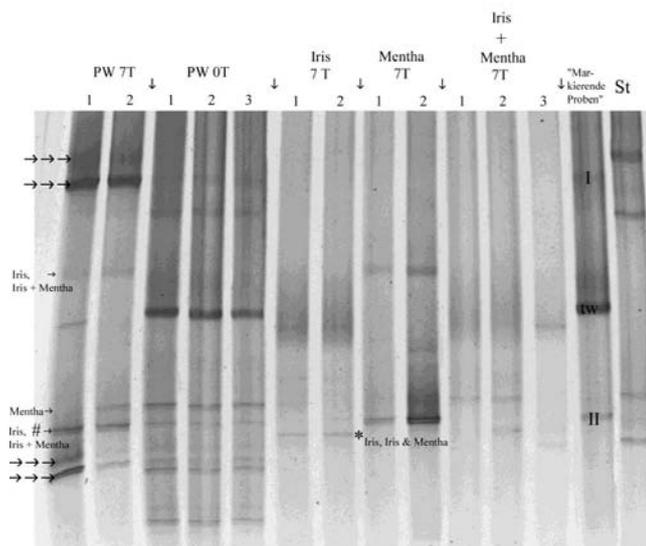
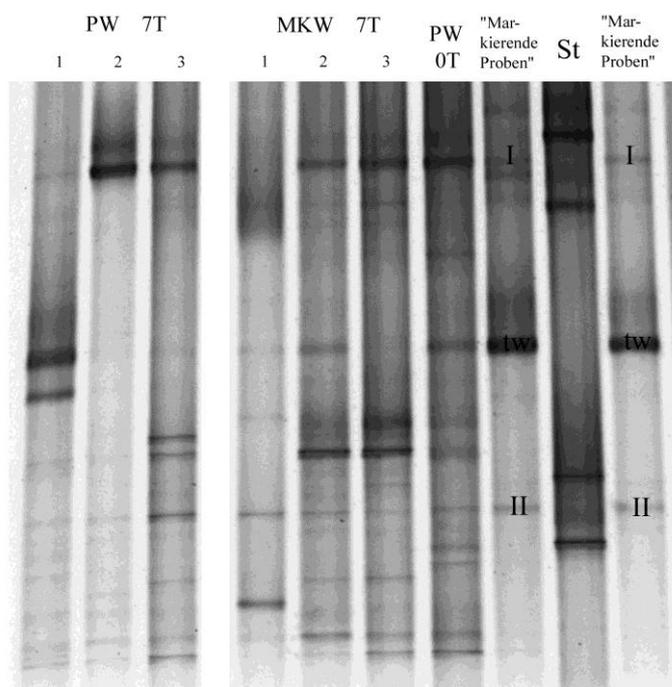


Abb. 29: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNA von Proben des **Iris & Mentha 2**-Versuchs zum Vergleich der Wirkung der Inkubation des Probenwassers mit Pflanzen mit der des oben beschriebenen PKW-Inkubationsversuchs (**Iris & Mentha 2 - SM**).

Mentha – SM (Frisches Probenwasser entnommen: 01/2008)

Im DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha-SM**-Versuchs waren im unbehandelten Probenwasser (PW 7T) 13 Banden sichtbar (Abb. 30). Die durch „markierende Proben“ gekennzeichneten wiederkehrenden Banden „Bande 1“, „Bande 2“, „tw“ kamen alle in den Proben des Versuchs (PW 7T, MKW 7T) vor. Es gab im Vergleich zur Nullkontrolle (PW 7T) weder Bandenneubildungen, noch Deletionen von Banden in den Proben des MKW 7T- Ansatzes. Dies stand im Gegensatz zum Pflanzenansatz **Mentha** (siehe Abb. 32). Die „tw“ Bande kam in diesem Versuch in allen Proben vor.



	MKW
Banden im PW:	13
Banden im PKW-W:	13
Übereinstimmung [%]:	79
Neu in PKW-W:	0
Deletiert in PKW-W:	0
„Bande 1“ in PW/PKW-W:	Ja/Ja
„Bande 2“ in PW/PKW-W:	Ja/Ja

Abb. 30: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha-SM**-Versuchs. MKW 7T bezeichnet die Proben aus Ansätzen mit durch MKW inkubiertem Probenwasser. „Markierende Proben“ zeigen die Positionen der wiederkehrenden Banden „Bande 1“(I), „Bande 2“(II) und „tw“ an. PW 0T bezeichnet das direkt am Tag des Versuchsansatzes frisch gefilterte Probenwasser.

Die Gesamtübereinstimmung zwischen Banden aus Proben mit PW 7T und Proben aus mit MKW inkubiertem Probenwasser lag bei 79 % (Abb. 31). Der in einer Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern errechnete pauschale R-Wert betrug 0,9 bei einer statistischen Signifikanz von 0,1 %.

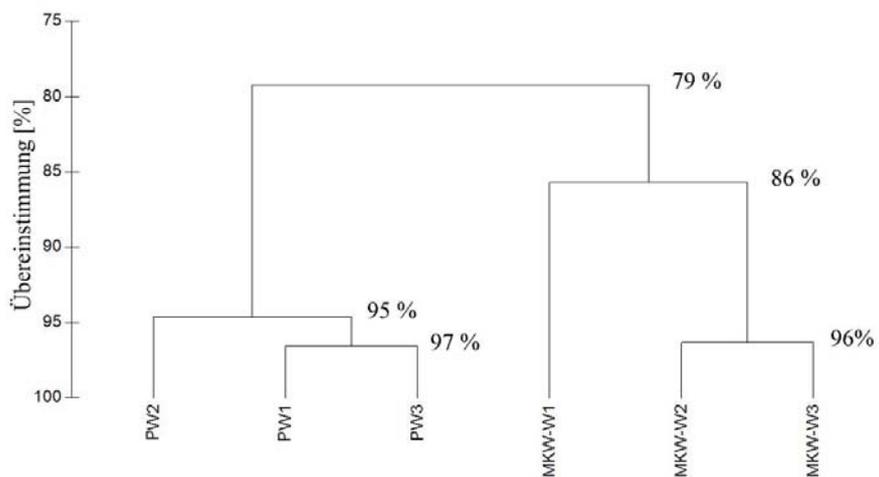


Abb. 31: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Mentha-SM**-Gels (Abb. 30). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

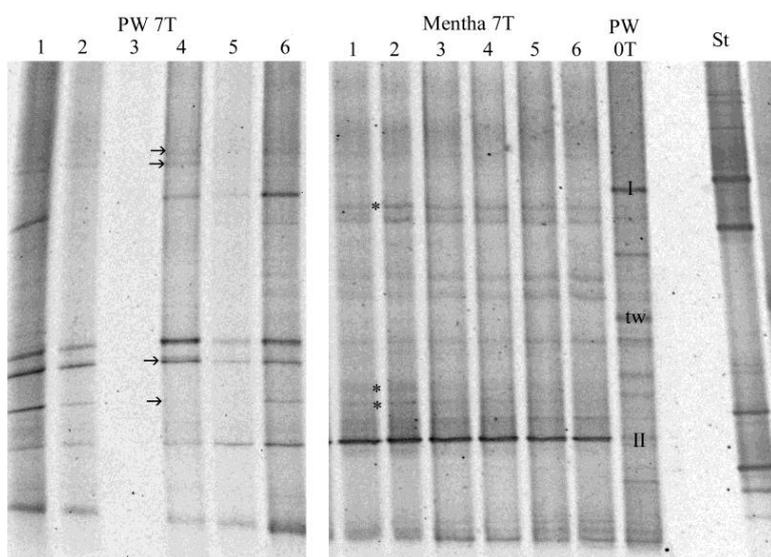


Abb. 32: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs zum Vergleich der Wirkung der Inkubation des Probenwassers mit Pflanzen mit der des oben beschriebenen PKW- Inkubationsversuchs (**Mentha-SM**).

Im Vergleich zu den **Pflanzen**-Versuchen (Vgl. Tab.4) war bei den **Sekundärmetaboliten**-Versuchen die höhere antibakterielle Potenz von *I. pseudacorus*- PKW (IKW) gegenüber *M. aquatica*- PKW (MKW) weniger deutlich. Im **Iris & Mentha 2**-Versuch war die Zahl der im Bakterioplankton gegenüber der Nullkontrolle deletierten Banden im IKW-Ansatz 50% gegenüber 38% im MKW Ansatz (Tab.5).

In den anderen 3 Versuchen (**Iris & Mentha 1 - SM; Iris 2 - SM; Mentha-SM**) gab es keine Banden im PW 7T, welche in PKW-Inkubationsansätzen nicht vorhanden waren. Die wiederkehrenden Banden „Bande 1“, „Bande 2“ wurden weder durch IKW noch durch MKW deletiert.

Tab. 5: Überblick über ausgebildete Banden in siebentägigen Ko-Inkubationsversuchen mit PW-Bakterioplankton und durch Pflanzen konditioniertem Probenwasser (PKW) im Vergleich zu den jeweils vorausgegangenen Experimenten in Anwesenheit der Pflanzen. IA bedeutet „Inkubationsansatz“ und fasst Pflanzen- und PKW-Ansätze zusammen. * Pflanzennamen in der Tabelle wurden abgekürzt. Iris steht für *I. pseudacorus*, Mentha bezeichnet *M. aquatica*.

Tab. 5 a Inkubationsansätze mit *I. pseudacorus* und IKW

PW inkubiert mit	Iris & Mentha 1		Iris & Mentha 2		Iris 2	
	Iris*	IKW	Iris*	IKW	Iris*	IKW
Banden im PW 7T	2	1	8	8	8	9
Banden im IA	0	1	3	10	6	9**
Übereinstimmung [%]	0	100	7,5	35	64	71
Neu im IA	0	0	1	6	1	0
Deletiert im IA	2	0	6	4	3	0**
Del. [%] (Del/Banden im PW 7T)	100	0	75	50	38	0
„Bande 1“ in PW/IA	Nein/Nein	Nein/Nein	Ja/Nein	Ja/Ja	Ja/Nein	Ja/Ja
„Bande 2“ in PW/IA	Ja/Nein	Ja/Ja	Ja/Nein	Ja/Ja	Ja/Nein	Ja/Ja

** Kennzeichnet arithmetische Mittelwerte mit St.Abw. ≥ 1 (siehe auch Abb. 24 des **Iris 2-SM**-Versuchs).

Tab. 5 b Inkubationsansätze mit *M. aquatica* und MKW

PW inkubiert mit	Iris & Mentha 1		Iris & Mentha 2		Mentha	
	Mentha*	MKW	Mentha*	MKW	Mentha*	MKW
Banden im PW 7T	2	1	8	8	15	13
Banden im IA	1	1	3	10	14	13
Übereinstimmung [%]	61	100	25	47	74	79
Neu in IA	0	0	0	5	3	0
Deletiert in IA	1	0	5	3	4	0
Del. [%] (Del/Banden im PW 7T)	50	0	63	38	27	0
„Bande 1“ in PW/IA	Nein/Nein	Nein/Nein	Ja/Nein	Ja/Ja	Nein/Nein	Ja/Ja
„Bande 2“ in PW/IA	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja

3.4 Qualitative Charakterisierung der Bakterioplankton-Gemeinschaft in mit steril aufgewachsenen *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica* -Pflanzen inkubiertem Probenwasser

Insgesamt führte die Inkubation von Proben des Probenwassers mit steril aufgewachsenen *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica* Pflanzen zu einer Veränderung im Bandenmuster gegenüber dem der Proben von unbehandeltem Probenwasser (PW 7T). Die Neubildung wie auch die Deletion von Banden gegenüber PW 7T (der Nullkontrolle) kam sowohl in Proben aus Ansätzen mit Wild- als auch in den Proben aus Ansätzen mit Sterilpflanzen vor. Allerdings ereigneten sich Deletionen von Banden nur im Versuch mit *Mentha aquatica*- und nicht im Versuch mit *I. pseudacorus*-Sterilpflanzen. Die in Anwesenheit von *I. pseudacorus*-Wildpflanzen bisher (Tab. 4) immer deletierte „Bande 2“ wurde von den Wildpflanzen im **Iris steril**-Versuch nicht deletiert (Tab. 6).

Abb. 33: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Iris Steril-** Versuchs, in dem steril aufgezogene (Steril aufgew. Iris 7T) und gereinigte Iris Wildpflanzen (Wild aufgew. Iris 7T) in ihrer Wirksamkeit verglichen wurden, die Bakteriengemeinschaft in Proben des unbehandelten Probenwassers (PW 7T) in der Zusammensetzung zu beeinflussen. Mit ** wurden Banden markiert, deren Vorkommen auf Proben aus Iris inkubierten TW-Ansätzen beschränkt war (Iris wild und Iris steril). *IS und *IW bezeichnet solche Iris spezifischen Banden ausschließlich für Ansätze mit sterilen bzw. wild gewachsenen gereinigten Pflanzen. Durch IW→ wurde eine ausschließlich in Proben aus dem Wildiris-Ansatz deletierte Bande gekennzeichnet. St ist der DNS Standard. I, II und tw sind durch „markierende Proben“ gekennzeichnete Positionen der wiederkehrenden Banden („Bande 1“, „Bande 2“ und „tw“).

Bei einer Analyse der relativen Übereinstimmung von Bandenmustern des Gels ergab sich ein pauschaler R-Wert von 1,0 bei einem Signifikanzintervall von 0,4 %. Die relative Übereinstimmung der Banden von Proben aus unbehandeltem Probenwasser (PW 7T) und mit Iris inkubiertem Probenwasser betrug 69 % für Steril- und 71 % für Wildpflanzen (Abb. 34).

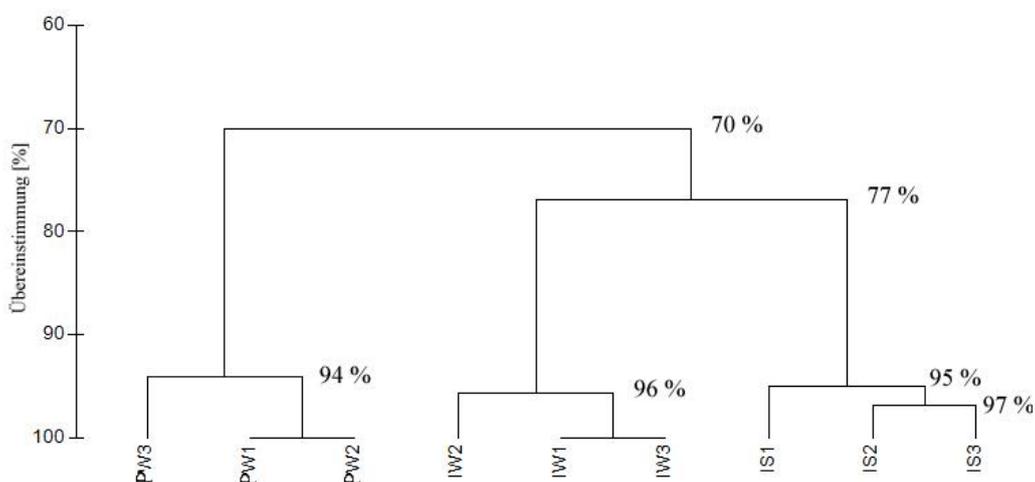
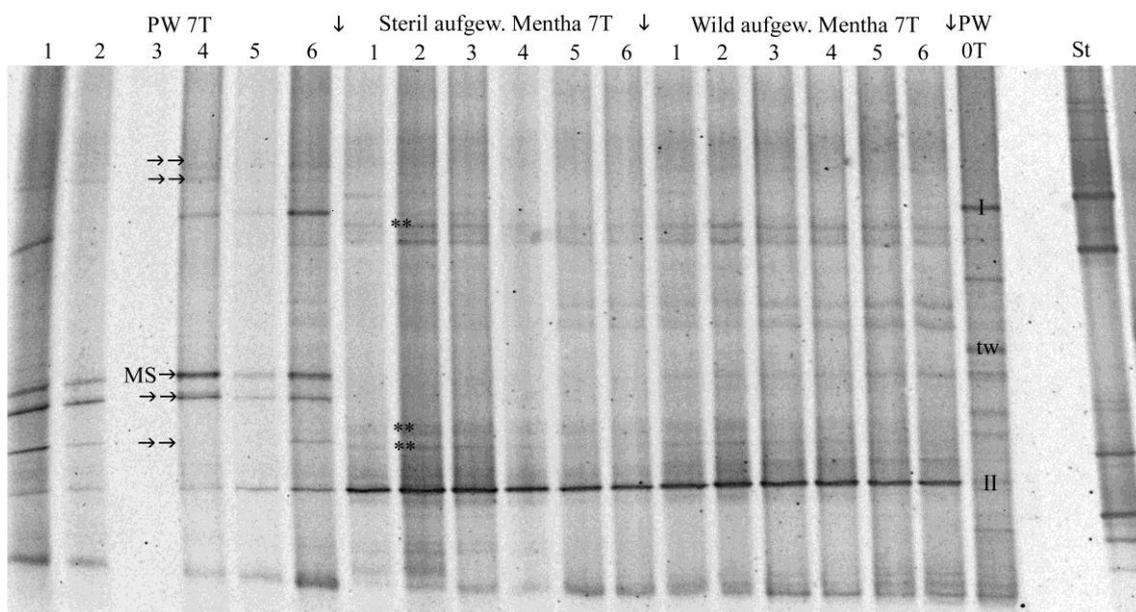


Abb. 34: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Iris Steril-**Gels (Abb. 33). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Mentha (Steril) (Entnahme des Probenwassers: 01/2008)

Das DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs wurde bereits in Auszügen gezeigt (Abb. 19). Hier wird die bereits besprochene Wirkung der wild aufgewachsenen *M. aquatica* Pflanzen mit der Wirkung der steril aufgewachsenen Pflanzen verglichen. Im PW 7T waren 15 Banden sichtbar. Eine der Banden, welche in Ansätzen von MKW im Vergleich zum PW 7T deletiert wurde, war selektiv nur im Sterilpflanzen-MKW deletiert (MS→ in Abb. 35). „Bande 1“ kam im gesamten Versuch nicht vor und die „Bande 2“ wurde in Ansätzen mit Mentha nicht deletiert. Das galt für den Ansatz mit Sterilpflanzen ebenso, wie für den mit gereinigten Wildpflanzen.



	MS ¹⁰	MW ¹⁰
Banden im PW:	15	15
Banden im PKW:	13	14
Übereinstimmung [%]:	67	74
Neu in PKW:	3	3
Deletiert in PKW:	5	4
„Bande 1“ in PW/PKW:	Nein/Nein	Nein/Nein
„Bande 2“ in PW/PKW:	Ja/Ja	Ja/Ja

Abb. 35: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs mit Proben aus Ansätzen von unbehandeltem Probenwasser (PW 7T), und von den Ansätzen, in denen PW inkubiert war mit steril aufgewachsenen *Mentha aquatica* (MS) und mit *M. aquatica* Wildpflanzen (MW). Banden, welche in Proben beider „Mentha“-Ansätze deletiert wurden, sind durch Doppelpfeile („→→“), solche, die nur in Proben von Ansätzen mit steril aufgezogenen *M. aquatica* fehlten, sind durch „MS→“ gekennzeichnet. „***“ bezeichnet 3 ausschließlich in Proben beider „Mentha“- Ansätze vorkommende Banden. „PW 0T“ bezeichnet eine frisch bei Ankunft im Labor am Versuchsstarttag gefilterte Probenwasserprobe, die als Marker für die Banden „Bande 1“(I), „Bande 2“(II) und „tw“ diente. St ist der DNS Standard.

In der Analyse der relativen Übereinstimmung im Bandenmuster ergab sich ein pauschaler R-Wert von 0,8 bei einer statistischen Signifikanz von 0,1 %. Das Bandenmuster von PW 7T stimmte mit dem von Proben der Mentha-Ansätze zu 67 % bei Steril- und zu 74 % bei Wildpflanzen überein. Die Übereinstimmung im Bandenmuster von Proben aus Ansätzen mit sterilen und wild gewachsenen Mentha betrug 94 % (abgesehen von einer Ausnahme) (Abb. 36).

¹⁰ MS steht für Inkubationsansatz mit steril aufgewachsenen, MW für Inkubationsansatz mit wild aufgewachsenen, gereinigten *Mentha aquatica* (siehe auch 2.1).

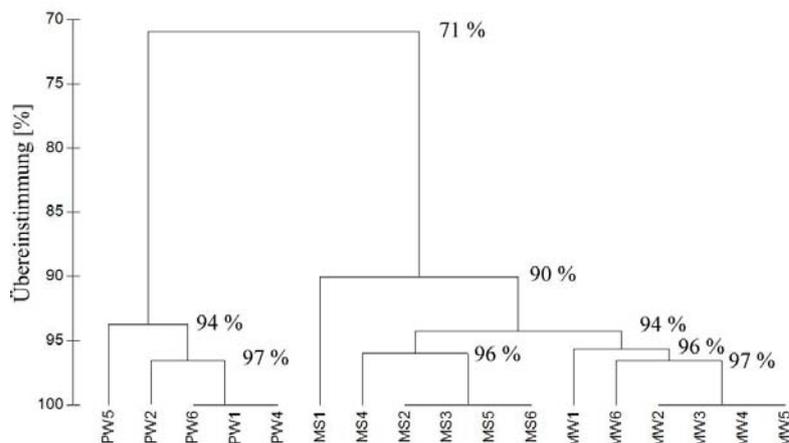


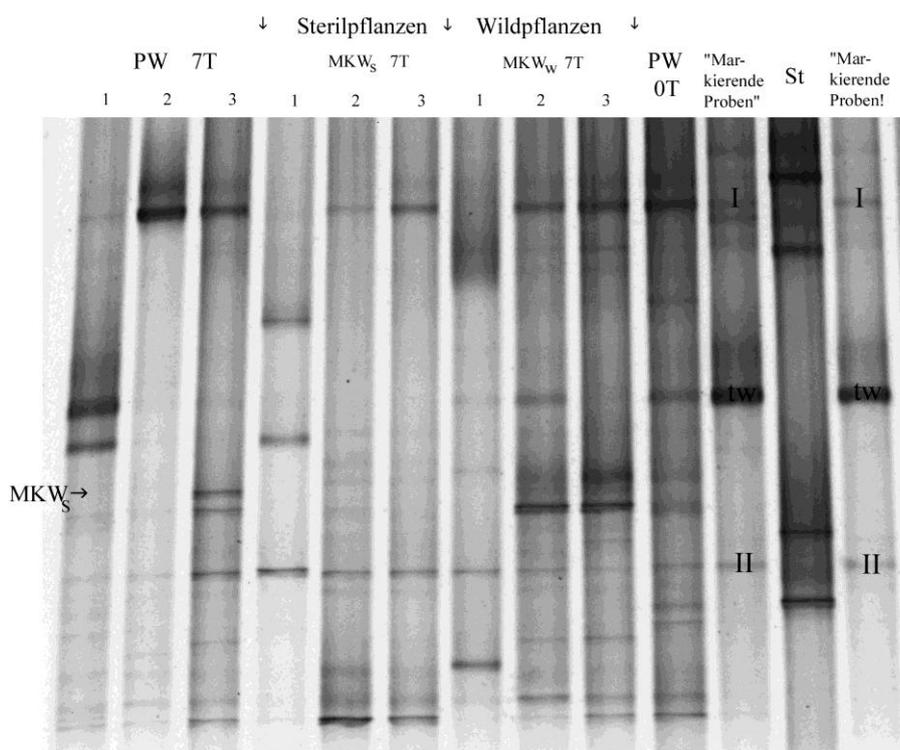
Abb. 36: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Mentha**-Gels (Abb. 35). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Tab. 6: Überblick über ausgebildete Banden in den 7T Ko-Inkubationsansätzen von Probenwasserbakterioplankton mit steril aufgewachsenen Pflanzen (*I. pseudacorus* und *M. aquatica*), des **Iris Steril**- bzw. **Mentha (Steril)**-Versuchs. „Steril“ und „Wild“ kennzeichnen die Pflanzenansätze mit steril- bzw. wild aufgewachsenen Individuen.

Pflanzen	Iris		Mentha	
	Steril	Wild	Steril	Wild
Banden im PW	8	8	15	15
Banden im PKW	15	11	13	14
Übereinstimmung [%]	69	71	67	74
Neu in PKW	7	4	3	3
Deletiert in PKW	0	1	5	4
Del. [%] (Del/Banden im PW)	0	13	33	27
„Bande 1“ in PW/PKW	Nein/Nein	Nein/Nein	Nein/Nein	Nein/Nein
„Bande 2“ in PW/PKW	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja	Ja/Ja

Mentha (Steril und Wild)-SM (Entnahme des Probenwassers: 01/2008)

Das DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha-SM**-Versuchs wurde in Auszügen bereits gezeigt (vgl. Abb. 30). Die bereits besprochenen Ergebnisse des Wildpflanzenansatzes werden hier mit denen der Sterilpflanzen verglichen (Abb. 37). Im PW 7T (Nullkontrolle) waren 13 Banden sichtbar. Die durch „markierende Proben“ gekennzeichneten wiederkehrenden Banden „Bande 1“, „Bande 2“, „tw“ kamen alle im Gel vor. Eine Bande (im Bild durch $MKW_S \rightarrow$ gekennzeichnet), welche in Proben von PW 7T erschien, wurde selektiv in Proben des MKW-Sterilpflanzen-Ansatzes deletiert. Auch im **Mentha**-Gel (Abb. 35) des vorausgegangenen Pflanzenversuchs war eine Bande nur in Anwesenheit von Sterilpflanzen deletiert worden.



