

Interaktionen zwischen assoziativen stickstofffixierenden Bakterien und Mykorrhizapilzen mit Nutzpflanzen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Tina Selle

geboren am 21.12.1967 in Hannover



1999

Referent: Apl. Prof. Dr. István Fendrik

Korreferent: HD Dr. Rainer Niemeyer

Tag der Promotion: 20. Mai 1999

meinen Eltern

DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde am Institut für Biophysik (IfB) der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. István Fendrik durchgeführt und im Rahmen eines Forschungsprojekts von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Ihre Anfertigung wäre ohne die menschliche und fachliche Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

Daher gilt an dieser Stelle mein Dank:

Prof. Dr. István Fendrik für die Vergabe des Themas, für die stete Gesprächsbereitschaft und die Förderung der Arbeit.

HD Dr. Rainer Niemeyer, Institut für Botanik, für das Interesse und für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Dr. Henning von Alten, Institut für Phytopathologie, für die Mitwirkung am Projekt als Zweit-antragsteller und seine fachliche Unterstützung zum Thema vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza.

Dr. Johanna Döbereiner, Dr. Mauro A. de Paula, Dr. Robert M. Boddey, EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, R.J., Brasilien, für die Einführung in die Arbeit mit VA-Mykorrhiza, Tips für die Isotopenverdünnungstechnik und die Hilfestellung beim Erlernen der Arbeitsmethoden des EMBRAPA. Und allen Mitarbeitern des EMBRAPA für die freundschaftliche Aufnahme einer *gringa*.

Dr. Martin Runge, Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, für die Anleitung bei den Arbeiten zur Herstellung von Antiserum und für das beteiligte Kaninchen. Außerdem Frau Schmidt für die Einweisung in die Arbeitsmethoden im Labor des Institut für Mikrobiologie.

Priv.-Doz. Dr. Anton Hartmann und den Mitgliedern des Instituts für Bodenökologie (IBÖ), GSF, Neuherberg für die Gastfreundschaft und die Möglichkeit, die Labore für die Arbeiten zur LSM-Präparation mit zu benutzen.

Dr. Bernhard Aßmus, IBÖ, dem Zauberer am LSM, dafür, dass er es möglich machte, in Nachtschichten *Azoarcus* auf die Spur zu kommen und für seine ansteckende Begeisterung.

Dr. Gudrun Kirchhof, IBÖ, für die zuverlässigen DNA-Analysen und die ausführlichen Beschreibungen.

Frau Armgard Janczikowski, Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover, für das Anfertigen von REM-Präparaten und die Zeit, die beim Betrachten im Rasterelektronenmikroskop verging. Für die Benutzung des REM danke ich Prof. Dr. Hans Diekmann.

Meiner Arbeitsgruppe „Assoziative Stickstoff(f)ixierung“ für ein hervorragendes Arbeitsklima mit zahllosen Anregungen und Ermunterungen, ständiger Hilfsbereitschaft, den gemeinsamen N-Fixer-Aktionen und den Zusammenhalt gegen äußere Widrigkeiten – als da sind Rüdiger Stanke, Kai Kalippke, Heidi Bliedung, Sandra Schulze, Matthias Debarry, Remon Sperr, meinen Diplomandinnen Norma Hayen-Schneg, Gaby Wieland, Silke Marotzke und den „Ehemaligen“ Britta Eberlein und Achim Schmalenberger.

Der Nachbararbeitsgruppe „AG-Kolb“, namentlich Konrad M. Weigt, Oliver Enders und Roland Schauer, für Nachhilfe in Physik, das „Zu-Hilfe-Eilen“ bei digitalen Problemen und freundschaftliche Kooperation.

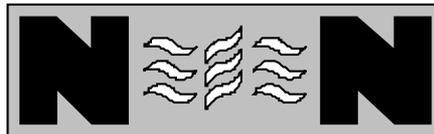
Unserer Werkstatt für die sofortige und ideenreiche Lösung kleinerer und größerer technischer Probleme.

Den Mitgliedern des ZSR für gute Nachbarschaft und die Möglichkeit der Gerätenutzung.

Frauke für viele Nächte mit Gesprächen und konstruktiven Diskussionen.

Meinen Eltern für ihre beständige Ermunterung, unermüdliche Hilfeleistung und die Geduld beim Anhören der endlosen Institutsgeschichten.

Hartmut für seine Zuneigung und die Unterstützung in jeder Hinsicht.



Die vorliegende Arbeit wurde auszugsweise veröffentlicht:

Stein, T., Hayen-Schneg, N., Fendrik, I., Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. *Soil Biol. Biochem.* 29: 969–971, 1997.

Wieland, G., Marotzke, S., Stein, T., Fendrik, I., Interaction of *Azoarcus* sp. with other diazotrophs in cereal plants. Poster präsentiert beim 7th Int. Symp. Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Faisalabad, Pakistan, 16.–21. Okt. 1996.

Weitere Veröffentlichungen:

Stein, T., Ueckert, J., Fendrik, I., Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of kallar grass using alginate-coated seeds in mixed inoculation. In: Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., de Zamaroczy, M., (Hrsg.). *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer, ASI Series G 37, 1995: 239–243.

Stein, T., Pollak, F.C., Kimmel, S., Fendrik, I., Niemann, E.-G., Colonization of kallar grass roots with *Azospirillum lipoferum* and its chemotactic negative mutant. In: Hegazi, N.A., Fayez, M., Monib, M., (Hrsg.). Cairo: The American University in Cairo Press, 1994: 387–389.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Tina Selle.

Tina Selle

Hannover, März 1999

ZUSAMMENFASSUNG

Das Wirtsspektrum des endophytischen diazotrophen Bakteriums *Azoarcus* sp. BH72 wurde auf die tropischen C₄-Nutzpflanzen Hirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) und Reis (*Oryza sativa* L.) ausgedehnt. Die äußere Rhizosphäre sowie das Innere von Wurzel und Spross wurden besiedelt. Auch die C₃-Pflanze Weizen wurde kolonisiert, doch wurden deutlich weniger Bakterien aus Spross und Wurzel reisoliert. Weizen wuchs kaum unter Stickstoffmangelbedingungen, profitierte also nicht von der bakteriellen Stickstofffixierung. Die Wurzel-exsudate von C₄- und C₃-Pflanzen sind stark unterschiedlich, und beeinflussen maßgeblich die Assoziation von Bakterien und Pflanze.

Die Zugabe von Kohlenstoffverbindungen im Medium störte das Chemotaxis gesteuerte Auffinden der Wurzel.

Obligat endophytische diazotrophe Bakterien (*Azoarcus* sp. BH72, *Herbaspirillum seropedicae*) besiedelten den Spross von Hirsepflanzen in stärkerem Umfang als assoziative, fakultativ endophytische Organismen (*Azospirillum brasilense* Sp245). Die beste Besiedlung erfolgte bei Organismen, die auch in natürlichen Habitaten miteinander eine Lebensgemeinschaft eingehen. Es sollte deshalb zwischen „primären“, also den ursprünglichen, und „sekundären“ Wirtspflanzen unterschieden werden.

Die beiden Endophyten *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* zeigten synergistische Effekte bei der gemeinsamen Besiedlung von Hirsepflanzen, wobei *Azoarcus* sp. BH72 in monoxenischer Kultur die Pflanzen stärker förderte. In Hydrokultur profitierten die Pflanzen hinsichtlich ihrer Biomasse besonders von der Mischkultur mit beiden Bakterien.

Die Herstellung spezifischer Antikörper ermöglichte jederzeit die eindeutige Identifizierung des untersuchten Bakteriums *Azoarcus* sp. BH72. Die Besiedlung der Hirse- und Weizenpflanze wurde mikroskopisch durch Markierung mit diesen Antikörpern verifiziert. *Azoarcus* sp. BH72 besiedelte das Wurzelinnere über die Wurzelhaarzone sowie die Durchbruchstellen entstehender Seitenwurzeln. Dokumentiert wurde die Besiedlung von Interzellularfurchen, das Eindringen von *Azoarcus* sp. BH72 in Interzellularen und Wurzelzellen und das Auftreten des Bakteriums in Zellen des Sprosses.

Mit Hilfe von Acetylenreduktionstests und Färbetechniken wurde die Nitrogenaseaktivität im Kultursystem nachgewiesen. Aktive Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 wurden in der Wurzelhaarzone von Hirse lokalisiert. Für die Nitrogenaseaktivität fand sich ein Optimum bei 5 % Sauerstoff im Luftraum.

In einem neuartigen hydroponischen Kultursystem mykorrhizierte der vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* Hirsewurzeln schnell und umfassend.

Eine über Monate stabile Lebensgemeinschaft aus *Sorghum bicolor*, *Azoarcus* sp. BH72 und *Glomus intraradices* wurde im Gewächshaus etabliert. Mit *G. intraradices* mykorrhizierte Pflanzen reduzierten das Wurzelwachstum zu Gunsten der Sprossentwicklung; die VAM übernahm einen Teil der Wurzelfunktion und erschloss der Pflanze für sie unzugängliche Stickstoffquellen. Das Bakterium verstärkte den Mykorrhizierungsgrad und leistete einen Beitrag zur Stickstoffversorgung der Pflanze. In monoxenischen Kulturen mit *Azoarcus* sp. BH72 trug die

verbesserte Stickstoffversorgung ebenfalls zur Verminderung des Wurzelwachstums bei; die Wurzelmasse wurde reduziert.

Der höchste Profit hinsichtlich des Stickstoffgehaltes in der Pflanze fand sich bei der gemeinsamen Kultur aller drei Organismen. Der Pilz als Mediator förderte die Translokation bakteriell fixierten Stickstoffs in die Pflanze. Aber auch ohne Beteiligung von VAM fand sich in der Pflanze Stickstoff aus der biologischen Fixierung (BNF), wobei jedoch der Gesamtstickstoffgehalt der Pflanze ohne Stickstofflimitierung im Medium gegenüber Kontrollpflanzen nicht signifikant anstieg. In Hydrokultur mit Stickstofflimitierung kam es hingegen zu einer Erhöhung des Stickstoffgehalts der Pflanze.

Bei gemeinsamer Kultur zeigten *Azoarcus* sp. BH72 und *G. intraradices* ein Konkurrenzverhalten bei der Besiedlung von Wurzeloberfläche und dem Inneren der Pflanze.

Die Verteilung des translozierten Stickstoffs innerhalb von Spross und Wurzel wurde bei der Kurztagpflanze Hirse mutmaßlich durch die Tageslänge während der Kultivierung beeinflusst.

Im Kultursystem der drei Organismen traten synergistische Effekte auf, von denen in erster Linie die Pflanze profitierte. Die Gesamtheit der Interaktionen kann nicht als uneingeschränkt bzw. dreiseitig mutualistisch bezeichnet werden, da für *Azoarcus* sp. BH72 bei ausreichender Stickstoffversorgung durch das Medium auf Grund der Besiedlungskonkurrenz mit der Mykorrhiza vordergründig kein Nutzen zu erkennen war.

Stichwörter: biologische Stickstofffixierung, *Azoarcus* sp. BH72, *Sorghum bicolor*

ABSTRACT

Using *in vitro*-cultivation systems the endophytic diazotrophic bacterium *Azoarcus* sp. BH72 colonized the outer rhizosphere as well as the interior of roots and shoots of the C₄ plants sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and rice (*Oryza sativa* L.) and to a lesser extent of the C₃ plant wheat. Wheat plants seemingly did not profit from bacterial nitrogen fixation, showing less growth. The association between plant and bacterium was decisively influenced by root exudates which are significantly different in C₃ and C₄ plants.

The chemotactically driven colonization of plant roots was disturbed by carbon supplements to the medium.

Obligate endophytic diazotrophic bacteria (*Azoarcus* sp. BH72 and *Herbaspirillum seropedicae*) exhibited a larger potential for colonizing the upper parts of sorghum than facultative endophytic organisms (*Azospirillum brasilense* Sp245). The most extensive colonization was observed with organisms which are already naturally associated. Thus it should be distinguished between "primary" and "secondary" host plants.

Both obligate endophytes displayed synergistic effects when inoculated together with sorghum seedlings. In monoxenic culture *Azoarcus* sp. BH72 promoted plant growth stronger than *H. seropedicae*, but the plant gained the most profit when both bacteria were added to the hydroponic cultures.

Specific antibodies allowed an unambiguous identification of *Azoarcus* sp. BH72. Using antibody-linked markers, colonization of sorghum was verified with microscopical techniques. *Azoarcus* sp. BH72 penetrated into the root interior at the zones of elongation and differentiation as well as at emergence sites of lateral roots. Bacteria were detected in intercellular gaps between rhizodermic cells, in intercellular spaces and inside cells of root and shoot.

By means of acetylene reduction assay and staining techniques activity of nitrogenase was proven in the cultivation system. Active cells of *Azoarcus* sp. BH72 were located in the zones of elongation and root hairs of sorghum. The enzyme showed a maximum activity with 5 % O₂ in the gas phase.

A new hydroponic culture system was used for mycorrhization of sorghum roots with the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus intraradices*.

A specific cultivation system was developed that allowed the establishment of an association with sorghum, *Azoarcus* sp. BH72 and *G. intraradices*, which was stable for months. Root development was diminished in favor of shoot growth by mycorrhization with *G. intraradices*. *Azoarcus* sp. BH72 not only increased the extent of mycorrhization and contributed to the plant's nitrogen supply but caused a decrease of root mass in monoxenic culture as well. The VAM mobilized nutrients that otherwise were not accessible for the plants.

Regarding the nitrogen content, the plant got the most benefit from a joint cultivation with both microorganisms. As a mediator the fungus facilitated the translocation of nitrogen fixed by the bacteria towards the plant. Such a translocation was also observed with bacteria alone and without VAM. Nonetheless, in this case, with sufficient nitrogen in the medium, the total amount of nitrogen in the plant was not significantly increased as compared with control

plants. On the other hand, when nitrogen was depleted (in hydroponic culture), the nitrogen content of the plant increased.

Azoarcus sp. BH72 and *G. intraradices* showed competitive behaviour in colonizing sorghum.

It is hypothesized that the length of day and night influenced the distribution of translocated nitrogen between root and shoot of the short-day plant sorghum.

In the culture of the three organisms synergistic effects occurred, but all interactions in total may not be considered as three-sided mutualistic. While plants had a benefit from the mixed culture, no obvious advantage was detected for *Azoarcus* sp. BH72 in a system with sufficient nitrogen supply.

Key words: biological nitrogen fixation, *Azoarcus* sp. BH72, *Sorghum bicolor*

I. INHALT

	Zusammenfassung.....	VIII
	Abstract	X
I.	Inhalt.....	XII
II.	Abkürzungen	XV
1	Einleitung.....	1
1.1	Diazotrophie und Rhizosphäre	1
1.2	Assoziationen und Symbiosen	3
1.3	Problemstellung	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Organismen	10
2.1.1	Bakterien	10
2.1.2	Vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze (VAM)	10
2.1.3	Pflanzen.....	11
2.2	Medien	11
2.2.1	Nähragar (NA).....	12
2.2.2	NFb-Medium	12
2.2.3	JNFb-Medium	13
2.2.4	Vorkulturmedium (VK-Medium)	13
2.2.5	Kongorotagar	14
2.2.6	LB-Medium	14
2.2.7	Agarplatten zur Samenkeimung.....	14
2.2.8	MMM-Agarplatten	15
2.2.9	PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	15
2.2.10	Alkohol/PBS.....	16
2.2.11	Hoagland-Medium.....	16
2.2.12	Pflanzennährlösung.....	17
2.3	Bakterienanzucht	17
2.3.1	Stammhaltung.....	17
2.3.2	Vorkultur	18
2.3.3	Gesamtzellzahlbestimmung.....	18
2.3.4	Lebendkeimzahlbestimmung.....	18
2.4	Mykorrhizaanzucht	19
2.4.1	Extraktion von Sporen	19
2.4.2	Oberflächensterilisation von Sporen	20
2.5	Pflanzenanzucht.....	20
2.5.1	Oberflächensterilisation der Samen	20
2.5.2	Auskeimung der Samen.....	20
2.6	Gemeinsame Kultur von Pflanzen und Mikroorganismen	21
2.6.1	Kulturgefäße	21
2.6.2	Inokulation	23
2.6.3	Mykorrhizierung in Hydrokultur	24
2.6.4	Kulturbedingungen.....	24
2.7	Ernte.....	25
2.7.1	Ernte der Hydrokultur	25

2.7.2	Ernte der Topfkulturen	26
2.7.3	Bodenproben.....	26
2.7.4	Trockengewichtsbestimmung	26
2.8	Färbungen	27
2.8.1	Rutheniumrot und Acridinorange	27
2.8.2	Lebendfärbung mit TTC	27
2.8.3	Färbung von VA-Mykorrhiza.....	28
2.9	Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades	29
2.10	Proteinbestimmung.....	29
2.11	Gesamtstickstoffbestimmung	30
2.11.1	Semimikro-Kjeldahlaufschluss.....	30
2.11.2	Mikro-Kjeldahlaufschluss	31
2.11.3	Colorimetrische Ammoniumbestimmung.....	31
2.11.4	Berechnungen	32
2.11.5	Nitratbestimmung	33
2.12	¹⁵ N-Analyse.....	33
2.12.1	Probenaufbereitung	34
2.12.2	Messung	34
2.12.3	Isotopenverdünnung und Berechnung der BNF	34
2.13	Acetylenreduktionstest (ARA).....	35
2.14	Gewinnung von Antikörpern gegen <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	37
2.14.1	Gewinnung von Normalserum bei Kaninchen.....	37
2.14.2	Immunisierung.....	37
2.14.3	Gewinnung des Antiserums	38
2.14.4	Kolonieblot (IBA).....	38
2.14.5	Serumspezifitätstest.....	39
2.15	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	40
2.16	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	41
2.16.1	Probenaufbereitung	42
2.16.2	Markierung mit Antikörpern	43
2.16.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	44
2.16.4	DAPI-Färbung.....	45
2.17	Rasterelektronenmikroskopie	46
2.18	DNA-Analysen	46
2.18.1	PCR-Fingerprinting.....	46
2.18.2	SSCP-Analyse (<i>single-strand conformation polymorphism</i>)	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Grundlagen.....	48
3.1.1	Antiserumtests.....	48
3.1.1.1	IBA	48
3.1.1.2	Serumspezifitätstest.....	48
3.1.1.3	ELISA.....	49
3.1.2	Genotypisierung morphologisch abweichender Kolonien von <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	50
3.1.2.1	Exopolysaccharidbildung bei <i>Azoarcus</i> sp. BH72	50
3.1.2.2	DNA-Analysen von <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	51
3.1.3	Sauerstoffabhängige Nitrogenaseaktivität bei <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	52
3.1.4	Nitrogenaseaktivität von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in gemeinsamer Kultur mit Hirse	54

3.1.5	Untersuchung von VAM-Sporen auf diazotrophe Bakterien.....	55
3.1.6	Inokulation von Hirse und Mais mit <i>H. seropedicae</i> HS19 und verschiedenen VAM-Pilzen	56
3.2	Kolonisierung von Pflanzen durch diazotrophe Bakterien.....	57
3.2.1	Besiedlung von Hirse mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in Hydrokultur in Abhängigkeit vom Medium.....	57
3.2.2	Etablierung von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und pH-Wert-Entwicklung im Hydrokultur-Medium von Hirse und Reis.....	58
3.2.3	Zeitauflösung der Kolonisierung von Hirse durch <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in Hydrokultur.....	60
3.2.4	Besiedlung von Hirse mit <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67 bzw. <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 in Substratkultur	61
3.3	Kolonisierung von Pflanzen bei Mischinokulation.....	62
3.3.1	Besiedlung von Hirse und Reis mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67 in modifizierter Hydrokultur.....	62
3.3.2	VAM-Übertragung in Hydrokultur	65
3.3.3	Hirse mit VAM und <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in Hydrokultur	66
3.3.4	Hirse mit VAM und <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in modifizierter Hydrokultur.....	67
3.3.4.1	Nitrogenaseaktivität bei Interaktion mit VAM an Hirse	68
3.3.4.2	Vergleich mit Weizen: <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und VAM in modifizierter Hydrokultur	69
3.4	Biomasse und N-Bilanz in Hydrokultursystemen.....	70
3.4.1	Hirse und <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	70
3.4.2	Reis und <i>Azoarcus</i> sp. BH72.....	72
3.4.3	Weizen und <i>Azoarcus</i> sp. BH72	73
3.4.4	BNF durch <i>Azoarcus</i> sp. BH72 bei Hirse, Reis und Weizen.....	75
3.5	Experimente in Töpfen: Hirse mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und VA-Mykorrhizapilzen.....	76
3.5.1	Experimente	78
3.5.2	Kolonisierungsverhalten von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und VAM im Topfsystem.....	78
3.5.2.1	Bodenbesiedlung: Verteilung von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in Töpfen.....	78
3.5.2.2	Besiedlung von Hirse durch <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und VAM	80
3.5.3	Trockengewicht, N-Gehalt und BNF.....	84
3.6	Lokalisation von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 in der Rhizosphäre.....	88
3.6.1	Färbungen	88
3.6.2	Lokalisation durch Nitrogenaseaktivität.....	88
3.6.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	89
3.6.4	Rasterelektronenmikroskopie	89
3.6.5	Mikroskopische Aufnahmen	90
4	Diskussion	104
4.1	Grundlegendes	104
4.2	Interaktionen von diazotrophen Bakterien mit Nutzpflanzen.....	106
4.3	VAM und Interaktionen mit Hirse und <i>Azoarcus</i> sp. BH72	115
4.4	Gewächshausexperimente in Töpfen.....	119
5	Literatur	127
6	Anhang	139
6.1	Geräteliste	139
6.2	Lebenslauf	141

II. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABTS[®]	2, 2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6))
Apm	Anschläge pro Minute
ARA	Acetylenreduktionstest (<i>acetylene reduction assay</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BH72	<i>Azoarcus</i> sp. BH72
BNF	Biologische Stickstofffixierung (<i>biological nitrogen fixation</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cfu	Lebendkeimzahl (<i>colony forming units</i>)
DAPI	4', 6-Diamidino-phenylindol
DAR	Antikörper gegen Kaninchen aus Esel (<i>donkey-anti-rabbit</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMBRAPA-CNPAB	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia</i>
EPS	Exopolysaccharide
FG	Frischgewicht
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FLUOS[®]	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
GAR	Antikörper gegen Kaninchen aus Ziege (<i>goat-anti-rabbit</i>)
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
IBA	Kolonieblot (<i>immunobinding assay</i>)
JNFb	Medium nach Fábio Pedrosa, modifiziert von Johanna Döbereiner
kb	Kilobasen
LKZ	Lebendkeimzahl
LM	Lichtmikroskop
LSM	konfokales Laserscanning Mikroskop

mod.	modifiziert
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure
MPN	Wahrscheinlichste Keimzahl (<i>most probable number</i>)
n	Elemente einer Grundgesamtheit (Anzahl der Parallelen)
NA	Nähragar
NFb	neues Medium nach Fábio Pedrosa
OD₅₇₈	Optische Dichte bei $\lambda = 578$ nm photometrisch bestimmt
PBS	isotonischer Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
rDNA	DNA, die für ribosomale RNA (Ribonukleinsäure) codiert
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Einheit für Sedimentationskoeffizienten)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
TTC	2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Tween 20[®]	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U_{pm}	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i> , bei Prozentangaben)
VAM	vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
VK	Vorkultur
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i> , bei Prozentangaben)
ZahLE+05	Darstellung von Zehnerpotenzen in Grafiken. E gibt den positiven oder negativen Exponenten zur Basis 10 an (hier: Zahl $\cdot 10^5$).
σ	Standardabweichung einer Grundgesamtheit mit n Elementen
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

1 EINLEITUNG

1.1 Diazotrophie und Rhizosphäre

Die Fähigkeit zur Diazotrophie (von *di-* = gr. zwei, *azote* = frz. Stickstoff, herzu-leiten von *a-* = gr. nicht und *zoein* = gr. leben, *trophe* = gr. Ernährung) ist alleine verschiedenen prokaryontischen Mikroorganismen der Gruppen Gram-negativer und Gram-positiver Eubakterien und Archaeobakterien vorbehalten. Dieser Prozess ist im Stickstoffhaushalt der Erde von zentraler Bedeutung, da er den Stickstoffkreislauf durch Nutzbarmachung des in der Atmosphäre reichlich (78 %) vorkommenden Distickstoffs schließt. Der biologisch fixierte Stickstoff liegt zunächst in der Biomasse gebunden vor und wird durch den Abbau organischen Materials durch saprophytische Mikroorganismen mineralisiert und in Ammonium überführt (Ammonifikation). Durch Nitrifikation über Nitrit entsteht Nitrat, von dem ein nicht unerheblicher Teil durch Denitrifikation von Bodenmikroorganismen wieder als molekularer Stickstoff (N_2) an die Atmosphäre verloren geht. Die mineralischen Stickstoffformen Ammonium und Nitrat können von Pflanzen assimiliert werden (Rawn, 1989).

Die Reduktion von molekularem Luftstickstoff zu Ammonium katalysiert das Enzym Nitrogenase, welches von *nif*-Genen im Genom codiert ist, die phylogenetisch stark konserviert sind. Die beiden Untereinheiten des Enzyms, Dinitrogenase und Dinitrogenase-Reduktase, bestehen aus Eisenschwefelproteinen. Die Dinitrogenase-Untereinheit, an die das Substrat bindet, ist mit Molybdän oder in einigen *Azotobacter* spp. mit Vanadium als Zentralatom komplexiert (Postgate, 1987; Smith *et al.*, 1988). Die Strukturgene für die Nitrogenase *nifHDK* sind in einem Operon geclustert, für weitere Modifikationen der Proteine codieren *nifBENVQ* und *nifM* (Eady, 1992). Der Energie-aufwendige Prozess erfordert große Mengen an Mg-ATP (Postgate, 1987) und unterliegt einem komplexen Regelmechanismus (Mugnai *et al.*, 1994). Das Regulatorgen *nifA* produziert nur dann einen Aktivator für das *nif*-Operon, wenn das Repressorprotein von *nifL* die Transkription von *nifA* zulässt (Eady, 1992; Überblick bei Vande Broek und Vanderleyden, 1995). Ist eine leicht verfügbare Quelle an gebundenem Stickstoff (z. B. Ammonium) vorhanden, wird die Nitrogenase teilweise wie bei *Herbaspirillum* (Fu und Burris, 1989) oder vollständig wie bei *Azospirillum* (Gallori und Bazzicalupo, 1985; Hartmann *et al.*, 1986) gehemmt. Sauerstoff zerstört das Enzym und reprimiert auch die Neusynthese (Bothe *et al.*, 1983; Vande Broek *et al.*, 1996). Dieser Umstand verlangt von den Bakterien entsprechende Schutzstrategien, die maßgeblich deren Ökologie bestimmen.

Lange bekannt ist die Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen, die zu einer Wurzelknöllchenbildung führt, in denen der Sauerstoffpartialdruck durch besondere Symbioseleistungen (Bildung von Peribacteroidmembran und Leghämoglobin) reduziert ist und die stickstofffixierenden Bakterien angesiedelt sind (Richter, 1996). Eine andere, als Mikroaerophilie bezeichnete Strategie besteht in der Anpassung des bakteriellen Stoffwechsels an verringerte Sauerstoffpartialdrücke. Entsprechende Organismen suchen solche mikroaeroben Bereiche auf (Aerotaxis), in denen dem Schutz der Nitrogenase einerseits und einem aeroben Stoffwechsel andererseits Rechnung getragen wird (Döbereiner *et al.*, 1995a). Für *Azospirillum* wurden sogenannte C-Formen beschrieben (Krieg und Döbereiner, 1984). Der dicken Kapsel, die einzelne oder mehrere kokkoide Zellen umschließt, wird neben einer allgemeinen Schutz-

funktion gegen Austrocknung und Hitze auch ein Schutz gegen Sauerstoff zugeschrieben (Berg *et al.*, 1979). Möglicherweise dienen auch von *Azoarcus* ausgebildete sogenannte *Envelopes* diesem Zweck (Reinhold *et al.*, 1987; Reinhold-Hurek und Hurek, 1998b).

In der Rhizosphäre gibt es sehr unterschiedliche Bereiche, die eine Ansiedlung von diazotrophen Bakterien ermöglichen. Unter dem Begriff wird der von der Pflanzenwurzel beeinflusste Bereich verstanden, der sich in Exorhizosphäre, Rhizoplane oder Wurzeloberfläche und Endorhizosphäre bestehend aus Epidermis, Cortex und Endodermis der Wurzel, gliedert (Lynch, 1990). In einem wenig durchlüfteten Boden, beispielsweise einer Reisüberflutungskultur, herrschen anaerobe Verhältnisse, die die Existenz von frei lebenden diazotrophen Anaerobiern (z. B. *Clostridium*) erlauben. Es wird vermutet, dass die in der Rhizosphäre vorherrschenden Sauerstoffverhältnisse mit verringerter Sauerstoffdiffusion (Hubbel und Gaskins, 1984; Hurek *et al.*, 1987a) und eine Verarmung an gebundenem Stickstoff besonders die Ansiedlung von diazotrophen Mikroorganismen begünstigen (Patriquin *et al.*, 1983). Neben den vielfältigen chemisch-physikalischen Einflüssen auf die Rhizosphäre, die maßgeblich die Temperatur, den pH-Wert, Wasser- und Salzgehalt, das Redoxpotential und die Bodendurchlüftung bestimmen (Lynch, 1983), wirkt auch die Pflanze auf den ihre Wurzeln direkt umgebenden Boden ein. So beschrieb z. B. Marschner (1985) die unterschiedlichen Transportraten für Ionen und Wasser, was zu Konzentrationsunterschieden nicht nur zwischen Pflanze und Boden sondern auch innerhalb des Bodens führt. So ist es nicht verwunderlich, dass sich die chemische Beschaffenheit der Rhizosphäre deutlich von der des umgebenden Bodens unterscheidet (Foster *et al.*, 1983). Die bakterielle Besiedlung der Pflanze ist nicht flächendeckend, sondern in kleinen, räumlich voneinander getrennten Nischen (Bowen, 1980). Eine Unterscheidung von Rhizoplane und Endorhizosphäre kann auf Grund der Art der Isolierung vorgenommen werden; durch Oberflächensterilisation erhält man Bakterien der Endorhizosphäre, durch Waschen zusätzlich die an der Wurzeloberfläche adsorbierten Zellen (Giddens und Todd, 1984).

Die Mikroorganismen der Rhizosphäre sind auf eine Versorgung mit Energiequellen angewiesen, die von der Pflanze in Form von Wurzelexsudaten, Lysaten und Sekreten wie dem Mucigel der Wurzelspitze geliefert werden können. Außer Zuckern, Zuckeralkoholen, organischen Säuren und Vitaminen (Newman, 1985) geben Pflanzen Aminosäuren, Nucleotide und Enzyme ab (Rovira, 1965; Waschütza, 1993), die einen Gradienten von der Wurzel aus aufbauen. Durch Chemotaxis finden die Mikroorganismen zur Wurzel (Reinhold *et al.*, 1985) und treten in Konkurrenz um die Ressourcen in dieser ökologischen Nische (Romantschuk, 1992; Aßmus, 1996). Durch die Produktion von Bacteriocinen, wie sie für Azospirillen nachgewiesen wurde (Bashan, 1986), und das Ausweichen in das Innere der Pflanze (Döbereiner, 1992b) versuchen sie, sich dem Konkurrenzdruck zu entziehen.

Für *Azoarcus* sp. (Reinhold *et al.*, 1986), *Herbaspirillum* sp. (Baldani *et al.*, 1986) und *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante und Döbereiner, 1988) ist beschrieben, dass sie das Innere von verschiedenen Pflanzen besiedeln. In Anlehnung an Kloepper *et al.* (1992) werden sie als Endophyten bezeichnet (James und Olivares, 1997). Es wurde die Einteilung in zwei Gruppen vorgeschlagen: „obligate“ und „fakultative“ Endophyten. Zur ersten Gruppe werden solche Bakterien gezählt, die regelmäßig im Pflanzeninneren vorkommen wie die oben genannten, und nicht auf Dauer frei im Boden überleben können. Zur zweiten Gruppe werden z. B. Azospirillen gezählt, die aus dem Boden isoliert werden können, aber auch das Potential besitzen, in die Pflanze einzudringen (Baldani *et al.*, 1997). Reinhold-Hurek und Hurek

(1998a) ziehen hingegen den Terminus „opportunistische“ statt obligate Endophyten vor, da die genannten Bakterien nicht streng auf die Endorhizosphäre beschränkt sind, sondern auch auf der Wurzeloberfläche und in der Exorhizosphäre gefunden wurden.

Bisher ist wenig bekannt über Nitrogenaseaktivität von diesen Bakterien *in planta*. Eine Expression des Enzyms wurde für *Azoarcus* sp. BH72 in Kallargras (Hurek *et al.*, 1997a) und für *Herbaspirillum rubrisubalbicans* in Zuckerrohr (Olivares *et al.*, 1997) und Hirse (James *et al.*, 1997) nachgewiesen. Indirekt wurde eine Nitrogenaseaktivität zusammen mit der Pflanze vielfach mit Hilfe eines Acetylenreduktionstests gemessen, wobei die geringe Substratspezifität des Enzyms ausgenutzt wird (Hardy *et al.*, 1973). Die Methode ist auch im Feld anwendbar und führte in der Vergangenheit zur Entdeckung einiger Assoziationen von diazotrophen Bakterien mit tropischen Gräsern (Watanabe *et al.*, 1981; Malik *et al.*, 1980; Alexander und Zuberer, 1989a). Eine Quantifizierung der Enzymaktivität ist jedoch durch das indirekte Messprinzip problematisch (Lee und Watanabe, 1977; Trolldenier, 1984). Selbst wenn die Nitrogenase aktiv ist, ist noch kein Beweis erbracht, dass fixierter Stickstoff abgegeben wird und die Pflanze einen Nutzen davon hat (James und Olivares, 1997). Eine Mutante von *Azospirillum brasilense* mit konstitutiver Nitrogenase-Expression gibt zwar Stickstoff in Form von Ammonium ab (Christiansen-Weniger, 1992), doch lässt dies keine Aussage bezüglich der Wildtypen im Feld zu. Darüber hinaus ist diese Mutante durch die permanent ausgeführte extrem Energiezehrende Stickstofffixierung nicht konkurrenzfähig.

Hinweise auf eine Stickstoffübertragung vom Bakterium auf die Wirtspflanze liefert die ^{15}N -Isotopenverdünnungsmethode, die zum ersten Mal von Newton *et al.* (1953) bei *Azotobacter* angewandt wurde. Die Pflanze wächst im Boden, der gebundenen, mit dem stabilen Isotop ^{15}N markierten Stickstoff enthält und assimiliert ihn. Wird von diazotrophen Bakterien fixierter unmarkierter Luftstickstoff von der Pflanze aufgenommen, senkt dieser ihren ^{15}N -Gehalt. Aus dem Isotopenverhältnis und durch Vergleich mit einer geeigneten Kontrolle kann der Anteil des in der Pflanze inkorporierten Stickstoffs, der aus der biologischen Fixierung stammt, berechnet werden. Urquiaga *et al.* (1992) wiesen mit dieser Technik eine Stickstoffübertragung bei Zuckerrohr durch *Acetobacter diazotrophicus* nach und Boddey und Victoria (1986) haben für *Brachiaria decumbens* einen Wert von 40 % ermittelt (für weitere Beispiele s. Boddey und Döbereiner, 1988; Boddey *et al.*, 1995). Den endophytischen Bakterien kommt in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung zu, da hier ein Nutzen für die Pflanze am wahrscheinlichsten ist (Döbereiner, 1997; James und Olivares, 1997).

1.2 Assoziationen und Symbiosen

Die diazotrophen Bakterien lassen sich an Hand ihrer Ökologie in symbiontische und assoziative Stickstofffixierer einteilen. Rhizobien und Actinomyceten (z. B. *Frankia*) gehen Symbiosen mit Leguminosen bzw. Gehölzen der Gattungen *Alnus*, *Casuarina* und anderen ein. Wie oben erwähnt, kommt es als Konsequenz zu auffälligen Knöllchenbildungen der Wurzeln. Eine enge Lebensgemeinschaft verschiedener Organismen, in der es im Gegensatz zur Symbiose nicht zur Ausbildung von speziellen Strukturen oder Leistungen kommt, wird als Assoziation bezeichnet.

Seit der Beschreibung von hohen Stickstofffixierungsraten bei tropischen Gräsern (Döbereiner *et al.*, 1972) haben Assoziationen von diazotrophen Bakterien mit Nutzpflanzen in der Forschung immer mehr Interesse gefunden. Obwohl von sehr vielen Nutzgräsern stickstofffixierende Bakterien aus verschiedenen Gattungen isoliert wurden (Übersicht bei Kloepper und Beauchamp, 1992), ist nicht bekannt, ob die natürlichen Assoziationen auch die effektivsten sind. Eine absolute Spezifität ist nur in einigen Fällen gegeben; z. B. ist *Azotobacter paspali* spezifisch für *Paspalum notatum* und *Acetobacter diazotrophicus* für vegetativ vermehrte Nutzpflanzen wie Zuckerrohr und Süßkartoffel (Döbereiner, 1970; Döbereiner *et al.*, 1995b). Ein positiver Einfluss von diazotrophen Mikroorganismen auf Pflanzen wurde vielfach beschrieben (Tien *et al.*, 1979; Baldani und Döbereiner, 1980; Okon und Kapulnik, 1986), obwohl direkte Beweise einer Förderung speziell durch die Stickstofffixierung noch ausstehen (James und Olivares, 1997).

Azoarcus spp. sind strikt aerobe diazotrophe Stäbchen, die zur β -Untergruppe der *Proteobacteria* gehören (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Die meisten der Stämme der fünf Arten (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998b) wurden von Wurzeln und aus Sprossen von Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) isoliert (Reinhold *et al.*, 1986), einem Futtergras, das als Pionierpflanze auf nährstoffarmen salzhaltigen Überflutungsböden in Pakistan angebaut wird und ohne Stickstoffdüngung wächst (Malik *et al.*, 1986). Der Stamm BH72 besiedelt natürlicherweise das Innere des Kallargras und bei Inokulation im Labor auch Reis, ohne phytopathogene Symptome hervorzurufen (Hurek *et al.*, 1994b). Der erste Schritt bei der Besiedlung ist das Anheften an die Wurzeloberfläche, wobei Typ IV Pili beteiligt sein sollen (Reinhold-Hurek, pers. Mitteilung). Bevorzugte Eindringorte sind die Elongations- und die Differenzierungszone der Wurzelspitze und vermutlich die Ausbruchstellen entstehender Seitenwurzeln (Reinhold und Hurek, 1988b). Von dort aus penetriert *Azoarcus* sp. BH72 in den Cortex und weiter bis ins Xylem, welches das Ausbreiten bis in die oberirdischen Pflanzenteile ermöglicht (Hurek *et al.*, 1994b). *Azoarcus* sp. BH72 verfügt über verschiedene Cellulasen und Pectinasen und da *Azoarcus* sp. BH72 die entsprechenden Spaltprodukte nicht assimilieren kann, wird vermutet, dass die Enzyme hauptsächlich der Penetration von pflanzlichen Zellwänden dienen (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993a; Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b; Reinhold-Hurek und Hurek, 1998a). In der Wirtspflanze Kallargras wurde *Azoarcus* sp. BH72 extrazellulär im Aerenchym in dichten kugelförmigen Aggregaten lokalisiert, die von einem bakteriellen *Envelope* umgeben sind (Reinhold *et al.*, 1987). Wie oben erwähnt, wird eine Schutzfunktion gegen Sauerstoff für diese Kapsel diskutiert. Es wird auch die Frage aufgeworfen, wie diese Zellen mit Nährstoffen versorgt werden, wenn sie nicht in lebenden Pflanzenzellen angesiedelt sind (Hurek *et al.*, 1994b). Die Expression von *nif*-Genen bei im Cortex lokalisierten Bakterien durch *in-situ*-Hybridisierung (Hurek *et al.*, 1997) zeige, dass die Bakterien aktiv sind und folglich vom apoplastischen Nährstofftransport partizipieren (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998a).

Für zehn Isolate der Gattung *Azoarcus* wurde eine Assoziation mit einem Basidiomyceten beschrieben. In einem ehemaligen Kallargrasfeld, wurden bei Überdauerungsformen (Sklerotien) dieses Pilzes spezifische PCR-Fingerprintmuster von *Azoarcus* gefunden, die aber nicht mit denen von Stamm BH72 identisch waren. Die Isolate wurden z. T. einer neuen Gruppe zugeordnet. Dieser Assoziation wird eine besondere Rolle bei der Überdauerung endophytischer *Azoarcus*-Stämme im Boden und der Neuinfektion von Wirtspflanzen zugeschrieben (Hurek *et al.*, 1997b). Inokulationsversuche mit den Sklerotien wurden noch nicht durchgeführt.

Ein anderer Pilz, ein Ascomycet, aus dem Kallargrasfeld wurde für gemischte Batch-Kulturen mit *Azoarcus* sp. BH72 eingesetzt (Hurek *et al.*, 1995). Diese herbeigeführte Assoziation rief Veränderungen bei beiden Mikroorganismen hervor. Die Bakterien waren physiologisch und morphologisch modifiziert, Bakterium und Pilz zeigten leicht veränderte Proteinstmuster in der Mischkultur (Karg und Reinhold-Hurek, 1996). *Azoarcus* sp. BH72 profitierte vom Pilz durch abgegebenes Substrat, da dem Medium nur Glucose beigegeben wurde, die *Azoarcus* sp. BH72 nicht verwerten kann (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Durch die hohe Atmungsaktivität des Pilzes wurde der Sauerstoffpartialdruck extrem gesenkt, so dass *Azoarcus* sp. BH72 in einen sogenannten hyperinduzierten Zustand mit erhöhter Stickstofffixierungs- und Respirationsrate überging. Es wurden spezielle intrazelluläre Membranstapel gebildet, die von Hurek *et al.* (1995) als Diazosomen bezeichnet wurden und welche mit der Stickstofffixierung in einer noch nicht näher charakterisierten Weise gekoppelt sind. Die Stickstofffixierung wurde zwar verstärkt, aber es wurde vermutet, dass die Zellteilung durch die Ausbildung von Diazosomen behindert wird (Hurek *et al.*, 1995). Ob diese spezielle Leistung eine ökologische Bedeutung hat, ist unbekannt; sie wurde bislang nur im Laborexperiment beobachtet.

Herbaspirillum seropedicae, aus der β -Untergruppe der *Proteobacteria*, wurde ursprünglich aus Mais (Baldani *et al.*, 1986), später aus weiteren tropischen Gramineen wie Reis, Hirse, Kamerungras (*Pennisetum purpureum*) und Zuckerrohr isoliert (Olivares *et al.*, 1996). Das Bakterium kann nicht im wurzelfreien Boden überleben (Olivares *et al.*, 1996) und wird durch Stecklingsvermehrung der Wirtspflanzen und möglicherweise auch durch deren Samen verbreitet (Döbereiner *et al.*, 1995b). Es kann am besten auf organischen Säuren und Glucose wachsen. Über die Sauerstofftoleranz unter Stickstofffixierungsbedingungen wird diskutiert: Bei einer Sauerstoffkonzentration von 3 % gehen Baldani *et al.* (1986) von einer relativ hohen Toleranz aus, während Vande Broek *et al.* (1996) es zusammen mit *Azospirillum* spp. und *Acetobacter diazotrophicus* als nicht tolerant einstufen. Die Stickstofffixierungsrate wird mit der von *Azospirillum* verglichen (Pimentel *et al.*, 1991) und die Aktivität wird durch gebundenen Stickstoff wie Ammonium, Glutamat und Asparagin nur teilweise gehemmt (Fu und Burris, 1989). Es wird angenommen, dass *H. seropedicae* durch Verletzungen der Wurzel wie z. B. an Seitenwurzelemargen eindringt, bis ins Protoxylem der Wirtspflanze wandert und Zellen sowie Interzellularräume des Cortex besiedelt (James und Olivares, 1997). Im Gegensatz zu Zuckerrohr wurde bei Hirse auch die Kolonisierung von Blättern beobachtet (Olivares *et al.*, 1997; Übersicht bei Döbereiner *et al.*, 1995b).

Die Gattung *Azospirillum* wurde von Tarrand *et al.* (1978) beschrieben und gehört zur α -Unterklasse der Proteobakterien. Vertreter wurden vorwiegend aus der Rhizosphäre von vielen tropischen und subtropischen Gräsern wie Zuckerrohr, Reis, Mais, Hirse, Kallargras und Weizen isoliert (Patriquin *et al.*, 1983; Okon und Kapulnik, 1986), mit denen sie Assoziationen eingehen. Bezüglich des Besiedlungsverhaltens gibt es stammspezifische Unterschiede; z. B. ist *A. brasilense* Sp245 in der Lage, in Weizenwurzeln einzudringen, Stamm Sp7 hingegen nicht (Schloter *et al.*, 1994; Aßmus *et al.*, 1995). Man rechnet *Azospirillum* zur ökologischen Gruppe der *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR; Kloepper *et al.*, 1992), da sie auf assoziierte Pflanzen positive Wachstumseffekte ausüben (Okon und Vanderleyden, 1997). Die Effekte beruhen auf der Stickstofffixierung, der Nitratreduktion (Eskew *et al.*, 1977), der Produktion von Phytohormonen (Hartmann *et al.*, 1983) und Siderophoren, einer Verbesserung der Wasseraufnahme und der Nährstoffnutzung (Okon und Vanderleyden, 1997) sowie möglicher-

weise einer Verdrängung phytopathogener Mikroorganismen durch Bacteriocine und bakteriell produziertes HCN (Weller, 1988; Okon und Vanderleyden, 1997). Es gibt auch schon Produktionen von Inokulum unter anderen mit *Azospirillum* für Anwendungen als „Biodünger“ auf dem Feld mit vielversprechenden Namen wie 'Azogreen' und 'Biopower' (Okon und Vanderleyden, 1997; Hassan et al., 1996).

Es wurde bereits erwähnt, dass diazotrophe Bakterien Assoziationen mit Hirse eingehen. Damit sind hier im engeren Sinn Vertreter der *Sorghum*-Hirsen (Mohrenhirse, engl. *sorghum*) gemeint, die als *S. bicolor* (L.) Moench zusammengefasst werden. Im deutschen Sprachgebrauch werden die Gattungen *Panicum*, *Setaria* (engl. *millet*), *Digitaria* und *Pennisetum* (engl. *pearl millet*) als Gramineen mit kleinen rundlichen Körnern mit eingeschlossen. Als Kulturpflanze wurde *Sorghum* bereits 5000 Jahre v. Chr. im nordöstlichen Afrika angebaut und ist heute im gesamten Bereich der Tropen und Subtropen zu finden (Franke, 1994). Der Anteil an der Gesamtgetreideproduktion liegt in Asien bei 35 %, weltweit bei 2 %. Als C₄-Pflanze ist *Sorghum* gut an semiaride Gebiete mit Durchschnittstemperaturen von 27–32 °C, hohen Sonneneinstrahlungen, kurzen Tageslängen (Kurztagpflanze) angepasst und bezüglich der Bodenverhältnisse anspruchslos (Franke, 1994). Daher ist sie besonders in Entwicklungsländern von großer Bedeutung. Neben der Nutzung als Viehfutter werden aus den Samen Mehlprodukte, Stärke, Dextrose, Alkohol, Öl und Wachs gewonnen. Manche Varietäten (Zuckerhirse) zeichnen sich durch einen besonders hohen Zuckergehalt aus (Geisler, 1991).

Da *Sorghum* Assoziationen mit diazotrophen Bakterien eingeht, wurden zahlreiche Inokulationsversuche mit *Azospirillum* (Pacovsky, 1990), *Herbaspirillum* (Pereira et al., 1988) und *Acetobacter diazotrophicus* (Paula et al., 1991) durchgeführt, und dabei wurden positive Wachstumseffekte und verbesserte Erträge sowie erhöhte Stickstoffkonzentrationen erzielt (Pereira et al., 1988; Pacovsky, 1990).

Reis (*Oryza sativa* L.) ist neben Mais (*Zea mays* L.) und Hirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) die maßgebliche Getreideart der Tropen und Subtropen und dient fast zwei Dritteln der Menschheit als Hauptnahrungsquelle, vor allem in Ländern der Dritten Welt (Wittwer, 1977). Mit den zwei verschiedenen Anbauweisen als Überflutungs- (*paddy rice culture*) und als Trockenkultur unterscheiden sich die Rhizosphäreneigenschaften, insbesondere in Bezug auf die Sauerstoffversorgung (Gambrell und Patrick, 1978). Reis ist eine einjährige C₄-Kurztagpflanze, die wie Kallargras in Überflutungskultur ein Aerenchym ausbildet, das im Wurzelbereich für stabile Sauerstoffverhältnisse sorgt, und auch den Austausch von Stickstoffgas und Methan erleichtert (Ueckert, 1988). Viele der assoziierten Rhizosphärenbakterien sind mikroaerobe Stickstofffixierer, von denen mit *Azospirillum*, *Herbaspirillum* und *Pseudomonas* nur wenige genannt sind (Krieg und Hoffmann, 1986). Eine Besonderheit der Überflutungskultur stellt die Symbiose des Cyanobakteriums *Anabaena azollae* mit dem Wasserfarn *Azolla* dar, die große Mengen Stickstoff in die Felder einträgt und damit fast den ganzen Bedarf decken kann (Schlegel, 1992). In tropischen Regionen wirken sich die Temperaturverhältnisse im Vergleich zu den gemäßigten Zonen begünstigend auf die Stickstofffixierung aus (Döbereiner, 1992a). Gerade in ärmeren Ländern wäre eine Reduzierung von teuren Düngemitteln wünschenswert.

Mit Weizen (*Triticum aestivum* L.) wurde in der vorliegenden Arbeit eine C₃-Pflanze hinzugenommen. Weizen wird in fast allen Ländern der Welt angebaut und ist das Getreide mit der

größten Massenproduktion (Geisler, 1991). Stickstoffdüngung wirkt ertragssteigernd, weshalb Weizenfelder mit bis zu 180 kg N/ha gedüngt werden (Franke, 1994).

Bei der vesikulären-arbuskulären (VA-)Mykorrhiza handelt es sich um eine mutualistische Wurzel-Pilz Symbiose, die über 80 % aller Pflanzenspezies ungeachtet ihrer Verbreitung und Häufigkeit mit nur drei Pilzfamilien eingehen. Zur Familie der *Glomaceae* gehören die Gattungen *Glomus* und *Sclerocystis*, zu den *Acaulosporaceae* gehören *Acaulospora* und *Entrophospora* und zur Familie der *Gigasporaceae* werden *Gigaspora* und *Scutellispora* gezählt (Wilcox, 1996). Während der langen Co-Evolution haben sich zwischen den beiden Symbiosepartnern mannigfaltige Abhängigkeiten herausgebildet, so dass der Pilz nicht ohne eine Pflanze kultiviert werden kann. Bisher sind sie besonders in ihrem Zusammenwirken und ihrer ökologischen Bedeutung nur unvollständig verstanden. So werden unter anderem die am Zustandekommen und an der Funktion der Symbiose beteiligten Gene untersucht (Gianinazzi, 1991).

VA-Mykorrhizapilze bilden keinen Mantel um die Wurzeln wie die Ektomykorrhiza, sondern die Hyphen penetrieren den Cortex und dringen bis zur Endodermis vor. Die eigentliche Wurzelstruktur wird kaum verändert, die Hyphen laufen in den Interzellularen entlang der gesamten Länge. In den Wurzelzellen bilden sich bäumchenartige Strukturen (Arbuskel) und Vesikel aus, die lichtmikroskopisch gut erkennbar sind (Bonfante-Fasolo, 1984). Der C-heterotrophe Pilz wird von der Pflanze mit Kohlenhydraten versorgt (Bethlenfalvay *et al.*, 1982) und trägt im Gegenzug zum Nährstoffhaushalt bei. Durch die vergrößerte resorbierende Oberfläche der Mykorrhiza wird besonders der Massenfluss von anorganischen Ionen verbessert. Bekannt sind Aufnahme und Transport der Elemente Phosphor, Schwefel, Kupfer, Zink, Calcium, Stickstoff, Kalium und Strontium durch das weit verzweigte Hyphennetz (Harley und Smith, 1983). Darüber hinaus können schwer lösliche oder in geringen Konzentrationen vorliegende Nährstoffe verfügbar gemacht (Barber, 1971; Reid, 1990) und organisches Material abgebaut werden. Die dabei frei werdenden Stickstoffverbindungen können durch erhöhte Aktivitäten von Glutaminsynthetase und Glutamatdehydrogenase in verstärktem Maße aufgenommen werden (Smith *et al.*, 1985). Der Erfolg einer VAM-Inokulation bei Kulturpflanzen hängt sehr stark von den äußeren Bedingungen wie Nährstoffangebot, Vorhandensein anderer Bodenorganismen und Art der Inokulierung (Sporen, infizierte Wurzelstücke) ab und wird maßgeblich von der Kombination Pflanze-Pilz bestimmt, obwohl ausgeprägte Spezifitäten selten sind (Powell, 1984; Dhillon, 1992). Interessant wäre eine Anwendung von VA-Mykorrhizapilzen im Feldmaßstab (Marschner, 1986). Dazu liegen auch bereits positive Berichte vor (Baltruschat, 1987), doch würde eine routinemäßige Anwendung durch die für jeden Einzelfall geforderte Selektionierung besonders effektiver Isolate erschwert werden.

Da VA-Mykorrhizapilze an ein weites Spektrum von Umweltbedingungen angepasst sind (Stahl und Christensen, 1991), können sie ihren Wirtspflanzen erhöhte Stressresistenz vermitteln. Zu Trockenstress und Wasserhaushalt mykorrhizierter Pflanzen liegt eine große Zahl von Untersuchungen vor (Allen und Boosalis, 1983; Bethlenfalvay *et al.*, 1988; Sylvia und Williams, 1992). Der geringere Befall mit bodenbürtigen Schadpilzen und Nematoden ist ebenfalls ausführlich beschrieben (Schönbeck *et al.*, 1993). Gesteigerte Biomasseerträge, Samenproduktion und Photosyntheseraten wurden als Folge beobachtet (Hayman, 1974; Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988).

Pacovsky *et al.* (1985) brachten als dritten Partner das diazotrophe Bakterium *Azospirillum* in eine Lebensgemeinschaft von Hirse und Mykorrhizapilz ein. Es wurden positive Effekte auf die pflanzliche Biomasse beobachtet, aber in einigen Fällen wurden auch unerwünschte Ergebnisse wie die Reduktion des Stickstoffgehalts beschrieben. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die VA-Mykorrhiza Symbiose durch diazotrophe Bakterien positiv beeinflusst werden kann (Pacovsky, 1989a, 1989b, 1989c; Ho, 1988; Paula *et al.*, 1992). Am Beispiel von verschiedenen Rhizobienstämmen mit VA-Mykorrhizapilzen wurden signifikante Wachstumseffekte auf die Wirtspflanzen beschrieben (Azcón, 1989; Azcón *et al.*, 1991). Es ist vorstellbar, dass der positive Einfluss der Bakterien auf die Keimung von Sporen ein Grund für die verstärkte Mykorrhizierung ist (Tilak *et al.*, 1989). Paula *et al.* (1991) zeigten, dass die Besiedlung von Zuckerrohr durch *Acetobacter diazotrophicus* durch VAM gesteigert werden kann. Die Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung aller drei Organismen sind noch weitgehend unbekannt. Von Spekulationen über Modifizierung von Wurzelexsudaten, ein erleichtertes Eindringen der Bakterien zusammen mit dem Pilz, Produktion von wachstumssteigernden Faktoren und Nährstoffmobilisierung wird berichtet (Garbaye, 1991).

Einige VA-Mykorrhizapilze bilden Sporen im Inneren der Wurzel, so auch *Glomus intraradices*. Die weiß bis gelbbraun gefärbten Sporen sind sehr variabel geformt, mit einem Durchmesser von 40–140 μm . Im Gegensatz zu anderen VA-Mykorrhizapilzen können die normalerweise endständigen Vesikel zu Sporen differenzieren. *G. intraradices* mykorrhiziert unter anderem *Sorghum*, Mais und Klee, und in älteren Wurzeln wird ein ausgedehntes Hyphengeflecht mit wenigen Arbuskeln beobachtet (Biermann und Linderman, 1983; INVAM, 1999).

Durch die Komplexität des Agroökosystems bestehen noch immer große Wissenslücken bezüglich Etablierung, Funktion und möglicher anthropogener Einflussnahme auf Symbiosen und Assoziationen (Zuberer, 1990). Durch die geringe Spezifität der Assoziationen von diazotrophen Bakterien bzw. den VA-Mykorrhizapilzen mit Gräsern besteht die Möglichkeit, den mikrobiellen Partner eines gut funktionierenden Systems auf eine andere Pflanze zu übertragen und damit dessen Wirtsspektrum zu erweitern. Dabei kann es unter Umständen wie bei Pathogenbefall zu einer hypersensitiven Reaktion der Nicht-Wirtspflanze kommen, wenn die Bakterien auf nicht natürliche Weise durch Injektion eingebracht werden (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998a). Auch bei einem hohen Potential der einzelnen Organismen resultiert aus dem komplizierten Zusammenspiel der Partner nicht in jedem Fall eine nutzbringende Assoziation. Darüber hinaus ist es stets problematisch, Erkenntnisse von einem reduzierten *in-vitro*-System, in dem sich einzelne Parameter gezielt variieren lassen, auf die Verhältnisse „im Feld“ zu übertragen.

1.3 Problemstellung

Diazotrophe Bakterien kommen in enger Lebensgemeinschaft mit vielen Nutzpflanzen vor (Baldani und Döbereiner, 1980; Okon und Kapulnik, 1986). Durch diese Assoziation soll die Lebensfähigkeit der Wirtspflanzen unter anderem durch eine verbesserte Versorgung mit Stickstoff gesteigert werden (Köhler, 1985; Döbereiner, 1992a; Urquiaga *et al.*, 1992). Im natür-

lichen Habitat von *Azoarcus* sp. wird die Futterpflanze Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) auf extremen Böden ohne Stickstoffdüngung angebaut (Malik *et al.*, 1986). Aus ihr wurde *Azoarcus* sp. BH72 erstmals isoliert, der dort nicht im freien Boden gefunden werden konnte (Reinhold *et al.*, 1986). Als Endophyt wird das Bakterium durch die Stecklingsvermehrung auf die nächste Kallargrasgeneration übertragen (Reinhold *et al.*, 1986). Aus Laborversuchen ist bekannt, dass *Azoarcus* sp. BH72 in der Lage ist, durch cellulolytische Enzyme aktiv die Wurzeln zu penetrieren (Reinhold und Hurek, 1988a; Reinhold-Hurek *et al.*, 1993a). Im Dissertationsvorhaben sollte das Wirtsspektrum von *Azoarcus* sp. BH72 auf ernährungsrelevante Nutzpflanzen erweitert werden. Es musste eine Pflanze gefunden werden, die durch ihre Ökologie geeignet ist, eine Assoziation mit dem Bakterium einzugehen, und die auch im natürlichen Lebensraum von Nutzen sein kann.

