

VBB-Bulletin Nr. 8 / Oktober 2004

1. Jahresbericht des Präsidenten	1
2. Tätigkeiten der Projektgruppen	4
2.1. Öffentlichkeitsarbeit.....	4
2.2. Mikrobiologie	4
2.3. Mykorrhiza.....	5
2.4. Fauna	5
2.5. Langzeitbeobachtung (NABOKABO)	5
3. Ausgewählte Projekte der VBB	6
3.1. Terrestrische Risikoindikatoren für die Seenregionen Baldeggersee, Greifensee and Murtensee	6
4. Forum	8
4.1. Der Fachbereich Bodenbiologie am Institut für Terrestrische Ökologie	8
4.2. Anwendung molekularbiologischer Metho- den in der mikrobiellen Ökologie: Potenzial zur Analyse der bakteriellen Vielfalt in den Böden und in der Rhizosphäre.....	10
4.3. Die Entwicklung der bodenbiologischen Kenngrößen der freiburgischen Landwirtschaftsböden	16

1. Jahresbericht des Präsidenten

Guido Schmid

*Amt für Umweltschutz, Fachstelle Bodenschutz,
St. Gallen*

Sie erinnern sich: 1983 schaffte der Bodenschutz knapp den Einzug in die helvetische Gesetzgebung (notabene elf Jahre nach der Verabschiedung der Bodencharta des Europarates). Die Bodenschutzbestimmungen des Umweltschutzgesetzes wurden 1986 in der Verordnung über Schadstoffe im Boden konkretisiert. Insbesondere wurde die Bodenfruchtbarkeit erstmals definiert: Der Boden gilt unter anderem als fruchtbar, wenn er eine standorttypische Struktur und eine ungestörte Abbaufähigkeit aufweist.

Damit wurde der Grundstein zur VBB gelegt: Mit dem Ziel, in der Arbeit des Bodenschutzes auch bodenbiologische Methoden einzusetzen schlossen sich 1991 VertreterInnen der Bodenschutzfachstellen der Kantone AG, BE, SG und SO zur „Arbeitsgruppe Bodenbiologie“ zusammen. 1995 ging aus dieser Arbeitsgruppe durch Erweiterung um die Forschungsanstalten FAL, FiBL und WSL sowie das BUWAL die VBB hervor.

Über 20 Jahre bodenschützerische Tätigkeit insgesamt und bald 10 Jahre Arbeitsgruppentätigkeit in der VBB – der Bodenschutz kommt langsam in die Jahre. Eine gute Gelegenheit, Rückschau zu halten. Was haben diese zehn Jahre der Bodenbiologie gebracht?

Neben dem Erfahrungsaustausch zwischen Vollzugsorganen und Forschenden wurde in verschiedenen VBB-Arbeitsgruppen eine Vielzahl von Projekten initiiert, mitgetragen oder selber durchgeführt.

Hier folgt eine Zusammenstellung der wichtigsten Projekte:

- Vollzugskonzept "Bodenbiologie und Bodenschutz"
- Anleitungen für Probenahme und Referenzmethoden (mikrobielle Biomasse SIR, FEM, mikrobielle Atmung, N-Mineralisation, Dehydrogenaseaktivität, Mykorrhiza-Infektionspotenzial, Regenwurmpopulation)
- Referenzwertebereiche für mikrobiologische Parameter im Acker und für Regenwurmpopulationen im Dauergrünland
- Mikrobiologische und bodenphysikalische Parameter in der Langzeitüberwachung, erster Einsatz mikrobiologischer Parameter im NABO
- Konzept "Datenbank für mikrobiologische Kennwerte"

- Ausstellungen: Regenwurm, GartenLehrpfad, ErlebnisBoden
- Lehrmittel: Boden praktisch erfahren
- Wissensplattform „KM Soil“

Alles in allem eine beachtliche Arbeitsleistung in und ausserhalb der Arbeitsgruppen. Auch wenn Sie, liebe Leserin, lieber Leser, bei der Lektüre des VBB-Bulletins ab und an den Eindruck hatten, dass die bodenbiologischen Mühlen langsam mahlen – die obige Liste zeigt: Es wurde viel erreicht in der Bodenbiologie! Ein herzliches Dankeschön allen, die dazu beigetragen haben. Und es bestätigt das, was wir im Arbeitsalltag immer wieder feststellen: Vollzugsarbeit braucht Zeit. Oder um es mit italienischem Charme zu sagen „chi va piano va sano e lontano“.

Die Plattform VBB wird in neuster Zeit vermehrt für Projekte genutzt, die nicht direkt mit Bodenbiologie zu tun haben. Auch das bietet Gelegenheit, die Ausrichtung dieser Plattform wieder einmal zu überdenken. In welche Richtung sollen die nächsten zehn Jahre VBB-Arbeit weisen? Mehr dazu im nächsten Heft.

Name und Arbeitsinhalt der Projektgruppe	Mitglieder	Kontaktperson
Öffentlichkeitsarbeit		
<ul style="list-style-type: none"> - Information und Sensibilisierung der Öffentlichkeit für den Bodenschutz - Erfahrungs- und Wissensaustausch 	R. Bono (BL) J. Burri (LU) C. Maurer-Troxler (BE) F. Okopnik (AG) B. Pokorni (NE) R. von Arx (BUWAL) G. von Rohr (SO) T. Wegelin (ZH)	Dr. Roland von Arx BUWAL CH-3003 Bern Tel. 031 322 93 37 roland.vonarx@buwal.admin.ch
Mikrobiologie		
<ul style="list-style-type: none"> - Erarbeiten und validieren von Probenahmestrategien (Wiese, Acker, Wald) - Auswahl, Standardisierung und Validierung von Methoden - Dokumentation der räumlichen und zeitlichen Variabilität - Pilotstudien zur Erfassung von konkreten Belastungen 	W. Heller (FAW) A. Fliessbach (FiBL) E. Laczko (Solvit) P. Mäder (FiBL) H.-R. Oberholzer (FAL)	Dr. Hans-Rudolf Oberholzer Agroscope FAL Reckenholz Reckenholzstrasse 191/211 CH-8046 Zürich Tel. 01 377 72 97 hansrudolf.oberholzer@fal.admin.ch
Mykorrhiza		
<ul style="list-style-type: none"> - Erarbeiten und validieren von Standardmethoden zur Beschreibung des Mykorrhiza-Zustandes von Böden 	S. Egli (WSL) U. Galli (Grenchen) J. Jansa (ETH) C. Maurer-Troxler (BE) P. Mäder (FiBL) B. Senn (WSL) V. Wiemken (Uni BS)	Dr. Simon Egli WSL Zürcherstrasse 111 CH-8903 Birmensdorf Tel. 01 739 22 71 simon.egli@wsl.ch
Fauna		
<ul style="list-style-type: none"> - Methoden zur Erfassung der Bodentiere evaluieren, standardisieren und in Fallstudien testen 	S. Keller (FAL) C. Maurer-Troxler (BE) L. Pfiffner (FiBL)	Dr. Claudia Maurer-Troxler Abteilung Umwelt und Landwirtschaft, Rütli CH-3052 Zollikofen Tel. 031 910 53 33 claudia.maurer@vol.be.ch
Langzeitbeobachtung		
<ul style="list-style-type: none"> - Koordination von bodenbiologischen Untersuchungen in KABO's - Pilotuntersuchungen zur Langzeitbeobachtung (Zusammenarbeit mit FAL-Projekt) 	H. Brunner (FAL) J. Burri (LU) A. Fehlmann (SO) U. Gasser (ZH) C. Maurer-Troxler (BE) H.-R. Oberholzer (FAL) F. Okopnik (AG) G. Schmid (SG) P. Schwab (FAL)	Dr. Claudia Maurer-Troxler Abteilung Umwelt und Landwirtschaft, Rütli CH-3052 Zollikofen Tel. 031 910 53 33 claudia.maurer@vol.be.ch

2. Tätigkeiten der Projektgruppen

2.1. Projektgruppe Öffentlichkeitsarbeit

Roland von Arx, BUWAL

Leider konnte die elektronische Plattform "KMSoil" nicht wie vorgesehen 2003 den kantonalen Fachstellen für Bodenschutz (FaBo) zur Verfügung gestellt werden, da sich die Programmierung und die Lösung der Sicherheitsauflagen verzögerte. Die Plattform unterstützt den Wissensaustausch zwischen den Bodenschutzfachstellen der Kantone und des Bundes. KMSoil besteht aus einer Infothek (Abb. 1), einem Expertenverzeichnis, einem Eventkalender, einem Diskussionsforum, Teamräumen für Arbeitsgruppen und einer Linksammlung. Seit Frühjahr 2004 ist die Plattform nun in Betrieb und die FaBo können mit dem neuen Hilfsmittel erste Erfahrungen sammeln. Später sollen auch weitere Umweltschutzfachstellen und Forschungsinstitutionen Zugang erhalten.

setzung für ein erfolgreiches Projekt ist, dass es von der Landwirtschaft wesentlich mitgetragen wird.

Die Landwirtschaftliche Lehrmittelzentrale (LmZ) hat nach der deutschen auch die französische Version des Lehrmittels „Ökologie“ für Landwirtschaftliche Schulen überarbeitet und mit Unterstützung des BUWAL neu herausgegeben. Verlag: LmZ, Zollikofen (Fax: 031 911 49 52, Email: lmz@pop.agri.ch, <http://surf.agri.ch/lmz>).

Auch der Schweizerische Familiengärtner-Verband (www.familiengaertner.ch) gibt seine neue Broschüre für den naturnahen Gartenbau nun ebenfalls als französische Version ("Jardins familiaux en harmonie avec la nature") heraus. Die Broschüre löst den "Gartentip" ("Jardi-conseils") ab.

Die Internetseite www.regenwurm.ch wurde mit Unterrichtseinheiten ergänzt. Sie ist nach wie vor mit 50-80 Abfragen pro Tag sehr gut besucht.