	MKW _S ¹¹	MKW _W ¹¹
Banden im PW:	13	13
Banden im PKW:	12	13
Übereinstimmung [%]:	87	79
Neu in PKW:	0	0
Deletiert in PKW:	1	0
„Bande 1“ in PW/PKW:	Ja/Ja	Ja/Ja
„Bande 2“ in PW/PKW:	Ja/Ja	Ja/Ja

Abb. 37: DGGE Profil der amplifizierten 16S rDNS von Proben des **Mentha-SM**-Versuchs. Die mit MKWs → im Bild gekennzeichnete Bande wurde im Vergleich zu PW 7T (der Nullkontrolle) nur in Proben aus Inkubation mit MKW von Sterilpflanzen deletiert. Überschrift und angrenzende Pfeile kennzeichnen das zur Inkubation des Probenwassers verwendete MKW als von Sterilpflanzen bzw. Wildpflanzen des **Mentha**-Versuchs stammend. PW 0T ist das frisch gefilterte Probenwasser.

In der Analyse der relativen Übereinstimmung im Bandenmuster wurde ein pauschaler R-Wert von 1 bei einer statistischen Signifikanz von 0,1 % errechnet. Die Übereinstimmung der Bandenmuster zwischen Proben des PW 7T und Proben von mit MKW aus dem Sterilpflanzen-Ansatz inkubiertem Probenwasser betrug 85 %. Die Übereinstimmung im Bandenmuster dieser Gruppe im Vergleich zu der Gruppe aus MKW-Proben des Wildpflanzenansatzes und der PW 0T Probe lag dagegen bei 77 % (Abb. 38).

¹¹ MKW_S steht für MKW-Inkubationsansatz mit steril aufgewachsenen, MKW_W für MKW-Inkubationsansatz mit wild aufgewachsenen, gereinigten *Mentha aquatica* Pflanzen.

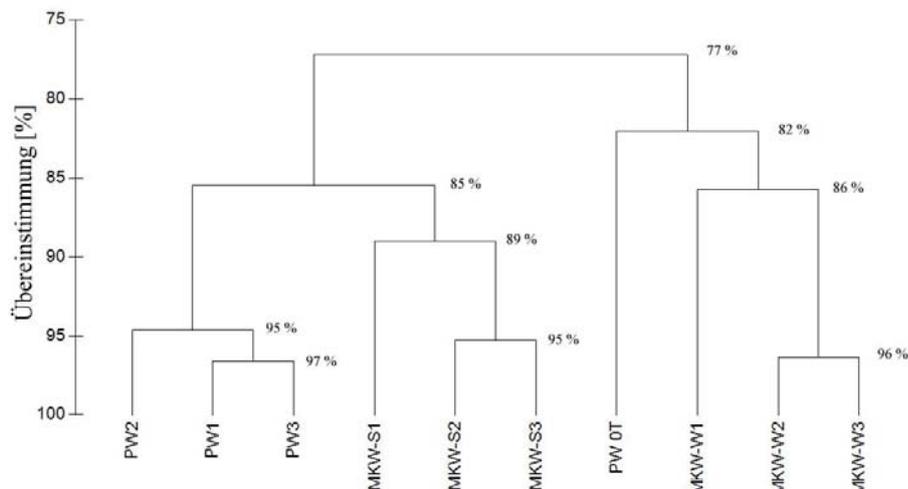


Abb. 38: Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Bandenmuster des **Mentha-SM-Gels** (Abb. 37). Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

3.5 Grobe taxonomische Einordnung der durch Inkubation mit Makrophyten beeinflussten planktonischen Bakterien im Probenwasser

Zur taxonomischen Einordnung der durch Inkubation mit Makrophyten beeinflussten planktonischen Bakterien im untersuchten Probenwasser wurden 2 Ansätze verfolgt.

Die DNS der wiederkehrenden Banden „Bande 1“ und „Bande 2“ wurde sequenziert und die Sequenzen von Abschnitten der 16S rDNS mit der entsprechenden Datenbank abgeglichen (3.5.1). Versuche, die zur Eluierung von Banden-DNS eingesetzte Zeit von 2 Wochen auch nur um wenige Tage zu verkürzen führten nicht zu einer erfolgreichen Amplifikation. Die Reinheit und korrekte Positionierung der aus Banden-DNS amplifizierten Proben wurde jedoch durch DGGE Gele verifiziert (vgl. Abb. 7 in 2.5.4.2). Um die Präsenz und die Beeinflussbarkeit durch *I. pseudacorus* von Vertretern der potentiell phytopathogenen Bakteriengattung *Pseudomonas* im Bakterioplankton zu prüfen, wurde Proben-DNS mithilfe einer Filter-PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (3.5.2).

3.5.1 Sequenzanalysen der DNS ausgeschnittener Banden.

3.5.1.1 Sequenzanalyse der „Bande 2“

Von 3 Proben (PW 7T1, 2; Mentha 7T 1; **Iris & Mentha 1**-Versuch) wurde „Bande 2“ ausgeschnitten und die DNS amplifiziert. Sequenzen der Amplikons wurden manuell mit einer Übereinstimmung von mindestens 90 % (Abb. 39) in ein *Alignment* gebracht. Darauf basierend wurde eine Konsensus Sequenz von 474 bp Länge erstellt. Im Abgleich mit der NCBI Datenbank für ribosomale DNS Sequenzen von Bakterien ergab sich eine Übereinstimmung von 98 % mit Abschnitten der 16S rDNS eines Vertreters der *Polynucleobacter* Gruppe (*Polynucleobacter cluster*). Die 4 höchsten Übereinstimmungen der Konsensussequenz mit in der Datenbank deponierten 16S rDNS-Sequenzen werden in Tab. 7 genannt.

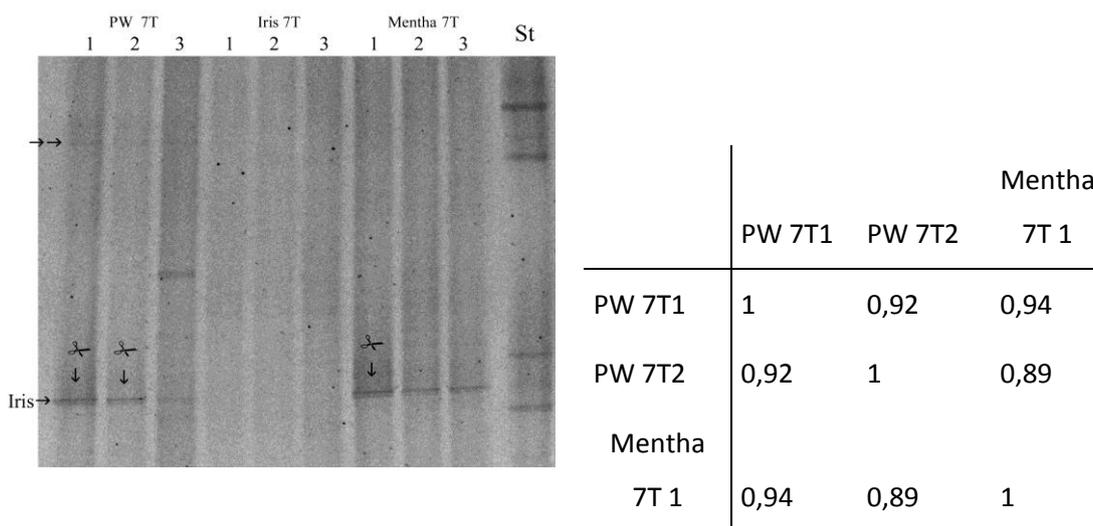


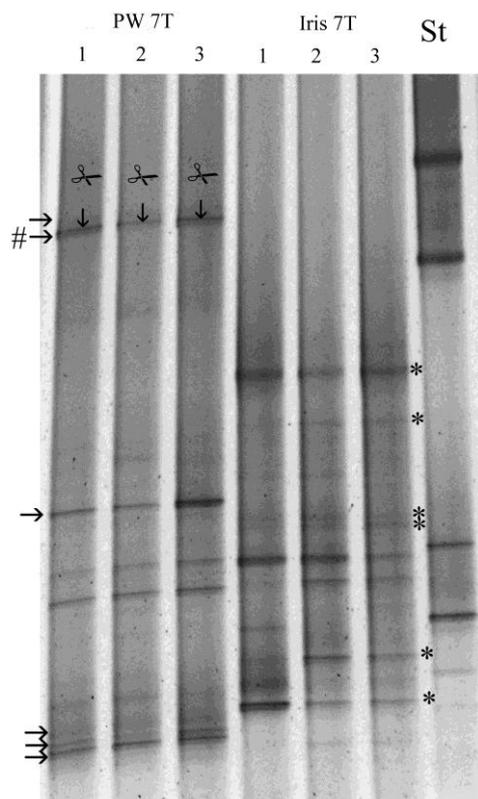
Abb. 39: Similaritätsmatrix der Sequenzen der DNS welche aus den ausgeschnittenen Banden PW 7T 1, 2 und Mentha 7T 1 des Gels vom **Iris & Mentha 1**-Versuch (siehe Bild links) amplifiziert worden waren.

Tab. 7: Die 4 höchsten Übereinstimmungen der beschriebenen Konsensussequenz mit Abschnitten der 16S rDNS von Vertretern der Datenbank (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp>). Länge der getesteten Sequenz: 474 bp.

Zugangsnummer	Bezeichnung des Datenbankvertreters	Übereinstimmung [%]	Übereinstimm. Basenpaare
FM208181.1	<i>Polynucleobacter</i> sp. (AM-8B5)	98	437
FM208180.1	<i>Polynucleobacter</i> sp. (MWH-PoolGreenA3)	97	433
AJ876403.1	β -Proteobacterium (MWH-IPGL7W22)	97	433
AM110088.1	<i>Polynucleobacter</i> sp. (MWH-Mekk-B1)	97	431

3.5.1.2 Sequenzanalyse der „Bande 1“

Aus Amplikons von DNS der ausgeschnittenen „Bande 1“ der Proben PW 7T 1, 2, 3 (**Iris 1**-Versuch) wurde basierend auf einer Similaritätsmatrix (Abb. 40), in der die 3 Sequenzen zu mindestens 90 % übereinstimmten, eine Konsensussequenz erzeugt. Diese hatte eine Länge von 457 bp. In einem Datenbankabgleich analog 3.5.1.1 ergab sich eine Übereinstimmung von 91 % mit einem Abschnitt der 16S rDNS Sequenz eines Vertreters der *Flavobacteria* (Tab. 8).



	PW 7T1	PW 7T2	PW 7T3
PW 7T1	1	0,90	0,91
PW 7T2	0,90	1	0,92
PW 7T3	0,91	0,92	1

Abb. 40: Similaritätsmatrix der Sequenzen der DNS, welche aus der ausgeschnittenen „Bande 1“ von Proben PW 7T 1, 2, 3 des Gels vom **Iris 1**-Versuch (siehe Bild links) amplifiziert worden war.

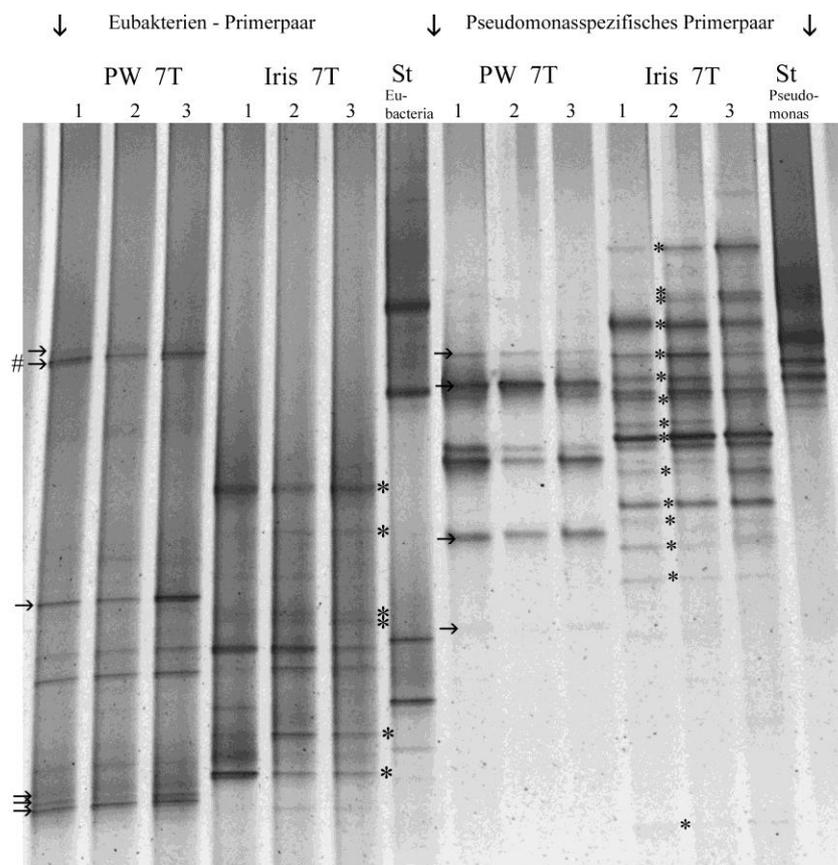
Tab. 8: Übereinstimmung der Konsensussequenz mit einem Abschnitt der 16S rDNS eines Vertreters oben genannter Datenbank (Tab. 7). Länge der getesteten Sequenz: 457 bp.

Zugangsnummer	Bezeichnung des Datenbankvertreters	Übereinstimmung [%]	Übereinstimm. Basenpaare
AB269814.1	Symbiont von <i>Flavobacterium</i> (AF459795)(KF030); <i>Flavobacteriaceae</i>	91	355

3.5.2 Amplifikation der DNS aus Proben von mit *Iris pseudacorus* inkubiertem Probenwasser mithilfe von *Pseudomonas* spezifischen Primern.

Pseudomonas 1 - Einfluss der Anwesenheit von *Iris pseudacorus* auf *Pseudomonas* spp. -Phylotypen im Bakterioplankton

Im Vergleich zur Amplifikation mit eubakteriellen 16 S Primern (P) waren bei Amplifikation mit *Pseudomonas* spezifischen ITS Primern (PP) in Proben von mit *I. pseudacorus* inkubiertem Probenwasser gegenüber der Nullkontrolle (PW 7T) mehr als doppelt so viele neu gebildete Banden zu sehen (P:6 im Vergleich zu PP:15). Die linke Seite des Gels (Abb. 41) zeigt die mit P amplifizierten Proben des **Iris 1**-Versuchs (vgl. Abb. 10). Im PW 7T waren 15 Banden sichtbar. Die „Bande 1“ war eine von 6 in IKW Proben im Gegensatz zur Nullkontrolle deletierten Banden. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die *Pseudomonas* spezifische Amplifikation mit PP (rechte Seite vom Gel in Abb. 41): Mit 7 im PW 7T (Nullkontrolle) und 15 in mit *I. pseudacorus* inkubiertem Probenwasser (IKW) sichtbaren Banden, war die Bandenzahl der Proben aus IKW im Vergleich zur Nullkontrolle höher. Eine der deletierten Banden (von oben die zweite im PW 7T deletierte Bande der mit PP amplifizierten Proben) erschien in sehr ähnlicher Position wie eine der Banden des *Pseudomonas*-DNS Standards („St *Pseudomonas*“).



Eubakterien-Primerpaar (P)	<i>Pseudomonas</i> -spezifisches Primerpaar (PP)
Banden im PW 7T:	Banden im PW 7T:
15	7
Banden im PKW:	Banden im PKW:
15	18
Übereinstimmung [%]:	Übereinstimmung [%]:
38	24
Neu in PKW:	Neu in PKW:
6	15
Deletiert in PKW:	Deletiert in PKW:
6	4
„Bande 1“ in PW/PKW:	---
Ja/Nein	---
„Bande 2“ in PW/PKW:	---
Nein/Nein	---

Abb. 41: Amplifikation von Proben des **Iris 1**-Versuchs mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) und unspezifischen eubakteriellen Primern (P). Durch vertikale Pfeile „↓“ wurden die Proben, die mit P („Eubakterien-Primerpaar“) amplifiziert worden waren von

den mit PP („*Pseudomonas*spezifisches Primerpaar“) amplifizierten abgegrenzt. „St *Eubacteria*“ bezeichnet den unspezifischen DNS-Standard für Eubakterien- (P-) Amplikons. „St *Pseudomonas*“ bezeichnet den für die PP-Amplikons verwendeten DNS-Standard. Die Markierungen der Banden auf der linken Seite des Gels wurden belassen, dürfen zwischen den beiden verschiedenen Amplifikationsansätzen aber nicht verglichen werden. „---“ steht für „Bande nicht überprüft“

In der *Pseudomonas*-spezifischen Amplifikation der DNS aus dem **Iris 1**-Versuch lag der Wert der relativen Bandenübereinstimmung bei 24 % verglichen mit 38 % für die unspezifisch amplifizierten Proben. Der pauschale R-Wert betrug 1 bei einer statistischen Signifikanz von 10 % (Abb. 42).

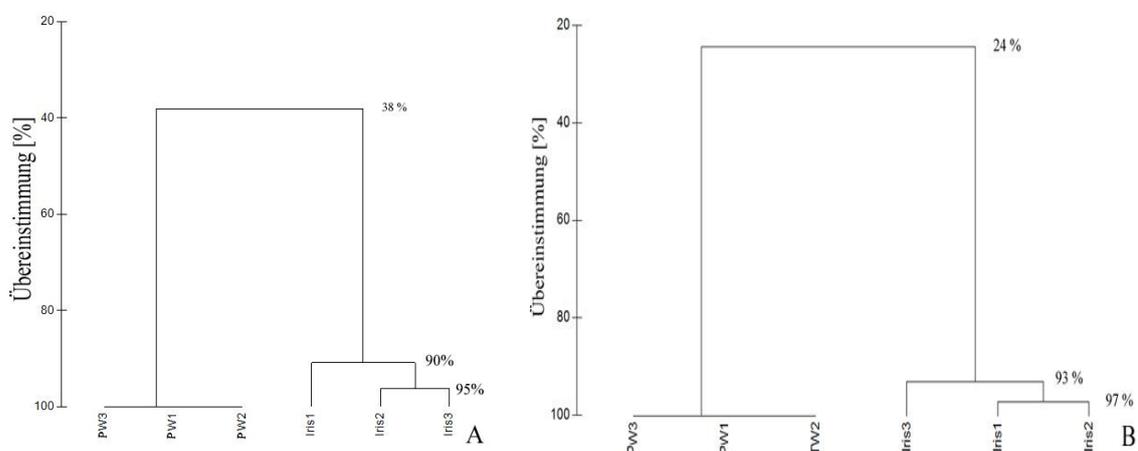


Abb. 42: Dendrogramme basierend auf den Ähnlichkeitsmatrizes der Bandenmuster der Proben in beiden Teilen des in Abb. 41 dargestellten Gels des **Iris 1**-Versuchs. Anordnung der Dendrogramme gemäß Auftragung der amplifizierten Proben im Gel. Dendrogramm A zeigt die relativen Bandenübereinstimmungen der mit unspezifischen Primern (P), Dendrogramm B die der mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) amplifizierten Proben. Die y-Achse zeigt den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

Pseudomonas 2 - *Pseudomonas* spp. -spezifische Amplifikation von PKW mit nur einer Bandenneubildung bei Verwendung eubakterieller Primer

Bei der Amplifizierung von DNS aus Proben von mit *I. pseudacorus* konditioniertem Probenwasser (IKW) des **Iris & Mentha 2**-Versuchs mit *Pseudomonas*-spezifischen ITS 1 Primern (PP) war eine größere Zahl ausschließlich in IKW neu entstandener Banden sichtbar, als bei Amplifikation mit eubakteriellen 16 S rDNS Primern (P) (P: 1 im Vergleich zu PP: 9). Auf der linken Seite des Gels (Abb. 43) wurden die mit P amplifizierten Proben aufgetragen. Dort waren im PW 7T 8 Banden zu sehen (vgl. Abb. 14, Abschnitt 3.2.1). Die Position der wiederkehrenden Bande „Bande 1“ wurde durch „PW **Iris 1**“ als „markierende Probe“ gekennzeichnet. Auf der rechten Seite des Gels waren die Amplifikationen der Proben durch PP aufgetragen. Hier kamen im PW 7T 18 Banden vor. Proben, welche bei Amplifikation mit P zur Markierung bekannter Bandenpositionen auf dem Gel verwendet wurden (St. „PW **Iris 1**“), wurden ebenfalls mit PP amplifiziert und mit den PP-amplifizierten Proben des **Iris & Mentha 2**-Versuchs aufgetragen. Dabei unterschied sich das Bandenmuster bei Amplifikons von PP von dem der mit P amplifizierten Proben.

(„Eubakterien-Primerpaar“) amplifizierten Proben auf der linken Seite von den durch PP (*Pseudomonas*-spezifisches Primerpaar“) amplifizierten Proben auf der rechten Seite des Gels abgegrenzt. Die „markierende Probe PW **Iris 1**“ zeigt die Position der „Bande 1“ im linken Gelabschnitt (mit P-Amplikons) an. Die oberste Bande des PW 7T im linken Gelabschnitt wurde mit „#“ als wiederkehrende Bande („Bande 1“) markiert. „St *Pseudomonas*“ ist der *Pseudomonas*-spezifische DNS Standard. „St“ kennzeichnet den unspezifischen DNS-Standard für Eubakterien. Der unspezifische DNS Standard, wurde sowohl mit den P- als auch mit den PP- amplifiziert und in beiden Teilen des Gels aufgetragen. In beiden Abschnitten des Gels wurden Banden, welche in PKW im Vergleich zum PW 7T nicht ausgebildet wurden durch einen Pfeil „→“ gekennzeichnet. Banden, welche spezifisch in Proben von IKW-Ansätzen entstanden, wurden durch „*“ kenntlich gemacht. Die Markierungen der Banden auf der linken Seite des Gels wurden belassen, dürfen zwischen den beiden verschiedenen Amplifikationsansätzen aber nicht verglichen werden.

Bei einer Analyse der relativen Übereinstimmungen von Bandenmustern wurde ein pauschalen R-Wert von 1, mit einer statistischen Signifikanz von 10 % errechnet. Ein Vergleich der Similarität der Banden zwischen Proben aus Ansätzen von PW 7T und Proben aus IKW ergab für P-Amplikons 36 %, für PP-Amplikons 47 % Übereinstimmung.

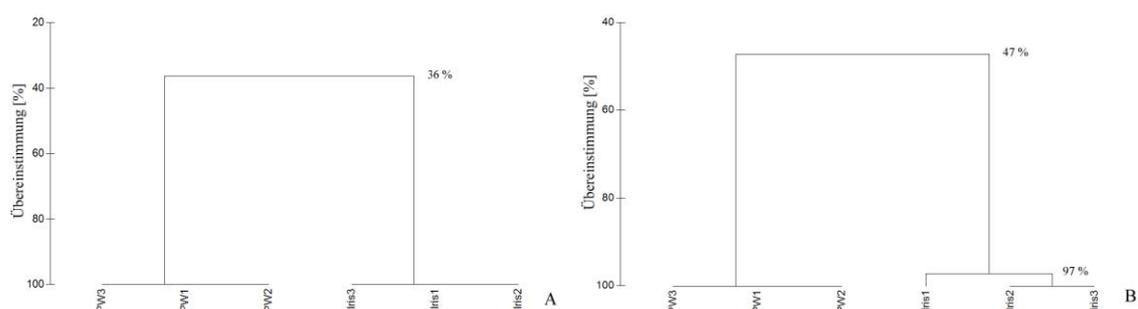


Abb. 44: Dendrogramme basierend auf den Ähnlichkeitsmatrizes der Bandenmuster der Proben in beiden Teilen des in Abb. 43 dargestellten Gels zur Analyse der Bandenmuster von Iris-Proben des **Iris & Mentha 2**-Versuchs mit verschiedenen Primern. Anordnung der Dendrogramme gemäß Auftragung der amplifizierten Proben im Gel. Dendrogramm A zeigt die relativen Bandenübereinstimmungen zwischen Proben aus PW 7T (Nullkontrolle)- und IKW-Ansätzen für die mit unspezifischen Primern (P) gewonnenen Amplikons. Dendrogramm B zeigt die relative Übereinstimmung der Banden von IKW- Proben mit der der Nullkontrolle für die mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) gewonnenen Amplikons. Die y-Achse zeigt

den Grad der relativen Übereinstimmung für die Bandenmuster einzelner Proben in Prozent.

3.6 Effekte von durch *Iris pseudacorus*-Inkubation potentiell an Wirkstoffen angereichertem PW auf das Wachstum phytopathogener Bakterien

In Versuchsansätzen von verschiedenen Bakterienstämmen trat ein signifikanter Effekt unter Inkubation mit durch *I. pseudacorus* konditioniertem PW (IKW) im Vergleich zur Inkubation mit der Nullkontrolle auf. Alle Kulturen (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*) zeigten bei Inkubation mit IKW ein gegenüber der Nullkontrolle reduziertes Wachstum. Der relative Unterschied in der Fluoreszenzintensität dieser Kulturen war sowohl gegenüber der Nullkontrolle, als auch gegenüber der Positivkontrolle des Antibiotikums Zeocin (in einer Konzentration von 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) signifikant (Tukey's test, $P = 0,05$).