Die Besiedlung von Nutzpflanzen mit *Azoarcus* sp. BH72 sollte demonstriert und die genaue Lokalisation *in situ* dokumentiert werden. Dazu gehörte als Grundlage die Entwicklung einer eindeutigen Identifizierungsmöglichkeit mit Hilfe von Antikörpern. Durch Vergleiche mit einem fakultativen und einem ebenfalls obligat endophytischen diazotrophen Bakterium (Patriquin *et al.*, 1983; Baldani *et al.*, 1986) sollte das Besiedlungspotential von *Azoarcus* sp. BH72 abgeschätzt werden.

Im Chemostaten wurden mit *Azoarcus* sp. hohe Stickstofffixierungsraten erzielt, die die Vermutung nahe legen, dass diese Bakterien zur Nährstoffversorgung der Kulturpflanze beitragen können (Hurek *et al.*, 1994a). Die Nitrogenaseaktivität sollte nun in Assoziation mit Wirtspflanzen ermittelt werden. Auch der Eintrag von fixiertem Luftstickstoff in die Pflanze, zu dem bisher keine Untersuchungen durchgeführt worden sind, war Ziel der Untersuchungen. Mit der ¹⁵N-Isotopenverdünnungsmethode ist es möglich, eine Übertragung des Stickstoffs nachzuweisen und zu quantifizieren (Boddey, 1987). Daneben kann mit indirekten Methoden eine Aktivität der Nitrogenase auch bei gemeinsamer Kultivierung mit der Pflanze gemessen werden (Hardy *et al.*, 1973; Patriquin und Döbereiner, 1978).

Vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze, von denen die meisten Pflanzen besiedelt sein können, fördern die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden und greifen auf vielfältige Weise in die Entwicklung ihrer Wirtspflanzen ein (Reid, 1990). An Modellsystemen mit VA-Mykorrhiza, diazotrophen Bakterien (*Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp.) und Nutzpflanzen wie Hirse, Mais und Süßkartoffel wurde gezeigt, dass Mykorrhiza auch als Vektor bei der gezielten Einschleusung der Bakterien dienen kann (Pacovsky, 1989a, 1989b; Paula *et al.*, 1991). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen geeigneten VAM-Pilz zu finden und damit eine Drei-Organismen-Lebensgemeinschaft mit *Azoarcus* sp. BH72, Kulturpflanze und VA-Mykorrhiza zu etablieren. Dafür sollte ein System entwickelt werden, das die Kultivierung unter mikrobiologisch kontrollierten Bedingungen außerhalb einer Klimakammer erlaubte. Die geeigneten Kulturparameter wurden vorab in reinen *in-vitro*-Experimenten ermittelt.

Ein vermuteter Nutzeffekt der Lebensgemeinschaft für die Kulturpflanze sollte an Hand der Biomasse und des Stickstoffgehalts dargestellt werden. Besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, ob ein Synergismus zwischen den Partnern im Hinblick auf die Besiedlung der Mikroorganismen und deren Wirkung auf die Pflanze existiert. Auch sollte die kontrovers diskutierte Frage geklärt werden, ob durch die Beteiligung von VAM-Pilzen der Stickstofftransfer vom Bakterium zur Pflanze erhöht wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

***Azoarcus* sp. BH72**

Endophytisches, mikroaerophiles Stäbchen, das aus der Rhizosphäre von Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) isoliert wurde (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Für die Überlassung dieses speziellen Stammes danke ich besonders Dr. Barbara Reinhold-Hurek, Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Spontanmutante eingesetzt, die gegen das Antibiotikum Rifampicin-resistent ist. Bis zu 30 µg/ml werden in semisolid-NFb-Medium toleriert. Sie wurde von Dr. Éva Kárpáti am Institut für Biophysik selektiert.

Weitere verwendete Bakterien und deren Herkunft:

<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	ATCC 35897, J. Döbereiner EMBRAPA-CNPAB
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HS19	Dr. Fábio L. Olivares EMBRAPA-CNPAB
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Dr. Johanna Döbereiner EMBRAPA-CNPAB
<i>Azoarcus indigenus</i> VB32	Dr. Barbara Reinhold-Hurek Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie
<i>Burkholderia solana-cearum</i>	DSM 50905, Dr. Anton Hartmann Institut für Bodenökologie, GSF
<i>Comamonas (Pseudomonas) testosteroni</i>	DSM 1622, Dr. Anton Hartmann Institut für Bodenökologie, GSF
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Dipl.-Biol. Rüdiger Stanke, Institut für Biophysik, Universität Hannover

2.1.2 Vesikulär-arbuskuläre Mykorrhizapilze (VAM)

***Glomus intraradices* Isolat 49**

Das Inokulationsmaterial wurde von Dr. Sigrid Land, Institut für Phytopathologie, Universität Hannover, in Schweden isoliert und wird als schnell und gut verpilzend und phosphatfördernd beschrieben (pers. Mitteilung). Die Sporen sind gelb und haben einen Durchmesser von durchschnittlich 82,2 µm.

Weitere verwendete Mykorrhizapilze und deren Herkunft:

<i>Glomus fasciculatum</i>	H. von Alten, Institut für Phytopathologie
<i>Glomus clarum</i>	M. de Paula, EMBRAPA-CNPAB, Brasilien
<i>Glomus etunicatum</i>	M. de Paula, EMBRAPA-CNPAB, Brasilien
<i>Gigaspora margarita</i>	M. de Paula, EMBRAPA-CNPAB, Brasilien

2.1.3 Pflanzen

Hirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench var. 'beefbuilder')

Die Samen wurden von Prof. Dr. Maddalena Del Gallo, ENEA-Casaccia, Rom, Italien, zur Verfügung gestellt. In Brasilien wurden Versuche mit der brasilianischen Varietät 'BR303' durchgeführt (EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, R. J., Brasilien).

Reis (*Oryza sativa* L.)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Variante 'Dae-Chung' aus Che-Ju, Korea, gearbeitet. Das Material wurde einer eigenen Nachzucht entnommen, die mit 10 atom% ¹⁵N angereichertem Stickstoff gedüngt wurde. Für Versuche in Brasilien stand die Variante 'Guarani' zur Verfügung.

Weizen (*Triticum aestivum* L. var. 'Syros')

Der Sommerweizen, stammte von J. Wilding, Bioland-Vertragswirt, Garbsen, OT Horst. Er wurde im Rahmen der Diplomarbeit eingesetzt, die von Gabriele Wieland (Institut für Biophysik, 1997) unter Anleitung der Verfasserin erstellt wurde.

Mais (*Zea mays* L.)

Die Samen einer brasilianischen Varietät von Zuckermais wurden für die Versuche in Brasilien vom EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, R. J., Brasilien zur Verfügung gestellt.

2.2 Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Merck mit der Reinheitsstufe „zur Analyse (p. A.)“ verwendet. Das mit H₂O bezeichnete Wasser stammte aus einer Doppeldestillieranlage oder aus einer Filtrierapparatur mit Umkehrosmose.

Die Medien wurden unter Standardbedingungen bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert, bzw. empfindliche Teilbestandteile wurden sterilfiltriert (hydrophile Einmalsterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Sartorius).

2.2.1 Nähragar (NA)

Nähragar (Fertignährboden, Merck Nr. 5450)	20,0	g/l
H ₂ O	1,0	l
Zusatz für die Rifampicin-resistente Mutante von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 (nicht autoklaviert):		
Rifampicin (2,5 % w/v in DMSO; Serva)	20	µg/ml

2.2.2 NFb-Medium

(Döbereiner, 1980, mod.)

DL-Malat	5,0	g/l
KOH	4,5	g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	g/l
NaCl	0,1	g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02	g/l
H ₃ BO ₃	2,80	mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	2,35	mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,00	mg/l
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,24	mg/l
Biotin (Vitamin H), sterilfiltriert	0,1	mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08	mg/l
Fe-EDTA (0,66 % w/v in H ₂ O)	10,0	ml/l
Bromthymolblau (0,5 % w/v in 0,2 N KOH)	2,0	ml/l
K ₂ HPO ₄	0,7	g/l
KH ₂ PO ₄	0,5	g/l
H ₂ O	ad 1,0	l
pH-Wert	6,8	
semisolid-Agar: Zusatz von		
Bacto-Agar (Difco)	1,8	g/l
Zusatz für die Rifampicin-resistente Mutante von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 (nicht autoklaviert):		
Rifampicin (2,5 % w/v in DMSO; Serva)	10	µg/ml
Agarplatten: Zusatz von		
Hefeextrakt	20	mg/l
Bacto-Agar (Difco)	15	g/l

Mikroaerophile diazotrophe Bakterien (*Azoarcus* sp., *Herbaspirillum*, *Azospirillum*) haben die Eigenschaft, in halbfestem (semisolid) stickstofffreiem Medium unterhalb der Agaroberfläche ein Pellicle (Bande) zu bilden (vgl. 2.3.1). Dieses Charakteristikum diente als Identifizierungsmerkmal.

2.2.3 JNFb-Medium

(Döbereiner et al., 1995a)

NFb-Medium (2.2.2) mit Modifikation des Phosphatpuffers:		
K ₂ HPO ₄	0,6	g/l
KH ₂ PO ₄	1,8	g/l
pH-Wert	5,8	
semisolid-Agar: Zusatz von		
Bacto-Agar (Difco)	1,9	g/l
Agarplatten: Zusatz von		
Bromthymolblau (0,5 % w/v in 0,2 N KOH)	6,0	ml/l
Hefeextrakt	20	mg/l
Bacto-Agar (Difco)	15	g/l

JNFb-Agarplatten mit der 3fachen Konzentration Bromthymolblau dienten als Selektivmedium für *Herbaspirillum seropedicae*. Es bildet kleine gelbliche Kolonien mit einem charakteristischen blauen Zentrum, die sich vom umgebenden bläulichen Agar gut sichtbar absetzen (Döbereiner et al., 1995a).

2.2.4 Vorkulturmedium (VK-Medium)

NFb-Medium (2.2.2) mit Zusatz von:		
NH ₄ Cl	0,5	g/l
Hefeextrakt	0,1	g/l
pH-Wert	6,8	
Zusatz für die Rifampicin-resistente Mutante von <i>Azoarcus</i> sp. BH72 (nicht autoklaviert):		
Rifampicin (2,5 % w/v in DMSO; Serva)	5	µg/ml

2.2.5 Kongorotagar

(Caceres, 1982, mod.)

modifiziertes NFb-Medium (2.2.2):			
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	an Stelle von Fe-EDTA	0,01	g/l
NH ₄ Cl		0,5	g/l
Hefeextrakt		0,1	g/l
Kongorot (0,025 % w/v)		15,0	ml/l
Bacto-Agar (Difco)		15,0	g/l
H ₂ O	ad	1,0	l
pH-Wert		6,8	

Bakterien der Gattung *Azospirillum*, insbesondere *A. lipoferum*, akkumulieren auf Agarplatten den Farbstoff Kongorot, bilden dunkelrote Kolonien und lassen sich dadurch leicht identifizieren. Andere Bakterien nehmen die leicht orange Farbe des Agars an oder bleiben weiß.

2.2.6 LB-Medium

(Luria-Bertani-Medium; Miller, 1972)

Pepton aus Casein		10,0	g/l
Hefeextrakt		5,0	g/l
NaCl		2,0	g/l
H ₂ O	ad	1,0	l
pH-Wert		7,0	
für Agarplatten: Zusatz von			
Bacto-Agar (Difco)		15,0	g/l

Das Medium diente zur Anzucht und zur kurzfristigen Stammerhaltung von *Comamonas testosteroni*, *Burkholderia solana-cearum* und *E. coli*, die als Teststämme für die Spezifität des Antiserums dienten.

2.2.7 Agarplatten zur Samenkeimung

Bacto-Agar (Difco)		5,0	g/l
H ₂ O	ad	1,0	l

2.2.8 MMM-Agarplatten

(*Meio Minimo Micorrhiza*, Bécard und Fortin, 1988)

Saccharose	5,0	g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,731	g/l
NH ₄ NO ₃	0,219	g/l
KNO ₃	0,800	g/l
KCl	0,650	g/l
myo-Inositol	0,500	g/l
Na-EDTA	8,00	mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	6,00	mg/l
KH ₂ PO ₄	4,80	mg/l
Glycin	3,00	mg/l
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,65	mg/l
H ₃ BO ₃	1,50	mg/l
KJ	0,75	mg/l
Nicotinamid	0,50	mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,13	mg/l
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B ₁)	0,10	mg/l
Pyridoxin (Vitamin B ₆)	0,10	mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,0024	mg/l
Bacto-Agar (Difco)	10,0	g/l
H ₂ O	ad 1,0	l
pH-Wert	5,5	

Die Vitamine wurden sterilfiltriert.

Die MMM-Agarplatten wurden zur Auskeimung von VA-Mykorrhizasporen verwendet.

2.2.9 PBS (*phosphate buffered saline*)

NaCl	9,0	g/l
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,2	g/l
KH ₂ PO ₄	0,7	g/l
H ₂ O	ad 1,0	l
pH-Wert	6,8	

2.2.10 Alkohol/PBS

Alkohol (Spiritus mit 97 % Ethanol, Handel)	500	ml
PBS (2.2.9)	500	ml

Die Lösung wurde zur Konservierung von geerntetem Pflanzenmaterial verwendet. Bei der Aufbewahrung in Plastikflaschen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde dadurch Eisbildung verhindert.

2.2.11 Hoagland-Medium

(Hoagland und Arnon, 1950, mod.)

CaCl ₂ · 2 H ₂ O		0,294	g/l
MgSO ₄ · 2 H ₂ O		0,197	g/l
KCl		0,149	g/l
¹⁵ NH ₄ Cl (10 atom%) ¹⁾	5,0 mg N/l ²⁾ ≅	0,019	g/l
Fe-EDTA		0,015	g/l
Spurenelemente:			
H ₃ BO ₃		2,86	mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O		1,88	mg/l
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O		0,22	mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O		0,13	mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O		0,08	mg/l
MOPS (C ₇ H ₁₄ NO ₄ SNa, pK _a = 7,2; Sigma)		2,0	g/l
KH ₂ PO ₄		0,72	g/l
H ₂ O	ad	1,0	l
pH-Wert		7,1	
als semisolid-Hoagland-Medium Zusatz von:			
Bacto-Agar (Difco)		4,0	g/l

¹⁾ 95 atom%iges ¹⁵NH₄Cl (VEB Berlin Chemie, DDR) wurde mit der nicht markierten Chemikalie gemischt.

²⁾ Sofern bei den Experimenten keine anderen Angaben

2.2.12 Pflanzennährlösung

(nach Empfehlung von Dr. Gerd Reidenbach, Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover)

Die angegebenen Mengen sind pro 500 ml-Topf berechnet und reichten für ca. 3 Wochen aus. Während dieser Zeit wurde bei Bedarf mit autoklaviertem Leitungswasser gewässert.

Fe	0,268 mmol	≐	Sequestren ¹⁾	4,469 g
Ca	2,00 mmol	≐	CaSO ₄ · 2 H ₂ O ²⁾	0,344 g
P	2,26 mmol	≐	KH ₂ PO ₄	0,307 g
Mg	0,625 mmol	≐	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,154 g
N	2,14 mmol	≐	¹⁵ NH ₄ Cl ³⁾	0,113 g
K	1,28 mmol	≐	K ₂ SO ₄	0,111 g
Mn	0,091 mmol	≐	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,018 g
B	0,091 mmol	≐	H ₃ BO ₃	5,642 mg
Zn	0,015 mmol	≐	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	4,305 mg
Cu	0,016 mmol	≐	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	3,984 mg
Mo	0,01 mmol	≐	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,420 mg

¹⁾ Sequestren: Fe-EDDHA mit 6 % Fe im Chelatkomplex (Nr. 66182, für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt von der Firma Ciba Geigy)

²⁾ Das Calcium wurde separat 1 Woche nach jeder Düngung dazugegeben.

³⁾ Die N-Düngung erfolgte in zwei Etappen. Die erste Hälfte mit den anderen Chemikalien zusammen, nach ca. 1 Woche die zweite Hälfte separat. ¹⁵NH₄Cl war mit 10 atom% ¹⁵N angereichert. 95 atom%iges ¹⁵NH₄Cl der Firma VEB Berlin Chemie, DDR, wurde dazu mit der unmarkiertem Chemikalie gemischt.

2.3 Bakterienanzucht

2.3.1 Stammhaltung

Für die Arbeitsstammhaltung eignete sich für alle verwendeten Bakterien ein semisolid-NFb-Medium (2.2.2). 10 ml-Reagenzgläser mit Schraubdeckel wurden mit 5 ml Medium befüllt. Aufgrund der halbfesten Konsistenz baute sich im Medium ein Sauerstoffgradient auf, der es den mikroaerophilen Bakterien ermöglichte, Bereiche mit optimaler Sauerstoffkonzentration aufzusuchen. So wurde dem obligat aeroben Stoffwechsel Rechnung getragen und gleichzeitig die sauerstoffempfindliche Nitrogenase vor zu hohem pO₂ geschützt. Die Kulturen wurden bei 35 °C im Brutschrank inkubiert. *Azoarcus* sp. musste jede Woche überimpft werden, um eine vitale Kultur zu erhalten; i. Allg. wurden die Stämme alle 2 Wochen in neues Medium überführt.

Für *Azoarcus* sp. wurden parallel NA-Platten (2.2.1) mit und ohne Rifampicin beimpft, um die Reinheit der Kultur zu überprüfen.

Zur Stammerhaltung wurden die Bakterienstämme eingefroren. Dazu wurde eine gut wachsende Übernachtskultur (log-Phase) abzentrifugiert (15 min, 10.000 Upm, Rotor JA-14, 4 °C) und das Pellet in wenig PBS (4 °C) aufgenommen. 1 ml der Suspension wurde in kleinen Schraubampullen mit 1 ml sterilem DMSO (10 %, 4 °C) versetzt und bei –85 °C tiefgefroren.

2.3.2 Vorkultur

Vorkulturen zur Anreicherung der diazotrophen Bakterien wurden über Nacht in VK-Medium (2.2.4) bei 35 °C im Schüttelwasserbad (100 Apm) angezogen. Die Zufuhr von Luftsauerstoff bewirkte ein stärkeres Wachstum, jedoch auch die Inaktivierung der Nitrogenase, weshalb das Medium eine N-Quelle enthalten musste.

2.3.3 Gesamtzellzahlbestimmung

Ein Aliquot der zu bestimmenden Suspension wurde mit der gleichen Menge Formaldehydlösung (4 %) versetzt und ggf. mit PBS verdünnt. Die Zählung erfolgte in einer Thomakammer (Fläche Großquadrat: 0,0025 mm², Tiefe: 0,100 mm).

2.3.4 Lebendkeimzahlbestimmung

Lebendkeimzahlbestimmungen wurden mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

Die zu bestimmende Bakteriensuspension wurde unter sterilen Bedingungen mit PBS verdünnt, und geeignete Verdünnungsstufen wurden auf Agarplatten (NA, 2.2.1) mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 1–2 Tagen bei 35 °C wurden die Kolonien gezählt und daraus die Lebendkeimzahl (LKZ) als cfu (*colony forming units*) berechnet. Bei Reisolierungen in nicht sterilen Gewächshausexperimenten wurden nicht eindeutige Kolonien einem ELISA (2.11) unterzogen, um die Identität von *Azoarcus* sp. BH72 festzustellen.

Bei der Lebendkeimzahlbestimmung mit der MPN-Methode (*most probable number method*) wurden in 1 : 10 Verdünnungsschritten je Verdünnungsstufe drei Röhrchen mit semisolid-NFb-Medium (2.2.2) beimpft. Drei aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen mit charakteristischer Pelliclebildung, wobei bei der höchsten Verdünnung mindestens ein Röhrchen negativ war, wurden ausgewertet. Im Zweifel wurde auch hier ein ELISA durchgeführt. Anhand einer

Tabelle (nach McCrady in Oberzill, 1967) wurde der Bakterientiter der Ausgangssuspension ermittelt.

2.4 Mykorrhizaanzucht

Die Vermehrung der vesikulär-arbuskulären Mykorrhizapilze (VAM-Pilze) erfolgte nach der Methode von Dehne und Backhaus (1986) am Institut für Phytopathologie und am Institut für Biophysik. Wirtspflanzen waren *Allium schoenoprasum* L. (Schnittlauch) und *Tagetes* sp. (Studentenblume), die aus handelsüblichen Samen angezogen wurden. Sie wuchsen auf Tongranulat oder in Sand im Gewächshaus der Institute für Phytopathologie und Technischen Gartenbau, Universität Hannover. Das poröse Granulat war mit Sporen und Myzel besetzt und konnte getrocknet ebenso wie der mit Sporen und Hyphen vermengte Sand als Inokulum verwendet werden (2.6.2). Das Material wurde trocken bei Raumtemperatur in Papiersäcken gelagert.

2.4.1 Extraktion von Sporen

(Gerdemann und Nicolsen, 1963)

In einem 10 l-Eimer wurde das Sporen und Hyphenstücke enthaltende Tongranulat oder Sandmaterial mit einem starken Leitungswasserstrahl kräftig gewaschen und mit den Händen mechanisch suspendiert. Nach ca. 10 min setzten sich die großen Partikel ab und der Überstand wurde durch Siebe der Maschenweiten 2 mm, 0,315 mm, 0,2 mm, 0,125 mm und 0,053 mm dekantiert. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Die drei unteren Fraktionen wurden nochmals mit einem kräftigen Wasserstrahl gewaschen, mit einer Spritzflasche in Glasschalen gespült und unter dem Stereomikroskop auf das Vorhandensein von Sporen überprüft.

Die entsprechende Fraktion wurde zur weiteren Aufreinigung und zum Abtrennen von nicht keimfähigen Sporen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und in Leitungswasser zentrifugiert (3 min, 3000 Upm, RT, Rotor JA-21). Das Pellet wurde in einer Saccharoselösung (45 % w/v) suspendiert und erneut zentrifugiert (1 min, 1000 Upm, RT), der Überstand sofort auf das kleinste Sieb gegeben und mit Leitungswasser sehr gründlich gespült. Die Sporen wurden in eine kleine Glasschale überführt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Diese Sporensuspension konnte so als Inokulum verwendet oder einer Oberflächensterilisation (2.4.2) unterzogen werden.

Die Keimung der Sporen konnte auf MMM-Agarplatten (2.2.8) nach Inkubation bei 35 °C im Dunkeln mit Hilfe des Stereomikroskops überprüft werden.

2.4.2 Oberflächensterilisation von Sporen

(Bécard und Piché, 1992)

Extrahierte und mit einer Pasteurpipette unter dem Stereomikroskop separierte Sporen wurden auf die Membran (Nitrocellulose, Porengröße $2\ \mu\text{m}$) eines autoklavierten Sterilfilters (zusammenschraubbar) überführt. Ein zweiter Sterilfilter für die Sterilisierung der Reagenzien wurde darüber gesetzt. Sie wurden nacheinander langsam während der angegebenen Zeiten mit einer Spritze durch die Filter gegeben und die Sporen damit gespült. Abschließend wurden die Sporen mit sterilem H_2O vom Filterpapier in ein Eppendorfgefäß gespült, wo sie über Nacht im Dunkeln bei $4\ ^\circ\text{C}$ gelagert wurden. Zur Steril- und Keimungskontrolle wurde die Suspension auf MMM-Platten (2.2.8) bei $35\ ^\circ\text{C}$ inkubiert.

Reagenzien:

Tween 20® (Fluka)	0,05 %	20 ml	1 min
Chloramin T	2,0 %	40 ml	5 min
Antibiotikallösung:		60 ml	2 min
Streptomycinsulfat	100 mg/l		
Kanamycin	50 mg/l		
H_2O		40 ml	

2.5 Pflanzenanzucht

2.5.1 Oberflächensterilisation der Samen

(Paula *et al.*, 1991)

Die Samen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane (zur optimalen Durchmischung) gegeben, der eine sterile 2 %ige Chloramin T-Lösung mit einem Tropfen Detergenz enthielt. Dazu wurden 0,02 % Streptomycinsulfat (nicht sterilisiert) als Festsubstanz gegeben. Die Samen wurden 15 min bei RT auf einem Schüttler (100 Upm) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit sterilem H_2O für jeweils 15 min auf dem Schüttler.

2.5.2 Auskeimung der Samen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Samen stets vorgekeimt. Das Waschwasser nach der Oberflächensterilisation wurde dekantiert und die Samen wurden mit einer sterilen Pinzette auf Platten zur Auskeimung (2.2.7) umgesetzt. Die Platten enthielten einen weichen Agar und wurden gegen Austrocknung mit Parafilm verschlossen. Die Petrischalen wurden in

der Klimakammer für 3–5 Tage inkubiert. Bereits auf dem Wasseragar war eine eventuelle Verpilzung feststellbar; zur weiteren Sterilitätskontrolle wurden einige Samen auf einer NA-Platte (2.2.1) ausgelegt. Die erzielte Keimungsrate lag bei über 90 %.

2.6 Gemeinsame Kultur von Pflanzen und Mikroorganismen

2.6.1 Kulturgefäße

Hydrokultur

Für die keimfreie Kultivierung der Pflanzen in Hydrokultur wurden Pflanzröhren (Abb. 1) in den Größen 20 · 3 cm und 34 · 3 cm verwendet. Ein Teil der Gefäße besaß seitlich einen Stutzen, der mit einem Subbaseal-Stopfen verschlossen war und durch den mit Spritze und Kanüle Proben entnommen werden konnten bzw. eine Belüftung erfolgen konnte. Die Keimlinge wurden auf einer mit Löchern versehenen PVC-Platte platziert, die durch einen Glasstab in der Mitte stabilisiert und durch einen Zwirnsfaden fixiert wurde. Dieser wurde durch eine Silikonschwammkappe gehalten, die für den Gasaustausch sorgte. Für Acetylenreduktionstests (ARA, 2.13) wurde die Röhre durch einen Septumstopfen gasdicht verschlossen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden 60 ml flüssiges Hoagland-Medium in die Röhren gefüllt. Eine modifizierte Hydrokultur erfolgte in semisolid-Hoagland-Medium. Die Festigkeit des Agars reichte aus, um Samen oder Keimling ohne PVC-Platte an der Oberfläche zu halten, ohne die Beweglichkeit der Mikroorganismen einzuschränken. Die Pflanzen wurden mit Hilfe einer langen Pinzette eingesetzt und geerntet.

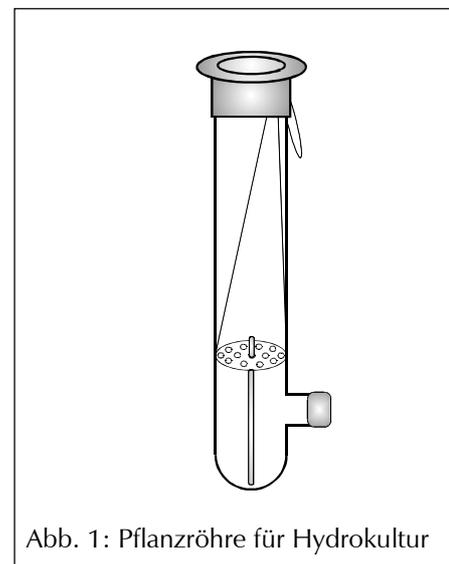


Abb. 1: Pflanzröhre für Hydrokultur

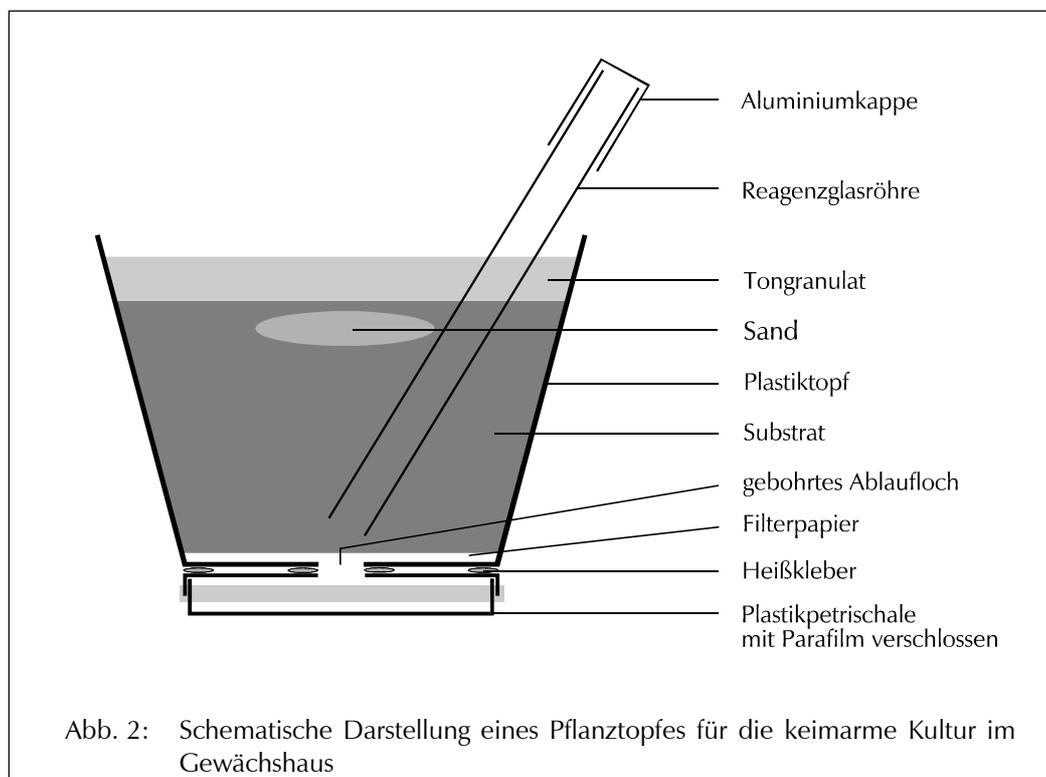
Für ein *in-vitro*-Experiment mit festem Substrat, wurden die Röhren mit 40 ml Vermiculit-Sand-Gemisch (s. u.) gefüllt, das mit 17 ml Hoagland-Medium vollständig durchfeuchtet wurde; die PVC-Platte war nicht notwendig. Bei Bedarf wurde der Flüssigkeitsstand mit Hoagland-Medium aufgefüllt. Dies geschah durch die geöffnete Kappe unter der Sterilbank.

Topfkultur

Die Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus sollte keimarm erfolgen. Verschiedene Kultursysteme wurden erprobt und in Abb. 2 ist der Aufbau des optimalen Modells schematisch dargestellt. Die Ablauflöcher von Plastikpflanztöpfen (Ø 12 cm, Teku) wurden mit

Heißkleber verschlossen und so der Topf auf dem Oberteil einer Plastikpetrischale befestigt. Zur Entwässerung wurde in der Mitte ein neues Loch gebohrt. Das Unterteil der Petrischale wurde mit Parafilm fixiert, so dass Kontaminationen vom Boden her ausgeschlossen waren. Ein Filterpapier (\varnothing 9 cm, Schleicher & Schuell) auf dem Boden des Topfes verhinderte das Herausrieseln des Substrats. Es handelte sich dabei um 500 ml eines 1 : 1 Gemischs aus Feinsand (Körnung 0,1–0,4 mm, Baumarkt) und Vermiculit (Tonmineral, Körnung 1–2 mm, Deutsche Vermiculit GmbH). Die Materialien sind inert, reagieren nicht mit den Nährlösungen und geben keine Stoffe ab. Da Ton Kalium und Stickstoff bindet (Baden *et al.*, 1969), wurde das Gemisch trotzdem auf den Gehalt getestet und ergab 80,0 ppm K (Atomabsorptionsspektrometrische Analyse, Institut für Pflanzenernährung) und 92 ppm N (Gesamtstickstoffbestimmung, 2.11). Zentral wurden 14 ml Sand in eine Mulde gegeben, in die die gekeimten Samen eingebettet wurden (s. auch 2.6.2). Abgedeckt wurden das Substrat und die Keimlinge mit einer ca. 1 cm dicken Schicht aus Tongranulat (Korngröße 2–4 mm, Pflanzenbedarf). Zur Bewässerung wurde eine Reagenzglasröhre eingesetzt, die mit einer Aluminiumkappe verschlossen war. An einer Butangasflamme wurde mit Hilfe eines „Papageis“ keimarm sterilisierte Nährlösung zugegeben.

Zur Sterilisation wurden die Plastikteile über Nacht in 70 % Alkohol (Spiritus) eingelegt, Filterpapier und Gießvorrichtung konnten autoklaviert werden. Das Substrat wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen für je 60 min autoklaviert (über Nacht stehen lassen bei RT). Auf diese Weise war zu Beginn des Versuchs die Sterilität des Systems gewährleistet; das Eindringen von Luftkeimen und Sporen in das Substrat wurde durch das stets trockene Tongranulat auf der Oberfläche weitgehend verhindert.



Pflanztöpfe am EMBRAPA-CNPAB

Für die Experimente mit VA-Mykorrhiza in Brasilien (EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, R. J., Brasilien; 3.1.5) wurden kleine Plastikbecher (200 ml) mit Löchern am Boden versehen, mit 70 % Alkohol sterilisiert und auf eine Petrischale gestellt. Das Substrat bestand aus einer autoklavierten Sand-Vermiculit-Mischung (300 g, 3 : 1). Je drei nicht vorgekeimte oberflächensterilisierte Samen wurden darin eingebettet. Parallel dazu dienten Agarplatten mit Samen als Sterilitätskontrolle. Die Töpfe besaßen keine Gießvorrichtung und wurden vorsichtig am Rand mit einer Pipette bewässert; zu Beginn wurden 20 ml H₂O zugegeben. Zum Schutz gegen Staub und Verdunstung wurden die Töpfe mit Aluminiumfolie abgedeckt, die später eingeritzt und um die Pflänzchen herum gelegt wurde.

2.6.2 Inokulation

Für die *Bakterieninokulation* wurde eine in VK-Medium (2.2.4) gewachsene Vorkultur zentrifugiert (15 min, 10.000 Upm, RT) und in PBS (2.2.9) aufgenommen. Entsprechend der ermittelten Gesamtzellzahl (2.3.3) wurde ein Aliquot erneut zentrifugiert und in dem entsprechenden Medium aufgenommen. Zur Überprüfung des Titors wurden Lebendkeimzahlbestimmungen (2.3.4) durchgeführt. Wurde direkt aus einer Vorkultur inokuliert, ist dies im Ergebnisteil vermerkt.

Hydrokultur: Zur Inokulation der Pflanzröhren wurde die gewaschene Bakteriensuspension in Hoagland-Medium (2.2.11) aufgenommen, so dass ein Titer von 10⁸ Zellen/ml erreicht wurde. Bei modifizierter Hydrokultur in semisolid-Hoaglandmedium wurden die Bakterien dem abgekühlten aber noch flüssigen Agar beigemischt. Eine entsprechend dichte Suspension konnte auch zu einem späteren Zeitpunkt durch das seitliche Septum zugegeben werden. Je drei Keimlinge wurden auf die PVC-Platte gesetzt und in die Röhre herabgelassen, bis die Wurzeln ins Medium eintauchten. Auf diese Weise konnte eine Berührung des Sprosses mit dem Medium und so eine äußerliche Berührung mit Bakterien verhindert werden. Wenn die Samen nicht vorgekeimt wurden, ist dies bei der Versuchsbeschreibung erwähnt.

Topfkultur: Die Pflanztöpfe wurden zunächst mit 200 ml Pflanzennährlösung (2.2.12) mit Rifampicin (0,5 µg/ml) und Biotin (0,1 mg/l) beschickt. Das Substrat wurde damit vollständig durchtränkt. 14 ml Sand wurden in der Mitte des Topfes platziert und je drei Keimlinge darin eingebettet. Der Sand bot durch die höhere Wasserkapazität eine optimale Feuchtigkeit. Die Bakterien wurden in 4 ml NFb-Medium (2.2.2, mit Rifampicin) direkt in dem getrockneten Sand möglichst dicht an den Wurzeln appliziert. Die Dichte betrug 10⁸ Zellen/ml bei 200 ml Flüssigkeit pro Topf ($\approx 3,6 \cdot 10^7$ Zellen/g FG Substrat). Bei den Kontrollansätzen wurden 4 ml steriles NFb-Medium zugegeben. Alle Komponenten wurden vor der Inokulation einer Sterilkontrolle auf NA unterzogen.

Für die *Mykorrhizainokulation* wurden die Sporen und Hyphenstücke aus der Mykorrhizaanzucht (2.4) extrahiert, die Suspension (2.4.1) oberflächensterilisiert (2.4.2) und direkt an die Keimlinge in den Sand pipettiert (ca. 500 µl).

2.6.3 Mykorrhizierung in Hydrokultur

(Dugassa *et al.*, 1995)

Unter Anleitung der Verfasserin wurden von Silke Marotzke und Gabriele Wieland für Experimente mit VAM in Hydrokultur die unter 2.6.1 beschriebenen Glasröhren mit flüssigem oder semisolid-Hoagland-Medium verwendet. Zusammen mit den vorgekeimten oberflächensterilisierten Samen wurde ein ca. 5 cm langes unsteril angezogenes mykorrhiziertes Schnittlauchpflänzchen in die Röhren eingesetzt, um eine Übertragung der Mykorrhiza herbeizuführen. Vgl. auch 3.3.2.

Für eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Mykorrhizapilzes in wassergesättigter Kultur wurden die Pflanzröhren täglich für 10–20 min mit synthetischer Luft belüftet. Durch einen Sterilfilter und sterile Kanüle (0,4 · 20 mm) wurde das Gas durch das seitliche Septum in das Medium geleitet, so dass es leicht perlend an den Wurzeln vorbeistrich, ohne die Rhizosphäre zu durchmischen. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Mykorrhiza (Bécard und Piché, 1992) wurden die Röhren im Wurzelbereich mit schwarzer Plastikfolie umwickelt.

2.6.4 Kulturbedingungen

Klimakammer

		Tag	Nacht
Temperatur	[°C]	28	26
Dauer	[h]	14	10
Beleuchtungsstärke ¹⁾	[klx]	15	0

¹⁾ Gemessen mit einem Luxmeter in Höhe der Pflanzen.

Klimakammer am EMBRAPA-CNPAB (Seropédica, R. J., Brasilien)

		Tag	Nacht
Temperatur	[°C]	25	25
Dauer	[h]	12	12
Beleuchtungsstärke	[klx]	ca. 14	0

Gewächshaus

Im beheizten Gewächshaus (23 °C) des Instituts für Technik im Gartenbau, Universität Hannover, standen die Pflanzentöpfe auf Tischen. Darüber waren Quecksilberdampflampen angebracht, die in der Zeit von 8–18 Uhr Zusatzlicht lieferten, wenn die natürliche Beleuchtung unter 20 klx sank. Dadurch wurde eine Beleuchtungsstärke von ca. 15 klx in Höhe der Pflanzen erreicht (bedeckter Himmel: 8 klx). Im Sommer war gelegentlich eine Beschattung durch eine Gaze notwendig, während der Wintermonate konnte keine Anzucht erfolgen.

Gewächshaus am EMBRAPA-CNPAB (Seropédica, R. J., Brasilien)

Im Gewächshaus in Brasilien wurde die Temperatur nicht geregelt. Es herrschten in der Zeit von Mai–Juli Temperaturen bis zu 40 °C bei starker Lichteinstrahlung und einer mittleren Tageslänge von 11 h ohne Zusatzlicht.

2.7 Ernte

Die Ernte erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Cleanbench mit sterilisierten Materialien. Dabei wurden Bakterien reisoliert, bzw. Sterilkontrollen durchgeführt, ggf. wurden Pflanzenteile für die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades und für Mikroskopie in Alkohol/PBS (2.2.10) bei –20 °C in Plastikflaschen konserviert, Frisch- und Trockengewicht wurden ermittelt und das getrocknete Material für weitere Analysen (N-Gehalt, ¹⁵N) bei RT aufbewahrt.

2.7.1 Ernte der Hydrokultur

Die Pflanzen wurden zusammen mit der Platte aus den Kulturröhren (vgl. Abb. 1) gezogen, so dass der Spross nicht mit dem Medium in Berührung kam und sich dort Bakterien äußerlich anheften konnten. Wurzel und Spross wurden voneinander getrennt und jeweils 3-mal 2 min in H₂O gewaschen. Zur Oberflächensterilisation wurden die betreffenden Pflanzenteile zuvor in Chloramin T (2 %) geschwenkt (2 min, 20 Upm, RT). Anschließend wurden sie in PBS (2.2.9) im Mörser oder mit einem Messerhomogenisator (5 min, höchste Stufe) homogenisiert. Mit der Suspension wurde eine Lebendkeimzahlbestimmung (2.3.4) durchgeführt. Der Rest wurde bei 70 °C getrocknet.

Bei modifizierter Hydrokultur in semisolid-Hoagland-Medium wurde zunächst eine Probe des Agars (1 ml) aus der Nähe der Wurzeln entnommen, um die Bakterien der äußeren Rhizosphäre zu reisolieren. Die Pflanzen wurden mit einer langen Pinzette vorsichtig herausgezogen und wie oben beschrieben verarbeitet.

2.7.2 Ernte der Topfkulturen

Das Tongranulat, das das eigentliche Substrat bedeckte (Abb. 2), wurde entfernt. Die Pflanzen wurden aus dem Topf gezogen, die Wurzeln in Leitungswasser gründlich gewaschen und auf einem Papiertuch abgetupft. Repräsentative Teile aller Pflanzen aus einem Topf (Sprossbasis, Blattmitte, Spitze von jungen Blättern, Wurzel dicht am Samenrest, dicke Wurzeln am Topfboden und Feinwurzeln) wurden für die Reisolierung eingesetzt bzw. in Alkohol/PBS (2.2.10) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ konserviert. Ein kleines Stück Spross bzw. Wurzel wurde zur Besiedlungs- und Oberflächensterilisationskontrolle auf eine NA-Platte gelegt; der Rest bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Von allen Stücken wurde das Frischgewicht bestimmt.

Zur Reisolierung von Bakterien wurden die Stücke 3-mal 2 min in H_2O gewaschen. Von den Wurzelproben wurde ein Teil zuvor 2 min lang oberflächensterilisiert (2 % Chloramin T, 20 Upm, RT). Für die anschließende Homogenisation wurde die manuelle Variante des Mörsers in PBS (2.2.9) gewählt. Während bei den Hydrokulturversuchen für die relativ jungen Pflanzen ein automatischer Homogenisator eingesetzt werden konnte, war dies bei dem kräftigeren Material hier nicht möglich. Es musste vorab mit einer Schere zerkleinert werden. Von der Suspension wurde eine Lebendkeimzahlbestimmung (2.3.4) durchgeführt.

2.7.3 Bodenproben

Zur Entnahme von Proben aus dem Substrat der Töpfe wurde eine sterile Reagenzglasröhre unter leichtem Drehen in den Boden gebohrt. Beim Herausziehen erhielt man eine Art Bohrkern, der mit einem Glasstab von der anderen Seite herausgedrückt wurde. Aus verschiedenen Schichten wurden Proben genommen, in PBS aufgeschwemmt und gut geschüttelt (30 min, RT, 200 Upm). Nach Absetzen des groben Materials wurde aus dem Überstand eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt.

2.7.4 Trockengewichtsbestimmung

Von allen geernteten Pflanzenstücken wurde das Frischgewicht (FG) bestimmt. Ein Teil davon wurde bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wurde das Trockengewicht (TG) bis zur Gewichtskonstanz wiederholt bestimmt. Aus der Relation von FG zu TG ließ sich das TG der anderen Pflanzenteile ermitteln und das Gesamttrockengewicht der Pflanze rekonstruieren.

Waren die Pflänzchen sehr klein, wurde das gesamte Material zur Reisolierung homogenisiert. Danach wurde das TG des verbliebenen Homogenats bestimmt, um die Bezugsgröße zu erhalten.

2.8 Färbungen

2.8.1 Rutheniumrot und Acridinorange

(Dazzo *et al.*, 1979)

Um Bakterien in pflanzlichen Strukturen deutlich sichtbar zu machen, wurde eine kombinierte Färbung mit Rutheniumrot und Acridinorange angewandt. Rutheniumrot färbt Pektine und saure Schleime der Pflanzen rot an, so dass sie nicht mehr für Acridinorange zugänglich sind. Dieses markiert bakterielle Nucleinsäuren in einer Differentialfärbung, so dass sie im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren.

Färbelösungen:

Rutheniumrot ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{OHCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1 % w/v	10	ml
Ammoniak, konz.	1	Tropfen
Acridinorange	10	mg
H_2O	50	ml

Beide Lösungen wurden stets frisch angesetzt, Acridinorange ist lichtempfindlich.

Inokulierte Wurzelproben wurden auf einem Objektträger für 5 min mit der Rutheniumrotlösung bedeckt. Nach Auflegen des Deckglases wurde das Präparat einmal mit H_2O gewaschen (mit Filterpapier durchgesogen) und mit Acridinorange für 5–10 min inkubiert, bevor wieder mit H_2O gewaschen wurde. Die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop erfolgte unmittelbar danach.

2.8.2 Lebendfärbung mit TTC

(Patriquin und Döbereiner, 1978)

TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) wird durch Reduktion, z. B. durch Nitrogenaseaktivität, in den roten wasserunlöslichen Farbstoff Formazan umgewandelt. TTC dringt in Pflanzen- gewebe ein und ist für Lebendfärbungen geeignet. In mikroaeroben Systemen ist so ein Nachweis von aktiver Nitrogenasetätigkeit diazotropher Bakterien *in situ* möglich.

Mit diazotrophen Mikroorganismen inokulierte Wurzeln oder Bakteriensuspensionen wurden mit sterilem Wasser abgespült bzw. zentrifugiert (2 min, 13.000 Upm) und je nach Farbausprägung für 4–24 h unter sterilen Bedingungen mit der Färbelösung bei RT im Dunkeln inkubiert. Bakterien in Pflanzröhren mit semisolid-Medium wurden auch durch einfaches Einspritzen von Färbelösung und anschließende Inkubation (s. o.) gefärbt.

Färbelösung:

TTC (aus Stammlösung sterilfiltriert)		1,5	g/l
Malat		0,625	g/l
KOH		0,563	g/l
K ₂ HPO ₄		0,7	g/l
KH ₂ PO ₄		0,5	g/l
H ₂ O	ad	1	l
pH-Wert		6,8	

Die Lösung muss im Dunkeln gehalten werden.

2.8.3 Färbung von VA-Mykorrhiza

(Koske und Gemma, 1989)

Reagenzien:

KOH		2,5	% w/v
HCl		1,0	% v/v
Färbelösung:			
Glycerin		500	ml
H ₂ O		450	ml
HCl (1 %ig)		50	ml
Trypanblau (ICN)		500	mg
Konservierungslösung:			
Glycerin		500	ml
H ₂ O		450	ml
HCl (1 %ig)		50	ml

Die gewaschenen Wurzeln wurden in Alkohol/PBS (2.2.10) in Reagenzgläsern mit Schraubdeckel aufbewahrt. Für die Färbung wurde die Lösung dekantiert und die Wurzeln wurden 2-mal mit H₂O gewaschen. Nach Zugabe von KOH wurden die Gläser für 10–30 min bei 90 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 2-mal mit H₂O gewaschen, bevor die Wurzeln für 1 h in HCl bei RT aufgehellt wurden. Nach Dekantieren der Säure wurde die Färbelösung zugegeben und 5 min auf 90 °C erhitzt. Die Wurzeln wurden abschließend in Konservierungslösung aufgenommen, in denen sie mehrere Monate haltbar waren.

Strukturen von VA-Mykorrhizapilzen (Hyphen, Arbuskel und Vesikel) sind dunkelblau gefärbt, Hyphen von Ektomykorrhiza erscheint im Stereomikroskop braun.

2.9 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

(Land und Schönbeck, 1991)

Nach der Färbung der VA-Mykorrhiza (2.8.3) wurden die Wurzeln in einer Petrischale mit Gitter (1 cm · 1 cm) ausgebreitet. Mit Hilfe des Stereomikroskops wurden 100 Kreuzungspunkte der Wurzeln mit dem Gitter auf das Vorhandensein von VAM-Strukturen (Hyphen, Vesikel, Arbuskel, Sporen) überprüft. Der infizierte Anteil wird als Mykorrhizierungsgrad in % angegeben.

2.10 Proteinbestimmung

(Bergersen, 1980; mod. nach Goa, 1953)

Reagenzien:

TCA (Trichloressigsäure)	26	% w/v
NaOH	3	% w/v

Benedicts Reagenz:

Na-Citrat	173	g/l
Na ₂ CO ₃	100	g/l
H ₂ O	500	ml
unter schwachem Erhitzen lösen und filtrieren.		
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	17,3	g/l
H ₂ O	100	ml
schwach erhitzen und lösen. Nach Abkühlen die Lösungen vereinigen.		
H ₂ O	ad	1 l

Die Proteinbestimmung wurde in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen durchgeführt. 1 ml Proteinlösung (Bakteriensuspension) wurde zum Fällern der Proteine mit 330 µl TCA versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugieren (2 min, 13.000 Upm) wurde der Überstand an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 1 ml NaOH gelöst (10 min Eppendorfmischer). Danach wurden 50 µl Benedicts Reagenz dazugegeben und nach 15 min die Konzentration des entstandenen blauen Farbstoffs (Kupferkomplex mit 2 Biuret-molekülen) bei 330 nm photometrisch gemessen. Für die Eichreihe wurden 1–800 µg/ml BSA eingesetzt.

2.11 Gesamtstickstoffbestimmung

(Bergersen, 1980; mod. nach Kjeldahl, 1883)

Das Prinzip dieser Methode, die auf Kjeldahl zurückgeht, besteht darin, dass bei nasser Veraschung stickstoffhaltigen Materials sowohl organischer als auch mineralischer Stickstoff durch heiße konzentrierte Schwefelsäure in Gegenwart eines Katalysators (Se, Hg, Cu) zu Ammonium reduziert wird. Ein hohes C/N-Verhältnis wie auch hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten fördern den Aufschluss, wobei Temperaturen über 350 °C zu Verlusten von Ammonium führen. Nitrat und Nitrit werden nicht vollständig reduziert, so dass entsprechende Proben vorbehandelt werden müssen, um diese zu erfassen (Bergersen, 1980). Bei Pflanzenmaterial und einem Medium mit Ammonium als N-Quelle, ist dieses nicht notwendig. Anschließend wurde die Ammoniumkonzentration colorimetrisch bestimmt (2.11.3).

Für Bakteriensuspensionen und Hydrokulturen eignete sich der sogenannte Mikro-Kjeldahl-aufschluss (Bergersen, 1980). Das Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für den Aufschluss von Pflanzenmaterial weiter modifiziert, so dass größere repräsentative Probenmengen eingesetzt werden konnten (Semimikro-Kjeldahl-aufschluss).

Reagenzien:

konz. H ₂ SO ₄ „zur Stickstoffbestimmung“ 98 %ig		
H ₂ O ₂	35	% v/v
NaOH	25	% w/v
frisches H ₂ O (Millipor-Anlage) für alle Arbeitsschritte		

Aufschlussreagenz:

H ₂ SO ₄ (s. o.)	500	ml
K ₂ SO ₄	50	g
metallisches Selen	500	mg

Das Reagenz wurde bei 250–300 °C auf einer Heizplatte 4 h lang erhitzt, bis es vollständig klar und farblos war. Das K₂SO₄ diente zur Erhöhung des Siedepunktes der H₂SO₄ (Siedepunkt 330 °C).

2.11.1 Semimikro-Kjeldahl-aufschluss

Die folgenden Arbeiten wurden unter dem Abzug ausgeführt. Zunächst wurden 50 ml-Erlenmeyerkolben (mundgeblasen mit enger Öffnung) mit 1 ml H₂SO₄ befüllt, mit unten zugeschmolzenen Glastrichtern (Ø 40 mm) als Deckel versehen und auf einer Heizplatte bei 330 °C 15 min lang ausgekocht, um sie von Stickstoffresten zu befreien. Nach dem Abkühlen wurden die Glasgeräte mit frischem H₂O abgespült und auf der Heizplatte getrocknet. Das

Pflanzenmaterial wurde direkt eingewogen. Es war vorab bei 70 °C getrocknet, mechanisch zerkleinert und anschließend mit flüssigem Stickstoff gemörsert worden. Die Menge der eingewogenen Trockensubstanz war abhängig vom N-Gehalt der Pflanzen; bewährt hat sich der Einsatz von 10–50 mg. Mit 10 ml Aufschlussreagenz und 1 ml H₂O₂ wurden die Kölbchen, wiederum mit den Trichtern verschlossen, für 30–60 min bis zum Aufklaren bei 330 °C inkubiert. Während des Aufschlusses verdampfte das H₂O₂, kondensierte am Trichter und spülte Probenmaterial von den Wänden in die Kölbchen zurück. Die Pflanzenproben schäumten stark in den Kolben, es traten Flüssigkeitsverluste auf, die in der Berechnung anschließend berücksichtigt wurden (V_A). Als Leerwert diente H₂O und als Standard wurde eine Lösung mit 100 mg/l Glutamin eingesetzt.

Für die colorimetrische Ammoniumbestimmung (2.11.3) wurden vom Aufschluss 0,5 ml in ein kleines Becherglas mit 3 ml frischem H₂O gegeben. Mit Hilfe einer pH-Elektrode und pH-Meter wurde mit NaOH ein pH-Wert von 3 eingestellt. Die Volumina dieses Neutralisats und des verbliebenen Aufschlusses wurden in einem Messzylinder bestimmt. Berechnung s. 2.11.4.

2.11.2 Mikro-Kjeldahlaufschluss

Die Prozedur entspricht im Wesentlichen den Arbeitsschritten, wie sie oben für den Semimikro-Kjeldahlaufschluss beschrieben wurden. Es wurden jedoch 7,5 ml-Erlenmeyerkolben verwendet, die mit 0,5 ml H₂SO₄ ausgekocht wurden. Die eingesetzte Probemenge war entsprechend geringer und betrug bei Flüssigproben maximal 200 µl. Hinzu kamen 500 µl Aufschlussreagenz und 50 µl H₂O₂. Die Inkubationszeit betrug 15 min. Danach wurde der gesamte Aufschluss quantitativ überführt und neutralisiert (pH 3). Berechnung s. 2.11.4.

2.11.3 Colorimetrische Ammoniumbestimmung

Phenolreagenz:

Phenol	1,0	g
Nitroprussid-Na	5,0	mg
H ₂ O	ad 100	ml

Die Lösung sollte in einer braunen Flasche aufbewahrt werden.

Hypochloritreagenz:

Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	4,48	g
NaOH	2,4	g
NaOCl (mit mind. 13 %, s. u.)	4,0	ml
H ₂ O	ad 100	ml

Die Lösung ist nur begrenzt haltbar (Bildung von Niederschlag).

480 μl Probe wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und nacheinander mit je 400 μl Phenolreagenz und Hypochloritreagenz versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für genau 30 min bei 37 °C im Eppendorfthermomischer inkubiert, wobei es zu Beginn 1 min geschüttelt wurde. Die Reaktion wurde im Eisbad abgestoppt. Die Konzentration des entstandenen blauen Farbkomplexes aus Indophenolblau wurde bei 630 nm im Photometer gegen einen Leerwert mit Wasser gemessen. Die Konzentration an Ammonium bzw. an Stickstoff in der Probe wurde anhand einer Eichgerade ermittelt. Um den Extinktionsbereich von 0 bis ca. 0,8 abzudecken, wurden Eichlösungen mit einer N-Konzentration von 0,025–4,0 mg/l als NH_4Cl verwendet. Angepasst an den pH-Wert am Ende der Kjeldahlprozedur, war in den Lösungen ein pH-Wert von ca. 3 eingestellt worden.

Gehaltsbestimmung des NaOCl

100 μl NaOCl (Chlorbleichlaug) wurden in ein Becherglas mit ca. 5 ml H_2O gegeben und mit 3–5 Tropfen 25 %iger H_2SO_4 angesäuert. Dazu wurde eine Spatelspitze Kaliumjodid gegeben und die entstandene dunkelbraune Lösung mit 0,1 M Natriumthiosulfat bis zur Gelbfärbung titriert. 50 μl einer 1 %igen Stärkelösung bewirkten eine Blaufärbung, woraufhin die Lösung mit Natriumthiosulfat bis zur Entfärbung titriert wurde (Jodometrie). Dabei reagiert 1 Mol Cl^- stöchiometrisch mit 2 Mol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Berechnung s. 2.11.4.

2.11.4 Berechnungen

Die Gleichungen (1) und (2) gelten für Semimikro-, (3) gilt für Mikro-Kjeldahlaufschluss.

$$(1) \text{ N - Gehalt [mg]} = \frac{(\text{N-Konz}_N \cdot V_N \cdot V_A)_{\text{Probe}}}{V_{\text{neutral.Probe}}} - \frac{(\text{N-Konz}_N \cdot V_N \cdot V_A)_{\text{RG}}}{V_{\text{neutral.RG}}}$$

$$(2) \text{ N - Konzentration } \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \text{ bzw. } \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{N - Gehalt der Probe}}{\text{Probe}}$$

$$(3) \text{ N - Konzentration } \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \text{ bzw. } \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{(\text{N-Konz}_N \cdot V_N)_{\text{Probe}} - (\text{N-Konz}_N \cdot V_N)_{\text{RG}}}{\text{Probe}}$$

N-Konz _N [mg/ml]	N-Konzentration des Neutralisats, anhand der Eichgeraden für die Ammoniumbestimmung ermittelt (2.11.3)
V _N [ml]	Volumen des Neutralisats
V _A [ml]	Volumen des Aufschlusses
V _{neutral} [ml]	Volumen, das neutralisiert wurde (0,5 ml)
RG	Leerwert, d.h. nur Kjeldahlreagenzien
Probe	zu bestimmende Probe
N-Gehalt der Probe [mg]	aus obiger Rechnung
Probe [g] bzw. [ml]	für Kjeldahl eingesetzte Probemenge (fest oder flüssig)

Bestimmung des NaOCl-Gehalts:

$$\text{NaOCl-Konzentration} \left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right] = V_{\text{TS}} \cdot \text{Konz.}_{\text{TS}} \cdot \frac{MG_{\text{NaOCl}}}{2 \cdot V_{\text{Probe}}}$$

V_{TS} [ml]	für die Titration verbrauchtes Volumen Natriumthiosulfat
Konz._{TS} [M]	Konzentration der Natriumthiosulfatlösung (0,1 M)
MG_{NaOCl} [g/mol]	Molekulargewicht von NaOCl (74,5 g/mol)
V_{Probe} [ml]	eingesetzte Probe an NaOCl (0,1 ml)

2.11.5 Nitratbestimmung

Zur Bestimmung von Nitrat im Leitungswasser für die Bewässerung der Topfkulturen (2.6.1) wurden Merck-Teststäbchen (Nr. 1.10020.001) mit einer Nachweisgrenze von 10–500 mg/l NO_3^- verwendet.