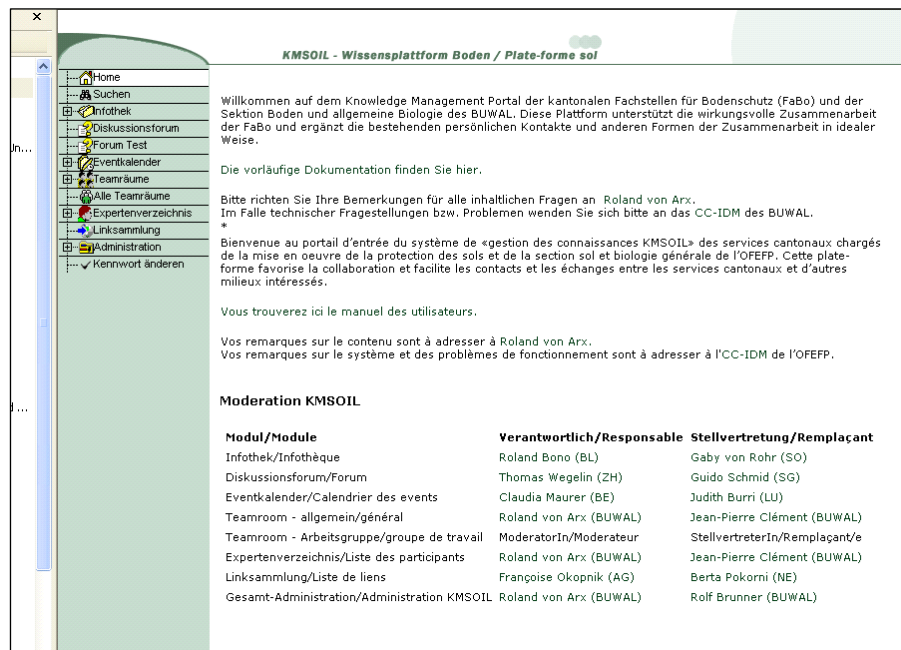


Abb. 1: Blick auf das Hauptmenü der Wissensplattform Boden – KMSOIL.

Die Pilotphase des Projekts „Von Bauern – für Bauern“ von Patricia Fry konnte 2003 abgeschlossen werden. Mit Hilfe von Videos sollen die Erfahrungen von Bäuerinnen und Bauern weiter vermittelt werden. Im Zentrum stehen die Erhaltung und Wiederherstellung der Bodenfruchtbarkeit. Die Umsetzung muss nun durch die landwirtschaftlichen Organisationen und zuständigen Fachstellen erfolgen. Voraus-

Neben verschiedenen Aktivitäten der kantonalen Bodenschutzfachstellen (www.umwelt-schweiz.ch/boden) laufen die Veranstaltungen zum Thema Boden der Zentral-schweizer Umweltschutzdirektionen (UR, SZ, NW, OW, LU, ZG) 2004 bereits das zweite Jahr. Die Federführung haben die Kantone Luzern und Zug. Die Aktionen für die breite Öffentlichkeit werden vom "ökomobil" (Umweltberatung Luzern) betreut.

2.2. Projektgruppe Mikrobiologie

Hans-Rudolf Oberholzer,
Agroscope FAL Reckenholz

Die Arbeitsgruppe koordinierte verschiedene Bodenbiologieprojekte zwischen den Forschungsinstitutionen. Zudem arbeitete sie im Rahmen einer Machbarkeitsstudie von Agrar-Umweltindikatoren in der Schweiz mit. Mitglieder der Gruppe berieten

die Kantone in der Langzeitbeobachtung mit mikrobiologischen Methoden.

2.3. Projektgruppe Mykorrhiza

Simon Egli, WSL Birmensdorf

Die Standardmethode zur Bestimmung des Mykorrhiza-Infektionspotentials in Landwirtschaftsböden wurde überarbeitet und in einer revidierten Version in den Referenzmethoden der Eidg. Landwirtschaftlichen Forschungsanstalten publiziert. Die Methode wurde noch einmal vereinfacht, vor allem um den zeitlichen Aufwand zu minimieren. Die resultierende Einsparung an Arbeitszeit beträgt rund 25%. Wir hoffen, dass die Methode nun bei der biologischen Beurteilung von Böden in der Praxis vermehrt angewendet wird. Für allfällige methodische Hilfestellungen steht die Projektgruppe jederzeit gerne zur Verfügung.

2.4. Projektgruppe Fauna

*Claudia Maurer-Troxler
Abteilung Umwelt und Landwirtschaft, Kt. Bern*

In dieser Gruppe gab es 2004 keine weiteren Aktivitäten, die Arbeitsgruppe wird aus Kapazitätsgründen bis auf weiteres sistiert.

2.5. Projektgruppe Langzeitbeobachtung (NABOKABO)

*Françoise Okopnik
Abteilung für Umwelt, Sektion Boden und Wasser, Aarau
Peter Schwab
Projektleitung LAZBO, FB14.2 (NABO) FAL*

Der VBB Projektgruppe Langzeitbeobachtung gehören neben Mitarbeitern der FAL zur Zeit Vertreter und Vertreterinnen der Kantone AG, BE, GR, SG, SO und ZH an. Der Einbezug von bodenbiologischen und bodenphysikalischen Methoden in die KABOs ist ein Arbeitsschwerpunkt dieser Gruppe. Für eine erfolgreiche Aufnahme neuer Methoden in die KABOs sind die Kantone darauf angewiesen, dass das NABO die Vorreiterrolle wahrnimmt. Ob das NABO Messungen zur zeitlichen Veränderung von physikalischen und biologischen Eigenschaften an den Referenzstandorten ins Untersuchungsprogramm aufnehmen wird, kann jedoch erst nach Abschluss der Pilot- und Testphase LAZBO entschieden werden.

In einem Bericht werden 2004 die Ergebnisse der dreijährigen LAZBO-Pilotuntersuchungen zusammengestellt, die untersuchten Methoden bewertet und erste Folgerungen zum Konzept Langzeitbeobachtung gezogen. Bis 2006 werden diese ersten Erfahrungen in einem modifizierten Konzept umgesetzt, mit drei weiteren Erhebungen an denselben Untersuchungsstandorten getestet und der Routinebetrieb optimiert (LAZBO-Testphase). 2007 sollen Methodenempfehlungen der FAL vorliegen.

In einer weiteren Untersuchung der FAL werden bis 2006 an 60 ausgewählten NABO-Standorten aus Vierfachproben zwei bodenmikrobiologische Parameter (Bodenatmung, mikrobielle Biomasse SIR) bestimmt. Das Ziel ist die Variation im NABO-Referenzmessnetz zu ermitteln und ein bestehendes Referenzwert-Modell zu validieren.

Die in der Arbeitsgruppe vertretenen Kantone streben an, ihre KABO-Daten fallweise gemeinsam auszuwerten. Ein Projekt, für das Daten zusammengelegt werden, stellt die Auswertung der Waldstandortdaten in Bezug auf die Waldbodenversauerung dar. Dieses Projekt wurde 2003 als Schwerpunktprojekt bearbeitet.

3. Ausgewählte Projekte der VBB

3.1. Terrestrische Risikoindikatoren für die Seenregionen Baldeggersee, Greifensee and Murtensee

Andreas Fliessbach
 FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick
 E-mail: andreas.fliessbach@fibl.ch

Pestizidstatistiken beruhen in der Regel auf Verkaufszahlen oder Angaben der Hersteller und sind selten sehr detailliert. So werden für die Schweiz jährliche Verkaufs- und Umsatzzahlen durch die Schweizerische Gesellschaft für Chemische Industrie (SGCI) veröffentlicht. Diese Zahlen spiegeln zwar etwa 90% des Marktvolumens wider, sind jedoch so aggregiert, dass die Wirkstoffe und Anwendungsgebiete nicht erkennbar sind. Neben der beabsichtigten Wirkung eines Pestizids auf Unkräuter, Pilze, Insekten und andere Organismen ist die Nebenwirkung im Allgemeinen eine Umweltbelastung, die nicht erwünscht ist. Die Nebenwirkung ist abhängig von der Menge, der Toxizität und der Verweildauer eines Wirkstoffes in der Umwelt. Diese Eigenschaften der Wirkstoffe von Pestiziden variieren sehr stark und eine Bewertung der Umweltwirkung muss daher die Exposition, die Toxizität, die Verfügbarkeit und die Abbaubarkeit eines jeden Wirkstoffes in dem betroffenen Umweltkompartiment berücksichtigen. Pestizidrisikoindikatoren werden aus bekannten Daten über Wirkstoffcharakteristika und Einsatzbereiche ermittelt und erfordern daher einen hohen Detaillierungsgrad der vorhandenen Daten. Anwenderdaten sind daher für die Berechnung von Risikoindikatoren interessanter als nationale Verkaufszahlen oder gar aggregierte Statistiken.

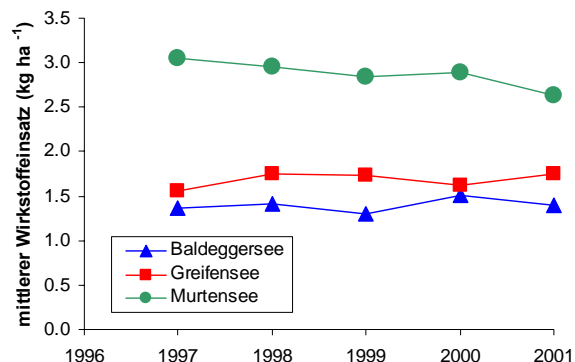


Abb. 2: Mittlere applizierte Wirkstoffmehje je Hektar und Jahr in den drei Seengebieten.