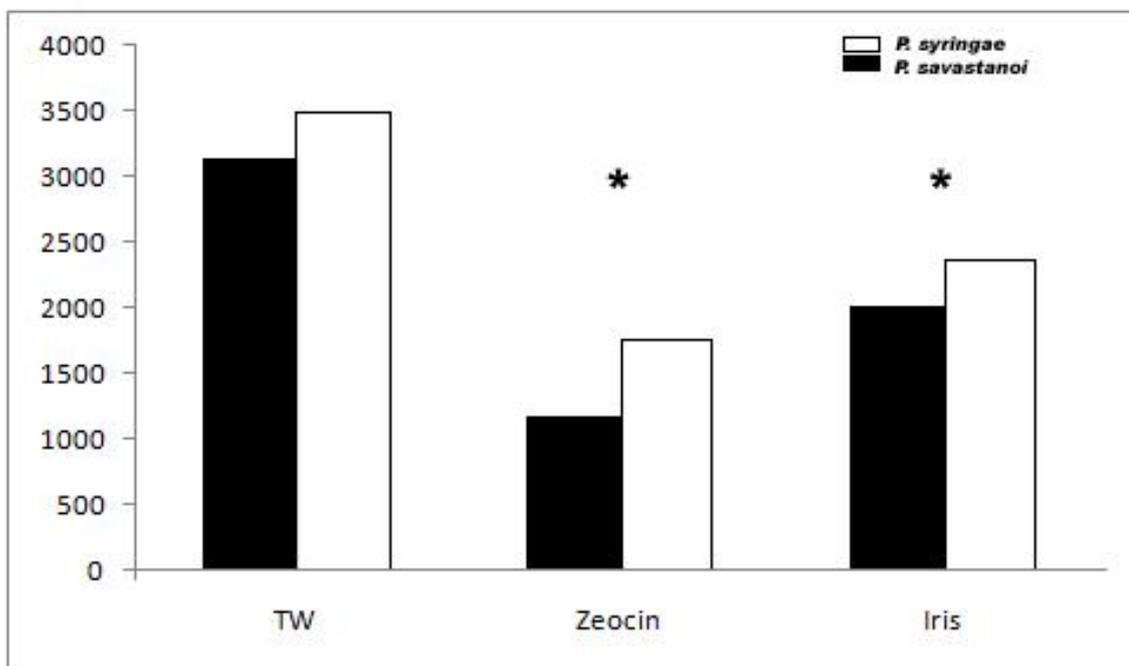


Abb. 45: Fluoreszenzintensität der Bakterienansätze nach 48 stündiger Inkubation mit aufkonzentriertem Probenwasser (PW 7T), Zeocin in aufkonzentriertem Probenwasser (Zeocin), oder IKW Konzentrat (Iris). Proben, welche sich signifikant von der Probenwasserkontrolle in ihrer Intensität unterscheiden wurden mit Stern „*“ markiert.

4 Diskussion

4.1 Natürliche Variabilität der Zusammensetzung von Bakterioplankton

Die Zahl der durch Gel-Banden repräsentierten Phylotypen variierte in Proben des als Nullkontrolle verwendeten unbehandelten 7T (7 Tage) Probenwassers (PW) in Abhängigkeit vom Jahresverlauf. Trotz der in Kapitel 2 beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen bei der Probennahme lag die Zahl von Banden zwischen 2 und 15. Diese Beobachtung bestätigte sich bei einer separaten Untersuchung auch für direkt nach Ankunft im Labor gefilterte Wasserproben (PW 0T). Diese wurden im Verlauf eines Jahres zu verschiedenen Monaten zwischen Mai und Dezember entnommen (9 im Mai bis 13 im Juli) (**PW 2008**). Nur 2 Banden stimmten im Jahresverlauf in allen Wasserproben über den gesamten Probennahme-Zeitraum überein. Es ist prinzipiell nicht verwunderlich, dass sich die Zusammensetzung von Gemeinschaften (planktonischer) Süßwasserbakterien in einem offenen System, wie es der Gießwasserteich darstellt, verändern. Die Verteilung der Mikroorganismen in einem Gewässer resultiert aus dem Zusammenwirken aller biotischen und abiotischen Faktoren. Daher ist sie auch wie diese ständig mehr oder weniger großen Änderungen unterworfen (Rheinheimer, 1981). Das Ausmaß, in welchem sich die Veränderungen mit der gewählten Analysenmethode jedoch feststellen ließen, war überraschend

In PW 7T Proben war gegenüber PW 0T ein Alterungseffekt zu erkennen. Dieser bestand darin, dass in PW 7T Proben deutlich weniger Banden sichtbar waren, als es in direkt im Anschluss an die Probennahme frisch gefiltertem Gießwasser (PW 0T) der Fall war (siehe z. B. **Iris & Mentha 2**: Bandenzahl PW 0T/ PW 7T: 12/8; $n^{12} = 3/2$; rel. Übereinstimmung: 70 % (Abb. 18); **Iris & Mentha 2-SM**: Bandenzahl PW 0T/ PW 7T: 11/8; $n^{12} = 2/1$; rel. Übereinstimmung: < 38 % (Abb. 28). Um natürliche Veränderungen innerhalb der Gemeinschaft planktonischer Bakterien aufgrund des Alterungseffekts auszuschließen, wurden Veränderungen in mit Pflanzen konditioniertem Wasser (PKW) stets mit PW 7T als Nullkontrolle abgeglichen. Auf diese Weise war es trotz der natürlichen Variabilität und des Alterungseffektes möglich, den Einfluss von *I. pseudacorus* und *M. aquatica* auf die Gemeinschaftsprofile des Bakterioplanktons in Inkubationsansätzen zu ermitteln.

¹² n= Anzahl aufgetragener Replikate je Probe (Abb. 17; Abb. 7-10)

4.2 Einfluss von *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica* auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft des Bakterioplanktons

Bei Parallelansätzen mit *I. pseudacorus* und *M. aquatica* im gleichen Probenwasser (selber Entnahme-Zeitpunkt) waren im Vergleich zur Nullkontrolle im PKW (mit Pflanzen konditionierten PW) Banden des Gemeinschaftsprofils nicht sichtbar (deletiert; siehe 3.2.1). Weiterhin gab es im PKW-Bandenprofil jedoch auch neue Banden im Vergleich zum Profil der Nullkontrolle (PW). Bandenneubildungen und Deletionen waren für 16SDNS Amplikons aus Proben sowohl für *I. pseudacorus*-PKW, als auch für *M. aquatica*-PKW spezifisch (Exp. **Iris & Mentha 1, 2**; 5.2.1). Banden-Deletionen/-Neubildungen in den 2 Versuchen bei *I. pseudacorus*: 2, 6/ 0, 1 und bei *M. aquatica*: 1, 5/ 0, 0 (Tab. 10; Tab. 4 in 5.2.1).

4.2.1 Bandendeletionen in Pflanzen konditioniertem Probenwasser (PKW) gegenüber der Nullkontrolle

Generell

Eine Bande, welche in Proben des Inkubationsansatzes im Gegensatz zu Proben der Nullkontrolle nicht (mehr) nachweisbar war, wurde so gedeutet, dass die ribosomale DNS des entsprechenden Phylotypen nach Filtration des Probenwassers nicht wiedergewonnen wurde. Diese Bande war „deletiert“ worden. Dieses Phänomen bot mehrere Interpretationsansätze:

- Die Zellen dieses Phylotypen wurden entweder lysiert, so dass die DNS freigesetzt wurde und einen 0,22 µm Filter passieren konnte, oder bereits abgebaut war.
- Die Bildung verkümmerter bzw. kleinwüchsiger Zellstadien durch schlechte Lebensbedingungen (Roszak & Collwell, 1987) könnte zur Nicht-Detektion lebensfähiger Zellen über (0,22 µm-) Filter PCR geführt haben.

Zellen, die kürzlich abgestorben aber noch intakt waren, wurden bei entsprechender Größe jedoch prinzipiell mit der Filter-PCR erfasst. Somit mussten Phylotypen, welche abgestorben waren zusätzlich bereits lysiert worden sein, um mit der Methode der (0,22 µm-) Filter PCR nicht mehr detektierbar zu sein.

Für das Absterben bzw. Verschwinden eines Phylotypen im Probenwasser-Bakterioplankton bzw. für den Übergang in ein nicht detektierbares Mangelstadium in Inkubationsansätzen im Vergleich zur Nullkontrolle gab es mehrere Ursachen.

Mögliche Mechanismen für Bandendeletionen:

1. Verringerungen von **Nährstoffen** und abiotischen Lebensgrundlagen im Wasser verschlechterten die Bedingungen für den jeweiligen Phylotypen direkt.
2. Eine veränderte **Nahrungssituation** (Verringerung bzw. Reduzierung) von Nährstoffen und abiotischen Nahrungsgrundlagen im Wasser führte zu einer erhöhten Konkurrenz zwischen Bakterien/Bakterien bzw. Bakterien/Eukaryoten, die direkt oder indirekt Lebensbedingungen für den Phylotypen verschlechterte.
3. Bakterivore **Prädatoren**, wie eubakterielle *grazer* führten zur Reduktion von Phylotypen.
4. Andere **Prädatoren** wie Bakteriophagen und Viren führten zur Reduktion von Phylotypen.
5. **Sekundärmetabolite** mit direkter oder indirekter antibakterieller Wirkung wurden durch Pflanzen und/oder Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen produziert und bewirkten direkt, oder indirekt eine Reduktion von Phylotypen.

Die unter 1 - 4 aufgeführten Mechanismen können dabei unabhängig von der Anwesenheit von Pflanzen/Pflanzen-Exsudaten zu einem veränderten Gemeinschaftsprofil führen.

Durch die Mechanismen 1 und 2 wären beispielsweise Veränderungen im Bakterioplankton in Versuchsansätzen gegenüber der Nullkontrolle erklärbar, welche durch vergrößerte aktive Oberflächen (durch die Filterwatte (FW) zur Fixierung von Pflanzen in Versuchen) entstanden. Durch einen Versuch mit FW-Nullkontrolle wurde aber festgestellt, dass FW als Grund für Veränderungen innerhalb der Gemeinschaft des Bakterioplankton ausgeschlossen werden konnte. Es zeigte sich kein Unterschied im Bandenmuster planktonischer Bakterien in Proben des PW-FW im Vergleich zur PW Nullkontrolle (Bilder der Gele, in denen die zusätzliche Nullkontrolle mit Filterwattesubstrat eingesetzt worden war in 7: Abb. 7-2 und Abb. 7-3). Dennoch hätte eine vergrößerte Oberfläche zu verstärkter Stoffwechselaktivität oder auch zur Etablierung potentiell sessiler Bakterien (Biofilmbildner) führen können. Verstärkte Biofilmbildung hätte im Vergleich zur Nullkontrolle ohne FW neue ökologische Nischen

für sessile Bakterien entstehen lassen. Es wäre denkbar, dass dies nicht nur zu quantitativen, sondern auch zu qualitativen Veränderungen in der Bakteriengemeinschaft geführt hätte. Zum Beispiel durch deletierte Gel-Banden, die einen Phylotypen repräsentierten, dessen Lebensbedingungen sich verschlechterten (Ursache 1 bzw. 2). Durch das Ergebnis beim Test auf Veränderungen in Bakterioplanktonprofilen bei Anwesenheit vergrößerter, abiotischer Oberflächen im Vergleich zur Nullkontrolle wurde diese Möglichkeit ausgeschlossen. Daher wurde davon ausgegangen, dass in **Pflanzenversuch**-Ansätzen beobachtete Veränderungen von Gemeinschaftsprofilen planktonischer Bakterien gegenüber der Nullkontrolle durch die Pflanzen und/oder mit diesen assoziierte Bakterien bewirkt wurden.

Mögliche Ursachen für Bandendeletionen in durch *I. pseudacorus* bzw.

***M. aquatica* konditioniertem PW**

Bei Parallelansätzen mit *I. pseudacorus* und *M. aquatica* im gleichen Probenwasser (Exp. **Iris & Mentha 1, 2**; 3.2.1) zeigten sich spezifisch sowohl für *I. pseudacorus*, als auch für *M. aquatica* Bandendeletionen (Bandendeletionen in den 2 Versuchen bei *I. pseudacorus*: 2, 6 und bei *M. aquatica*: 1, 5 (Tab 11; Tab. 4 in 3.2.1)). Beim **Iris & Mentha 2**-Versuch (Abschnitt 5.2.1) wurde die Wirkung von *I. pseudacorus* und *M. aquatica* auch im Kombinationsansatz untersucht. Es kam zu spezifisch von der Anwesenheit einer Pflanzenart im Ansatz abhängigen Bandendeletionen im Kombinationsansatz (Abb. 17). Zwei Banden im PW 7T (Nullkontrolle) wurden nur bei Anwesenheit von *I. pseudacorus* im Inkubationsansatz deletiert (Ansätze: Iris; Iris & Mentha (Kombinationsansatz)). Im „Mentha“-Ansatz (Mentha) waren die beiden Banden wie auch im PW 7T zu sehen und nicht deletiert. Weiterhin wurde im „Mentha“-Ansatz eine Bande artspezifisch deletiert. Zudem war die im Einzelansatz beobachtbare Banden-deletierende Wirkung von *M. aquatica* im Kombinationsansatz mit *I. pseudacorus* nicht erkennbar. Dies waren Hinweise auf potentiell unterschiedliche Wirkmechanismen zur Deletion von Banden bei den beiden Pflanzen (4.2.3). Möglicherweise führten unterschiedliche Abgaberaten und/oder Zusammensetzungen von Pflanzenexsudaten zu den artspezifisch unterschiedlichen Effekten bei Bandendeletionen (mögliche Ursache: 1 bzw. 2; 1 und 2). Die Veränderung der Konzentration anorganischer N- und P-Verbindungen im Wasser könnte in Versuchen abhängig von der Pflanzenart variiert haben. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da keine Veränderungen der Konzentrationen von N- und P-Verbindungen im Probenwasser insgesamt feststellbar waren (pH 6,5 - 7; $\text{NO}_3^- \leq 5$;

$\text{NO}_2^- \leq 0,1$; $\text{PO}_4^{3-} \leq 0,5$; 4.2.1). Allerdings erfolgte die Messung von pH, NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} mit Testsets der Aquaristik und war nicht sehr empfindlich (z. B. wurde der pH Wert in 0,5- Schritten gemessen).

Zur Untersuchung des Effektes einer Erhöhung von Nährstoffen (N-, P- Salze) wurden in einem Vorversuch (Abb. 7-1) Ansätze der Nullkontrolle und Pflanzenansätze gedüngt und mit einer ungedüngten Nullkontrolle (PW 7T und Pflanzenansatz (Mentha 7T)) verglichen. Die Düngung führte dabei nicht zu Veränderungen im Bandenprofil im Vergleich zu nicht gedüngten Proben (7.2).

Möglicherweise bewirkten Veränderungen durch Schwankungen in der Konzentration von N- und P- Salzen in Versuchen zwar quantitative Veränderungen im Bakterioplankton. Es waren jedoch keine qualitativen Veränderungen mit der verwendeten Untersuchungsmethode (Analyse der 16S rDNS- Bandenprofile) sichtbar. Vielleicht bewirkten veränderte Konzentrationen anorganischer Nährstoffe kein Absterben aller Zellen eines beeinträchtigten Phylotypen, so dass der Bandennachweis weiterhin möglich war. Neben direkten Mechanismen (Mechanismus 1) führten möglicherweise auch indirekte Mechanismen (Mechanismus 2) zu quantitativen und qualitativen Veränderungen im Bakterioplankton. In der Literatur gibt es Schilderungen einer verstärkten Prädation auf Bakterien durch Eukaryoten bei Reduktion anorganischer Nährstoffe. Aufgrund von Konzentrationsveränderungen limitierender Faktoren änderte sich das Nahrungsverhalten mixotropher Flagellaten zur heterotrophen Lebensweise (Rothaupt, 1997; Urabe *et al.*, 1999). Da Prädatoren quantitative und auch qualitative Veränderungen innerhalb von Bakteriengemeinschaften verursachen können (Jürgens *et al.*, 1999) wäre es möglich, dass sich die Konkurrenzsituation für bestimmte Phylotypen auch in Pflanzenansätzen verschlechterte (Mechanismus 2).

Anhand der Analyse von 16S rDNS Bandenmustern konnten Veränderungen der Gemeinschaft des Bakterioplanktons in Pflanzenansätzen im Vergleich zur Nullkontrolle durch Bandendeletionen festgestellt werden (2.5). Es waren jedoch keine Rückschlüsse auf Mechanismen, welche zu den Bandendeletionen führten möglich. Prinzipiell ist denkbar, dass jeder der unter 4.2.1 genannten Mechanismen zu den beobachteten deletierten Gel-Banden (die einen Phylotypen repräsentierten, dessen Lebensbedingungen sich verschlechterten) im Bandenprofil planktonischer Bakterien des PKW gegenüber der Nullkontrolle geführt hat. Keiner der aufgeführten Mechanismen wurde durch die Untersuchungsergebnisse widerlegt. Es ist auch durchaus wahrscheinlich, dass mehrere der genannten Mechanismen gleichzeitig zu den Veränderungen im Bakterioplankton führten.

4.2.2 Bandenneubildungen in mit Pflanzen konditioniertem PW (PKW) gegenüber der Nullkontrolle

Generell

Eine Bande, welche in Proben des Inkubationsansatzes im Gegensatz zu Proben der Nullkontrolle nachweisbar war zeigte, dass die ribosomale DNS des entsprechenden Phylotypen im konditionierten Probenwasser durch Filtration mit einer 0,22 µm Membran (2.5.1) gewonnen wurde. Bakterien, welche im Gegensatz zur Nullkontrolle in PWK Proben auf 0,22 µm Filtermembranen erfasst wurden, waren in diese Ansätze neu eingeschleppt worden. Eventuell wurde ihre DNS aber auch im PKW durch Filter PCR erfassbar, weil die Zellen erst dort aufgrund besserer Lebensbedingungen eine Größe erreichten, in der sie durch den Filter zurückgehalten wurden.

Mögliche Ursachen für Neubildungen von Banden in durch *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* konditioniertem PW

Bei Parallelansätzen mit *I. pseudacorus* und *M. aquatica* im gleichen Probenwasser (selber Entnahme-Zeitpunkt) zeigten sich spezifisch für *I. pseudacorus* - jedoch nicht für *M. aquatica* - Bandenneubildungen (Exp. **Iris & Mentha 1, 2**; 3.2.1). Bandenneubildungen in den 2 Versuchen bei *I. pseudacorus*: 0, 1 und bei *M. aquatica*: 0, 0 (Tab. 11; Tab. 4 in 3.2.1).

Im Kombinationsansatz von *I. pseudacorus* und *M. aquatica* im **Iris & Mentha 2**-Versuch (Abschnitt 3.2.1) kam es neben den in 4.2.1 beschriebenen spezifischen Deletionen auch zu einer spezifisch auf Präsenz von *I. pseudacorus* zurückgehenden Bandenneubildung. Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, artspezifisch unterschiedlicher Mechanismen der Interaktion beider Pflanzen mit dem Bakterioplankton im PW.

Bandenneubildungen in 16S rDNS Amplikons aus Proben von PKW gegenüber der Nullkontrolle sind prinzipiell durch abgeschüttelte assoziierte Rhizombakterien von Pflanzen möglich. Dies ist besonders bei *I. pseudacorus* morphologisch bedingt (1.5.2.1) eine wahrscheinliche Erklärung. Das ausgedehnte Wurzelwerk ermöglicht eine komplexe Rhizosphärengemeinschaft (Seidel, 1973).

Auch für Ansätze mit *M. aquatica* ist die Bildung neuer Banden in 16S rDNS Amplikons aus Proben von PKW gegenüber der Nullkontrolle durch Einschleppung epiphytischer Bakterien auf Blättern und Sprossachsen in Ansätze erklärbar. Individuen von *M. aquatica* wuchsen im Gegensatz zu *I. pseudacorus* zum Teil submers (1.5.2.2). Submers ausgebildete Stolone zeigten wie in 2.1, 1.5.2.2 beschrieben, spezielle Morphologie im Vergleich zu emers gewachsenen. Die Situation der Exposition submerser Sprosse bzw. Blätter von *M. aquatica* gegenüber Bakterien ist prinzipiell mit der einer Rhizosphäre von *I. pseudacorus* vergleichbar. Beide sind von Medium umgeben, in dem Bakterien ubiquitär auftreten. In Versuchen dieser Arbeit wurden etwa $1 - 5 \cdot 10^6$ Bakterien $\cdot \text{ml}^{-1}$ im Probenwasser festgestellt (Abb. 21). Dieser Wert erscheint im Vergleich zu gemessenen Zellzahlen von Bakterien in (marinen) aquatischen Lebensräumen plausibel (Watson *et al.* 1977). In der Luft ist die Zahl von Bakterienzellen wesentlich geringer, weil Bakterien dort in der Regel kein Substrat finden. Bei Landpflanzen befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Rhizosphäre mehr Bakterien, als dies bei Blättern der Fall ist (mögliche Ausnahme: Standorte mit hoher Luftfeuchtigkeit, keimbelastete Standorte). Daher wird es für die Interpretation der Interaktion zwischen Bakterien und Makrophyten im getesteten Wasser für wahrscheinlich gehalten, dass die submers ausgebildeten Stolone von *M. aquatica* ähnliche Anpassungen an die Anreicherung symbiontischer Bakterien aufwiesen, wie die Rhizosphären mancher aquatischer Makrophyten. Wäre dies zutreffend, so wäre es möglich, dass auch über solche Stolone von *M. aquatica* assoziierte Bakterien in Versuche eingebracht wurden.

Es war zu vermuten, dass sowohl durch *I. pseudacorus*, als auch durch *M. aquatica* assoziierte Bakterien in Versuche eingebracht wurden. Es war weiterhin wahrscheinlich, dass eingebrachte (assoziierte) Bakterien im Probenwasser als Bandenneubildungen detektiert wurden. Zur Klärung dieser Frage sollte folgende **Hypothese** getestet werden:

Neugebildete Banden in 16S rDNS Amplikons aus Proben von PKW gegenüber der Nullkontrolle repräsentierten Phylotypen pflanzenassoziiierter Bakterien, welche in die Versuche eingeschleppt wurden.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Versuche mit steril aufgewachsenen Pflanzen beider Spezies (*I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica*) durchgeführt. In diesen wurden Pflanzen-Ansätze mit steril aufgewachsenen Pflanzen (Sterilpflanzen) mit Ansätzen mit wild aufgewachsenen Pflanzen (Wildpflanzen) verglichen. Veränderungen in beiden Pflanzenansätzen wurden im Vergleich zu einer Nullkontrolle aus unbehandeltem PW (PW 7T) betrachtet.

Sterilversuche

In beiden Sterilversuchen mit *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* kam es zu Neubildungen von Banden in Pflanzenansätzen gegenüber der Nullkontrolle (Neu gebildet in Sterilversuch: Sterilpflanzen (PKW_{Sterilpflanzen}) / Wildpflanzen (PKW_{Wildpflanzen}) mit *I. pseudacorus*: 7/4 Banden; n = 3/3; mit *M. aquatica*: 3/3 Banden; n = 6/6¹³) (Tab. 11)).

Die Neubildung von Banden in PKW_{Sterilpflanzen} stand im Widerspruch zu der am Kapitelbeginn aufgestellten Hypothese, dass Bandenneubildungen im PKW gegenüber der Nullkontrolle auf pflanzenassoziierte Bakterien zurückzuführen waren. Wären im Vergleich zur Nullkontrolle zusätzlich ausgebildete Banden tatsächlich alle auf durch *I. pseudacorus* eingebrachte Rhizosphären-Bakterien zurückzuführen gewesen, so hätte man erwarten müssen, dass in Ansätzen mit steril aufgezogenen Pflanzen keine zusätzlichen Banden zu sehen gewesen wären. Ebenso wäre dies für Phyllospärenbakterien bzw. Spross-assoziierte Bakterien von *M. aquatica* erwartet worden.

Replikate dieser Versuche zeigten hohe Werte für relative Übereinstimmungen von Bandenmustern (Übereinstimmung bei Replikaten in Sterilversuch: (PKW_{Sterilpflanzen}) / (PKW_{Wildpflanzen}) von *I. pseudacorus* Ansätzen [%]¹⁴: $\geq 95 / \geq 96$; n = 3/3; Übereinstimmung bei Replikaten von *M. aquatica* Ansätzen [%]¹⁴: $\geq 90 / \geq 96$; n = 6/6). Dies deutete darauf, dass neu gebildete Banden nicht auf Artefakte (wie etwa Verunreinigungen beim Hantieren mit Probenwasser während der Filtrierung) zurückzuführen waren.

¹³ n bezeichnet die Zahl ausgewerteter Proben (DNS von Membranfiltersegment). Die Anzahl der Replikate eines Ansatzes war wie in Kapitel 2 beschrieben 3. Bei n = 6 wurden 2 Probe je Replikat (Probenglas) im Gel ausgewertet.

¹⁴ Angegeben sind die Werte der Analyse relativer Übereinstimmung von Bandenmustern (siehe Abb. 34 für **Iris steril**-Versuch bzw. Abb. 36 für **Mentha steril**-Versuch).

Unter der Voraussetzung, dass nach der in Kapitel 2 beschriebenen Methode steril aufgewachsene Pflanzen frei von anhaftenden Bakterien waren, wurde die aufgestellte **Hypothese** wie folgt **erweitert**:

Neugebildete Banden in 16S rDNS Amplikons aus Proben von PKW gegenüber der Nullkontrolle repräsentierten Phylotypen pflanzenassoziierter Bakterien, welche in die Versuche eingeschleppt wurden. Möglicherweise wurden sie auch von Phylotypen des Probenwassers verursacht, welche aufgrund verbesserter Lebensbedingungen in Inkubationsansätzen aus nicht nachweisbaren Stadien entstanden.