2.12 ^{15}N -Analyse

Der prozentuale Anteil des Isotops ^{15}N am Gesamtstickstoff wurde emissionsspektrometrisch bestimmt. Dabei wird molekularer Stickstoff in einem Hochfrequenzfeld (27,12 MHz) zum Leuchten angeregt. Bei Anwesenheit der beiden Isotope ^{14}N und ^{15}N sind entsprechend der Häufigkeitsverteilung die drei Molekülkombinationen $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ und $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ vorhanden. Aufgrund ihrer differierenden Kernmasse, emittieren die Moleküle Licht mit geringfügig unterschiedlicher Energie und damit unterschiedlicher Wellenlänge ($\Delta\lambda = 0,6$ nm). $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ emittiert bei 297,7 nm, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ bei 298,3 nm und $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ bei 298,9 nm.

Im verwendeten Emissionsspektrometer werden die Banden durch ein NaCl-Prisma aufgetrennt und in einem Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt. Die Strahlungsintensität ist dabei der Anzahl der Moleküle proportional und aus dem Verhältnis der Peakhöhen zueinander, die mit einem Schreiber aufgezeichnet werden, berechnet sich der Anteil an ^{15}N . Eichsalze ergaben bei dem Gerät eine durchschnittliche Abweichung von 0,037 atom%, die Korrelation betrug 0,9999.

2.12.1 Probenaufbereitung

(Dumas-Verbrennung, nach VEB Statron)

Wurzel und Spross wurden getrennt analysiert. Getrocknetes Pflanzenmaterial mit $7,5 \mu\text{g N}$ wurde direkt in ein spezielles Emissionsröhrchen (angefertigt von J. Pfeuffer, Glasbläser, Hannover) eingewogen. Für die geringen Mengen (bei Hirse wurde ca. 1 mg benötigt) wurde eine Feinwaage mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 mg verwendet. Bei flüssigen Probe wurde das berechnete Volumen in das Anregungsröhrchen pipettiert, musste jedoch vor der Weiterverarbeitung getrocknet werden (70 °C oder Gefriertrocknung).

Die Umwandlung des gebundenen Stickstoffs in N_2 erfolgte durch die Dumas-Reaktion. CuO als Reduktionspartner und frisch getrocknetes CaO (1000 °C über Nacht) zur Bindung von entstehenden Gasen, die die Messungen überlagern (H_2O , CO_2 , CO), wurden zur Probe dazugegeben. Mit Hilfe einer Drehschiebervakuumpumpe wurde das Röhrchen evakuiert (maximal 0,06 mbar) und mit einem Brenner zugeschmolzen. Die Dumas-Reaktion erfolgte bei Pflanzenmaterial für mindestens 36 h, bei Medien für 8 h bei 560 °C im Muffelofen.

2.12.2 Messung

Nach einer Ruhephase mindestens über Nacht wurden die Proben im ^{15}N -Analysator gemessen, wobei das Teilspektrum mit dem oben genannten Wellenlängenbereich mehrfach durchgefahen wurde. Da die Isotope statistisch gleich auf die drei Molekülsorten verteilt sind, brauchen nur zwei der drei Peaks ausgewertet werden.

$$^{15}\text{N} [\text{atom}\%] = \frac{100}{R \cdot 2 + 1} \quad R = \frac{\text{Peakhöhe } ^{28}\text{N}_2}{\text{Peakhöhe } ^{29}\text{N}_2} \cdot \frac{\text{Verstärkungsbereich II}}{\text{Verstärkungsbereich I}}$$

2.12.3 Isotopenverdünnung und Berechnung der BNF

(biological nitrogen fixation)

(Boddey, 1987)

Der Anteil des Stickstoffs in einer Pflanze oder einem Pflanzenteil, der aus der biologischen Stickstofffixierung (BNF) stammte, kann mit Hilfe der ^{15}N -Isotopenverdünnungsmethode ermittelt werden.

$$\text{BNF} [\%] = \left(1 - \frac{(^{15}\text{N atom}\% \text{ excess})_{\text{fixing system}}}{(^{15}\text{N atom}\% \text{ excess})_{\text{non fixing system}}} \right) \cdot 100 \%$$

Einer Pflanze wird im Medium eine mit dem Isotop ^{15}N markierte Stickstoffquelle, in der vorliegenden Arbeit 10 atom% als NH_4Cl , angeboten. Im Kontrollansatz (*non fixing system*) besitzen die Pflanzen nach der Kulturzeit einen bestimmten Anteil an ^{15}N , der über dem natürlichen Wert (*excess*) liegt. Die natürliche Häufigkeit des ^{15}N -Isotops wird mit 0,366 atom% angegeben. Im fixierenden System (*fixing system*) wird von den diazotrophen Bakterien molekularer unmarkierter Luftstickstoff eingebracht, der den Gehalt an ^{15}N in der Pflanze verringert („verdünnt“). Die BNF wurde für verschiedene Kulturpflanzen, jeweils in Wurzel und Spross getrennt, ermittelt.

2.13 Acetylenreduktionstest (ARA)

(*acetylene reduction assay*)

(Hardy *et al.*, 1973)

Das Enzym Nitrogenase katalysiert nicht nur die Umwandlung von N_2 in Ammonium, sondern reduziert auch noch eine Reihe anderer Verbindungen mit 3-fach-Bindungen wie Acetylen, Nitrile und Cyanide. Diese Eigenschaft wird genutzt, um die Aktivität dieses Enzyms zu quantifizieren oder um qualitativ seine Anwesenheit und Funktionstüchtigkeit unter bestimmten Bedingungen zu erfassen.

Ein gasdicht mit einem Septumstopfen abgeschlossenes Gefäß mit Bakterien wurde mit 10 Vol% Acetylen (Ethin) begast, indem zunächst die berechnete Gasmenge mit einer Einmalspritze mit Kanüle (0,4 · 20 mm) aus dem Gefäß entnommen wurde und das gleiche Volumen an Acetylen dazugesetzt wurde. Die Inkubationsdauer richtete sich nach der Größe des Gefäßes und nach der Bakteriendichte. Für Experimente mit flüssigen Bakterienkulturen eigneten sich mundgeblasene 50 ml-Erlenmeyerkolben, die mit 10 ml Suspension befüllt und auf einem Schüttler (100 Apm, 35 °C) inkubiert wurden.

Für die Einstellung einer definierten Atmosphäre wurden die gasdicht verschlossenen Gefäße an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert (je nach Größe 5–10 min) und anschließend mit Argon gespült (5 min), indem noch eine zweite Kanüle für den Gasausfluss in das Septum gestochen wurde. Das Volumen der zuzusetzenden Gase wurde mit Spritze und Kanüle entnommen, synthetische Luft für die O_2 -Versorgung und Acetylen wurden nacheinander zugegeben.

Verwendete Gase:

Acetylen (Ethin)	C_2H_2	technisches Gas	Linde
Argon	Ar	reines Gas Reinheit 4.8	Linde
Ethylen (Ethen)	C_2H_4	reines Gas, 99,9 %	Linde
Stickstoff	N_2	reines Gas Reinheit 5.0	Linde
Synthetische Luft	21 % O_2 , 79 % N_2	reines Gas	Linde
Wasserstoff	H_2	reines Gas	Linde

Der Nachweis des gebildeten Ethylens (Ethen) erfolgte in einem **Gaschromatographen** (GC) mit Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Zweikanalschreiber für die Aufzeichnung. Als Referenz diente reines Ethylen.

Injektortemperatur	125 °C
Säule	V4a Stahlsäule, 90 cm
Stationäre Phase	Porapak N 80/100 mesh
Säulentemperatur	60 °C
Mobile Phase	N ₂ 0,5 bar
FID-Flamme mit	H ₂ 0,6 bar
	synthetische Luft 1 bar

Berechnung des gebildeten Ethylens:

$$\text{Ethylen [nmol]} = \frac{\text{Peakhöhe} \cdot \text{Abs.} \cdot \text{Gasraum}}{\text{Probe} \cdot \text{rel. Eichpeak} \cdot \text{Molvolumen}}$$

Peakhöhe [cm]	gemessene Peakhöhe am GC-Schreiber
Abs.	am GC gewählter Abschwächungsfaktor
Gasraum [ml]	Gasraum über dem Medium (Headspace)
Probe [ml]	Probemenge, die im GC analysiert wurde
rel. Eichpeak [cm/μl]	für Ethylen aktuell bestimmter relativer Eichpeak
Molvolumen [μl/nmol]	Konstante für das Volumen, das 1 mol Gas einnimmt (22,41 l/mol)

$$\text{spezifische Nitrogenaseaktivität} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{h}} \right] = \frac{\text{gebildetes Ethylen [nmol]}}{\text{Protein [mg]} \cdot \text{Zeit [h]}}$$

$$\text{relative Nitrogenaseaktivität} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{ml} \cdot \text{h}} \right] = \frac{\text{gebildetes Ethylen [nmol]}}{\text{Ansatz [ml]} \cdot \text{Zeit [h]}}$$

Für den Fall, dass aus versuchstechnischen Gründen, beispielsweise bei der Verwendung von Agar und bei Besiedlung von Pflanzen, die Biomasse (Protein) der stickstofffixierenden Bakterien nicht bestimmt werden konnte, wurde die sogenannte relative Nitrogenaseaktivität angegeben, wobei das gebildete Ethylen auf die Inkubationszeit und das Medienvolumen (Ansatz) mit den enthaltenen Mikroorganismen bezogen wurde.

2.14 Gewinnung von Antikörpern gegen *Azoarcus* sp. BH72

(M. Runge, Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover)

2.14.1 Gewinnung von Normalserum bei Kaninchen

Am Tag vor der Immunisierung (Tag 0) wurde einem Kaninchen aus der Ohrvene Blut entnommen, um Serum zur Kontrolle zu gewinnen. Das Tier wurde im Tierstall der Tierärztlichen Hochschule (TiHo) Hannover zu Versuchszwecken unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Dr. Martin Runge vom Institut für Mikrobiologie der TiHo Hannover hatte es zur Verfügung gestellt und beaufsichtigte die Arbeiten zur Gewinnung von Antiserum.

Dem Tier wurden an einem Ohr außen die Haare mit einer Rasierklinge vorsichtig abgeschnitten und die Haut desinfiziert. Die Ohrvene musste am Ohrgrund abgedrückt werden, um sie oben mit einem Skalpell anzuritzen. Das austretende Blut wurde in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen und 5–10 min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde in ein neues Gefäß überführt und für die spätere Kontrolle eingefroren.

2.14.2 Immunisierung

Freunds Adjuvans (Cooper, 1981):

Mannidmonooleat	15	% v/v
Paraffinöl	85	% v/v
'komplett' mit:		
<i>Mycobacterium butyricum</i> (inaktiviert)	0,05	% w/v

Tag 1: Eine Vorkultur von *Azoarcus* sp. BH72 wurde mit Formaldehydlösung versetzt, um die Zellen abzutöten. Ein Vorversuch hatte ergeben, dass bei 0,4 % Formaldehyd als Endkonzentration die Bakterien gerade abgetötet waren. Eine NA-Platte (2.2.1) mit der konzentrierten Kultur diente als Kontrolle für die vollständige Abtötung der Bakterien. Nach 4 h Inkubation wurde die Kultur abzentrifugiert (15 min, 10.000 Upm) und das Pellet in PBS (2.2.9) aufgenommen, so dass die Suspension einen Proteingehalt (2.10) von 100 µg/ml aufwies. 1,2 ml wurden in einem Septumgläschen mit der gleichen Menge Freunds komplettem Adjuvans versetzt. Die restliche Suspension wurde für weitere Immunisierungen eingefroren (–20 °C).

Das Versuchstier wurde immunisiert durch intradermale Injektion von je 100 µl an 10–15 Lokalisationen im Hinterteil. Dazu wurde die Bakteriensuspension mit einer 5 ml-Einmalspritze und Kanüle gut durchgemischt, bis sie schaumig-weiß war. Durch das Adjuvans wurde die Immunantwort erhöht. Durch die stabile (gut durchmischte) Öl-Wasseremulsion wird das Immunogen über den Körper verteilt und nur sehr langsam freigesetzt. Das komplette

Adjuvans ist nur bei der ersten Applikation notwendig, wobei die Mycobacterien der allgemeinen Stimulierung des gesamten Immunsystems des Tieres dienen (Cooper, 1981).

Tag 28: Das Kaninchen wurde nachimmunisiert durch die intravenöse Gabe von 0,2 ml der eingefrorenen Bakteriensuspension mit 3 mg/ml Protein in Freund's Adjuvans.

Tag 59: Es folgte die dritte (*Booster-*) Immunisierung (wie Tag 28). Ein paar Tage zuvor war bereits Serum gewonnen worden, um es auf Spezifität zu testen (2.14.4, 2.14.5).

2.14.3 Gewinnung des Antiserums

Tag 66: Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen narkotisiert und das Herz mit einer speziellen Kanüle punktiert. Das ausgepumpte Blut (ca. 80 ml) wurde in einem Falconröhrchen aufgefangen. Das Blut wurde zum Gerinnen stehen gelassen und zentifugiert. Das gewonnene rosafarbene Serum (ca. 35 ml) wurde zum weiteren Gebrauch portioniert und der Rest mit Natriumazid (0,1 % NaN_3) konserviert. Kleinere Mengen (0,1–5 ml) wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Um einen Volumenverlust durch Sublimation zu verhindern, wurden bei $-85\text{ }^\circ\text{C}$ größere Portionen in 15 ml-Falconröhrchen eingefroren.

Für die Anwendungen in dieser Arbeit musste das polyklonale Serum nicht weiter aufgereinigt werden, wie die Spezifitätstests (3.1.1) zeigten.

2.14.4 Kolonieblot (IBA)

(colony immunobinding assay)

(M. Runge, Institut für Mikrobiologie, TiHo Hannover)

Dieses Verfahren eignet sich zur Identifizierung von Mikroorganismen auf einer Agaroberfläche. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Überprüfung des Antikörpertiters gegen *Azoarcus* sp. BH72 nach Immunisierung eines Versuchstieres eingesetzt. Die Arbeiten wurden im Labor des Instituts für Mikrobiologie der TiHo Hannover ausgeführt.

Als Ausgangsmaterial diente eine NA-Platte (2.2.1) mit Rifampicin, da hier *Azoarcus* sp. BH72 kleine Kolonien ohne Exopolysaccharide bildet (3.1.2.1). Ein Nitrocellulosefilter (\varnothing 1,5 cm, Schleicher & Schuell BA 85 $0,45\text{ }\mu\text{m}$) wurde vorsichtig auf ein paar Kolonien gelegt und nach 10–20 min bei RT mit den Kolonien nach oben in eine Makrowellplatte (Greiner) gelegt. Es folgte die Zugabe von $300\text{ }\mu\text{l}$ Serum. Zwei Filter wurden mit Normalserum (Negativkontrolle), zwei mit Antiserum vor der letzten Immunisierung für 1–2 h auf einem Rundschtüttler (300 Upm, RT) inkubiert. Das Serum wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Filter wurden 3-mal mit PBS gewaschen (1 ml, 10 min 300 Upm). Anschließend wurden $500\text{ }\mu\text{l}$ Antikaninchen-Serum zugegeben, mit dem die Filter für 1–2 h auf dem Schüttler inkubiert wurden. Nach Absaugen des Serums folgten drei Waschschrte mit PBS und $500\text{ }\mu\text{l}$ Substrat pro Filter wurden zugegeben. Nach ca. 3 min zeigte sich eine deutliche blauviolette

Farbreaktion, bei der das 4-Chlor-1-Naphthol zu einem unlöslichen Farbstoff oxidiert wurde. Die Reaktion wurde durch 2–3-maliges Waschen mit Leitungswasser abgestoppt. Schließlich wurden die Plättchen auf Filterpapier getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung unter dem Stereomikroskop. Positive Kolonien waren blauviolett, negative farblos.

Reagenzien:

PBS, hier:		
NaCl	8,0	g/l
KCl	0,2	g/l
KH ₂ PO ₄	0,2	g/l
Na ₂ HPO ₄	0,11	g/l
H ₂ O	ad 1,0	l
pH-Wert	7,2	
Normalserum aus Kaninchen (2.14.1)	1 : 100	in PBS
Antiserum gegen <i>Azoarcus</i> sp. BH72 aus Kaninchen (2.14)	1 : 100	in PBS
GAR-Peroxidase konjugiert	1 : 100	in PBS
Substrat, frisch ansetzen:		
Methanol	4,0	ml
4-Chlor-1-Naphthol (Aldrich)	12	mg
PBS (s. o.)	20	ml
H ₂ O ₂ (30 %ig)	20	μl

2.14.5 Serumspezifitätstest

(Reinhold *et al.*, 1986)

Dieser Test wurde wie der Kolonieblot (2.14.4) zur Überprüfung des Antikörpertiters gegen *Azoarcus* sp. BH72 vor der letzten Immunisierung (2.14) eingesetzt und im Labor des Instituts für Mikrobiologie der TiHo Hannover durchgeführt.

Reagenzien:

PBS (2.2.9)		
Normalserum aus Kaninchen (2.14.1)	1 : 25	in PBS
Antiserum gegen <i>Azoarcus</i> sp. BH72 aus Kaninchen (2.14)	1 : 25	in PBS
GAR-FITC konjugiert, im Dunkel halten	1 : 50	in PBS

Eine Vorkultur von *Azoarcus* sp. BH72 wurde zentrifugiert (15 min, 10.000 Upm), mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen, so dass eine OD₅₇₈ von 0,5 eingestellt wurde. In einem Eppendorfgefäß wurden 50 μl der Suspension mit 50 μl Antiserum bzw. Normalserum (Negativkontrolle) versetzt und 30 min bei RT auf einem Schüttler (500 Upm) inkubiert. Die

Zellen wurden abzentrifugiert (6 min, 5000 Upm) und in 100 μ l PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Zu den zentrifugierten Zellen wurden 50 μ l Antikaninchen-Serum gegeben und 30 min inkubiert (RT, 500 Upm, im Dunkeln). Es folgten wieder zwei Waschschriftte und die Aufnahme des Pellets in 50 μ l PBS. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zellen, an die der primäre und der sekundäre Antikörper gebunden hatten, zeigten durch das konjugierte Fluorochrom FITC (Anregungsmaximum: $\lambda = 494$ nm) eine grüne Fluoreszenz (Emissionsmaximum: $\lambda = 518$ nm).

2.15 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

(Schloter *et al.*, 1992, mod.)

Dieser Test wurde zur eindeutigen Identifizierung von *Azoarcus* sp. BH72 eingesetzt. Bei der Reisolierung der Bakterien (2.7) war dieses insgesamt vorteilhaft, bei den Gewächshaus-experimenten unerlässlich, bei denen keine sterilen Bedingungen eingehalten werden konnten. Nach der Gewinnung des Antiserums (2.14.3) wurden zunächst die geeigneten Verdünnungen für die Antikörper ermittelt und gleichzeitig Spezifitätstest mit anderen Bakterien durchgeführt (3.1.1.3).

Reagenzien:

Poly-L-Lysin (0,1% in H ₂ O, Sigma)		
PBS (2.2.9)		
Blockierlösung:		
PBS	10	% v/v
BSA (Fraktion V, pH 7, Serva)	3	% w/v
Waschlösung (WL):		
PBS	10,0	% v/v
BSA	0,3	% w/v
Tween 20® (Fluka)	0,05	% v/v
ABTS® (C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₆ S ₄ (NH ₄) ₂ , Boehringer)	1,0	mg/ml
in ABTS®-Puffer 10 %, Boehringer		
Antiserum gegen <i>Azoarcus</i> sp. BH72 aus Kaninchen (2.14)	1 : 5000	in WL
GAR-IgG, Peroxidase konjugiert (Sigma)	1 : 300	in WL

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (V-Form, Greiner) wurde pro Well mit 50 μ l Poly-L-Lysin beschichtet. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde mit je 200 μ l PBS pro Napf gewaschen. Jeweils 50 μ l der zu testenden Bakteriensuspension wurden dazugegeben. Aus einer Flüssig- oder einer semisolid-Kultur wurde direkt einpipettiert. Handelte es sich um die Überprüfung von Kolonien auf einer Agarplatte, wurden ein oder mehrere Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und vor dem Auftragen in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit 200 μ l PBS suspendiert. Nach 30 min Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37 °C

waren die Zellen durch das Poly-L-Lysin an die Platte gebunden und es folgte ein Waschschriff mit 200 μl PBS. Anschließend wurden die verbliebenen Bindungsstellen mit 200 μl Blockierlösung unspezifisch abgesättigt (30 min, 37 °C oder mindestens 1 h, RT). Danach wurde die Platte ausgeschlagen und abgetupft. Nach Zugabe von 50 μl Antiserum (primärer Antikörper, 30 min, 37 °C) verdrängen die spezifischen Antikörper durch ihre höhere Affinität das BSA von den Bindungsstellen der Zellen von *Azoarcus* sp. BH72. Nach 3 Waschgängen mit je 200 μl Waschlösung wurden jeweils 50 μl des sekundären Antikaninchen-Antikörpers (GAR) dazugegeben, der an den ersten Antikörper gebunden hat (45 min, 37 °C), gefolgt von 5-mal Waschen mit je 200 μl Waschlösung. Die Prozedur endete mit der Zugabe von 100 μl ABTS[®], das als Substrat für die an den GAR-Antikörper gekoppelte Peroxidase diente und zu einem grünen Farbstoff umgesetzt wurde. Als Negativkontrolle wurden pro Mikrotiterplatte drei Nöpfe mit PBS befüllt, als Positivkontrolle je drei Nöpfe mit einer Suspension von *Azoarcus* sp. BH72.

2.16 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Prinzip

In einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) wird das Präparat nicht flächig ausgeleuchtet, sondern es erfolgt eine Fluoreszenzanregung durch Abtasten mit einem Laserstrahl, der durch einen Scan-Spiegel bewegt wird und durch das Objektiv auf das Präparat trifft. Das langwellige Fluoreszenzlicht wird durch einen Strahlteiler vom kürzerwelligen Anregungslicht des Lasers abgetrennt, durch eine Lochblende (konfokales *Pinhole*) auf einen Detektor (*Photomultiplier*) gelenkt und in digitale Signale umgewandelt. Die Lochblende blockt das Licht aus den nicht fokussierten Objektbereichen ab, wodurch ein nahezu störfreies Bild aus der Fokusebene (*xy-Scan*) des Präparats entsteht. Ein Ausschnitt kann nacheinander in mehreren Ebenen mit definiertem Abstand (0,7–1,5 μm) abgetastet werden (*z-Serie*). Wenn diese mit Hilfe entsprechender Software übereinander gelegt werden, entsteht eine *z-Projektion*, die einem lichtmikroskopischen Bild ähnelt. Senkrecht dazu lässt sich ein optischer Schnitt parallel zur *z-Achse* legen (*z-Scan*), der es ermöglicht, in das Präparat „hinein zu sehen“. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 3 (Aßmus, 1996).

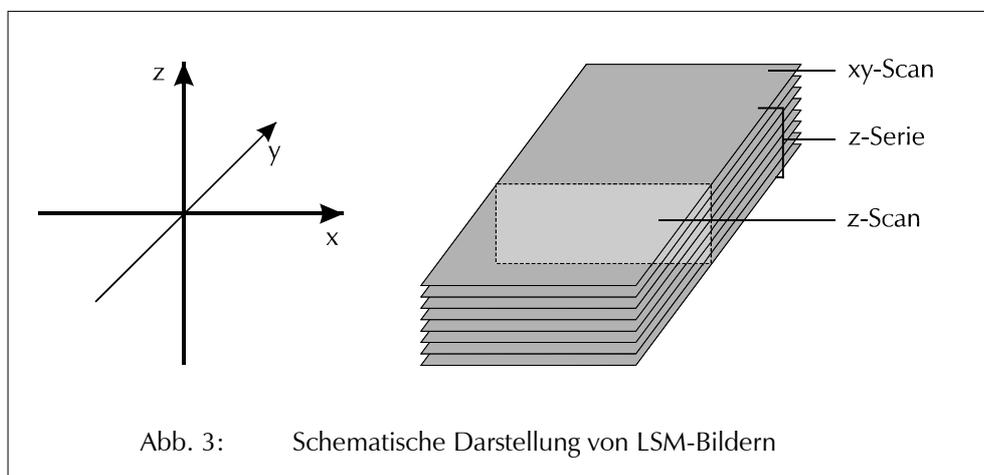
Das LSM an der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg) war mit Objektiven 40 x und 100 x, zwei Helium-Neon-Lasern (543 nm und 633 nm) und zwei Argon-Lasern (364 nm und 488/514 nm), verschiedenen Filtern und umfangreicher Software ausgestattet. Mit diesem Aufbau konnte die Autofluoreszenz der Wurzel und gleichzeitig die Fluoreszenz eines Farbstoffes angeregt werden. Wellenlängenspezifisch wurden daraus künstliche Farbbilder (*rgb-Bilder*) berechnet. Mit einem Antikörper-konjugierten Fluorochrom, konnten über Kopplung mit Antiserum Bakterien spezifisch sichtbar gemacht werden (Schloter *et al.*, 1993). Die Tabelle zeigt die verwendeten Fluorochrome und die Anordnung des LSM.

Fluorochrome:

	DAPI	Texas Red®/TRITC	FLUOS®
Anregungsmaximum	342 nm	545 nm	494 nm
Emissionsmaximum	442 nm	578 nm	517 nm
Laser	Ar, 364 nm	HeNe, 543 nm	Ar, 488 nm
Filter [nm]	BP 400–435	LP 590	BP 51–525 BP 525–565

BP: Bandpass-Filter, der bestimmte Wellenlängen passieren lässt.

LP: Longpass-Filter, der Wellenlängen oberhalb des Grenzwertes passieren lässt.



Die Nutzung des LSM wurde durch die Zusammenarbeit mit Dr. Bernhard Aßmus und Dr. Anton Hartmann am Institut für Bodenökologie der GSF ermöglicht. Der größte Teil der Präparationen wurde im dortigen Labor durchgeführt.

2.16.1 Probenaufbereitung

Für die Markierung der inokulierten Pflanzenproben mit Antiserum musste eine Vorbehandlung erfolgen. Stücke von Wurzel und Spross wurden nach der Ernte unter sterilen Bedingungen und gründlichem Waschen mit Leitungs- und destilliertem Wasser zunächst in Plastikflaschen in Alkohol bei -20 °C aufbewahrt und anschließend mit der Methode nach Bauwens *et al.* (1994) fixiert.

Reagenzien

PBS (2.2.9)

Formaldehydlösung:

Formaldehyd	1	ml
DMSO (Serva)	10	ml
EGTA (Serva)	60	mM
langsam dazugeben, pH-Wert 6,8 stets mit NaOH (25 %) nachjustieren		
PBS	ad 100	ml

PBT-Puffer:

PBS mit 0,05 % Tween 20 [®] (Fluka)		
Proteinkinase K in PBT-Puffer	40	µg/ml

Die Behandlung der Proben erfolgte bei RT und begann mit einer 25-minütigen Inkubation in Formaldehydlösung, gefolgt von 5 min in Methanol und 4-mal Spülen in Ethanol. In dieser Lösung wurden die Proben 3 Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ entwässert. Für 30 min wurde ein Ethanol-Xylol-Gemisch (1 : 1) dazugegeben und je 2-mal in Ethanol und Methanol gespült, dann 5 min stehen lassen in Methanol/PBT-Puffer (1 : 1) mit 1 % Formaldehyd. Es folgte eine Nachfixierung in PBT-Puffer mit 1 % Formaldehyd (25 min) und 5-mal Spülen mit PBT-Puffer. Die Proben wurden danach für 8 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Proteinkinase K verdaut und anschließend in PBT-Puffer gewaschen (5 min). PBT-Puffer mit 1 % Formaldehyd wurde für 25 min zur Nachfixierung dazugegeben und danach mit PBT-Puffer ausgewaschen (5 min).

2.16.2 Markierung mit Antikörpern

(Schloter, 1993)

Eine indirekte Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe von Antikörpern ist in einem Zweischrittverfahren möglich, in dem ein sekundärer Antikörper, der mit Biotin markiert ist, an den primären bindet. Der sekundäre Antikörper wird dann mit Streptavidin, an welches Fluorochrome gekoppelt sind, detektiert.

Die fixierten Pflanzenstücke (2.16.1) wurden in einer Glaspetrischale zunächst mit Blockierlösung beschickt (30 min) und mit vorgewärmter ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) Waschlösung (WL) gründlich abgespült. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer äquilibrierten Kammer (feucht). Die Objekte wurden zuerst mit Antiserum (primärer Antikörper) vollständig bedeckt (30 min) und nach Abspülen mit WL mit dem sekundären Antikörper (DAR) 40 min inkubiert. Es folgte ein Waschschritt und das Fluorochrom wurde aufgetragen (20 min). Dann wurden die Objekte erneut gewaschen, zuletzt mit PBS und H_2O .

Reagenzien:

PBS (2.2.9)		
Blockierlösung:		
BSA (Sigma) in PBS	3,0	% w/v
Waschlösung (WL):		
PBS	10,0	% v/v
BSA	0,1	% w/v
Tween 20 [®] (Fluka)	0,05	% v/v
Antiserum gegen <i>Azoarcus</i> sp. BH72 aus Kaninchen (2.14)	1 : 100	in WL
DAR-IgG, biotinyliert (Amersham)	1 : 300	in WL
Texas Red [®] -Streptavidin (Amersham)	1 : 40	in WL

2.16.3 In-situ-Hybridisierung

Neben der indirekten Markierung mit spezifischen Antikörpern wurde die direkte Detektion durch Oligonukleotidsonden eingesetzt. Es handelt sich um rRNA-Sonden, die mit einem Fluorochrom markiert sind. Sie binden an die RNA aktiver Ribosomen, so dass Zellen markiert werden, die zum Zeitpunkt der Fixierung aktiv waren. Es wurden unspezifische Sonden verwendet, die Eubakterien bzw. die β -Unterklasse der Proteobakterien markieren.

Sonden:

	Fluorochrom	Zielgruppe	Referenz
EUB338 (16S rRNA)	FLUOS [®]	<i>Eubacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990
BET42a (23S rRNA)	TRITC	β - <i>Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> , 1992

Die Sonden wurden am GSF-Forschungszentrum aufbereitet (Aßmus, 1996) und freundlicherweise von Dr. Bernhard Aßmus gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt.

Waschlösung:

Tris	2,4	g/l
Na ₃ -EDTA	2,0	g/l
SDS	0,2	g/l
H ₂ O	ad	l
pH-Wert	7,4	
NaCl-Zugabe: für EUB338	0,98	M
NaCl-Zugabe: für BET42a	0,06	M
aus einer 4,5 M Stammlösung.		

Sondenlösung:

Sonde in TE-Puffer	50	ng/ μ l
TE-Puffer:		
Tris	1,2	g/l
Na ₃ -EDTA	0,4	g/l
H ₂ O	ad 1,0	l
pH-Wert	7,5	

Hybridisierungslösung:

Waschlösung mit		
Formamid-Zugabe für EUB338	0	%
Formamid-Zugabe für BET42a	35	%

Die Pflanzenproben wurden bei dieser Präparation direkt auf großen Deckgläsern (50 · 24 mm, Stärke 2) fixiert. Diese waren zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt und die Proben entwässert worden (je 5 min, RT in 80 % und 100 % Ethanol). Die Wurzelstücke wurden an ihren Enden mit 0,3 %iger Agarose auf dem Deckglas immobilisiert (Trocknen bei 37 °C). 8 μ l vorgewärmte (48 °C) Hybridisierungslösung wurden auf die Probe gegeben und 1 μ l Sondenlösung darin verteilt. Die Hybridisierung erfolgte für 1,5–2,5 h bei 46 °C in der äquilibrierten Kammer. Die Bindungselektivität der verwendeten Sonden ist dabei streng abhängig von der Na⁺- und der Formamidkonzentration. Die Bedingungen zur Erhöhung der Stringenz wurden von Aßmus (1996) optimiert. Schließlich wurden die Deckgläser kurz abgespült, in die Waschlösung gestellt (20 min, 48 °C), mit H₂O gespült und an der Luft getrocknet (RT). Es schloss sich eine Gegenfärbung mit DAPI (2.16.4) an.

2.16.4 DAPI-Färbung

(Aßmus, 1996; Porter und Feig, 1980)

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in DNA einlagert und praktisch alle vorhandenen Zellen färbt. Sollten die Präparate noch mit DAPI gegengefärbt werden, wurden sie vor dem letzten Waschschrift der Antikörper-Markierung (2.16.2) bzw. nach der *in-situ*-Hybridisierung (2.16.3) mit einer frisch angesetzten DAPI-Gebrauchslösung für 5–10 min (RT) bedeckt, gründlich mit H₂O gespült und an der Luft getrocknet.

DAPI-Stammlösung (1 mM in H ₂ O, –20 °C) (4', 6-Diamidino-phenylindol, C ₁₆ H ₁₅ N ₅ · 2 HCl; Sigma)	0,35	mg/ml
DAPI-Gebrauchslösung	1 : 500	in PBS

2.17 Rasterelektronenmikroskopie

In Alkohol/PBS (2.2.10) oder in Glycerin (10 %) konservierte Wurzelproben wurden einer Standardprobenaufbereitung nach Robinson *et al.* (1984) unterzogen. Die Probenvorbereitung und die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden von Armgard Janczikowski am Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover durchgeführt.

DMA-Puffer:

Dimethylarsinsäure (2 M, pH 7,2)	52,8	ml
Glutaraldehydlösung (25 %)	7,2	ml

Untersucht wurden Proben von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 aus einer Hoagland-Hydrokultur und Proben aus Topfversuchen mit Hirse, die mit *Azoarcus* sp. BH72 und *Glomus intraradices* inokuliert war. Wurzelproben wurden zunächst mit DMA-Puffer für 1 h auf Eis fixiert. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 20 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 99,8 % Ethanol. In der letzten Lösung wurden die Proben in einem *Critical-Point-Dryer* mit flüssigem CO₂ getrocknet und unmittelbar danach in einer Kathodenzerstäubungsanlage („Sputtergerät“) mit reinem Gold bedampft. Das Präparat war damit konserviert und ist in einem Exsikkator nahezu unbegrenzt lagerfähig. Durch den Goldüberzug sind alle Oberflächen für den Elektronenstrahl undurchdringlich und man erhält Bilder vom Relief des Präparats, die fotografiert wurden.

2.18 DNA-Analysen

2.18.1 PCR-Fingerprinting

(Gündisch *et al.*, 1993)

Mit diesem System können reproduzierbar stammspezifische Muster erzeugt werden. Die DNA wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten und mit einem Primer inkubiert. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem Polyacrylamidgel (Auflösung 1000–150 bp) und in einem Agarosegel (4000–400 bp) aufgetrennt. Der Primer „GRK“ ist komplementär zu repetitiven Sequenzen (LINES, *long interspaced elements*), die in allen Bakterien vorkommen, aber durch verschiedene Schnittstellen von Restriktionsenzymen in unterschiedlich lange Stücke getrennt werden. Neben dem stammspezifischen Muster treten immer gattungs-, art- und andere gruppenspezifische Banden auf (Kirchhof, 1995, pers. Mitteilung).

Dieses System wurde an der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH), Neuherberg, entwickelt und patentiert. Die hier gezeigten Arbeiten wurden von Dr. Gudrun Kirchhof durchgeführt.

2.18.2 SSCP-Analyse (*single-strand conformation polymorphism*)

(Orita *et al.*, 1989)

Mit Hilfe der SSCP-Analyse können Sequenzunterschiede innerhalb von kurzen, bis ca. 200 bp langen PCR-Amplifikaten festgestellt werden, da die Mobilität im elektrischen Feld nicht nur von der Größe sondern auch von der Sequenz des DNA-Fragments abhängt. Die DNA wurde denaturiert und auf ein gut temperiertes Polyacrylamidgel und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die sequenzabhängige Neuausbildung der Konformation der Einzelstränge wurde analysiert. Es wurden die hochvariable Region der für die 23 S rRNA codierenden DNA (rDNA) und der Primer 1860–317 gewählt. In dieser Region können sehr häufig artspezifische Sequenzunterschiede gefunden werden (Ludwig *et al.*, 1994). Diese Analyse verdanke ich ebenfalls Dr. Gudrun Kirchof.

3 ERGEBNISSE

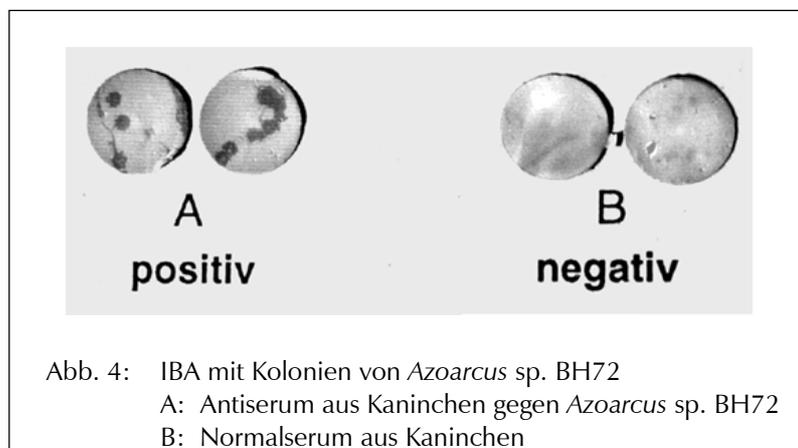
3.1 Grundlagen

3.1.1 Antiserumtests

Mit dem von Kaninchen gebildeten Antiserum gegen *Azoarcus* sp. BH72 wurden verschiedene Spezifitätstests durchgeführt.

3.1.1.1 IBA

Das vor der letzten Immunisierung gewonnene Serum und das Normalserum wurden mit einem IBA auf den Gehalt an Antikörpern untersucht. In Abb. 4 sind auf den Filterpapieren bei A Kolonieabdrücke zu erkennen, an die die Antikörper des Antiserums gebunden haben; das Normalserum (B) enthielt keine Antikörper gegen *Azoarcus* sp. BH72. Die Farbe entsteht durch die Reaktion eines an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzyms mit 4-Chlor-1-Naphthol zu einem unlöslichen Farbstoff.



3.1.1.2 Serumspezifitätstest

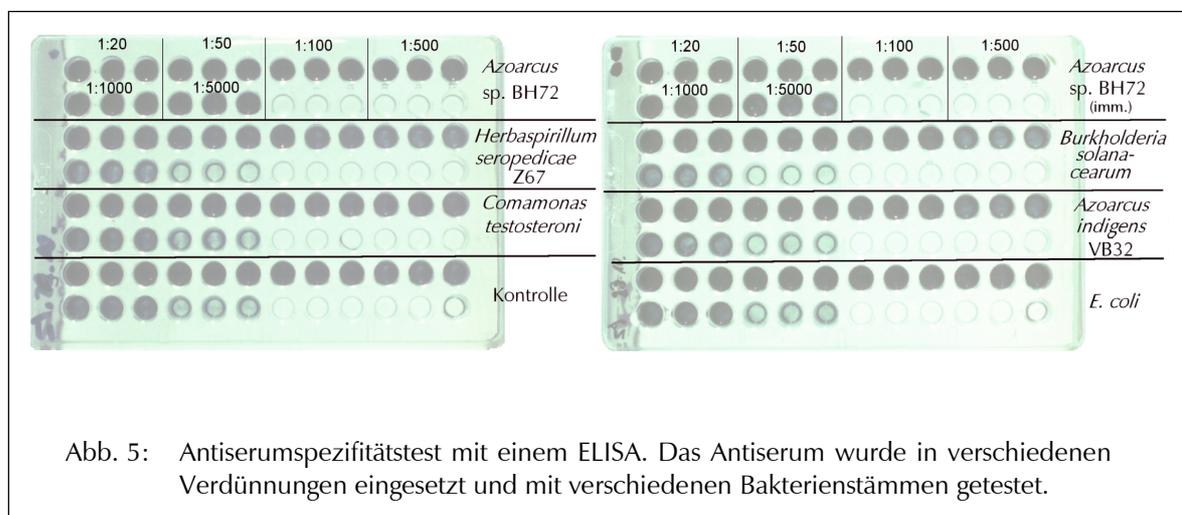
Mit dem vor der letzten Immunisierung entnommenen Testserum wurde ein weiterer Spezifitätstest durchgeführt. Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 zeigten im Fluoreszenzmikroskop eine grüne Fluoreszenz, wenn sie mit dem Antiserum inkubiert wurden, mit Normalserum hingegen nicht. Das Versuchstier besaß vor der Immunisierung keine Immunglobuline gegen *Azoarcus* sp. BH72, und hatte durch die Impfung einen ausreichenden Antikörpertiter aufgebaut. Danach folgte die „Booster“-Immunisierung.

3.1.1.3 ELISA

In einem ELISA (Abb. 5) wurde das gewonnene Antiserum auf seine Spezifität hin getestet und dabei die Methodik optimiert. Das Antiserum wurde in folgenden Konzentrationen mit den genannten Bakterien eingesetzt:

Antiserumkonzentration	1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 5000
Bakterium	<i>Azoarcus</i> sp. BH72 <i>Azoarcus</i> sp. BH72 (imm.) <i>Azoarcus indigens</i> VB32 <i>Burkholderia solana-cearum</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>E. coli</i> <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67

Als Kontrolle diente PBS. Das als *Azoarcus* sp. BH72 (imm.) bezeichnete Bakterium stammte aus derjenigen Kultur, welche für die Immunisierung verwendet worden war. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse auf den ELISA-Platten.



Das polyklonale Serum erwies sich bei einer Verdünnung von 1 : 5000 als hoch spezifisch, um *Azoarcus* sp. BH72 eindeutig identifizieren zu können. Selbst mit dem nahe verwandten *Azoarcus indigens* VB32 blieb hier die für eine positive Reaktion charakteristische Grünfärbung aus. Bei den anderen Verdünnungen war das Antiserum zu hoch konzentriert und hatte gebunden, wie die Kontrollen zeigten. Wurde der ELISA zur Identifizierung von *Azoarcus* sp. BH72 in einer Suspension mit hoher Dichte verwendet, konnte das Antiserum auch 1 : 10.000 verdünnt eingesetzt werden.

3.1.2 Genotypisierung morphologisch abweichender Kolonien von *Azoarcus* sp. BH72

3.1.2.1 Exopolysaccharidbildung bei *Azoarcus* sp. BH72

Es wurde festgestellt, dass *Azoarcus* sp. BH72 auf NA-Platten stets einen charakteristischen Hof aus Exopolysacchariden (EPS) zeigte (Abb. 6, links). Die Rifampicin-resistente Mutante, die bei der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, bildete auf NA-Platten mit Rifampicin wenig oder gar keine EPS (Abb. 6, rechts).

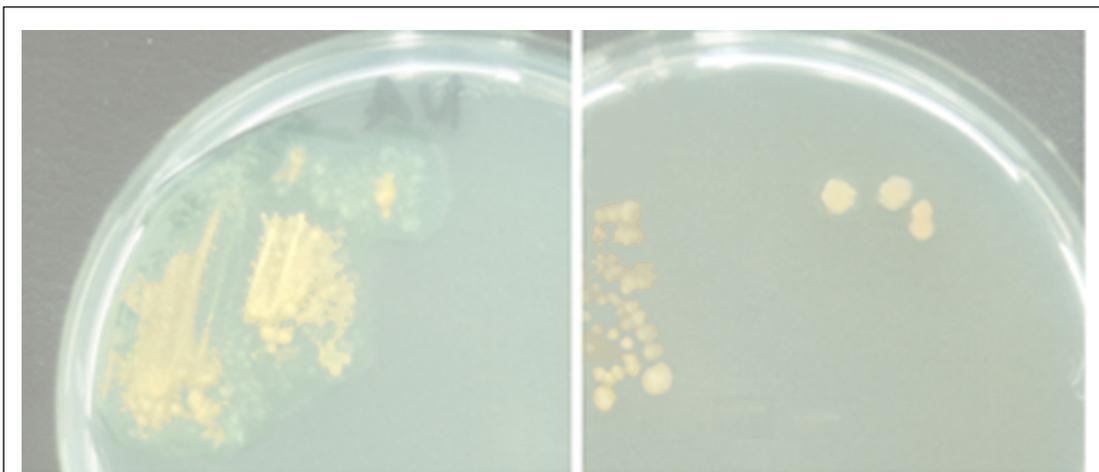


Abb. 6: Koloniemorphologie von *Azoarcus* sp. BH72. Links: Das Bakterium bildet auf NA-Platten einen charakteristischen Hof mit Exopolysacchariden (EPS). Rechts: Kolonien auf einer NA-Platte mit Rifampicin. Die Bildung von EPS ist gegenüber der auf einer reinen NA-Platte deutlich verringert.

Im Rahmen der laufenden Dissertation am Institut für Biophysik von Dipl.-Biol. Rüdiger Stanke wurde festgestellt, dass eine weitere Mutante von *Azoarcus* sp. BH72 ebenfalls nur wenig EPS auf NA bildet. Der Stamm wurde mit einem *gus*-Insert versehen und exprimiert konstitutiv β -Glucuronidase.

In einem Experiment zum Besiedlungsverlauf von *Azoarcus* sp. an Hirse (3.2.3), fanden sich bei der Reisolierung der Bakterien auf einer NA-Platte Kolonien mit und ohne EPS. Je länger die Bakterien mit der Pflanze zusammen kultiviert wurden, desto häufiger traten Kolonien ohne EPS auf. Am Ende des Versuchs machten sie bis zu einem Drittel der Kolonien einer Platte aus. Diese Kolonien zeigten ansonsten die typische Morphologie und waren rund, glatt, beigefarben und leicht transparent. In der im Folgenden beschriebenen DNA-Analyse wurde gezeigt, dass es sich nicht um eine Kontaminante handelte (3.1.2.2).

3.1.2.2 DNA-Analysen von *Azoarcus* sp. BH72

Aufgrund der Beobachtung, dass *Azoarcus* sp. BH72 bei einer Reisolierung Kolonien mit und ohne Exopolysaccharide nebeneinander zeigte (3.1.2.1), wurden DNA-Analysen durchgeführt, um die Isolate eindeutig zu identifizieren.

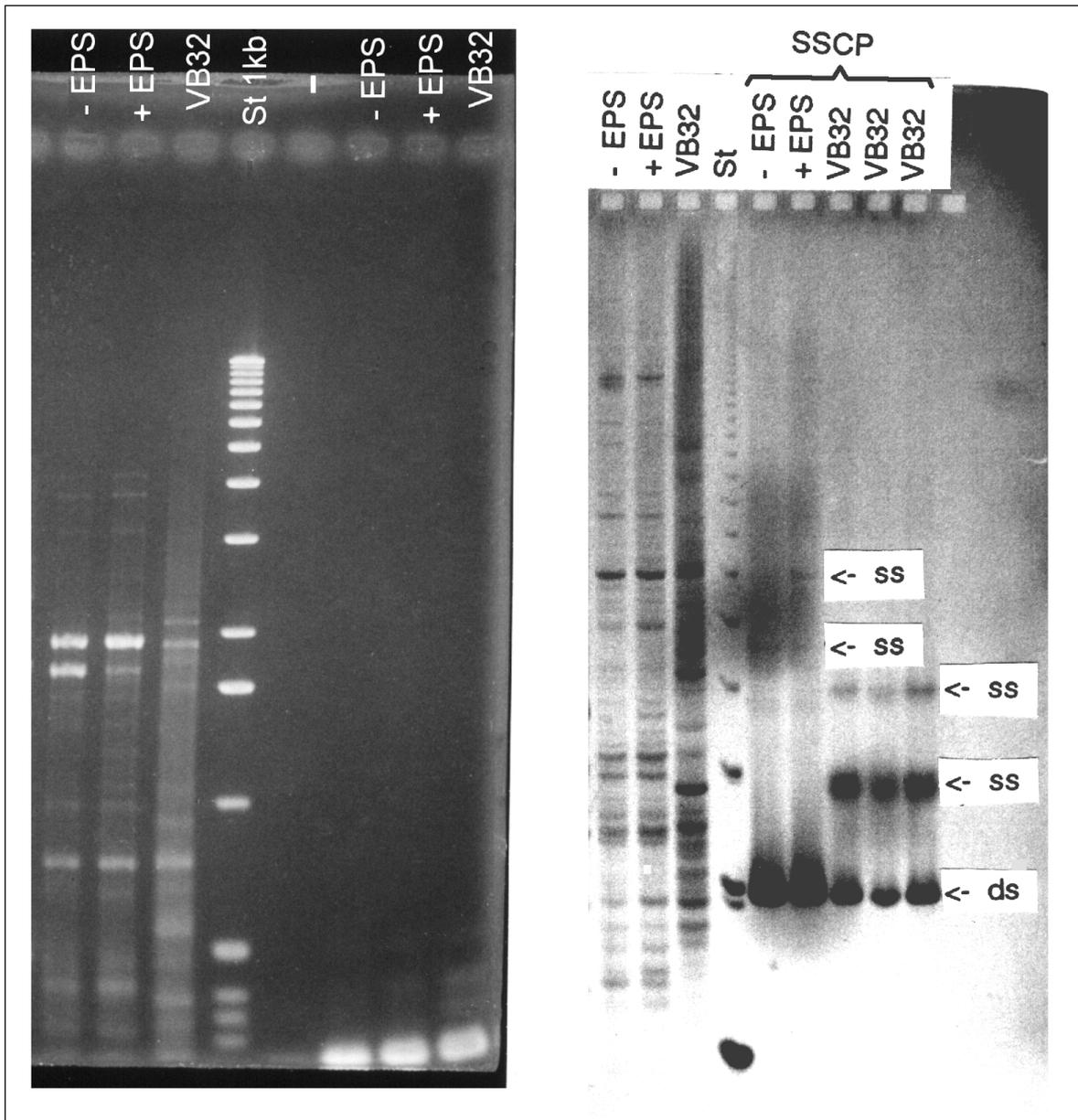


Abb. 7: DNA-Fingerprinting und SSCP-Analyse von *Azoarcus* sp. Links: Polyacrylamidgel, rechts Agarosegel. +EPS bzw. -EPS: *Azoarcus* sp. BH72 mit bzw. ohne Exopolysaccharide, VB32: *Azoarcus indigenes* VB32, St: Standard, ss: Einzelstrangbanden der SSCP-Analyse, ds: Doppelstrangbanden.

In Abb. 7 ist links ein Polyacrylamidgel dargestellt, auf dem die DNA von *Azoarcus* sp. BH72 mit (+EPS) und ohne (–EPS) Exopolysaccharide und von *Azoarcus indigenus* VB32 (VB32) sowie ein Längenstandard (St 1 kb) aufgetragen sind. Mit 'ss' sind die Einzelstrangbanden der SSCP-Analyse gekennzeichnet. Abb. 7 zeigt rechts ein Agarosegel, das ebenso wie das Polyacrylamidgel beladen wurde. Die drei linken Spuren zeigen Amplifikationsprodukte des PCR-Fingerprinting, die drei rechten eine SSCP-Analyse.

Die beiden Gele ergaben völlig identische Fingerprint-Muster für die beiden BH72-Isolate. Sie wiesen signifikante Unterschiede zu VB32 auf, zeigten aber auch einige gemeinsame Banden, welche die Verwandtschaft zu *Azoarcus indigenus* belegen. Die SSCP-Analyse zeigte, dass die Basensequenzen von BH72 +EPS und –EPS identisch waren und Unterschiede zu VB32 aufwiesen. Da die untersuchte Region sehr klein war, sind die Banden nur auf dem Polyacrylamidgel (Abb. 7 links) sichtbar, das Agarosegel hatte eine geringere Auflösung; die Banden sind hier am unteren Rand zu erkennen.

3.1.3 Sauerstoffabhängige Nitrogenaseaktivität bei *Azoarcus* sp. BH72

Um einen Hinweis auf die Stickstofffixierung zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen zu erhalten, kann ein Acetylenreduktionstest (ARA) durchgeführt werden. Kulturen von *Azoarcus* sp. BH72 wurden in Kölbchen mit flüssigem NFb-Medium in eingestellter Atmosphäre und bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert und wurden während der Versuchsdauer von 46 h bei 35 °C im Wasserbad geschüttelt (100 Apm). Mit Hilfe eines Gaschromatographen wurde die Ethylenproduktion zu definierten Zeitpunkten gemessen und daraus die spezifische Nitrogenaseaktivität berechnet. In Parallelkolben wurden gleichzeitig die OD₅₇₈ und der Proteingehalt bestimmt.

Abb. 8 zeigt, dass die höchste Nitrogenaseaktivität nach 26,5 h gemessen wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren die Bakterien innerhalb eines Bereiches von 3–8 % O₂ besonders aktiv, mit einer Peak-Aktivität bei einer O₂-Konzentration von 5 % (≅ 25 % pLuft). Bei einer Konzentration von <1 % wurde kaum Acetylen umgesetzt, und die Bakterien zeigten während der ganzen Inkubationszeit kein Wachstum (vgl. OD₅₇₈).

Beim Einstellen einer Atmosphäre mit mehr als 5 % O₂ kam es in den gasdichten Kolben versuchsbedingt zu einem leichten Überdruck, so dass die Konzentration des Acetylens, welches als letztes Gas zugegeben wurde, weniger als 10 % betrug. Es wurden Kontrollen ohne Bakterien mit der höchsten O₂-Konzentration begast. Das hier gemessene Ethylen wurde von den jeweiligen Proben abgezogen. Mit Dauer des Versuchs nahm diese Menge zu, was auf die spontane Reduktion des Acetylens hindeutet. Kontrollen nach Versuchsende bestätigten deren Sterilität.

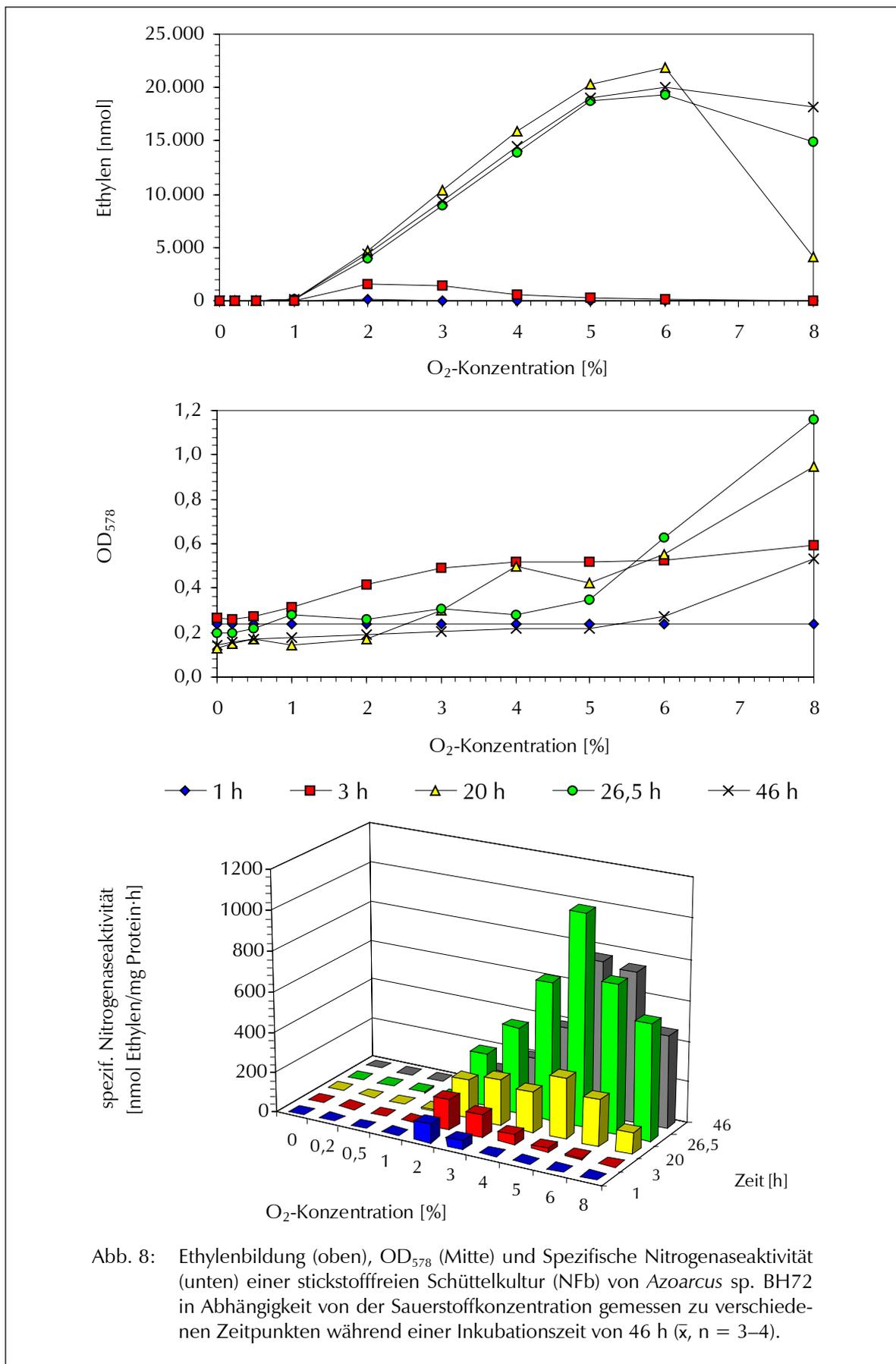


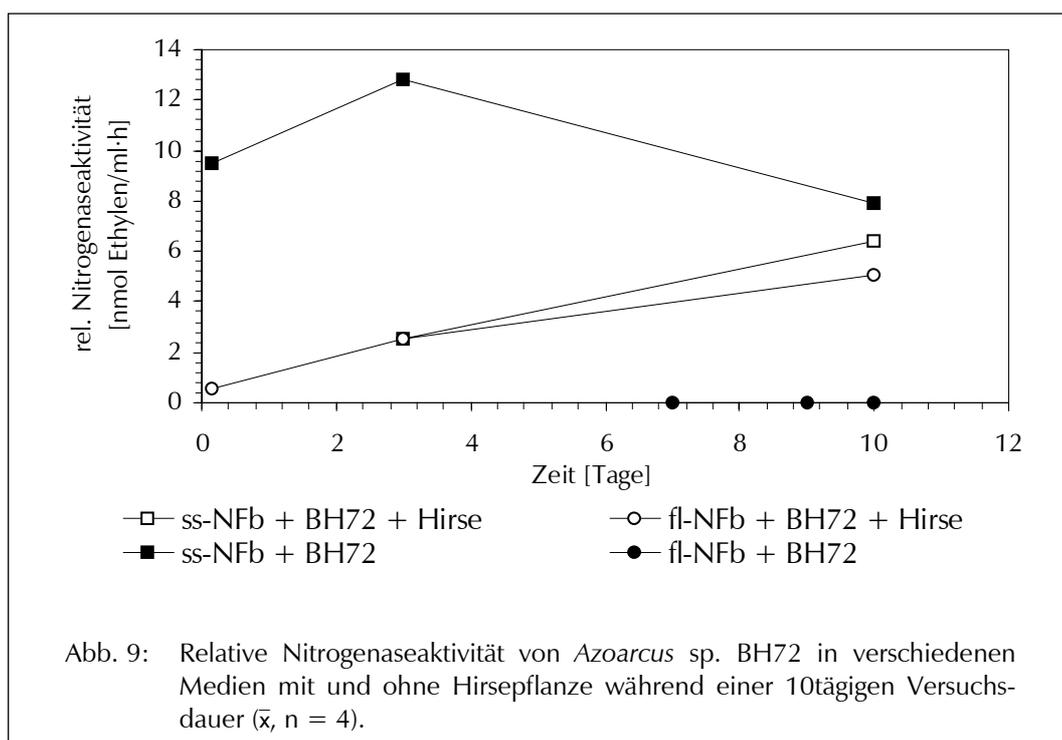
Abb. 8: Ethylenbildung (oben), OD₅₇₈ (Mitte) und Spezifische Nitrogenaseaktivität (unten) einer stickstofffreien Schüttelkultur (NFb) von *Azoarcus* sp. BH72 in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten während einer Inkubationszeit von 46 h (\bar{x} , n = 3–4).