Die Landwirtschaftliche Beratungszentrale Lindau (LBL) und der Service Romand de la Vulgarisation Agricole (SRVA) Lausanne haben im Auftrag des BLW in den Jahren 1997 bis 2001 Befragungen von Landwirten durchgeführt. In den drei Seengebieten Baldeggersee, Greifensee and Murtensee wurden jährlich 10-15% der Landwirte und Landwirtinnen einer Region gebeten, Feldkalender auszufüllen mit möglichst detaillierten Angaben über die Art und Menge des Pestizids, die behandelte Kultur und den Zeitpunkt der Anwendung. Diese wurden an die beiden Beratungsorganisationen zurückgesandt. Letztlich hat dieses Vorgehen dazu geführt, dass für 3-5% der landwirtschaftlichen Nutzfläche Daten vorliegen. Diese Daten wurden mit Hilfe der AGIS Datenbank des BLW auf die gesamte Fläche eines Gebietes hochgerechnet. Im Murtenseegebiet ist der Ackeranteil an der landwirtschaftlichen Nutzfläche und auch der Wirkstoffeinsatz deutlich höher als in den anderen Gebieten (Tab. 1, Abb. 2).

Tab. 1: Ackerland und Grünland in den drei Seenregionen.

	Landwirtschaftliche Nutzfläche (ha)	Natur- und Kunstwiesen (ha)	Ackerland (ha)	Übrige Kulturen (ha)	Ackerland (%)
Baldeggersee	8186	5561	2550	75	31%
Greifensee	9908	6942	2918	49	29%
Murtensee	41108	16888	23182	1038	56%

Risikoindikatoren

Die Risikoindikatoren wurden bereits vorgestellt (Wyss, 2002). Jeder Indikator stellt eine Beziehung her zwischen Exposition und Toxizität. Der niederländische Indikator (NL) teilt diesen Quotienten noch durch die gesamte mit Pestiziden behandelte Fläche und repräsentiert daher eher

ein mittleres Toxizitätsmass. Der Norwegische Indikator (NO) bedient sich eines Stufensystems (score). Alle Indikatoren wurden ursprünglich zur Verwendung mit nationalen – nicht aggregierten – Verkaufszahlen entwickelt.

Weder der Niederländische noch der Norwegische Risikoindikator zeigten einen annähernd

stetigen Verlauf wie durch die mittlere Wirkstoffmenge vorgegeben. Lediglich der Dänische "Load-Index" (DK) wies eine Beziehung zur Pestizidmenge auf. Der Niederländische Indikator war relativ eng mit den Wirkstoffen korre-

liert, die eine hohe Toxizität aufwiesen, wie Ioxynil, die Aktivsubstanz von einigen Herbiziden des Winterweizens (Tab. 2).

Tab. 2: Bestimmtheitsmasse (r^2) für lineare Regressionen der terrestrischen Risikoindikatoren aus den Niederlanden, Dänemark und Norwegen mit dem durchschnittlichen Wirkstoffeinsatz je Seenregion.

	NL Indikator Regenwurm	NL Indikator Vogel	DK Indikator Regenwurm	DK Indikator Vogel	NO Indikator
Baldeggersee	(-) 0.072	(-) 0.000	0.480	0.004	0.453
Greifensee	(-) 0.003	(-) 0.005	(-) 0.054	(-) 0.353	(-) 0.239
Murtensee	0.124	(-) 0.152	0.446	0.003	0.323
Alle Regionen	0.039	0.005	0.319	(-) 0.145	0.041

Der Niederländische und der Dänische Indikator berechnen für Vögel und Regenwürmer separate Risiken, im Norwegischen sind Toxizitätswerte für Vögel, Regenwürmer und Bienen enthalten.

Schlussfolgerungen

Die Pestizid-Anwenderdaten der drei Seengebiete sind im Hinblick auf die flächenbezogene Auflösung sehr unterschiedlich. Baldeggersee und Greifensee haben in erster Linie eine gemischte Ackerbau- und Viehwirtschaft. Aus diesem Grunde ist hier ein grosser Grünlandanteil zu finden. Im Murtenseegebiet ist dieser Anteil viel kleiner, was auf eine intensivere Ackerbau- wie auch Gartenbaunutzung der Flächen hinweist. Trotz der Unterschiede in der Grösse scheint die höhere Anzahl an Datenpunkten im Murtenseegebiet eine Ursache für die bessere Datenqualität zu sein. Dies zeigt sich auch an der geringeren zeitlichen Streuung. Diese Ergebnisse legen eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung bei der Erhebung von Pestizidanwenderdaten nahe.

Die Hypothese, dass eine Reduktion der Pestizidanwendung eine Risikoverringerung bedeutet, unterstützen lediglich in einigen Fällen der Dänische und der Norwegische Indikator. Es lagen aber auch Fälle vor, wo der Indikator mit abnehmender Anwendungsmenge zunahm. Falls dies ein realer Trend sein sollte, würde dies bedeuten, dass vermehrt Pestizide mit höherer Toxizität eingesetzt wurden.

Die Resultate sind als vorläufig zu bewerten, da nicht herauszufinden war, ob die gefundene Variabilität tatsächlich Unterschiede in der Pestizidanwendung widerspiegelt oder nur bedingt ist durch Unterschiede in der Befragungsintensität. Repräsentative und vertrauenswürdige Pestizid-Anwenderdaten sind notwendig um den Effekt umwelt- und agrarpolitischer Massnahmen bewerten zu können. Ein Vergleich der Indikatoren mit tatsächlich

gemessenen Effekten steht noch aus um die Richtigkeit und Plausibilität der Risikoindikatoren bewerten zu können. Hier besteht noch Forschungsbedarf. Ein von der Europäischen Gemeinschaft mit Beteiligung der Schweiz gefördertes Projekt (EU Forschungsprogramm: Wider Fields; EU Nr. 2002-501997-SSP-1) widmet sich der Harmonisierung der Pestizid-Umweltindikatoren und strebt auch eine Verifizierung dieser Indikatoren an.

Wyss, G 2002 Risikoindikatoren für den Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf terrestrische Systeme. *VBB Bulletin* 6, 11-13.

4. Forum

Die Arbeitsgruppe VBB ist die Schnittstelle zwischen bodenbiologischer Forschung und dem Vollzug. Eine wichtige Aufgabe der Gruppe ist, bodenbiologische Methoden für den kantonalen Vollzug der VBBo bereitzustellen.

Die Entwicklung im Gebiet der Bodenbiologie verläuft wie in allen biologischen Wissenschaften rasant. Um einen Einblick in die neusten Trends der Grundlagenforschung zu erhalten, lädt die VBB Experten von Hochschulen ein, die Ihr Arbeitsgebiet vorstellen. An zwei VBB-Sitzungen stellten Prof. Josef Zeyer vom Institut für Terrestrische Ökologie und Prof. Michel Aragno von der Universität Neuenburg ihre Forschungskonzepte und ausgewählte Projekte vor.

4.1. Der Fachbereich Bodenbiologie am Institut für Terrestrische Ökologie (<http://www.ito.umnw.ethz.ch/SoilBio/>)

Josef Zeyer
 Institut für Terrestrische Ökologie,
 Grabenstrasse 3, 8952 Schlieren
 E-mail: josef.zeyer@env.ethz.ch

Übersicht und Organisation

Das Institut für Terrestrische Ökologie (ITOE) der ETH in Schlieren umfasst die vier Fachbereiche Bodenphysik (Leiter: H. Flüher), Bodenchemie (R. Kretzschmar), Bodenschutz (R. Schulin) und Bodenbiologie (J. Zeyer). Als das ITOE vor über zehn Jahren gegründet wurde, waren die Platzverhältnisse der ETH an den Standorten Zentrum und Höggerberg äusserst knapp. Deshalb wurde beschlossen, das ITOE temporär auf dem alten Wagiareal in der Nähe des Bahnhofes in Schlieren anzusiedeln. Zur Zeit arbeiten rund 80-90 Personen am Institut. Das ITOE erhält einerseits feste Mittel von der ETH (Etat-Stellen und ordentliche Kredite) und andererseits muss es sich intensiv um Drittmittel bemühen (Projekte finanziert durch NF, EU, COST, Industrie, BUWAL, Kantone, etc.). Die Laboratorien in Schlieren sind gut ausgerüstet und erlauben Forschungsaktivitäten auf den verschiedensten Gebieten. Lehrveranstaltungen werden aber vorwiegend in den Hörsälen des ETH-Zentrums durchgeführt, da das ITOE in Schlieren nicht über geeignete Vorlesungssäle verfügt. Die ETH-Departemente *Chemie* und

Biologie sind vor einiger Zeit vom ETH-Zentrum auf den Höggerberg umgezogen, weshalb im ETH-Zentrum Räume frei wurden. Es ist nun vorgesehen, dass das ITOE zusammen mit anderen Instituten im Sommer 2005 in diese Räume umzieht.

Struktur und Forschungsgebiete des Fachbereiches Bodenbiologie

Die Forschungsaktivitäten im Fachbereich Bodenbiologie sind prozessorientiert. Die biologisch katalysierten Stoffkreisläufe im Boden sind für den Menschen und seine Umwelt von entscheidender Bedeutung. Diese Prozesse sind unter anderem dafür verantwortlich, dass natürliche (z.B. Kohlenstoff- und Stickstoff-Verbindungen) und anthropogene Stoffe (z.B. Mineralische Dünger, Pestizide, Abfälle) laufend umgesetzt werden und die Qualität der Böden, des Grundwassers und der Luft erhalten bleibt. Die Forschung im Fachbereich Bodenbiologie fokussiert einerseits auf die qualitative und quantitative Erfassung dieser Prozesse und andererseits auf die Charakterisierung der „Katalysatoren“, d.h. der mikrobiellen Gemeinschaften. Dabei wird sowohl im Laboratorium als auch im Feld gearbeitet. Die Aktivitäten lassen sich grob in drei Bereiche einteilen:

Mikrobielle Prozesse im Untergrund: Diese Forschungsgruppe befasst sich primär mit der *in situ* Quantifizierung von Prozessen in natürlichen Böden (unter anderem Oxidation von Treibhausgasen wie Methan) und in kontaminierten Grundwasserleitern (unter anderem Abbau von ausgelaufenem Heizöl unter anaeroben Bedingungen). Beachtet werden muss dabei, dass sehr viele mikrobielle Prozesse mit geochemischen Prozessen gekoppelt sind.