Es müssten sich allerdings innerhalb des Versuchszeitraums (7 Tage) aus Zellen der Nullkontrolle, die über Sterilfilter nicht gewonnen wurden Stadien gebildet haben, die durch 0,22 µm Filter erfassbar waren. Theoretisch wäre es denkbar, dass Zellen im Probenwasser unter verbesserten Lebensbedingungen gegenüber der Nullkontrolle aufgrund Bildung von wachstumsfähigen Zellen aus Mangelstadien VBNC (*viable but nonculturable*)-Zellen (Roszak & Collwell, 1987) detektiert wurden. Hahn (2004) isolierte 19 Bakterientaxa aus steril filtriertem Süßwasser durch Akklimatisierung auf substratreichem Agarmedium. Die Isolate wiesen Zelllängen von < 1 µm bis > 10 µm auf.

Mögliche Gründe für einen Selektionsvorteil bestimmter Bakterien gegenüber anderen Bakterien im PKW im Vergleich zu Nullkontroll-Ansätzen (in PKW_{Sterilpflanzen} bzw. PKW_{Wildpflanzen}) waren:

- Exsudation von Stoffen durch die Pflanze verbesserten das Milieu für den Phylotypen (z. B. durch pH Wert Änderung).
- Die sterile Pflanze bot potentiell symbiontischen Bakterien aus VBNC-Stadien im Freiwasser in der Rhizosphäre bzw. Phyllosphäre freie ökologische Nischen. Die Bakterien wurden auch im Freiwasser durch Filter PCR nachweisbar als planktonische Stadien assoziierter Bakterien oder abgeschüttelte Zellen. Vor allem für Bandenneubildungen im PKW_{Sterilpflanzen}, die auch im PKW_{Wildpflanzen} als Neubildungen gegenüber der Nullkontrolle vorkamen, wäre dies eine mögliche Erklärung.
- Die sterile Pflanze bot potentiell pathogenen oder kommensalischen Bakterien aus VBNC-Stadien im Freiwasser in der Rhizosphäre bzw. Phyllosphäre freie ökologische Nischen. Bakterien siedelten sich aus VBNC-Stadien aus dem Freiwasser heraus in freien ökologischen Nischen (Ferluga *et al.*, 2008) an. Die ökologischen Nischen waren bei Wildpflanzen durch assoziierte Bakterien der Rhizosphäre bzw. Phyllosphäre besetzt. Bei sterilen Pflanzen konnten sich die

Bakterien ungehindert vermehren und wurden im Freiwasser nachweisbar (abgeschüttelte Zellen). Dies könnte vor allem spezifisch beim Ansatz mit steril aufgewachsenen *I. pseudacorus* neu gebildete Banden erklären, die in PKW_{Wildpflanzen} nicht vorkamen.

Unabhängig von der Tatsache, dass Pflanzen in allen anderen Pflanzenversuchen Wildpflanzen waren (wild heranwachsen), wurde die erweiterte Hypothese auch für die Erklärung von Bandenneubildungen in Ansätzen dieser Versuche in Betracht gezogen (siehe 4.2). Es ist davon auszugehen, dass nicht-sterile Pflanzen eine besiedelte Rhizosphäre bzw. Phyllosphäre mitbrachten und daher weniger freie ökologische Nischen boten, als steril aufgewachsene Pflanzen. Dennoch stammten Pflanzen aus einer Akklimatisierungskultur (2.1) und kamen in Versuchen erstmals mit dem Probenwasser in Kontakt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass neue potentielle Symbionten/Pathogene/Kommensalen (assoziierte Bakterien) als nicht detektierbare Mangelstadien im PW enthalten waren.

Die Prüfung der erweiterten Hypothese ist jedoch experimentell schwer nachvollziehbar, da molekularbiologisch nachweisbare assoziierte Bakterien nicht zu kurzfristig (7T Inkubationszeit) sichtbaren Veränderungen beim Wirt geführt haben müssen. Möglicherweise wird eine Sequenzierung neu gebildeter Banden die Zugehörigkeit der Phylotypen zu Bakteriengruppen mit obligat pathogenen oder symbiontischen Vertretern aufzeigen. In einer Arbeit zum Vergleich von Bakteriengemeinschaften an gesunden und kranken Schilfrhizomen wurden bei gesunden Pflanzen Vertreter gefunden, welche sich durch Sequenzierung potentiell symbiontischen Bakterienstämmen zuweisen liessen (Micsinai *et al.*, 2003).

Auch bei Sterilversuchen kam es wie bei den zu Anfang beschriebenen Wildpflanzen zu Deletionen von Banden in PKW im Vergleich zur Nullkontrolle. Die Zahl deletierter und neu gebildeter Banden in Sterilpflanzenversuchen unterschieden sich abhängig von der verwendeten Pflanzenart. Daher werden Ergebnisse der Sterilveruche mit *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* einzeln für jede Pflanzenart diskutiert. Hinweise auf unterschiedliche Mechanismen der beiden Pflanzen, Phylotypen des Bakterioplankton zu beeinflussen, werden diskutiert.

4.2.3 Unterschiedliche Mechanismen der Beeinflussung von Phylotypen des Bakterioplankton durch *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica*

Sterilpflanzenversuch mit *Iris pseudacorus*

Im Sterilpflanzen-Ansatz mit *I. pseudacorus* kam es zu keinen Bandendeletionen im PKW im Vergleich zur Nullkontrolle. Es waren im PKW_{Sterilpflanzen} jedoch mehr Banden neu gebildet, als im PKW_{Wildpflanzen} (Deletiert PKW_{Sterilpflanzen} / PKW_{Wildpflanzen}: 0/1 Banden; neu gebildet: 7/4 Banden; n=3/3).

Möglicherweise bewirkte das Fehlen antimikrobiell aktiver Rhizombakterien den Verlust der deletierenden Wirkung bei den sterilen *I. pseudacorus*. Es wäre aufgrund des Ergebnisses denkbar, dass assoziierte Bakterien für eine antibakterielle, bzw. Bakterienbanden¹⁵-deletierende Wirkung im PKW der **Pflanzen**-Versuche mit *I. pseudacorus* aus der Akklimatisierungskultur (siehe Tab. 4a) wichtig waren.

Ein antibakterieller Wirkmechanismus über mikrobiellen Antagonismus wäre in Abschnitt 4.2.1 unter Punkt 5 einzuordnen. Ein solcher indirekter antibakterieller Wirkmechanismus beinhaltet die Anlockung und/oder Anreicherung von Mikroorganismen. Diese schaden ihrerseits anderen potentiell phytopathogenen Bakterien und eukaryotischen Konkurrenten der Pflanzen. Für den terrestrischen Lebensraum und insbesondere für agrartechnisch genutzte Pflanzen ist das Thema „*plant-growth-promoting rhizobacteria*“ (PGPR), also (Rhizo-) Bakterien, welche das Wachstum von Pflanzen verbessern ein stark bearbeiteter Forschungssektor (1.2.2). Durch pflanzenbürtige Sekundärmetabolite beeinflusst, reichern sich benigne Bakterien in der Rhizosphäre an. Durch die Produktion antibakterieller Sekundärmetabolite (Wright *et al.*, 2001) oder durch Mechanismen, die anderen Mikroben den Zugang zu Nährstoffquellen verwehren nutzen diese der Pflanze (De Weger, 1986; Peters & Long 1988; Haas & Defago, 2005; Ferluga *et al.*, 2008; Velusamy & Gnanamanickam, 2008). In limnischen Ökosystemen existieren Beschreibungen der Interaktionen von Wurzelexsudaten und im Rhizom assoziierten Mikroorganismen. In der Literatur wird berichtet über die Beeinflussung des mikrobiellen Schadstoffabbaus durch Helophyten, die in ihrer Morphologie mit *I. pseudacorus* vergleichbar sind (Lalke-Porzyk & Donderski, 1990; Moormann, 2001; Küsel, 2003; Reinhofer *et al.* 2007). Diese Studien bestärken Vermutungen, dass die Pflanzen Vorteile durch Beeinflussung des Aufbaus einer benignen Rhizosphäre haben.

Eine mögliche Erklärung für eine größere Zahl neu gebildeter Banden in PKW_{Sterilpflanzen} im Vergleich zu PKW_{Wildpflanzen} wären daher symbiontische bzw. pathogene/kommensalische Bakterien, welche freie ökologische Nischen bei bakterienfrei (steril) aufgewachsenen Pflanzen besetzen (vgl. vorausgegangener Abschnitt). Spezifisch bei Sterilpflanzen neu angesiedelte Bakterien wurden möglicherweise beim Hantieren abgeschüttelt und/oder bildeten planktonische (Vermehrungs-) Stadien. Diese wurden über Filter PCR nachgewiesen.

Auffallend beim **Sterilpflanzen**-Versuch mit *I. pseudacorus* war die im Vergleich zu anderen **Pflanzen**-Versuchen mit Wildpflanzen derselben Spezies geringe Zahl (Vgl. Tab. 4) deletierter Banden bei PKW_{Wildpflanzen}. Dabei lag die relative Übereinstimmung der Bandenprofile von Proben der 3 PKW_{Wildpflanzen} Replikate bei $\geq 96\%$ (Abb. 34). Zu Beginn von 4.2.3 wurde die Vermutung geäußert, dass assoziierte Bakterien eine wichtige Rolle für die antibakterielle Wirkung auf das Bakterioplankton hatten. Würde dies zutreffen, so wäre ein Einfluss der Größe der Rhizosphäre denkbar.

Einfluss von Größe (Wurzellänge) auf Deletion von wiederkehrenden Banden und von Banden insgesamt bei *Iris pseudacorus*

Für die Untersuchung von steril aufgewachsenen *I. pseudacorus* im Vergleich mit *I. pseudacorus*-Wildpflanzen waren zur besseren Vergleichbarkeit mit den kleinwüchsigen Sterilpflanzen, kleinere Individuen der wild aufgewachsenen Pflanzen verwendet worden. Kleine Pflanzen (5 -10 cm Wurzellänge) deletierten die in Ansätzen mit normal großen (20 cm Wurzellänge) *I. pseudacorus* durchgehend deletierte „Bande 2“ nicht. Dies war ein Hinweis auf eine verringerte antibakterielle Wirkung der kleinen Wild-*I. pseudacorus*. Außerdem wurde von 8 in der Nullkontrolle sichtbaren Banden nur eine Bande deletiert, was einem relativen Anteil deletierter Banden von 12,5 % in diesem Versuch für Wild- *I. pseudacorus* entspricht. Im Vergleich dazu lag der relative Anteil deletierter Banden bei Versuchen mit wild aufgewachsenen *I. pseudacorus* Pflanzen bei mindestens 38 % (Tab. 11).

Aufgrund der Beobachtung, dass in Übereinstimmung mit dem qualitativen Effekt auf das Muster von Banden in DGGE Gelen auch ein statistisch signifikanter quantitativer Effekt der Ko-Inkubation von Pflanzen auf die Zellzahl im Probenwasserbakterioplankton einherging (3.2.2), wird bei deletierten Banden auch von einer Reduktion der Phylotypen im Bakterioplankton ausgegangen. Es wurde

¹⁵ Banden im 16S rDNS-Gemeinschaftsprofil des Bakterioplankton aus Proben von PW

möglicherweise auch eine geringere Anzahl bakterieller Phylotypen des Bakterioplankton durch kleine *I. pseudacorus* eliminiert. Es ist denkbar, dass kleinere Pflanzen im Vergleich zu den in allen anderen Wildpflanzenansätzen verwendeten 20 cm (Wurzellänge; siehe Tab. 11)-Individuen geringere Mengen an DOC exsudierten. Die Abgabe von DOC erwies sich in Untersuchungen als abhängig von der Assimilationsleistung in der Photosynthese (Welsh *et al.* 1997). Ebenso könnte die Exsudation von Primär- und Sekundärmetaboliten durch eine kleinere Größe und ein vermutlich geringeres Alter von Versuchspflanzen beeinträchtigt gewesen sein. Die Beobachtung bei marinen Makroalgen, dass antimikrobiell wirksame Metaboliten an den Thallusspitzen konzentriert sind (Dworjanyn *et al.*, 1999), wurde von Lalke-Porczyk & Donderski (2003) an Süßwasserpflanzen bestätigt. Vermutlich war diese Beobachtung auf verstärkte Produktion antibiotischer Sekundärmetabolite zum Schutz von jungen Geweben zurückzuführen. Kulturunabhängige Untersuchungen zeigten die Gruppierung des bakteriellen Gemeinschaftsprofils von Wurzelspitzen junger Pflanzen in einer eigenen Untergruppe innerhalb von Rhizosphären-Bakteriengemeinschaften auf Wurzelspitzen (Duineveld *et al.*, 2000). Dennoch ist es denkbar, dass noch nicht ausgewachsene Pflanzen nicht alle bioaktiven Sekundärmetabolite produzieren, welche adulte Individuen zu synthetisieren fähig sind. Wenn die Pflanze zur Produktion betreffender Sekundärmetabolite auf symbiontische Bakterien angewiesen ist, so wird vermutet, dass der Aufbau einer effektiv antibiotisch wirksamen Rhizosphäre mit dem Wachstum des Rhizosphärenraums einhergeht (Bosse & Frenzel 1997). Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Größe der Rhizosphäre einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Bandendeletion bei *I. pseudacorus* hat, müssten Versuche (analog **Iris-steril**) mit normal großen *I. pseudacorus* (20 cm Wurzellänge; siehe Tab. 11) und kleinen wild aufgewachsenen *I. pseudacorus* (etwa 10 cm Wurzellänge wie Individuen in **Iris Steril**; siehe Tab. 11) durchgeführt werden. Die beiden Ansätze müssten hinsichtlich ihrer Effektivität, Banden in PW im Vergleich zu einer Nullkontrolle zu deletieren, über Filter PCR und DGGE Analyse von Bandenprofilen verglichen werden. Außerdem sollten Bakterien in PKW von Pflanzen beider Größe quantifiziert und jeweils mit der Nullkontrolle abgeglichen werden. So wäre eine Einschätzung der Effektivität der Bandendeletion bei Pflanzen mit kleinem Wurzelraum im Vergleich zu Pflanzen mit normalem Wurzelraum ausgewachsener Individuen unter den hier untersuchten Bedingungen möglich. Es wäre daraufhin möglich zu beurteilen, ob die antibakterielle Wirkung von frei schwimmenden *I. pseudacorus*-Pflanzen, wie sie in den Versuchen dieser Arbeit beobachtet wurde mit der Größe der Rhizosphäre korreliert.

Sterilpflanzenversuch mit *Mentha aquatica*

Bei *M. aquatica* kam es im Ansatz mit steril aufgewachsenen Pflanzen im Vergleich zum Wildpflanzen-Ansatz zu keinen zusätzlichen Bandenneubildungen. In beiden Pflanzenansätzen waren 3 neue Banden im Vergleich zur Nullkontrolle sichtbar (Abb. 35). Die Lage der neu gebildeten Banden in beiden Pflanzenansätzen stimmte optisch überein. Die Vermutung, dass die Banden nah miteinander verwandte Phylotypen repräsentierten, wurde allerdings nicht über eine Sequenzierung der betreffenden Banden überprüft.

Allerdings waren zur Sequenzanalyse der „Bande 2“ in dieser Arbeit ebenfalls 3 Banden, welche optisch übereinstimmten ausgeschnitten worden. Die Sequenzen der aus den Banden gewonnenen DNS stimmten insgesamt zu 90 % und mehr überein (Abb. 39). Es ist daher durchaus denkbar, dass es sich auch bei den optisch übereinstimmenden Banden im **Mentha (steril)**-Versuch um Banden desselben Phylotypen handelte. Im Vergleich zum Wildpflanzen-Ansatz war im Sterilpflanzen-Ansatz eine Bande mehr deletiert (Im $PKW_{\text{Sterilpflanzen}} / PKW_{\text{Wildpflanzen}}$ deletiert: 5/4 Banden; neu gebildet: 3/3 Banden; $n=6/6^{16}$) (Tab. 11).

Steril gezogene *M. aquatica* im Vergleich zu Wildpflanzen von *M. aquatica* im Versuch boten möglicherweise im Gegensatz zu *I. pseudacorus* keine größere Anzahl ökologischer Nischen z. B. für kommensalische Bakterien. Es ist denkbar, dass sich auf steril gewachsenen, sowie auf Wildpflanzen von *M. aquatica* im Gegensatz zu *I. pseudacorus* nur stark spezialisierte Bakterien ansiedeln konnten. Dies wäre z. B. denkbar in Zusammenhang mit der Abgabe etherischer Öle durch die Pflanze. Für *M. aquatica* (Mimica-Dukić *et al.*, 2003) und die Gattung *Mentha* allgemein ist die Produktion antibiotisch wirksamer etherischer Öle bekannt (Deans, 2007; Lawrence, 2007). Es ist davon auszugehen, dass sowohl Sterilpflanzen, als auch Wildpflanzen etherische Öle produzieren. Möglicherweise waren spezialisierte Phylotypen des Bakterioplankton in der Lage, Komponenten etherischer Öle als Substrat zu nutzen. Es ist außerdem denkbar, dass *M. aquatica* im Gegensatz zu *I. pseudacorus* keine für nicht spezialisierte Bakterien des Bakterioplankton verwertbare Substrate exsudierte. Wenn dies zutreffen würde, ließe sich erklären, warum auf steril- und auf wild aufgewachsenen Pflanzen die gleichen assoziierten Phylotypen detektierbar waren.

¹⁶ n bezeichnet die Zahl ausgewerteter Proben (DNS von Membranfiltersegment). Die Anzahl der Replikate eines Ansatzes war wie in Kapitel 2 beschrieben 3. Bei n=6 wurden 2 Probe je Replikat (Probenglas) im Gel ausgewertet.

Die Beobachtung, dass eine steril aufgewachsene Pflanze effektiver bakterielle Phylotypen im Probenwasser deletierte, als eine in natürlicher (Bakterien enthaltender) Umgebung aufgewachsene war ein Hinweis auf eine nicht von assoziierten Bakterien abhängige antibakterielle Wirkung von *M. aquatica*. Möglicherweise waren oben genannte etherische Öle für die Banden deletierende Wirkung¹⁷ der Pflanzenart verantwortlich.

Die spezifischen Unterschiede deletierter und neu gebildeter 16S rDNS Banden in DGGE Gelen von **Pflanzen**-Versuchen im Kombinationsansatz und in Parallelversuchen (4.2) unterstützten die Hypothese von artspezifisch unterschiedlichen antibakteriellen Mechanismen. Vergleiche zwischen Einzelversuchen mit beiden Pflanzenarten bezüglich relativer Veränderungen im Bandenprofil planktonischer Bakterien des Probenwassers waren nicht möglich. Daher wurden DNS-Sonden zur Verfolgung wiederkehrender Banden eingesetzt, um die Eliminierung der diese Banden repräsentierenden Phylotypen zwischen verschiedenen Versuchen vergleichen zu können. Dabei wurden spezifische Unterschiede für die beiden Pflanzenarten gefunden, die wiederkehrenden Banden „Bande 1“ bzw. „Bande 2“ zu deletieren.

Deletion wiederkehrender Banden in Anwesenheit von *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica*

Es war Ziel dieser Arbeit nicht nur relative, sondern auch spezifische Veränderungen im Auftreten von natürlich im Probenwasser enthaltenen Bakterien aufgrund der Präsenz von Versuchspflanzen zu beschreiben. Daher wurde nach wiederkehrenden Banden innerhalb verschiedener Proben gesucht. Die „Bande 2“ kam in über 80 % der DGGE Gele von Inkubationsversuchen mit Pflanzen bzw. durch Pflanzen konditioniertem PW vor (siehe Tab. 9). Im **PW 2008**-Gel (siehe 4.1; Abb. 8) kam „Bande 2“ in allen zu 6 verschiedenen Zeitpunkten (Mai, Juni, Juli, September, Oktober, Dezember 2008) gezogenen Wasserproben vor. Sie wies vermutlich auf einen im Probenwasser häufig vorkommenden Phylotypen hin. „Bande 1“ wurde für die Verfolgung mit einer DNS-Sonde ausgewählt, weil sie im **Iris 1**-Versuch deletiert wurde (PKW im Vergleich zur Nullkontrolle). Sie kam in 64 % der DGGE Gele von Inkubationsversuchen mit Pflanzen bzw. Pflanzen konditioniertem PW (4.3) vor (siehe Tab. 9).

¹⁷ Banden im 16S rDNS-Gemeinschaftsprofil des Bakterioplankton aus Proben von PW

Durch die Verfolgung zweier im Probenwasser häufig vorkommender Banden in allen Versuchen wurde die Hypothese einer stärkeren Wirkung von *I. pseudacorus*-Pflanzen im Vergleich zu *M. aquatica*-Pflanzen unterstützt („Bande 1“ deletiert in „Iris“-/„Mentha“-Versuchen: immer/immer; $n_{\text{versuche}}=4/1$; „Bande 2“ deletiert in „Iris“-/„Mentha“-Versuchen: immer/nie; $n_{\text{versuche}}=3/3$) (Tab. 9). Es wurden nur Versuche berücksichtigt, in denen die Banden in der Nullkontrolle sichtbar waren. Es wurden außerdem hier nur **Pflanzen**-Versuche mit wild aufgewachsenen Individuen berücksichtigt. Diskussion des Vorkommens der „Bande 1“ bzw. „Bande 2“ in Sterilpflanzenversuchen bzw. in **Sekundärmetaboliten**-Versuchen wird nachfolgend, bzw. in 4.3 beschrieben.

Tab. 9: Vorkommen und Deletion der wiederkehrenden Banden „Bande 1“ bzw. „Bande 2“ in Inkubationsversuchen. Iris, Iris & Mentha, Mentha bezeichnet Inkubationsansätze mit *I. pseudacorus*, *I. pseudacorus* & *M. aquatica*, *M. aquatica*. Iris & Mentha ist der Kombinationsansatz, die anderen sind Parallelansätze. „-“ steht bei Banden, welche in der PW Nullkontrolle nicht sichtbar waren. Für diese war keine Aussage zur möglichen Deletion im Pflanzenansatz möglich.

Versuch	„Bande 1“ sichtbar	„Bande 2“ sichtbar	„Bande 1“ deletiert	„Bande 2“ deletiert
Iris 1	ja	nein	ja	-
Iris 2	ja	nein	ja	-
Iris 3	ja	ja	ja	ja
Iris & Mentha 1	nein	ja	-	Ja bei Iris; nein bei Mentha
Iris & Mentha 2	ja	ja	Ja bei allen	ja bei Iris, Iris & Mentha; nein bei Mentha
Mentha (steril)	nein	ja	-	nein für Steril-, nein für Wildpflanzen
Iris steril	nein	ja	-	nein
Mentha SM	ja	ja	nein	nein
Iris 2 - SM	ja	ja	nein	nein
Iris & Mentha 1 SM	nein	ja	-	nein bei allen
Iris & Mentha 2 SM	ja	ja	nein bei allen	nein bei allen

Der die „Bande 2“ der verfolgten DNS-Banden repräsentierende Phylotyp wurde nur in Anwesenheit der Pflanze *I. pseudacorus* im Probenwasserbakterioplankton eliminiert. Bei Versuchen bzw. Ansätzen mit *M. aquatica*-Pflanzen war die Bande in PKW und der Nullkontrolle zu sehen. „Bande 2“ war in Nullkontrollen beider **Sterilpflanzen**-Versuche sowie auch in Pflanzenansätzen mit Sterilpflanzen zu sehen. Die Bande wurde in

Pflanzenansätzen mit wild aufgewachsenen *I. pseudacorus* immer (mit einer Ausnahme: Wild aufgewachsene Pflanzen des **Sterilpflanzen**-Versuchs; siehe Diskussion des Einflusses der Pflanzengröße zu Beginn dieses Abschnitts) deletiert im Vergleich zur Nullkontrolle. In den beiden **Sterilpflanzen**-Versuchen kam es jedoch weder durch *M. aquatica*, noch durch *I. pseudacorus* dazu. Diese Beobachtung ist ebenfalls zur Stützung der Hypothese geeignet, dass assoziierte Bakterien möglicherweise eine wichtige Rolle bei der antibakteriellen Wirksamkeit von *I. pseudacorus* erfüllen. Da in Versuchen mit *M. aquatica*-Pflanzen die „Bande 2“ auch in Anwesenheit wild aufgewachsener Pflanzen nie deletiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass kein Mechanismus bei der Pflanze ausgebildet war, welcher zur vollständigen Elimination dieses Phylotypen in Versuchen führte.

Die „Bande 1“ dagegen wurde in Pflanzenansätzen immer deletiert, wenn sie in der Nullkontrolle vorhanden war (Tab. 9).

Da in der Nullkontrolle der **Sterilpflanzen**-Versuche „Bande 1“ nicht sichtbar war, wird keine Aussage zu deren möglicher Deletion in Anwesenheit von Pflanzen in diesen Versuchen getroffen.

Insgesamt war die Menge der gegenüber der Nullkontrolle deletierten Banden im PKW in Vergleichsansätzen (in **Iris & Mentha 1**; **Iris & Mentha 2**) bei Inkubation mit *I. pseudacorus* größer als bei Inkubation mit *M. aquatica* (Banden-Deletionen in den 2 Versuchen bei *I. pseudacorus*: 2, 6 und bei *M. aquatica*: 1, 5 (4.2, Tab. 11). Dies war ein Hinweis auf eine stärkere bakterienunterdrückende Wirkung von *I. pseudacorus* auf das Bakterioplankton des untersuchten Probenwassers im Vergleich zu *M. aquatica*. Die auch gegenüber den wiederkehrenden Banden festgestellte stärker deletierende Wirkung von *I. pseudacorus* unterstütze die Vermutung einer stärkeren antibakteriellen Wirksamkeit auf das Bakterioplankton von *I. pseudacorus* weiter.

Zur Untersuchung der ökologischen Relevanz der Phylotypen, welche die wiederkehrenden Banden repräsentierten, wurden die Banden sequenziert. Zur weiteren Spezifizierung von Banden, welche von den untersuchten Pflanzenarten eliminierte Phylotypen des Bakterioplankton repräsentierten, wurden spezifische Primer zur Amplifikation von PKW-Proben DNS eingesetzt.