3.1.4 Nitrogenaseaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 in gemeinsamer Kultur mit Hirse

Dieser Versuch sollte bestimmen, ob *Azoarcus* sp. BH72 unter Kultivierungsbedingungen mit und ohne Pflanze messbare Nitrogenaseaktivität zeigt. In diesen Systemen kann die aktuelle Anzahl der Bakterien oder deren Biomasse nicht erfasst werden. Es war aber möglich, die relative Nitrogenaseaktivität, d. h. bezogen auf das Medienvolumen, anzugeben.

Aus einer Vorkultur wurde 1 ml in Pflanzröhren mit 50–60 ml des entsprechenden Mediums injiziert (durchschnittliche Animpfdichte $3 \cdot 10^6$ cfu/ml) und 6 Tage später unter Acetylen in der Klimakammer inkubiert; die Kontrollen enthielten keine Bakterien. Die Ethylenproduktion wurde in verschiedenen Zeitabständen gaschromatographisch bestimmt. Abb. 9 zeigt Mittelwerte aus 4 Parallelen für folgende Ansätze:

- ◆ flüssiges NFb-Medium (fl-NFb) mit und ohne Hirsekeimling
- ◆ semisolid NFb-Medium (ss-NFb) mit und ohne Hirsekeimling



Die Bakterien zeigten die höchste Nitrogenaseaktivität im semisolid-NFb-Medium, das selektiv diazotrophe mikroaerophile Mikroorganismen anreichert. Die Aktivität ist in Gegenwart der Pflanze zunächst geringer, gleicht sich jedoch gegen Versuchsende an. In flüssigem Medium wurde eine sehr geringe Ethylenproduktion gemessen, zusammen mit Hirse war die Produktion mit der in semisolid-Medium mit Pflanze vergleichbar. Es ist jedoch anzumerken, dass sich ein Medium mit derartig hoher Konzentration an C-Quelle hemmend auf das Wachstum der Hirse auswirkte (vgl. 3.2.1).

3.1.5 Untersuchung von VAM-Sporen auf diazotrophe Bakterien

Um zu bestimmen, ob mit den Pilzsporen bereits vorab assoziierte Bakterien in die Experimente eingebracht werden, wurden Sporen von *Glomus fasciculatum*, *G. etunicatum*, *G. clarum* und *Gigaspora margarita* auf eine Besiedlung mit diazotrophen Bakterien hin untersucht. In Brasilien (EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, R.J., Brasilien) wurden Sporen aus dem dort für die Versuche (3.1.6) verwendeten Material extrahiert, separiert und verschiedenen Behandlungen ausgesetzt:

♦ gewaschen	1, 5, 10, 50 Sporen
♦ oberflächensterilisiert	1, 5, 10, 50 Sporen
♦ oberflächensterilisiert und aufgebrochen	1, 5, 10, 50 Sporen

Die Sporen wurden zu unterschiedlichen Mengen in einem Selektivmedium für stickstoff-fixierende Bakterien (semisolid-NFb-Medium) bei 30 °C inkubiert. Zum Aufbrechen wurden die Sporen beim Umsetzen aus der letzten Waschlösung vorsichtig mit einer flachen Pinzette gequetscht. Drei Parallelen wurden angeimpft; als Kontrolle diente die Waschlösung. Die Gläschen, in denen sich ein für Diazotrophe typisches Pellicle bildete, wurden weiter untersucht. Die Identifizierung der gefundenen Mikroorganismen (Tab. 1, 1b) gelang mit Hilfe spezifischer Selektivmedien (JNFb, semisolid und als Platten, Kongorotagar) und mikroskopischer Methoden unter Anleitung von Dr. Johanna Döbereiner und Dr. Vera L.D. Baldani (EMBRAPA-CNPAB).

Tab. 1: Von VAM-Sporen isolierte diazotrophe Bakterien.

VAM-Sporen von	Pellicle in	Bakterium
<i>Glomus fasciculatum</i> Institut für Phytopathologie	NFb und JNFb ab 10 Sporen	<i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Isolat E (<i>Burkholderia</i> sp.)
<i>Glomus clarum</i> EMBRAPA-CNPAB	NFb und JNFb ab 50 Sporen	<i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<i>Glomus etunicatum</i> EMBRAPA-CNPAB	JNFb ab 1 Spore	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<i>Gigaspora margarita</i> EMBRAPA-CNPAB	kein Pellicle	

Bei oberflächensterilisierten Sporen und bei den Kontrollen zeigte sich weder bei intakten noch bei aufgebrochenen Sporen Bakterienwachstum.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den Experimenten am EMBRAPA-CNPAB (3.1.6) die Sporen von *G. fasciculatum* und *G. clarum* oberflächensterilisiert. Das im späteren Verlauf der Arbeit am Institut für Biophysik eingesetzte Material von *G. intraradices* wurde generell einer

Oberflächensterilisation unterzogen, um auch Kontaminationen mit anderen Bodenbakterien und Pilzen weitgehend zu beseitigen.

Tab. 1b: Charakteristika der gefundenen diazotrophen Bakterien.

Bakterium	Charakteristika
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Wachstum in NFb, dunkelrote Kolonien auf Kongo-rotagar, großes Spirillum-förmiges Bakterium
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Wachstum in JNFb, helle Kolonien mit blauem Zentrum auf JNFb-Agar mit 3-fach Bromthymolblau, sehr kleines, kurzes Stäbchen, mit starker Beweglichkeit besonders in der Nähe von Luftblasen
Isolat E (<i>Burkholderia</i> sp., Hartmann et al., 1995)	Wachstum in NFb, kleines, sehr kurzes Stäbchen mit lichtbrechender Kapsel

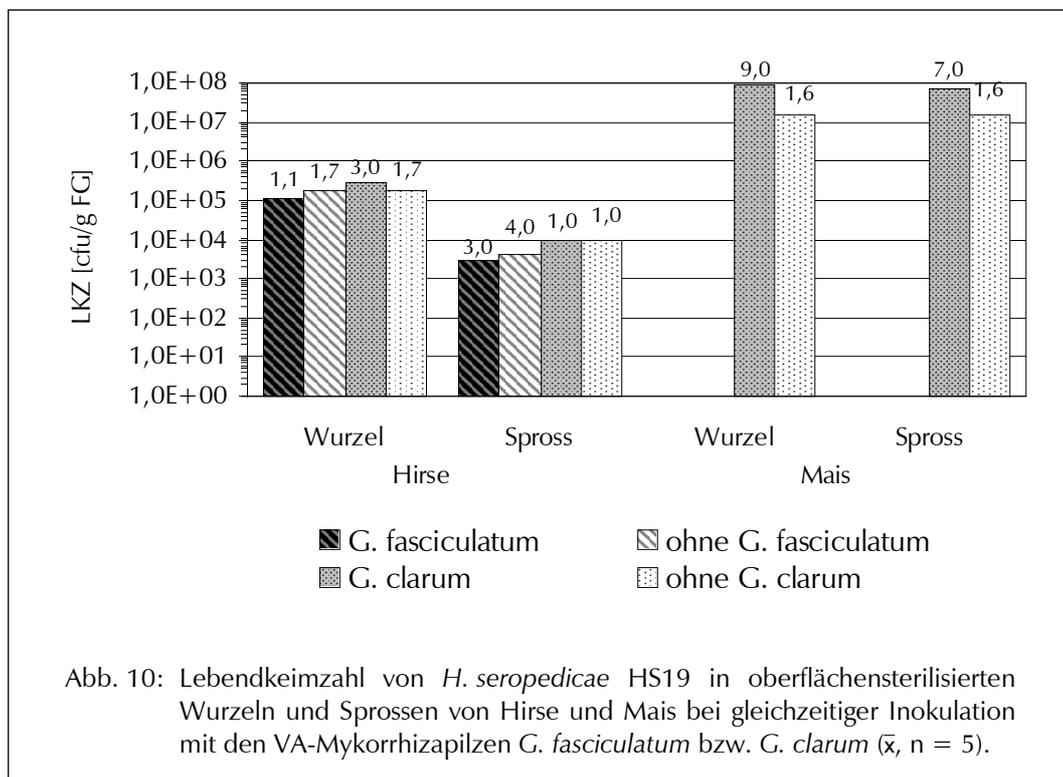
3.1.6 Inokulation von Hirse und Mais mit *H. seropedicae* HS19 und verschiedenen VAM-Pilzen

In dem am EMBRAPA-CNPAB (Seropédica, R.J., Brasilien) durchgeführten Versuch sollte die Besiedlung von Hirse und Mais mit dem gut untersuchten endophytischen Bakterium *H. seropedicae* HS19 unter dem Einfluss der VA-Mykorrhizapilze *G. clarum* und *G. fasciculatum*, untersucht werden. Es wurde ein keimarmes System aus kleinen Töpfen und einem Vermikulit-Sand-Gemisch als Substrat gewählt. Das VAM-Inokulum stammte vom Institut für Phytopathologie, Universität Hannover (*G. fasciculatum*) und vom EMBRAPA-CNPAB (*G. clarum*). Die Mykorrhizasporen wurden aus Sand gewonnen, separiert und oberflächensterilisiert. Diazotrophe Bakterien wurden mit einer Dichte von 10^{11} cfu/g in Torf angeimpft, der um jeweils 3 steril angezogene Keimlinge platziert wurde. Dort wurde auch die Sporensuspension aufgebracht. Die Pflanzen wuchsen 4 Wochen im Gewächshaus. Im Anschluss wurden die Bakterien aus oberflächensterilisierten Wurzeln und Sprossen reisoliert, mit der MPN-Methode quantifiziert und mit einem ELISA für *H. seropedicae* auf Identität geprüft.

Abb. 10 stellt die Lebendkeimzahl von *H. seropedicae* HS19 an Hirse im Vergleich mit Mais dar. In Pflanzen aus Ansätzen ohne *H. seropedicae* wurden keine Bakterien gefunden. Der Mykorrhizierungsgrad betrug 3–4 %, wobei Arbuskel und Vesikel sowie intra- und extrazelluläre Hyphen und junge Sporen gefunden wurden.

Vergleich mit Mais

Für einen Vergleich wurden Maispflanzen unter den gleichen Bedingungen angezogen. Auch hier wurde aus den entsprechenden Kontrollen kein *H. seropedicae* isoliert. Die Ergebnisse zusammen mit denen aus Hirse sind in Abb. 10 zusammengefasst. Der Mykorrhizierungsgrad betrug maximal 3 %.



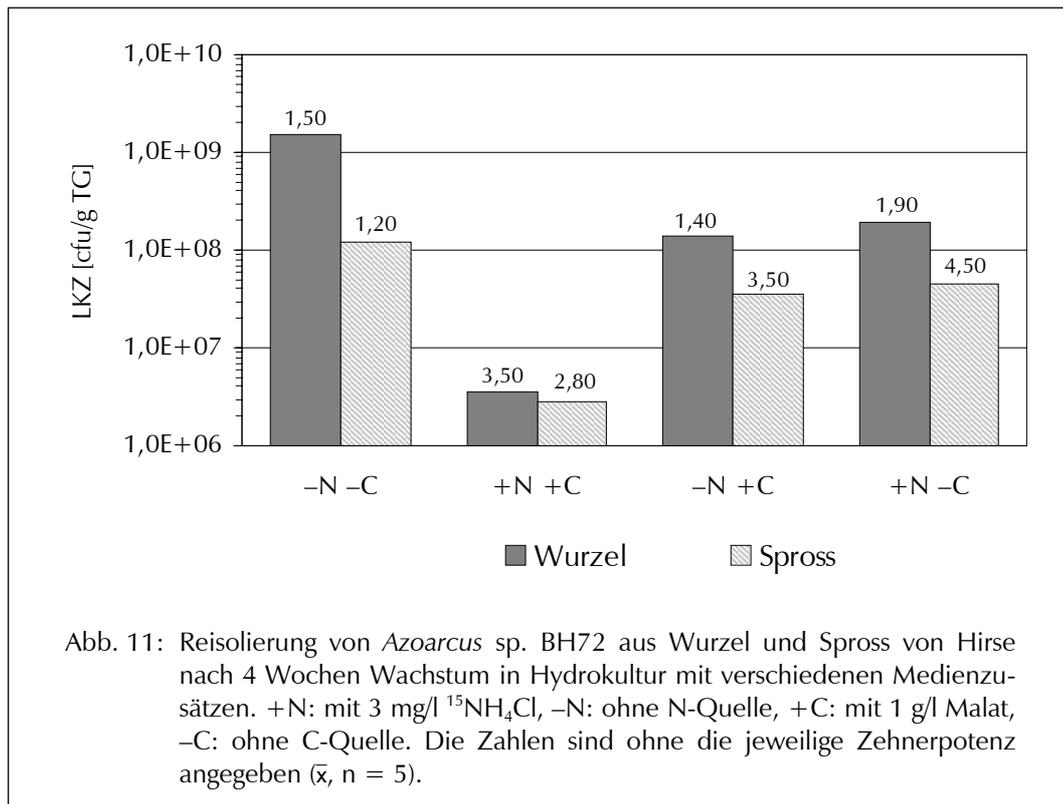
3.2 Kolonisierung von Pflanzen durch diazotrophe Bakterien

3.2.1 Besiedlung von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 in Hydrokultur in Abhängigkeit vom Medium

Um die Kolonisierung von Hirse durch das diazotrophe Bakterium *Azoarcus* sp. BH72 zu erfassen, wurden Pflanzen in monoxenischer Hydrokultur angezogen. Je 2 vorgekeimte Samen wurden in einer Glasröhre mit einer anfänglichen Dichte von $5 \cdot 10^7$ cfu/ml inokuliert. Das Hoagland-Medium wurde in vier Variationen eingesetzt:

Hoagland-Medium	<ul style="list-style-type: none"> ◆ ohne Zusätze ◆ mit N-Quelle (3 mg/l N als 10 atom% $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) ◆ mit C-Quelle (1 g/l Malat, neutralisiert mit KOH) ◆ mit Zusatz von N- und C-Quelle (s. o.)
-----------------	--

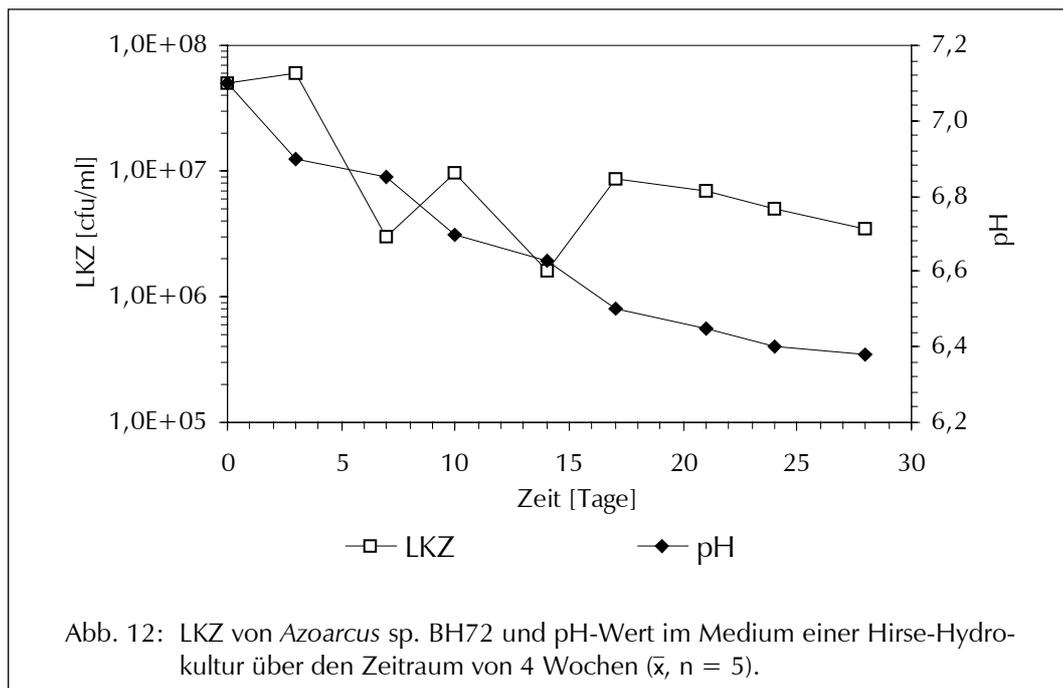
Abb. 11 zeigt die Anzahl der Bakterien, die nach 4 Wochen an Wurzel und Spross gefunden wurden. Die Pflanzen in einer Röhre wurden dabei vereinigt. Die Zugabe von N- oder C-Quelle erbrachte keine unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Lebendkeimzahl; die Pflanzen wurden jedoch durch das Malat im Wachstum deutlich behindert (vgl. Hayen-Schneg, 1995). Die höchsten Lebendkeimzahlen wurden im Ansatz ohne Zusätze erzielt, wohingegen am wenigsten Bakterien von Pflanzen in Medium mit N- und C-Quelle reisoliert werden konnten.



3.2.2 Etablierung von *Azoarcus* sp. BH72 und pH-Wert-Entwicklung im Hydrokultur-Medium von Hirse und Reis

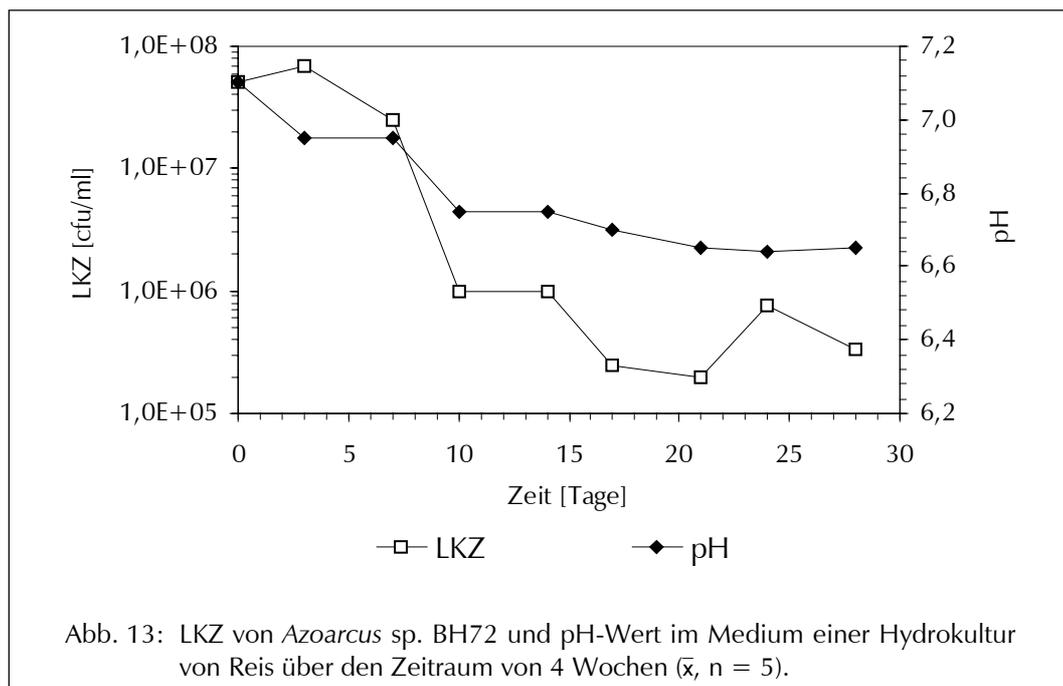
Unter Zugabe von NH_4Cl kommt es durch die Aufnahme des Ammoniums zu einer Ansäuerung des Pflanzenmediums (Findenegg, 1987). Die Verwendung von MOPS statt Phosphat als Puffersubstanz konnte diese Ansäuerung bei vergleichbaren Experimenten im Medium von Reis- und Kallargraskulturen einschränken (Stein, 1992). Es sollten die Verhältnisse einer Hirsekultur diesbezüglich geklärt werden, da die Zugabe von NH_4Cl für die Bestimmung der BNF (3.5.3) Voraussetzung war. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob *Azoarcus* sp. BH72 im Pflanzenmedium während der Kulturdauer ohne zusätzliche C-Quelle überleben kann.

Das flüssige Hoagland-Medium enthielt zu Beginn 3 mg/l N als NH_4Cl und wurde mit $5 \cdot 10^7$ cfu/ml angeimpft. Über den Zeitraum von 4 Wochen wurden der Hirsekultur Proben entnommen, in denen die Lebendkeimzahl und der pH-Wert bestimmt wurden. Die Ergebnisse zeigt Abb. 12.



Der pH-Wert sank während der Kulturdauer kontinuierlich ab und stabilisierte sich bei pH 6,4. Die Dichte der Bakterien wurde unter Schwankungen mit der Zeit geringer, wobei sich $4 \cdot 10^6$ cfu/ml im Medium etablierten.

Vergleichspflanze Reis

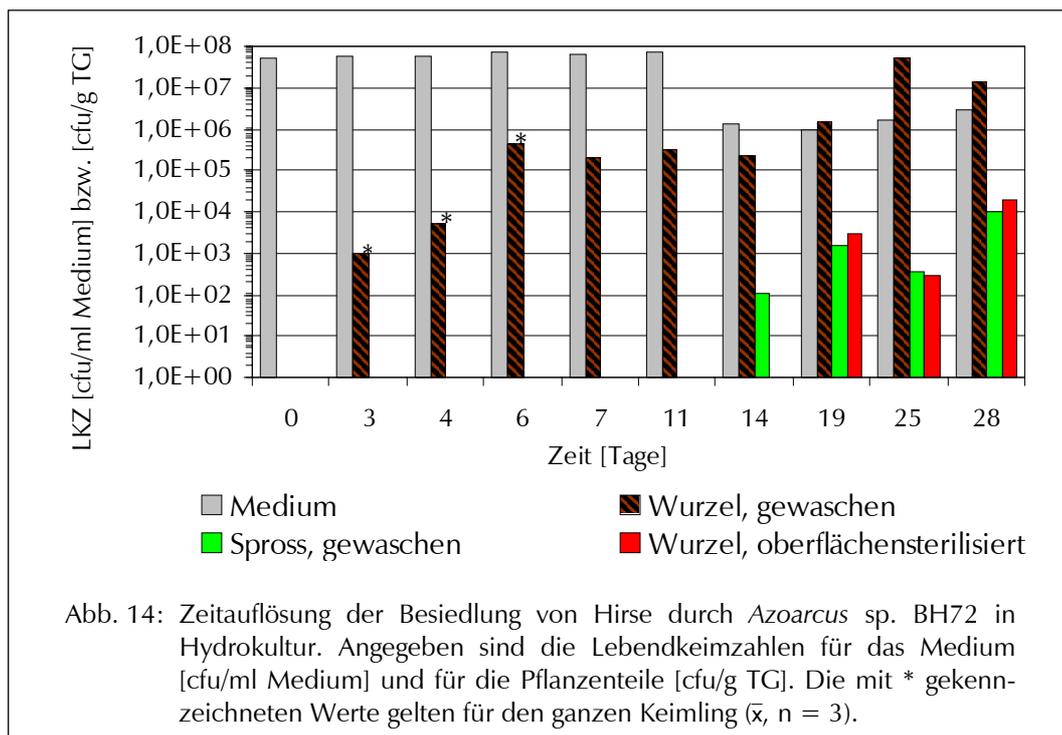


Um einen Eindruck vom Besiedlungspotential von *Azoarcus* sp. BH72 zu erhalten, wurden Reiskeimlinge unter den gleichen Bedingungen wie in den Versuchen mit Hirse in Hoagland-Hydrokultur mit *Azoarcus* sp. BH72 ($5 \cdot 10^7$ cfu/ml) inokuliert. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus dem flüssigen Medium entnommen und auf Bakterien und pH-Wert hin untersucht. Aus Parallelansätzen wurden nach 4 Wochen ungestörter Kultur die Bakterien von Wurzel und Spross reisoliert. Abb. 13 zeigt die Mittelwerte für Lebendkeimzahl und pH-Wert.

Im Vergleich zu Hirse sank der pH-Wert nicht so stark ab und war bereits nach 3 Wochen konstant bei pH 6,65. Allerdings konnte sich nur die sehr viel niedrigere Anzahl von ca. $3 \cdot 10^5$ cfu/ml im Medium behaupten. Die Anzahl der von Reis reisolierten Bakterien betrug nach 4 Wochen $2,2 \cdot 10^7$ cfu/g TG für die Wurzel und $2,0 \cdot 10^7$ cfu/g TG für den Spross.

3.2.3 Zeitauflösung der Kolonisierung von Hirse durch *Azoarcus* sp. BH72 in Hydrokultur

In Abb. 14 ist die Verteilung von inokulierten Bakterien im *in-vitro*-System während des Kultivierungszeitraums von 4 Wochen dargestellt. Je 2 oberflächensterilisierte, nicht vorgekeimte Hirsesenen wurden in einer Röhre kultiviert. Das Hoagland-Medium wurde mit einer Dichte von $5 \cdot 10^7$ cfu/ml beimpft. Es wurden jeweils 3 Röhren parallel analysiert und die Lebendkeimzahl im Medium, an Wurzel und Spross und in der oberflächensterilisierten Wurzel ermittelt. Beim Spross wurde sehr genau darauf geachtet, dass er bei der Entnahme nicht mit dem Medium und damit den Bakterien in Berührung kam. Nach 3, 4 und 6 Tagen (Stern *) waren die Pflänzchen noch sehr klein, so dass sie als ganzes gewaschen bzw. oberflächensterilisiert und homogenisiert wurden (aus Stein *et al.*, 1997).



Eine Besiedlung der Keimlinge war bereits am 3. Tag der Kultivierung festzustellen. Nach 2 Wochen wurden erstmals Bakterien von der Sprossprobe reisoliert. Zu diesem Zeitpunkt war die LKZ im Medium von $7 \cdot 10^7$ auf $1,3 \cdot 10^6$ cfu/ml gesunken. Ab dem 19. Tag konnte *Azoarcus* sp. auch in der oberflächensterilisierten Wurzel nachgewiesen werden und etablierte sich bis zum Ende des Versuchs in der ganzen Pflanze.

3.2.4 Besiedlung von Hirse mit *Herbaspirillum seropedicae* Z67 bzw. *Azospirillum brasilense* Sp245 in Substratkultur

Es sollte das Verhalten von anderen bekannten diazotrophen Bakterien im Hinblick auf die Besiedlung von Hirse in festem Substrat untersucht werden. Eine Mischung aus Sand und Vermikulit, wie sie auch für die Gewächshausversuche in Töpfen (3.5) verwendet wurde, diente als Grundlage für die Hirsekeimlinge, von denen je einer in eine Pflanzröhre gesetzt wurde. Die Animpfdichte im Hoagland-Medium, mit dem das Substrat gesättigt wurde, betrug für den Endophyten *H. seropedicae* $1,3 \cdot 10^8$ cfu/ml bzw. für *A. brasilense* $1,3 \cdot 10^9$ cfu/ml. Nach Bedarf wurde das Medium aufgefüllt. Nach 1 Monat Wachstum in der Klimakammer wurden die Pflanzen geerntet und die Bakterien wurden von Wurzel, Spross und aus oberflächensterilisierte Wurzel reisoliert. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung.

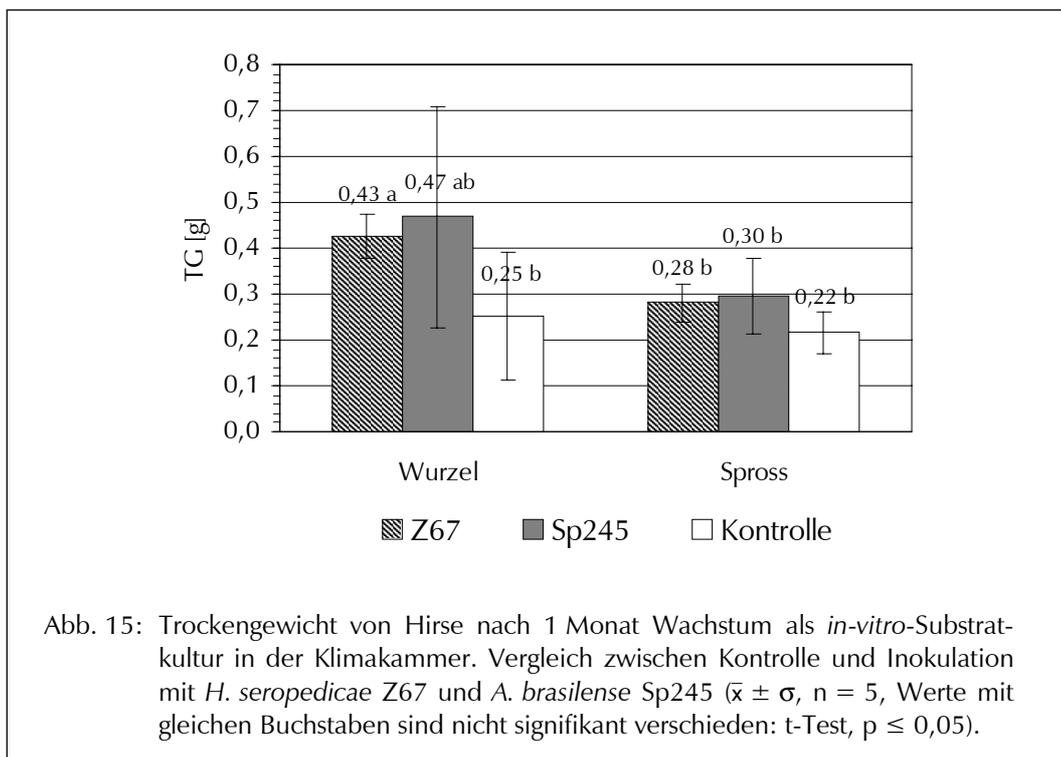
Tab. 2: Besiedlung von Hirse mit *H. seropedicae* Z67 bzw. *A. brasilense* Sp245 in einer *in-vitro*-Substratkultur. Angegeben sind die Lebendkeimzahlen an Wurzel, Spross und in oberflächensterilisierte Wurzel nach 1 Monat Wachstum in der Klimakammer (Median, n = 4, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

	Lebendkeimzahl [cfu/g TG]	
	<i>H. seropedicae</i> Z67	<i>A. brasilense</i> Sp245
Wurzel	$4,84 \cdot 10^7 \pm 2,21 \cdot 10^7$ a	$6,65 \cdot 10^7 \pm 1,52 \cdot 10^7$ a
Wurzel, sterilisiert	$5,19 \cdot 10^4 \pm 3,38 \cdot 10^4$ b	$1,05 \cdot 10^5 \pm 3,44 \cdot 10^5$ b
Spross	$4,76 \cdot 10^5 \pm 8,60 \cdot 10^5$ ab	$8,30 \cdot 10^4 \pm 7,28 \cdot 10^4$ b

A. brasilense wurde in größeren Zahlen als *H. seropedicae* an und in der oberflächensterilisierten Wurzel gefunden, wohingegen Z67 bevorzugt den Spross besiedelte, wo er trotz geringerer Animpfdichte in höheren Zahlen reisoliert wurde als *A. brasilense*. Insgesamt war die Besiedlung der ganzen Wurzel 300–1000mal stärker als in der Wurzel.

Trockengewicht von Hirse nach Inokulation mit *H. seropedicae* Z67 bzw. *A. brasilense* Sp245

Am Ende des Experiments wurde neben der Besiedlung der Pflanze mit den diazotrophen Bakterien auch die Trockenmasse von Wurzel und Spross bestimmt. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse.



Die Biomasse der Wurzel war nach 4 Wochen Kultur und Inokulation mit diazotrophen Bakterien gegenüber der Kontrolle erhöht, wobei die Unterschiede zwischen *A. brasilense* und *H. seropedicae* gering waren. Das Sprosswachstum wurde ebenso gefördert, jedoch in geringerem Umfang. Insgesamt hatten die Wurzeln der inokulierten Pflanzen ein größeres Trockengewicht als die Sprosse, was bei der Kontrolle nicht festzustellen war.

3.3 Kolonisierung von Pflanzen bei Mischinokulation

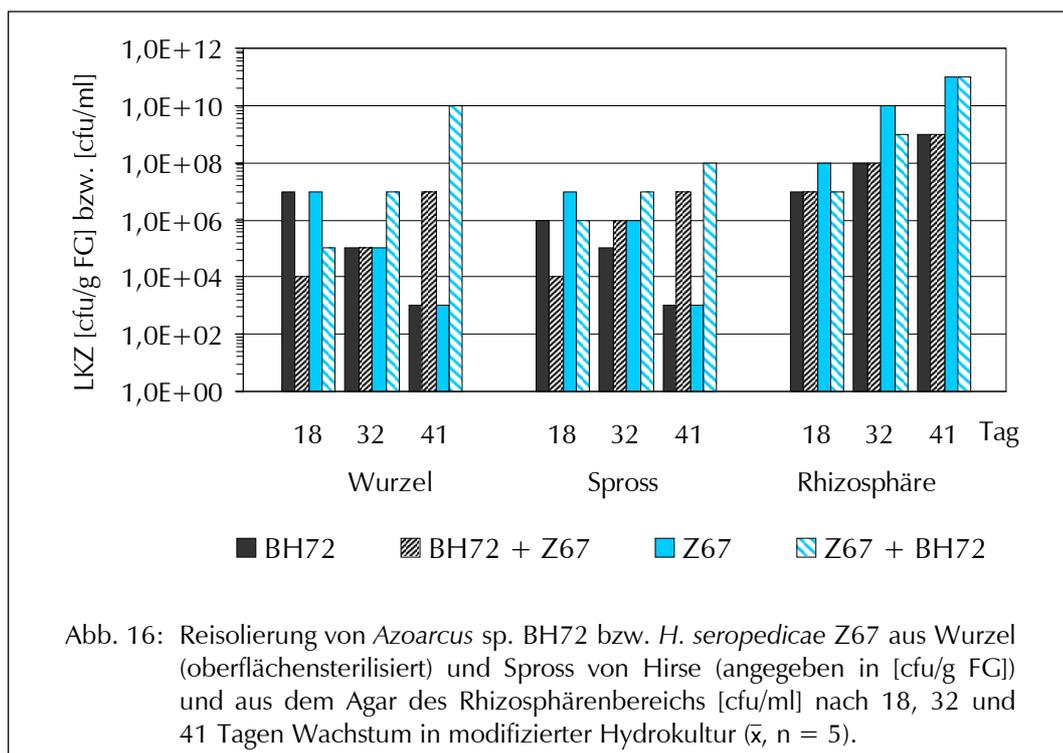
3.3.1 Besiedlung von Hirse und Reis mit *Azoarcus* sp. BH72 und *Herbaspirillum seropedicae* Z67 in modifizierter Hydrokultur

Am EMBRAPA-CNPAB (Seropédica, R.J., Brasilien) wurden Untersuchungen zum Konkurrenzverhalten von stickstofffixierenden Bakterien in Bezug auf die Kolonisierung von Hirse durchgeführt. Vorgekeimte Samen wurden in eine modifizierte Hydrokultur gebracht. Es wurde stickstofffreier Hoagland-Agar mit einem pH-Wert von 6,3 eingesetzt, um Bedingungen herzu-

stellen, die für die Pflanzen und alle beteiligten Bakterien geeignet waren. 1 ml einer Vorkultur (10^8 cfu/ml) wurde zu dem noch flüssigen Hoagland-Agar (60 ml) gegeben. Der Versuch umfasste folgende Ansätze:

- ◆ *Azoarcus* sp. BH72
- ◆ *H. seropedicae* Z67
- ◆ *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* Z67 in Mischkultur

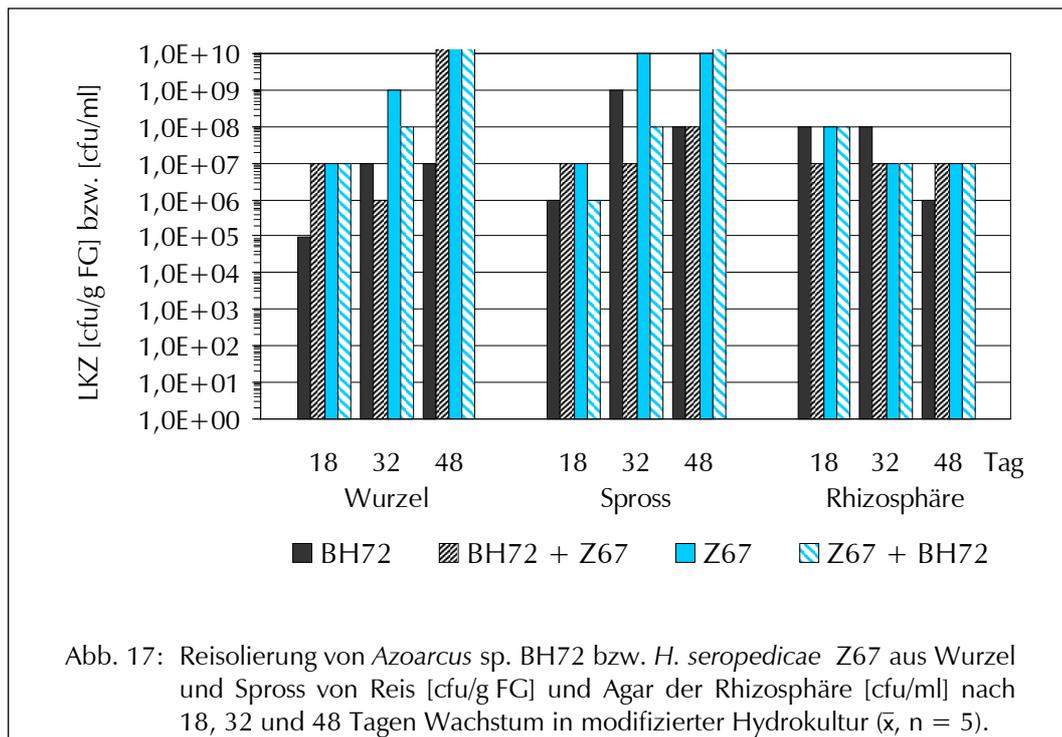
Nach 18, 32 und 41 Tagen Wachstum in der Klimakammer wurden jeweils 5 parallel aufgezogene Pflanzen ausgewertet. Die Wurzeln wurden oberflächensterilisiert und getrennt von den Sprossen homogenisiert. Ein Aliquot des Agars aus dem Rhizosphärenbereich wurde ebenfalls auf Bakterien hin untersucht. Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte nach der MPN-Methode, wobei die Zahlen für *Azoarcus* sp. BH72 in NFB mit Rifampicin und die für *H. seropedicae* in JNFb ermittelt wurden. In diesen Medien wurde das Wachstum des jeweils anderen Bakteriums unterdrückt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt (aus Wieland et al., 1996).



Die höchste Bakteriendichte mit 10^{11} cfu/ml für *H. seropedicae* wurde nach 41 Tagen im Agar aus dem Rhizosphärenbereich gefunden, *Azoarcus* sp. erreichte 10^9 cfu/ml, wobei sich bei gemeinsamer Inokulation kein Unterschied zeigte. In Wurzel und Spross verhielt es sich anders: Bei Einzelinokulation nahm die jeweilige Bakteriendichte mit der Zeit ab, bei Mischinokulation jedoch zu. Dies galt für *Azoarcus* sp. wie für *H. seropedicae* gleichermaßen.

Vergleichspflanze Reis: Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* Z67

Parallel zu dem vorher geschilderten Experiment wurde Reis mit *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* Z67 in Einzel- und Mischkultur angezogen. Nach 18, 32 und 48 Tagen wurden die Bakterien aus der oberflächensterilisierten Wurzel, dem Spross und dem Agar aus der Rhizosphäre getrennt reisoliert. Die MPN-Bestimmung erfolgte in Selektivmedien. Die Ergebnisse zeigt Abb. 17 (aus Wieland *et al.*, 1996).

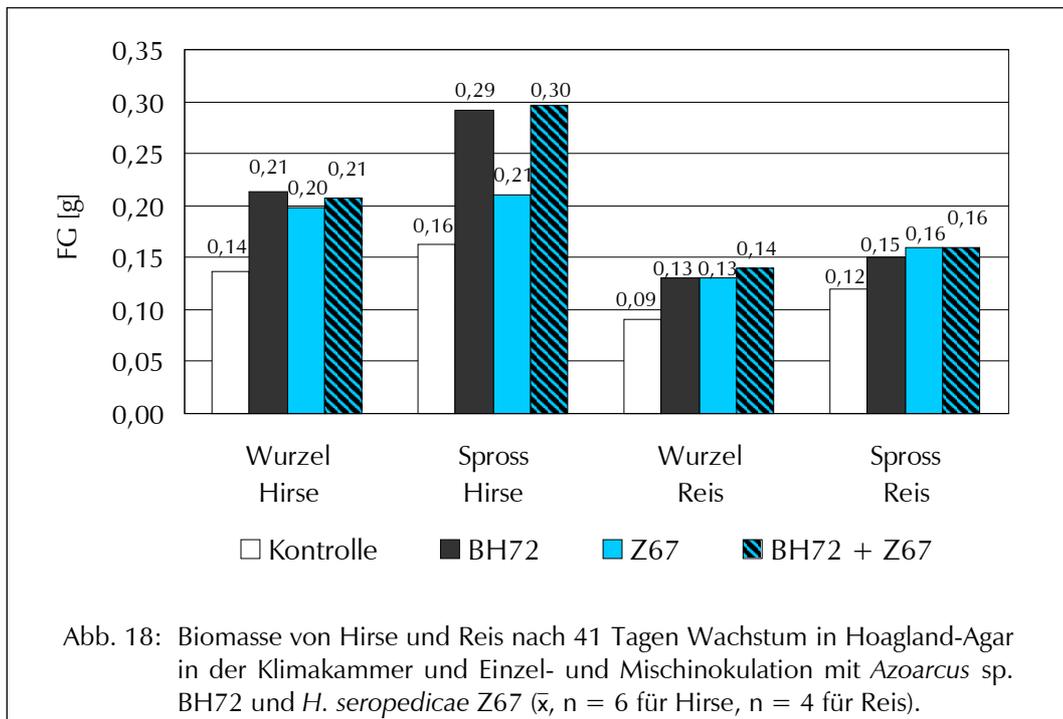


Bei Reis als Wirtspflanze wurde die größte Dichte an Bakterien nicht im Medium sondern im Spross (10^{10} cfu/g FG) gefunden, ebenfalls für *H. seropedicae* nach 32 Tagen. Eine duale Inokulation hatte einen leicht negativen Effekt; die Dichte von *H. seropedicae* war an Wurzel und Spross geringer als bei der Einzelinokulation. *Azoarcus* sp. etablierte sich während der Kulturdauer in Wurzel und Spross, der Einfluss von *H. seropedicae* war dabei tendenziell gering. Im Medium waren die Bakterienzahlen der Parallelansätze für *H. seropedicae* nahezu gleich. Auffallend war jedoch, dass die Dichte von *Azoarcus* sp. mit der Zeit abnahm, zusammen mit *H. seropedicae* jedoch gleich blieb.

Frischgewicht von Hirse und Reis

Die Effekte der Einzel- und Mischinokulation mit diazotrophen Bakterien auf die Pflanze wurden anhand der Frischgewichte von Wurzel und Spross ausgewertet. Eine gegenseitige Einflussnahme auf die Besiedlungsdichte wurde bereits oben beschrieben. Die Pflanzen wurden in

stickstofffreiem Hoagland-Agar in der Klimakammer angezogen; die Kontrolle enthielt abgetötete Bakterienzellen. Abb. 18 zeigt die Werte für Hirse und Reis (aus Wieland *et al.*, 1997).



Nach der Inokulation mit diazotrophen Bakterien wiesen Hirse- und Reispflanzen eine erhöhte Biomasse gegenüber den Kontrollen auf. Insbesondere beim Spross von Hirse wurde deutlich, dass im Ansatz mit *Azoarcus* sp. BH72 die Pflanze stärker gewachsen war. Der Unterschied zur Mischinokulation war hier geringer, aber deutlich zur Inokulation mit *H. seropedicae*.

Bei Reis war eine geringe Erhöhung des Frischgewichts der Wurzel bei gemeinsamer Inokulation der diazotrophen Bakterien festzustellen. Der Unterschied zu den Einzelinokulationen war jedoch vergleichsweise klein.

3.3.2 VAM-Übertragung in Hydrokultur

Um das System zur Mykorrhizierung möglichst einfach zu gestalten, wurde versucht, das herkömmliche Vorgehen, bei dem Boden mit Sand- oder Tongranulat-Inokulum versetzt wird, durch eine Übertragung der Mykorrhiza in hydroponischer Kultur zu ersetzen. Ein Hirsekeimling wurde zusammen mit einem mit *G. intraradices* mykorrhizierten Schnittlauchpflänzchen in eine Pflanzröhre gesetzt, welche flüssige Pflanzennährlösung (1 : 10) enthielt, wie sie auch für Gewächshausexperimente in Töpfen verwendet wurde (3.5). Während der Versuchsdauer von 21 Tagen in der Klimakammer wurde das Wachstum des Mycels beobachtet und protokolliert. Am Ende des Experiments wurden die Wurzeln der Hirse durch Anfärben qualitativ auf Mykorrhizastrukturen untersucht. Die Ergebnisse sind zusammen mit denen aus Kapitel 3.3.3 in Tab. 3 dargestellt.

3.3.3 Hirse mit VAM und *Azoarcus* sp. BH72 in Hydrokultur

Wie in 3.3.2 beschrieben, wurden Hirsekeimlinge mit VA-Mykorrhiza zusammengebracht, indem ein mykorrhiziertes Schnittlauchpflänzchen mit in die Pflanzröhre eingesetzt wurde. Es wurden zusätzlich die Auswirkungen einer Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 (10^8 cfu/ml) beobachtet. Um die Ausbildung der Hyphen nicht zu stören, wurden Wurzel- und Sprosslängen von außen mit einem Lineal gemessen. Die Werte geben somit nur Tendenzen an.

In Tab. 3 sind die Beobachtungen zur Mycelentwicklung sowie die über die Wachstumsperiode gemessenen Wurzel- und Sprosslängen der folgenden Ansätze zusammengefasst.

◆ Hirse	Kontrolle
◆ Hirse mit <i>Azoarcus</i> sp. (10^8 Zellen/ml)	BH72
◆ Hirse mit <i>G. intraradices</i>	VAM
◆ Hirse mit <i>G. intraradices</i> und <i>Azoarcus</i> sp.	BH72+VAM

Tab. 3: Übertragung von *G. intraradices* von einer mykorrhizierten Schnittlauchpflanze auf Hirse in Hydrokultur und Auswirkungen einer zusätzlichen Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 auf Hirse- und Hyphenentwicklung (Mycel erkennbar/nicht erkennbar: +/-), (\bar{x} , n = 5, n. b.: nicht bestimmt).

Ansatz	Zeit [Tage]	Wurzellänge [cm]	Sprosslänge [cm]	Mycel	VAM-Strukturen in Hirse
Kontrolle	3	1,55	2,2	–	n. b.
	7	1,72	3,1	–	n. b.
	11	1,90	3,3	–	n. b.
	16	2,54	3,4	–	n. b.
	21	3,10	3,6	–	keine
BH72	3	1,80	2,4	–	n. b.
	7	2,20	3,1	–	n. b.
	11	3,80	4,1	–	n. b.
	16	4,90	5,5	–	n. b.
	21	5,80	6,8	–	keine
VAM	3	1,61	2,4	–	n. b.
	7	1,91	3,3	+	n. b.
	11	2,31	3,8	+	n. b.
	16	2,97	4,2	+	n. b.
	21	3,60	4,6	+	Vesikel, Arbuskel
BH72+VAM	3	1,81	2,77	–	n. b.
	7	3,20	4,5	+	n. b.
	11	4,31	6,1	+	n. b.
	16	5,90	7,92	+	n. b.
	21	7,20	8,7	+	Vesikel, Arbuskel

Bereits nach 7 Tagen gemeinsamer Kultivierung waren in den Ansätzen mit VAM Hyphen zu erkennen, welche von Schnittlauchwurzeln ausgehend ins Medium wuchsen (in Tab. 3 bei 'Mycel' mit '+' vermerkt). Später (nach 11 Tagen) hatte das Mycel besonders in den oberen Bereichen der Röhre auf die Hirsewurzeln übergreifen. Bei der mikroskopischen Auswertung nach 28 Tagen war bei allen Hirsewurzeln eine starke Mykorrhizierung mit Ausbildung von Vesikeln und Arbuskeln zu verzeichnen (vgl. Abb. 25 und 26). Ein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne *Azoarcus* sp. war auf diese Weise nicht zu erkennen.

Die Pflanzen, die mit VAM und *Azoarcus* sp. inokuliert waren, wuchsen während der 3 Wochen Kultivierung am stärksten. Obwohl die Zahlen nur tendenziell zu werten sind, war der Größenunterschied zur Kontrolle besonders im Spross auffällig (2,5fach, bei VAM 1,3fach, bei BH72 1,9fach). Das Verhältnis von Wurzel zu Spross war nach 3 Wochen bei der Kontrolle mit 0,86 und BH72 mit 0,85 am größten, d. h. die Wurzel war im Verhältnis länger gewachsen als bei VAM mit 0,78 und BH72+VAM mit 0,71.

3.3.4 Hirse mit VAM und *Azoarcus* sp. BH72 in modifizierter Hydrokultur

Die Bedingungen für die gemeinsame Kultivierung von Hirse mit VA-Mykorrhiza und diazotrophen Mikroorganismen, wie sie im vorangegangenen Kapitel (3.3.3) beschrieben sind, wurden optimiert. Als Nährlösung wurde semisolid-Hoagland-Medium in Pflanzröhren verwendet, welche je einen Hirsekeimling und eine mit *G. intraradices* mykorrhizierte Schnittlauchpflanze enthielten. Zusätzlich wurde das Medium mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert (final: $4 \cdot 10^8$ cfu/ml). Während des Wachstums in der Klimakammer wurde das Längenwachstum von Wurzel und Spross in der Röhre protokolliert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden Wurzelproben zur Bestimmung der Mykorrhizierung der Hirse entnommen. Die in Tab. 4 aufgelisteten Ergebnisse stellen Tendenzen dar und sind qualitativ zu bewerten.

Die Mykorrhizaentwicklung war in diesem Experiment mit derjenigen in Flüssigkultur (3.3.3) vergleichbar. Zu Beginn waren Hyphen sichtbar, die von den Schnittlauchwurzeln ausgingen und später auch um die Hirsewurzeln ein Mycel bildeten (vgl. Abb. 25 und 26). Unter dem Mikroskop betrachtet erwies sich die Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 als förderlich für die Mykorrhizierung der Hirsewurzeln. So zeigte sich nach 21 Tagen in der BH72+VAM-Probe die weitaus stärkste Ausbildung vesikulär-arbuskulärer Strukturen. Im semisolid-Medium selbst entwickelte sich ein für diazotrophe Bakterien typisches Pellicle. Mitunter bildeten sie eine schleierartige Verdichtung um die Wurzeln herum.

Das semisolid-Hoagland-Medium erwies sich als günstiger für die *in-vitro*-Kultivierung, wie die Entwicklung der Pflanzen zeigte. Wurzeln und Sprosse wurden insgesamt länger, wobei auch hier die Pflanzen mit beiden Mikroorganismen am besten wuchsen, die mit Einzelinokulation nur eines Partners waren ungefähr gleich groß und größer als die Kontrollpflanzen. Bei beiden Hydrokulturexperimenten zeigte die Wurzel der Kontrollpflanzen relativ zum Spross das stärkste Wachstum.

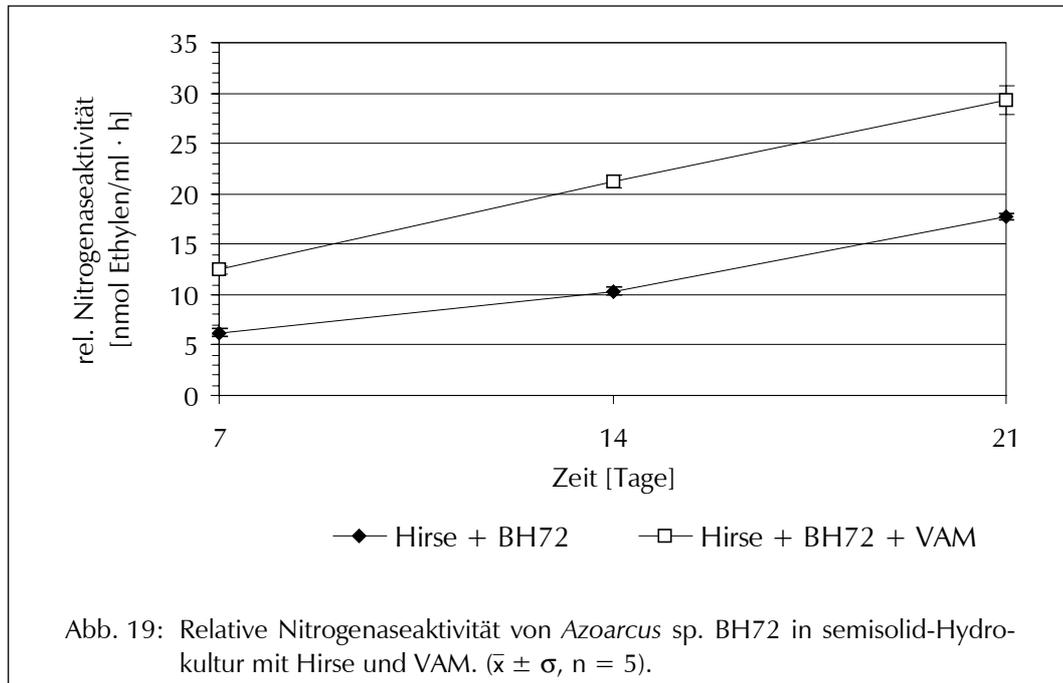
Tab. 4: Wurzel- und Sprosslängen sowie Mykorrhizierung (Ausbildung von VAM-Strukturen) von Hirse in modifizierter Hydrokultur inokuliert mit *G. intraradices* (VAM) und *Azoarcus* sp. BH72 (BH72) (\bar{x} , n = 5, n. b.: nicht bestimmt). Zur Mykorrhizierung: \pm : mäßig besiedelt, +: deutlich sind Vesikel und Arbuskel zu erkennen, ++: starke Mykorrhizierung, +++: relativ stärkste Mykorrhizierung.

Ansatz	Zeit [Tage]	Wurzellänge [cm]	Sprosslänge [cm]	VAM-Strukturen in Hirse
Kontrolle	3	2,7	3,4	n. b.
	7	3,92	4,8	keine
	14	5,2	5,3	keine
	18	5,41	6,02	n. b.
	21	7,03	8,53	keine
BH72	3	2,93	4,3	n. b.
	7	3,98	5,85	keine
	14	5,4	7,8	keine
	18	6,8	10,42	n. b.
	21	9,5	13,98	keine
VAM	3	3,2	4,2	n. b.
	7	4,2	5,6	\pm
	14	5,2	6,7	+ Vesikel, Arbuskel
	18	7,02	10,27	n. b.
	21	9,8	13,7	++ Vesikel, Arbuskel
BH72+VAM	3	3,1	3,8	n. b.
	7	4,46	6,12	+ Vesikel, Arbuskel
	14	6,72	8,2	++ Vesikel, Arbuskel
	18	8,31	12,33	n. b.
	21	10,86	15,7	+++ Vesikel, Arbuskel

3.3.4.1 Nitrogenaseaktivität bei Interaktion mit VAM an Hirse

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um festzustellen, ob VA-Mykorrhiza einen Einfluss auf die Stickstofffixierung von diazotrophen Mikroorganismen haben kann. Dazu wurde ein übersichtliches *in-vitro*-System mit Hirse, *G. intraradices* (durch Schnittlauch übertragen, vgl. 3.3.2) und *Azoarcus* sp. BH72 in semisolid-Hoagland-Medium gewählt. Die Bakterien wurden mit einer Dichte von 10^8 Zellen/ml in 60 ml Hoagland-Medium angeimpft. Am 7., 14. und 21. Tag der Kultivierung in der Klimakammer wurde jeweils ein ARA durchgeführt, wobei die Röhren für 1 h mit Acetylen in einer Atmosphäre mit 1 % O₂ inkubiert wurden. Die Grafik in Abb. 19 zeigt die Ergebnisse für die mit Bakterien inokulierten Röhren; Kontrollwerte ohne Diazotrophe wurden subtrahiert. Die Auswirkungen auf die Pflanzengröße und die Ausbildung von Mycel beschreibt Tab. 4 in 3.3.4.

Die gemessene relative Nitrogenaseaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 bei Einzelinokulation war zu jedem Zeitpunkt der Kultur signifikant kleiner als in Mischkultur mit VAM (t-Test, $p \leq 0,05$).



3.3.4.2 Vergleich mit Weizen: *Azoarcus* sp. BH72 und VAM in modifizierter Hydrokultur

Zum Vergleich mit den Untersuchungen an Hirse wurden Weizenpflanzen durch Übertragung mit *G. intraradices* mykorrhiziert (3.3.2) und mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert. Das *in-vitro*-System mit 50 ml N-freiem semisolid-Hoagland-Medium wurde 18 Tage lang in der Klimakammer kultiviert. Aus 5–7 Parallelen wurden Länge und Trockengewicht von Wurzel und Spross ermittelt, die Bakterien aus der oberflächensterilisierten Wurzel und vom Spross reisoliert und der Mykorrhizierungsgrad bestimmt (Tab. 5 und Tab. 6).