Molekulare Ökologie: In diesem Bereich werden molekulare Methoden entwickelt oder optimiert, um mikrobielle Strukturen und Funktionen im Boden zu erfassen. Die Methoden beruhen im wesentlichen auf der Analyse von DNA und/oder RNA und umfassen Nachweise mit PCR (*Polymerase Chain Reaction*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) und Gensonden.

Biologische Interaktionen: Diese Gruppe befasst sich mit Netzwerken (z.B. Nahrungsketten) im Boden. Die meisten Umsätze im Boden sind Teile von Netzwerken und können erst verstanden werden, wenn parallel dazu auch die

flankierenden Prozesse untersucht werden. Beispielsweise können Bakterien auf gewissen organischen Schadstoffen wachsen und dann aber selbst wiederum den Protozoen als Nahrungsquelle dienen.

Die drei Forschungsgruppen arbeiten eng zusammen, um das Synergiepotential voll zur Geltung zu bringen. Beispielsweise werden Abbauprozesse in kontaminierten Grundwasserleitern mit Hilfe von chemischen und geochemischen Methoden *in situ* quantifiziert und parallel dazu werden die abbauenden mikrobiellen Gemeinschaften mit Hilfe von molekularen Methoden charakterisiert. Darüber hinaus ist der Fachbereich Bodenbiologie aber auch auf Kooperationen mit anderen Laboratorien im In- und Ausland angewiesen. Isotopenstudien werden beispielsweise in Zusammenarbeit mit dem Paul Scherrer Institut (PSI) in Villigen und dem Geologischen Institut der ETH durchgeführt. Im Bereich der molekularen Ökologie gibt es Zusammenarbeiten mit dem MPI Bremen, der GSF in München und der GBF in Braunschweig.

Ausgewählte Forschungsprojekte

a) Mikrobieller Abbau von Öl in Grundwasserleitern

Gelangen Mineralöle durch Unfälle in einen Grundwasserleiter, werden sie durch natürlich vorkommende Mikroorganismen langsam mineralisiert. Die Mineralisierung ist mit einer Zehrung von Oxidationsmitteln verbunden und häufig stellen sich im Grundwasserleiter sulfat-reduzierende und methanogene Verhältnisse ein. In einem kontaminierten Grundwasserleiter in Studen im Kanton Bern wird untersucht, wie rasch die Mineralisierungsprozesse und damit Selbstreinigungsprozesse ablaufen, welche mikrobiellen Populationen am Abbau beteiligt sind und welche geochemischen Prozesse parallel zu den mikrobiologischen ablaufen. Im dicht überbauten Gebiet (Abb. 3) ist der intrinsische mikrobielle Abbau oft die einzige Sanierungsoption.

Kleikemper, J, Schroth, M H, Sigler, WV, Schmucki, M, Bernasconi, SM, Zeyer, J (2002). Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1516-1523

Heizöl-Unfall Studen, BE

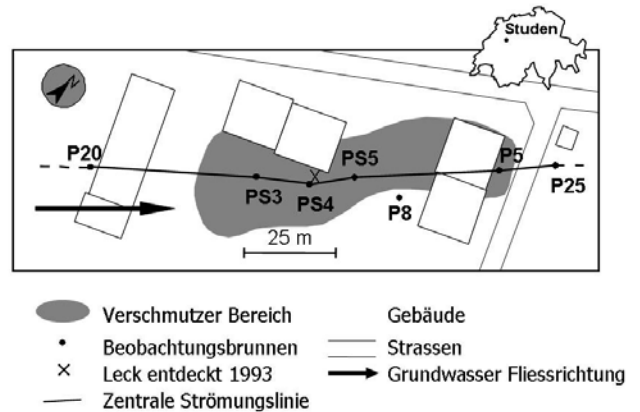


Abb. 3: Untersuchungsgebiet Studen (Bern).

b) Mikrobielle Sukzession in Gletschervorfeldern

Die Vorfelder von Gletschern, die sich zurückziehen, werden von Pionieren (Mikroorganismen, Pflanzen) besiedelt, und bereits nach rund 50 Jahren kann eine ausgeprägte Bodenbildung beobachtet werden. Gletschervorfelder sind somit ideale Experimentierfelder für das Studium der Sukzession und der metabolischen Schlüsselprozesse (Zersetzung von Gesteinen, Stickstofffixierung, Umsätze in der Rhizosphäre, etc.). Im Vorfeld des Dammagletschers auf der Göschenalp verfolgen wir die bodenbildenden Prozesse qualitativ und quantitativ.

Sigler, VW, Crivii, S Zeyer, J (2002). Bacterial succession in glacial forefield soils characterized by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. *Microb Ecol* **44**, 306-316

c) Einfluss der Lagerung auf die biologische Qualität der Böden

Die Abbaubarkeit von Herbiziden muss vom Hersteller in verschiedenen Böden geprüft werden. Dabei ist es unumgänglich, dass die im Feld gewonnenen Bodenproben transportiert und im Labor oft längere Zeit gelagert werden. In einem Zusammenarbeitsprojekt mit der Syngenta AG wird untersucht, wie sich die biologische Qualität und damit die Abbauleistung von Böden durch die Lagerung verändert.

Pesaro, M, Widmer, F, Nicollier, G, & Zeyer, J (2003). Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Soil Biol Biochem* **35**, 1049-1061

d) Quantifizierung der Stickstofffixierung mit molekularen Methoden

Die Stickstoff-fixierenden Populationen im Boden können mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zunehmend detaillierter bestimmt werden. Andererseits stehen auch zuverlässige Methoden zur Verfügung, die Intensität der Stickstofffixierung im Boden zu bestimmen. Was aber fehlt ist der direkte Bezug zwischen der Populationsstruktur und der Intensität der Stickstofffixierung. An dieser Stelle setzt ein Forschungsprojekt ein, in dem versucht wird, durch die Quantifizierung der mRNA und der Nitrogenase im Boden die Brücke zwischen Strukturen und Funktionen zu schlagen.

Bürgmann, H, Widmer, F, Sigler, WV, Zeyer, J (2003). mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1928-1935

4.2. Anwendung molekularbiologischer Methoden in der mikrobiellen Ökologie: Potenzial zur Analyse der bakteriellen Vielfalt in den Böden und in der Rhizosphäre

Michel Aragno
Laboratoire de Microbiologie, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel,
2000 Neuchâtel
E-mail: michel.aragno@unine.ch

Einleitung

Über die bakterielle Vielfalt in natürlichen Lebensräumen war lange Zeit weit weniger bekannt als über die Vielfalt anderer Gruppen von Lebewesen. So wird angenommen, dass der weitaus grösste Teil der Bakterienarten bis heute noch nicht beschrieben ist. Diese Wissenslücke hat verschiedene Gründe: Die Fortschritte in der Grundlagenforschung der Zellbiologie und Molekularbiologie in den 1960er- und 1970er-Jahren gründeten wesentlich auf einer einzigen Bakterienart, auf *Escherichia coli*. Ausserdem fehlte es in der Ökologie und Taxonomie der Bakterien an neuen und zuverlässigen Methoden. So weisen die klassischen Methoden, die auf der Kultivierung von Bakterien beruhen, einen gravierenden Mangel auf: Bei der Untersuchung einer durchschnittlichen Bodenprobe ergibt die Auszählung der mit Acridinorange oder DAPI angefärbten lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop Werte,

die im Durchschnitt rund hundert Mal höher sind, als wenn die Zählung nach einer Kultur (MPN-Verfahren bei flüssigen Medien oder Auszählung der auf gelierten Nährmedien gewachsenen Kolonien) erfolgt. Mit anderen Worten: 99% der Bakterienzellen entgehen der Untersuchung!

Es mussten deshalb Methoden ohne dieses Handicap gefunden werden. Indirekt kann die Biomasse zum Beispiel über die ATP-Menge (Maire, 1984; 1987) oder durch Chloroform-Fumigation (Voroney und Paul, 1984) bestimmt werden. Zusätzliche Hinweise über die Bestimmung der Biomasse hinaus liefert die Untersuchung der Fettsäuren von Phospholipiden (PLFA): Einige Fettsäuren kommen nur bei bestimmten taxonomischen Gruppen vor und können deshalb für deren Identifikation herangezogen werden. Über die Vielfalt der Fettsäuren lässt sich darüber hinaus auch ein Bild der Vielfalt der vertretenen Mikroorganismen gewinnen (Laczkò, 1994). Der bedeutendste Impuls bei der Untersuchung der Bakterienvielfalt in natürlichen Lebensräumen, speziell in den Böden, ging aber zweifellos von der Anwendung molekularbiologischer Methoden aus. Erwähnenswert ist die Anwendung von DNA-Sonden (z.B. *in-situ*-Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden, FISH, Amann et al., 1995) und insbesondere natürlich Methoden, die auf der Vervielfältigung spezifischer DNA-Segmente beruhen (Polymerase-Kettenreaktion, PCR). Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist die früher eher etwas vernachlässigte mikrobielle Ökologie im vergangenen Jahrzehnt zu einer der Vorzeigedisziplinen der modernen Biologie avanciert.