4.2.4 Spezifizierung der durch Inkubation mit *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* deletierten Banden

„Bande 1“ und „Bande 2“ repräsentieren möglicherweise ubiquitäre Süßwasserbakterien

Bei der Sequenzierung der in Anwesenheit von *I. pseudacorus* in Pflanzenansätzen immer deletierten, wiederkehrenden „Bande 2“ und einem Abgleich der erhaltenen Sequenz mit der NCBI Datenbank für ribosomale DNS Sequenzen von Bakterien zeigte sich eine nahe Verwandtschaft zu Vertretern der *Polynucleobacter* Gruppe (β -*Proteobacteria*) (Übereinstimmung 98 %; 437 von 474 bp) (3.5.1.1). Diese Bande wurde in Anwesenheit von *M. aquatica*-Pflanzen nie deletiert.

Die Sequenzierung der „Bande 1“ ergab eine Verwandtschaft zu Vertretern der *Flavobacteriaceae* (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)) (Übereinstimmung 91 %; 355 von 457 bp) (3.5.1.2). Diese Bande repräsentierte einen sowohl in Anwesenheit von *I. pseudacorus*-, als auch *M. aquatica*-Pflanzen eliminierten Phylotypen. In einer Studie von 689 16S rRNS-Gen-Sequenzen aus Süßwasser-Seen und -Flüssen gehörten Vertreter der Abteilungen der *Proteobacteria* (α - und β -Unterabteilung) und der CFB zu den häufigsten und waren kosmopolitisch ubiquitär (Zwart *et al.*, 2002). In Studien zur Analyse von SüßwasserBakterioplankton-Gemeinschaften wurden Bakterien der *Polynucleobacter*-Gruppe immer gefunden (Hiorns *et al.*, 1997; Zwart *et al.*, 2002; Hahn, 2003; Newton *et al.*, 2006; Weisse, 2006). Die genannten Autoren bzw. Arbeitsgruppen nutzten Methoden für ihre Studien, welche unabhängig von einer Kultivierung sind. Die Isolierung von Bakterien der *Polynucleobacter*-Gruppe war aber bis vor kurzem noch unmöglich, da viele zu den obligaten Ultramikrobakterien ($<0.1 \mu\text{m}^3$) gehören. Diese wachsen langsam und halten Konkurrenz in Kultur unter Standardbedingungen nicht stand (Hahn, 2003). Für die Sequenzierung wurde (nach dem *E. coli* – Nummerierungssystem für Basen des 16S rRNS Gens (Brosius *et al.*, 1978)) nur der Ausschnitt von Position 341 – 907 der 16SDNS eingesetzt und daher ist die Zuordnung zu den genannten Gattungen unsicher. Für eine exakte Zuordnung müsste eine 16S rDNS- Genbibliothek (*gene-library*) des Organismus in Klonen erstellt und sequenziert werden. Sollte sich die Identifikation der Banden als ubiquitäre Teichwasserbakterien bestätigen, so hätte die Anwesenheit von *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* zur Elimination einer in großen Zahlen (Boenigk *et al.* 2004) ($> 60 \%$ der bakteriellen Gemeinschaft eines getesteten

Huminstoff-reichen Sees) (Wu & Hahn, 2005) im Probenwasser vorkommenden Gruppe geführt. Über die Ökologie von Vertretern der *Polynucleobacter* Gruppe ist wenig bekannt (Watanabe *et al.*, 2009). Um beurteilen zu können, welche ökologische Relevanz spezifische antibakterielle Mechanismen gegen Vertreter der *Polynucleobacter* Gruppe haben, muss mehr über die Ökologie dieser Bakterien in Erfahrung gebracht werden. Bisher ist bekannt, dass es mit *Euplotes aediculatus* assoziierte möglicherweise fakultativ symbiontisch lebende *Polynucleobacter* gibt (Heckmann & Schmidt, 1987). Eine Literaturrecherche gab keinen Hinweis auf Phytopathogenität von Vertretern der *Polynucleobacter* Gruppe (Hahn, 2003; Hahn *et al.*, 2005; Boenigk *et al.* 2004). Die Zuordnung des Phylotypen der „Bande 1“ ist nicht signifikant und muss mithilfe einer 16S rDNS-Genbibliothek des Organismus und einer Sequenzierung von dieser abgesichert werden, um Aussagen treffen zu können.

Spezifisch gegenüber *Escherichia coli*, Enterokokken und Salmonellen hatte Seidel (1971) in ihren Versuchsaufbauten (in Durchlaufrieten) eine bessere Abbauleistung für *M. aquatica* im Vergleich zu *I. pseudacorus* ermittelt. Allerdings wurde in 4.2.3 auf die Möglichkeit eingegangen, dass bei *I. pseudacorus* und *M. aquatica* verschiedene antibakterielle Wirkmechanismen aktiv sind. Dies macht die Ergebnisse des Vergleichs der antibakteriellen Effektivität beider Pflanzen in verstärktem Maße abhängig von der gewählten Nachweismethode und den verwendeten Modellorganismen. Möglicherweise waren die von Seidel gewählten Zielorganismen für antibakterielle Wirkungen der Pflanzen sensibler gegenüber antibakteriellen Mechanismen von *M. aquatica* (z. B. etherischen Ölen). Die in dieser Arbeit überwachten Vertreter einer natürlichen Bakterioplankton-Gemeinschaft dagegen zeigten sich sensibler gegenüber den Mechanismen von *I. pseudacorus*.

Amplifikation von Proben-DNS aus *Iris pseudacorus*-Inkubationsversuchen mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) im Vergleich zur Nullkontrolle

Bei der Amplifikation von DNS aus Proben von *I. pseudacorus*-**Inkubationsversuchen** mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) zeigten sich Bandenneubildungen im IKW (mit *Iris pseudacorus* konditioniertes PW) gegenüber der Nullkontrolle. Im Vergleich zu der Zahl von neuen Banden in parallel mit unspezifischen eubakteriellen Primern (P) amplifizierten Proben desselben Versuchs kam es zu vielen Neubildungen (Neue Banden in P-/PP- Amplikons bei Exp. **Pseudomonas 1**: 6/15 und bei Exp. **Pseudomonas 2**: 1/9; n=3/3 in beiden Exp.) (3.5.2). Neugebildete Banden im IKW gegenüber der Nullkontrolle stammten daher wahrscheinlich zum Teil von der Gattung *Pseudomonas*. Bei Amplifikation von IKW-Proben-DNS aus dem **Iris & Mentha 2**-Versuch kam es mit PP zu 9 Bandenneubildungen, obgleich in mit P amplifizierten IKW Proben eine neue Bande sichtbar wurde. Möglicherweise war dies jedoch ein Hinweis auf Bandenbildung an mehreren Positionen bei Amplifikation mit den ITS 1 Primern (2.5.3). Bei Amplifikation mit 16S rDNS wurde bereits über die Existenz multipler Operons bei Genen der kleinen ribosomalen Untereinheit berichtet („rrn Operons“, siehe Nübel et al. 1996; Lam, 2007). Es ist denkbar, dass ähnliche Sequenzheterogenitäten innerhalb von anderen Genen der ribosomalen RNS und vielleicht auch in nicht-kodierenden Abschnitten vorkommen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass neu aus Probenwasser etablierte, assoziierte Bakterien von *I. pseudacorus* (vgl. 4.2.2) der Gattung *Pseudomonas* angehörten. Viele bisher entdeckte, mit Pflanzen assoziierte (Rhizo-) Bakterien im terrestrischen (Ferluga et al., 2008) wie im aquatischen Lebensraum (Gunnison & Barko, 1989) sind Vertreter der Gattung *Pseudomonas*. Auch viele der genannten „*plant-growth-promoting rhizobacteria*“ (PGPR) gehören dieser Bakteriengattung an (de Weger, 1986; Defago, 2005). Unter diesem Gesichtspunkt ist es potentiell möglich, einige der im PKW detektierten Bandenneubildungen in **Pseudomonas**-Gelen durch „eingeschleppte“ bzw. aus dem Probenwasser in Anwesenheit der Pflanze etablierte Phylotypen Rhizom-assoziiierter Bakterien zu erklären. Viele Phytopathogene entstammen ebenfalls der Gattung *Pseudomonas* (z. B. *Pseudomonas syringae*). Diese Art ist aufgrund der Überlebensfähigkeit in Wasser und der Verbreitung mithilfe von Gießwasser ein besonders problematisches Phytopathogen (Bashan, 1985; Riffaud & Morris, 2002). Wie in 4.2.2 beschrieben, wäre es durchaus denkbar, dass potentielle Phytopathogene sich aufgrund freier ökologischer Nischen auf sterilen *I. pseudacorus* etablierten.

Bereits bei der Untersuchung der Pflanzenart-spezifischen Deletion wiederkehrender Banden in Abschnitt 4.2.3 wurde in Tab. 9 der Untersuchung einer potentiell antibakteriellen Wirkung von Pflanzenexsudaten in Abwesenheit von Pflanzen vorgegriffen. Die Betrachtung der antibakteriellen Wirkung von *I. pseudacorus* bzw. *M. aquatica* gegenüber bakteriellen Phylotypen im Bakterioplankton erfolgte anhand der Kultur- unabhängigen Methode der Filter PCR und der DGGE Gel Analyse von Bandenprofilen (4.2). Durch diese indirekte Nachweismethode wurde ein antibakterieller Effekt der beiden untersuchten limnischen aquatischen Makrophyten (LAM) gegenüber Phylotypen des Bakterioplankton sichtbar. Dieser wurde festgestellt durch deletierte Banden im PKW im Vergleich zur Nullkontrolle. Es zeigten sich spezifische Unterschiede zwischen den beiden LAM in der deletierenden Wirkung auf Phylotypen im PW. Außerdem wurde die Deletion einer Bande, welche einen Phylotypen repräsentiert, der potentiell nahe verwandt zu ubiquitären Teichwasserbakterien ist, häufig festgestellt. Durch Inkubationsversuche mit Bakterioplankton des PW durch PKW in Abwesenheit der Pflanze (durch welche PKW gewonnen worden war) wurde die antibakterielle Wirkung der Pflanzenexsudate getestet (**Sekundärmetaboliten**-Versuche).

4.3 Effekt exsudierter Sekundärmetabolite (SM) von *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica* auf das inkubierte Bakterioplankton und inkubierte Bakterien

Die Zahl deletierter Banden in **Sekundärmetaboliten (SM)**-Versuchen (**Iris & Mentha 1-SM; Iris & Mentha 2-SM; Iris-SM; Mentha-SM**) war geringer als in den vorausgegangenen **Pflanzen**-Versuchen (Tab. 5 a, b).

Im **Iris & Mentha 2-SM**-Versuch (Abb. 27) wurden Bandendeletionen im PKW beobachtet (Tab. 10). Nur in diesem **SM**-Versuch kam es bei Ansätzen mit *I. pseudacorus* und bei Ansätzen mit *M. aquatica* zu Deletionen und zu einer von der Anwesenheit von IKW abhängigen Deletion (Abb. 27). Im Parallelversuch **Iris & Mentha 1-SM** und in den Einzelversuchen **Iris-SM** bzw. **Mentha-SM** wurden dagegen keine Banden im PKW inkubierten PW deletiert. Die Spezifität einer Deletion und die hohe Übereinstimmung von Replikaten (100%) ($R=1$; Signifikanzlevel=0,1) im **Iris & Mentha 2-SM**-Versuch machten eine Auswertung des Versuchs trotz der geringen Zahl der auf das DGGE Gel aufgetragenen Replikate ($n = 2$) zulässig. Wie gezeigt wurde, kam es auch in **Sekundärmetaboliten**-Versuchen zu Deletionen von Banden im Vergleich zur Nullkontrolle (Tab. 10). Es erscheint daher denkbar, dass

Exsudate bzw. exsudierte Sekundärmetabolite im Umgebungswasser der Pflanzen auch in deren Abwesenheit wirksam blieben.

Lam & Harder (2007) wiesen Reduktionseffekte von durch Exsudate mariner Makroalgen konditioniertem Wasser auf Phylotypen des marinen Bakterioplankton in unmittelbarer Nähe nach. Der Versuchsansatz war dem hier verwendeten methodisch ähnlich. In der Arbeit verwendete Makroalgen stammten aus Gattungen, für die teilweise in der Literatur durch Extraktetests eine antibakterielle Wirksamkeit bereits bestätigt war. Wie in der vorliegenden Untersuchung kam es auch in dieser Studie sowohl in Inkubationsversuchen in Anwesenheit der Makroalgen, als auch in Versuchen mit Exsudatwasser in Abwesenheit der Pflanzen zu Deletionen von Banden im Bakterioplankton des Testwassers. Ebenso wie in dieser Untersuchung an *I. pseudacorus* und *M. aquatica* war die antibakterielle Wirksamkeit der Makroalgen in Versuchen in deren Anwesenheit größer, als in Abwesenheit.

In dieser Untersuchung mit *I. pseudacorus* und *M. aquatica* bei Versuchen mit Exsudatwasser waren keine der verfolgten Banden von Deletionen betroffen (siehe 4.2.3; Tab. 9). Die Eliminierung von Phylotypen war anscheinend abhängig von der im PW vorhandenen Bakterioplankton-Gemeinschaft. Nur auf diese Weise ist erklärbar, weshalb es nur in einem Versuch (**Iris & Mentha 2-SM**) zu Bandendeletionen kam und in den anderen beiden **Sekundärmetaboliten**-Versuchen nicht. Dies deutet wiederum auf eine Spezifität der antibakteriellen Wirkungen von Pflanzenexsudaten für bestimmte Phylotypen des Bakterioplankton.

Alle Punkte der in 4.2.1 geführten Diskussion könnten die auch in Abwesenheit der Pflanzen beobachtbare antibakterielle (Banden-deletierende¹⁸) Wirkung erklären. Die einzigen nicht zu berücksichtigenden potentiellen Wirkmechanismen sind die, welche von der Anwesenheit Pflanzen assoziierter Bakterien ausgingen. Dieser Faktor, wurde durch die Sterilfiltrierung von PKW vor Versuchsstart ausgeschlossen.

Damit ist die antibakterielle Wirkung, welche in dieser Arbeit anhand von Bandendeletionen erkennbar war keinesfalls ausschließlich auf Sekundärmetabolite von Pflanzen/Pflanzen-assoziierten Bakterien beschränkt. Die verwendete, Kultur-unabhängige Analyseverfahren für (antibakterielle) Wirkungen limnischer aquatischer Makrophyten auf Bandenprofile der Bakterioplankton-Gemeinschaft war nicht selektiv auf die Erfassung dieses Aspektes einer möglichen antibakteriellen Wirkung ausgerichtet (4.4). Verfahren zum Nachweis und Test antibakteriell wirksamer Sekundärmetabolite, welche auf Extraktionen aus Pflanzen basieren sind fehleranfällig

¹⁸ Banden im 16S rDNS-Gemeinschaftsprofil des Bakterioplankton aus Proben von PW

und selektiv (Hirsch *et al.* 2003). Außerdem lassen sie oft keine Schlüsse auf die ökologische Relevanz von *in vitro* gewonnenen Ergebnissen zu. Der Nachweis der aktiven Abgabe beschriebener Antibiotika und anderer Sekundärmetabolite durch die Pflanze ist schwierig (Glomski *et al.* 2002). Probleme bei der Detektion der Stoffe ergeben sich durch Verdünnung und häufig kurze Halbwertszeiten bioaktiver Sekundärmetabolite (Lewis, 1986) im Wasser. Nachweise physiologisch wirksamer Konzentrationen von Stoffen sind bei der raschen Verdünnung im wässrigen Lebensraum schwer zu erbringen. In Anwesenheit der Pflanze wurden vermutlich in Konzentrations-*hotspots* (vgl. Paul *et al.* 2006) in unmittelbarer Nähe des Pflanzenkörpers ausreichend hohe Konzentrationen für eine antibakterielle Wirkung erreicht. Möglicherweise an spezialisierten Drüsen der Epidermis.

Es waren auch in einem **Sekundärmetaboliten**-Versuch Banden-Neubildungen im Vergleich zur Nullkontrolle zu sehen (**Iris & Mentha 2-SM**). Analog zu der Beobachtung von Bandenneubildungen bei Versuchen mit Sterilpflanzen (4.2.2) musste auch für **Sekundärmetaboliten**-Versuche die eingangs für (Wild-) **Pflanzen**-Versuche aufgestellte Hypothese erweitert werden. Vermutlich handelte es sich bei den Banden um Phylotypen, welche sich in PKW aus einem nicht detektierbaren Mangelstadium in nachweisbarer Größe etablierten. Dies ist möglicherweise auf exsudierte Wirkstoffe von Pflanzen/Pflanzen-assoziierten Bakterien zurückzuführen, welche das Wachstum und/oder die Konkurrenzsituation der Phylotypen verbessert haben. Möglich wäre auch eine indirekte Wirkung der Exsudate durch antibakterielle Wirkung auf Konkurrenten des Phylotypen. (4.2.1).

Zusammenfassend ist es wahrscheinlich, dass Pflanzen und/oder mit ihnen assoziierte Mikroorganismen antibakteriell wirksame Stoffe/Sekundärmetabolite abgaben. Offenbar wurden die Stoffe jedoch in zu geringen Konzentrationen für eine Aufrechterhaltung der Wirkung in deren Abwesenheit abgegeben. Um die antibakterielle Wirkung der Exsudate untersuchter Pflanzen bzw. von assoziierten Mikroorganismen der Pflanzen zu überprüfen, wurde ein Inkubations-Versuch mit potentiell phytopathogenen Bakterien und Konzentraten des PKW durchgeführt.

In diesem Versuch wurde gleichzeitig getestet, ob der nahe mit in Gießwasser überlebensfähigen *Pseudomonas syringae* (Riffaud & Morris, 2004) verwandte *P. syringae* pv. *syringae* durch Exsudate von *I. pseudacorus* im Wachstum beeinflusst wurde

Tab. 10: Zusammenfassung der Zahl deletierter Banden in PKW-inkubiertem Probenwasser in Proben von **Sekundärmetaboliten**-Versuchen im Vergleich zu den vorausgegangenen **Pflanzen**-Versuchen. * n_{Replikate}= 2; ** n_{Replikate}= 3; ***n_{Replikate}= >3.

Versuch	Bandendeletionen in Pflanzen -Versuchen		Bandendeletionen in PKW -versuchen	
	Iris-Ansatz	Mentha-Ansatz	Iris-Ansatz	Mentha-Ansatz
Iris & Mentha 1	2***	1**	0**	0**
Iris & Mentha 2	6*	5*	4*	3*
Iris ¹⁹	3***	-	0**	-
Mentha	-	4***	-	0**

Einfluss exsudierter Sekundärmetabolite von *Iris pseudacorus* auf *Pseudomonas* spp.

Potentiell phytopathogene Stämme von *Pseudomonas* (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*) wurden durch Inkubation mit in Wasser gelösten Konzentraten von *Iris pseudacorus*-Exsudat signifikant im Wachstum gehemmt. Die Dichte der Zellen in mit IKW- (Iris konditioniertes PW) Konzentrat inkubierten Kulturen verringerte sich während einer 48 h Inkubation im Vergleich zur Inkubation mit der Nullkontrolle signifikant ($P = 0.05$) (3.6). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht feststeht, ob die getesteten Pseudomonaden auch im Probenwasser vorkamen. Prinzipiell ist es durchaus denkbar, dass phytopathogene Bakterien im untersuchten Gießwasser vorhanden waren. Die Verbreitung von phytopathogenen Bakterien durch Bewässerungssysteme ist ein bekanntes Problem (Riffaud & Morris, 2002; Seipp *et al.*, 2007). *Pseudomonas* spp. können auch in nährstoffarmen Wasser leben (Byrd *et al.*, 1991). Es ist daher möglich, dass sich bei den aquatischen Makrophyten Mechanismen zum Schutz gegen phytopathogene *Pseudomonas* spp. entwickelt haben.

¹⁹ Pflanzenversuch: **Iris 2**

In Gelen von **Pseudomonas**-Versuchen (4.2.4) wurden Amplikons eines Gemischs von 3 *Pseudomonas*-DNS Isolaten (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. fluorescens*; siehe M&M) als DNS-Standard verwendet. Einige der Bandenpositionen der ausgebildeten Banden dieses DNS Standards stimmten dabei mit denen von PP-amplifizierten PW 7T Proben überein (Abb. 41, Abb. 43). Dies ist ein Hinweis auf eine Anwesenheit von Phylotypen im Probenwasser, die nahe mit den getesteten Pseudomonaden sind. Allerdings müsste die Übereinstimmung der Banden durch eine Sequenzierung überprüft werden, um eine Aussage zu treffen, ob potentiell phytopathogene *Pseudomonas*-Stämme im Probenwasser vorhanden waren. Ebenso wäre es auf diese Weise möglich, die in Anwesenheit von *I. pseudacorus* beeinflussten *Pseudomonas* zu identifizieren. Die Beobachtung, dass bei **Sekundärmetaboliten**-Versuchen die Deletion abhängig war von der im PW vorhandenen Bakteriengemeinschaft spricht für eine insgesamt stark selektive antibakterielle Wirkung von Pflanzenexsudaten.

Der Effekt der signifikanten Wachstumsverringerng auf *P. syringae* pv. *syringae* und *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* war bei Verwendung eines 10x Konzentrats von IKW aus 3 Probengläsern (Replikaten) aufgetreten. Für den Nachweis, dass die in diesem Ansatz mit dem Exsudate-Konzentrat erreichte Konzentration unter natürlichen Bedingungen lokal erreicht wird, sowie zur Identifikation möglicher antibakteriell wirksamer Sekundärmetabolite sind jedoch weitere Studien nötig.

4.4 Diskussion der Methoden

Kultivierung der aquatischen Makrophyten

Die Akklimatisierungskultur war gut dazu geeignet, Pflanzen beider Spezies über den Zeitraum von bis zu 3 Jahren unter gleichbleibenden Bedingungen zu halten. Die Pflanzen zeigten alle ein kräftiges Wachstum und bildeten im Fall von *Mentha aquatica* sogar Blüten aus. Durch die Akklimatisierungskultur war der schnelle Zugriff auf Individuen, die unter gleichen Bedingungen gewachsen waren, möglich. Individuen waren in Replikaten gut vergleichbar. Die substratlose Wuchsform mit frei treibenden Wurzeln in Wasser bot keine sichtbaren Nachteile für das Wachstum der Pflanzen. Die Tatsache, dass *Iris pseudacorus* nicht blühten ist vermutlich durch die geringe Beleuchtungsintensität zu erklären ($200-300 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Das freie Treiben der Wurzeln von *Iris pseudacorus* bewirkte gegenüber Literaturangaben verlängerte Wurzeln (Kapitel 2). Sollte sich die in 4.2.3 vermutete positive Korrelation von

Wurzellänge und antibakterieller Effektivität der Pflanze bestätigen, so könnte die freitreibende Haltungsform zur Verwendung in Gießwasseraufbereitungsanlagen nützlich sein.

Die Steril-Kultivierung von Pflanzen war allerdings problematisch. Die Kulturschalen für Sterilkulturen waren sehr klein (Kapitel 2) und es dauerte mindestens 30 Kalenderwochen, bis sterile *Iris pseudacorus* Wurzeln ausgebildet hatten, welche ≥ 10 cm Länge aufwiesen.

Filter PCR zur Amplifikation von 16SDNS Proben und Analyse von Bandenprofilen auf DGGE Gelen

Die verwendete Nachweismethode für bakterielle ribosomale DNS mit Amplifikationsschritt über PCR und anschließender DGGE des mit einer GC-Klammer versehenen Fragments zur Auftrennung verschiedener Phylotypen ist sehr empfindlich. So kann beispielsweise ein einzelnes DNS-Molekül innerhalb einer Menge von 10^5 Zellen im Probenwasser nachgewiesen werden (Fischer & Lerman, 1983; Higuchi *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1988). Wie beschrieben (4.2.1) lässt die Deletion von DNS-Banden im durch Pflanzen konditionierten Probenwasser bei dieser sensiblen Nachweismethode deshalb auf ein Absterben und eine Lyse der entsprechenden Bakterien des Probenwasserbakterioplankton schließen.

Bei Amplifikation von DNS aus Proben von Pflanzen-Ansätzen mit Sterilpflanzen ließen Bandenneubildungen in Bandenprofilen des PKW gegenüber der Nullkontrolle jedoch auf das Vorhandensein nicht-filtrierbarer (über $0,22 \mu\text{m}$ Membranen) bakterieller Phylotypen in PW schließen. Ebenso deuteten Bandenneubildungen in Proben von mit PKW inkubiertem PW in **Sekundärmetaboliten**-Versuchen auf nicht detektierte Stadien bakterieller Phylotypen im PW. Die mögliche Beeinflussung von Ultramikrobakterien, bzw. kleinwüchsigen Stadien planktonischer Bakterien durch Exsudate von LAM zu untersuchen hätte das Potential, Gegenstand einer nachfolgenden Untersuchung zu werden. Durch Untersuchungen von Hahn (2004) wurde die Existenz überraschend großer Zahlen von keimfähigen Bakterien in Sterilfiltraten nachgewiesen. In Süßwasserseen wurde ein großer Anteil planktonischer Bakterien als zu einer Gruppe von Ultramikrobakterien gehörig bestimmt (Hahn *et al.*, 2005). Möglicherweise können sich solche potentiellen Mangelstadien durch exsudierte Nährstoffe von LAM im Wasser in nachweisbaren Zahlen etablieren und erreichen durch Sterilfiltrierung erfassbare Größe. Möglicherweise wäre es daher

empfehlenswert, vergleichbare Untersuchungen an Teichwasserproben zukünftig mit einem zusätzlichen 0,1 µm Filter durchzuführen.