Weizen wies die größte Biomasse bei Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 auf, wohingegen der Zusatz von VAM keine Auswirkungen auf das Gewicht von Wurzel und Spross im Vergleich zur Kontrolle zu haben schien. Das Verhältnis von Wurzel und Sprosslänge war bei der Kontrolle am größten (0,74), bei *BH72+VAM* am kleinsten (0,38), d. h. die Wurzel war bei der Kontrolle im Vergleich zum Spross länger gewachsen. Das Verhältnis von Wurzeltrockengewicht und Wurzellänge zeigte jedoch, dass nicht in gleichem Maße Biomasse gebildet wurde; die Wurzel war relativ lang und dünn (0,11 mg/cm), während die Wurzel im Ansatz *BH72+VAM* kürzer und kräftiger war (0,20 mg/cm). Ein Effekt der Mykorrhiza auf die Besiedlung mit diazotrophen Bakterien war nicht zu erkennen.

Tab. 5: Auswirkungen der Inokulation mit *G. intraradices* und *Azoarcus* sp. BH72 auf Länge und Trockengewicht von Weizenpflanzen ($\bar{x} \pm \sigma$, n = 5–7).

Ansatz	Länge [cm]		Trockengewicht [mg]	
	Wurzel	Spross	Wurzel	Spross
Kontrolle	15,76 ± 2,37	21,42 ± 3,79	1,81 ± 0,2	2,89 ± 0,4
BH72	17,23 ± 3,53	32,05 ± 3,40	2,28 ± 0,7	3,01 ± 0,9
VAM	9,80 ± 2,13	18,76 ± 4,19	1,68 ± 0,4	2,32 ± 0,3
BH72+VAM	7,49 ± 1,69	19,70 ± 3,13	1,50 ± 0,2	2,27 ± 0,2

Ansatz	Verhältnis	Verhältnis	Verhältnis
	Wurzellänge : Sprosslänge	TG Wurzel : Wurzellänge [mg/cm]	TG Wurzel : TG Spross
Kontrolle	0,74	0,11	0,63
BH72	0,54	0,13	0,76
VAM	0,52	0,17	0,72
BH72+VAM	0,38	0,20	0,66

Tab. 6: Besiedlung von Weizen mit *Azoarcus* sp. BH72 bei gleichzeitiger Inokulation mit VAM (*G. intraradices*) und Mykorrhizierungsgrad nach 18 Tagen Wachstum in modifizierter Hydrokultur (\bar{x} , n = 5–7).

Ansatz	Lebendkeimzahl [cfu/g FG]			Mykorrhizierung [%]
	Wurzel	Spross	Medium	
BH72	$5,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^4$	0
BH72+VAM	$2,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$	51
VAM	0	0	0	54

3.4 Biomasse und N-Bilanz in Hydrokultursystemen

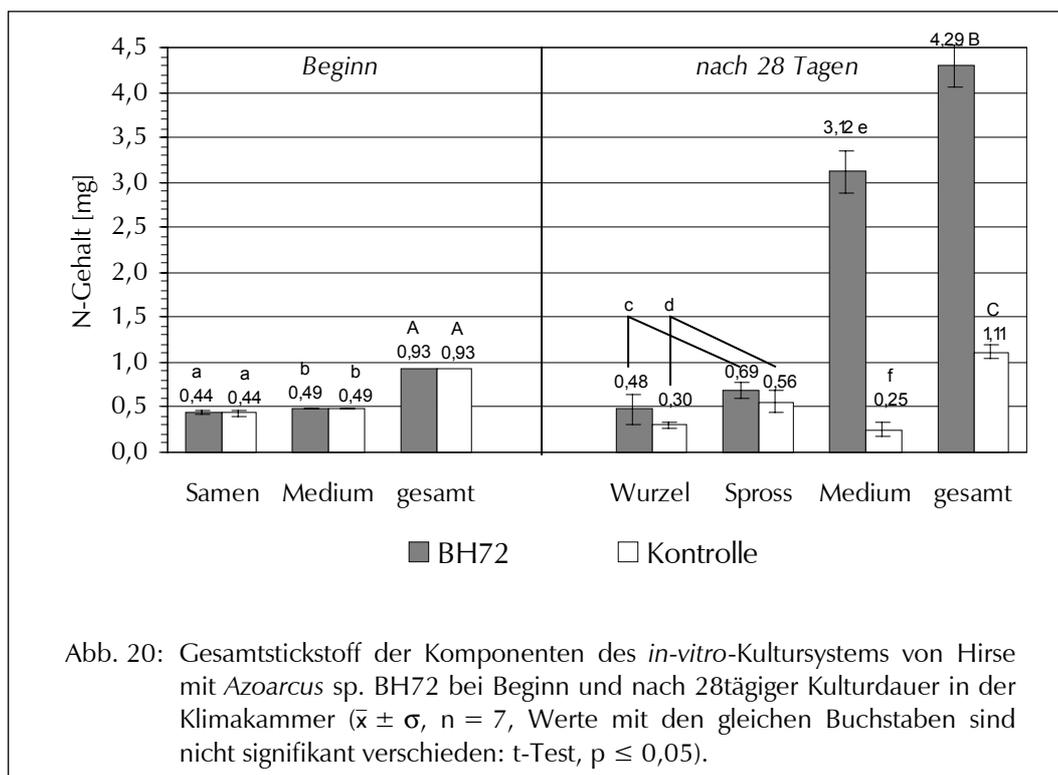
3.4.1 Hirse und *Azoarcus* sp. BH72

In Glasröhren mit flüssigem Hoagland-Medium wurden Hirseplänzchen mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert ($5 \cdot 10^7$ cfu/ml in 60 ml) und 4 Wochen lang in der Klimakammer kultiviert. Der Stickstoffgehalt jeder einzelnen Komponente wurde vorab bestimmt. Es gab keine weitere Medienezufuhr, so dass als alleinige Stickstoffquellen nur markiertes Ammonium (3 mg N/l, 10 atom% ^{15}N) und Luftstickstoff zur Verfügung standen. Dies ermöglichte die anschließende

Ermittlung der BNF (Tab. 10, Abb. 23) mit der Isotopenverdünnungsmethode (3.4.4). Am Ende des Experiments wurden die Biomasse als Trockengewicht und wiederum die N-Konzentration der Komponenten bestimmt (Tab. 7). Eine Zunahme des Gesamtstickstoffs im System im Vergleich zu den Ausgangswerten lässt auf biologische N-Fixierung schließen. Parallel dazu wurden Pflanzen mit abgetöteten Bakterien als Kontrolle angesetzt. Die Verhältnisse im Kultur- und im Kontrollsystem zu Anfang und nach 28 Tagen sind in Abb. 20 veranschaulicht (aus Stein *et al.*, 1997).

Tab. 7: Trockengewicht und N-Konzentration der Komponenten im System zu Anfang und nach 28 Tagen Kultivierung von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 7$).

		Trockengewicht [g]	N-Konzentration [mg/g TG] bzw. [mg/l]
Tag 0	Same Inokulationsmedium	0,0325	13,54 \pm 0,78 0,008
Tag 28	Wurzel	0,045	10,76 \pm 3,50
	Spross	0,051	13,54 \pm 1,69
	Medium		0,052 \pm 0,004
	Wurzel Kontrolle	0,042	7,21 \pm 0,78
	Spross Kontrolle	0,048	11,70 \pm 2,56
	Medium Kontrolle		0,004 \pm 0,001



Der N-Gehalt hat im Kultursystem mit dem diazotrophen Bakterium über den Zeitraum von 4 Wochen signifikant zugenommen, während er bei der Kontrolle so gut wie gleich blieb. Dabei war im Medium ein 17facher und damit der größte Zuwachs zu verzeichnen.

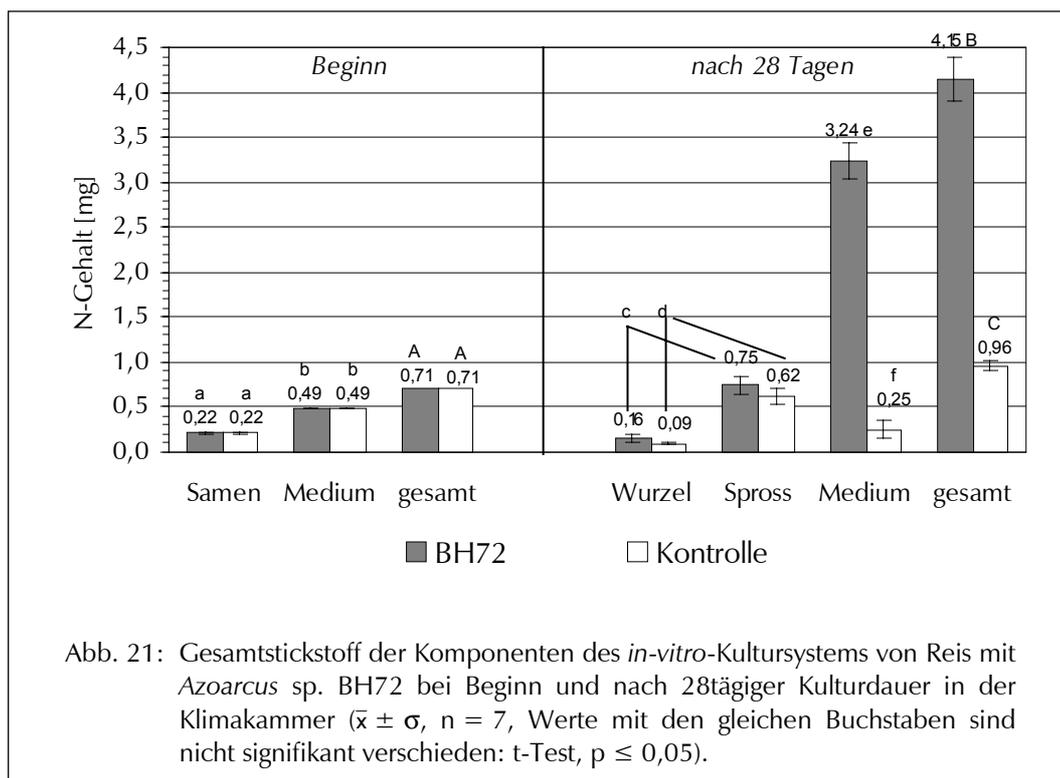
3.4.2 Reis und *Azoarcus* sp. BH72

Parallel zu dem in 3.4.1 geschilderten Experiment wurde Reis in einem Hydrokultursystem mit Hoagland-Medium der Stickstofffixierungsaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 ausgesetzt (Animpfdichte $5 \cdot 10^7$ cfu/ml). Der Versuch lief ebenfalls über 4 Wochen, zu dessen Beginn und Ende die N-Konzentrationen der einzelnen Komponenten und das Trockengewicht der Pflanze bestimmt wurden. Da gleichzeitig über den Gehalt an ^{15}N die BNF ermittelt werden sollte (3.4.4), war im flüssigen Medium ^{15}N -markiertes NH_4Cl enthalten, welches Pflanze und Mikroorganismen zur Verfügung stand. Die Verteilung des Gesamtstickstoffs im System ist in Abb. 21 gezeigt, die Werte für N-Konzentration und Biomasse finden sich in Tab. 8.

Tab. 8: Trockengewicht und N-Konzentration der Komponenten im System zu Anfang und nach 28 Tagen Kultivierung von Reis mit *Azoarcus* sp. BH72 ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 7$).

		Trockengewicht [g]	N-Konzentration [mg/g TG] bzw. [mg/ml]
Tag 0	Same Inokulationsmedium	0,022	10,15 \pm 0,56 0,008
Tag 28	Wurzel Spross Medium Wurzel Kontrolle Spross Kontrolle Medium Kontrolle	0,016 0,044 0,013 0,042	9,94 \pm 3,01 17,01 \pm 2,26 0,054 \pm 0,003 6,58 \pm 0,98 14,75 \pm 2,03 0,004 \pm 0,002

Insgesamt war im inokulierten Flüssigkultursystem mit Reis eine signifikante Zunahme des Stickstoffgehalts zu verzeichnen. Er verteilt sich dabei hauptsächlich auf Medium und Spross. Im Kontrollsystem hat der Stickstoffgehalt nicht nennenswert zugenommen. Im reinen Trockengewicht von Reis waren diese Unterschiede jedoch nicht zu erkennen.



3.4.3 Weizen und *Azoarcus* sp. BH72

Als weitere Vergleichspflanze wurde Weizen hinzugezogen. Unter den gleichen Bedingungen wuchsen die Pflanzen für 36 Tage mit 5 mg/l N als 10 atom% $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ unter den gleichen Bedingungen wie in 3.4.1 beschrieben. 50 ml Hoagland-Medium wurden mit 1 ml einer Vorkultur von *Azoarcus* sp. BH72 (10^8 Zellen/ml) beimpft. Für die Bilanz wurden Biomasse, Stickstoffkonzentration von Samen und Inokulationsmedium am Beginn sowie Wurzel, Spross und Medium am Ende des Experiments untersucht. Die Werte sind in Tab. 9 zusammengefasst. Die Bilanz im gesamten Kultursystem veranschaulicht Abb. 22. Zur Ermittlung der biologischen Stickstofffixierung wurde eine ^{15}N -Analyse durchgeführt, deren Ergebnis in Tab. 10 dokumentiert ist.

Es fällt auf, dass im Weizenkultursystem nach der Wachstumszeit von 36 Tagen der im Mittel größte Stickstoffanteil im Spross zu finden war. Allerdings waren Spross und Wurzel nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen. Nur im Medium gab es einen leichten Anstieg. Insgesamt war die N-Zunahme vergleichsweise gering.

Tab. 9: Trockengewicht und N-Konzentration der Komponenten im System zu Beginn und nach 36 Tagen Kultivierung von Weizen mit *Azoarcus* sp. BH72 ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 7-13$).

		Trockengewicht	N-Konzentration
		[g]	[mg/g TG] bzw. [mg/l]
Tag 0	Same Inokulationsmedium	0,0342	21,94 \pm 3,01 7,30
Tag 36	Wurzel	0,0384	6,86 \pm 0,98
	Spross	0,1037	8,29 \pm 0,90
	Medium		21,02 \pm 6,94
	Wurzel Kontrolle	0,0359	6,96 \pm 0,97
	Spross Kontrolle	0,0712	8,99 \pm 0,90
	Medium Kontrolle		11,79 \pm 3,34

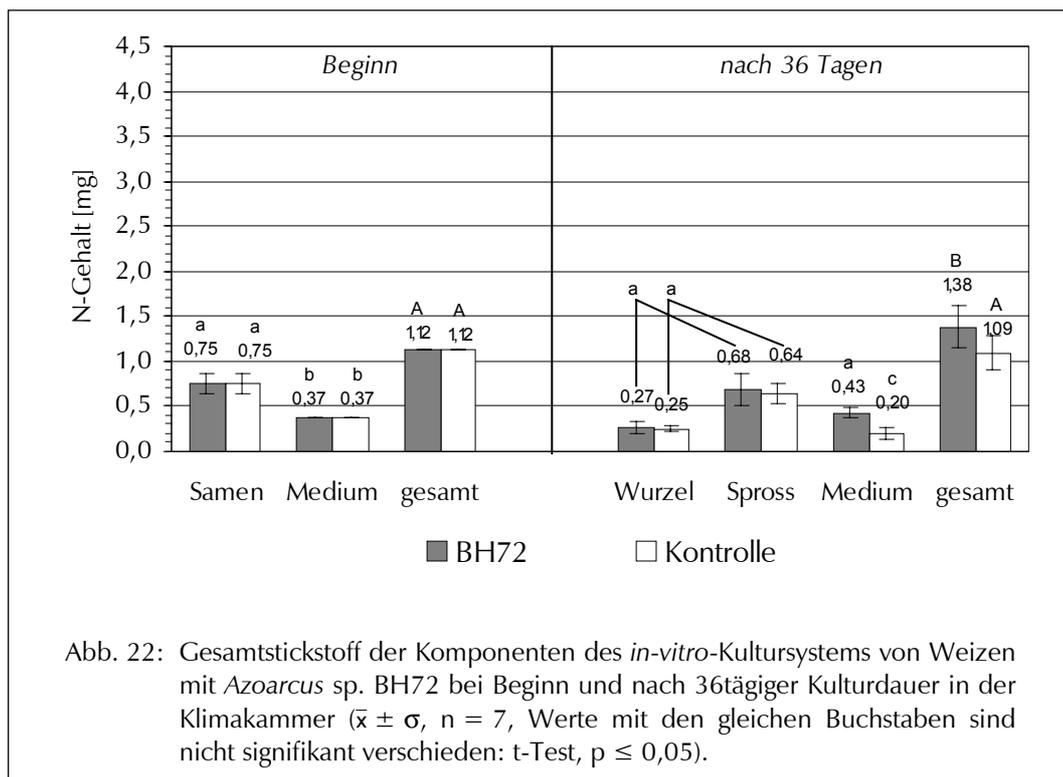


Abb. 22: Gesamtstickstoff der Komponenten des *in-vitro*-Kultursystems von Weizen mit *Azoarcus* sp. BH72 bei Beginn und nach 36tägiger Kulturdauer in der Klimakammer ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 7$, Werte mit den gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

3.4.4 BNF durch *Azoarcus* sp. BH72 bei Hirse, Reis und Weizen

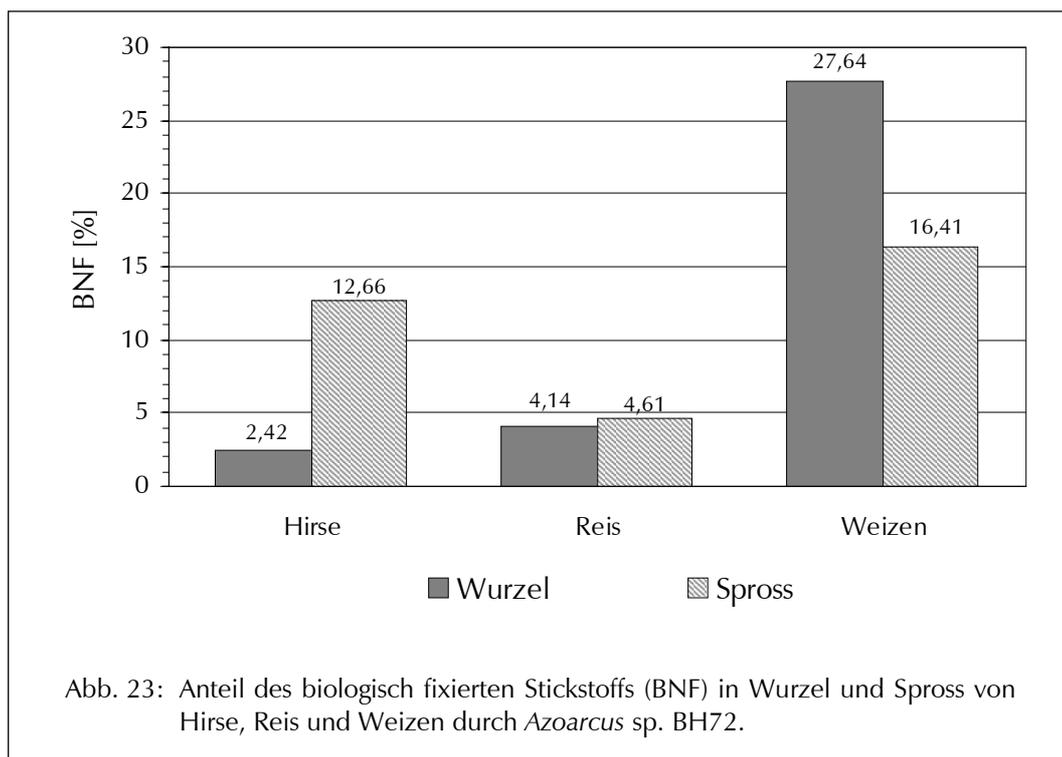
Als wichtigster Parameter für Auswirkungen diazotropher Mikroorganismenaktivität in der Assoziation mit Pflanzen wird die Stickstofffixierung gesehen. Wieviel bakteriell gebundener molekularer Stickstoff von einer Pflanze aufgenommen wurde, konnte mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode quantifiziert werden. Dazu wurden Hirse-, Reis- und Weizenpflanzen mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert und unter den in 3.4.1–3.4.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Einzige N-Quelle waren der ^{15}N -markierte Stickstoff im Medium und Luftstickstoff. Im nicht-fixierenden System wurden dem Medium abgetötete Bakterien zugesetzt. Stickstoffkonzentrationen und Trockengewichte finden sich unter 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3. Tab. 10 zeigt den gemessenen Gehalt an ^{15}N in der Biomasse. Die daraus berechneten Ergebnisse für die BNF sind in Abb. 23 veranschaulicht (aus Stein *et al.*, 1997).

Tab. 10: ^{15}N -Anteil an der Biomasse von Hirse, Reis und Weizen nach 28 bzw. 36 (Weizen) Tagen Wachstum in Hydrokultur und Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72. Die jeweiligen Kontrollen wurden mit abgetöteten Bakterien beimpft ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 3-7$).

	^{15}N [atom%]	
	mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72	Kontrolle
Hirse Wurzel	1,98 \pm 0,48	2,02 \pm 0,28
Hirse Spross	2,16 \pm 0,28	2,42 \pm 0,28
Hirse Medium	0,45	9,5
Reis Wurzel	4,77 \pm 0,59	4,95 \pm 1,04
Reis Spross	6,57 \pm 0,42	6,87 \pm 0,36
Reis Medium	0,68	9,5
Weizen Wurzel	1,78 \pm 0,35	2,32 \pm 0,32
Weizen Spross	1,69 \pm 0,36	1,95 \pm 0,21
Weizen Medium	6,23 \pm 0,66	9,32 \pm 1,06

Es ist anzumerken, dass die Reissamen 9,92 atom% ^{15}N enthielten, während die anderen Samen nicht angereichert waren und zwischen 0,37 und 0,67 atom% ^{15}N enthielten. Der Reis stammte aus eigener Zucht und wurde mit Medium gedüngt, das KNO_3 mit 10 atom% ^{15}N beinhaltete.

Der höchste Anteil von N aus der BNF fand sich im Spross von Weizen, was nicht nur auf die 8 Tage längere Kultivierungszeit zurückzuführen ist. Während in Weizen und Hirse der bakteriell fixierte Stickstoff bevorzugt im Spross eingebaut wurde, ist der Unterschied zwischen Wurzel und Spross bei Reis sehr viel geringer.



3.5 Experimente in Töpfen: Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VA-Mykorrhizapilzen

Das komplexe System aus Pflanze, diazotrophen Bakterium und VAM wurde in vorangegangenen Experimenten fast ausschließlich im übersichtlichen Hydrokultursystem ohne Einfluss von fremden Mikroorganismen untersucht. Ein Schritt in Richtung der Verhältnisse im Boden stellte die Kultivierung der drei Organismen in Pflanztöpfen im Gewächshaus dar.

Als Grundlage diente festes Substrat, das mit Nährlösung angereichert wurde. Es wurden verschiedene Systeme zur keimarmen Kultivierung entwickelt und erprobt. In den Probeansätzen erzielte Teilergebnisse sind ebenfalls in den folgenden Kapiteln aufgelistet. Um ein Gießen zu vermeiden, bei dem Kontaminanten von der Oberfläche in den Wurzelbereich gespült werden könnten, wurde der größere Topf mit Substrat auf einen kleineren Pflanztopf als Nährlösungsreservoir gestellt, so dass er ihn vollständig abdeckte. Der Substrattopf besaß am Boden eine Petrischale, die ursprünglichen Löcher waren zugeklebt, und durch ein neues Loch in der Mitte reichte eine Nylonkordel als Docht in das untere Gefäß. Die Zufuhr von Flüssigkeit durch Kapillar- und Saugwirkung von oben erwies sich als nicht stark genug, es musste trotzdem von oben gegossen werden. Die neue Variante mit einem Glasrohr zum Gießen war hervorragend geeignet. Es konnte bei Bedarf gegossen werden, die Flüssigkeit gelangte an den Gefäßboden ohne Kontaminanten einzuschwemmen oder das lokale Milieu in der Rhizosphäre mit den inokulierten diazotrophen Bakterien zu stören.

Der ursprüngliche Ansatz, oberflächensterilisierte Samen auf der Substratoberfläche unter einer Frischhaltefolie auskeimen zu lassen, wurde aufgrund der sich bildenden Staunässe und des Bedürfnisses der Bakterien nach C-Quelle von den Wurzeln verworfen. Die bewährte Methode des Vorkeimens unter sterilen Bedingungen war auch hier von Vorteil. Die Keimlinge wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf die Oberfläche des Substrats gesetzt und mit etwas Sand zugedeckt. Sie konnten sich so im Dunkeln besser entwickeln und die dort aufgebrachte Bakteriensuspension wurden im feinkörnigen Sand gehalten, der im Gegensatz zum Vermikulit-Sand-Gemisch eine höhere Wasserkapazität besaß. Eine Schicht Tongranulat verhinderte wirksam ein Austrocknen der oberen Schichten und der jungen Pflänzchen, und gleichzeitig die Bildung von Staunässe. Die Gefahr einer Kontamination durch Staub und Spritzwasser im Gewächshaus, das noch von anderen Instituten genutzt wurde, wurde so reduziert.

Das in den anderen Versuchen verwendete Hoagland-Medium erwies sich in Substratkultur über längere Zeit als ungünstig für das Pflanzenwachstum. Die Sprosse der Hirse wurden nach anfänglich guter Entwicklung nach etwa 4 Wochen an den Rändern rötlich, was auf Phosphatmangel zurückzuführen war. Die von Dr. Gerd Reidenbach und Dr. Franz Wiesler (Institut für Pflanzenernährung, Universität Hannover) empfohlene Pflanzennährlösung, die auf Grundlage von verschiedenen Rezepten adaptiert wurde, brachte eine deutliche Verbesserung für die Pflanzen. Sie wurden größer und besaßen eine kräftige Grünfärbung in allen Blatteilen. Um die Nitrogenaseaktivität der diazotrophen Bakterien nicht zu reprimieren, wurden lediglich 30 mg N in Form von ^{15}N -markiertem NH_4Cl zugegeben. Alle 3 Wochen wurde mit der Nährlösung nachgedüngt, dazwischen bei Bedarf gewässert.

Während die Keimungsrate der Hirsesamen und die Vitalität des *Azoarcus*-Stammes unverändert gut waren, war das Mykorrhizainokulum in dieser Hinsicht während der Gesamtheit der Versuche sehr unterschiedlich. Das im Institut für Biophysik an Schnittlauch und *Tagetes* vermehrte Material war meist von guter Qualität, wie die Experimente mit der Übertragung in Hydrokultur gezeigt haben (3.3.2). Keimfähige Sporen und Wurzelstücke konnten vom Sand getrennt und oberflächensterilisiert werden. Die Keimfähigkeit wurde dadurch zwar etwas beeinträchtigt, die Zahl der anhaftenden Mikroorganismen wurde jedoch drastisch reduziert, wie auf MMM-Agarplatten zu erkennen war (nicht gezeigt). Die übliche Methode, 5 % unbehandeltes Inokulationsmaterial unter das Substrat zu mischen, ergab eine zu hohe Dichte an Fremdorganismen (Bakterien und Pilze), deren Auswirkungen zu unterschiedlich und nicht einschätzbar waren. Eine in Tongranulat an *Tagetes* vermehrte Charge (Institut für Phytopathologie, Universität Hannover) besaß eine geringere Infektionsfähigkeit und enthielt nur vereinzelt isolierbare Sporen. Auch das nicht sterilisierte Material besaß nicht die gleichen guten Eigenschaften wie die oben erwähnten Chargen. Vermutlich war falsche Lagerung der gesamten Produktion dafür verantwortlich (Dr. H. von Alten, Institut für Phytopathologie, Universität Hannover, pers. Mitteilung).

3.5.1 Experimente

In dem oben und unter 2.6.1 beschriebenen System wurden drei Experimente in aufeinanderfolgenden Jahren durchgeführt. Dabei wurden vier verschiedene Inokulationen mit 10 Parallelen vorgenommen.

Experiment:

- | | |
|-----------------|-----------------------------------|
| ♦ Probeansatz | 76 Tage von März–Juni 1995 |
| ♦ Experiment 95 | 80 Tage von August–Oktober 1995 |
| ♦ Experiment 96 | 50 Tage von August–September 1996 |
| ♦ Experiment 97 | 70 Tage von März–Juni 1997 |

Ansatz:

- | | |
|-------------|---|
| ♦ Kontrolle | Hirse alleine |
| ♦ BH72 | Hirse mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72 |
| ♦ VAM | Hirse mit <i>Glomus intraradices</i> |
| ♦ BH72+VAM | Hirse mit <i>Azoarcus</i> sp. BH72 und <i>Glomus intraradices</i> |
-

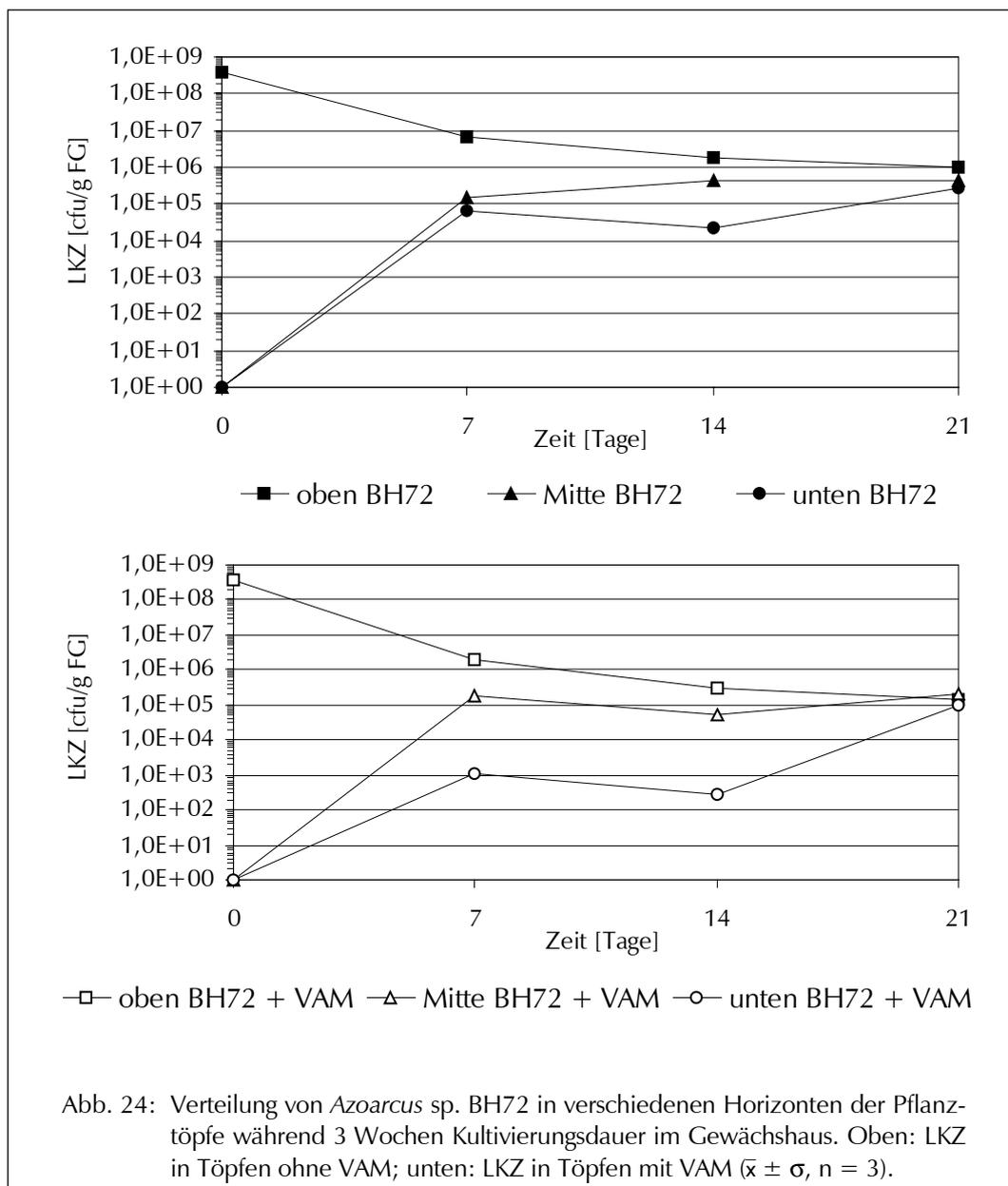
Die Pflanzen wurden im Gewächshaus für ca. 3 Monate kultiviert. Je nach Wetterlage mussten die Ansätze unterschiedlich stark gewässert werden. Gelegentlich war im Sommer eine Beschattung notwendig.

Bei der Ernte wurden Wurzel und Spross voneinander getrennt, ein Teil der Wurzel oberflächensterilisiert. Die Pflanzen aus einem Topf wurden gemeinsam analysiert, so dass das Ergebnis daraus bereits einen Mittelwert darstellt. Von allen Pflanzen wurden die Bakterien reisoliert, der Mykorrhizierungsgrad bestimmt, Trockengewicht, N-Konzentration und ^{15}N -Anteil gemessen und die BNF ermittelt.

3.5.2 Kolonisierungsverhalten von *Azoarcus* sp. BH72 und VAM im Topfsystem

3.5.2.1 Bodenbesiedlung: Verteilung von *Azoarcus* sp. BH72 in Töpfen

Der Verbleib der angeimpften Bakterien im Substrat der Töpfe wurde über 3 Wochen verfolgt. Dazu wurden Töpfe mit Hirsekeimlingen mit und ohne Mykorrhizainokulum angesetzt. *Azoarcus* sp. BH72 wurde in einer Dichte von $3,7 \cdot 10^8$ cfu/g FG im Sand nahe den Samen zugegeben. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden Bodenproben aus dem oberen, mittleren und unteren Horizont der Töpfe entnommen und auf den Gehalt an *Azoarcus* sp. untersucht. Die Verteilung in je 3 parallelen Töpfen ist in Abb. 24 dargestellt.



Da die Bakterien im oberen Bereich angeimpft wurden, waren die Werte für den mittleren und unteren Substrathorizont am Anfang Null. Bereits nach 7 Tagen waren Zellen in diese Bereiche vorgedrungen. Die Besiedlung der oberen Schichten nahm mit der Zeit in allen Töpfen mit (Abb. 24 unten) und ohne VAM-Inokulum (Abb. 24 oben) ab. Nach 3 Wochen hatten sich die Bakterien gleichmäßig verteilt. Beim Vergleich der Ansätze mit und ohne VAM zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test mit $p \leq 0,05$): Die Dichte im Ansatz alleine mit *Azoarcus* sp. BH72 betrug nach 3 Wochen ca. 10^6 cfu/g FG, im Ansatz mit VAM hingegen nur 10^5 cfu/g FG. Die Besiedlung der unteren Horizonte erfolgte mit VAM zudem langsamer.

3.5.2.2 Besiedlung von Hirse durch *Azoarcus* sp. BH72 und VAM

Da das Kultursystem während der Wachstumsperiode nicht mehr vollständig steril gehalten werden konnte, ergab sich das Problem der Identifizierung von *Azoarcus* sp.. Daher wurden die in semisolid-NFb-Medium gebildeten Pellicle (MPN) und die Kolonien auf den Agarplatten mit einem ELISA auf Identität geprüft. Die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung und der Mykorrhizierungsgrad sind in den Tab. 11 – Tab. 14 zusammengefasst. Die Lebendkeimzahlen reisolierter Bakterien wurden als Mittelwerte (\bar{x}) aus bis zu 10 Parallelen angegeben. Pflanzen mit negativem Bakteriennachweis gingen mit dem Wert Null in den Mittelwert ein. Daraus resultiert eine sehr hohe Standardabweichung (σ), aber der Mittelwert ist auf diese Weise realistischer als bei Nichtberücksichtigung dieser Töpfe. In den Tabellen ist daher immer der prozentuale Anteil der besiedelten Pflanzen angegeben, der bei der Betrachtung der Standardabweichung Beachtung finden muss.

Mikroskopische Aufnahmen zur Besiedlung und genauen Lokalisation der Mikroorganismen finden sich in 3.6.

Tab. 11: Besiedlung von Wurzel, Spross und oberflächensterilisierter Wurzel von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VA-Mykorrhiza in Töpfen: Probeansatz ($\bar{x} \pm \sigma$ für besiedelte Pflanzen, $n = 7$ für LKZ, $n = 5-6$ für Mykorrhizierung, n. b.: nicht bestimmt, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Probeansatz		LKZ	besiedelte Pflanzen	Mykorrhizierung	mykorrhizierte Pflanzen
		[cfu/g TG]	[%]	[%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	0	0	0	0
	Spross	0	0		
BH72	Wurzel	$2,7 \cdot 10^8$ $\pm 2,2 \cdot 10^8$ a	100	0	0
	Wurzel sterilisiert	$4,8 \cdot 10^6$ $\pm 5,1 \cdot 10^6$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	$7,1 \cdot 10^6$ $\pm 6,6 \cdot 10^6$	64		
VAM	Wurzel	0	0	59,7 $\pm 5,2$ a	100
	Spross	0	0		
BH72+VAM	Wurzel	$6,3 \cdot 10^7$ $\pm 5,8 \cdot 10^7$ a	100	78,3 $\pm 5,5$ b	71
	Wurzel sterilisiert	$8,2 \cdot 10^5$ $\pm 1,2 \cdot 10^6$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	0	0		

Die Tab. 11 zeigt die Ergebnisse der Besiedlungsanalysen des Probeansatzes. Aus den nicht mit Bakterien inokulierten Ansätzen (Kontrolle, VAM) wurden keine Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 isoliert. Die Wurzeln im Ansatz mit *Azoarcus* sp. BH72 wurden mit $2,7 \cdot 10^8$ cfu/g TG besiedelt, das Wurzelinnere mit $4,8 \cdot 10^6$ cfu/g TG. Im Spross wurden die Bakterien mit $4,6 \cdot 10^6$ cfu/g TG durchschnittlich in der gleichen Anzahl gefunden, jedoch waren nicht alle Pflanzen kolonisiert (64 % besiedelte Pflanzen im Vergleich zu 100 % bei den Wurzelproben). Die Pflanzen aus der Mischinokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 und VAM waren schwächer besiedelt, bei keiner Pflanze wurde *Azoarcus* sp. BH72 im Spross nachgewiesen. Der Mykorrhizierungsgrad war bei den Pflanzen mit Bakterien und VAM signifikant höher als im Einzelansatz mit VAM, obwohl nicht alle Pflanzen infiziert waren.

Tab. 12: Besiedlung von Wurzel, Spross und oberflächensterilisierter Wurzel von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VA-Mykorrhiza in Töpfen: Experiment 95 ($\bar{x} \pm \sigma$ für besiedelte Pflanzen, $n = 5$ für LKZ, $n = 7$ für Mykorrhizierung, n. b.: nicht bestimmt, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 95		LKZ	besiedelte Pflanzen	Mykorrhizierung	mykorrhizierte Pflanzen
		[cfu/g TG]	[%]	[%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	0	0	0	0
	Spross	0	0		
BH72	Wurzel	$5,5 \cdot 10^7$ $\pm 7,2 \cdot 10^7$ a	100	0	0
	Wurzel sterilisiert	$5,1 \cdot 10^6$ $\pm 7,5 \cdot 10^6$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	$5,0 \cdot 10^5$ $\pm 4,8 \cdot 10^5$	40		
VAM	Wurzel	0	0	37,0 $\pm 8,6$ a	100
	Spross	0	0		
BH72+VAM	Wurzel	$3,3 \cdot 10^7$ $\pm 6,0 \cdot 10^7$ a	100	33,0 $\pm 10,0$ a	100
	Wurzel sterilisiert	$3,9 \cdot 10^6$ $\pm 4,4 \cdot 10^6$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	0	0		

Von allen Pflanzen aus Experiment 95 (Tab. 12), die mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert waren, wurde das Bakterium reisoliert. Der Ansatz BH72 wies höhere Keimzahlen auf als BH72+VAM. In beiden Ansätzen waren an der Wurzel 10-mal mehr Zellen vorhanden als in der oberflächensterilisierten Wurzel und bei Ansatz BH72 100-mal mehr als im Spross; im Ansatz BH72+VAM wurden keine Zellen im Spross gefunden. Der Mykorrhizierungsgrad war in beiden Ansätzen mit 37 % und 33 % ähnlich, wobei alle Pflanzen eine Infektion aufwiesen. Die jeweiligen Kontrollen zeigten keine Besiedlung mit *Azoarcus* sp. BH72 (Kontrolle, VAM) bzw. mit Mykorrhiza (Kontrolle, BH72).

Tab. 13: Besiedlung von Wurzel, Spross und oberflächensterilisierter Wurzel von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VA-Mykorrhiza in Töpfen: Experiment 96 ($\bar{x} \pm \sigma$ für besiedelte Pflanzen, $n = 9$ für LKZ, $n = 5-8$ für Mykorrhizierung, n. b.: nicht bestimmt, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 96		LKZ	besiedelte Pflanzen	Mykorrhizierung	mykorrhizierte Pflanzen
		[cfu/g TG]	[%]	[%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	0	0	0	0
	Spross	0	0		
BH72	Wurzel	$1,6 \cdot 10^8$ $\pm 1,7 \cdot 10^8$ a	100	0	0
	Wurzel sterilisiert	$1,4 \cdot 10^5$ $\pm 2,6 \cdot 10^5$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	0	0		
VAM	Wurzel	0	0	33,3 $\pm 3,7$ a	80
	Spross	0	0		
BH72+VAM	Wurzel	$5,8 \cdot 10^7$ $\pm 1,5 \cdot 10^8$ a	89	39,3 $\pm 7,1$ a	63
	Wurzel sterilisiert	$5,5 \cdot 10^4$ $\pm 6,3 \cdot 10^4$ A	67	n. b.	n. b.
	Spross	$2,2 \cdot 10^3$ $\pm 1,2 \cdot 10^4$	33		

In Experiment 96 (Tab. 13) wurde *Azoarcus* sp. BH72 in ca. 1000-facher Dichte an der Wurzel gefunden verglichen mit dem Wurzelinneren. Dabei lagen die Zellzahlen im Ansatz mit *Azoarcus* sp. BH72 alleine wiederum höher als im gemischten Ansatz. Im Unterschied zu den

vorherigen Experimenten war bei einem Drittel der Pflanzen im dualen Ansatz der Spross besiedelt, im Einzelansatz hingegen nicht. Der Mykorrhizierungsgrad ist mit dem in Experiment 95 vergleichbar und zeigte keine Abweichung auf Grund einer dualen Inokulation.

Tab. 14: Besiedlung von Wurzel, Spross und oberflächensterilisierter Wurzel von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VA-Mykorrhiza in Töpfen: Experiment 97 ($\bar{x} \pm \sigma$ für besiedelte Pflanzen, $n = 9$ für LKZ, $n = 8$ für Mykorrhizierung, n. b.: nicht bestimmt, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 97		LKZ	besiedelte Pflanzen	Mykorrhizierung	mykorrhizierte Pflanzen
		[cfu/g TG]	[%]	[%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	0	0	0	0
	Spross	0	0		
BH72	Wurzel	$2,6 \cdot 10^7$ $\pm 4,3 \cdot 10^7$ a	100	0	0
	Wurzel sterilisiert	$6,7 \cdot 10^3$ $\pm 5,7 \cdot 10^3$ A	100	n. b.	n. b.
	Spross	$5,5 \cdot 10^3$ $\pm 7,6 \cdot 10^3$ α	56		
VAM	Wurzel	0	0	0	0
	Spross	0	0		
BH72+VAM	Wurzel	$4,3 \cdot 10^5$ $\pm 9,0 \cdot 10^5$ a	89	0	0
	Wurzel sterilisiert	$5,9 \cdot 10^3$ $\pm 7,6 \cdot 10^3$ A	67	n. b.	n. b.
	Spross	$3,2 \cdot 10^3$ ± 0 α	11		

In Tab. 14 sind die Ergebnisse von Experiment 97 zusammengefasst. Hier wurden die geringsten Zahlen für die Bakterienbesiedlung ermittelt. Die Relationen sind jedoch denen der anderen Gewächshausexperimenten ähnlich: Die gesamte Wurzel wurde ca. 100-fach stärker besiedelt als das Innere, der Spross wies noch etwas geringere Zahlen auf. Auch in diesem Experiment war die Kolonisation in Mischinokulation geringer als bei monoxenischer Kultur mit *Azoarcus* sp. BH72, von den Pflanzen waren 56 % bzw. 11 % überhaupt besiedelt, d. h. in diesem Experiment wurden bei BH72+VAM Bakterien auch aus dem Spross reisoliert. Keine der Pflanzen war mykorrhiziert, das VAM-Material war in diesem Jahr nicht infektiös.

3.5.3 Trockengewicht, N-Gehalt und BNF

Aus dem getrockneten und gewogenen Pflanzenmaterial wurde nach sehr feinem Homogenisieren in flüssigem Stickstoff die N-Konzentration in Wurzel und Spross mit dem speziell an die Probemengen dieser Topfexperimente adaptierten Semimikro-Kjeldahlaufschluss bestimmt. Das Trockenmaterial wurde durch den Einsatz von flüssigem Stickstoff spröde und ließ sich sehr gut zermörsern. Es zeigte sich, dass dieser Stickstoff nach kurzer Zeit vollständig verdunstet war und die Messungen nicht beeinträchtigte. Durch die Aufarbeitung aller Pflanzenteile wurde ein Wert für die mittlere Stickstoffkonzentration in Wurzel und Spross bestimmt.

Da es nicht Ziel dieser Experimente war, eine N-Bilanz aufzustellen, wurde darauf verzichtet, das gesamte Bodenmaterial aufzuarbeiten. Das System war nicht ganz abgeschlossen, da nachgedüngt wurde. Auch ist ein geringfügiger Eintrag von gebundenem Stickstoff aus der Luft nicht vollständig auszuschließen. Die Verteilung der diazotrophen Bakterien im Substrat wurde in einem Vorversuch (3.5.2.1) untersucht. Das Vermikulit-Sand-Gemisch enthielt keinen messbaren Stickstoff; das verwendete autoklavierte Leitungswasser war ebenfalls stickstofffrei (Gesamtstickstoffbestimmung und Nitrattest).

Zur Ermittlung des N-Eintrags durch biologische Stickstofffixierung im offenen Topfsystem wurde die Isotopenverdünnungsmethode verwendet. Markierter Stickstoff in Form von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ wurde den Pflanzen angeboten. Der Anteil dieses Isotops am Gesamtstickstoff wurde im homogenisierten Trockenmaterial von Wurzel und Spross aller Pflanzen bestimmt. Daraus wurde die BNF berechnet.

In Tab. 15 – Tab. 17 sind die Ergebnisse der Biomasse-, Gesamtstickstoff- und ^{15}N -Bestimmungen zusammengefasst und die BNF berechnet.

In Experiment 95 (Tab. 15) war das Gesamttrockengewicht der Kontrolle am größten und in den Ansätzen mit Mykorrhiza am kleinsten. Die Wurzel war bei der Kontrolle und im Ansatz mit *Azoarcus* sp. BH72 stärker ausgeprägt als der Spross, bei den Ansätzen mit Mykorrhiza verhielt es sich umgekehrt. In diesen Ansätzen wiesen die oberirdischen Teile auch eine höhere Stickstoffkonzentration auf, die signifikant höher lag als bei den anderen beiden Ansätzen. Der Stickstoffgehalt der gesamten Pflanze war bei gemeinsamer Inokulation am größten und in der Kontrolle am kleinsten. Auffällig ist der signifikante Unterschied zwischen den N-Gehalten von Wurzel und Spross bei den Kulturen mit Mykorrhiza. Der Wert für die biologische Stickstofffixierung (BNF) war bei dualer Inokulation in der Wurzel deutlich höher als bei Einzelinokulation mit *Azoarcus* sp. BH72. Da der ^{15}N -Gehalt im Spross der Kontrollpflanzen nicht ermittelt werden konnte, ist kein Wert für die BNF angegeben.

Tab. 15: Trockengewicht, Stickstoffkonzentration, Stickstoffgehalt und BNF in Wurzel und Spross von Hirse nach Gewächshauskultur mit *Azoarcus* sp. BH72 und *G. intraradices* in Töpfen: Experiment 95 ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 7$, n. b.: nicht bestimmt, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 95		TG	N-Konzentration	N-Gehalt	¹⁵ N	BNF
		[g]	[mg/g TG]	[mg]	[atom%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	9,48 ± 2,32	1,64 ± 0,41	15,18 ± 3,66 a	9,69 ± 0,75	
	Spross	5,37 ± 0,44	3,48 ± 0,55	18,59 ± 2,73 ac	n. b.	
	gesamt	14,85 ± 2,50 a		37,02 ± 8,69 A		
BH72	Wurzel	7,73 ± 1,38	2,03 ± 0,33	15,40 ± 2,70 a	8,90 ± 0,38	8,4
	Spross	5,50 ± 0,21	3,36 ± 0,38	18,46 ± 2,22 ac	9,16 ± 0,51	n. b.
	gesamt	13,23 ± 1,31 a		33,86 ± 3,39 A		
VAM	Wurzel	2,94 ± 0,44	2,22 ± 0,44	6,50 ± 1,71 b	n. b.	
	Spross	4,35 ± 0,60	8,77 ± 0,76	37,76 ± 3,38 d	n. b.	
	gesamt	7,29 ± 0,91 c		44,25 ± 3,54 B		
BH72+VAM	Wurzel	4,24 ± 0,67	4,95 ± 0,37	20,89 ± 3,20 c	8,07 ± 0,37	17,4
	Spross	4,81 ± 0,61	8,82 ± 0,73	42,05 ± 3,26 e	9,15 ± 0,49	n. b.
	gesamt	9,04 ± 1,05 b		62,14 ± 4,77 C		

Der ¹⁵N-Gehalt des Sprosses im Kontrollansatz konnte nicht bestimmt werden.

Tab. 16: Trockengewicht, Stickstoffkonzentration, Stickstoffgehalt und BNF in Wurzel und Spross von Hirse nach Gewächshauskultur mit *Azoarcus* sp. BH72 und *G. intraradices* in Töpfen: Experiment 96 ($\bar{x} \pm \sigma$, n = 4–9, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 96		TG	N-Konzentration	N-Gehalt	¹⁵ N	BNF
		[g]	[mg/g TG]	[mg]	[atom%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	2,94 ± 0,92	6,46 ± 1,38	18,13 ± 4,43 abe	9,22 ± 0,99	
	Spross	1,42 ± 0,21	22,80 ± 3,37	31,70 ± 2,58 cd	9,40 ± 0,42	
	gesamt	4,36 ± 1,11 ab		49,83 ± 5,25 A		
BH72	Wurzel	2,54 ± 0,50	6,79 ± 0,97	16,89 ± 2,41 a	7,04 ± 1,16	24,6
	Spross	1,51 ± 0,12	22,41 ± 2,55	33,66 ± 3,09 c	8,50 ± 0,76	10,0
	gesamt	4,05 ± 0,59 a		50,54 ± 2,83 A		
VAM	Wurzel	1,34 ± 0,78	9,85 ± 2,65	11,44 ± 5,28 b	8,69 ± 0,66	
	Spross	0,86 ± 0,36	35,82 ± 2,56	30,11 ± 12,31 cde	9,06 ± 0,54	
	gesamt	2,19 ± 1,09 c		41,55 ± 17,07 A		
BH72+VAM	Wurzel	1,81 ± 0,56	9,69 ± 1,54	17,54 ± 6,18 abe	7,33 ± 0,52	21,3
	Spross	1,29 ± 0,40	22,27 ± 3,19	27,66 ± 5,19 d	8,28 ± 0,53	12,4
	gesamt	3,10 ± 0,93 bc		46,19 ± 10,75 A		

Die Tab. 16 zeigt die Ergebnisse von Experiment 96. Die Biomasse war hier in der Kontrolle am größten, und bei allen Ansätzen hatte die Wurzel die höhere Trockenmasse als der Spross. Die N-Konzentration lag für alle Ansätze im gleichen Bereich, wobei der Spross stets eine deutlich höhere Konzentration aufwies. Dementsprechend gab es im N-Gehalt keine großen Unterschiede. Aber es fällt auf, dass die Ansätze Kontrolle und BH72 einen höheren Gesamtstickstoffgehalt hatten als die Ansätze VAM und BH72+VAM, die untereinander jeweils sehr ähnlich waren. Für die BNF wurden unabhängig von der Inokulationskombination Werte von 21–25 % für die Wurzel und 10–12 % für den Spross berechnet.

Tab. 17: Trockengewicht, Stickstoffkonzentration, Stickstoffgehalt und BNF in Wurzel und Spross von Hirse nach Gewächshauskultur mit *Azoarcus* sp. BH72 und *G. intraradices* in Töpfen: Experiment 97 ($\bar{x} \pm \sigma$, $n = 9$, Werte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden: t-Test, $p \leq 0,05$).

Experiment 97		TG	N-Konzentration	N-Gehalt	^{15}N	BNF
		[g]	[mg/g TG]	[mg]	[atom%]	[%]
Kontrolle	Wurzel	5,45 $\pm 0,98$	3,24 $\pm 1,01$	17,46 $\pm 6,44$ ae	8,24 $\pm 0,30$	
	Spross	1,78 $\pm 0,29$	6,89 $\pm 1,60$	12,23 $\pm 2,35$ de	8,93 $\pm 0,28$	
	gesamt	7,23 $\pm 1,11$ a		27,88 $\pm 5,61$ A		
BH72	Wurzel	6,81 $\pm 1,39$	4,67 $\pm 0,58$	31,88 $\pm 6,96$ b	6,77 $\pm 1,68$	18,7
	Spross	2,33 $\pm 0,21$	3,62 $\pm 1,03$	8,45 $\pm 2,70$ c	7,79 $\pm 0,79$	13,3
	gesamt	9,15 $\pm 1,58$ b		40,33 $\pm 8,33$ BC		
VAM	Wurzel	8,45 $\pm 0,91$	2,69 $\pm 0,63$	22,78 $\pm 5,91$ a	8,63 $\pm 0,27$	
	Spross	2,56 $\pm 0,21$	4,01 $\pm 1,11$	10,26 $\pm 2,95$ cd	9,13 $\pm 0,56$	
	gesamt	11,00 $\pm 0,94$ c		33,04 $\pm 7,64$ AC		
BH72+VAM	Wurzel	7,50 $\pm 1,50$	4,10 $\pm 0,63$	30,57 $\pm 6,57$ b	5,25 $\pm 1,93$	38,0
	Spross	2,41 $\pm 0,19$	4,50 $\pm 0,66$	10,86 $\pm 1,82$ cd	7,37 $\pm 1,35$	18,2
	gesamt	9,91 $\pm 1,56$ bc		41,43 $\pm 6,88$ B		

In Experiment 97 (Tab. 17) zeigt sich die deutlichste Diskrepanz zwischen Wurzel und Spross bezüglich der Biomasse. Aufgrund von Unterschieden in der Wurzelmasse hatte hier der Ansatz mit Mykorrhiza das höchste Trockengewicht und die Kontrolle das niedrigste. Letztere zeigte entsprechend die höchste N-Konzentration, die anderen Ansätze unterschieden sich nur geringfügig. Im Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten war hier der N-Gehalt bei allen Ansätzen in der Wurzel signifikant größer als in den oberirdischen Pflanzenteilen. Dabei unterschieden sich besonders die Wurzeln, so dass beim N-Gehalt der gesamten Pflanze die Kulturen, die mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert waren, höhere Werte aufwiesen als die Kulturen mit VAM alleine und die Kontrolle. Für die BNF ergaben sich 18–21 %, für den Spross 13–18 %, womit sich die Inokulationsvarianten nicht unterschieden.

3.6 Lokalisation von *Azoarcus* sp. BH72 in der Rhizosphäre

3.6.1 Färbungen

Zur ersten visuellen Analyse der Besiedlung von Wurzeln durch *Azoarcus* sp. wurden verschiedene Färbemethoden getestet. Es mussten solche Färbemethoden angewandt werden, die möglichst nur die Mikroorganismen färben. Bei den gängigen Bakterienfärbungen (Gram, Karbolfuchsin, Methylenblau) färbten sich die pflanzlichen Strukturen ebenfalls stark an. Die kombinierte Färbung mit Rutheniumrot und Acridinorange, einem fluoreszierenden Lebendfarbstoff, lieferte ein zufriedenstellendes Ergebnis. Pflanzliche Strukturen wurden zunächst mit Rutheniumrot abgesättigt, während vitale Bakterien mit Acridinorange gegengefärbt wurden. Im Fluoreszenzmikroskop zeigten sie dann eine grüne Fluoreszenz.

Drei Wochen alte Hirsepflanzen aus Hydrokultur, die mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert waren, wurden untersucht. Lebende Bakterien besiedelten Wurzelspitze und Wurzelhaarzone auch von Seitenwurzeln. Die größte Dichte fand sich vor allem im Mucigel um die Kalyptra. Diese Methode gab keinen Aufschluss über die genaue Lokalisation der Bakterien relativ zu den Pflanzenzellen. Da eine simultane Darstellung des Pflanzengewebes und der fluoreszierenden Bakterienzellen nicht möglich war und das Mikroskop nicht mit einer Fotovorrichtung ausgestattet war, ist hier kein Dokument gezeigt.

3.6.2 Lokalisation durch Nitrogenaseaktivität

Axenisch in Hydrokultur angezogene Hirseplänzchen wurden mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert. Nach 2 Wochen wurden die Wurzeln mit TTC inkubiert. Der Farbstoff wurde durch die Nitrogenase reduziert und färbte aktive diazotrophe Bakterien rot. Abb. 31 zeigt rot angefärbte Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 an einem Wurzelhaar. In vereinzelt Zellen hatten sich während der langen Einwirkzeit der Färbelösung bereits lichtbrechende Formazankristalle gebildet (Patriquin und Döbereiner, 1978). Unter den gewählten Bedingungen, ist die Färbung auf die Aktivität der Nitrogenase zurückzuführen; das Medium war frei von gebundenem Stickstoff und die Sauerstoffversorgung gewährleistet.

Insgesamt war die Kolonisierung sehr heterogen. Abb. 27 gibt eine Übersicht über die Wurzelentwicklung in Hoagland-Medium. Nach 14 h Inkubation mit der Färbelösung im Dunkeln ist eine leichte Rotfärbung der Wurzeln zu erkennen, die Nahaufnahme (Abb. 28) zeigt Kolonien bevorzugt an den Seitenwurzelemargen (s. auch Abb. 29). Einzelne Wurzelzellen waren gänzlich mit rot gefärbten Bakterien gefüllt (Abb. 30). Des Weiteren wurden Bakterienzellen besonders an den Wurzelhaaren gefunden (Abb. 31 und Abb. 32).

Bei Weizen wurde festgestellt, dass *Azoarcus* sp. BH72 in der Differenzierungs- und Elongationszone der Wurzeln siedelte und dort wiederum besonders im Bereich von entstehenden Seitenwurzeln (s. Wieland, 1997).

Diese und die vorher beschriebene Methode boten den Vorteil, dass ausschließlich aktive Bakterien detektiert wurden und so die Besiedlungsstruktur aufgezeigt werden konnte. Eine eindeutige Lokalisation erlaubte jedoch nur die konfokale Laserscanning-Mikroskopie (3.6.3).