Molekularbiologische Untersuchung von Bakteriengesellschaften mittels PCR

Einen Überblick zu den wichtigsten aus der PCR abgeleiteten Methoden gibt das Schema in Abbildung 4. Aus einer Stichprobe eines natürlichen Lebensraums (z.B. eine Bodenprobe), in der eine bestimmte Gesellschaft verschiedener Bakterien vertreten ist, wird die gesamte aus den Zellen stammende DNA extrahiert und gereinigt. Anschliessend wird mittels PCR die Vervielfältigung eines je nach Anwendung gewählten, spezifischen DNA-Segments vorgenommen. Dazu werden zwei Primer verwendet, kurze Oligonukleotide, deren Sequenz homolog zu den äussersten Bereichen des zu vervielfältigenden DNA-Segments ist. Das Produkt der Vervielfältigung ist eine Mischung von Segmenten, die für die gesamte untersuchte Gesell-

schaft oder einen Teil der ursprünglich vertretenen Arten repräsentativ ist. Die Primer können so gewählt werden, dass ein DNA-Bereich eines universell vorhandenen Gens (z.B. ein ribosomales Gen) vervielfältigt wird, der bei allen Bakterien eine sehr ähnliche Sequenz aufweist. Es werden also homologe Segmente aller vertretenen Bakterien vervielfältigt. Das resultierende DNA-Gemisch vermittelt ein Bild der gesamten in der Stichprobe vertretenen Bakteriengesellschaft.

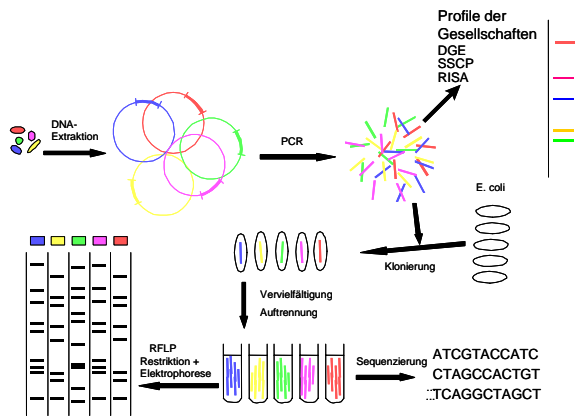


Abb. 4: Molekularbiologische Charakterisierung von Bakteriengesellschaften.

Auswahl der zu vervielfältigenden Sequenzen

Die ribosomalen Gene sind die am besten untersuchten phylogenetischen Marker und eignen sich zur Untersuchung der Vielfalt einer Bakteriengesellschaft und zur stammesgeschichtlichen Einordnung der vertretenen Arten. Je nach Region der ribosomalen Gene ist die Sequenz sehr unterschiedlich stark konserviert. So gibt es Segmente, die bei allen Lebewesen vollständig übereinstimmen, oder Bereiche, die bei allen Bakterien, bei einer grösseren Bakteriengruppe (z.B. den Proteobakterien) oder auch nur innerhalb einer einzigen Gattung wie *Pseudomonas* identisch sind. Es können also für eine bestimmte Bakteriengruppe spezifische Primersequenzen gewählt werden, welche nur die homologen Segmente dieser Gruppe vervielfältigen (Signatur Sequenzen).

Die variabelsten Sequenzen befinden sich in den Intergen-Regionen zwischen den ribosomalen Genen, die aus nicht-kodierenden Segmenten bestehen und folglich nicht oder nur beschränkt unter Selektionsdruck stehen. In diesen Bereichen haben Mutationen eine bessere Chance, sich über längere Zeiträume

der Evolution halten zu können. Mit Hilfe dieser Intergen-Regionen gelingt eine viel feinere phylogenetische Aufschlüsselung, die eine Zuordnung innerhalb der Arten ermöglicht.

Es können aber auch Segmente weiterer Gene vervielfältigt werden, die zum Beispiel für spezifische Funktionen codieren. So wird es möglich, die funktionelle Identität von Organismen innerhalb der Stichprobe gezielt zu untersuchen.

Beschreibung der Bakteriengesellschaften: Elektrophorese, Klonierung, Sequenzierung

Das aus der PCR-Reaktion stammende Gemisch von Segmenten kann mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die verschiedenen Banden auf dem Gel entsprechen den anfänglich vervielfältigten Segmenten der verschiedenen Populationen (Abb. 5). Für eine genauere Beschreibung dieser Methoden, mit denen sich ein Profil zur Vielfalt und Struktur der untersuchten Gesellschaften zeichnen lässt, sei auf die Fachliteratur oder ein Standardwerk wie Gobat et al. (2003, 2004) verwiesen. Diese Profile lassen sich im Übrigen anschliessend kodieren und durch statistische Methoden vergleichen (Fromin et al., 2002). Jedem Profil lässt sich nun ein der Artenvielfalt entsprechender Index zuordnen (Hamelin et al., eingereicht).

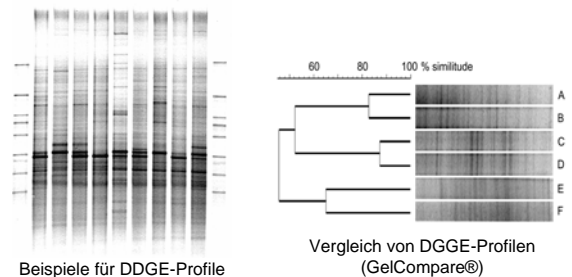


Abb. 5: Beispiele für Profile von Bakteriengesellschaften.

Die verschiedenen Segmente können nun, entweder direkt aus dem Reaktionsgemisch nach der PCR oder durch Ausschneiden aus dem Gel nach der Elektrophorese, zur Klonierung verwendet werden: Die entsprechende DNA-Sequenz wird in ein Plasmid – eine kleine übertragbare Einheit des Genoms – und das Plasmid anschliessend in eine *Escherichia-coli*-Zelle eingefügt. Die Nachkommen dieser Zelle, ihre Klone, tragen nun Kopien des Segments. Die verschiedenen Klone mit den ursprünglich zufällig eingebrachten unterschiedlichen Segmenten, widerspiegeln nun die Zusammen-

setzung der ursprünglichen Gesellschaft. Die so isolierten Klone wiederum können zum Beispiel durch die Muster nach Behandlung der Plasmide mit Restriktionsenzymen (RFLP-Analyse) oder durch Sequenzierung beschrieben werden. Durch den Vergleich der so erhaltenen Sequenzen mit denjenigen bestehender Datenbanken (besonders umfangreich sind die Datenbanken ribosomaler Gene) kann die phylogenetische Position jedes Organismus, dessen DNA vervielfältigt und kloniert wurde, bestimmt werden.

RT-PCR: ein funktioneller Ansatz

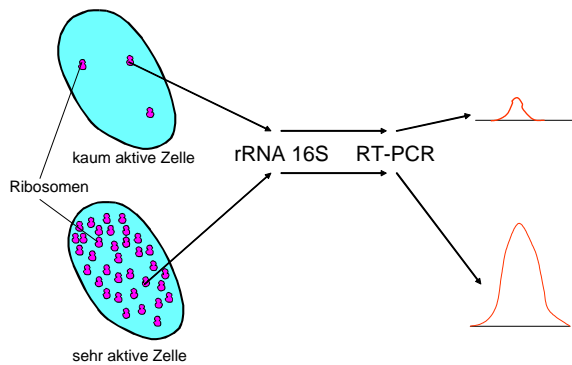


Abb. 6: RT-PCR mit ribosomaler RNA: Gewichtung aufgrund der Zellaktivität.

Über die Vervielfältigung eines Gens, das für eine bestimmte Funktion codiert, kann nachgewiesen werden, dass in der untersuchten Probe Organismen vorhanden sind, welche dieses Gen tragen. Dies bedeutet aber noch nicht, dass diese Organismen auch aktiv sind oder zum Zeitpunkt der Probenentnahme aktiv waren. Mit Hilfe der reversen Transkription (Reverse Transcription, RT), lässt sich eine funktionellere Dimension in die molekularbiologischen Untersuchungen einführen. Bei der RT wird der zur RNA komplementäre DNA-Strang (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase, einem aus RNA-Viren stammenden Enzym, synthetisiert. Anschliessend können die cDNA-Sequenzen oder bestimmte Abschnitte mittels PCR vervielfältigt werden. Diese Methode wird als RT-PCR bezeichnet.

Die RT-PCR lässt sich auf ribosomale RNA-Moleküle anwenden, anschliessend werden die Produkte mit Elektrophorese aufgetrennt. Im Unterschied zum Muster bei der Verwendung von DNA als Ausgangsmaterial (Abb. 6), widerspiegelt das Profil nun auch die Aktivität der Zellen, da diese den Gehalt an Ribosomen stark beeinflusst. Bei gleicher Dichte liefert eine sehr aktive Population bei einer Untersuchung mit

RT-PCR also viel stärkere entsprechende Banden (Abb. 7). Auf diese Weise lassen sich die aktivsten Populationen der Gesellschaft bestimmen.

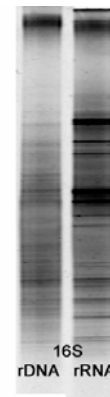


Abb. 7: Vergleich der Profile von Gesellschaften (Segment V₃ des Gens für die 16S-rRNA). Links: PCR ausgehend von der gesamten DNA einer Stichprobe. Rechts: RT-PCR ausgehend von der gesamten RNA derselben Stichprobe.

Voraussetzung für die enzymatische Aktivität ist, dass das entsprechende Gen durch ein molekulares Signal angeschaltet wird: Nun wird die Boten-RNA (messenger-RNA, mRNA) des betreffenden Gens synthetisiert (Transkription, Abb. 8). Ausgehend von der aus einer Probe extrahierten RNA kann also versucht werden, eine bestimmte Boten-RNA durch RT-PCR zu vervielfältigen. Wenn die Vervielfältigung gelingt, ist dies zwar noch kein Beweis, aber ein deutlicher Hinweis, dass das entsprechende Gen aktiviert worden war.

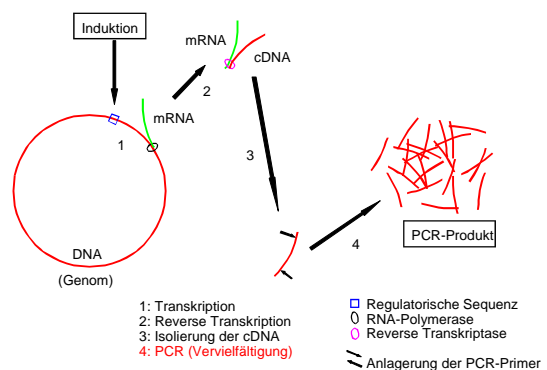


Abb. 8: Das Prinzip der RT-PCR.