Außerdem gab es weitere Hinweise auf eine mögliche Nicht-Detektion im Probenwasser vorhandener Banden-Phylotypen in mehreren **Pflanzen**-Versuchen und einem

Sekundärmetaboliten-Versuch : In den DGGE Gelen zu Auswertung der Bandenmuster der Proben von Versuchen (**Iris & Mentha 2**, **Mentha**, 3.2; **Iris & Mentha 2-SM**, 3.4) war die wiederkehrende, sogenannte tw Bande in PW 7T Proben nicht zu sehen. In einigen Wiederholungsversuchen war sie in PW 7T dagegen schwach sichtbar. Die „tw“ Bande war eine der bei der vergleichenden Gießwasseruntersuchung

Probenwasser2008-Versuch vom Jahresverlauf unabhängig in allen PW 0T Proben vorhandenen Banden. Bei Gelen zur Überprüfung von Bandenpositionen (7.4) und auf Gelen zur Überprüfung von Banden-DNS-Sonden („markierenden Proben“) wurden verschiedene Filtersegmente gleicher Proben auf verschiedenen Gelen entwickelt. Die durch Sonden markierten Bandenpositionen zwischen verschiedenen Gelen waren gut vergleichbar. Möglicherweise ging die durch Überprüfungsgele gefundene Nicht-Detektion von Banden in PW 7T o.g. Versuche auch auf eine unregelmäßige Verteilung von Phylotypen auf Filtermembranen zurück. Durch Teilung der Filter in Segmente war die Banden-DNS der betreffenden Bakterien in einigen Segmenten nachweisbar und in anderen unter der Nachweisgrenze. Die Empfindlichkeit der Methode lässt theoretisch die Detektion einzelner Zellen in Volumina wie den hier untersuchten 60 ml zu (Higuchi *et al.*, 1988). Allerdings lag die Nachweisgrenze für bakterielle Phylotypen des Probenwassers aufgrund von Huminstoffen und anderen möglichen Inhibitoren der Amplifikation in der PCR in dieser Arbeit mit großer Wahrscheinlichkeit über der von 1-10 Zellen. Diese Gefahr bestand jedoch nur bei Organismen, welche in geringen Konzentrationen im Probenwasser vorhanden waren. Aufgrund der Beobachtungen wird angenommen, dass die „tw“ Bande auf einen ubiquitären Phylotypen zurückgeht, der in frisch gefiltertem (0T) Probenwasser deutlich nachweisbar war. In gealtertem Probenwasser kam der Phylotyp jedoch nur in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze vor. DNS-Sonden der „tw“ Bande wurden daher nicht als *marker* für eine Beeinflussung von Phylotypen des Bakterioplanktons durch konditioniertes Wasser verwendet. Sie dienten vielmehr als eine verlässliche Orientierungshilfe für Bandenmuster von PW 0T Proben. Um Fehlerquellen wie die beschriebene auszuschließen, war der Einsatz von Wiederholungsgelen, DNS-Sonden und Standards entscheidend. Der Einsatz von Wiederholungsgelen ermöglichte eine verlässliche Erkennung von Banden und damit eine Beurteilung auch bei schwacher

Ausprägung. Mithilfe verwendeter DNS Sonden ließen sich zwei der wiederkehrenden Banden in Versuchs-Gelen identifizieren. Es war jedoch wichtig, DNS-Sonden auf Gelen mit vorher abgesicherten DNS-Sonden vor dem Einsatz als „marker“ zu überprüfen, um die Position der Bande zu bestätigen (7.4). Zusätzlich zur PW-Nullkontrolle sichtbare Banden in **Sekundärmetaboliten**-Versuchen (3.3) wurden ebenfalls überprüft. Das Einschleppen von Phylotypen von Ultramikrobakterien (Hahn, 2004) des PW mit dem durch Pflanzen-konditionierten PW in den Sekundärmetabolitenversuch war denkbar und wurde daher mit der entsprechenden Nullkontrolle ausgeschlossen. Obgleich das PKW vor Inkubation mit frischem PW sterilfiltriert wurde, wären Neubildungen von Banden in Inkubationsansätzen fälschlicherweise als neue Phylotypen assoziierter Bakterien von Pflanzen gedeutet worden. Da Versuche zur Inkubation mit Exsudatwasser (PKW) im Anschluß an einen Pflanzenversuch durchgeführt wurden, war das Probenwasser der Nullkontrolle des Sekundärmetabolitenversuchs methodisch bedingt mindestens 7 Tage nach dem Probenwasser des Pflanzenversuchs aus dem Teich entnommen worden. Daher unterschieden sich das frisch gefilterte Probenwasser (PW 0T) und die Nullkontrolle (PW 7T) der **Sekundärmetaboliten-** (**SM-**) Versuche von dem PW der **Pflanzen-** Versuche. Banden Neubildungen wurden stets relativ zur entsprechenden (PW 7T-) Nullkontrolle betrachtet. Um diese möglicherweise scheinbar neu gebildeten Banden erkennen zu können, wurden PW 0T Proben des vorausgegangenen Pflanzenversuchs auf Gele zur Auswertung der **SM**-Versuche aufgetragen (Exp. **Iris & Metha 2-SM**; 3.3; Abb. 27).

Das Vor-Filtern von Probenwasser war bei den vergleichsweise geringen Volumina gefilterten Wassers (60 ml über 0,22 µm Filterschritt) entscheidend. Die Filterkaskade (2.5.1) wurde entwickelt, nachdem eine vorher angewandte Vorfilter-Methode über Papierfilter von > 10 µm Porenweite (Sartorius, Göttingen, FT-3-101-055, Ø 50 mm) (2.5.1) nicht ausreichte, um planktonische Algen zu entfernen. Bis zu einem Porendurchmesser von 3 µm waren grobe, gelblich bis grünliche Partikel im Filter zu sehen (Abb. 46). Dies deutete auf Huminstoffe und Phytoplanktonorganismen. Die Entfernung von Huminstoffen ist entscheidend für eine Vermeidung von Amplifikationsproblemen bei der PCR.



Abb. 46: Filtermembranen nach Filtrierung von 400 ml Probenwasser (PW OT). Filter linke Seite: 3 µm Porenweite, Filter rechtes Bild: 1 µm Porenweite. Probenwasser war über Papierfilter vorgefiltert worden.

Eignung des indirekten Nachweises antibakterieller Wirksamkeit über Untersuchung qualitativer Veränderungen in DNS-Profilen von Bakterien

Die Beobachtung, dass in Übereinstimmung mit dem qualitativen Effekt auf das Muster von Banden in DGGE Gelen auch ein statistisch signifikanter quantitativer Effekt der Ko-Inkubation von Pflanzen auf die Zellzahl im Teichwasserbakterioplankton einherging (3.6) spricht für eine gute Anwendbarkeit der Kultur-unabhängigen DGGE mit den gewählten unspezifischen eubakteriellen Primern zum indirekten Nachweis antibakteriell wirksamer Exsudate in Gewässerproben des untersuchten Gießwasserteiches. Unter der Voraussetzung, dass genannte Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, ist die Methode gut geeignet, um ohne zeit- und materialaufwendige Extraktionsverfahren Effekte von LAM und anderen Faktoren auf die Zusammensetzung von Gemeinschaften planktonischer Bakterien zu untersuchen. Im Gegensatz zu Extraktions- gestützten Verfahren ist die in dieser Arbeit verwendete Methode des indirekten Nachweises antibakterieller Wirksamkeit nicht auf eine antibiotische Wirksamkeit beschränkt. Effekte, welche durch andere Exsudate, wie z. B. Nährstoffe oder milieuverändernde Stoffe verursacht sind, werden mit der Kultur-unabhängigen DGGE Gel-gestützten Analyse von 16S rDNS Amplikons aus durch Filter PCR gewonnener DNS nachgewiesen. Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass kürzlich abgetötete Zellen im Filter erfasst werden. Außerdem sind quantitative Veränderungen in Bakterienprofilen nicht ersichtlich, so lange Zellen per Filtrierung gewonnen werden können.

Tab. 11: Zusammenfassung der relativen Übereinstimmung von Nullkontrolle „PW“ und konditioniertem Wasser „PKW“ der **Pflanzen**-Versuche unter Berücksichtigung des

Anteils deletierter Banden an der Gesamtzahl von Banden in der Nullkontrolle „PW“ und der Pflanzengröße. Del=deletierte Banden im PKW; Neu=Bandenneubildungen im PKW; Bl=Blattlänge; Wu= Wurzellänge; Sto=Länge der Stolone. Bezeichnungen der Versuche in Fettdruck angegeben.

		Banden in PW	Del	Neu	Übereinstimmung der Bandenmuster [%] PW/PKW	Anteil neu gebildeter Banden [%] Neu/PW	Anteil deletierter Banden [%] Del/PW	Pflanzen- größe [cm]	
Iris Versuche	Iris 1	15	6	6	38	40	40	Bl: 20- 40 Wu: 20	
	Iris & Mentha 1	2	2	0	0	0	100	Bl: 20- 40 Wu: 20	
	Iris 2	8	3	1	64	13	38	Bl: 20- 40 Wu: 20	
	Iris 3	13	6	4	23	31	46	Bl: 20- 40 Wu: 20	
	Iris & Mentha 2	8	6	1	7,5	13	75	Bl: 20- 40 Wu: 20	
	Iris steril	Steril	8	0	7	69	88	0	Bl: 15 Wu: 10
		Wild		1	4	71	50	13	Bl: 10- 15 Wu: 5- 10

		Banden in PW	Del	Neu	Übereinstimmung der Bandenmuster [%] PW/PKW	Anteil neu gebildeter Banden [%] Neu/PW	Anteil deletierter Banden [%] Del/PW	Pflanzen- größe [cm]
Mentha Versuche								
Iris & Mentha 1		2	1	0	61	0	50	Sto: 15- 30
Iris & Mentha 2		8	5	0	25	0	63	Sto:15- 30
Mentha	Steril	15	5	3	67	20	33	Sto: 5- 10
	Wild		4	3	74	20	27	Sto: 10

Literaturverzeichnis

- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D. A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* **58**, 614-23.
- Bais, H. P., Walker, T. S., Schweizer, H. P. and Vivanco, J. M. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 983–995.
- Bais, H. P., Fall, R. and Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* **134**, 307-19.
- Bais, H. P., Prithiviraj, B., Jha, A. K., Ausubel, F. M. and Vivanco, J. M. (2005). Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**, 217-21.
- Bais, H. P., Boeckling, C. D. and Vivanco, J. M. (2008). Root Exsudates Modulate plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere in Karlovsky, P. (Ed), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, Springer Verlag pp. 241-252.
- Balaban, N., Giacometti, A., Cirioni, O., Gov, Y., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Viticchi, C., Del Prete, M. S., Saba, V., Scalise, G. and Dell'Acqua, G. (2003). Use of the Quorum-Sensing Inhibitor RNAlII Inhibiting Peptide to Prevent Biofilm Formation In Vivo by Drug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases* **187**, 625-630.
- Bashan, Y. (1985). Field dispersal of *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, and *Alternaria macrospora* by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles, and water sources. *Canadian J. Bot.* **64**, 276-281.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S. (2001). Mucoïd mutants of the biocontrol strain *pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 255-60.
- Blotnick, J. R., Rho, J. and Gunner, H. B. (1980). Ecological Characteristics of the Rhizosphere Microflora of *Myriophyllum heterophyllum*. *J Environ Qual* **9**, 207-210.

- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A. and Hahn, M. W. (2004). Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynucleobacter cluster. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5787-93.
- Bosse, U. and Frenzel, P. (1997). Activity and Distribution of Methane-Oxidizing Bacteria in Flooded Rice Soil Microcosms and in Rice Plants (*Oryza sativa*). *Appl Environ Microbiol* **63**, 1199-1207.
- Brandt, L. A. and Koch, E. W. (2003). Periphyton as a UV-B filter on seagrass leaves: a result of different transmittance in the UV-B and PAR ranges. *Aquatic Botany* **76**, 317-327.
- Brix, H. (1997). Do Macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Wat. Sci. Tech.* **35**, 11-17.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. and Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4801-5.
- Byrd, J. B., Xu, H.-S. and Colwell, R. R. (1991). Viable but Nonculturable Bacteria in Drinking Water. *Appl Environ Microbiol* **57**, 875-878.
- Camacho, J. V., Martinez, A. D. L., Gomez, R. G. and Sanz, J. M. (2007). A comparative study of five horizontal subsurface flow constructed wetlands using different plant species for domestic wastewater treatment. *Environmental Technology* **28**, 1333-1343.
- Cardenas, M. L. (1975). 3-(3-Carboxyphenyl)alanin aus *Iris pseudacorus* - Zur Ökochemie kernkarboxylierter aromatischer Verbindungen mit natürlichem Vorkommen, Dissertation, Universität Göttingen.
- Carlson, D. J. and Carlson, M. L. (1984). Reassessment of Exsudation by Fucoid Macroalgae. *Limnol. Oceanogr.* **29**, 1077-87.
- Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G. and Boivin-Masson, C. (2003). Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by α -Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology* **185**, 7266–7272.
- Choudhury, S., Sree, A., Mukherjee, S. C., Pattnaik, P. and Bapuji, M. (2005). In Vitro Antibacterial Activity of Extracts of Selected Marine Algae and Mangroves against Fish Pathogens. *Asian Fisheries Science* **18**, 285-294.
- Čížková, H., Brix, H., Kopecký, J. and Lukavská, J. (1999). Organic acids in the sediments of wetlands dominated by *Phragmites australis*: evidence of phytotoxic concentrations. *Aquatic Botany* **64**, 303–315.
- Cossu, R., Borin, M., Lavagnolo, M. C. and Spinato, P. (2003). Screening of species suitable to be used in subsurface flow vegetated bed as a tool for integrated

- wastewater management. *IWA International Conference on Efficient Use and Management of Water for Urban Supply. Teneriffa, Spanien.*
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. and Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**, 90-3.
- de Boer, W., Kowalchuk, G. A. and Van Veen, J. A. (2006). "Root Food" and the rhizosphere microbial community composition. *New Phytologist* **170**, 3-6.
- de Weger, L. A., van Boxtel, R., van der Burg, B., Gruters, R. A., Geels, F. P., Schippers, B. and Lugtenberg, B. (1986). Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* **165**, 585-94.
- de Wever, A., Muylaert, K., Van der Gucht, K., Pirlot, S., Cocquyt, C., Descy, J.-P., Plisnier, P.-D. and Vyverman, W. (2005). Bacterial Community Composition in Lake Tanganyika: Vertical and Horizontal Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5029–5037.
- Deans, S. G. (2007). Antimicrobial Activity of Essential Oils and Constituents of *Mentha* Species in Lawrence, B. M. (Ed), *Mint The genus Mentha*, CRC Press, pp. 497-514.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-7.
- Drewe, J. A., Mwangi, D., Donoghue, H. D. and Cromie, R. L. (2009). PCR analysis of the presence and location of *Mycobacterium avium* in a constructed reed bed, with implications for avian tuberculosis control. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 320-8.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2004). Update on Biochemistry of Plant Volatiles: Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology* **135**, 1893–1902.
- Duineveld, B. M., Kowalchuk, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D. and Van Veen, J. A. (2000). Analysis of Bacterial Communities in the Rhizosphere of *Chrysanthemum* via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as Well as DNA Fragments Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **67**, 172–178.
- Dworjanyn, S. A., De Nys, R. and Steinberg, P. (1999). Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biology* **133**, 727-736.
- Enríquez, J. and Sand-Jensen, K. (2003). Variation in Light Absorption Properties of *Mentha aquatica* L. as a Function of Leaf Form: Implications for plant growth. *Int. J. Plant Sc.* **164**, 125-136.

- Eppley, R. W., Renger, E. H. and Harrison, W. G. (1979). Nitrate and phytoplankton production in southern Californian waters. *Limnol Oceanogr* : **24**, 483-494.
- Fareed, M. F., Haroon, A. M. and Rabeh, S. A. (2008). Antimicrobial activity of some macrophytes from Lake Manzalah (Egypt). *Pak J Biol Sci* **11**, 2454-63.
- Ferluga, S., Steindler, L. and Venturi, V. (2008). N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in Gram-Negative Rhizobacteria in Karlovsky, P. (Ed), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, Springer Verlag pp. 69-90.
- Fischer, S. G. and Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1579-83.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-75.
- Giesler, R., Högberg, M. N., Strobel, B. W., Richter, A., Nordgren, A. and Högberg, P. (2007). Production of dissolved organic carbon and low-molecular weight organic acids in soil solution driven by recent tree photosynthate. *Biogeochemistry* **84**, 1–12.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. and Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**, 6618-22.
- Glomski, L. A. M., Wood, K. V., Nicholson, R. L. and Lembi, C. A. (2002). The Search for Exudates from Eurasian Watermilfoil and Hydrilla. *J. Aquat. Plant Manage* **40**, 17-22.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D. and Edwards, A. C. (1996). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 369-378.
- Gross, E. M., Meyer, H. and Schilling, G. (1996). Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry* **41**, 133-138.
- Gross, E. M. (2003). Allelopathy of Aquatic Autotrophs. *Critical Reviews in Plant Science* **22**, 313-339.
- Haas, D. and Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* **3**, 307-19.
- Hahn, M. W. (2003). Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5248-54.

- Hahn, M. W. (2004). Broad diversity of viable bacteria in 'sterile' (0.2 microm) filtered water. *Res Microbiol* **155**, 688-91.
- Hahn, M. W., Pöckl, M. and Wu, Q. L. (2005). Low Intraspecific Diversity in a Polynucleobacter Subcluster Population Numerically Dominating Bacterioplankton of a Freshwater Pond. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4539-4547.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* **86**, 985-90.
- Harder, T., Lau, S. C., Dahms, H. U. and Qian, P. Y. (2002). Isolation of bacterial metabolites as natural inducers for larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J Chem Ecol* **28**, 2029-43.
- Harder, T., Dobretsov, S. and Qian, P. Y. (2004). Waterborne polar macromolecules act as algal antifoulants in the seaweed *Ulva reticulata*. *Mar Ecol Prog Ser* **274**, 133-141.
- Harder, T. (2008). Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence in Flemming, H. C., Venkatesan, R., Murthy, S. P. and Cooksey, K. (Eds), *Marine and Industrial Biofouling*, Springer Verlag, pp. 219-232.
- Hawes, M. C., Gunawardena, U., Miyasaka, S. and Zhao, X. (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci* **5**, 128-33.
- Heckmann, K. and Schmidt, H. J. (1987). *Polynucleobacter necessarius* gen. nov. sp. nov. an Obligately Endosymbiotic Bacterium Living in the Cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 456-457.
- Hellio, C., Bremer, G., Pons, A. M., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2000). Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 543-9.
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar Environ Res* **52**, 231-47.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**, 87-102.
- Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. and Erlich, H. A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature* **332**, 543-6.
- Hill, V. R. and Sobsey, M. D. (2001). Removal of *Salmonella* and microbial indicators in constructed wetlands treating swine wastewater. *Water Sci Technol* **44**, 215-22.

- Hiltner, L. (1904). Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft* **98**, 59–78. In: Bais, H. P., Boeckling, C. D. and Vivanco, J. M. (2008). Root Exsudates Modulate plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere in Karlovsky, P. (Ed), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, Springer Verlag pp. 241-252.
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. and Zehr, J. P. (1997). Bacterial Diversity in Adirondack Mountain Lakes as Revealed by 16S rRNA Gene Sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2957–2960.
- Hirano, S. S. and Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 624-53.
- Hirsch, A. M., Bauer, W. D., Bird, D. M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J. I. (2003). Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* **84**, 858–868.
- Hornak, K., Masin, M., Jezbera, J., Bettarel, Y., Nedoma, J., Sime-Ngando, T. and Simek, K. (2005). Effects of decreased resource availability, protozoan grazing and viral impact on a structure of bacterioplankton assemblage in a canyon-shaped reservoir. *FEMS Microbiol Ecol* **52**, 315-27.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With an Antibiotic Produced by the Bacterium. *Phytopathology* **69**, 480-482.
- Huss, A. A. and Wehr, J. D. (2004). Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria americana*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake. *Microb Ecol* **47**, 305-15.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* **316**, 76-9.
- Jercovic, I. and Mastelic, J. (2001). Composition of Free and Glycosidically Bound Volatiles of *Mentha aquatica* L. *Croatica Chemica Acta* **74**, 431-439.
- Johnston, C. A. (1993). Mechanisms of Wetland-Water Quality Interaction in Moshiri, G. A. (Ed), *Constructed wetlands for water quality improvement*, CRC Press, pp. 293-300.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. and Amann, R. (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1241-50.
- Karlovsky, P. (2008). Secondary metabolites in soil ecology in Karlovsky, P. (Ed), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, Springer Verlag pp. 1-19.

- Karner, M. B., DeLong, E. F. and Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**, 507-10.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. (2002). 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **68**, 699-704.
- Kent, A. D. and Triplett, E. W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol* **56**, 211-36.
- Kickuth, R. (1970). [Ecochemical capacities of higher plants]. *Naturwissenschaften* **57**, 55-61.
- King, G. M. (1994). Associations of Methanotrophs with the Roots and Rhizomes of Aquatic Vegetation. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3220-3227.
- Kirchman, D. L., Yu, L. Y., Fuchs, B. M. and Amann, R. (2001). Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquatic Microbial Ecology* **26**, 13-22.
- Kumaraswamy, R., van Dongen, U., Kuenen, J. G., Abma, W., van Loosdrecht, M. C. M. and Muyzer, G. (2005). Characterization of Microbial Communities Removing Nitrogen Oxides from Flue Gas: the BioDeNOx Process. *Appl Environ Microbiol*, 6345–6352.
- Kusch, P., Wiessner, A., Paredes, D., Kästner, M., Münch, C. and Müller, R. (2008). Pflanzenkläranlagen – Zukunftspotenzial und Forschungsbedarf. *Chemie Ingenieur Technik* **80**.
- Kusel, K., Chabbi, A. and Trinkwalter, T. (2003). Microbial processes associated with roots of bulbous rush coated with iron plaques. *Microb Ecol* **46**, 302-11.
- Lachnit, T., Blümel, M. and Imhoff, J. F. (2009). Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquat Biol* **5**, 181–186.
- Lalke-Porczyk, E. and Donderski, W. (2001). Metabolic Activity of Epiphytic Bacteria Inhabiting the Common Reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel) in Moty Bay of Jeziorak Lake. *Polish Journal of Environmental Studies* **10**, 443-450.
- Lalke-Porczyk, E. and Donderski, W. (2003). Distribution of Epiphytic Bacteria on the Surface of Selected Species of Helophytes and Nimpheides from the Littoral Zone of the Southern Part of Jeziorak Lake in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* **12**, 83-93.
- Lam, C. and Harder, T. (2007). Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *J. Phycol.* **43**, 874-881.

- Lam, C. (2007). Allelopathy of marine macroalgae against microbial epibiosis, Dissertation, Universität Oldenburg.
- Lam, C., Stang, A. and Harder, T. (2008). Planktonic bacteria and fungi are selectively eliminated by exposure to marine macroalgae in close proximity. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 283-91.
- Lawrence, B. M. (2007). Oil Composition of Other Mentha Species and Hybrids in Lawrence, B. M. (Ed), *Mint The genus Mentha*, CRC Press, pp. 326-327.
- Lewis, W. M., Jr (1986). Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae. *Am. Nat.* **127**, 184-194.
- Lima-Filho, J. V. M., Carvalho, A. F. F. U., Freitas, S. M. and Melo, V. M. M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology* **33**, 311-313.
- Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W. and Simon, M. (2005). An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environ Microbiol* **7**, 961-8. ; Latest update of the Moviol/SybrGreen I staining protocol (May 2006)
- Manceau, C. and Horvais, A. (1997). Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato. *Appl Environ Microbiol* **63**, 498-505.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145 (Pt 2)**, 283-91.
- Mansouri, H., Petit, A., Oger, P. and Dessaux, Y. (2002). Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2562-6.
- Martens-Habbena, W. and Sass, H. (2006). Sensitive determination of microbial growth by nucleic acid staining in aqueous suspension. *Appl Environ Microbiol* **72**, 87-95.
- Martinko, J. M. (1984). Antibiotics in Brock, T. D. (Ed), *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, pp. 758-762.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G. and Bauer, W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1444-9.

- Matsuo, Y., Imagawa, H., Nishizawa, M. and Shizuri, Y. (2005). Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Science* **307**, 1598.
- Micsinai, A., Borsodi, A. K., Csengeri, V., Horváth, A., Oravecz, O., Nikolausz, M., Reskóné, M. N. and Márialigeti, K. (2003). Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* **506-509**, 707–713.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H. and Tebbe, C. C. (2000). Variation of Microbial Rhizosphere Communities in Response to Crop Species, Soil Origin, and Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb Ecol* **40**, 43-56.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–99.
- Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, N., Mihajlović, B. and Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* **69**, 413-419.
- Moebus, K. and Johnson, K. M. (1974). Exudation of dissolved organic carbon by brown algae. *Marine Biology* **26**, 117-125.
- Moormann, H. (2001). Einfluss der Rhizodeposition von Helophyten auf den mikrobiellen Schadstoffabbau, Universität Bremen.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. and Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 948-50.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Neemann, G. (2000). Optimierung der Reinigungsleistung von Kleinkläranlagen am Beispiel von Schilfkläranlagen und ausgewählten technischen Systemen. *Konzepte zur Abwasserbehandlung im ländlichen Raum Band I*, 56 – 76.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**, 26723-6.
- Newton, J. A. and Fray, R. G. (2004). Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant–microbe interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 213–224.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. and Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**, 5636-43.