3.6.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie war es möglich, *Azoarcus* sp. BH72 eindeutig in der Rhizosphäre zu lokalisieren. Durch die Markierung mit stammspezifischem Antiserum wurde die Zellen zweifelsfrei identifiziert. Die untersuchten Proben stammten von Hirse und Weizen, die mit *Azoarcus* sp. BH72 und z. T. mit VA-Mykorrhiza inokuliert waren.

Bei Proben aus den keimarm, aber nicht monoxenisch durchgeführten Gewächshausexperimenten wurden neben *Azoarcus* sp. BH72 andere Bodenbesiedler gefunden (Abb. 33, Abb. 36, Abb. 48 und Abb. 49). Letztere wurden mit DAPI oder mit Fluorochrom-markierten Sonden erfasst.

Strukturen der VA-Mykorrhiza wurden ebenfalls sichtbar gemacht. Sie zeigten bei Anregung eine Autofluoreszenz, die sich von der Pflanze unterschied und in den Bildern bräunlich erschien. Auf diese Weise konnten intra- und extrazelluläre Sporen und Hyphen an Hirse nachgewiesen werden (Abb. 43–Abb. 46).

In Abb. 47 ist *Azoarcus* sp. BH72 im Spross von Hirse zu sehen. Da weniger Proben von oberirdischen Teilen als aus der Rhizosphäre untersucht wurden, kann für den Spross keine sichere Aussage zur Besiedlungsdichte getroffen werden. Eine stärkere Besiedlung an anderen Stellen ist deshalb nicht auszuschließen.

Insgesamt fand sich eine sehr heterogene Kolonisierung der Pflanzen. Bevorzugt siedelte sich *Azoarcus* sp. BH72 in intrazellulären Räumen zwischen den äußeren Rhizodermiszellen (Abb. 35, Abb. 38 und Abb. 50) und im Bereich der Wurzelhaare an (Abb. 33), wo Zellen auch intrazellulär nachgewiesen werden konnte (Abb. 39–Abb. 42). Mögliche Eindringorte können Sekundärwurzeln (Abb. 52) und beschädigte Wurzelzellen (Abb. 53) sein.

In Abb. 48 sind große kugelige Strukturen an einer Weizenwurzel zu erkennen, die mit Antiserum rot markiert sind. Da die Antikörper hoch spezifisch sind (3.1.1.3), handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellen von *Azoarcus* sp. BH72, die von einer bakteriell gebildeten Hülle umgeben und somit einer direkten Markierung nicht zugänglich waren. In mehreren Präparaten hat sich zudem gezeigt, dass *Azoarcus* sp. BH72 nicht mit DAPI angefärbt werden kann.

3.6.4 Rasterelektronenmikroskopie

Untersucht wurden Wurzelproben aus monoxenischer Hydrokultur von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und aus Topfexperimenten. *Azoarcus* sp. BH72 wurde auf der Oberfläche der Wurzel

und in den Ausbruchstellen von Seitenwurzeln detektiert (Abb. 55 und Abb. 56), wo er tief in den Lücken zwischen den Zellen lokalisiert war. Anhand des Vergleichs mit der monoxenisch angezogenen Pflanze war *Azoarcus* sp. BH72 auch im Präparat aus Topfkultur zu identifizieren. Das Bakterium wurde z. T. gehäuft auf der Wurzeloberfläche gefunden (Abb. 54). Dort war es auch zusammen mit VA-Mykorrhizahyphen angesiedelt (Abb. 57), jedoch war das Mycel nicht dicht mit Bakterien besetzt. Da nur das Relief der Präparate dem Elektronenstrahl zugänglich war, kann hier keine Aussage über intrazelluläres Vorkommen getroffen werden.

3.6.5 Mikroskopische Aufnahmen

LM-Aufnahmen: VAM

Abb. 25: Ungefärbtes Präparat mit Hyphen von *G. intraradices* an einer Hirsewurzel. LM-Aufnahme 50 x.

Abb. 26: Mit Trypanblau angefärbtes Präparat. Erkennbar sind die blauen Strukturen der VA-Mykorrhiza, z. T. in den Zellen der Hirsewurzel. Inokulation mit *G. intraradices* und *Azoarcus* sp. BH72. LM-Aufnahme 50 x.

LM-Aufnahmen: TTC-Färbung

Abb. 27: Pflanzröhre mit Hoagland-Medium und einer 2 Wochen alten Hirsepflanze, die mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert war. 14 h vor der Aufnahme wurde TTC-Färbelösung im Dunkeln zugesetzt. Makroskopisch ist eine rötliche Färbung der Wurzeln zu erkennen. Die Nahaufnahme (Abb. 28) zeigt Details.

Abb. 28: Nahaufnahme von Abb. 27. An den Seitenwurzelemargen sind Kolonien von *Azoarcus* sp. BH72 zu erkennen, die auf Grund von Nitrogenaseaktivität rötlich gefärbt sind.

Abb. 29: Besiedlung der Ausbruchstelle einer Seitenwurzel mit *Azoarcus* sp. BH72 einer 7 Tage alten monoxenisch angezogenen Hirsepflanze; erkennbar auf Grund der durch Nitrogenaseaktivität hervorgerufenen Rotfärbung. LM-Aufnahme 128 x.

Abb. 30: Wurzel einer 2 Wochen alten Hirsepflanze, die in Hydrokultur mit *Azoarcus* sp. BH72 beimpft war. An mehreren Stellen ist eine deutliche Rotfärbung zu sehen, die sich z. T. auf die genauen Ausmaße einer Pflanzenzelle beschränkt. Dies läßt vermuten, dass sich die Bakterien intrazellulär angesiedelt hatten und zum Zeitpunkt der Färbung aktiv waren. LM-Aufnahme 63 x.

Abb. 31: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72, die ein Wurzelhaar besiedeln. In ganz wenigen Zellen haben sich bereits lichtbrechende Formazankristalle gebildet, was die Grenze der Färbezeit anzeigt. Ein 5 Tage alter Hirsekeimling wurde für 1 Tag in der Klimakammer in einer Suspension mit *Azoarcus* sp. BH72 kultiviert, gewaschen und anschließend mit der TTC-Lösung inkubiert. Eine dichte Besiedlung mit fest assoziierten Bakterien war das Ergebnis. LM-Aufnahme 320 x.

Abb. 32: Aggregate von *Azoarcus* sp. BH72, die sich zwischen Wurzelhaaren angesiedelt haben. Gleiches Präparat wie Abb. 31. LM-Aufnahme 320 x.

LSM-Aufnahmen

Abb. 33: Dichte Ansammlung von Bakterien in diffuser Matrix in der Wurzelhaarzone von Hirse aus einer Gewächshauskultur mit *Azoarcus* sp. BH72. Mit der TRITC-gekoppelten BET42a-Sonde sind Bakterien der β -Untergruppe der Proteobakterien (*Azoarcus* sp.) markiert. Bei Anregung mit 364 nm waren daneben mit DAPI gefärbte Bakterien sichtbar, die größer und ovoider als *Azoarcus* sp. waren und nicht zur β -Proteogruppe gehörten (nicht gezeigt). LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, xy-Scan.

Abb. 34: Wurzelbesiedlung einer in monoxenischer Hydrokultur angezogenen Hirsepflanze mit *Azoarcus* sp. BH72. Markierung: mit Texas-Red-gekoppeltem Antiserum gegen *Azoarcus* sp. BH72. LSM-Aufnahme, Anregung bei 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Einzelbilder in 1 μ m Abstand).

Abb. 35: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 in einer Hirsewurzel. Gezeigt sind die tieferen Schichten des Präparats von Abb. 34. In einem z-Scan dazu war zu erkennen, dass sich einige Bakterien in den Pflanzenzellen befanden und andere tief in interzellulären Einschnitten lokalisiert waren (nicht gezeigt). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 543 nm, Projektion einer z-Serie (Schnittebenen 9–20 in 1 μ m Abstand).

Abb. 36: In der Matrix einer Hirsewurzel aus Gewächshauskultur mit *Azoarcus* sp. BH72 befinden sich grün fluoreszierende Bakterien, die mit der FLUOS[®]-gekoppelten EUB338-Sonde für Eubakterien markiert sind. Nur wenige Zellen von *Azoarcus* sp. sind mit der BET42a-Sonde (rot durch TRITC) gefärbt. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, xy-Scan.

Abb. 37: Dichte Besiedlung einer Hirsewurzel aus *in-vitro*-Hydrokultur mit *Azoarcus* sp. BH72. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung: 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Ebenen, 1 μ m).

Abb. 38: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 an einer Hirsewurzel aus Hydrokultur. Die Bakterien sind häufig in tiefen Furchen zwischen den äußeren Wurzelzellen angesiedelt (vgl. z-Scan Abb. 50). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. Anregung bei 488 nm und 543 nm, xy-Scan.

Abb. 39: Intrazellulär angesiedelte Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 in einer Hirsewurzel aus Topfkultur mit *Azoarcus* sp. BH72 und VAM. Der korrespondierende z-Scan (Abb. 40) belegt das intrazelluläre Vorkommen. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Ebenen, 1 μ m).

Abb. 40: Ein z-Scan zu Abb. 39. Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 in einer Rhizodermiszelle.

- Abb. 41: *Azoarcus* sp. BH72 in einer Wurzelhaarzelle von Hirse aus Gewächshauskultur mit VAM. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (5 Ebenen, 1 μm).
- Abb. 42: Ein z-Scan zu Abb. 41. Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 in einer Wurzelhaarzelle.
- Abb. 43: Eukaryontische Strukturen in Zellen einer Hirsewurzel, die mit *Azoarcus* sp. BH72 und VAM inokuliert war. Es kann sich dabei um autofluoreszierendes Pilzmaterial handeln, das an mehreren Stellen gehäuft auftrat, z. T. zusammen mit Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 (nicht gezeigt). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (5 Ebenen, 2,5 μm).
- Abb. 44: Spore von *G. intraradices* in einer äußeren Wurzelzelle von Hirse aus Gewächshauskultur mit VAM. Sie zeigt eine bräunliche Autofluoreszenz, die sie vom gelblich-grünen Pflanzenmaterial abhebt. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm, xy-Scan.
- Abb. 45: Ein z-Scan zu Abb. 44. Intrazelluläre Spore von *G. intraradices* in Hirse.
- Abb. 46: Junge Sporen an einer Wurzel von Hirse aus Gewächshauskultur mit VAM. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm, Projektion einer z-Serie (32 Ebenen, 2,5 μm).
- Abb. 47: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 im Spross von Hirse aus Topfkultur. Der dazugehörige z-Scan belegte das intrazelluläre Vorkommen (nicht gezeigt). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Ebenen, 1 μm).
- Abb. 48: Unspezifisch mit DAPI (blau) gefärbter Zellhaufen aus der Wurzelhaarzone von unsteril angezogenem und mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliertem Weizen. Daneben sind kugelige Strukturen mit spezifischem Antiserum markiert. Vermutlich sind dies Zellen von *Azoarcus* sp. BH72, die mit einem *Envelope* umgeben sind und daher den Antikörpern nicht direkt zugänglich waren. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum und DAPI. LSM-Aufnahme, Anregung bei 364 nm, 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Ebenen, 1 μm).
- Abb. 49: *Azoarcus* sp. BH72 an einer Wurzel von Hirse aus Gewächshauskultur mit VAM. Daneben sind weitere Bodenbakterien durch die DAPI-Färbung blau dargestellt. Im korrespondierenden z-Scan war zu erkennen, dass sich diese nur auf der Wurzeloberfläche befanden (nicht gezeigt). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum und DAPI. LSM-Aufnahme, Anregung bei 364 nm, 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (20 Ebenen, 1 μm).
- Abb. 50: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72, die tiefe Zwischenräume der äußeren Wurzelzellen besiedeln. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, z-Scan.
- Abb. 51: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 auf einer Weizenwurzel. Bei dem oberen Bakterium ist ein mit Antikörpern rot markiertes Flagellum zu erkennen (Pfeil). Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung: 488 nm und 543 nm, xy-Scan.

- Abb. 52: Der Ausschnitt zeigt eine Ausbruchsstelle einer Sekundärwurzel bei Weizen und dort vorgedrungene Zellen von *Azoarcus* sp. BH72. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung: 488 nm und 543 nm, Projektion einer z-Serie (5 Ebenen, 1 μm).
- Abb. 53: Beschädigte Rhizodermiszellen bei Weizen mit eingedrungenen Zellen von *Azoarcus* sp. BH72. Markierung: Texas-Red-konjugiertes Antiserum. LSM-Aufnahme, Anregung bei 488 nm und 543 nm, xy-Scan.

REM-Aufnahmen

- Abb. 54: Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 auf der Wurzel einer in Hydrokultur monoxenisch angezogenen Hirsepflanze (14 Tage alt). REM-Aufnahme.
- Abb. 55: Hirsewurzel in der Nähe einer Seitenwurzel aus Gewächshauskultur mit VAM und *Azoarcus* sp. BH72; Übersicht (Pfeil s. Abb. 55). REM-Aufnahme.
- Abb. 56: *Azoarcus* sp. BH72 an der Ausbruchsstelle einer Seitenwurzel. Bei einigen Zellen ist die polare Geißel gut erkennbar. Detailansicht von Abb. 55 (Pfeil). REM-Aufnahme.
- Abb. 57: Hirsewurzel mit Hyphen von *G. intraradices* und Zellen von *Azoarcus* sp. BH72. Die Pflanze wurde zusammen mit beiden Mikroorganismen im Gewächshaus angezogen. REM-Aufnahme.

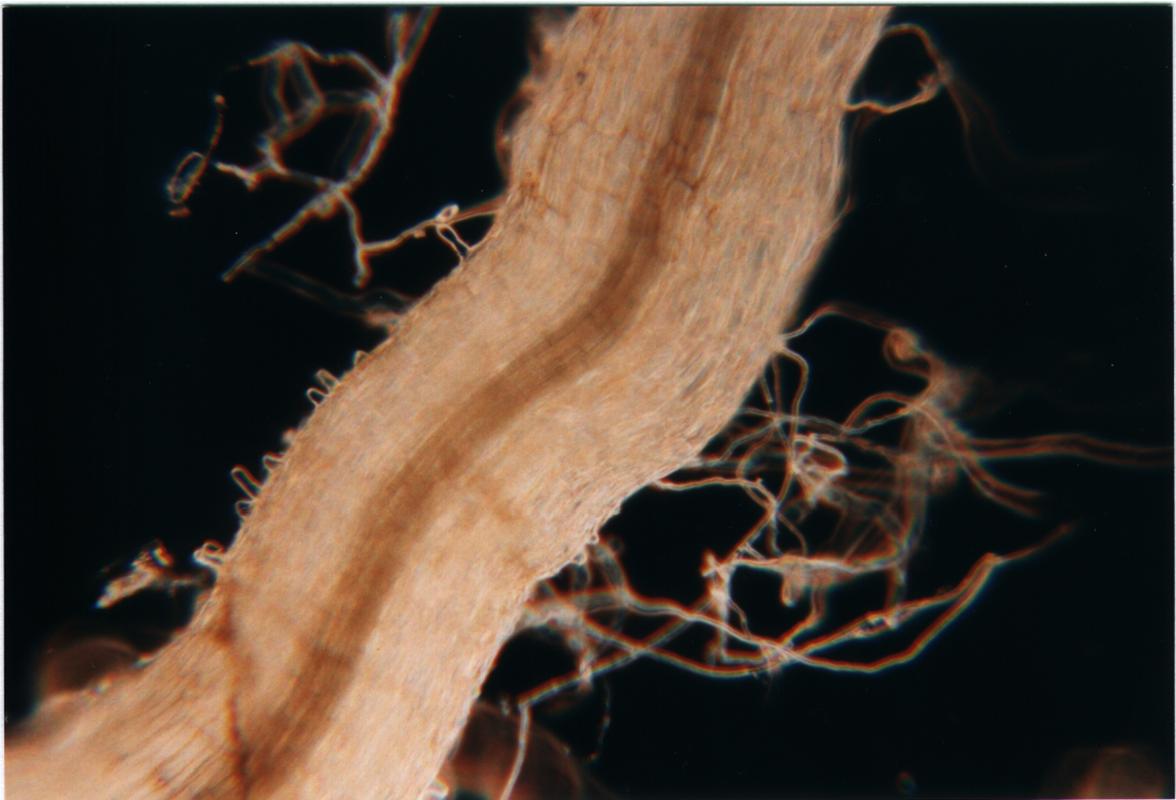


Abb. 25



Abb. 26

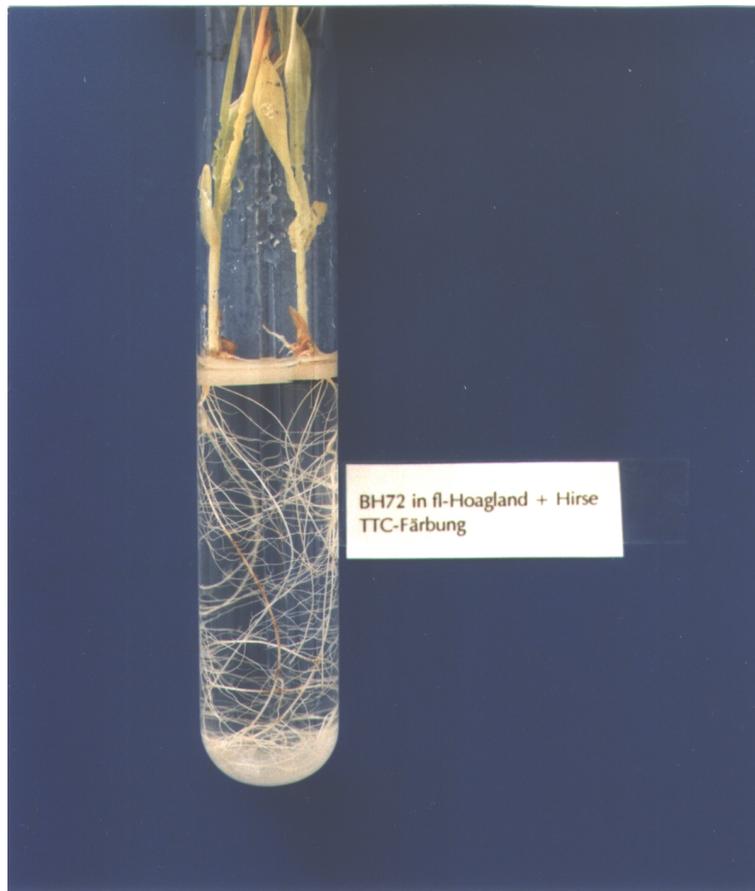


Abb. 27



Abb. 28

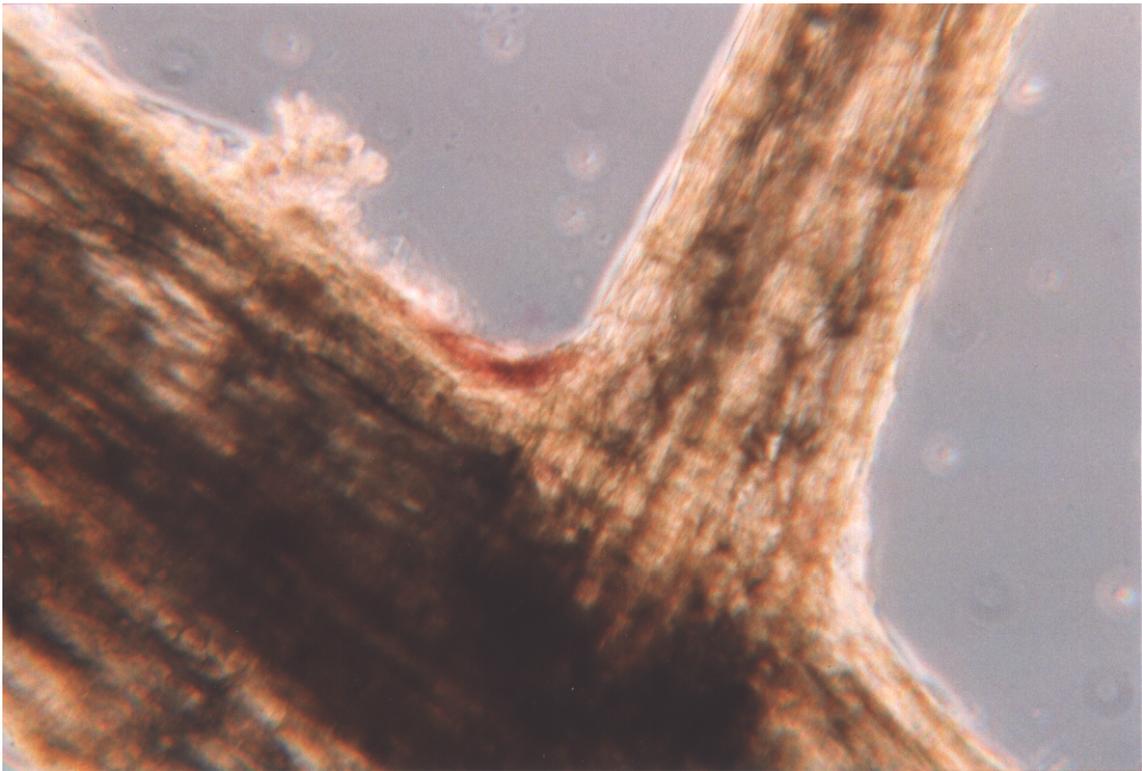


Abb. 29

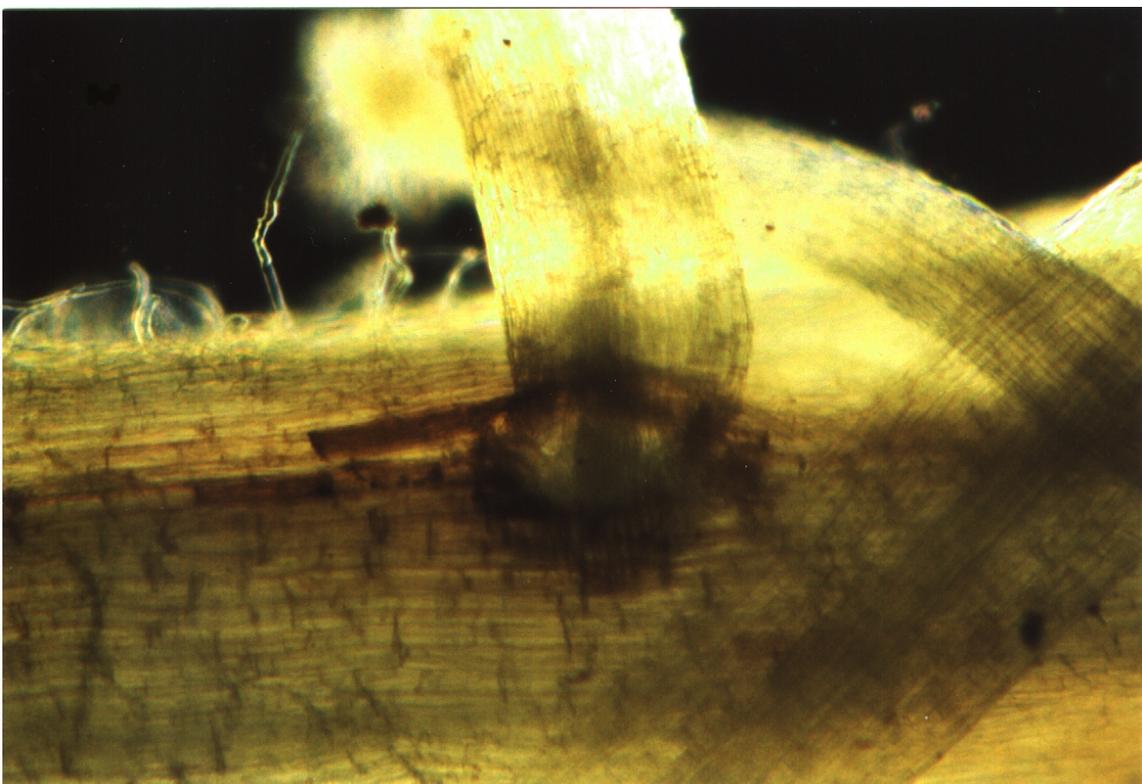


Abb. 30



Abb. 31

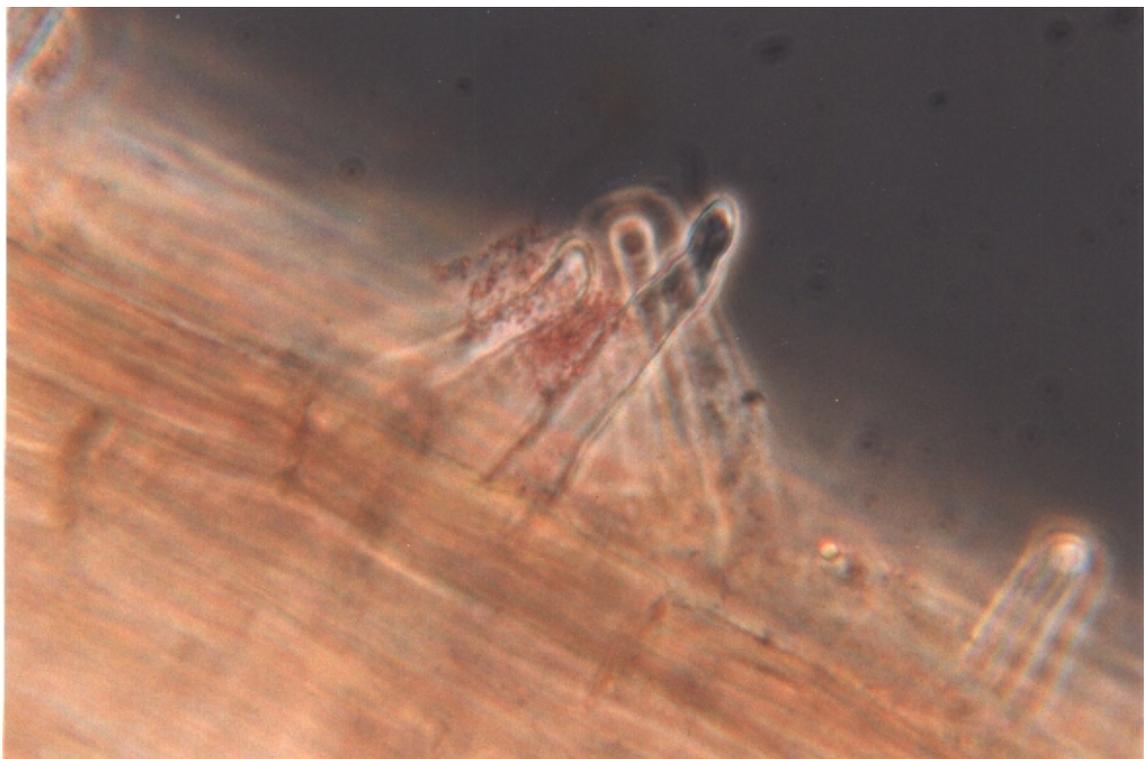


Abb. 32

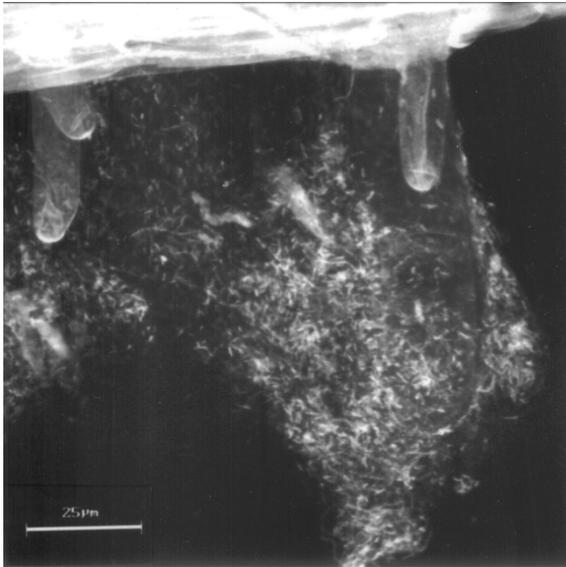


Abb. 33

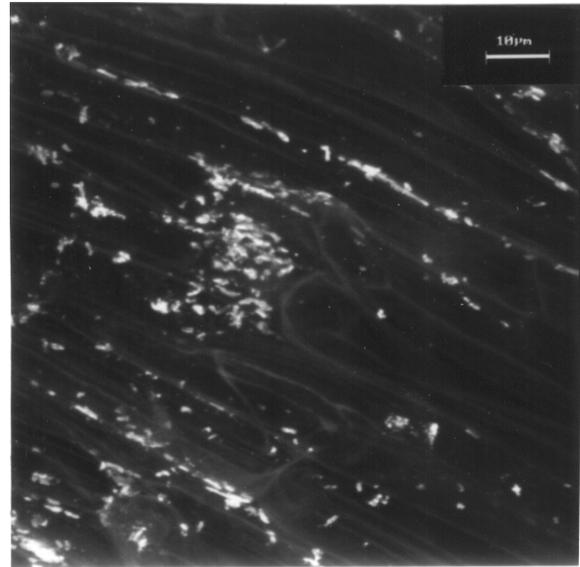


Abb. 34

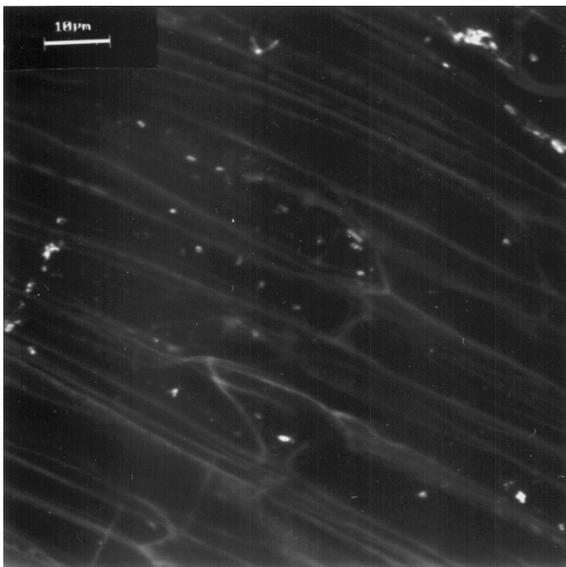


Abb. 35

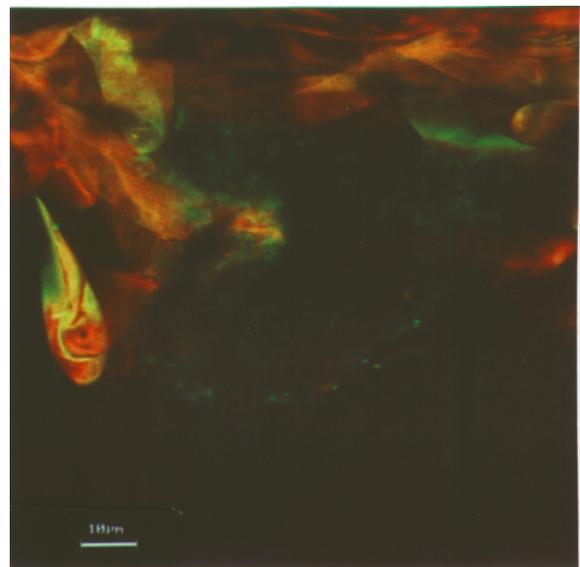


Abb. 36



Abb. 37

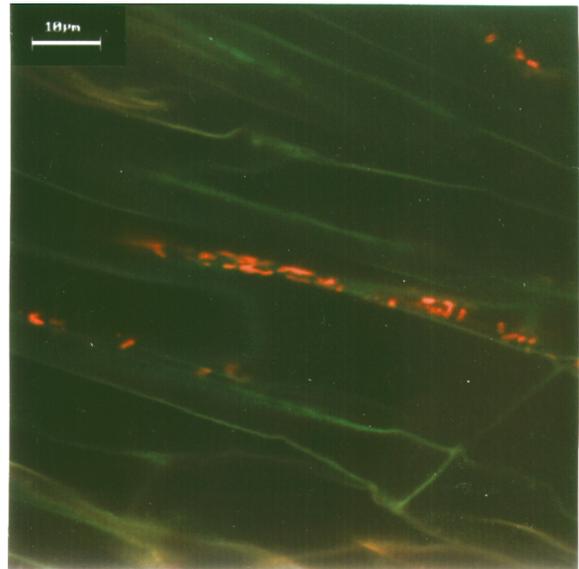


Abb. 38

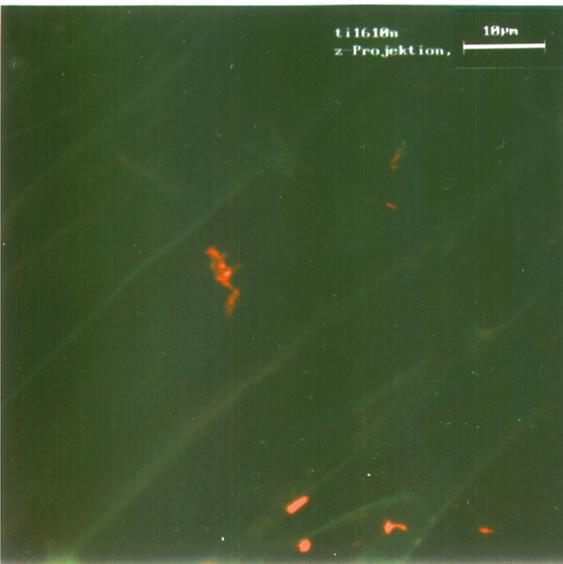


Abb. 39

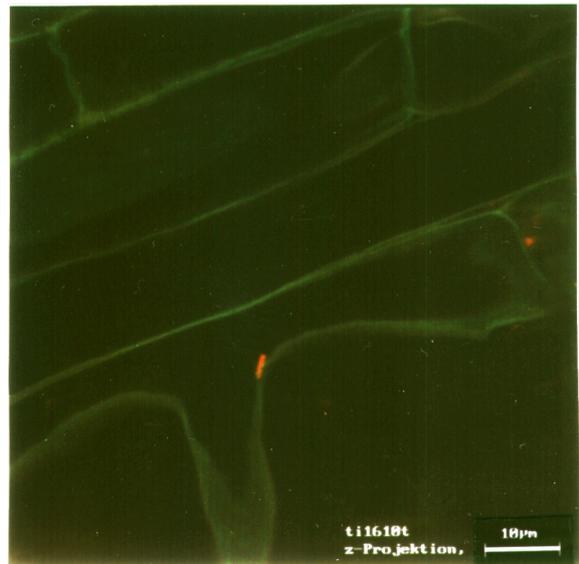


Abb. 41

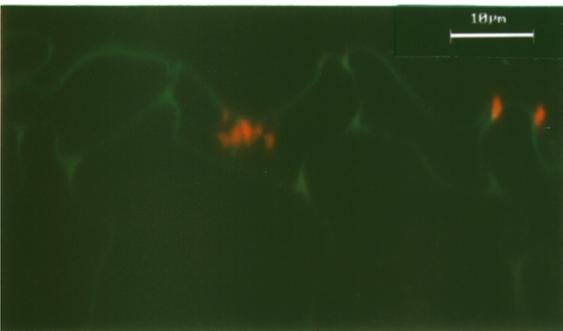


Abb. 40

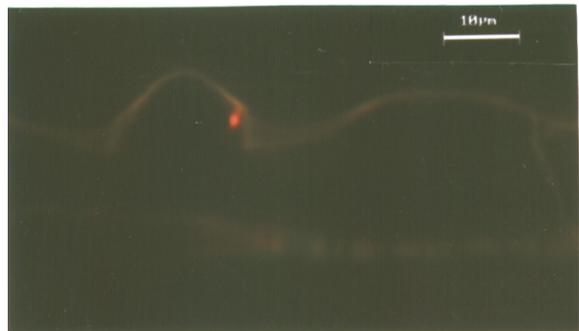


Abb. 42

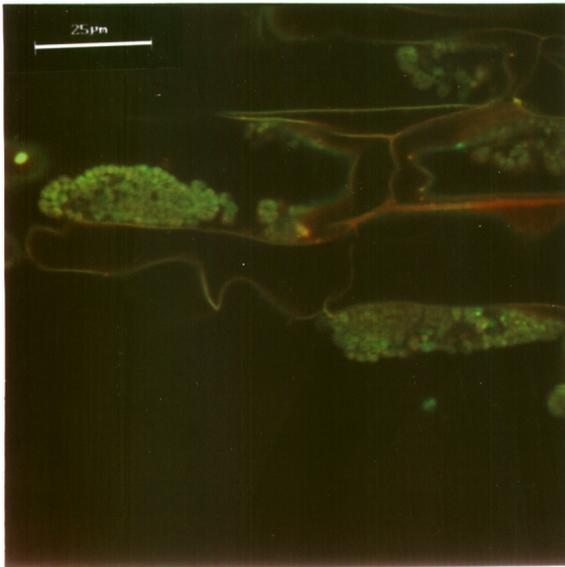


Abb. 43

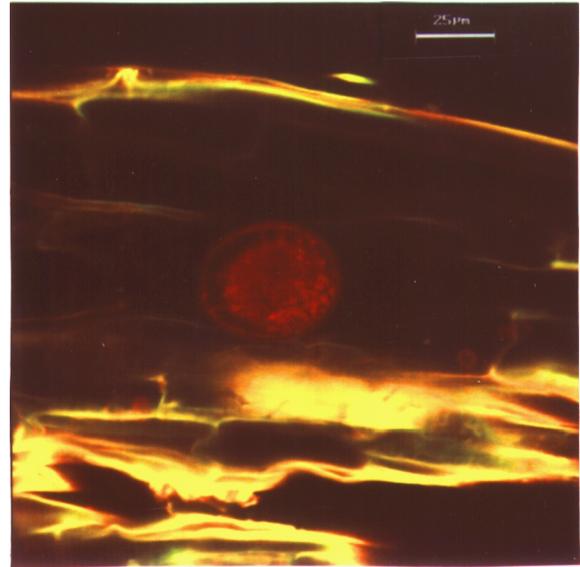


Abb. 44

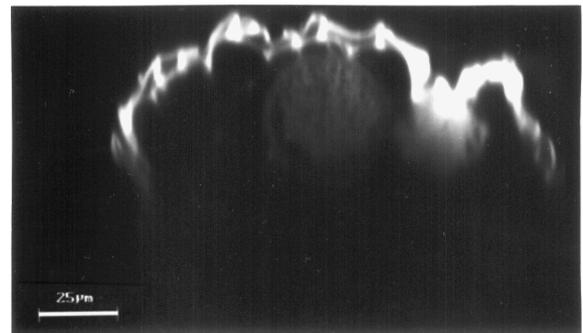


Abb. 45

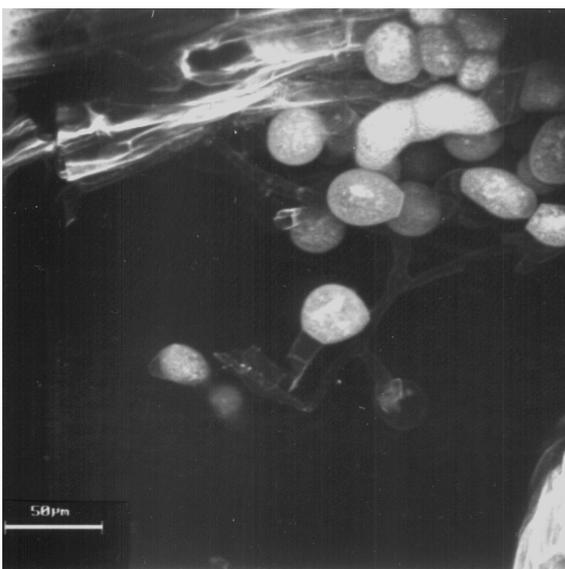


Abb. 46

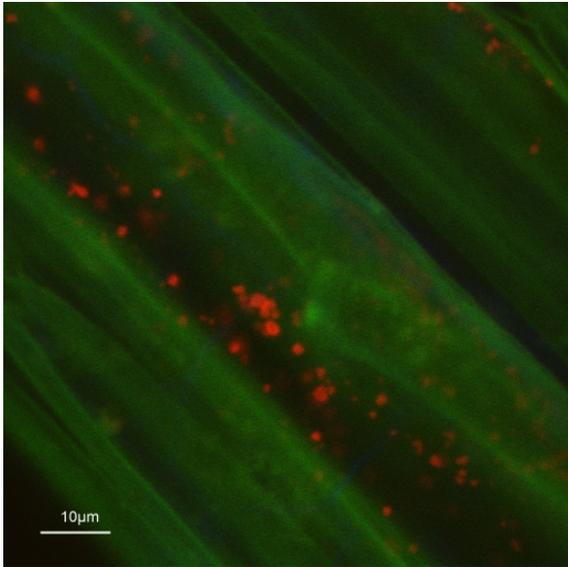


Abb. 47

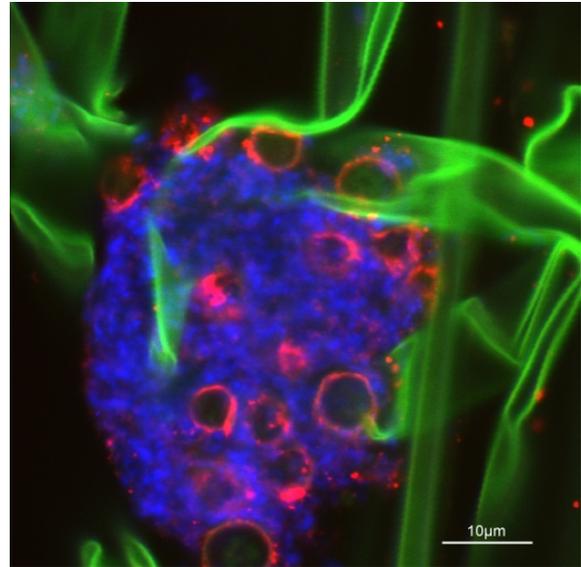


Abb. 48

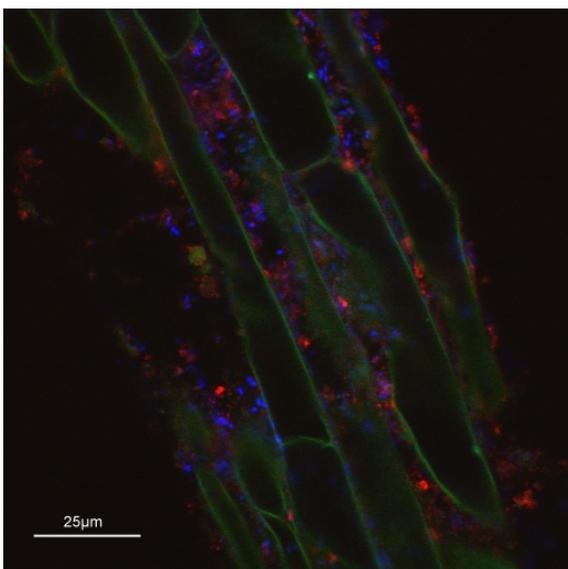


Abb. 49

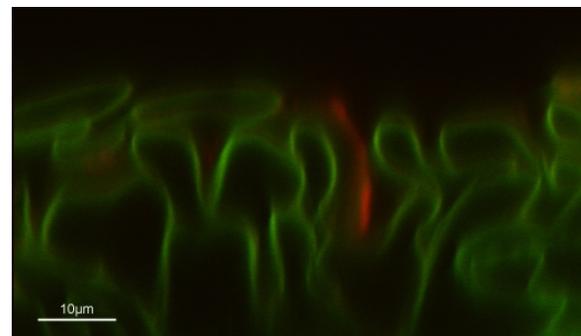


Abb. 50

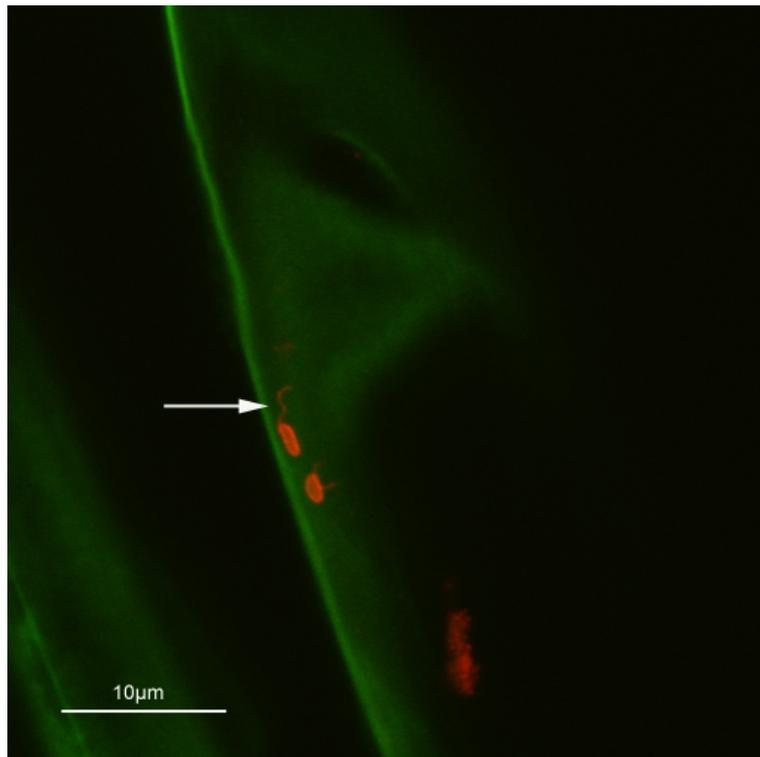


Abb. 51

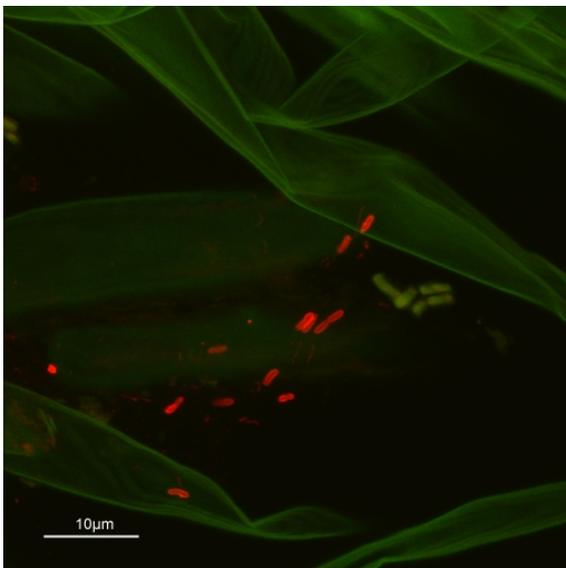


Abb. 52

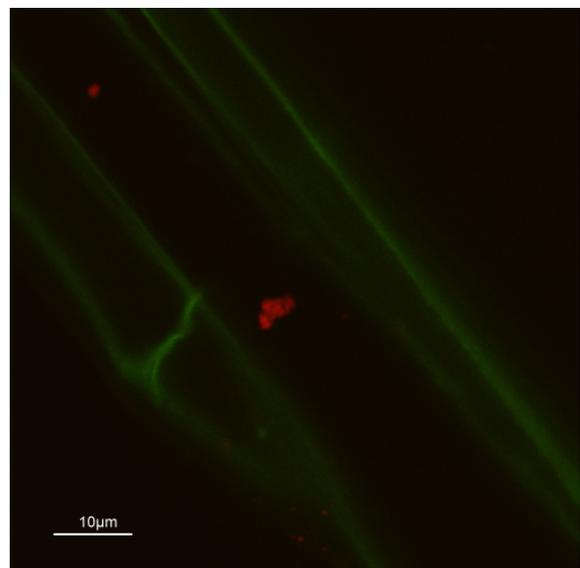


Abb. 53

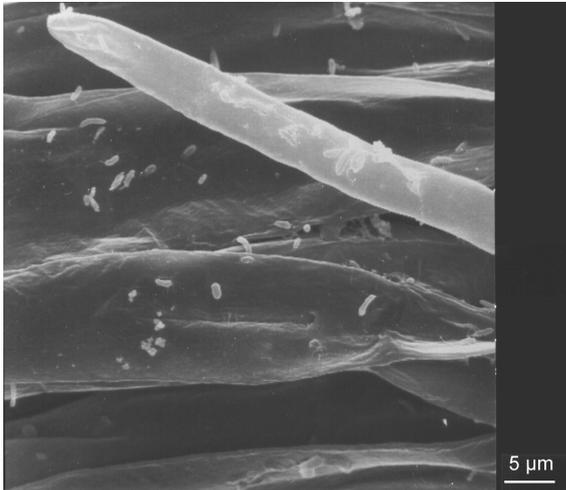


Abb. 54

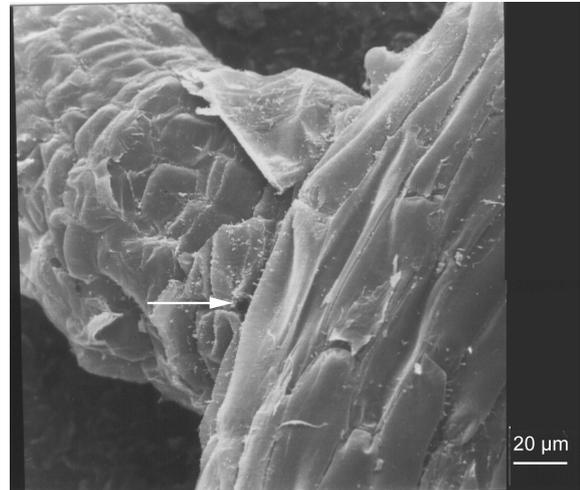


Abb. 55

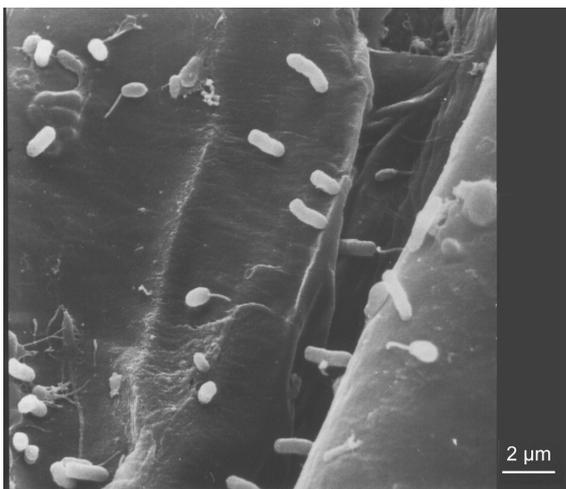


Abb. 56

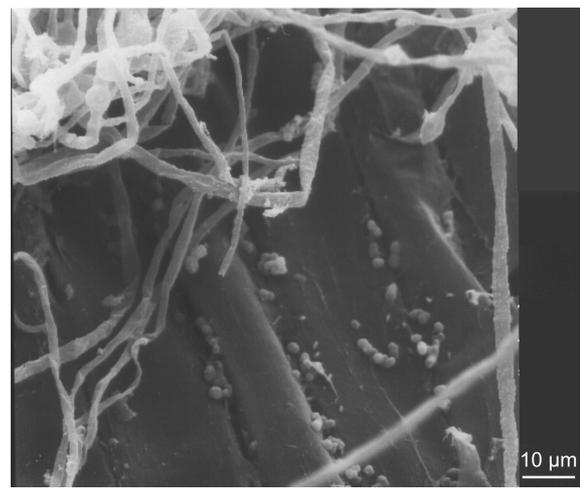


Abb. 57

4 DISKUSSION

4.1 Grundlegendes

***Azoarcus* sp. BH72: Identifizierung und Bildung von EPS**

Mit einem 1986 isolierten (Reinhold *et al.*, 1986) Mitglied des später als *Azoarcus* beschriebenen Genus (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b) sollte in einem *in-vitro*-System unter möglichst naturnahen Bedingungen eine Assoziation mit einer ernährungsrelevanten Nutzpflanze und einem geeigneten VAM-Pilz etabliert werden. Dazu war vorab eine Reihe von Versuchen notwendig.

Eine der wichtigen Voraussetzungen für die Arbeit unter unsterilen Gewächshausbedingungen war die eindeutige Identifizierbarkeit des verwendeten Bakteriums. Gegen *Azoarcus* sp. BH72 wurden zu diesem Zweck erfolgreich spezifische Antikörper hergestellt, deren Bindungsfähigkeit mit verschiedenen Tests belegt wurde (3.1.1.1, 3.1.1.2) und deren Eignung in einem Spezifitätstest mit verwandten Bakterienstämmen dargestellt wurde (3.1.1.3).

Zur Erleichterung der Identifizierung von *Azoarcus* sp. BH72 nach Reisolierung bei Topfversuchen, in denen eine Reihe anderer Bakterien gefunden wurden, wurde eine Rifampicin-resistente Mutante selektiert. Es handelte sich dabei um eine Spontanmutation, die nicht gerichtet erfolgt ist. Das Antibiotikum Rifampicin gehört zu den Rifamycinen, wird von Streptomyceten gebildet und hemmt durch spezifische Bindung an die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase 1 die Initiation der RNA-Synthese. Es gibt zwei Arten von Resistenzen; einerseits ist das Enzym so verändert, dass Rifampicin nicht binden kann, andererseits wird durch eine vermehrte Bildung der Polymerase die Hemmung aufgehoben (Franklin und Snow, 1973). Bei *Azoarcus* sp. BH72 handelt es sich offensichtlich um die zweite Resistenzvariante. Hinweise darauf liefert das Phänomen der Produktion von Exopolysacchariden (EPS). Auf reichhaltigen NA-Platten bildet *Azoarcus* sp. BH72 Kolonien mit einem Hof aus sezernierten EPS, unter dem Einfluss von Rifampicin hingegen nicht (3.1.2.1). Die EPS-Bildung wurde unter diesen Bedingungen also zu Gunsten einer erhöhten Enzymsynthese reduziert. Das gleiche Phänomen wurde bei einer Mutante mit *gus*-Insert beobachtet, die konstitutiv das Enzym Glucuronidase bildet und auf Grund dieser zusätzlichen Stoffwechselleistung nicht in der Lage ist EPS zu bilden (R. Stanke, Institut für Biophysik, pers. Mitteilung). Dem gegenüber hat die Rifampicin-resistente Mutante den Vorteil, dass der Stoffwechsel unter natürlichen Bedingungen, d. h. ohne Antibiotikum, nicht beeinträchtigt ist und somit die Experimente zur Besiedlung und zur Stickstofffixierung unbeeinflusst durch unphysiologische Stoffwechselsituationen durchgeführt werden konnten. Bei gelegentlich gefundenen Kolonien ohne EPS auf NA war die Bildung der Polymerase vermutlich permanent erhöht. Zweifel hinsichtlich der Identität von Kolonien mit und ohne EPS-Bildung konnten durch DNA-Analysen eindeutig beseitigt werden (3.1.2.2). Kolonien mit und ohne EPS-Bildung zeigten identische DNA-Fingerprints. Auch eine SSCP-Analyse belegte die genetische Identität der phänotypisch unterschiedlichen *Azoarcus*-Isolate. Dabei wurde auch deutlich, dass der Stamm *Azoarcus* sp. BH72 zwar Gemeinsamkeiten mit dem nahe verwandten *A. indigenus* VB32 aufweist, jedoch insgesamt signifikant verschieden ist. Bislang sind die phylogenetischen Analysen jedoch noch nicht ausreichend, um für den Stamm BH72 eine neue Spezies zu postulieren oder ihn einer

bestehenden zuzuordnen (Hurek *et al.*, 1997b). Über eine ökologische Bedeutung der EPS-Bildung lässt sich nur spekulieren. Im Boden kommt es durch mikrobielle Polysaccharide zur Mikroaggregation (vgl. Abb. 32, Abb. 33), die das Mikroklima stark beeinflusst; Wassergehalt, Erosionsschutz und Belüftung werden optimiert (Lynch, 1990). Eine derartige Wirkung kommt jedoch nur bei *Azoarcus*-Vertretern der äußeren Rhizosphäre in Frage.

O₂-Sensitivität der Nitrogenase von *Azoarcus* sp. BH72

Die Stickstofffixierung stellt in dieser Arbeit ein zentrales Thema dar. Daher wurde bei *Azoarcus* sp. BH72 die Sauerstoffempfindlichkeit des Schlüsselenzyms Nitrogenase in geschlossenen Batch-Kulturen untersucht (3.1.3). Da kein Gasaustausch erfolgte, war die Wachstumszeit, durch die im Gasraum eingestellte Sauerstoffkonzentration limitiert; bereits nach dreistündigem Wachstum waren 3 % O₂ durch den aeroben Stoffwechsel (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b) verbraucht. Ein Optimum der Nitrogenaseaktivität wurde bei 5 % O₂ ermittelt; der natürliche atmosphärische Anteil dieses Gases beträgt jedoch 21 %. Der Verbrauch des Sauerstoffs in Luftraum und Medium ist deshalb eine essentielle Voraussetzung für die Nitrogenaseaktivität. Erst wenn die O₂-Konzentration unter 8 % absank, war im Acetylenreduktionstest (ARA) eine Ethylenbildung messbar. Aus diesen Versuchen ergibt sich auch, dass Nitrogenase und aerober Stoffwechsel bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ihre maximale Aktivität entwickeln. Das stärkste Bakterienwachstum fand sich bei der höchsten getesteten O₂-Konzentration, jedoch erst nach 20stündigem Wachstum. *Azoarcus* sp. ist damit unter Stickstofffixierungsbedingungen ein relativ Sauerstoff-tolerantes Bakterium. Im Vergleich dazu wird für *H. seropedicae* ein Grenzwert von 3 % (Baldani *et al.*, 1986) und für *Azospirillum* von 2 % O₂ (Vande Broek *et al.*, 1996) angegeben.

Diese Ergebnisse entsprechen den für den Boden diskutierten Verhältnissen, bei denen zusätzlich die Wurzelatmung zum O₂-Verbrauch beiträgt und so zu einer Verbesserung der Lebensbedingungen für assoziative diazotrophe Bakterien in der externen Rhizosphäre führt. Somit ist vermutlich ein Gleichgewicht von Energiestatus und Gehalt des im Medium bzw. Boden verfügbaren Stickstoffs dafür ausschlaggebend, dass diazotrophe Bakterien aktiv Bereiche mit verringerter Sauerstoffkonzentration aufsuchen, um auf Kosten des Energiestoffwechsels Nitrogenaseaktivität zu entwickeln. Bei genügender Stickstoffversorgung zeigt *Azoarcus* sp. BH72 keine Sauerstoffsensitivität im Wachstum (Hurek *et al.*, 1987a).

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass nach 26,5 h durchweg eine höhere Nitrogenaseaktivität als nach 48 h gemessen wurde. Dieses beruht auf der Art der Messung. Sie ergibt einen Durchschnittswert für die gesamte vorangegangene Inkubationsperiode, und das an Hand der optischen Dichte erkennbare Absterben der Bakterien bei langer Inkubation führt dabei zu einer Verringerung dieses Wertes.