Lassen sich die Bakteriengesellschaften mit molekularbiologischen Methoden treffend beschreiben?

Mit den molekularbiologischen Methoden lässt sich die Hürde der Kultivierbarkeit umgehen: Sie liefern Informationen zur Struktur der Gesell-

schaften und zur Position in der Stammesentwicklung jener 99% der Zellen der Stichprobe, die sich (gegenwärtig) nicht kultivieren lassen. Die Informationen bleiben aber lückenhaft. Im Rahmen der jüngsten Entwicklungen können die Funktionen von Organismen ohne Umweg über ihre Kultivierung erforscht werden. Es ist aber (noch?) nicht möglich, die vervielfältigten funktionellen Gene mit der phylogenetischen Position der entsprechenden Organismen in Verbindung zu bringen.

Die molekularbiologischen Methoden weisen ausserdem weitere Nachteile auf. Ein Problem stellt sich im Zusammenhang mit der Stichprobenauswahl. Selbst eine winzige Stichprobe reicht im Allgemeinen für eine PCR-Analyse aus. Dann ist die Untersuchung jedoch viel anfälliger auf Abweichungen, die sich aus der Heterogenität der Bodenprobe ergeben. Umgekehrt können mit einer umfangreichen Stichprobe feine Strukturunterschiede der Bakteriengesellschaften im Hinblick auf Aggregate und Mikrogradienten des Bodens und der Rhizosphäre nicht aufgelöst werden (Morris et al., 2002).

Die Extraktion der DNA aus der Bodenprobe und die DNA-Reinigung sind die kritischen Schritte der Analyse. Dazu müssen die Bakterienzellen „aufgeknackt“ werden. Da gewisse Bakterienzellen viel widerstandsfähiger als andere sind, kann der Erfolg der Extraktion stark von der Bakterienart abhängen. Die DNA eines zähen Organismus kann deshalb möglicherweise nur teilweise gewonnen werden, während die DNA empfindlicher Organismen bei der Extraktion beschädigt werden könnte. Ausserdem steht nicht sicher fest, dass die DNA aller Bakteriengruppen gleich effizient vervielfältigt wird. Bei der klassischen PCR kann nicht genau festgestellt werden, in welcher Menge das vervielfältigte Gen zu Beginn vorlag. Mit Methoden der quantitativen PCR gelingen hingegen recht zuverlässige Schätzungen.

Je kleiner die untersuchten Segmente, desto genauer lassen sich die Profile der Gesellschaften auflösen. Mit zu kurzen Segmenten können aber nicht ausreichende Informationen für eine genaue phylogenetische Analyse gewonnen werden.

Schliesslich werden mit den Profilen der Gesellschaften nur die vorherrschenden Populationen erfasst, die im Allgemeinen gerade 0.1 bis 1 % der gesamten Gesellschaft darstellen. Weniger

stark vertretene Populationen lassen sich allerdings erfassen, wenn Primer eingesetzt werden, die selektiv für die entsprechende Bakteriengruppe sind. So wären zum Beispiel *Pseudomonas*-Populationen nicht in einem „universellen“ Profil vertreten, sondern nur in einem Profil, das sich auf gramnegative Proteobakterien beschränkt, sofern sie bezogen auf diese Gruppe mindestens einen Anteil von 0.1 - 1% stellen.

Einige Beispiele von Studien auf der Basis molekularbiologischer Methoden

a) Einfluss der Nähe der Wurzel auf die Vielfalt der Bakterien

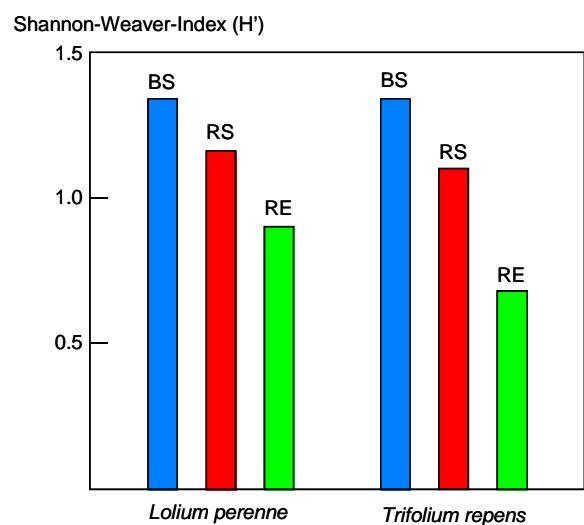


Abb. 9: Abnahme der Vielfalt der Bakteriengesellschaften mit zunehmender Nähe zur Wurzel (BS: entfernter Boden; RS: Boden der Rhizosphäre; RE: gewaschene Wurzeln, Endophyten).

Lebende Pflanzenwurzeln scheiden organische Stoffe in den umgebenden Boden in einem Ausmass aus, das sich mit der in ihrer Biomasse gebundenen Menge vergleichen lässt. Es wurde lange angenommen, dass dieses «Manna» in der Rhizosphäre zu einer Zunahme der bakteriellen Vielfalt in der unmittelbaren Nachbarschaft der Wurzel führt. Das trifft nicht zu. In einer Studie über die bakterielle Vielfalt im Wurzelwerk von Englischem Raygras (*Lolium perenne*) und Weissklee (*Trifolium repens*) wurde bei der Untersuchung der gesamten Bakteriengesellschaft durch Klonierung festgestellt, dass die Vielfalt vom entfernteren Boden über den Boden der Rhizosphäre bis zur Rhizoplane (Wurzeloberfläche) bzw. der Endorhizosphäre (dem endophytischen Bereich innerhalb des Wurzelgewebes) deutlich abnimmt (Abb. 9, Marilley et

al, 1997). Die Charakterisierung der Klone durch Sequenzierung ergab ausserdem, dass bestimmte Bakteriengruppen durch die Nähe von Wurzeln begünstigt werden, während andere bevorzugt in weiter entferntem Boden zu finden sind (Abb. 10, Marilley et al, 1998).

% der Bakteriengesellschaft

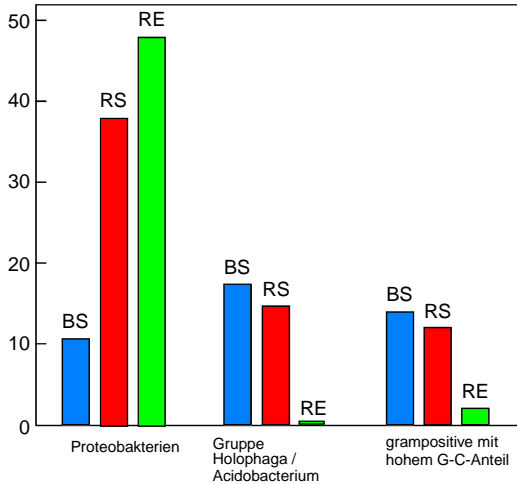


Abb. 10: Verteilung der Bakteriengruppen in Abhängigkeit von der Nähe zur Wurzel.

b) Nachweis von stickstofffixierenden Bakterienpopulationen

Die in der Rhizosphäre herrschenden Bedingungen (niedrige Sauerstoffkonzentration, Überfluss energiereicher Nährstoffe, gewöhnlich wenig verfügbarer Stickstoff) begünstigen das Wachstum stickstofffixierender Bakterien. Dennoch ist die Bedeutung dieser symbiotischen Stickstoff-Fixierung besonders im Zusammenhang mit landwirtschaftlich geprägten Ökosystemen nicht unumstritten. *Molinia coerulea*, ein in Moorböden häufiges Gras, entwickelt sich aussergewöhnlich gut auf extrem stickstoffarmen Böden, wie sie am Südufer des Neuenburgersees auftreten. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die symbiotische Stickstoff-Fixierung für diese Pflanze sehr wichtig ist. Tatsächlich wurden Stickstoff-fixierende Bakterien bei einer entsprechenden Untersuchung des wurzelnahen Bodens nachgewiesen (Hamelin et al., 2002). Dazu wurde mit PCR das Gen vervielfältigt (*nifH*), dessen Produkt, das Enzym Dinitrogenase-Reduktase, allen Stickstoff-fixierenden Bakterien gemeinsam ist. Die meisten isolierten Klone liessen sich auf Grund der sehr ähnlichen Sequenz zu einer Gruppe zusammenfassen, die aber keinem bisher bekannten und kultivierten Organismus zugeordnet werden konnte. Deshalb wären sie in

einer Studie zur Isolierung von Bakterien nicht erfasst worden. Diese Gruppe ist sowohl in der Wurzel selbst, als auch im den Wurzeln anhaftenden Boden und im entfernteren Boden zahlreich vertreten. Eine Untersuchung hinsichtlich der Boten-RNA des Gens *nifH* mittels RT-PCR ergab jedoch, dass das Gen nur in Bakterien aktiviert ist, die im Wurzelgewebe leben. Daraus lässt sich schliessen, dass zur Auslösung der Stickstofffixierung der enge Kontakt mit der Wurzel erforderlich ist. Der Boden dient also nur als Reservoir für Organismen, die zwar zur Stickstofffixierung fähig, aber nicht aktiv sind.

c) Einfluss des Entwicklungsstadiums der Wurzel auf die Bakteriengesellschaft

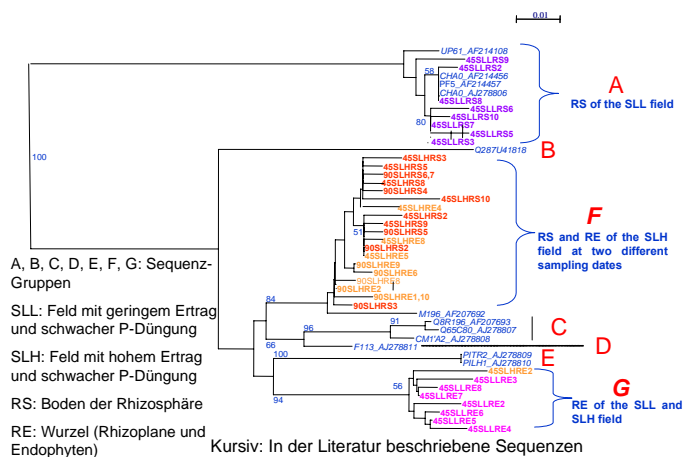


Abb. 11: Polymorphismus von *phnD*-Sequenzen der DNA im Boden von Weizenkulturen in Bhavanipur (Utar Pradesh, Indien).