- O'Sullivan, D. J. and O'Gara, F. (1992). Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews* **56**, 662-676.
- Oger, P., Mansouri, H., Nesme, X. and Dessaux, Y. (2004). Engineering Root Exudation of Lotus toward the Production of Two Novel Carbon Compounds Leads to the Selection of Distinct Microbial Populations in the Rhizosphere. *Microbial Ecology* **47**, 96–103.
- Paul, N. A., De Nys, R. and Steinberg, P. (2006). Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Mar Ecol Prog Ser* **306**, 87-101.
- Peters, N. K. and Long, S. R. (1988). Alfalfa Root Exudates and Compounds which Promote or Inhibit Induction of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Plant Physiol* **88**, 396-400.
- Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* **146 Pt 12**, 3237-44.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L. and Givskov, M. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* **187**, 1799-814.
- Reddy, K. R., D'Angelo, E. M. and DeBusk, T. A. (1990). Oxygen Transport through Aquatic Macrophytes: The Role in Wastewater Treatment. *J. Environ. Qual.* **19**, 1990.
- Reinhofer, M., Stuhlbacher, A. and Grandi, E. (2007). Antibakterielle Wirkung von Wurzelexsudaten, *Hygienisierung von Abwässern in Pflanzenkläranlagen*, Institut für Nachhaltige Techniken und Systeme – JOINTS Forschungsbereich Ökosystemtechnik, pp. 1-64.
- Reitner, B., Herzig, A. and Herndl, G. J. (1999). Dynamics in bacterioplankton production in a shallow, temperate lake (Lake Neusiedl, Austria): evidence for dependence on macrophyte production rather than on phytoplankton. *Aquat Microb Ecol* **19**, 245-254.
- Rheinheimer, G. (1981). *Mikrobiologie der Gewässer*. Gustav Fischer.
- Riffaud, C. M. H. and Morris, C. E. (2002). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Irrigation Water Retention Basins by Immunofluorescence Colony-staining. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 539-545.

- Rivera, F., Warren, A., Ramirez, E., Decamp, O., Bonilla, P., Gallegos, E., Calderón, A. and Sánchez, J. T. (1995). Removal of Pathogens from Wastewaters using the Root Zone Method (RZM). *Wat. Sci. Tech.* **32**, 211-218.
- Rodriguez, S. R., Ojeda, F. P. and Inestrosa, N. C. (1993). Settlement of benthic marine invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* **97**, 193-207.
- Roszak, D. B. and Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* **51**, 365-79.
- Rothaupt, K. O. (1997). turnover by freshwater bacterivorous flagellates: differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquat Microb Ecol* **12**, 65-70.
- Ruiz-Rueda, O., Hallin, S. and Baneras, L. (2009). Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 308-319.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Seidel, K. (1966). [Purification of waters by higher plants]. *Naturwissenschaften* **53**, 289-97.
- Seidel, K. (1969). [Bactericidal effect of higher plants]. *Naturwissenschaften* **56**, 642-3.
- Seidel, K. (1971). [Effects of higher plants on pathogenic germs in waters]. *Naturwissenschaften* **58**, 150-1.
- Seidel, K. (1973). Zu Biologie und Gewässer-Reinigungsvermögen von *Iris pseudacorus* L. *Naturwissenschaften* **60**, 158-159.
- Seipp, D., Brand, T., Kaminski, K., Wagner, S. and Werres, S. (2007). Can *Phytophthora ramorum* be Spread With Contaminated Irrigation Water? *Sudden Oak Death Third Science Symposium. Santa Rosa, California*.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. and Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 232-6.
- Sieburth, J. M. (1969). Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *J. exp. mar. Biol. Ecol* **3**, 290-309.
- Smith, R. D., Dennison, W. C. and Alberte, R. S. (1984). Role of Seagrass Photosynthesis in Root Aerobic Processes. *Plant Physiol* **74**, 1055-1058.

- Sorell, B. K. and Armstrong, W. (1994). On the Difficulties of Measuring Oxygen Release by Root Systems of Wetlands Plants. *Journal of Ecology* **82**, 177-183.
- Sorell, B. K., Mendelssohn, I. A., Mckee, K. L. and Woods, R. A. (2000). Ecophysiology of Wetland Plant Roots: A Modelling Comparison of Aeration in Relation to Species Distribution. *Annals of Botany* **86**, 675-685.
- Spiegelmann, D., Whissell, G. and Greer, C. W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* **51**, 355-386.
- Steinberg, P. D., De Nys, R. and Kjelleberg, S. (2002). Chemical cues for surface colonization. *J Chem Ecol* **28**, 1935-51.
- Stottmeister, U. (2003). Bioremediation und natürlicher Abbau und Rückhalt (natural attenuation) in Bahadir, M. (Ed), *Biotechnologie zur Umweltentlastung* Vieweg+Teubner, pp. 182.
- Ström, L., Mastepanov, M. and Christensen, T. R. (2005). Species-specific effects of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from wetlands. *Biogeochemistry* **75**, 65-82.
- Suffredini, I. B., Sader, H. S., Goncalves, A. G., Reis, A. O., Gales, A. C., Varella, A. D. and Younes, R. N. (2004). Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. *Braz J Med Biol Res* **37**, 379-84.
- Sutherland, W. J. (1990). Biological Flora of the British Isles *Iris pseudacorus* L. *Journal of Ecology* **78**, 833-848.
- Tanner, C. C. (2001). Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Science and Technology* **44**, 9-17.
- Temudo, M. F., Muyzer, G., Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M. C. M. (2008). Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**, 1121-1130.
- Teplitski, M., Robinson, J. B. and Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 637-48.
- Urabe, J., Gurung, T. B. and Yoshida, T. (1999). Effects of phosphorus supply on phagotrophy by the mixotrophic alga *Uroglena americana* (Chrysophyceae). *Aquat Microb Ecol* **18**, 77-83.

- v. Wintzingerode, F., Göbel, U. B. and Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 213-229.
- Vicré, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A. and Driouich, A. (2005). Root Border-Like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiol* **138**, 998–1008.
- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. F., Haberl, R., Perfler, R. and Laber, J. (Eds) (1998). *Removal Mechanisms and Types of Constructed Wetlands*.
- Wahl, M. (1989). Marine Epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspect *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **58**, 175-189.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E. and Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**, 44-51.
- Watanabe, K., Komatsu, N., Ishii, Y. and Negishi, M. (2009). Effective isolation of bacterioplankton genus Polynucleobacter from freshwater environments grown on photochemically degraded dissolved organic matter. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 57–68.
- Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L. and Valois, F. W. (1977). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* **33**, 940-6.
- Weisse, T. (2006). Biodiversity of Freshwater Microorganisms - Achievements, Problems and Perspectives. *Pol. J. Ecol.* **54**, 633–652.
- Welsh, D. T., Bourgues, S., de Wit, R. and Auby, I. (1997). Effect of plant photosynthesis, carbon sources and ammonium availability on nitrogen fixation rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*. *Aquat Microb Ecol* **12**.
- Wetzel, R. G. (1993). Constructed Wetlands: Scientific Foundations Are Critical in Moshiri, G. A. (Ed), *Constructed wetlands for water quality improvement*, CRC Press, pp. 3-9.
- Wright, S. A. I., Zumhoff, C. H., Schneider, L. and Beer, S. V. (2001). Pantoea agglomerans Strain EH318 Produces Two Antibiotics That Inhibit Erwinia amylovora In Vitro. *Appl Environ Microbiol* **67**, 284–292.
- Yahai, L., Watanabe, A. and Kimura, M. (2002). Contribution of plant-derived carbon to soil microbial biomass dynamics in a paddy rice microcosm. *Biol Fertil Soils* **36**, 136–142.
- Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Hagen, F. and Han, S.-K. (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**, 141–155.

5 Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben; die mir durch ihre Anregungen und durch aufmunternde Diskussionen immer wieder Energie gaben und meine Kreativität angeregt und bestätigt haben. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken und Ihnen meine Arbeit hiermit widmen!

Ich danke Herrn Prof. Tilmann Harder für die Betreuung meiner Arbeit über Kontinente hinweg, zu Tages- und Nachtzeiten! Danke für die gute Kommunikation Sydney - Oldenburg! Danke für die wertvollen Ratschläge, die unkomplizierte Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre!

Ich danke Frau Dr. Luise Berthe-Corti für die Begutachtung der Arbeit als Zweitprüferin und für ihren Einsatz und ihr Engagement zum Gelingen dieser Arbeit! Vielen herzlichen Dank auch für die aufmunternden Worte und die großartigen Arbeitsgruppenbesprechungen. Danke für die heimatliche Aufnahme in die AG Mikrobiologie!

Ich danke der Arbeitsgemeinschaft industrielle Forschungsvereinigungen AiF Berlin für die großzügige Finanzierung des Projektes.

Ich danke Frau Dr. Elke Haase für die Kooperation der Gärtnerei Piccoplant in diesem Projekt und danke für die aufopferungsvolle Hilfe bei der Organisation der Probennahmen!

Ich danke Herrn Dr. Marcus Nachtkamp für unzählige hilfreiche Anregungen in wunderbaren Diskussionen und für die Unterstützung bei meiner Arbeit durch die kritische Durchsicht des Manuskripts! Es lebe Douglas Adams!

Ich danke Herrn Rainer Hulsch und Herrn Uwe Maschmann für die großartige technische Unterstützung in allen Lebenslagen und für das Engagement für meine Arbeitsgruppe bei der großen Räumaktion in der Universität zur Erneuerung der Labore! Weiterhin danke ich Herrn Maschmann für die Bereitstellung von Bakterienkulturen für meine mikrobiologischen Versuche!

Ich danke nochmals allen Mitgliedern der AG Allgemeine Mikrobiologie für die wunderschöne Zusammenarbeit die exzellente wissenschaftliche Kommunikation und die großartige Nachbarschaft! Ich danke Frau Constanze Jenschke, Frau Meike Focken, Frau Barbara Bruns, Frau Charlotte Versteegen.

Ich danke meinen Assistenten Frau Tatjana Schwetzer und Herrn Tobias Lipsewers für die unersetzliche Hilfe im Labor. Vor allem bei der Betreuung der Pilz- und Bakterienkulturen! Ich danke allen Assistenten der kooperierenden Gärtnerei für die Mithilfe bei den Arbeiten im Feld und für die unentbehrliche Hilfe bei der Organisation der Zusammenarbeit! Ganz herzlichen Dank besonders für die Pflege der Wild- und Sterilpflanzen! Ich danke Frau Antje Seebeck! Danke auch den technischen Mitarbeitern im Gewächshaus und den Betreuern der Felder für wichtige Informationen zur Planung der Versuchszeiten.

Ich danke Herrn Dr. Marc Volkmann und Frau Insa Ziemens für die Einführung in die Technik der Zellzahlbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie und die unersetzlichen Anregungen bei der Methodenwahl! Danke für die erquickliche Zusammenarbeit und die vielen guten Tipps! Danke für die Teamarbeit!

Ich danke allen ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Umweltbiochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und wünsche Euch viel Glück und Erfolg in allen Teilen der Welt! Ich danke und grüße: Frau Dr. Cindy Lam, Frau Dr. Zita Sebesvari, Frau Rebecca Neumann, Frau Mandy Winterberg, Frau Donata Dubber, Herrn Dr. Ferdinand Esser, Herrn Arne Wick, Herrn Tim Lachnit.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG Geomikrobiologie für die wertvolle wissenschaftliche Zusammenarbeit und dafür, dass unsere Arbeitsgruppen immer ein gutes Team waren! Ich danke Herrn Dr. Erhard Rhiel und Frau Renate Kort für die unermüdliche technische Unterstützung, für die guten Tipps und für die Zusammenarbeit am Elektronenmikroskop! Ich danke Frau Silke Ammermann, Frau Sophie Martyna, Frau Maria Schmölling für die Hilfe bei der Organisation der Arbeitsmaterialien und die nette Nachbarschaft! Ich danke Frau Dr. Kasia Palinska für die gute Zusammenarbeit bei der oben genannten Räumaktion und für die reibungslose Übernahme der Labore! Ich danke Frau Anette Schulte für die Betreuung der Bakterienstämme für die DNS Standards und für die nette Zusammenarbeit mit der AG Umweltbiochemie.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern des ICBM für die unerlässliche Hilfe bei der Durchführung molekularbiologischer Arbeiten und die Bereitstellung von Arbeitsmaterial! Ich danke Herrn Dr. Thorsten Brinkmann, Herrn Dr. Bert Engelen. Ich danke Frau Andrea Schlingloff für die Hilfe bei der DNS Quantifizierung über Fluoreszenzmessung!

Ich danke Herrn Prof. Beninda-Emonds für seine unentbehrliche Hilfe bei der Bewertung taxonomischer Ergebnisse und die fachmännische Beratung!

Ich danke der AG Biochemie für gute Nachbarschaft und für den Erfahrungsaustausch!
Ich danke Frau Dr. Irene Witte und Herrn Andre Stang!

Ich danke und grüße Frau Sarah Kohls und Frau Dr. Scholz Böttcher

Ich danke allen technischen Mitarbeitern des ICBM für die großartige Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft, so dass trotz immer voller Terminpläne alle nötigen Wartungen und Reparaturen möglich waren. Danke vor allem auch für den erhellenden technischen Austausch auf so vielen Gebieten!

Ich danke meiner Schreibzimmer-Genossin Frau Ilka Töpfer für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit!

Dankeschön!

6 Lebenslauf

Annette Grathoff

Am Wiesengrund 14
90530 Wendelstein



Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 24.04.1980

Geburtsort: Nürnberg

Familienstand: Ledig

Studium

2006-2009 Promotion zum Thema
„Veränderungen in der Zusammensetzung von Bakterioplankton-Gesellschaften durch Inkubation mit den Süßwasser Makrophyten *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica*“

03/2006-03/2009 Wissenschaftliche Hilfskraft (Doktorandin)
 In der AG Umweltbiochemie
 (Prof. Dr.Tilman Harder)

Institut für Chemie und Biologie des Meeres,
CvO Universität Oldenburg

1999-2004

Biologiestudium an der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen/Nürnberg

* Abschluss: Diplom Biologin

* Diplomarbeitsthema: **„Duftstoffe
sphingophiler Blütenpflanzen im
elektrophysiologischen Test an
Sphingiden“**

**03/2004-09/2004,
09/2002-02/2003,
04/2003-07/2003**

Mitwirkung als studentische Hilfskraft am AiF
Projekt zur ökologischen
Schädlingsbekämpfung der
Roskastanienminiermotte *Cameraria
ohridella*

**05/2003-06/2003,
11/2003-12/2003**

Assistenz im Zoologischen Großpraktikum
für Studenten des Hauptstudiums

**08/2002-09/2002,
02/2003-03/2000**

Gastforschungstätigkeit in der Biologischen
Anstalt Helgoland (AWI) an Projekt über
Mikroorganismen im Körper mariner
Invertebraten

(Ergebnisse veröffentlicht in:

Schütt *et al.*, 2007:

Bacterial aggregates in the tentacles of the
sea anemone *Metridium senile*; Helgoland
Marine Research **4**, 211-216).

04/2002-06/2002

Assistenz im allgemeinen Biologie Praktikum
für Studenten des 2. Semesters

02/2002-03/2002

Exkursion nach Costa Rica. Schwerpunkt Tropenökologie. Entwicklung, Durchführung und Präsentation zweier Forschungsprojekte während des Aufenthaltes. Abdruck der Arbeiten im Exkursionsband.

Schulzeit

1989-1999

Adam-Kraft-Gymnasium Schwabach

* Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Sonstiges

Posterpräsentation

2005

Graduiertentreffen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 2005
Themenschwerpunkt „Evolutionary Chemical Ecology“: Poster und Vortrag zum Thema „Scents from sphingophilous flowers electrophysiologically tested with sphingid antennae in an EAG assay“

1999/2000

Videodokumentation mit begleitender schriftlicher Arbeit im Leistungskurs Biologie;
Auszeichnung der Arbeit bei Abiturabschlussfeier 1999 als beste Facharbeit des Jahrgangs.

Präsentation des Films und der Arbeit in Form eines Posters bei „Jugend Forscht“

Engagement im Umweltschutz

2006,

2007,

2008:

Mitarbeit innerhalb der Greenpeace Gruppe Oldenburg beim Projekt zur Umstellung des Speisefischangebotes in den Mensen des Studentenwerkes (Oldenburg, Wilhelmshaven, Emden) auf nachhaltig gefangenen Fisch. Start: Ende 2006. Begleitung und Aktualisierung in den Jahren 2007 und 2008.

Mitgliedschaften

*** Deutsche Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie (DGaE)**

*** Vorstandsmitglied im Förderverein Zoologisches Museum Erlangen**

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten

Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, den 16.06.2009

7 Anhang

7.1 Charakteristik des Probenwassers

In Tab. 12 sind die gemessenen Werte zur Charakterisierung des Probenwassers in Versuchen dargestellt. Es werden dabei die Werte für alle 11 durchgeführten Inkubationsversuche mit unbehandeltem Probenwasser als Nullkontrolle angegeben. Gemessene Werte des **Mentha-Dünger**-Versuchs, in dem Konzentrationen anorganischer Nährsalze im Probenwasser artifiziell erhöht wurden sind ebenfalls angegeben.

Tab. 13: Überblick über pH Wert und anorganische Nährstoffe des Probenwassers. Werte wurden bestimmt für das unbehandelte, frische Probenwasser (PW 0T), sowie für das direkt in Inkubationsversuchen eingesetzte Probenwasser. PW 7T bezeichnet das Wasser der Nullkontrolle und PKW bzw. PKW-W das konditionierte Wasser in Versuchen. PKW Proben wurden immer am letzten Tag des Experimentes genommen und geprüft (7T). I, M, I & M bezeichnen Versuche mit I = *Iris pseudacorus*, M = *Mentha aquatica*, I&M = Kombinationsversuch mit *I. pseudacorus* und *M. aquatica*. Bei Versuchen, in denen Wildpflanzen und Sterilpflanzen getestet wurden, wurde dies mit den Abkürzungen w = Wildpflanzen bzw. s = Sterilpflanzen ergänzt.

	Iris1			Iris & Mentha 1			Iris 2			Iris 3		
	PW 7T	PKW	PW 0T	PW 7T	PKW für I,M	PW 0T	PW 7T	PKW	PW 0T	PW 7T	PKW	PW 0T
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	> 6,5	> 6,5	> 6,5
NO ₂ ⁻ [mg/L]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,1	0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
NO ₃ ⁻ [mg/L]	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0
PO ₄ ³⁻ [mg/L]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5

	Iris & Mentha 2			Iris steril			Mentha			Mentha Dünger*		
	PW 7T	PKW für I,M,I&M	PW 0T	PW 7T	PKW wild/steril	PW 0T	PW 7T	PKW wild/steril	PW 0T	PW 7T	PKW	PW 0T
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	> 6,5	7,0	7,0	7,0	7,0
NO ₂ ⁻ [mg/L]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,3	< 0,3
NO ₃ ⁻ [mg/L]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	< 10	< 10	< 10
PO ₄ ³⁻ [mg/L]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
	Mentha-SM			Iris & Mentha 1-SM			Iris-SM			Iris & Mentha 2-SM		
	PW 7T	PKW-W wild/steril	PW 0T	PW 7T	PKW-W für I,M	PW 0T	PW 7T	PKW-W	PW 0T	PW 7T	PKW-W	PW 0T
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	< 6,5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
NO ₂ ⁻ [mg/L]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
NO ₃ ⁻ [mg/L]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PO ₄ ³⁻ [mg/L]	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1

* Dieser Versuch diente zur Methodenentwicklung und wurde nicht molekularbiologisch ausgewertet.

7.2 DGGE Gele des Düngerelements und der 3T Versuche

Dünger Experiment mit *Mentha aquatica* (10.-17.08.2006)

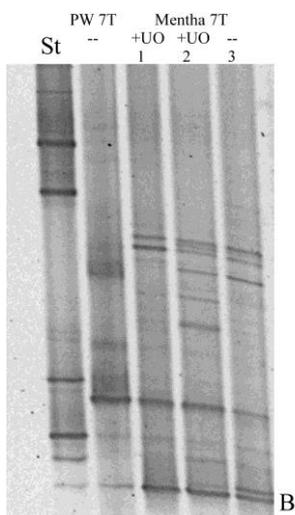
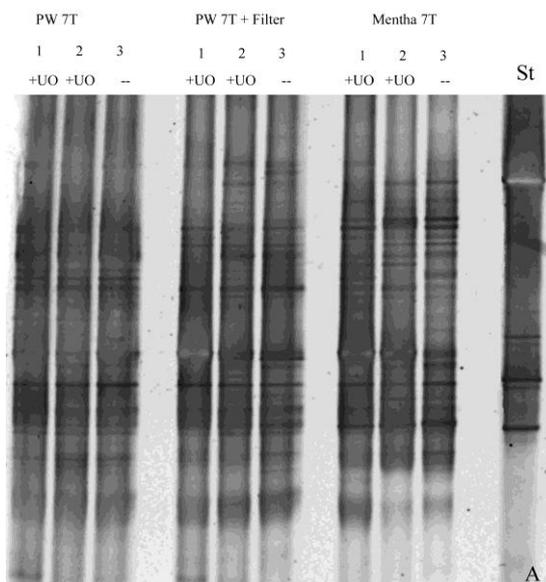


Abb. 7-1: Ausschnitte von Gelen zur Amplifikation der Proben des Versuchs unter Verwendung von Dünger in Ansätzen. A: DNS amplifiziert durch TOUCHDOWN_PCR. B: Amplifizierung der Proben des Versuchs durch NORMAL_PCR. Proben aus unbehandeltem Probenwasser als „PW“, Proben aus mit *Mentha aquatica* inkubiertem Gießwasser als „Mentha“ bezeichnet. 7T gibt eine Inkubationsdauer des Ansatzes an dem die Probe stammt von 7 Tagen an. TW +Filter bezeichnet die für die frühen Experimente zusätzlich genutzte Nullkontrolle (siehe 2 a). Der Pfeil (→) markiert eine

Bande, welche im unbehandelten Teichwasser vorkam, im Mentha-Ansatz jedoch nicht. Wurde Dünger dem Ansatz beigefügt, so wurde dies mit dem Zusatz +UO (UniversolOrange) angegeben.

Inkubationsexperimente mit *Iris pseudacorus* und *Mentha aquatica* über 3 Tage

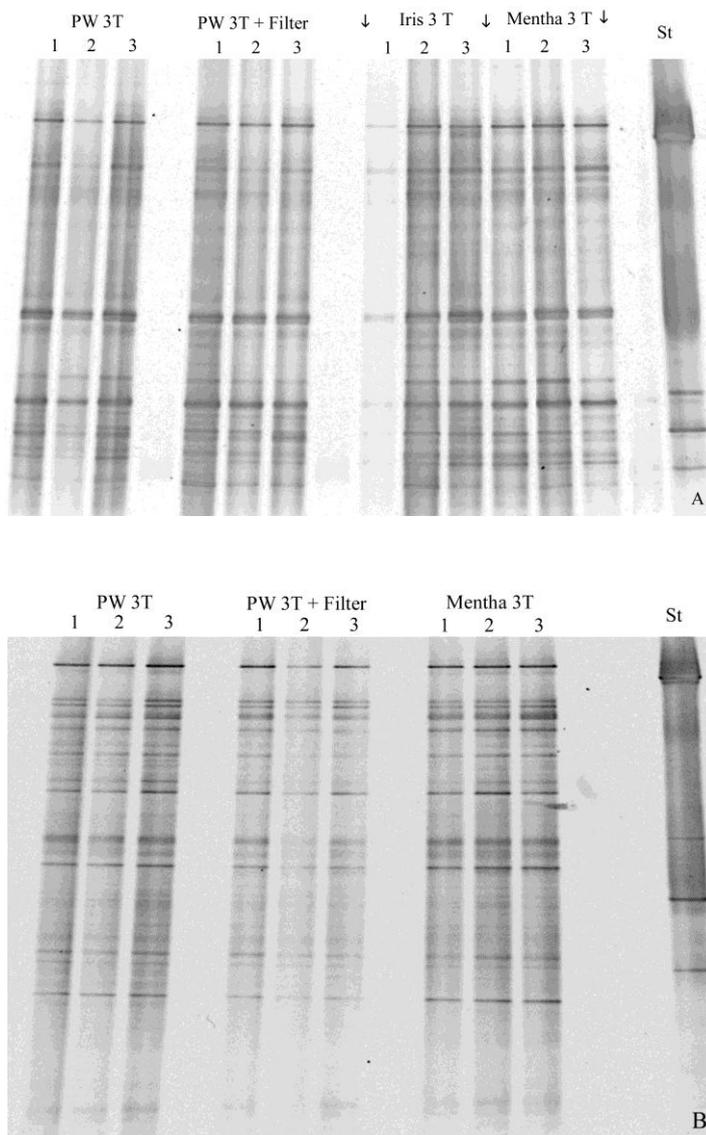


Abb. 7-2: DGGE Gele amplifizierter DNS aus Filterproben von 3 Tage dauernden Inkubationsexperimenten mit *Iris pseudacorus* bzw. *Mentha aquatica*. A: Gel des **Iris & Mentha 3 Tage**-Versuchs. B: Gel des **Mentha 3 Tage**-Versuchs. St markiert in beiden Gelen (Bild A, B) den DNS Standard. Die Amplifikation der DNS beider Versuche zur 3T Inkubation erfolgte unter Nutzung des PCR Programms „TOUCHDOWN_PCR“ (Kapitel 2). PW 3T bezeichnet das unbehandelte Probenwasser

(Nullkontrolle). PW 3T + Filter ist die Nullkontrolle für in Versuchen verwendete Filterwatte (Kapitel 2). Iris bzw. Mentha 3 T bezeichnet Proben des mit der jeweiligen Pflanze inkubierten PW

7.3 Abbildungen zu den in Kapitel 3 gezeigten Versuchen mit Angaben der zur Analyse verwendeten Banden

Iris 1 (24. – 31.08.2006)

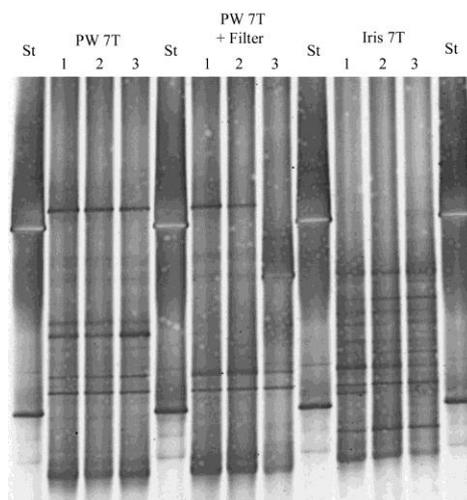


Abb. 7-3: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris 1**-Versuchs von 2006. „PW 7T +Filter“ bezeichnet die zusätzliche Nullkontrolle von PW mit Filterwatte (siehe 2.4.2).