Nitrogenaseaktivität bei gemeinsamer Kultur mit Hirse

Dieser Sauerstoffeffekt findet sich auch bei der Betrachtung der Nitrogenaseaktivität in gemeinsamer Kultur mit Hirse wieder (3.1.4). In flüssigem NFb-Medium unter Normalatmosphäre war auch in Standkultur die O₂-Konzentration so hoch, dass *Azoarcus* sp. BH72 in alleiniger Kultur keine messbare Ethylenproduktion zeigte. Es zeigte sich auch keine Trübung im Medium, die

auf Bakterienwachstum hindeuten würde. Hingegen war mit einer Hirsepflanze bereits nach 1,5 h Nitrogenaseaktivität vorhanden, die während der langen Versuchszeit von 10 Tagen stetig anstieg. Hier hat die Wurzelatmung den pO_2 so weit abgesenkt, dass Nitrogenaseaktivität möglich war. Unter normalen atmosphärischen Bedingungen ist die Assoziation mit einer geeigneten Pflanze also eine Grundvoraussetzung für die Stickstofffixierung. Im modifizierten semisolid-Medium mit Hirsepflanze war die Ethylenproduktion mit der in flüssigem Medium mit Pflanze vergleichbar, nach 10 Tagen sogar noch etwas höher. Darüber hinaus war eine dünne Pellicle unterhalb der Medienoberfläche zu erkennen, wie es für mikroaerophile Bakterien typisch ist (Döbereiner *et al.*, 1995a), was das gute Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 belegt. Daran anknüpfend stellt sich die Frage, weshalb in ebensolchem Medium ohne Pflanze eine sehr viel höhere Ethylenproduktion zu verzeichnen war. Bei Versuchen mit Pflanzen wurden die Bakterien nicht gleichzeitig mit der Pflanze angeimpft, sondern später zugesetzt, während sie bei Einzelinokulation in frisch hergestelltes Medium gegeben wurden. *Azoarcus* sp. fand hier offenbar bessere Bedingungen vor, da durch das Erhitzen des semisolid-Agars vor der Befüllung der Röhren der Sauerstoffgehalt im Medium stark reduziert war. Die Geometrie der Gefäße mit einer geringen Oberfläche sowie die eingeschränkte Gasdiffusion im erstarrenden Medium bewirkten die Ausbildung eines Sauerstoffgradienten mit verringerten O_2 -Konzentrationen im unteren Teil der Röhre. Dort fanden die Bakterien Verhältnisse, die die Nitrogenaseaktivität begünstigten und es bildete sich ein ausgeprägtes Pellicle, das mit der Zeit zur Oberfläche wanderte. Starkes Wachstum führte zu einer raschen Verarmung an Sauerstoff auch in den oberen Regionen und somit zu einer sehr frühen Aktivität der Nitrogenase, was wiederum den im Vergleich schnelleren Aufbau von Biomasse ermöglichte. Durch den Umstand, dass lediglich die relative Nitrogenaseaktivität bestimmt werden konnte, wurde die Zunahme der Bakterienzahl über die Zeit nicht eingerechnet.

Durch Färbung mit Tetrazoliumchlorid (TTC) konnten Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 mit Nitrogenaseaktivität mikroskopisch dokumentiert werden (Abb. 28–32). TTC wird bei Reduktion durch das Enzym in einen roten Farbstoff umgesetzt. Aktive Bakterien befanden sich in der äußeren Rhizosphäre von Hirse in der Wurzelhaarzone, an Seitenwurzelemengenen und auch intrazellulär. TTC kann auch von anderen, nicht stickstofffixierenden Mikroorganismen, wie z. B. obligat anaeroben fermentativen Bakterien (Oren, 1987), reduziert werden. Das Verfahren wurde deshalb nur im monoxenischen System oder an einer reinen Bakterienkultur angewandt (Reinhold und Hurek, 1988b), in denen keine reduzierenden Bedingungen herrschten.

4.2 Interaktionen von diazotrophen Bakterien mit Nutzpflanzen

***Azoarcus* sp. BH72 mit Hirse und Reis**

Die Besiedlung von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 wurde in monoxenischer Hydrokultur genaueren Betrachtungen unterzogen.

Eine Variation des flüssigen Hoagland-Mediums gab Aufschluss über den Einfluss von C- und N-Versorgung auf die Kolonisierung (3.2.1, Abb. 11). Dies geschah auch im Hinblick auf die Isotopenverdünnungsversuche (3.4, 3.5), in denen aus methodischen Gründen Stickstoff als

Ammonium zugesetzt werden musste. Die stärkste Besiedlung fand sich ohne Zusatz von C- und N-Quelle. Durch die Notwendigkeit, Luftstickstoff zu fixieren, ist der Bedarf des Bakteriums an C-Quelle zur Energiegewinnung sehr hoch (Postgate, 1987) und daher ist der Prozess der Stickstofffixierung durch die Verfügbarkeit von C-Quellen limitiert (O'Toole und Knowles, 1973). Als Folge besiedeln die chemotaktisch positiven Bakterien gezielt die Rhizosphäre. Für die Besiedlung der Wurzel ist Chemotaxis von großer ökologischer Bedeutung, da die Bakterien so in der Lage sind, sich gegen konkurrierende Organismen durchzusetzen (Stein *et al.*, 1994). Bereits der junge Keimling ist in der Lage, durch Exsudate das Überleben der assoziierten Bakterien sicherzustellen. Für Bakterienisolate von C₄-Pflanzen erwiesen sich organische Säuren als stärkstes Attraktant. Besonders wirksam auf Kallargrasisolate war in dieser Hinsicht Malat (Reinhold *et al.*, 1985), das Hauptwurzelexsudat von Kallargras (Kloss *et al.*, 1984). Nach vierwöchiger Kultur konnten Bakterien nicht nur aus der Rhizosphäre sondern in hoher Zahl auch aus dem Spross reisoliert werden. Dieses ist ein erster Beleg für die Fähigkeit des obligaten Endophyten *Azoarcus* sp. BH72 auch das Innere von Hirsekeimlingen zu besiedeln, für den bisher ausschließlich die Besiedlung von Kallargras und von Reis beschrieben wurde (Hurek *et al.* 1991; Hurek *et al.*, 1994b). Folgeexperimente (3.2.3, 3.3.1, 3.5) bestätigen dieses und mit Hilfe mikroskopischer Techniken konnte gezeigt werden, dass es sich um eine intrazelluläre Besiedlung handelte (3.6, Abb. 30, 39–42, 47). An dieser Stelle sei besonders auf die hohe Zahl der Bakterien hingewiesen, die nicht nur von bzw. aus der Wurzel sondern auch aus dem Spross reisoliert wurden! Dieses bestätigt die Wahl von Hirse als Versuchspflanze und belegt nachdrücklich die Befähigung von *Azoarcus* sp. BH72 zur endophytischen Besiedlung tropischer Gramineen neben der Wirtspflanze Kallargras (Stein *et al.*, 1997; Reinhold *et al.*, 1986).

Bei Zusatz von Malat und Ammonium wurden die wenigsten Bakterien an der Pflanze gefunden, da im Medium ausreichend Nährstoffe vorhanden waren. Fehlte hingegen die C-Quelle, wanderten die Bakterien zur Pflanze hin, allerdings nicht in so starkem Maße wie unter Stickstofffixierungsbedingungen (ohne Ammonium), da der Bedarf an C-Quelle geringer und das Aufsuchen von O₂-ärmeren Bereichen an der Wurzel nicht essentiell ist (Hurek *et al.*, 1987b). Nahezu die gleichen Bakterienmengen wurden reisoliert, wenn keine N-, aber C-Quelle vorhanden war. Durch die Malatzugabe ist vor allem zu Beginn kein Gradient vorhanden und die Bakterien sind nicht in der Lage, die Wurzel durch Chemotaxis aufzusuchen. Darüber hinaus kann auch im Medium Stickstofffixierung erfolgen, da im unteren Bereich der Standkultur der Sauerstoffpartialdruck hinreichend gering ist (vgl. 3.1.3 und 3.1.4) und er im weiteren Verlauf durch die metabolische Aktivität der Bakterien und die Wurzelatmung auch in den oberen Regionen des Kulturgefäßes gesenkt wird.

Der Ansatz, die gemeinsame Anzucht von Pflanze und Bakterien in *in-vitro*-Kultur zu starten und die Bakterien durch Zufuhr einer geeigneten Energiequelle zu unterstützen ergab positive Reaktionen hinsichtlich der Nitrogenaseaktivität (Döbereiner, 1977; Alexander und Zuberer, 1989b), erwies sich hier jedoch als nachteilig für die Besiedlung und für die Pflanze, die im Wachstum sichtbar gehemmt wurde. Hurek *et al.* (1994b) beschrieben für Reis, dass Pflanzen mit *Azoarcus* sp. BH72 und Malat ein geringeres Trockengewicht aufwiesen als ohne Malat. In vorangegangenen Experimenten wurde bei Reis und Kallargras gezeigt, dass nach 8 Tagen 1 g/l Malat verbraucht worden war, damit einhergehend der pH-Wert anstieg und die Bakterienpopulation im Medium sehr stark gewachsen war bis maximal $2,5 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Stein,

1992). Auch hier wurde keine Förderung der Pflanzen durch den bakteriellen Stoffwechsel beobachtet.

Die Entwicklung der Bakterienpopulation im Medium wurde für das hauptsächlich verwendete Hoagland-Medium, mit 3 mg/l NH_4Cl und ohne Malat, bei Kulturen mit Hirse und Reis verfolgt (3.2.2). Von der anfänglichen Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ cfu/ml war bei Hirse und Reis während der vierwöchigen Versuchszeit im Kulturmedium eine Abnahme unter leichten Schwankungen zu verzeichnen. Dies mag auch dadurch bedingt sein, dass die Bakterien Chemotaxis-gesteuert die Wurzel aufsuchen. Hauptsächlich ist dafür jedoch der durch die NH_4^+ -Aufnahme bedingte pH-Wert-Abfall verantwortlich (Findenegg, 1987), der parallel zur Abnahme der LKZ auftrat. Für die Nitrogenaseaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 wird ein Optimum von pH 6,5–6,8 angegeben (Reinhold-Hurek et al., 1993b) und Versuche in kontinuierlicher Kultur im Chemostaten ergaben eine konstante Wachstumsrate im Bereich von pH 6,0–7,8 (Hayen-Schneg, 1995). Unter den hier gewählten Bedingungen wurde allerdings ein deutlicher Abfall der Lebendkeimzahl im Medium beobachtet, sobald ein pH-Wert von 6,8 unterschritten wurde. Es darf zudem nicht außer Acht gelassen werden, dass die Böden, auf denen die ursprüngliche Wirtspflanze Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) wächst, extreme pH-Werte von 9–10 aufweisen. Diese Werte werden zwar durch das Kallargras etwas abgesenkt (Malik et al., 1986), jedoch kann hieraus abgeleitet werden, dass der Mikroorganismus eher an höhere pH-Werte angepasst ist und eine Ansäuerung des Mediums eine Wachstumsabschwächung bewirkt. Zudem ist *Azoarcus* sp. BH72 ein endophytisches Bakterium, das nicht im freien Boden des Kallargrasfeldes gefunden wurde (Reinhold et al., 1986).

Der pH-Wert war bei der Reiskultur über die Zeit stabiler. Aber auch hier zeigte sich bei einem Abfall des pH-Wertes von pH 6,95 auf pH 6,75 nach 7 Tagen eine starke Abnahme der Zellzahl im Medium, die schließlich sogar auf $2,2 \cdot 10^5$ cfu/ml zurückging. Bei Hirse waren nach 4 Wochen noch $4 \cdot 10^6$ cfu/ml vorhanden. Reis bietet für *Azoarcus* sp. BH72 mit der pH-Wert-Stabilität und ebenso als C_4 -Pflanze mit der Versorgung an organischen Säuren wie Malat, Glutarat, Acetat, Citrat und Succinat (Rovira, 1969; Waschütza, 1993), die *Azoarcus* sp. BH72 verwerten kann (Reinhold-Hurek et al., 1993b), gute äußere Bedingungen. *Azoarcus* spp. wurde aber nie von Reis isoliert, sondern ein Förderungspotential wurde bislang nur in monoxenischer *in-vitro*-Kultur beobachtet (Hurek et al., 1994b; Reinhold-Hurek und Hurek, 1998a). Die Assoziation mit Hirse erwies sich allerdings als mindestens genauso erfolgreich: Am Ende des Versuchs wurden von Reisswurzel und -spross $2,2 \cdot 10^7$ cfu/g TG bzw. $2,0 \cdot 10^7$ cfu/g TG reisoliert, verglichen mit $1,9 \cdot 10^8$ cfu/g TG bzw. $4,5 \cdot 10^7$ cfu/g TG bei Hirse.

In der Hauptsache konzentrierten sich die Experimente daher auf Hirse als Versuchspflanze, und mit ihr wurde die zeitliche Abfolge der Besiedlung und die genaue Verteilung von *Azoarcus* sp. BH72 im Hydrokultursystem untersucht (3.2.3). Im Medium blieb die Zellzahl zunächst stabil, bis es nach 11 Tagen zu einem Abfall kam, wie er bereits oben beobachtet wurde. Der pH-Wert sank zu dieser Zeit ab, und das Stickstoffangebot war erschöpft. Auf der Wurzeloberfläche wurden bereits nach 3 Tagen Bakterien gefunden (1. Messpunkt) und nach 14 Tagen auch im Spross, jedoch noch nicht in der oberflächensterilisierten Wurzel. Diese Beobachtung erscheint nicht plausibel und könnte (1) auf einer äußerlichen bakteriellen Verunreinigung eines untersuchten Sprosses oder (2) auf einem falsch negativen Befund bei der Reisolierung von Bakterien aus dem Wurzelinneren, d. h. aus oberflächensterilisierten Wurzeln beruhen. Auf Grund der geringen Bakterienzahlen, die sich zu Beginn der Besiedlung des

Pflanzeninneren reisolieren ließen, war es unvermeidbar, gelegentlich einen solchen Befund zu erhalten. Da außerdem beim Ernten der Pflanze genau darauf geachtet wurde, dass der Spross nicht mit dem Kulturmedium und somit mit den Bakterien in Berührung kam und alle bisherigen Daten darauf hinweisen, dass sich die potentiellen Eindringorte an der Wurzel befinden (s. u.; Reinhold-Hurek und Hurek, 1998b), ist davon auszugehen, dass das Innere der Hirsewurzel spätestens nach 14 Tagen besiedelt war. Im weiteren Verlauf konnten Bakterien in steigender Zahl aus Wurzel und Spross reisoliert werden. Dieses deckt sich mit der Untersuchung aus 3.2.1. Unter den hier gewählten Bedingungen verteilten sich die Bakterien gleichmäßig in Wurzel und Spross von Hirse, während die Zahl der Zellen auf der Wurzel um den Faktor 1000 größer war. Die Mehrzahl der Bakterien scheint also in Assoziation mit der Pflanzenwurzel zu existieren und ein geringerer Teil tritt in ein endophytisches Verhältnis ein. Wie oben erwähnt wurden Bakterien lichtmikroskopisch an Wurzelhaaren und auch intrazellulär in der Wurzel lokalisiert (Abb. 29–32). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gelang die eindeutige Lokalisation. Der Besiedlungsvorgang wird an anderer Stelle ausführlicher diskutiert.

Obligate und fakultative Endophyten: *Herbaspirillum seropedicae* bzw. *Azospirillum brasilense*

Dieses Verhältnis scheint typisch zu sein. Ein anderes, als obligater Endophyt bezeichnetes Bakterium, *Herbaspirillum seropedicae* (James und Olivares, 1997), wurde in einem *in-vitro*-Experiment, allerdings mit festem Substrat, an bzw. in Hirse in vergleichbaren Zahlen gefunden (3.2.4, Tab. 2). Auffällig ist jedoch die starke Besiedlung des Sprosses, wo *H. seropedicae* Z67 sich nach einmonatiger Kultur in fast 10fach höherer Zahl ansiedelte als in der Wurzel. Parallel wurde Hirse mit *Azospirillum brasilense* Sp245 inokuliert, einem Bakterium, das nicht bevorzugt mit Hirse assoziiert ist, sondern an Weizen und dort auch endophytisch vorkommt (James und Olivares, 1997; Schloter *et al.*, 1993; Aßmus *et al.*, 1995). Da es sich jedoch um ein fakultativ und nicht obligat endophytisches Bakterium handelt (Baldani *et al.*, 1997), wurde es in 10fach höherer Dichte als der obligate Endophyt *H. seropedicae* zugesetzt. Es wurde hier nach einmonatiger Kultur von der Wurzel und aus der oberflächensterilisierten Wurzel von Hirse in vergleichbar großen Zahlen wie *H. seropedicae* reisoliert, während es im Spross in 10fach geringeren Mengen gefunden wurde. *H. seropedicae* war also in der Lage, diesen Animpfvorteil auszugleichen und hatte als obligater Endophyt das Bestreben, in die oberirdischen Pflanzenteile vorzudringen. Für die Pflanze brachte die Inokulation mit den diazotrophen Bakterien generell Vorteile beim Aufbau von Biomasse (Abb. 15). Das Trockengewicht war gegenüber der nicht inokulierten Kontrolle signifikant erhöht. Eine Unterscheidung zwischen den Bakterien kann diesbezüglich nicht getroffen werden; die mit *A. brasilense* Sp245 inokulierten Pflanzen wiesen ein geringfügig höheres Trockengewicht auf, allerdings waren auch ca. 1,5-mal mehr Bakterien pro g TG an der Wurzel vorhanden als bei *H. seropedicae*, was auf einen direkten Zusammenhang von Bakteriendichte und Trockengewicht der Pflanze schließen lässt. Als sogenannte PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*; Kloepper *et al.*, 1992) vermögen Azospirillen die Wirtspflanze auf vielfache Weise zu unterstützen (Okon und Vanderleyden, 1997). Diese Arbeit zeigt, dass Gleiches auch für *H. seropedicae* und *Azoarcus* sp. BH72 (s. u.) gilt.

Endophytische Bakterien können durch ihr Verhalten dem Konkurrenzdruck durch andere Mikroorganismen in der Rhizosphäre (Kloepper und Beauchamp, 1992) entgehen und erschließen dadurch neben Exsudaten, Sekreten, wie dem Mucigel, und Lysaten aus abgestreiften Zellen der Wurzel (Rovira, 1969; Lynch, 1983) auch intrazelluläre Energiequellen, die sie direkt nutzen können. In monoxenischer Kultur mit Hirse zeigte *H. seropedicae* höhere Affinität zur Pflanze als *A. brasilense* Sp245, ein fakultativer Endophyt. Herrscht bei gemeinsamer Inokulation eine direkte Konkurrenzsituation für die beiden Mikroorganismen vor, hat auch dann der obligate Endophyt Besiedlungsvorteile gegenüber dem vornehmlich außen assoziierten Bakterium (Stein *et al.*, 1995). Versuche mit Mischinokulationen geben Aufschluss über das Konkurrenzverhalten zweier obligater Endophyten bei der Besiedlung von Hirse und Reis.

Mischinokulation zweier endophytischer Bakterien *Azoarcus* sp. BH72 und *Herbaspirillum seropedicae* bei Hirse und Reis

Hirse wurde mit *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* Z67 zusammen und in Kontrollen separat mit jedem Bakterium inokuliert. Die Kulturdauer von 41 Tagen war für eine Hydrokultur vergleichsweise lang, ermöglichte aber eine Beobachtung der Besiedlung über die oben beschriebenen Zeiträume hinaus. Nach 32tägiger monoxenischer Kultur wurden für *H. seropedicae* in Spross und Wurzel ähnlich große Besiedlungsdichten gefunden (3.3.1) wie bei den zuvor diskutierten Substratexperimenten. *Azoarcus* sp. BH72, der aus der oberflächensterilisierten Wurzel in ähnlichen Zahlen isoliert wurde, zeigte aber im Spross zumeist eine geringere Besiedlungsdichte als *H. seropedicae*. Bei beiden Experimenten wurde allerdings eine kontinuierliche Verringerung der Bakterienzahl bezogen auf das Pflanzenfrischgewicht beobachtet. Im Rhizosphären-nahen Agar hingegen zeigten beide Bakterienarten eine Vermehrung über die gesamte Zeit, so dass ausgeschlossen werden kann, dass in diesen Versuchsreihen in der Rhizosphäre der Hirsepflanzen ungünstige Bedingungen für eine bakterielle Besiedlung vorlagen. Es liegt vielmehr die Annahme nahe, dass sich die Bakterienpopulationen im Inneren der Pflanze stabilisierten. Die Darstellung in Abb. 16 zeigt die LKZ bezogen auf das Frischgewicht der Pflanze. Da das FG mit der Zeit stärker stieg als die Zahl der Bakterien, kam es zu einer Verteilung und relativen Ausdünnung der Bakterien im Inneren von Spross und Wurzel (bezogen auf das FG). Nimmt man die Ergebnisse von Reis hinzu, wird diese These bestätigt: Die Bakterienzahlen in Wurzel und Spross stiegen, und die Reispflanzen blieben im Vergleich zu den entsprechenden Hirsepflanzen klein. Folglich zeigte sich keine Abnahme der relativen Bakteriendichte pro g FG in Wurzel und Spross.

In der äußeren Rhizosphäre besaß *H. seropedicae* durch den erniedrigten pH-Wert (6,3) im Agar mindestens bei Beginn der Kultur einen Wachstumsvorteil gegenüber *Azoarcus* sp., was sich in den höheren Zahlen reisolierter Bakterien widerspiegelt. Das pH-Optimum für *H. seropedicae* liegt bei pH 5,3–8,0 (Baldani *et al.*, 1986) und damit in niedrigeren Bereichen als für *Azoarcus* sp. BH72. Bei Mischinokulation wirkt sich dieser Vorteil im Agar nicht weiter aus, synergistische Effekte bewirkten im Gegenteil eine Förderung beider Bakterien in der äußeren Rhizosphäre bei der Besiedlung von Wurzel und Spross. Dort kam es bei Hirse in allen Pflanzenteilen zu einem Anstieg der Zellzahlen von *H. seropedicae* und *Azoarcus* sp. BH72, wobei *H. seropedicae* stets etwas im Vorteil war. Da dies bei Einzelinokulation nicht gegeben war, scheint *H. seropedicae* zur Penetration der Wurzel die Hilfe von *Azoarcus* sp. BH72 zu nutzen,

für den nachgewiesen wurde, dass er in der Lage ist, mit Cellulasen und Pectinasen pflanzliche Zellwände zu durchdringen (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993a). Der Nachweis solcher Enzyme bei *H. seropedicae* ist bislang nicht gelungen (James und Olivares, 1997). Zu einer gewissen Konkurrenz der beiden Endophyten kam es allein zu Beginn der Wachstumszeit, wie die Besiedlungsdichten für Wurzel und Spross am 18. Tag zeigen, wo in Mischkultur weniger Bakterien angesiedelt waren als in der Einzelkultur. Am 32. Tag waren jedoch keine Unterschiede bei der Zahl der reisolierten Bakterien mehr erkennbar. Worauf genau die Synergie der Mikroorganismen beruht, ist noch unklar. Zweifelsfrei ist hingegen die Förderung der Hirsepflanze durch die Mikroorganismenaktivität (Abb. 18). Insbesondere das Sprosswachstum wurde von *Azoarcus* sp. BH72 ungleich stärker gefördert als von *H. seropedicae* und dieser Effekt konnte auch in Mischinokulation nicht weiter gesteigert werden, was wiederum bedeutet, dass die Bakterien gute Bedingungen vorfanden und nur eine scheinbare Abnahme der Zellzahl bei Einzelinokulation vorlag.

Bei Reis war ebenfalls eine Förderung der pflanzlichen Biomasse durch *Azoarcus* sp. BH72 und *H. seropedicae* im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollpflanzen zu verzeichnen, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Unterschiede zwischen den Inokulationsansätzen mit den verschiedenen Kombinationen waren nicht zu erkennen.

Auch bei der Besiedlungsstruktur von Wurzel und Spross zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Pflanzen. Während in monoxenischer Kultur bei Hirse die Zellzahlen beider Bakterien sowohl innerhalb der Wurzel als auch im Inneren des Sprosses über die gesamte Beobachtungsdauer abnahmen (s. o.), zeigte sich im Gegensatz dazu bei Reis für beide Diazotrophe eine starke Zunahme. Dabei fand sich *H. seropedicae* in deutlich größeren Zahlen als *Azoarcus* sp. BH72. Diese Zunahme der relativen Zellzahl im Vergleich zu Hirse ist auf das geringere Wachstum der Reispflanzen zurückzuführen, deren Biomassezunahme im Versuchszeitraum geringer war. Der Grund für die z. T. extreme Besiedlungsdichte von *H. seropedicae* liegt in der Tatsache, dass Reis, insbesondere die verwendete Varietät, die Ursprungspflanze des Stamms Z67 darstellt und dass diese Experimente in Brasilien durchgeführt wurden. Dort herrschten nicht nur in der Klimakammer für die Kultivierung optimale Bedingungen (z. B. Luftfeuchtigkeit), sondern es konnten auch optimal aufeinander abgestimmtes Saatgut und Inokulum verwendet werden, die beide im natürlichen Habitat miteinander assoziiert sind. Es ergaben sich also Hinweise, dass Endophyten mit ihrer natürlichen Wirtspflanze auch in *in-vitro*-Versuchen eine engere Assoziation bilden als nahe verwandte diazotrophe Bakterien, die von anderen Gramineen isoliert worden sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen aber die Ansicht, dass originäre („primäre“) Wirtspflanzen für die Besiedlung mit ihren natürlicherweise assoziierten diazotrophen Bakterien prädisponiert sind. Die Kombination der Organismen in einer Assoziation ist somit von großer Bedeutung (Zuberer, 1990). Diese wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass die Besiedlung mit *H. seropedicae* durch die Anwesenheit von *Azoarcus* sp. BH72 nicht zusätzlich gesteigert wird, wohl aber die mit *Azoarcus* sp. BH72 in der Wurzel, was eine Parallele zum oben besprochenen Hirseexperiment darstellt. Weshalb dies nicht für die Sprossbesiedlung gleichermaßen gilt, ist unklar; ein entsprechender Effekt mag aber auf Grund von Messungenauigkeiten nicht erfasst worden sein. Es ist aber festzustellen, dass der postulierte synergistische Effekt nur dann wirksam wird, wenn nicht originäre („sekundäre“) Wirtspflanzen endophytisch besiedelt werden. In einer natürlichen endophytischen Assoziation scheint unter geeigneten Bedingungen dem hingegen bereits eine optimale

und somit nicht mehr steigerungsfähige Besiedlungsdichte erreichbar zu sein. Der „Fremdkeim“ *Azoarcus* sp. BH72 scheint von einer Mischkultur mit *H. seropedicae* zu profitieren. Im Vergleich zur monoxenischen Kultur besiedelte er nicht nur das Innere von Wurzel und Spross in größeren Zahlen, er bildete auch in der Rhizosphäre eine stabile Population. Dieses war möglicherweise durch pH-Effekte bedingt, die aus der Interaktion von Pflanze und Mikroorganismus resultierten. In den Wurzelexsudaten von Reis fanden sich verschiedene organische Säuren (Waschütza, 1993), ein Absinken des pH-Wertes wurde jedoch durch die enge Assoziation und den schnellen Umsatz der Exsudate limitiert.

Für den obligaten Endophyten *H. seropedicae* scheint unabhängig von der Wirtspflanze generell ein ökologischer Druck zur Besiedlung der Wirtspflanze zu herrschen. Die Bakteriendichte in der äußeren Rhizosphäre nahm sowohl in Einzel- wie auch in Mischkultur während der Wachstumszeit leicht ab, bzw. blieb konstant, während im Pflanzeninneren eine starke Vermehrung der Bakterien beobachtet wurde. Dieses mag als Zeichen einer starken Abhängigkeit des Endophyten von der Wirtspflanze gedeutet werden, wurde im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

N-Bilanz und BNF für Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72

Bisher wurden das Besiedlungspotential der Mikroorganismen und die Auswirkungen auf das Längenwachstum und die Biomasse der Wirtspflanzen diskutiert. Zur Ermittlung eines Stickstoffgewinns wurde eine N-Bilanz aufgestellt, in der die Stickstoffgehalte eines Kultursystems ohne weitere Nährstoffzufuhr bei Beginn und bei Versuchsende für alle Komponenten bestimmt werden. Die Anwendung der ¹⁵N-Isotopenverdünnungsmethode erlaubt darüber hinaus eine Aussage über die Herkunft des eingebauten Stickstoffs und eine Abschätzung des aus der BNF stammenden Anteils (3.4). Für Hirse in hydroponischer Kultur mit *Azoarcus* sp. BH72 wurden Werte von 2,2 % für die Wurzel und 12,7 % BNF für den Spross errechnet (3.4.4): Während der vierwöchigen Wachstumsperiode verdreifachten sich der Stickstoffgehalt und das Trockengewicht der Hirsepflanze bei gleichbleibender Stickstoffkonzentration. In Wurzel und Spross nahm der N-Gehalt absolut um 0,73 mg zu, von denen 0,1 mg aus der biologischen Stickstofffixierung und maximal 0,49 mg aus dem Medium (0,18 mg N aus NH₄Cl) und dem anfänglich zugegebenen Bakterieninokulum (0,31 mg N) stammten.

In der Bilanz fehlen noch 0,14 mg, was darauf zurückgeführt wird, dass der Stickstoffgehalt weder in den tatsächlich eingesetzten Pflanzensamen noch dem betreffenden Aliquot des Bakterieninokulums sondern in entsprechenden Parallelproben bestimmt wurde. Auf Grund interindividueller Schwankungen kann eine Abweichung nicht ausgeschlossen werden; dieses gilt analog für die Versuche mit Reis und Weizen.

Im Medium der Hirsekulturen war nach 4 Wochen eine Zunahme des Stickstoffgehalts um ca. 40 % bezogen auf den N-Gehalt bei Kulturbeginn zu verzeichnen. Da 99,1 % des Stickstoff im Medium aus BNF stammten, wurden also von den 4,29 mg N, die sich nach vierwöchiger Kultur im Medium fanden, 3,2 mg durch die Nitrogenaseaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 eingebracht (≅ 75 %). Dieses wird durch einen Vergleich mit den Kontrollpflanzen bestätigt. Bei diesen zeigte sich rechnerisch ein Anstieg von 0,18 mg N im Gesamtsystem, was auf Mess- und Rundungsungenauigkeiten zurückzuführen ist (s. o.). Beim Vergleich der beiden Ansätze zeigt

sich eine Differenz von 3,18 mg N, was dem BNF-Eintrag im aktiven System entspricht! Das parallel dazu bestimmte Trockengewicht hatte sich während der Wachstumszeit bei gleichbleibender Stickstoffkonzentration ebenso verdreifacht, wie der Gehalt an Gesamtstickstoff in den Pflanzen (Abb. 20).

Aus vorherigen Versuchen ist bekannt, dass das zu Beginn im Medium angebotene Ammonium in einem solchen System sehr schnell von dem Keimling aufgenommen wird; es ist nach maximal einer Woche verbraucht (Stein, 1992). Da Stickstoff im Boden in der Regel der limitierende Faktor ist, besitzen die Pflanzen eine hohe Stickstoffaffinität. Die Aufnahme mobilen Bodenstickstoffs (NH_4^+ und NO_3^-) erfolgt sehr schnell und effizient (Mengel, 1984). Im Gegensatz zu natürlichen Böden, in denen ca. 30 % der für Pflanzen verfügbaren Stickstoffverbindungen an die Tonfraktion gebunden ist (Trehan, 1996), können Pflanzen in Hydrokultur vorhandenes Ammonium vollständig aufnehmen. Daraus ist zu schließen, dass die Pflanze das zu Beginn vorhandene Ammonium genutzt hat. Die in den Hydrokulturen im Medium und der externen Rhizosphäre aktiven diazotrophen Bakterien fixierten molekularen Stickstoff und immobilisierten ihn hauptsächlich in Form organischer Verbindungen in der eigenen Biomasse. Somit lag der während des Versuchs im Medium in großer Menge angereicherte Stickstoff in einer Form vor, die für die Pflanze nicht unmittelbar nutzbar war. Der überwiegende Anteil der aus lysierten Bakterien freigesetzten stickstoffhaltigen Verbindungen kann allerdings von Pflanzen nicht direkt genutzt werden und muss erst von nitrifizierenden und ammonifizierenden Bodenorganismen freigesetzt und für Pflanzen verfügbar gemacht werden. Diese Prozesse liefen in den Versuchen mit monoxenischen Hydrokulturen jedoch nicht ab. In weiteren Versuchen, die später diskutiert werden, sollte organisch gebundener Stickstoff über Mineralisierung durch Mykorrhizapilze (Reid, 1990) den Pflanzen verfügbar gemacht werden. In den Hydrokulturen jedoch war den Pflanzen in der Hauptsache nur der bakterielle Stickstoff zugänglich, der von Bakterien stammte, die das Pflanzeninnere besiedelt hatten und dort intrazellulär katabolisiert werden konnten.

Die Beobachtungen und Schlussfolgerungen, die sich aus den Hydrokulturversuchen mit Hirse ergaben, werden durch die analogen Experimente mit Reis bestätigt (3.4.2). Bemerkenswert ist dabei, dass im Vergleich mit den Experimenten mit Hirse *Azoarcus* sp. BH72 im Medium fast die gleiche Menge an Stickstoff eingetragen hat, während in den Pflanzen ein geringer Teil des Stickstoff aus der BNF stammte: Nach 28 Tagen stammten 96,6 % des Stickstoffs im Medium ($\hat{=}$ 3,13 mg) und ca. 4 % des Stickstoffs der Pflanze ($\hat{=}$ 0,04 mg) aus BNF. *Azoarcus* sp. BH72 brachte insgesamt also ca. 76 % des Stickstoffs des Gesamtsystems durch seine N_2 -Fixierungsaktivität ein. Auch diese Daten decken sich wiederum mit der Differenz der Stickstoffgehalte von 3,19 mg aus inokulierten und Kontrollpflanzen.

Die Gemeinsamkeiten wie auch die Unterschiede, die sich aus den Hydrokulturversuchen mit Reis und Hirse ergeben, lassen sich mit den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente erklären. *Azoarcus* sp. BH72 kann sich bei beiden Pflanzen im Hydrokultursystem etablieren (3.2). Dieser Prozess ist pH-Wert-abhängig, und über einen Kulturzeitraum von 28 Tagen fanden sich vergleichbare Bakterienzahlen im Medium (3.2.1 und 3.2.2). Offensichtlich herrschten in dem Kulturmedium von Reis und Hirse weitgehend gleiche Bedingungen, so dass *Azoarcus* sp. BH72 in beiden Fällen ähnliche Mengen Stickstoff einbrachte. Im Pflanzeninneren zeigten sich jedoch Unterschiede. Im Innern von Reis ist die Verteilung der Gase durch das Aerenchym gleichmäßiger als bei Hirse (Ueckert, 1988), was die fast identischen Werte für den

Stickstoffeintrag aus der BNF in Wurzel und Spross erklärt. In der Hirsewurzel wurde am wenigsten fixiert, da hier der pO_2 zwar niedriger aber auch die N_2 -Diffusion eingeschränkt war, während im Hirsespross das beste Verhältnis aus Versorgung und Schutz herrschte.

Der hohe Eintrag von BNF-Stickstoff im Medium steht nur scheinbar im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen zur Nitrogenaseaktivität (3.1.3 und 3.1.4). Die aktuelle Aktivität zu jedem beliebigen Zeitpunkt war in diesen Experimenten mit großer Wahrscheinlichkeit eher gering. Zu Beginn lagen noch gebundener Stickstoff sowie O_2 im Medium vor, die die Nitrogenaseaktivität reprimierten (Mugnai *et al.*, 1994; Vande Broek *et al.*, 1996). Über die Kultivierungszeit jedoch wurden NH_4^+ und O_2 verbraucht, die Nitrogenaseaktivität stieg an, und selbst bei einer noch möglichen geringen Aktivität akkumulierte sich Stickstoff in der Biomasse, und eine Zunahme des messbaren Stickstoffgesamtgehalts war zu verzeichnen. Auf eine Bestimmung der Nitrogenaseaktivität mit einem ARA wurde verzichtet. Ein solcher Test liefert immer nur Aussagen zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Kulturphase; entsprechende Daten sind in 3.1.4 dargestellt. Eine kontinuierliche Beobachtung über einen längeren Zeitraum ist problematisch, da das Messgas Acetylen einerseits toxisch wirkt, andererseits durch den gasdichten Abschluss die Versorgung mit lebenswichtigen Gasen (N_2 , O_2 , CO_2 ; Boddey, 1987; Ueckert, 1988) behindert ist. Durch die ^{15}N -Isotopenverdünnungsmethode, die in diesen Versuchen die Daten zum N-Eintrag durch BNF lieferte, wird das System an sich nicht behindert. Die Gefahr von Artefakten ist damit verringert und nur noch messtechnisch bedingt.

Mit Weizen wurde ein vergleichbares Experiment in Hydrokultur durchgeführt (3.4.3). Obwohl das Trockengewicht um das Dreifache zunahm, sank die Stickstoffkonzentration, d. h. es kam zu einer Ausdünnung des Stickstoffs aus dem Samen. Die Kontrollpflanzen waren kleiner und wiesen daher eine höhere Stickstoffkonzentration auf. Anders als bei den Versuchen mit Hirse und Reis war der Gesamtstickstoffgehalt im aktiven Ansatz mit *Azoarcus* sp. BH72 nur geringfügig höher als bei der Kontrolle. Auch der Stickstoffeintrag im Gesamtsystem des aktiven Ansatzes war mit 0,26 mg deutlich geringer. Da Weizenkeimlinge auf Grund des großen Samens über einen großen Stickstoffvorrat verfügen, wurde die Kulturzeit auf 38 Tage verlängert, um eine ausreichend große Aufnahme von $^{15}NH_4^+$ aus dem Medium zu gewährleisten. Offensichtlich war aber auch dieser Zeitraum noch nicht ausreichend, da auch die Kontrollen keinen stark erhöhten ^{15}N -Anteil aufwiesen und somit den angebotenen Stickstoff nicht genügend genutzt haben. Eine kleine Differenz des aufgenommenen ^{15}N im fixierenden Ansatz zur Kontrolle führt rechnerisch zu großen Werten für die BNF (27,6 % und 16,4 % für Wurzel bzw. Spross von Weizen).

Als C_3 -Pflanze gibt Weizen kaum organische Säuren ins Medium ab (Vančura *et al.*, 1977) und *Azoarcus* sp. BH72 war nicht in der Lage, die von der Wurzel abgeschiedenen Mono- und Disaccharide aufzuschließen (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Auch bei längerer Kultivierungszeit war die Fixierung im Medium sehr gering und der Stickstoffzuwachs im System insgesamt ebenfalls. Da die Stickstofffixierung wesentlich von der Energieversorgung abhängt (Döbereiner, 1977; Zuberer, 1990), konnten die Bakterien keine dauerhafte Assoziation eingehen. Ob sie deshalb verstärkt abstarben und Weizen von dem bis dahin fixierten Stickstoff einen (geringen) Teil verwerten konnte, bleibt Spekulation. Es kann aber festgestellt werden, dass *Azoarcus* sp. BH72 leistungsfähige Assoziationen mit tropischen Gramineen (C_4 -Pflanzen)

bildet. C₃-Pflanzen hingegen bieten eine weniger geeignete Grundlage für solch enge und wechselseitig positive Interaktionen.

Der Ansatz, eine Ammonium-ausscheidende Mutante in die Assoziation einzubringen, erschien zunächst vielversprechend hinsichtlich der Stickstoffnutzbarkeit (Kamuru *et al.*, 1997). Es stellte sich jedoch heraus, dass eine solche Mutante von *A. brasilense* durch den hohen Energiebedarf für die permanent ablaufende Stickstofffixierung in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt und daher nicht konkurrenzfähig war (Christiansen-Weniger, 1992).

4.3 VAM und Interaktionen mit Hirse und *Azoarcus* sp. BH72

Bei der Wahl der Versuchsorganismen musste berücksichtigt werden, dass nicht nur zwischen Pflanzen und diazotrophen Bakterien einerseits und vesikulär-arbuskulären Mykorrhizapilzen (VAM-Pilzen) andererseits Assoziationen bzw. Symbiosen bestehen (James und Olivares, 1997; Patriquin *et al.*, 1983; Köhler, 1985; Harley und Smith, 1983), sondern auch die Mikroorganismen untereinander Lebensgemeinschaften bilden können (Tilak *et al.*, 1989; Paula *et al.*, 1991; Bianciotto *et al.*, 1996). Dabei scheint *Azoarcus* sp. eine besonders enge Assoziation mit Pilzen einzugehen. *Azoarcus* sp. kann am extremen Standort von Kallargras nur in Assoziation mit der Wirtspflanze oder mit einem Pilz existieren: Verschiedene Stämme von *Azoarcus* wurden aus Sklerotien eines Basidiomyceten aus der Rhizosphäre von Kallargras isoliert (Hurek und Reinhold-Hurek, 1995). Die Interaktion zwischen den Mikroorganismen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Überdauerung von *Azoarcus* sp. innerhalb der Ruheformen des Pilzes, ein Phänomen, das auch in Reisfeldern (ehemals mit Kallargrasanbau) beobachtet wurde (Hurek *et al.*, 1997b), sondern es wurden auch metabolische und morphologische Wechselwirkungen beobachtet. *Azoarcus* sp. BH72 bildet bei gemeinsamer Kultur mit einem von Kallargraswurzeln isolierten Ascomyceten neuartige Membranstapel im Cytoplasma (Hurek *et al.*, 1995). Diese Diazosomen entstehen im Zuge einer Hyperinduktion, wenn die Bakterien bei stark verminderter Sauerstoffkonzentration gesteigerte respiratorische und Stickstofffixierungsaktivitäten zeigten (Hurek *et al.*, 1994a; Hurek *et al.*, 1995). Inzwischen sind weitere Assoziationen von *Azoarcus* spp. mit Pilzen beschrieben worden (Hurek *et al.*, 1997b). Postuliert wurde, dass diese Assoziation den obligat endophytischen Bakterien eine Überdauerung im Boden unabhängig von Wirtspflanzen ermöglicht, und darüber hinaus der Pilz dem Bakterium als Vektor bei der Besiedlung von Pflanzenwurzeln dient (Hurek *et al.*, 1997b).

Bestehende Lebensgemeinschaften von VAM-Pilzen und diazotrophen Bakterien

Sporen verschiedener VAM-Pilze wurden daraufhin auf das Vorkommen von diazotrophen Bakterien untersucht (3.1.5). Von den Sporen wurden *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum* und *Burkholderia* sp. (Isolat E, Hartmann *et al.*, 1995) isoliert. Anders als von Paula (1991) und Tilak *et al.* (1989) beschrieben, konnte jedoch keine Besiedlung des Sporennieren festgestellt werden. Somit kann also nicht davon ausgegangen werden, dass die untersuchten VAM-Spezies *Glomus fasciculatum*, *G. clarum*, *G. etunicatum* und *Gigaspora margarita* derartig enge Assoziationen mit Bakterien eingehen, dass die Pilzhyphen bereits zum Zeitpunkt der

Sporeneimung mit Bakterien besiedelt sind. Sie können statt dessen erst später bakteriell kolonisiert werden; der zur Symbiose der drei Organismen führende Prozess ist also komplexer, als zuvor auf Grund der Daten von Paula *et al.* (1991; 1992) und Pacovsky (1989a; 1989c) angenommen worden war. Wahrscheinlich wird die durch VAM begünstigte endophytische Besiedlung von Pflanzen durch Bakterien von der Interaktion von Bakterium und Pilz maßgeblich beeinflusst. Entsprechende Einflussfaktoren sind jedoch nicht bekannt (Garbaye, 1991) und konnten somit nicht bei den Kultivierungsversuchen berücksichtigt werden. Die Sporen ließen sich oberflächensterilisieren und konnten somit als Ausgangsmaterial für Inokulationsversuche dienen.

Auswirkungen von VAM auf die Besiedlung von Nutzpflanzen mit dem endophytischen Bakterium *Herbaspirillum seropedicae*

Zur Auswahl eines geeigneten VAM-Pilzes mussten vorangestellte Versuche durchgeführt werden, da keine Daten zu Interaktionen von *Azoarcus*-Spezies mit VAM-Arten vorlagen. Zur Schaffung von kontrollierten Bedingungen wurden die Sporen der genannten VAM-Pilze oberflächensterilisiert. Es wurde vermutet, dass gegenseitige Beeinflussungen der drei Organismen von der jeweiligen Kombination abhängen (Fabbri *et al.*, 1994). Die Mykorrhiza hatte jedoch bei Hirse keinen Einfluss auf die Besiedlung von Wurzel und Spross mit *H. seropedicae*. Bei Mais fanden sich Hinweise auf einen geringen fördernden Effekt der Besiedlung mit *H. seropedicae* mit *G. clarum*. Auch der Mykorrhizierungsgrad war bei Hirse als auch bei Mais mit den beiden VAM-Pilzen gering, d. h. umgekehrt hat *H. seropedicae* die Mykorrhizierung nicht gefördert (3.1.6). Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf die ohnehin bestehende Assoziation des Bakteriums mit Mais und Hirse (neben Reis, Zuckerrohr und *Pennisetum*; Olivares *et al.*, 1996) zurückzuführen. Die Gründe für den in jeder Richtung ausbleibenden Synergismus konnten aber nicht endgültig geklärt werden; dies war auch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Da die Zusammenhänge noch nicht genügend verstanden sind, sind solche Ergebnisse kein Einzelfall (Staley *et al.*, 1992).

Mykorrhiza in Hydrokultur und Interaktionen mit Hirse und *Azoarcus* sp. BH72

Unter Zuhilfenahme einer neuen Methode zur Mykorrhizierung (Dugassa *et al.*, 1995) konnte die Eignung von *Glomus intraradices* als Mykorrhiza-Komponente im System der drei Organismen demonstriert werden. Aufgrund dieser in Vorversuchen erzielten guten Erfolge bei der Übertragung auf Hirse, und hier gerade in Zusammenhang mit *Azoarcus* sp. BH72, wurde er im folgenden Verlauf der Arbeit eingesetzt. Bei dieser, im Institut für Phytopathologie neu entwickelten Methode, wurde *G. intraradices* in hydroponischer Kultur von einer bereits mykorrhizierten Pflanze (Schnittlauch, 3.3.2) auf Hirse übertragen. In einem ersten Versuch wurde als Hydrokulturmedium die Pflanzennährlösung verwendet, die zur Anzucht auf festem Substrat ausgelegt war (3.3.3). Sie wurde in einer 1 : 10-Verdünnung eingesetzt und das eingeschränkte Wachstum zeigte, dass die gewählten Bedingungen suboptimal waren. Deshalb wurde für eine zweite Versuchsreihe Hoagland-Medium als Grundlage der semisolid-Kultur verwendet. Das Wachstum der Hirsepflanzen war deutlich besser, dennoch war der erste Ansatz zur Abschätzung der Eignung von *G. intraradices* in den Folgeversuchen mit Festsubstrat

unerlässlich. Unabhängig vom Pflanzennährmedium zeigten sich vergleichbare Ergebnisse bei der Mykorrhizierung. Bereits nach 7 Tagen war eine Besiedlung der Hirsewurzeln mit dem Pilz erfolgt und nach 3 Wochen hatte sich eine Symbiose mit intrazellulären Strukturen ausgebildet (vgl. auch Abb. 25 und 26). Darüber hinaus hatte eine Inokulation mit dem diazotrophen Bakterium *Azoarcus* sp. BH72 einen positiven Einfluss auf die Anzahl der Arbuskel und Vesikel, und damit auf die Stärke der Mykorrhizierung. Die Mikroorganismen übten dabei einen fördernden Einfluss auf Spross- und Wurzelwachstum aus: Alle Hirsepflanzen, die mit einem oder beiden Mikroorganismen zusammen kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollpflanze in allen Teilen ein stärkeres Längenwachstum. Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt bei gemeinsamer Inokulation mit Bakterium und Pilz, was auf einen Synergismus der Mikroorganismen hinweist. Ähnliche Ergebnisse beschrieb Azcón (1989) für *Azotobacter* und *G. fasciculatum* mit Tomate und Pacovsky (1989a) für *Azospirillum* und *G. etunicatum* mit Hirse.

Darüber hinaus fallen bei der Betrachtung des Verhältnisses von Wurzel- zu Sprosslänge Unterschiede zwischen den Ansätzen auf: Mit VAM inokulierte Pflanzen zeigten eine relativ kürzere Wurzel (vgl. Staley *et al.*, 1992). Diese Beobachtungen konnten noch ausgeprägter im Experiment in modifizierter Hydrokultur wiederholt werden, mit semisolid-Hoagland-Medium. Die Kontrollpflanze wies wiederum die relativ längste Wurzel auf, wohingegen das Längenverhältnis bei den anderen Ansätzen ähnlich war. Das Mycel der Mykorrhiza übernimmt offensichtlich einen Teil der Wurzelfunktion bei der Erschließung des Mediums (Tinker, 1975). Die Pilzhyphe bewirken eine Vergrößerung der resorbierenden Oberfläche, die bei den Kontrollpflanzen durch die Wurzel selber bewerkstelligt werden muss. Außerdem kommt es zu einer Erhöhung der Produktion von Glutaminsynthetase, was zur Aufnahme von Ammonium aus dem Medium beiträgt (Smith *et al.*, 1985). Dieses ist bei einer Inokulation mit stickstofffixierenden Bakterien als Stickstofflieferanten von besonderer Bedeutung. In modifizierter Hydrokultur wurde ein ähnlicher Effekt auch bei Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 beobachtet. Die Lebendkeimzahl konnte in diesem Versuch zwar nicht bestimmt werden, aber es fiel eine Schleierbildung um die Wurzeln herum auf, die als typisch für mikroaerophile Bakterien unter Stickstofffixierungsbedingungen in semisolid-Medium beschrieben und als Identifizierungsmerkmal herangezogen wird (Döbereiner *et al.*, 1995a). Die Bakterien suchten aktiv diese Bereiche auf und konnten sich durch die Mediumkonsistenz stärker als in flüssiger Kultur in Wurzelnähe anreichern. Somit war im Vergleich zum vorher diskutierten Versuch in flüssigem Medium ein intensiverer Stoffaustausch zwischen den beiden Partnern möglich, der den Einfluss auf die Pflanze erhöhte. Die mikroaerophilen Bakterien profitierten von der Nährstoffversorgung (Kohlenhydrate im weiteren Sinne; Rovira, 1969) sowie der Wurzelatmung bzw. der damit verbundenen Absenkung des pO_2 in der Rhizosphäre, was eine entscheidende Bedeutung für die Nitrogenaseaktivität hat (s. u.). Aufgrund der erhöhten bakteriellen stickstofffixierenden Aktivität wird die Versorgung der Pflanze mit Stickstoffverbindungen verbessert. Die starke, durch das semisolid-Medium unterstützte, Anreicherung der diazotrophen Bakterien in unmittelbarer Nähe der Wurzel ermöglichte den Pflanzen offensichtlich eine ausreichende Nährstoffversorgung mit Hilfe einer im Vergleich zu den Kontrollen geringeren resorbierenden Oberfläche.

Pilze und Bakterien üben also über unterschiedliche Wirkmechanismen einen gleichgerichteten Effekt auf die Pflanze aus, der ein verstärktes Wachstum der assimilierenden Pflanzenteile ermöglicht.

Bei den Kulturen auf semisolid-Medium wurde außerdem während der dreiwöchigen Wachstumszeit die relative Nitrogenaseaktivität gemessen (3.3.4.1). Ihr stetiger Anstieg ist einerseits durch einen O₂-Effekt, andererseits durch die zunehmende Bakterienzahl bedingt (siehe auch Abb. 27 und 28, Färbung mit TTC). Bei Anwesenheit von Mykorrhiza wurde diese Enzymaktivität bereits bei der ersten Messung nach 7 Tagen noch gesteigert, was auf den rascheren Stickstoff- und Sauerstoffverbrauch durch den Pilz zurückzuführen ist. Auch die Verringerung von Stickstoff im Medium induziert und verstärkt die Aktivität der Nitrogenase durch eine Enthemmung des Aktivators auf genetischer Ebene (Mugnai *et al.*, 1994). Versuche mit Reis und Kallargras in Hoagland-Medium mit 7,5 mg N/l zeigten, dass der verfügbare Stickstoff nach spätestens 19 Tagen verbraucht war (Stein, 1992). Der Pilz hat diesen Verbrauch noch beschleunigt und somit die bakterielle Nitrogenaseaktivität verstärkt. Der positive Effekt der erhöhten Stickstofffixierung auf die beiden eukaryontischen Organismen kommt in dem stärkeren Mykorrhizierungsgrad und dem verbesserten Pflanzenwachstum zum Ausdruck (Tab. 5). Steigerungen der Nitrogenaseaktivität beobachteten auch Azcón *et al.* (1991) bei Rhizobien in Kombination mit verschiedenen Mykorrhizapilzen.

Im Vergleichsversuch mit Weizen (3.3.4.2) fällt auf, dass die Kontrollpflanze gut und die nur mit *Azoarcus* sp. BH72 inokulierte am besten gewachsen war. Dem Medium wurde hier wegen des höheren Stickstoffgehalts des größeren Weizensamens (0,75 mg N, Hirsesamen 0,44 mg N) kein Stickstoff zugegeben. Neben Spross- und Wurzellänge wurde außerdem das Trockengewicht dieser Pflanzenteile bestimmt, da dieser Parameter zur Beurteilung des Pflanzenwachstums in den weiteren Versuchen auch herangezogen wurde. Berechnet wurden nun die Verhältnisse der Längen bzw. Trockengewichte von Wurzel zu Spross. Das Längenverhältnis war, wie bei Hirse, bei der Kontrolle am größten, mit VAM bzw. *Azoarcus* sp. BH72 kleiner und am kleinsten in der Mischinokulation, was wiederum für einen synergistischen Effekt spricht. Für das Verhältnis der Trockengewichte zeigte sich bei der Kontrolle allerdings der geringste Wert, d. h. bei den entsprechenden Pflanzen waren die Wurzeln trotz eines verhältnismäßig starken Längenwachstums relativ zum Spross sehr leicht. Die Wurzeln der Kontrollpflanzen waren durch die Notwendigkeit des Erschließens von Nährstoffen lang und dünn geworden (kleines Verhältnis TG zu Länge, Tab. 5), in den anderen Ansätzen konnten die Mikroorganismen einen Teil der Versorgung übernehmen und die Wurzeln blieben kürzer und kräftiger (großes Verhältnis TG zu Länge). Dies wurde bei mikroskopischen Kontrollen von Proben aus Gewächshausexperimenten (3.5) bestätigt: Insbesondere unter Einfluss von VAM waren die Seitenwurzeln stark verkürzt.

Bei den Versuchen mit Weizen war im Unterschied zu Hirse keine Beeinflussung der Mikroorganismen untereinander festzustellen. Der Mykorrhizierungsgrad lag mit und ohne *Azoarcus* sp. BH72 bei ca. 50 %, die Reisolierung der Bakterien, die anstelle eines ARA als direkter Parameter aufgenommen wurde, zeigte ebenfalls keinen Unterschied. Wie schon an *Herbaspirillum* mit verschiedenen VAM-Pilzen gezeigt (3.1.6), ist die jeweilige Kombination der Organismen von großer Bedeutung. Bei Weizen war nicht nur die Zahl der Bakterien niedriger als bei Hirse in vergleichbaren Versuchen (3.3.1, Abb. 16), sondern *Azoarcus* sp. BH72 zeigte bei Hirse einen Einfluss auf den Mykorrhizierungsgrad, der sich bei der nicht tropischen Nutzpflanze Weizen nicht fand.

4.4 Gewächshausexperimente in Töpfen

Nach den Voruntersuchungen in vereinfachten Hydrokultursystemen, die der Optimierung der Versuchsbedingungen und -parameter sowie der Auswahl der geeigneten Organismen dienten, wurde eine Drei-Organismen-Lebensgemeinschaft mit Hirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), *Azoarcus* sp. BH72 und *Glomus intraradices* in Töpfen initiiert mit dem Ziel die Gesamtheit der gegenseitigen Beeinflussung unter möglichst natürlichen Bedingungen abzuschätzen (3.5). Zur Annäherung an die Verhältnisse im Boden wurde festes Substrat gewählt, und die Töpfe wurden im Gewächshaus kultiviert. Obwohl alle Materialien zuvor sterilisiert wurden, war ein gewisser Eintrag an Fremdorganismen nicht völlig auszuschließen (Abb. 33, 48, 49). Auch das Mykorrhizainokulum, das neben *G. intraradices* quantitativ und qualitativ nicht definierbare mikrobielle Kontaminanten enthielt, wurde einer Oberflächensterilisation unterzogen. Diese wurde möglichst schonend durchgeführt, da nicht nur Sporen, sondern auch sehr feines gut mykorrhizierendes Wurzel- und Hyphenmaterial aus der kleinsten Siebfraktion mit verwendet wurde. So blieb die Infektionsfähigkeit der VAM-Pilze erhalten, und die Kontaminationen mit Pilzen und Bakterien konnten reduziert, aber nicht vollständig beseitigt werden (Wieland, 1997). Deshalb waren die Grundlagenversuche zur eindeutigen Identifizierung von *Azoarcus* sp. BH72 und seiner Abgrenzung von diesen Kontaminanten von fundamentaler Bedeutung.

In Probeläufen wurden verschiedene Pflanzgefäße und Medien getestet, und bereits Teilergebnisse erzielt (Tab. 11). So zeigte sich bei Inokulation in Ansätzen sowohl mit als auch ohne VAM, dass alle Hirsepflanzen gut mit *Azoarcus* sp. BH72 besiedelt wurden, der an den Wurzeln in Zahlen von $6 \cdot 10^7$ bis $3 \cdot 10^8$ cfu/g TG gefunden werden konnte. Dabei befanden sich ca. 98 % der Bakterien auf der Wurzeloberfläche, und 2 % wurden aus der oberflächensterilisierten Wurzel, also dem Wurzelinneren, reisoliert. Auffällig war, dass alle Pflanzen, die mit den Bakterien und VAM kultiviert wurden, durchweg eine bakterielle Besiedlung des Wurzelinneren zeigten, während in keinem Fall *Azoarcus* sp. BH72 aus dem Spross reisoliert werden konnte. In den Ansätzen allerdings, in denen eine monoxenische Kultur nur mit dem Bakterium erfolgte, fanden sich bei 64 % aller Pflanzen Bakterien im Sprossinneren (durchschnittlich $5 \cdot 10^6$ cfu/g TG).

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten der anderen Gewächshausexperimente. Die einzelnen parallelen Töpfe eines Ansatzes zeigten z. T. eine sehr unterschiedlich starke Besiedlung der Pflanzen mit *Azoarcus* sp. BH72. In manchen wurden, besonders im Spross, keine Bakterien gefunden. Obwohl bei diesen Pflanzen nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine schwache Besiedlung nicht nachgewiesen werden konnte, war die Häufung dieser negativen Befunde bei Pflanzen nach Inokulation mit Pilz und Bakterium auffällig. Diese Beobachtung beruht vermutlich auf einem später noch diskutierten Konkurrenzphänomen zwischen VAM und diazotrophen Bakterien.