Die Aktivität der Wurzel verändert sich im Laufe ihrer Entwicklung und folglich entlang ihrer Achse. Der junge Bereich einer Wurzel gibt in ihrer Streckungszone die grösste Menge löslicher organischer Verbindungen an die Umgebung ab, während ältere Zonen durch eine Autolyse von Rindengewebe geprägt sind. Ein besonderer Fall ist die Entwicklung von Proteoidwurzeln gewisser Pflanzengruppen (die keine Mykorrhiza-Symbiosen eingehen) bei Phosphatmangel. Ein Beispiel dafür ist die Weisse Lupine, *Lupinus albus*, die im Reifestadium eine Fülle von Wurzelzellen bildet, die in bis zu tausendfach erhöhten Konzentrationen Citrat und Protonen abgeben und damit einerseits durch Ansäuerung und andererseits durch Komplexbildung mit Eisen die Löslichkeit des vorhandenen Phosphats erhöhen. Diese starke Sekretion dauert nur einige Tage. Die Entwicklung der Bakteriengesellschaften in der Umgebung dieser Wurzeln verläuft entsprechend (Abb. 11). Insbesondere im reifen Stadium wird

ein starker Selektionsdruck auf die Gesellschaften ausgeübt, der mit der Alterung dieser Strukturen nachlässt (Weisskopf et al., eingereicht).

d) Einfluss landwirtschaftlicher Anbaumethoden auf spezifische Populationen

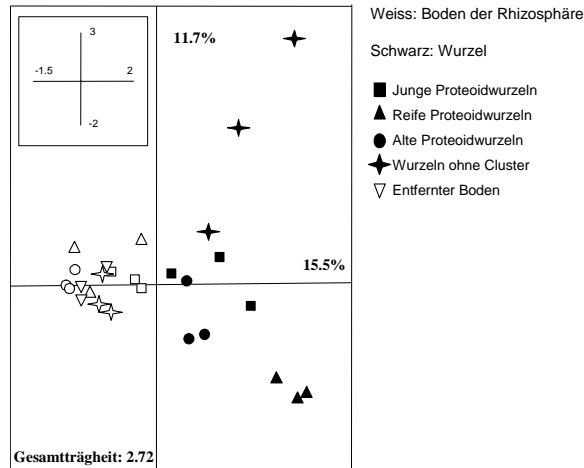


Abb. 12: Einfluss der Art der Wurzel und des Entwicklungsstadiums der Proteoidwurzeln auf die Struktur der Bakteriengesellschaften des Bodens und der Wurzel bei *Lupinus albus*. Korrespondenzanalyse. Nach Weisskopf et al. (eingereicht).

Bestimmte Bakterien der Rhizosphäre schützen die Pflanzenwurzeln vor pathogenen Pilzen. Einige produzieren wachstumshemmende Stoffe wie 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) gegen solche Parasiten. An der Synthese dieser Verbindung ist eine Reihe von Enzymen beteiligt, die durch die *phl*-Gene codiert werden. Das Gen *phlD* wird oft für den Nachweis dieser Synthese verwendet. Es wurden bereits mehrere «Familien» von Sequenzen des Gens *phlD* bei verschiedenen Bakterien beschrieben, von denen die meisten zur Gruppe fluoreszierender *Pseudomonas*-Bakterien gehören. In einer Studie von Bakteriengesellschaften von Weizenkulturen in der Ganges-Ebene in Indien untersuchten wir das Vorkommen von DAPG-produzierenden Bakterien ausgehend von aus dem Boden und den Wurzeln extrahierter DNA durch Vervielfältigung des *phlD*-Gens mit PCR. Wir konnten so verschiedene Familien von *phlD*-Sequenzen in Abhängigkeit der Bodenqualität (hoher oder schwacher Ertrag), der Anbaumethode (starke oder schwache Düngung) und der Nähe zur Wurzel nachweisen (Abb. 12, Shani, Imfeld und Roesti, pers. Mitteilung).

Aussichten für die Bodenbiologie

Die Eroberung der mikrobiologischen Bodenökologie durch molekularbiologische Methoden im vergangenen Jahrzehnt hat zu einem Paradigmenwechsel in der Bodenbiologie geführt. Bisher konzentrierte sich die Grundlagenforschung auf der Basis weniger Modelle auf die Entwicklung immer zuverlässigerer und leistungsfähigerer Methoden. Selbst wenn der Einbezug neuer Methoden auch in Zukunft nicht ganz vernachlässigt werden soll, ist die Zeit nun wahrscheinlich reif dazu, diese Ansätze in der Praxis der beschreibenden und vergleichenden Bodenkunde umzusetzen. Methoden zum Erfassen von Profilen von Gesellschaften bieten zusammen mit leistungsfähigen statistischen Werkzeugen und Diversitätsindizes ein viel versprechendes Instrument, das die klassischen Methoden der beschreibenden Bodenkunde, die organischen und anorganischen Bodenanalysen und die Untersuchungen der Bodenfauna- und -flora sinnvoll ergänzt (Gobat et al., 2003, 2004). Ein weiteres Fenster öffnet sich mit den funktionellen Untersuchungen zur Erforschung biologischer Vorgänge im Boden durch molekularbiologische Methoden. Diese neuen molekularbiologischen Methoden ersetzen die klassischen Techniken der Bodenkunde nicht, sondern ergänzen diese sehr effizient. Dazu müssen aber umfangreiche Datenbanken erstellt werden, um die Daten der molekularbiologischen Ökologie zur Beschreibung der Böden zu nutzen. Das hat allerdings seinen Preis: Molekularbiologische Methoden sind relativ kostspielig. Es ist deshalb zu hoffen, dass die Politik nicht nur sehr zielgerichtete Forschung begünstigt. Diese ist zwar zweifellos unentbehrlich, jedoch nur einer Flucht nach vorne, wenn sie nicht durch eine «horizontale» Forschung getragen wird, wie dies bei der Beobachtung der Umwelt der Fall ist. Die Umweltbeobachtung bildet das Fundament der gesamten Forschung und rechtfertigt diese letztlich.

Amann, R I, Ludwig, W, Schleifer, K-H 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti, D, Jourdain-Miserez, K, Forestier, N, Teyssier-Cuvelle, S, Gillet, F, Aragno, M, Rossi, P 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol*, **4**, 634-643.

Gobat, J.-M, Aragno, M, Matthey, W 2003. *Le Sol Vivant*, 2^e éd. 568 pp. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

- Gobat, J.-M, Aragno, M, Matthey, W 2004. The Living Soil. 550 pp. Science Publishers Inc. New-York, Delhi.
- Hamelin, J, Fromin, N, Tarnawski, S, Teyssier-Cuvette, S, Aragno, M 2002. *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligotrophic perennial grass. *Environ Microbiol.* **8**: 477-481
- Hamelin J, Poly F, Besson O, Fall S, Brauman A, Tarnawski S, Aragno M, Fromin N. (submitted) From microbial community barcode to genetic heterogeneity indices. *Molecular Ecology*
- Laczko, E 1994. Neue Ansätze zur Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden: die Phospholipidfettsäuren-Analyse und ihre Anwendung. *Bull Bodenkundl Ges Schweiz* **18**: 23-28
- Maire, N 1984. Extraction de l'adénosine triphosphate dans les sols: une nouvelle méthode de calcul des pertes en ATP. *Soil Biol Biochem* **16**: 361-366
- Maire, N 1987. Evaluation de la vie microbienne dans les sols par un système d'analyses biochimiques standardisé. *Soil Biol Biochem* **19**: 491-500
- Marilley, L, Vogt, G, and Aragno, M 1997. Diversité bactérienne en fonction de la proximité aux racines de deux plantes de prairie par analyse de profils de restriction d'une bibliothèque de gènes rADN 16S. *Bull Soc Suisse Pédologie* **21**:59-64.
- Marilley, L, Vogt, G, Blanc, M., Aragno, M 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR analysis of 16s rDNA. *Plant Soil* **198**: 219-224
- Morris, CE, Bardin, M, Berge, O, Frey-Klett, P, Fromin, N, Girardin, H, Guinebretière, MH, Lebaron, Ph, Thiéry, JM, Trousselier, M 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 592 - 616
- Voroney, RP, Paul, EA 1984. Determination of Kc and Kn *in situ* for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biol Biochem* **16**: 9-14
- Weisskopf, L, Fromin, N, Tomasi, N, Aragno, M, Martinoia, E (submitted) Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant Soil*

4.3. Die Entwicklung der bodenbiologischen Kenngrößen der freiburgischen Landwirtschaftsböden

N. Rossier und J. Dessurault,
Institut agricole de l'Etat de Fribourg,
Grangeneuve, 1725 Posieux
E-mail:rossiern@fr.ch

Mit Hilfe des FRIBO werden pedologische, agronomische und andere umweltrelevante Informationen der freiburgischen Landwirtschaftsböden gesammelt. Damit lassen sich die Entwicklung der Bodenfruchtbarkeit und mögliche Ursachen für deren Veränderungen feststellen.