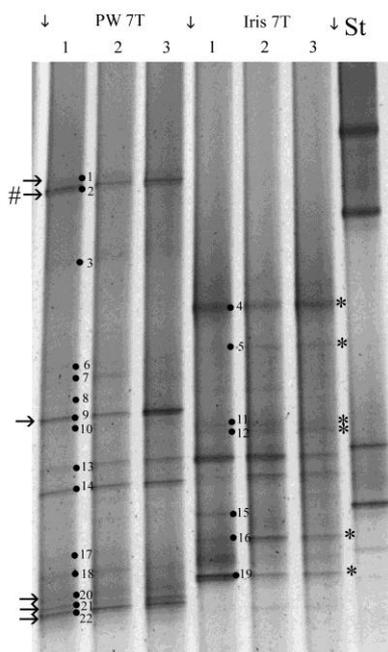


Abb. 7-4: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris 1**-Versuchs. Alle 22 zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris & Mentha 1 (19.-26.03.2008)

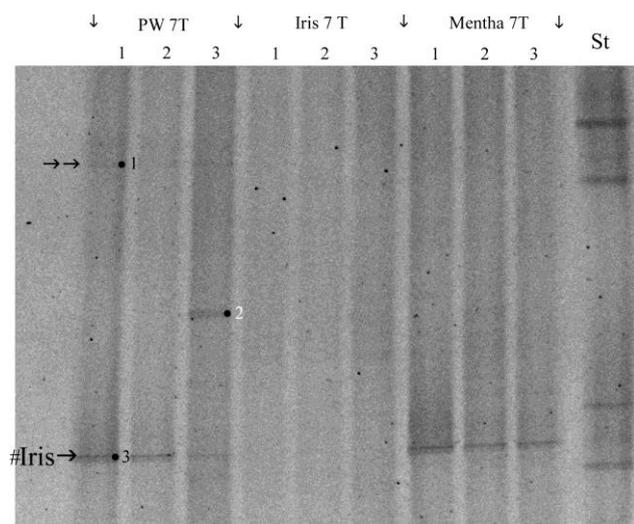


Abb. 7-5: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris & Mentha-1** Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell beschriftete Bande wurde als Verunreinigung behandelt. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris & Mentha 1-SM (27.03. - 03.04.2008)

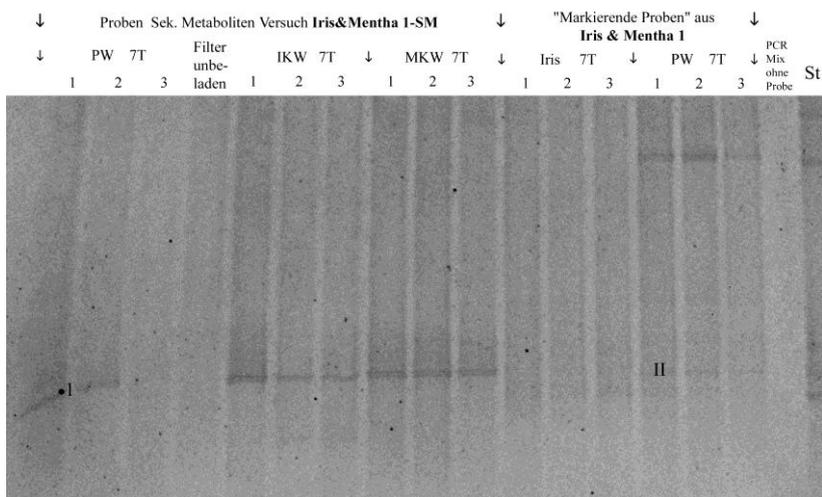


Abb. 7-6: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris & Mentha 1-SM**-Versuchs. Die Markierung aus dem unter 3.3 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris 2 (08-15.07.2008)

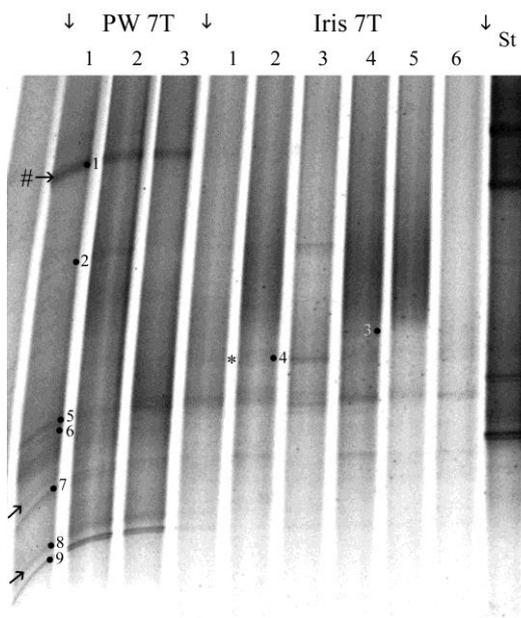


Abb. 7-7: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris 2**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und

nummeriert. Die hell beschriftete Bande wurde als Verunreinigung behandelt. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris 2 – SM (16.-23.07.2008)

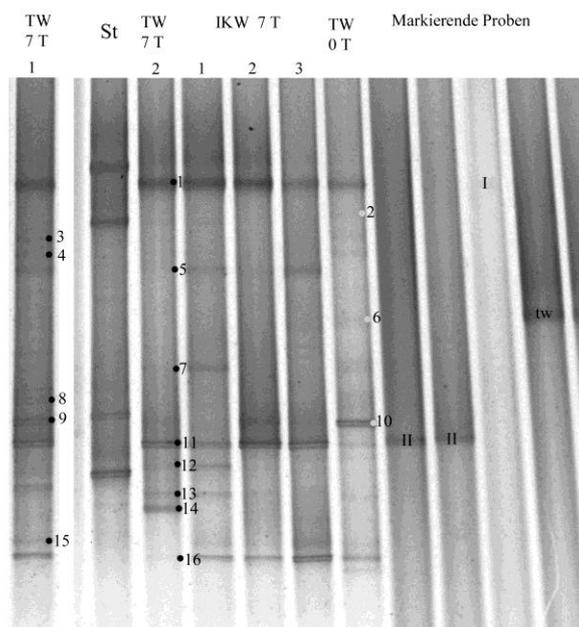


Abb. 7-8: : DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris 2-SM**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell markierten, aber schwarz beschrifteten Banden kamen nur im PW 0T vor. Die Markierungen aus dem unter 3.3 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris 3 (31.07.-07.08.2008)

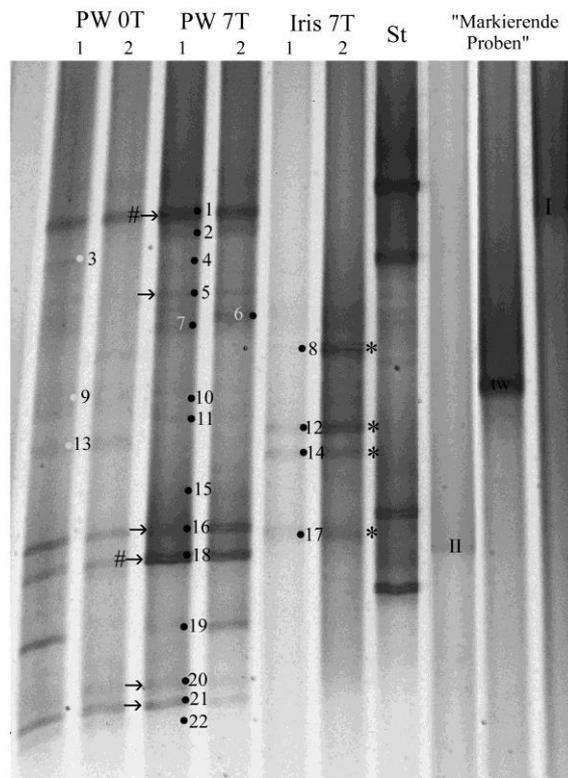


Abb. 7-9: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris 3**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell beschrifteten Banden wurden als Verunreinigung behandelt. Die hell markierten, aber schwarz beschrifteten Banden kamen nur im PW 0T vor. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris & Mentha 2 (10.-17.09.2008)

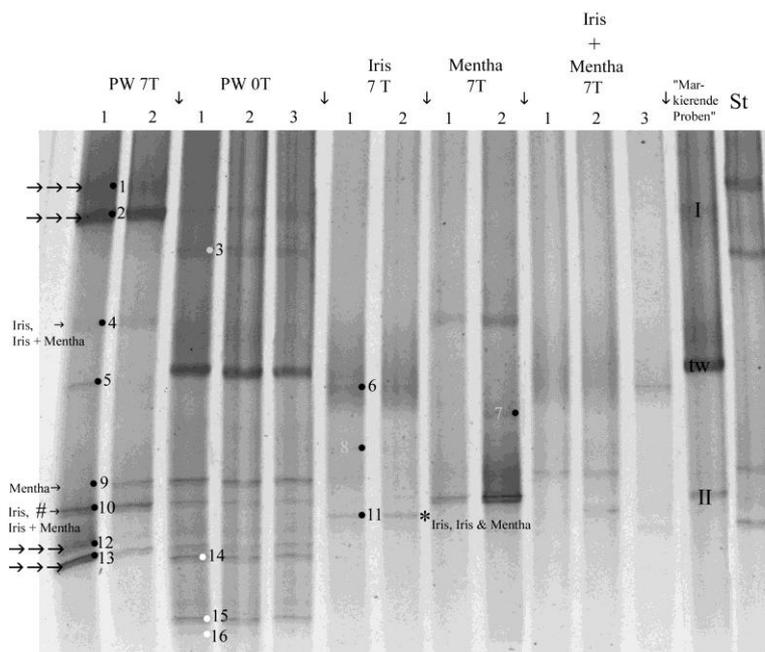


Abb. 7-10: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris & Mentha 2**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell beschrifteten Banden wurden als Verunreinigung behandelt. Die hell markierten, aber schwarz beschrifteten Banden kamen nur im PW 0T vor. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Mentha (16.-23.01.2008)

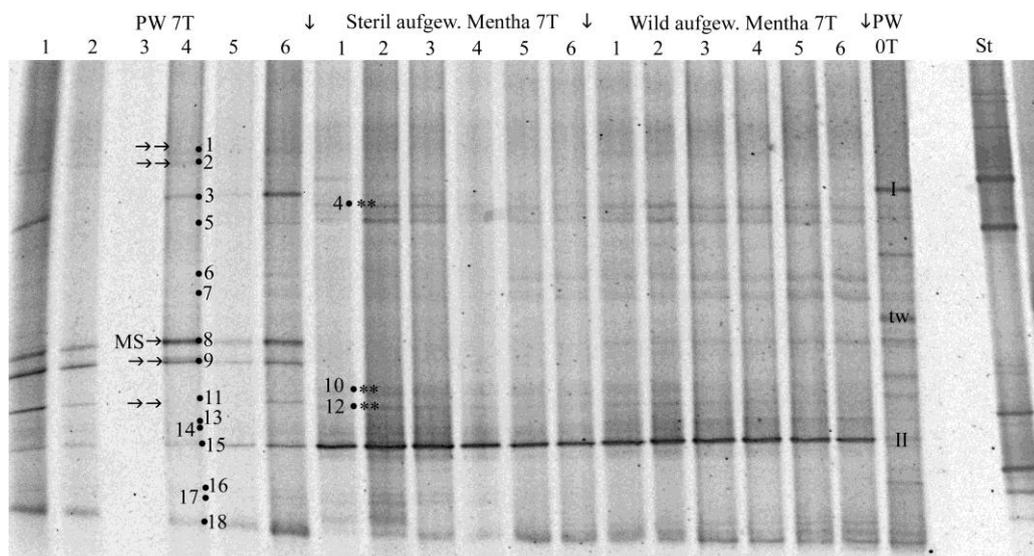


Abb. 7-12: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Mentha**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die Markierungen aus dem unter 3.2.1 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Mentha-SM (24.-31.01.2008)

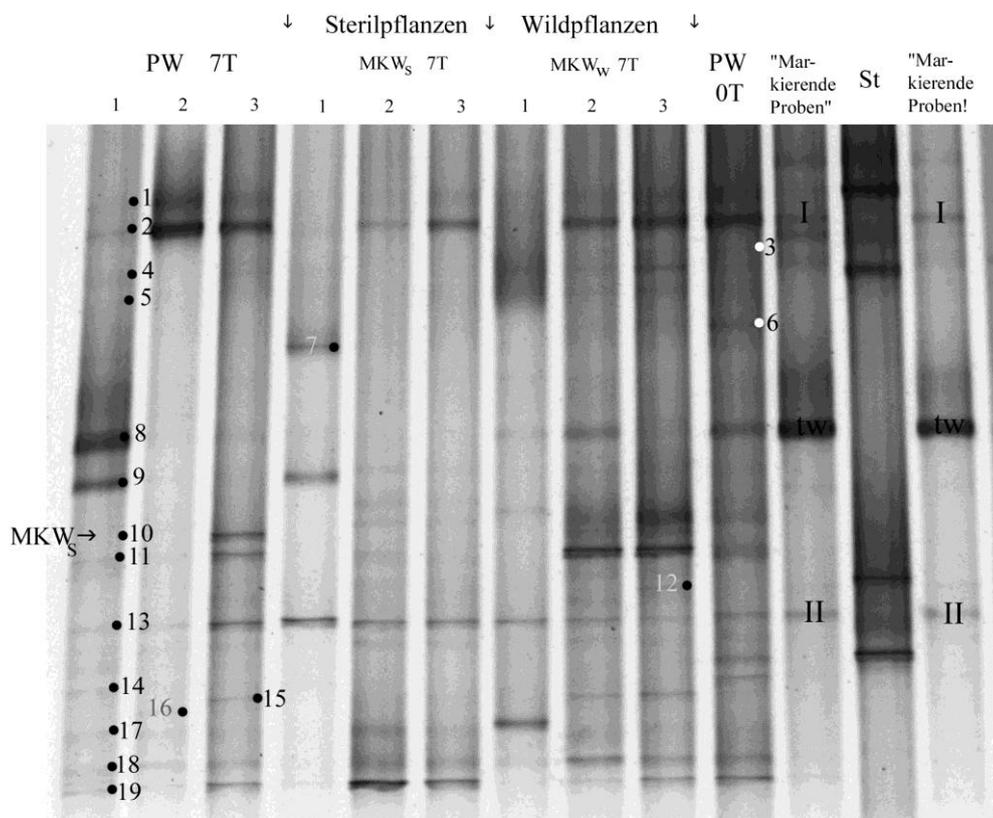


Abb. 7-13: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Mentha-SM**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell beschrifteten Banden wurden als Verunreinigung behandelt. Die hell markierten, aber schwarz beschrifteten Banden kamen nur im PW 0T vor. Die Markierungen aus dem unter 3.3 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Iris Steril (22.-29.06.2007)

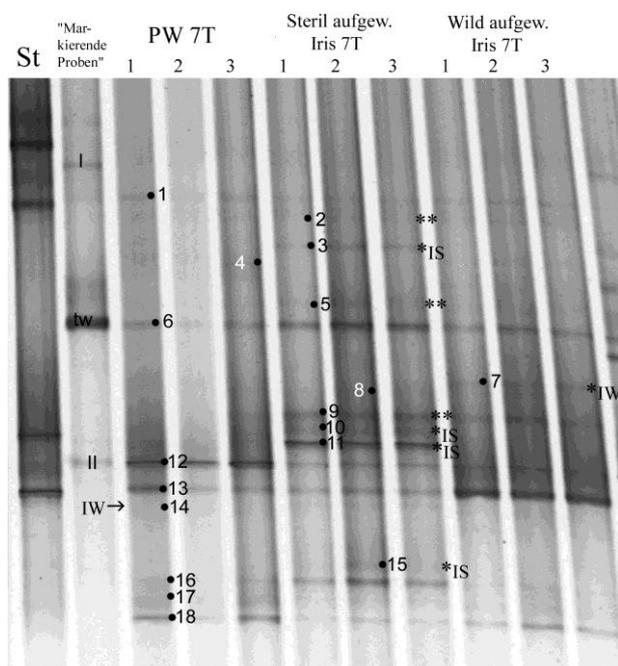


Abb. 7-14: DGGE Profil der amplifizierten 16SDNS von Proben des **Iris Steril**-Versuchs. Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die hell beschrifteten Banden wurden als Verunreinigung behandelt. Die Markierungen aus dem unter 3.4 gezeigten Gel wurden beibehalten

Pseudomonas 1 (DNS von Proben aus Iris 1)

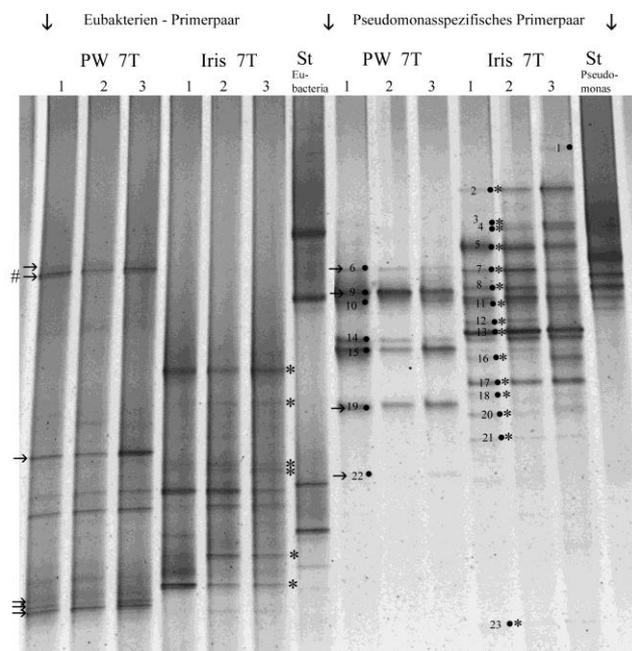


Abb. 7-15: Gel zur Auswertung der Amplifikation von Proben des **Iris 1**-Versuchs mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) und unspezifischen eubakteriellen Primern (P). Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die Markierungen aus dem unter 3.5.2 gezeigten Gel wurden beibehalten.

Pseudomonas 2 (DNS der Proben aus dem Ansatz von mit Iris-Pflanzen inkubiertem Probenwasser des **Iris & Mentha 2**-Versuchs)

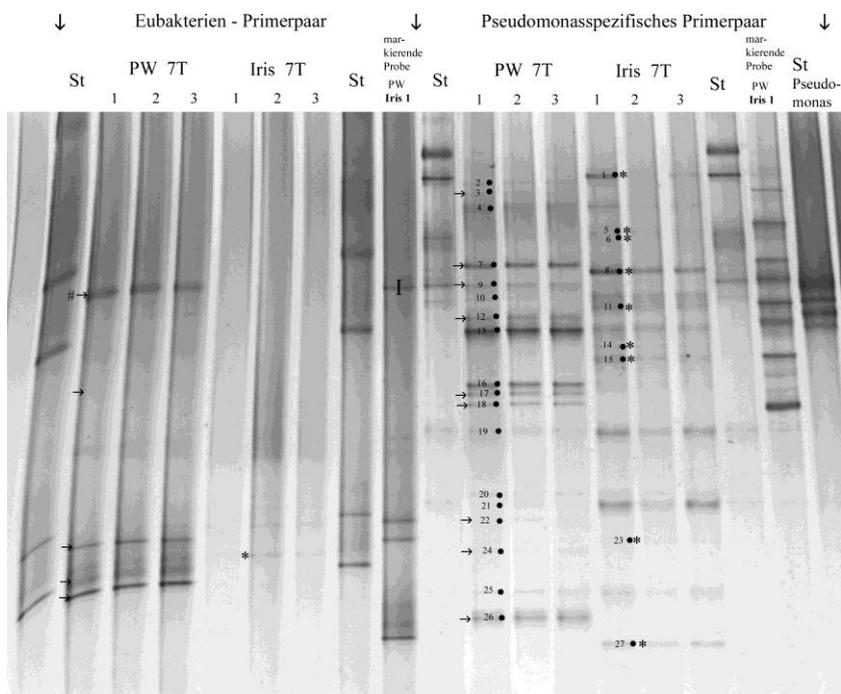


Abb. 7-16: Gel zur Auswertung der Amplifikation von mit Iris-Pflanzen inkubiertem Probenwasser des **Iris & Mentha 2**-Versuchs mit *Pseudomonas*-spezifischen Primern (PP) und unspezifischen eubakteriellen Primern (P). Alle zur Erstellung der Similaritätsmatrix verwendeten Banden wurden gekennzeichnet und nummeriert. Die Markierungen aus dem unter 3.5.2 gezeigten Gel wurden beibehalten.

7.4 Abbildungen zu den in Kapitel 3 angesprochenen Markergelen zur Überprüfung von Bandenpositionen

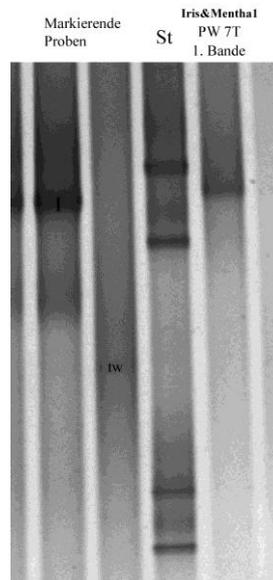


Abb. 7-17 a: Ausschnitt eines Marker- DGGE Gels, in dem Proben aus einer Reamplifikation der an oberster Position stehenden 1. Bande im Gel des **Iris & Mentha 1**-Versuchs mit einer „markierenden Probe“ für die „Bande 1“ getestet wurden. Mit der DNS Sonde konnte nachträglich eindeutig festgestellt werden, dass die „Bande 1“ im **Iris & Mentha**-Versuch nicht vorkam. Die im Bereich der Position von „Bande 1“ ausgebildete Bande des Amplikons der 1. Bande von PW 7T lag deutlich über der „Bande 1“.

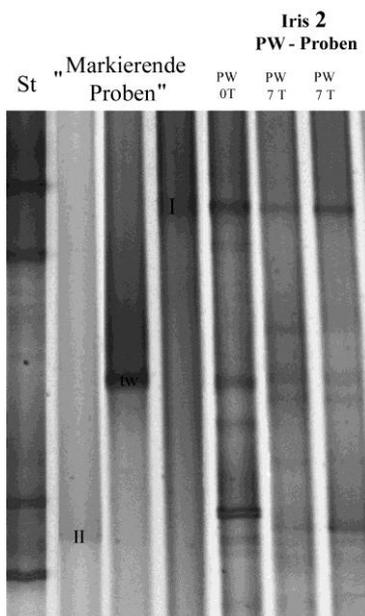


Abb. 7-18 b: Ausschnitt eines Marker- DGGE Gels, auf dem PW Proben (PW 0T, PW 7T) des **Iris 2**-Versuchs mit „markierenden Proben“ getestet wurden. Ziel des Bandennachweises war die Überprüfung der Banden 1 und 5 in Abb. 7-7. Es wurde sichtbar, dass die Bande 5 nicht der „Bande 2“ (II) entspricht. Die Übereinstimmung der 1. Bande im Gel des **Iris 2**-Versuchs (Abb. 7-7), mit der „Bande 1“ (I) wurde mit Hilfe des Gels bestätigt.

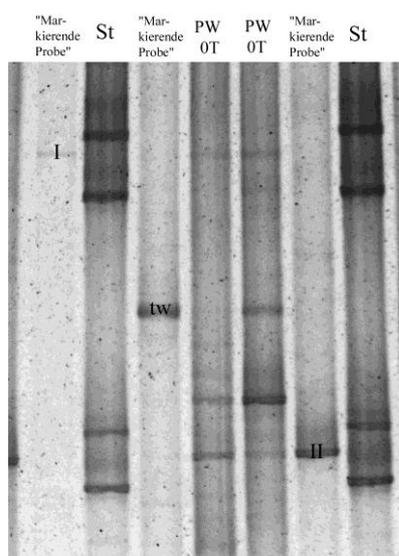


Abb. 7-19 c: Ausschnitt eines Marker- DGGE Gels, auf dem PW 0T-Proben des **Mentha**-Versuchs mit „markierenden Proben“ getestet wurden. Ziel des Bandennachweises war die Überprüfung der Eignung von PW 0T zur Markierung der wiederkehrenden Banden „Bande 1“, „Bande 2“, „tw“ im **Mentha**-Gel in Abb. 7-12. Die

Übereinstimmungen der Banden in Positionen der 3 wiederkehrenden Banden mit den Positionen der Banden in den „markierenden Proben“ wurden sichtbar.