Die Probeansätze lieferten außerdem erste Daten zum Grad der Mykorrhizierung, der mit 78,3 % bei dualer Inokulation über dem der Einzelinokulation mit VAM von 59,7 % lag. *Azoarcus* sp. BH72 förderte offensichtlich die Mykorrhiza, wobei dieses indirekt auf der bakteriellen Stickstofffixierung beruhen könnte. In diesen ersten Experimenten wurde das gleiche Hoagland-Medium wie für die Hydrokulturversuche verwendet, das mit 5 mg N/l nur wenig Stickstoff enthielt. Dieser wurde schnell von der Pflanze assimiliert (Stein, 1992), so dass einzig

Luftstickstoff (N_2) als N-Quelle diene. Der von den Bakterien fixierte und in bakterieller Biomasse inkorporierte Luftstickstoff war für die Pflanzen nicht verfügbar, jedoch war es dem Pilz möglich, ihn zu mineralisieren und aufzunehmen (Barber, 1971; Reid, 1990). Da der heterotrophe Pilz außerdem auf eine externe Quelle organischen Kohlenstoffs angewiesen war, die von der Pflanzenwurzel gestellt wurde, wirkte die Mangelsituation im Medium möglicherweise fördernd auf die Mykorrhizierung (Reid, 1990). In Ansätzen mit Bakterien verfügte der Pilz über eine Stickstoffquelle und die mutualistische Beziehung mit der Pflanze, die auf diesem Weg mit Stickstoff versorgt wurde, wurde vertieft. Die verstärkte Mykorrhizierung kann als Ausdruck dafür gewertet werden. Wie bereits erwähnt, wird über Mechanismen der Interaktion spekuliert (Reid, 1990; Garbaye, 1991). In entsprechenden Experimenten mit PGPR (*Azospirillum*) wurden Wachstumsfaktoren als Auslöser vermutet (Fabbri *et al.*, 1994). Darüber hinaus ist bekannt, dass sich durch Interaktionen die Proteinmuster von Bakterium und Pilz in gemeinsamer Kultur verändern können (Karg und Reinhold-Hurek, 1996).

Ein derartig hoher Mykorrhizierungsgrad wurde in den folgenden Versuchen nicht reproduziert. Als Grund dafür wird die Zusammensetzung der später verwendeten Pflanzennährlösung angesehen. Sie hatte einen doppelt so hohen Phosphatgehalt wie das Hoagland-Medium. Die Erhöhung des Phosphatgehalts war unerlässlich für das Pflanzenwachstum, verminderte allerdings auch den Mykorrhizierungsgrad. Phosphatmangel fördert die Bildung einer Mykorrhiza, da sie beim Erschließen von Phosphatquellen für die Pflanze und damit der Symbiose von Nutzen ist (Reid, 1990; Dalal, 1978). Pflanzen können Phosphor nur in Form von anorganischem Orthophosphat aufnehmen; organisches Phosphat ist für sie nicht direkt nutzbar. Letzteres muss durch Phosphatasen der Mykorrhiza freigesetzt werden. Die Mineralisierung entsprechender Verbindungen findet jedoch in ausreichendem Maß nur bei höherer Bodentemperatur und deshalb bevorzugt in tropischen Regionen statt. In den gemäßigten Klimaten ist sie ohne Bedeutung (Dalal, 1978). Da auch im Gewächshaus eher niedrigere Temperaturen vorherrschten, wurde auf einen Einsatz von organisch gebundenem Phosphat verzichtet. Weiterführende Versuche sollten vorzugsweise in einem voll beheizbaren Gewächshaus oder in wärmeren Regionen durchgeführt werden. Bei Mangel an organischem Phosphat, kommt der Mykorrhizierung also größere Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit musste allerdings der Pflanzenentwicklung Rechnung getragen werden und in den späteren Versuchen wurde mit der Pflanzennährlösung Orthophosphat in für das Pflanzenwachstum ausreichender Menge zugesetzt. Als Folge davon wurde der Grad der Mykorrhizierung auf durchschnittlich 35 % vermindert.

In einem verkürzten Versuch mit Hirse konnte gezeigt werden, dass *Azoarcus* sp. BH72 in der Lage ist, unter den genannten Bedingungen (Gewächshaus, festes Substrat, Pflanzennährlösung) über 3 Wochen im Substrat nicht nur zu überleben, sondern das gesamte Topfvolumen gleichmäßig zu besiedeln (3.5.2.1). Die Bakterien hatten sich innerhalb relativ kurzer Zeit gleichmäßig im ganzen Topf verteilt und waren in einer Konzentration von durchschnittlich 10^6 cfu/g FG vorhanden. Innerhalb dieses Zeitraumes hatte außerdem die Pflanze das Substrat weitgehend durchwurzelt. Aus dem obersten Horizont, in dem die Bakterien zu Beginn eingebracht wurden, waren sie nach unten gewandert. Da nicht von oben gegossen wurde, konnte ein Transport durch Ausspülen ausgeschlossen werden. Bei Mischkultur mit VAM nivellierte sich die Kolonisation ebenfalls, aber die tieferen Horizonte wurden deutlich später besiedelt und die Zellzahl, die sich nach 3 Wochen einstellte war mit $1 \cdot 10^5$ cfu/g FG immer noch

niedriger. Die Mykorrhiza verhinderte also durch Interaktion zu einem gewissen Teil ein Abwandern in wurzelferne Bereiche. Ob die Bakterien fest an das Mycel gebunden und somit immobilisiert waren, konnte nicht geklärt werden. Zwar wurde das gemeinsame Auftreten von Pilzhyphen und Bakterienzellen beobachtet (3.6, Abb. 57), jedoch fand sich in keinem Präparat, dass Hyphen bevorzugt mit Bakterien besetzt waren. Es ist also fraglich, ob die Ausbreitung des Bakteriums durch eine physische Retention durch den Pilz behindert wurde. Die verminderte Vermehrung der Bakterien mag auch auf einer Konkurrenz zwischen den beiden Mikroorganismen um Kohlenhydrate oder anderer Metabolite der Hirsewurzel beruhen (Pacovsky *et al.*, 1985; Reid, 1990). Erschließt die Mykorrhiza durch intrazelluläre Strukturen direkt eine C-Quelle der Wurzel, könnte dadurch die Versorgung der Bakterien im Substrat und in wurzelfernerer Bereichen eingeschränkt sein. Diese Möglichkeit steht in Kontrast zu den in Hydrokultur gefundenen Ergebnissen (3.3.3 und 3.3.4), wo sich die Nährstoffe allerdings durch Diffusion gleichmäßiger verteilen konnten, durch den begrenzten Raum konzentriert wurden und keine Konkurrenzsituation eintrat. Durch ein solches Konkurrenzverhalten sowie eine Retention wäre auch erklärbar, warum sich bei einer gemeinsamen Inokulation der Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 und VAM oft keine Bakterien im Inneren der Pflanzensprosse fanden.

Mit dem optimierten Kultursystem wurden drei Gewächshausexperimente ('Experiment 95, 96 und 97') mit den 4 Ansätzen Kontrolle, BH72 (mit *Azoarcus* sp. BH72), VAM (mit *G. intraradices*) und BH72+VAM (mit *Azoarcus* sp. BH72 und *G. intraradices*) in jeweils 10 Parallelen in drei aufeinanderfolgenden Jahren (1995, 1996, 1997) durchgeführt.

Pflanzenbesiedlung

In den Gewächshausversuchen kam der Einfluss der Mykorrhiza bei der Besiedlung von Hirse mit *Azoarcus* sp. BH72 ebenfalls zum Tragen. Entgegen den Befunden von Paula *et al.* (1991; 1992) wurde kein positiver Zusammenhang zwischen Mykorrhizierung und der bakteriellen Besiedlung von oberirdischen Pflanzenteilen gefunden, sondern eine gegenteilige Beziehung war der Fall. In allen BH72+VAM-Ansätzen war die Besiedlung der Wurzel mit *Azoarcus* sp. BH72 geringer (Faktor 1,5–5) als in BH72-Ansätzen. In zwei von drei BH72+VAM-Experimenten fand sich, wie bei Vorversuchen, keinerlei bakterielle Sprossbesiedlung.

Die Stärke der Besiedlung war mit der in Hydrokulturversuchen vergleichbar. Während unter den Bedingungen der Hydrokultur (räumliche Limitierung, geschlossenes System, eingeschränkter Gasaustausch) die Bakterienpopulation nach einmonatiger Kultur jedoch abnahm (3.3.1), war ihre stabile Existenz zusammen mit der Pflanze in den Gewächshausversuchen auch über mehrere Monate gesichert. Nach dieser Zeit fand sich bei den drei Experimenten 95, 96 und 97 ein auffälliger Unterschied bei der Besiedlung des Wurzelinneren, der unabhängig von der Mykorrhizierung war und auf die Art des Einbringens der Bakterien in das Kultursystem zurückzuführen war. Bei Experiment 95 erfolgte das Animpfen mit einer Bakterien-suspension in PBS, und es konnten 10 % der insgesamt von nicht oberflächensterilisierten Wurzeln reisolierten Bakterien im Inneren der Wurzel lokalisiert werden. In den beiden anderen Versuchen fanden sich dort nur ≤ 1 % der Bakterien. In diesen Fällen war eine entsprechend dichte Suspension in 4 ml NFB-Medium hergestellt und bei den Keimlingen lokal begrenzt zugegeben worden. In dieser Menge Medium ist es *Azoarcus* sp. BH72 möglich, für

1 bis maximal 2 Wochen gut zu wachsen. Danach sollte der sich einstellende Gradient der Wurzelexsudate ausreichend wahrnehmbar sein, um die Bakterien chemotaktisch zur Wurzel zu führen. Wahrscheinlich wurden in dieser Zeit die Bakterien jedoch zu lange im oberen Substrathorizont gehalten. Die Wurzeln waren in dieser Zeit bereits weiter gewachsen, so dass ein Anheften der Bakterien an die junge Spitze nicht mehr möglich war. Dort, im Bereich der Elongations- und der Differenzierungszone (Wurzelhaarzone), befinden sich die bevorzugten Eintrittsorte von *Azoarcus* sp. bei der Besiedlung des Wurzelinneren (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998a). Erst die entstehenden Seitenwurzeln boten wieder Eindringorte für die Bakterien (3.6, Abb. 28, 29, 52, 55, 56). Im Experiment 95 war auf diesen Zusatz von Nährlösung noch verzichtet worden und die Bakterien konnten zum frühestmöglichen Zeitpunkt bereits die ersten Wurzeln besiedeln. Da die Kulturdauer außerdem mit 80 Tagen um 30 bzw. 10 Tage länger war als in Experiment 96 und 97 konnte dieser Besiedlungsvorsprung in den anderen Experimenten nicht mehr aufgeholt werden.

Durch mikroskopische Untersuchungen wurde belegt, dass *Azoarcus* sp. BH72 sich nicht nur an der Wurzelspitze (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998b), sondern wie *Herbaspirillum* und *Acetobacter diazotrophicus* (James und Olivares, 1997) auch an den Austrittsorten von Seitenwurzeln ansiedeln kann. Die Besiedlung der Wurzelhaarzone wurde in lichtmikroskopischen (Abb. 31 und 32), LSM- (Abb. 33) und REM-Aufnahmen (Abb. 54) dargestellt. Dass dort auch das Eindringen in die Wurzelzellen erfolgte, zeigen Abb. 41 und Abb. 42. Darüber hinaus wurde mit diesen mikroskopischen Techniken gezeigt, dass sich *Azoarcus* sp. BH72 ebenfalls verstärkt dort auf der Wurzel ansiedelte, wo die Seitenwurzeln die Rhizodermis durchbrachen (Abb. 28, 29, 52, 55 und 56). Mit *in-situ*-Hybridisierungstechniken, der spezifischen Markierung durch Antikörper und Visualisierung mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops standen Methoden zur Verfügung, die eine exakte und spezifische Lokalisation von Mikroorganismen in der Rhizosphäre erlaubten (zur Einsetzbarkeit der Methoden vgl. Aßmus, 1996). *Azoarcus* sp. BH72 wurde in tiefen Furchen zwischen den äußeren Rhizodermiszellen zu lokalisiert (Abb. 35, 38 und 50), von wo aus er in die interzellulären Räume sowie in die Zellen selbst vordrang (Abb. 39 und 40). Auch ein Eindringen über beschädigte Rhizodermiszellen wurde beobachtet (Abb. 53). In dieser Arbeit wurde *Azoarcus* sp. BH72 nicht in Cortex und Xylem von Hirse gefunden. Es konnte nicht geklärt werden, ob *Azoarcus* sp. BH72 wie bei Kallargras (Hurek *et al.*, 1994b) weiter penetriert ist, oder ob die Antikörper nicht vollständig in das Präparat eingedrungen sind. Um das Gewebe nicht zu zerstören, werden für LSM-Präparate in der Regel keine Schnitte angefertigt (Aßmus, 1996).

Die durch Reisolierungsversuche bewiesene Besiedlung des Hirsesprousses durch *Azoarcus* sp. BH72 konnte ebenfalls mit dem LSM bestätigt werden (Abb. 47).

Abb. 48 zeigt kugelförmige Strukturen, die mit den Antikörpern spezifisch markiert sind. Ähnliche Strukturen beschrieben Reinhold *et al.* (1987) als *round bodies* im Aerenchym von Kallargras. Später wurde den als *Envelopes* bezeichneten Hüllen eine Sauerstoffschutzfunktion zugeschrieben (Reinhold-Hurek und Hurek, 1998b). Hier befinden sie sich außen in der Wurzelhaarzone zusammen mit anderen Bodenbakterien. Letztere sind mit DAPI gefärbt. Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 im Inneren waren nicht markiert, was daran liegt, dass DAPI *Azoarcus* sp. BH72 nicht anfärbte (vgl. Aßmus, 1996) und dass die Antikörper offenbar die Hülle nicht durchdringen konnten.

Die Besiedlung von Wurzelhaaren und der Basis von Seitenwurzeln war bereits wenige Tage nach der Keimung der Hirsepflanze zu beobachten (Abb. 29 und 31). Dieses stützt die Vermutung, dass die in PBS zugesetzten Bakterien gegenüber denen aus den anderen Experimenten einen Besiedlungsvorsprung hatten.

Auch die Mykorrhizierung der Wurzel konnte fotografisch belegt werden. Im Lichtmikroskop konnten Hyphen von *G. intraradices* an Hirsewurzeln (Abb. 25) und nach Anfärben auch VAM-Strukturen, z. T. in den Wurzelzellen (Abb. 26) identifiziert werden. Per LSM und REM wurde belegt, dass Hirsewurzeln mit Pilzen und *Azoarcus* sp. BH72 auch endophytisch besiedelt waren (Abb. 43 und 57). In Abb. 43 sind eukaryontische Strukturen in Wurzelzellen erkennbar, die vermutlich *G. intraradices* zuzuordnen sind. Ob *Azoarcus* sp. BH72 die Eintrittsstellen der VAM-Hyphen als Penetrationsmöglichkeit zu nutzen vermag, konnte nicht visuell bewiesen werden. Mit Hilfe der unterschiedlichen räumlichen Darstellungen im LSM wurde demonstriert, dass sich Pilzsporen an der Wurzel (Abb. 46) und in Wurzelzellen fanden (Abb. 44 und 45).

Trockengewicht

Die unterschiedliche Wachstumszeit der Experimente spiegelt sich auch im gemessenen Trockengewicht der gesamten Pflanzen wider. Während bei Pflanzen aus den kürzeren Experimenten generell die Wurzel ein höheres Trockengewicht als der Spross aufwies, waren die Verhältnisse nach 80tägigem Wachstum in den Ansätzen VAM und BH72+VAM umgekehrt. Nach der Keimung von Pflanzensamen erfolgt die gleichzeitige Ausbildung von resorbierenden und assimilierenden Pflanzenteilen. In der frühen Wachstumsphase überwiegt allerdings das Wurzelwachstum, um den Keimling so schnell wie möglich mit ausreichenden Mengen an Wasser und Nährstoffen zu versorgen. Erst wenn diese Versorgung sichergestellt ist, nimmt das Sprosswachstum nun relativ zur weiteren Wurzelentwicklung zu. Offensichtlich war nach 80 Tagen dieser Punkt bereits überschritten worden, was sich in dem relativ größeren Trockengewicht des Sprosses niederschlägt. Der Vergleich der Pflanzen aus den Ansätzen VAM und BH72+VAM mit denen aus der Kontrolle und BH72 des gleichen Versuchs führte außerdem zu dem Schluss, dass die Mykorrhizierung auf Grund der oben bereits diskutierten Vergrößerung der resorptiven Oberfläche durch Hyphen diesen Prozess noch beschleunigte. Dieses ist ein weiterer Beleg für den mutualistischen Charakter der Interaktionen zwischen Pflanze und Pilz in dieser Kombination.

In diesem Zusammenhang ergeben sich weitere Hinweise für eine bereits oben diskutierte mögliche Konkurrenz zwischen den mikrobiellen Komponenten des Systems. Das geringste Wurzeltrockengewicht bzw. der relativ schwerste Spross fand sich bei Pflanzen, die nur mit VAM inokuliert waren. *Azoarcus* sp. BH72 schwächt diesen Effekt ab! Das von Pacovsky *et al.* (1985; Reid, 1990) bereits postulierte Konkurrenzverhalten würde also die synergistischen Effekte im System der drei Organismen abschwächen.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchs lässt sich außerdem ableiten, dass die Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 im Vergleich zur Kontrolle das Verhältnis von Spross- und Wurzelwachstum ebenfalls zu Gunsten des Sprosses beeinflusste. Dieser Effekt war jedoch weniger deutlich als bei Kultur mit VAM; die kürzesten Wurzeln fanden sich stets bei den mykorrhizierten Pflanzen.

An dieser Stelle sei noch einmal auf eine Besonderheit des Experiments 97 hingewiesen. Auf Grund der eingeschränkten Keimfähigkeit des verwendeten VAM-Inokulums erfolgte an keiner Pflanze eine Infektion. Dieser Umstand, der erst bei der Ernte der Pflanzen entdeckt werden konnte, hat zur Folge, dass dieses Experiment nur je zwei Ansätze ohne mikrobiologische Komponente (Kontrollen) und mit *Azoarcus* sp. BH72 (BH72) enthielt. Somit ist erklärlich, dass bei allen ausgewerteten Pflanzen das Trockengewicht der Wurzel höher war als das des Sprosses.

In allen Versuchen zeigten die Kontrollpflanzen, trotz der fehlenden Interaktionen mit Mikroorganismen kein eingeschränktes Wachstum bzw. verringertes Trockengewicht. Da in den Ansätzen die Verhältnisse in natürlichen Böden, die einen Gesamtstickstoffgehalt von 0,02–4 % aufweisen (Baden *et al.*, 1969), simuliert werden sollten, lag keine echte Stickstofflimitierung vor. Somit konnte das Auftreten von Mangelerscheinungen vermieden werden.

N-Gehalt und BNF

Im Allgemeinen wurde der mit dem Medium zugegebene Stickstoff von den Pflanzen gut genutzt und bevorzugt im Spross eingebaut. Über die Zeit schien eine Verlagerung von Stickstoff aus der Wurzel in den Spross zu erfolgen, was als Folge eines stärkeren Sprosswachstums und des erhöhten Stickstoffbedarfs für die Bildung von Chlorophyll und die Induktion der Blütenbildung zu interpretieren ist. Eine Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 bewirkte unter den gewählten Bedingungen nur in einem Fall eine Erhöhung des absoluten Stickstoffgehalts, der nach 70tägiger Kultur um 31 % über dem der Kontrollpflanzen lag. Dabei ist zu berücksichtigen, dass aus oben dargelegten Gründen eine Grundversorgung von Stickstoff durch das verwendete Medium sichergestellt werden musste. Auf der Grundlage dieser Daten kann allerdings keine Antwort auf die kontrovers diskutierte Frage gegeben werden, ob Pflanzen von der N_2 -Fixierungsaktivität assoziierter diazotropher Bakterien profitieren oder ob Wachstumseffekte primär auf einer Verstärkung der Stickstoffaufnahme beruhen (Christiansen-Weniger, 1992; Hurek *et al.*, 1994b; Kamuru *et al.*, 1997; James und Olivares, 1997). Der Einsatz von Nitrogenase-negativen Mutanten (z. B. *nifK*⁻, Hurek *et al.*, 1994b) wäre bei diesem Problem hilfreich.

Es konnte aber gezeigt werden, dass VAM die Aufnahme und Translokation von Stickstoff, der überwiegend im Spross akkumuliert wurde, förderte. Dieses verwundert nicht, da die Mykorrhizierung der Pflanze bei einer Kulturdauer von über 50 Tagen eine verstärkte Sprossentwicklung relativ zum Wurzelwachstum ermöglichte. Die Erhöhung der Stickstoffzufuhr in mykorrhizierten Pflanzen beruht auf der Erweiterung der resorptiven Oberfläche zur Aufnahme anorganischer Ionen, auf der Erhöhung der Glutaminsynthetase (Smith *et al.*, 1985) und auf der Mobilisierung des in der Tonfraktion festgelegten Ammoniums (Trehan, 1996).

Ein weiterer Aspekt des Stickstoffhaushaltes innerhalb der Assoziation von Pflanze und Mikroorganismen ergibt sich bei der Betrachtung des Stickstoffanteils, der aus der biologischen Stickstofffixierung stammt. In den Pflanzen aus den drei Gewächshausversuchen wurden Mittelwerte von 17 % und 12 % BNF für Wurzel und Spross berechnet, wenn die Pflanzen zuvor mit *Azoarcus* sp. BH72 inokuliert worden waren. Wurde dem System außerdem VAM zugesetzt, stiegen die Werte auf 20 % bzw. 16 % BNF. Dieses korreliert mit Beobachtungen von Barea

et al. (1987), die eine Erhöhung der Stickstoffaufnahme aus dem Boden und der Stickstofffixierung durch Mykorrhizierung beschrieben.

In diesen Versuchen war der BNF-Eintrag in der Wurzel höher als im Spross, was auf Grund der starken bakteriellen Besiedlung der Wurzel nachvollziehbar ist. Die Steigerung des Eintrags biologisch fixierten Stickstoffs durch VAM mag erstaunen, da sich zuvor Hinweise für ein Konkurrenzverhalten zwischen den Mikroorganismen fanden. Dieses machte sich in einer verringerten Besiedlung der Pflanze mit dem diazotrophen Bakterium bemerkbar, so dass davon auszugehen ist, dass die Erhöhung des BNF-Eintrags nicht direkt durch die Bakterien erfolgte. Da Bodenpilze als heterotrophe Organismen organisch gebundenen Stickstoff mobilisieren können, wird postuliert, dass *Glomus intraradices* den von *Azoarcus* sp. BH72 in organischen Verbindungen fixierten Stickstoff für die Hirsepflanze verfügbar machte. In Ergänzung dazu ist auch zu diskutieren, ob die VAM durch ihre heterotrophe und katabolische Stoffwechselaktivität eine Reduktion des O₂-Partialdrucks bewirkte und somit die Nitrogenaseaktivität förderte. Dieser Effekt kann aber nur von untergeordneter Bedeutung sein; in den oben diskutierten Versuchen wurde gezeigt, dass bereits Wurzelatmung und bakterieller Stoffwechsel eine entsprechende Milieubereitung bewirken. Eine Klärung könnte über die Bestimmung der Nitrogenaseaktivität mit Hilfe eines ARA oder durch die Inkubation mit markiertem Luftstickstoff ¹⁵N₂ erfolgen. Aber hier ergibt sich die Schwierigkeit, das gesamte Kultursystem luftdicht abzuschließen und das Problem der verminderten Gasdifffusion im wassergesättigten Substrat (Lee und Watanabe, 1977; Boddey, 1987).

Beim Vergleich der drei Gewächshausversuche zeigten sich bei Experiment 97 auffällige Abweichungen bei der Verteilung des Stickstoffs in der Pflanze: In der Wurzel fand sich ein deutlich höherer Anteil als im Spross. Da Experiment 97 im Frühjahr und Frühsommer und die beiden anderen Versuche im Hoch- und Spätsommer bzw. Herbst durchgeführt wurden, ist dieses möglicherweise Ausdruck eines Tageslängeneffekts. Hirse ist eine Kurztagpflanze, die durch die Verkürzung der Tageslänge den Impuls für verstärktes Sprosswachstum und zur Reproduktion (Blütenbildung), bekommt (Heß, 1981). Während dieses Phänomen in den beiden ersten Experimenten beobachtet wurde, bewirkte die zunehmende Tageslänge während des Experiments 97 eine Verstärkung des Wurzelwachstums relativ zur Sprossentwicklung und ein verändertes Einbaumuster des aufgenommenen Stickstoffs. *Azoarcus* sp. BH72 scheint diesen Prozess vermutlich über die Bereitstellung von Stickstoff begünstigt zu haben. Eine derartig auffällige Beeinflussung war nicht zu erwarten gewesen, und in nachfolgenden Versuchen im Freiland oder Gewächshaus ist dem Tageslängeneffekt Rechnung zu tragen, um die Versuchsbedingungen zu standardisieren.

Abschließend ist festzustellen, dass es in Gewächshausexperimenten gelang, eine über mehrere Monate stabile Lebensgemeinschaft aus tropischer Graminee, diazotrophen Bakterium und VA-Mykorrhiza zu etablieren. Die Entwicklung von Hirsepflanzen wurde besonders durch die Mykorrhizierung mit *Glomus intraradices* gefördert. Bei monoxenischer Inokulation mit *Azoarcus* sp. BH72 konnte zuvor ein Eintrag von BNF-Stickstoff in die Pflanze nachgewiesen werden, eine signifikante Förderung des Wachstums und des Stickstoffgehalts war nicht erkennbar. Erst bei gemeinsamer Kultur aller drei Organismen schien die Pflanze von der Aktivität des diazotrophen Bakteriums zu profitieren; die VAM fungierte dabei als Mediator. Es ist bei dieser Bewertung aber zu beachten, dass im gewählten Kultursystem keine Stickstofflimitierung herrschte. Es sollte deshalb in anderen Systemen getestet werden, ob unter

Stickstoffmangel *Azoarcus* sp. BH72 einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum tropischer Nutzpflanzen ausüben kann. Für ein tiefer gehendes Verständnis mikrobieller Lebensgemeinschaften und ihrer Bedeutung für den entsprechenden Lebensraum mit einer assoziierten Pflanze müssen die physiologischen Leistungen und gegenseitigen Beeinflussungen umfassender untersucht werden.

So konnte in dieser Arbeit mit der Isotopenverdünnungsmethode zwar Stickstoff aus der biologischen Stickstofffixierung in der pflanzlichen Biomasse nachgewiesen werden, es fehlt aber noch immer ein direkter Beweis für die Freisetzung entstandener Stickstoff-haltiger Verbindungen aus Bakterien und deren Translokation in die Pflanze (James und Olivares, 1997). Allerdings konnte bereits der Nachweis von Nitrogenaseaktivität von *Azoarcus* sp. BH72 *in planta* erbracht werden (Hurek *et al.*, 1994b).

5 LITERATUR

- Alexander, D.B., Zuberer, D.A., $^{15}\text{N}_2$ fixation by bacteria associated with maize roots at a low partial O_2 pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1748–1753, 1989a.
- Alexander, D.B., Zuberer, D.A., Effects of organic substrates and chloramphenicol or nalidixic acid on acetylene reduction associated with roots of intact maize and sorghum plants. *Plant Soil* 112: 61–67, 1989b.
- Allen, M.F., Boosalis, M.G., Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytol.* 93: 67–76, 1983.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919–1925, 1990.
- Aßmus, B., *In situ*-Detektion von Bakterien aus Boden- und Gewässerhabitaten mit spezifischen Markierungen sowie optischen und zytometrischen Methoden. Aachen: Shaker Verlag, 1996.
- Aßmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R., Hartmann, A., *In situ*-localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013–1019, 1995.
- Azcón, R., Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 21: 639–644, 1989.
- Azcón, R., Rubio, R., Barea, J.M., Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N_2 -fixation (^{15}N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 117: 399–404, 1991.
- Baden, W., Kuntze, H., Niemann, J., Schwerdtfeger, G., Vollmer, F.-J., *Bodenkunde*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 1969.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J., Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 86–93, 1986.
- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J., Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 911–922, 1997.
- Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 433–439, 1980.
- Baltruschat, H., Field inoculation of maize with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by using expanded clay as carrier material for mycorrhiza. *J. Plant Dis. Prot.* 94: 419–430, 1987.
- Barber, D.A., Influence of microorganisms on assimilation of nitrogen by plants from soil and fertilizer sources. In: *Nitrogen-15 in soil plant studies*. Wien: I.A.E.A. 1971: 91–101.

- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R., Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N-technique under field conditions. *New Phytol.* 106: 717–725, 1987.
- Bashan, Y., Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1067–1071, 1986.
- Bauwens, S., Katsanis, K., Van Montagu, M., Van Oostveldt, P., Engler, G., Procedure for whole mount fluorescence in situ hybridization of interphase nuclei on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 6: 123–131, 1994.
- Bécard, G., Fortin, J., *New Phytol.* 108: 211–131, 1988.
- Bécard, G., Piché, Y., Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture. In: Norres, J., Read, D., Varma, A. (Hrsg.). *Methods in microbiology* Vol. 24, Techniques for the study of mycorrhiza. Academic Press 6, 1992: 90–107.
- Berg, R.H., Vasil, V., Vasil, I.K., The biology of *Azospirillum*-sugar cane association. II. Ultrastructure. *Protoplasma* 101: 143–163, 1979.
- Bergersen, F.J., Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: Bergersen, F.J. (Hrsg.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1980: 66–110.
- Bethlenfalvai, G.J., Brown, M.S., Pacovsky, R.S., Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. *New Phytol.* 90: 537–543, 1982.
- Bethlenfalvai, G.J., Thomas, R.S., Dakessian, S., Brown, M.S., Ames, R.N., Mycorrhizae in stressed environments: Effects on plant growth, endophyte development, soil stability, and soil water. In: Whitehead, E.E. (Hrsg.). *Arid lands, today and tomorrow*. Boulder: Westview Press, 1988: 1015–1029.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H.V., Bonfante, P., An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3005–3010, 1996.
- Biermann, B., Linderman, R.G., Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles, and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95: 97–105, 1983.
- Boddey, R.M., Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 209–210, 1987.
- Boddey, R.M., de Oliveira, O.C., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., Field application of the ¹⁵N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. *Fert. Res.* 42: 77–87, 1995.
- Boddey, R.M., Döbereiner, J., Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soil* 108: 53–65, 1988.
- Boddey, R.M., Victoria, R.L., Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labeled organic matter and fertilizer. *Plant Soil* 90: 265–292, 1986.

- Bonfante-Fasolo, P., Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell, C.L., Bagyaraj, D.J. (Hrsg.). VA mycorrhiza. Boca Raton: CRC Press, 1984: 5–33.
- Bothe, H., Yates, M.G., Cannon, F.C., II: 1. Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. In: Läuchli, A., Bielecki, R.L. (Hrsg.). Encyclopedia of plant physiology, Vol. 15A. Heidelberg: Springer Verlag, 1983.
- Bowen, G.D., Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: Ellwood, D.C. et al. (Hrsg.). Contemporary microbial ecology. London: Academic Press, 1980.
- Caceres, E.A.R., Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990–991, 1982.
- Cavalcante, V.A., Döbereiner, J., A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil 108: 23–31, 1988.
- Christiansen-Weniger, C., N₂-fixation by ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* in auxine-induced root tumours of wheat (*Triticum aestivum* L.). Biol. Fertil. Soils 13: 165–172, 1992.
- Cooper, T.G., Biochemische Arbeitsmethoden. Berlin: Walter de Gruyter, 1981.
- Dalal, R.C., Soil organic phosphorus. Adv. Agron. 29: 83–117, 1978.
- Dazzo, F.B., Urbano, M.R., Brill, W.J., Transient appearance of lectin receptors on *Rhizobium trifolii*. Curr. Microbiol. 2: 15–20, 1979.
- Dehne, H.-W., Backhaus, G.F., The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production. Zeitschr. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 93: 415–424, 1986.
- Dhillon, S.S., Host-endophyte specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of *Oryza sativa* L. at the pre-transplant stage in low or high phosphorus soil. Soil Biol. Biochem. 24: 405–411, 1992.
- Döbereiner, J., Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. 124: 224–230, 1970.
- Döbereiner, J., Physiological aspects of N₂ fixation in grass-bacteria associations. In: Newton, W., Postgate, J.R., Rodriguez-Barrueco, C. (Hrsg.). Recent developments in nitrogen fixation. London: Academic Press, 1977: 513–522.
- Döbereiner, J., Forage grasses and grain crops. In: Bergersen, F.J. (Hrsg.), Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1980: 535–556.
- Döbereiner, J., History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis 13: 1–13, 1992a.
- Döbereiner, J., Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂-fixing bacteria. Ciência e Cultura 44: 310–313, 1992b.
- Döbereiner, J., Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biol. Biochem. 29: 771–774, 1997.

- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995a.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., de Zamaroczy, M. (Hrsg.). *Azospirillum* VI and related microorganisms. Genetics, physiology, ecology. Berlin: NATO ASI Series Vol. G 37, Springer-Verlag, 1995b: 3–14.
- Döbereiner, J., Day, J.M., Dart, P.J., Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71: 103–116, 1972.
- Dugassa, D.G., Grunewaldt-Stöcker, G., Schönbeck, F., Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. Mycorrhiza 5: 279–282, 1995.
- Eady, R.R., The dinitrogen-fixing bacteria. In: Balows, A. (Hrsg.). The prokaryotes. Heidelberg: Springer Verlag, 1992: 534–553.
- Eskew, D.L., Focht, D.D., Ting, I.P., Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. Appl. Environ. Microbiol. 34: 582–585, 1977.
- Fabbri, P., Isopi, R., Puppi, G., Del Gallo, M., Co-inoculation of two endophytic and two plant-growth promoting, nitrogen fixing bacteria on sweet sorghum via arbuscular mycorrhizal fungi. Manuskript, 1994.
- Findenegg, G.R., Comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. Plant Soil 103: 239–243, 1987.
- Foster, R.C., Rovira, A.D., Cook, T.W., Ultrastructure of the root soil interface. St. Paul: The American Phytopathology Society, 1983.
- Franke, G. (Hrsg.), Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen. Bd.2 Spezieller Pflanzenbau. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 1994.
- Franklin, T.J., Snow, G.A., Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Berlin: Springer, 1973.
- Fu, H., Burriss, R.H., Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol. 171: 3168–3175, 1989.
- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 28: 35–38, 1985.
- Gambrell, R.P., Patrick, W.H., Chemical and microbiological properties of anaerobic soils and sediments. In: Hook, D.D., Crawford, R.M.M. (Hrsg.). Plant live in anaerobic environments. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1978: 375–423.
- Garbaye, J., Biological interactions in the mycorrhizosphere. Experientia 47: 370–375, 1991.
- Geisler, G., Farbatlas landwirtschaftliche Kulturpflanzen. Dordrecht: Kluwer Verlag, 1991.
- Gerdemann, J., Nicolsen, T., Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235–244, 1963.
- Gianinazzi, S., Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. Agriculture, Ecosyst. Environ. 35: 105–119, 1991.

- Giddens, J., Todd, R.L., Rhizosphere microorganisms – overview. In: Todd, R.L. (Hrsg.). Microbial-plant interactions. Madison: Soil Society of America, 1984.
- Goa, J., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5: 218, 1953.
- Gündisch, G., Kirchhof, G., Baur, M., Bode, W., Hartmann, A., Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. Microb. Rel. 2: 41–45, 1993.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Holsten, R.D., Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47–81, 1973.
- Harley, J.L., Smith, S.E., Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press, 1983.
- Hartmann, A., Baldani, J.I., Kirchhof, G., Aßmus, B., Hutzler, P., Springer, N., Ludwig, W., Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., de Zamaroczy, M. (Hrsg.). *Azospirillum* VI and related microorganisms: Genetics, physiology, ecology. Berlin: NATO ASI Series G 37, Springer Verlag, 1995: 415–427.
- Hartmann, A., Fu, H., Burris, R.H., Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. J. Bacteriol. 165: 864–870, 1986.
- Hartmann, A., Singh, M., Klingmüller, W., Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. Can. J. Microbiol. 29: 916–923, 1983.
- Hassan, U., Mirza, M.S., Rasul, G., Mehnaz, S., Hafeez, F.Y., Ali, S., Bilal, R., Malik, K.A., Development of a biofertilizer (Biopower) for wheat and rice. 7th Int. Symp. Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Faisalabad, Pakistan, 16.–21. Okt. 1996. Abstract: 169.
- Hayen-Schneg, N., Wachstumsphysiologische Untersuchung und Inokulationsversuche mit Kulturpflanzen am Beispiel des stickstofffixierenden Endophyten *Azoarcus*. Diplomarbeit, Universität Hannover, Institut für Biophysik, 1995.
- Hayman, D.S., Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytol. 73: 71–80, 1974.
- Heß, D., Pflanzenphysiologie. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 1981.
- Ho, I., Interaction between VA-mycorrhizal fungus and *Azotobacter* and their combined effects on growth of tall fescue. Plant Soil 105: 291–293, 1988.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., The water culture method for growing plants without soil. Circular 347, Berkeley: California Agricultural Experimental Station, CA, 1950.
- Hubbel, D., Gaskins, M., Associative N₂-fixation with *Azospirillum*. In: Alexander, M., (Hrsg.). Biological N₂-fixation: ecology, technology and physiology. New York: Plenum Press, 1984: 201–224.
- Hurek, T., Egener, T., Reinhold-Hurek, B., Divergence in nitrogenase of *Azoarcus* spp., *Proteobacteria* of the β subclass. J. Bacteriol. 179: 4172–4178, 1997a.
- Hurek, T., Reinhold, B., Fendrik, I., Niemann, E.-G., Root-zone-specific oxygen tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with kallar grass. Appl. Environ. Microbiol. 53: 163–169, 1987a.

- Hurek, T., Reinhold, B., Niemann, E.-G., Effect of oxygen on NH_4^+ -grown continuous cultures of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Can. J. Microbiol.* 33: 919–922, 1987b.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs, *Azoarcus* spp., by analyses of partial 16S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2257–2261, 1995.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Turner, G.L., Bergersen, F.J., Augmented rates of respiration and efficient nitrogen fixation at nanomolar concentrations of dissolved O_2 in hyperinduced *Azoarcus* sp. strain BH72. *J. Bacteriol.* 176: 4726–4733, 1994a.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., van Montagu, M., Kellenberger, E., Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176: 1913–1923, 1994b.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., van Montagu, M., Kellenberger, E., Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by *Azoarcus*. In: Polsinelli, R., Materassi, R., Vincenzini, M. (Hrsg.). Nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991: 215–242.
- Hurek, T., Van Montagu, M., Kellenberger, E., Reinhold-Hurek, B., Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp. BH72. *Mol. Microbiol.* 18: 225–236, 1995.
- Hurek, T., Wagner, B., Reinhold-Hurek, B., Identification of N_2 -fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4331–4338, 1997b.
- INVAM, Internet http://invam.caf.wvu.edu/myc_info/glomus/intraradices/intrarad.htm, 1999.
- James, E.K., Olivares, F.L., Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 77–119, 1997.
- James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J., *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Exp. Bot.* 48: 785–797, 1997.
- Kamuru, F., Albrecht, S.L., Allen, L.H. Jr., Shanmugam, K.T., Growth and accumulation of ^{15}N in rice inoculated with the parent and a nitrogenase-derepressed mutant strain of *Anabaena variabilis*. *Appl. Soil Ecol.* 5: 189–195, 1997.
- Karg, T., Reinhold-Hurek, B., Global changes in protein composition of N_2 -fixing *Azoarcus* sp. strain BH72 upon diazosome formation. *J. Bacteriol.* 178: 5748–5754, 1996.
- Kjeldahl, F., *Z. Anal. Chem.* 22: 366–382, 1883.
- Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38: 1219–1232, 1992.
- Kloepper, J.W., Schooners, B., Baker, P.A.H.M., Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. *Phytopathology*, 82: 726–727.
- Kloss, M., Iwannek, K.-H., Fendrik, I., Niemann, E.-G., Organic acids in the root exudates of *Diplachne fusca* (Linn.) Beauv. *Environ. Exp. Bot.* 24: 179–188, 1984.

- Köhler, K.-H., Fortschritte und Probleme bei der biologischen Stickstoffbindung unter besonderer Berücksichtigung von Assoziationen. *Biol. Rdsch.* 23: 137–160, 1985.
- Koske, R.E., Gemma, J.N., A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92: 486–588, 1989.
- Krieg, N.R., Döbereiner, J., Genus *Azospirillum*. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Hrsg.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984: 94–104.
- Krieg, N.R., Hoffmann, P.S., Microaerophily and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 107–130, 1986.
- Land, S., Schönbeck, F., Influence of different soil types on abundance and seasonal dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils of North Germany. *Mycorrhiza* 1: 39–44, 1991.
- Lee, K.K., Watanabe, I., Problems of the acetylene reduction technique applied to water-saturated paddy soils. *App. Environ. Microbiol.* 34: 654–660, 1977.
- Ludwig, W., Dorn, S., Spindler, N., Kirchhof, G., Schleifer, K.-H., PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3236–3244, 1994.
- Lynch, J.M., *Soil biotechnology: Microbiological factors in crop productivity*. Oxford: Scientific Publications, 1983.
- Lynch, J.M., Microbial metabolites. In: Lynch, J.M. (Hrsg.). *The rhizosphere*. Chichester: John Wiley & Sons, 1990: 177–206.
- Malik, K.A., Aslam, Z., Naqvi, M., Kallar grass a plant for saline land. Faisalabad: Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), 1986.
- Malik, K.A., Zafar, Y., Hussain, A., Nitrogenase activity in the rhizosphere of kallar grass (*Diplachne fusca* (Linn.) Beauv.). *Biologia* 26: 107–112, 1980.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593–600, 1992.
- Marotzke, S., Untersuchung der Dreiersymbiose zwischen dem diazotrophen Endophyten *Azoarcus* und dem mykorrhizierenden Pilz *Glomus intraradices* an der Kulturpflanze *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Diplomarbeit, Universität Hannover, Institut für Biophysik, 1997.
- Marschner, H., Nährstoffdynamik in der Rhizosphäre. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 98: 291–309, 1985.
- Marschner, H., *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press, 1986.
- Mengel, K., *Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1984.
- Miller, J.H., *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

- Mugnai, M., Bazzicalupo, M., Fani, R., Gallori, E., Paffetti, D., Pastorelli, R., Factors affecting nitrogen fixation and *nif* gene transcription in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 120: 133–136, 1994.
- Newman, E., The rhizosphere: carbon source and microbial populations. In: Fitter, A. (Hrsg.). Ecological interaction in soil: plants, microbes and animals. Blackwell Scientific Publications, 1985.
- Newton, J.W., Wilson, P.W., Burris, R.H., Direct determination of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation in *Azotobacter*. J. Biol. Chem. 204: 445, 1953.
- O´Toole, P., Knowles, R., Efficiency of acetylene reduction (nitrogen fixation) in soil: effect of type and concentration of available carbohydrate. Soil Biol. Biochem. 5: 789–797, 1973.
- Oberzill, W., Mikrobiologische Analytik. Carl: Nürnberg, 1967.
- Okon, Y., Kapulnik, Y., Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil 90: 3–16, 1986.
- Okon, Y., Vanderleyden, J., Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News 63: 366–370, 1997.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J., Occurrence of the endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. Biol. Fertil. Soils 21: 197–200, 1996.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I., Döbereiner, J., Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. New Phytol. 135: 723–737, 1997.
- Oren, A., On the use of tetrazolium salts for the measurement of microbial activity in sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 127–133, 1987.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874–879, 1989.
- Pacovsky, R.S., Diazotroph establishment and maintenance in the *Sorghum-Glomus-Azospirillum* association. Can. J. Microbiol. 35: 977–981, 1989a.
- Pacovsky, R.S., Metabolic differences in *Zea-Glomus-Azospirillum* symbioses. Soil Biol. Biochem. 21: 953–960, 1989b.
- Pacovsky, R.S. Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. In: Skinner, F.A., Boddey, R.M., Fendrik, I. (Hrsg.). Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989c: 235–239.
- Pacovsky, R.S., Development and growth effects in the *Sorghum-Azospirillum* association. J. Appl. Bacteriol. 68: 1–9, 1990.
- Pacovsky, R.S., Fuller, G., Paul, A.E., Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in sorghum. Soil Biol. Biochem. 17: 525–531, 1985.

- Patriquin, D.G., Döbereiner, J., Light microscopy observations of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24: 734–742, 1978.
- Patriquin, D.G., Döbereiner, J., Jain, D.K., Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900–915, 1983.
- Paula, M.A., Reis, V.M., Döbereiner, J., Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertil. Soils* 11: 111–115, 1991.
- Paula, M.A., Urquiaga, S., Siqueira, J.O., Döbereiner, J., Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils* 13: 1–4, 1992.
- Pereira, J.A.R., Cavalcante, V.A., Baldani, J.I., Döbereiner, J., Kersters, K., Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 110: 269–274, 1988.
- Pimentel, J.P., Olivares, F.L., Pitard, R.M., Urquiaga, S., Akiba, F., Döbereiner, J., Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 137: 61–65, 1991.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943–948, 1980.
- Postgate, J.R., Nitrogen fixation. *New Studies in Biology*. Edward Arnold, 1987.
- Powell, C.L., Field inoculation with VA mycorrhizal fungi. In: Powell, C.L., Bagyaraj, D.J. (Hrsg.). *VA mycorrhiza*. Boca Raton: CRC Press, 1984: 205–222.
- Rawn, J.D., *Biochemistry*. Burlington: Neil Patterson Publ., 1989.
- Reid, C.P.P., Mycorrhizas. In: Lynch, J.M. (Hrsg.). *The rhizosphere*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1990: 281–315.
- Reinhold, B., Hurek, T., Light microscopical visualization of diazotrophs on and in roots by immunogold-silver staining. *Biol. Fertil. Soils* 6: 298–301, 1988a.
- Reinhold, B., Hurek, T., Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. *Plant Soil* 110: 259–268, 1988b.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 162: 190–195, 1985.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 889–891, 1987.
- Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E.-G., Fendrik, I., Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520–526, 1986.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6: 139–144, 1998a.

- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 29–54, 1998b.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Claeysens, M., van Montagu, M., Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *J. Bacteriol.* 175: 7056–7065, 1993a.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., de Ley, J., *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 574–584, 1993b.
- Richter, G., *Biochemie der Pflanzen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1996.
- Robinson, R.W., Akin, D.E., Nordstedt, R.A., Thomas, M.V., Aldrich, H.C., Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilm from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 127–136, 1984.
- Romantschuk, M., Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 225, 1992.
- Rovira, A.D., A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. *J. Appl. Bacteriol.* 19: 72–79, 1965.
- Rovira, A.D., Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35: 35–57, 1969.
- Schlegel, H.G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992.
- Schlöter, M., Entwicklung von Methoden zur Identifizierung, Lokalisierung und Quantifizierung von *Azospirillum brasilense* Stämmen mit monoklonalen Antikörpern. Dissertation, Aachen: Verlag Shaker, 1993.
- Schlöter, M., Bode, W., Hartmann, A., Beese, F., Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biol. Biochem.* 24: 399–403, 1992.
- Schlöter, M., Borlinghaus, R., Bode, W., Hartmann, A., Direct identification, and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. *Journal of Microscopy* 171: 173–177, 1993.
- Schlöter, M., Kirchhof, G., Heinzmann, U., Döbereiner, J., Hartmann, A., Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: Hegazi, N.A., Fayed, M., Monib, M. (Hrsg.). *Nitrogen fixation with non-legumes*. Cairo: The American University in Cairo Press, 1994: 283–289.
- Schönbeck, F., Grunewaldt-Stöcker, G., von Alten, H., Mycorrhizae. In: Campell, C.L., Benson, D.M. (Hrsg.). *Epidemiology and management of root disease*. Berlin: Springer Verlag, 1993.

- Smith, B.E., Eady, R.R., Lowe, D.J., Gormal, C., The vanadium-iron protein of vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* contains an iron vanadium cofactor. *Biochem. J.* 250: 299–302, 1988.
- Smith, S., Gianinazzi-Pearson, V., Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 39: 221–244, 1988.
- Smith, S.E., St John, B.J., Smith, F.A., Nicholas, D.J.D., Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol.* 99: 211–227, 1985.
- Stahl, P.D., Christensen, M., Population variation in the mycorrhizal fungus *Glomus mossae*: Breadth of environmental tolerance. *Mycol. Res.* 95: 300–307, 1991.
- Staley, T.E., Lawrence, E.G., Nance, E.L., Influence of a plant growth-promoting pseudomonad and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on alfalfa and birdsfoot trefoil growth and nodulation. *Biol. Fertil. Soils* 14: 175–180, 1992.
- Stein, T., ¹⁵N-Isotopenverdünnung bei Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) durch diazotrophe Mikroorganismen, Diplomarbeit, Universität Hannover, Institut für Biophysik, 1992.
- Stein, T., Hayen-Schneg, N., Fendrik, I., Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. *Soil Biol. Biochem.* 29: 969–971, 1997.
- Stein, T., Pollak, F.C., Kimmel, S., Fendrik, I., Niemann, E.-G., Colonization of kallar grass roots with mixed inocula of *Azospirillum lipoferum* and its chemotactic negative mutant. In: Hegazi, N.A., Fayez, M., Monib, M. (Hrsg.). Nitrogen fixation with non-legumes. Cairo: The American University in Cairo Press, 1994: 387–389.
- Stein, T., Ueckert, J., Fendrik, I., Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of Kallar grass using alginate-coated seeds in mixed inoculation. In: Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., de Zamaroczy, M. (Hrsg.). *Azospirillum* VI and related microorganisms: Genetics, physiology, ecology. Berlin: NATO ASI Series G 37, Springer Verlag, 1995: 239–243.
- Sylvia, D.M., Williams, S.E., Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA Special Publishers 54, 1992: 101–124.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J., A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967–980, 1978.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H., Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 17: 1016–1024, 1979.
- Tilak, K.V.B.R., Li, C.Y., Ho, I., Occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 116: 286–288, 1989.
- Tinker, P.B.H., Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on higher plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29: 325–349, 1975.

- Trehan, S.P., Immobilisation of $^{15}\text{NH}_4^+$ in three soils by chemical and biological processes. *Soil Biol. Biochem.* 28: 1021–1027, 1996.
- Trolldenier, G., Die assoziative Stickstoffbindung im Wurzelbereich – Ergebnisse und Erwartungen. *Forum Mikrobiol.* 7: 154–161, 1984.
- Ueckert, J., Untersuchungen zur internen Gasdiffusion bei *Leptochloa fusca* und *Oryza sativa*, Diplomarbeit, Universität Hannover, Institut für Biophysik, 1988.
- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M., Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 105–114, 1992.
- Vančura, V., Prikryl, Z., Kalachová, Wurst, M., Some quantitative aspects of root exudation. *Ecol. Bull.* 25: 381–386, 1977.
- Vande Broek, A., Keijers, V., Vanderleyden, J., Effect of oxygen on the free-living nitrogen fixation activity and expression of the *Azospirillum brasilense NifH* gene in various plant-associated diazotrophs. *Symbiosis* 21: 25–40, 1996.
- Vande Broek, A., Vanderleyden, J., Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 445–466, 1995.
- VEB Statron, Zur Tracertechnik mit dem stabilen Stickstoffisotop ^{15}N , Abhandlung zum Emissionsspektrometer NOI 5, VEB Statron, DDR, 1974.
- Waschütza, S., Untersuchung der Wurzelexsudate im Hinblick auf Bakterien/Pflanzen-Assoziationen bei Kultur- und Wildformen von koreanischem Reis (*Oryza* sp.). Dissertation, Universität Hannover, 1993.
- Watanabe, I., De Guzman, M.R., Cabrera, D.A., The effect of nitrogen fertilizer on N_2 fixation in the paddy field measured by *in situ* acetylene reduction assay. *Plant Soil* 59: 135–139, 1981.
- Weller, D.M., Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407, 1988.
- Wieland, G., Interaktionen zwischen *Azoarcus* sp. BH72 und Kulturpflanzen sowie anderen Bodenmikroorganismen, Diplomarbeit, Universität Hannover, Institut für Biophysik, 1997.
- Wieland, G., Marotzke, S., Stein, T., Fendrik, I., Interaction of *Azoarcus* sp. with other diazotrophs in cereal plants. Poster präsentiert beim 7th Int. Symp. Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Faisalabad, Pakistan, 16.–21. Okt. 1996.
- Wilcox, H.E., Mycorrhizae. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Hrsg.). *Plant roots. The hidden half*, 1996: 689–721.
- Wittwer, S.H., Agricultural productivity and biological nitrogen fixation, an international view. In: Hollaender, A. (Hrsg.). *Genetic engineering in nitrogen fixation*. New York: Plenum Press, 1977: 515–520.
- Zuberer, D.A., Soil and rhizosphere aspects of N_2 -fixing plant-microbe associations. In: Lynch, J.M. (Hrsg.). *The rhizosphere*. Chichester: John Wiley & Sons, 1990: 317–353.

6 ANHANG

6.1 Geräteliste

Autoklav	Schnellsterilisier Autoklav type 26, Melag Dampfsterilisator 500, Varioklav, H + P Labortechnik GmbH, München
Bidestille	Fistream water still, Fisons, Loughborough, England
Critical Point Dryer	Kritisch-Punkt Apparatur CPD 030, Balzers Union
Fotokamera	Spiegelreflexkamera Olympus OM1 mit Balgengerät und Drahtauslöser
Gaschromatograph	Fractovap mod. 4200-01, Carlo-Erba Strumentazione, Italien Säule: 90 cm V4A Stahlsäule, Außen-Ø 4mm, Innen-Ø 2 mm, mit Porapak N80/100 mesh gepackt Zweikanal-Schreiber , BD 41, Kipp und Zonen, Solingen
Gefriertruhen	-85 °C: UF85-460T, Colora Messtechnik GmbH, Lorch -20 °C: GT 460, Bauknecht, Stuttgart
Heizplatte	Ceran 500, Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Homogenisator	Messerhomogenisator ho 1806, Edmund Bühler, Tübingen
Inkubatoren	Brutschrank, BvW40, Memmert, Schwabach Eppendorf-Thermostat, 5320, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Eppendorf-Thermomixer, 5420, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Wasserbad, Typ 1012, GFL, Hannover Schüttelwasserbad, Typ 1083, reziprok, GFL, Hannover
Klimakammern	Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen-Frommern Kälte Roter, Langenhagen
Luxmeter	LX-101, Bioblock Scientific
Magnetrührer	mit Heizplatte, IKA Combimag RCT, Ika Werk, Staufen i. Br.
Mikropipetten	Eppendorf Varipette, Eppendorf Comforpette, Eppendorf Reference
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop, Objektive 6,3-, 16-, 40fach mit 10fach Okularen, Zeiss, Oberkochen Stereomikroskop Stemi SV11, 0,6–66fach Zoomobjektiv, Okulare 10fach, Zeiss, Oberkochen Fluoreszenzmikroskop, Zeiss, Oberkochen Laserscanning-Mikroskop LSM 410, Zeiss, Oberkochen Rasterelektronenmikroskop DSM 940, Zeiss, Oberkochen

Millipore-Anlage	Milli-Rho und Milli-Q Plus, Wasser mit $15\mu\Omega\text{cm}$, Eschborn
Mischer	Eppendorf-Mischer, 5432, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Whirlmixer, Mono-Mixer, Sarstedt Whirlmixer, MS1 Minishaker, IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
^{15}N-Analysator	NOI 5, VEB Statron, Fürstenwalde mit Flachsreiber , BD 8, Kipp & Zonen, Solingen
Öfen	Muffelofen, KM 170, Heraeus, Hanau Trockenschrank, TV 500L, Memmert, Schwabach
pH-Meter	Präzisions-pH-Meter Typ 350, Knick, Berlin mit pH-Elektrode , WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipettus, Hirschmann-Laborgeräte
Schüttler	Rundschüttler MTS4, IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Spektralphotometer	Spectronic 301, Milton Roy, USA
Sputtergerät	Kathodenzerstäubungsgerät SCD 040, Balzers Union
Statistik	zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, MS Excel 8.0
Sterilbank	Airflow-Bank, Type 324H, Ceag Schirp Reinraumtechnik, Selm-Birk NSF 49 BS 5726, „biohazard“, Clean Air, Woerden, Niederlande
Vakuumpumpe	1004 A, Alcatel, Frankreich mit Vakuummessgerät , VSP 222, Vakuubrand, Wertheim
Waagen	Analysenwaage, Sartorius research R300S, Sartorius, Göttingen Analysenwaage, Sartorius research R200D mit Ablesegenauigkeit 0,01 mg, Sartorius, Göttingen Tischwaage, Sartorius laboratory L2200P, Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Kühlzentrifuge: Centrifuge Model J2-MC, Beckman, München „Eppendorf“-Zentrifuge: Biofuge pico, Heraeus Instr., Osterode Zentrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

6.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tina Selle, geb. Stein
Geboren am 21. Dezember 1967 in Hannover

Schulbildung

1973 – 1977 Grundschule Wettbergen
1977 – 1986 Humboldtschule Hannover

Hochschulstudium

WS 1986/87 – SS 1992 Studium der Biologie an der Universität Hannover. Diplomprüfungen in Botanik, Genetik, Biophysik und Humanphysiologie.
Diplomarbeit am Institut für Biophysik der Universität Hannover bei Prof. Dr. E.-G. Niemann zum Thema „¹⁵N-Isotopenverdünnung bei Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) durch diazotrophe Mikroorganismen“
Diplomnote „sehr gut“

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Sept. – Okt. 1989 Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover, Abt. Geomikrobiologie, Dr. K. Bosecker, Mitarbeit im Rahmen des Projekts „Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur Anreicherung von Wertmetallen aus silikatreichen Rohstoffen und Rückstandsprodukten“
seit Jan. 1992 Universität Hannover, Institut für Biophysik, AG Stickstofffixierung, Prof. Dr. E.-G. Niemann, Prof. Dr. I. Fendrik, Betreuung der Kurse „Physikalische Messverfahren in der Biologie“ und „Biologische Stickstofffixierung“
Mai – Juli 1993 Forschungsaufenthalt am EMBRAPA/CNPAB, Abt. Bodenmikrobiologie bei Dr. Johanna Döbereiner, Rio de Janeiro, Brasilien
seit Dez. 1993 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biophysik im Rahmen eines DFG-Projekts zur Erforschung der „Dreiersymbiose zwischen stickstofffixierenden Mikroorganismen, vesikulär-arbuskulären Mykorrhizapilzen und Kulturpflanzen“
Juni 1994 Forschungsaufenthalt am ENEA-Casaccia, Abt. Biotechnologie und Agrikultur bei Prof. Dr. Maddalena Del Gallo, Rom, Italien