Die 250 Standorte des FRIBO decken fast 100'000 ha Land ab (~76'500 ha landwirtschaftliche Nutzfläche und ~20'500 ha Alpweiden) und repräsentieren somit die gesamte landwirtschaftlich genutzte Fläche des Kantons Freiburg. Jährlich werden 50 Standorte beprobt. Jeder einzelne Standort wird also alle fünf Jahre einmal untersucht, was jeweils einen Zyklus ergibt. Im Jahre 2001 konnte der dritte Zyklus abgeschlossen werden. Dies erlaubt uns, nach 15 Jahren Analysen erste Aussagen über die Entwicklung verschiedener physikalischer, chemischer und biologischer Bodenkenngrossen zu machen. Die Entwicklung der verschiedenen Parameter wird innerhalb der drei Bewirtschaftungstypen der Standorte, nämlich Ackerfläche, Dauerwiesen und Alpweiden aufgezeigt.

Die Auswertung der bodenbiologischen Resultate der ersten drei Zyklen (1987 – 2001) sollen im vorliegenden Bericht präsentiert und diskutiert werden. Es wurden zwei bodenbiologische Kennziffern erhoben: Messung der Biomasse ATP und die Atmungsaktivität des Bodens. Mit Hilfe dieser Messungen konnte die org. Kohlenstoffmineralisierung, die biologische Reaktivität und das Verhältnis CO₂/ATP berechnet werden.

Die 250 FRIBO-Standorte sind in zwei einheitliche Kategorien zusammengefasst worden, um die Gültigkeit der statistischen Interpretationen zu erhöhen. Die erste Klassifizierung wurde nach dem Kriterium der Bodenbewirtschaftung (Ackerbau, Dauerwiese oder Alpweide) durchgeführt. Dies erlaubt uns, den Einfluss der landwirtschaftlichen Bodenbearbeitung abzuschätzen. Für die zweite Kategorie hat eine statistische Analyse der Daten (Faktorenanalyse) die Austauschfähigkeit der Kationen (KAK-Klassen 1 bis 5 gemäss dem Gehalt der Ton-Humus-Komplexe des Bodens) als zweites Kriterium ergeben. Dieser chemische Parameter erklärt grösstenteils das Systemverhalten des Bodens.

Die Analyse der biologischen Resultate des FRIBO ist zunächst mit Hilfe einer Studie über die Wechselbeziehungen der gemessenen Parameter erfolgt. Diese Untersuchung hat gezeigt, dass die biologischen Parameter stark mit der KAK, dem Gehalt an Humus und Ton, dem Bodentyp sowie mit einigen Spurenelementen korreliert. Außerdem beeinflussen die Bodenbewirtschaftung und die Höhe über Meer wesentlich die biologischen Parameter der freiburgischen Landwirtschaftsböden.

Die statistische Auswertung mit Hilfe von Box-Plots und dem Vergleich der Mittelwerte (LSD-Test) zeigt statistisch gesicherte Unterschiede aller biologischen Kenngrößen zwischen den drei Bewirtschaftungstypen. Alle biologischen

Kenngrößen nehmen in der Reihenfolge Ackerfläche → Dauerwiese → Alpweide zu. Einzige Ausnahme bildet die biologische Reaktivität; sie ist stark an den Kalkgehalt des Bodens gebunden (Tab. 3).

Tab. 3: Mittelwerte der drei Zyklen aller biologischen Kenngrößen.

Parameter	Bodenbewirtschaftung		
	Ackerflächen	Dauerwiesen	Alpweiden
Biomasse ATP [ng/g]*	1140	2264	3292
Atmungsaktivität [$\mu\text{g CO}_2/\text{g/Std}$]*	4.3	8.5	12.7
Org. Kohlenstoffmineralisierung [$\mu\text{g MO/g/15 Tage}$]*	703	1616	2928
Biologische Reaktivität [%]*	110	91	64
Verhältnis CO_2/ATP *	4.7	5.7	7.4

* Signifikante Unterschiede gemäss LSD-Test

Die Beobachtungen stimmen mit dem bereits beobachteten Nord-Süd Gradient des Kantons Freiburgs überein (Julien et al. 2002). Im Norden finden sich mehrheitlich Ackerflächen mit leichten Böden, im Süden Alpweiden mit hohem Tongehalt. Der gleiche Gradient liegt auch für den Humusgehalt, und die KAK vor. Die enge Wechselbeziehung der Bodenbiologie mit

diesen Kenngrößen ergibt ebenfalls einen Anstieg der biologischen Aktivität gemäss dem Nord-Süd Gradient.

Je grösser die KAK, umso höher sind auch die Biomasse ATP, die Atmungsaktivität und die organische Kohlenstoffmineralisierung. Dies entspricht den berechneten Korrelationen.

Tab. 4: Mittelwerte der drei Zyklen aller biologischen Kenngrößen gemäss den KAK-Klassen.

Parameter	KAK-Klassen (meq/100g)				
	Klasse 1 (< 12.0)	Klasse 2 (12.0-15.9)	Klasse 3 (16.0-20.9)	Klasse 4 (21.0-25.9)	Klasse 5 (≥ 26.0)
Biomasse ATP[ng/g]*	752	1162	1706	2436	3500
Atmungsaktivität [$\mu\text{g CO}_2/\text{g/Std}$]*	3	4.6	7.2	9.7	11.5
Org. Kohlenstoffmineralisierung [$\mu\text{g MO/g/15 Tage}$]*	493	766	1213	1941	2682
Biologische Reaktivität [%]*	115	105	107	82	77
Verhältnis CO_2/ATP *	4.9	4.9	5.4	6.3	6.0

* Signifikante Unterschiede gemäss LSD-Test

Die Entwicklung der biologischen Kenngrößen der freiburgischen Landwirtschaftsböden blieb während der 15jährigen Untersuchungszeit stabil. Zwischen den einzelnen Standorten zeigen sich jedoch grosse Unterschiede der "biologischen Qualität" der Böden.

Um die analysierten Werte interpretieren zu können ist eine Klassifikationstabelle mit Hilfe der FRIBO-Daten erarbeitet worden (Tab. 4). Diese Tabelle basiert auf statistischen Grundlagen für jede ausgewählte Kenngrösse (Biomasse ATP, Atmungsaktivität, organische Kohlenstoff-Mineralisierung und dem Verhältnis CO_2/ATP). Mit Hilfe der beiden, zur Analyse der Resultate gebildeten Klassen (Bodenbewirtschaftung und KAK), wurde eine Interpretationstabelle erstellt. Die klassierten Ergebnisse sind mit einer beschreibenden Statistik interpre-

tiert worden, um damit die Quantile von 10 und 90% sowie die Quartile von 25 und 75% bestimmen zu können. Die bodenbiologischen Kenngrößen der FRIBO-Standorte wurden anschliessend der Interpretationstabelle zugeteilt. Gemäss dieser weisen 15 bis 25% der FRIBO-Standorte eine oder mehrere ungenügende oder mässige biologische Kennziffern auf.

Bei den Ackerflächen ist dies auf einen tiefen Humusgehalt und auf fehlende Kunstwiesen zurückzuführen. Die Beibehaltung von Kunstwiesen in der Fruchtfolge erweist sich als gutes Mittel zur Erhaltung oder Verbesserung der Bodenqualität (physikalisch, chemisch und biologisch). Probleme bei den Naturwiesen sind der tiefe pH-Wert, der Salzgehalt und die übermässige Beigabe von organischem Material (Überweidung). Hier sind Verbesserungen durch

Aufkalken, Entwässerung und ein besseres Hofdüngermanagement möglich.

Die Gründe für ungenügende oder mässige biologische Kennziffern der Alpweiden liegen bei der Bodenverdichtung sowie den schweren und sauren Böden. Eine Drainierung und eine Aufkalkung können hier ebenfalls als Verbesserungsmöglichkeit erwähnt werden. Auf den Alpweiden sind solche jedoch oft sehr schwierig und zur Erhaltung der Biodiversität auch nicht erwünscht.

Der vorliegende Bericht zeigt die zentrale Rolle des "Bodenlebens" zur Erhaltung eines fruchtbaren und gesunden Landwirtschaftsbodens.

Trotz des Systems zur Beprobung welches jährlich über eine Zeitspanne von mehreren Monaten verteilt ist und keine Wiederholungen beinhaltet, wird die Streuung der Resultate durch die grosse Anzahl Stichproben und die statistische Interpretation abgedeckt.

Betrachten wir die stabile Entwicklung der bodenbiologischen Kenngrössen in Bezug auf die unterschiedlichen Werte je nach Bodenbewirtschaftung (Ackerfläche, Dauerwiese und Alpweiden) so können wir ohne weiteres behaupten, dass diese "biologische" Methode sich für die langfristige Bodenbeobachtung gut eignet.

Rossier, N et Dessureault, J., 2004: Evolution des paramètres biologiques des sol agricoles fribourgeois. *Revue Suisse Agric* **36** (2): 77-82.

Impressum VBB-Bulletin Nr. 8/2004

Herausgeberin

VBB (Arbeitsgruppe Vollzug BodenBiologie)

Die kantonale Bodenschutzfachstellen und das Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL) haben die Arbeitsgruppe VBB 1995 gegründet. Diese widmet sich Fragen zur Bodenbiologie im Hinblick auf den Vollzug des Bodenschutzes und die Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit nach der Verordnung über die Belastung des Bodens (VBBo).

Vorsitzender seit 2003

Guido Schmid

Amt für Umweltschutz

Lämmlibrunnenstrasse 54

CH – 9001 St. Gallen

Tel. 071 229 24 10

E-Mail: guido.schmid@sg.ch

Sekretariat und Bezug

Dr. Paul Mäder

Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL)

Ackerstrasse

Postfach

CH – 5070 Frick

Tel. 062 865 72 32

Fax 062 865 72 73

E-Mail: paul.maeder@fibl.ch

Das Bulletin ist auch auf Internet verfügbar unter:

Deutsch:

http://www.umwelt-schweiz.ch/buwal/de/fachgebiete/fg_boden/info/biologiesols

Französisch:

http://www.environnement-suisse.ch/buwal/fr/fachgebiete/fg_boden/info/biologiesols