

**Mikrobieller Metabolismus von 2,4-Dichlorphenol in der
Drilosphäre und Einfluss auf die N₂O-Bildung:**

Verknüpfung von Prozessen mit Populationen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Anja Dallinger

Bayreuth, im August 2015

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Juli 2008 bis Oktober 2011 am Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von PD Dr. Marcus A. Horn durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fördernummer: DFG HO 4020/1-1) sowie ein Stipendium der Frauenförderung der Universität Bayreuth (Aktenzeichen: A 4515-I/3).

Das Projekt fand im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP 1315 „Biogeochemical Interfaces in Soils“ statt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 13.08.2015

Zulassung durch die Promotionskommission: 26.08.2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 14.12.2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Marcus Horn (Erstgutachter)

Prof. Dr. Dirk Schüler (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Konrad Dettner (Vorsitz)

Prof. Dr. Egbert Matzner

- Für meine Frechdachse -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen, Tabellen & Gleichungen.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIX
1. Einleitung	1
1.1. 2,4-Dichlorphenol – Bildung und Schicksal in der Umwelt	1
1.1.1. Eigenschaften von Chlorphenolen	1
1.1.2. Ökologische Relevanz von 2,4-DCP	3
1.1.3. Abbau und Transformation von 2,4-DCP.....	4
1.2. Regenwürmer – Lebensweise und Einfluss auf ihre Umwelt.....	10
1.2.1. Habitate und ökologische Gruppen.....	10
1.2.2. Ökologische Relevanz	11
1.2.3. Verdauungssystem	12
1.2.4. Einfluss auf das Schicksal von Xenobiotika.....	14
1.3. N₂O – ein klimarelevantes Spurengas	17
1.3.1. N ₂ O-bildende Prozesse	17
1.3.1.1. Nitrifikation	18
1.3.1.2. Denitrifikation.....	19
1.3.1.3. „Nitrifikanten“ Denitrifikation	21
1.3.1.4. Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium.....	22
1.3.2. Einfluss von Regenwürmern auf die N ₂ O-Bildung	22
1.3.3. Einfluss von Xenobiotika auf die N ₂ O-Bildung	23
1.4. Zielstellung & Hypothesen	24
2. Material & Methoden	26
2.1. Untersuchungsstandorte und Regenwürmer.....	26
2.1.1. Boden	26
2.1.2. Regenwürmer.....	27
2.2. Analytische Methoden.....	27
2.2.1. Extraktion von 2,4-DCP	27
2.2.2. Trockengewicht und Wassergehalt.....	28
2.2.3. Bestimmung des pH-Wertes	28
2.2.4. Gaschromatographische Messungen.....	29
2.2.5. Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Messungen (HPLC).....	31
2.2.6. Colorimetrische Messungen	32
2.2.6.1. Ammonium	32
2.2.6.2. Eisen (II)	32
2.2.6.3. Nitrat	33
2.2.6.4. Nitrit.....	33
2.2.6.5. Sulfat.....	33

2.3. Nährmedien und Kultivierungstechniken	33
2.3.1. Flüssigmedien.....	34
2.3.1.1. Oxische Flüssigmedien	34
2.3.1.2. Anoxische Flüssigmedien	35
2.3.2. Stammlösungen	37
2.3.3. Festmedien	37
2.3.3.1. Oxische Festmedien	37
2.3.3.2. Anoxisches Festmedium	38
2.4. Inkubationsversuche	39
2.4.1. Abbau von 2,4-DCP in Bodensäulen	39
2.4.2. Abbau von 2,4-DCP in Mikrokosmen.....	40
2.4.2.1. Aerober und anaerober Abbau in Bodenaufschlämungen	40
2.4.2.2. Aerober Abbau in vorbehandelten Regenwurm- und Bodenproben	41
2.4.3. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP.....	43
2.4.3.1. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP in vorbehandelten Regenwurm- und Bodenproben	43
2.4.3.2. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP in feldfrischem Boden mit und ohne Regenwurm	43
2.4.3.3. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP in Regenwurmgewebe.....	44
2.4.3.4. ¹⁴ CO ₂ -Probennahme und Messung.....	45
2.4.3.5. ¹⁴ C-Wiederfindung in den Inkubationsansätzen	46
2.4.4. N ₂ O-Bildung in Bodensäulen.....	47
2.5. Mikrobiologische Methoden	48
2.5.1. Stammhaltung und Kultivierung von <i>Cupriavidus necator</i> JMP134.....	48
2.5.2. Isolierung & Charakterisierung 2,4-DCP-abbauender Bakterien	48
2.5.2.1. Anreicherung von 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen.....	48
2.5.2.2. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP durch ausgewählte Isolate	50
2.5.2.3. 2,4-DCP Toleranz- und Toxizitätstest.....	51
2.5.3. Lebend-Keimzahlbestimmung	51
2.5.3.1. 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen	51
2.5.3.2. Denitrifikanten	52
2.6. Molekularbiologische Methoden	52
2.6.1. Extraktion von DNA und RNA.....	53
2.6.2. Enzymatische Auftrennung von DNA und RNA.....	54
2.6.3. Präzipitation von Nukleinsäuren	54
2.6.4. Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	54
2.6.4.1. Spektralphotometrie	54
2.6.4.2. Fluoreszenz-basierende Quantifizierung.....	55
2.6.5. Stabile Isotopenbeprobung (RNA-SIP).....	55
2.6.5.1. Allgemeine Vorbereitungen	58
2.6.5.2. Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation.....	58
2.6.5.3. Fraktionierung	59
2.6.5.4. Bestimmung der Schwebdichte	59
2.6.5.5. Präzipitation der RNA.....	60
2.6.6. Reverse Transkription	60
2.6.7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	61

2.6.7.1.	Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von 16S rRNA Genen	61
2.6.7.2.	Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von <i>tfdB</i> -, <i>tfdC</i> - und <i>pheA</i> -Genen	63
2.6.7.3.	Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von <i>narG</i> -, <i>nirK</i> -, <i>nirS</i> -, <i>nosZ</i> - sowie <i>amoA</i> -Genen	65
2.6.7.4.	M13-Kontroll-PCR	68
2.6.8.	Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	69
2.6.8.1.	Herstellung von qPCR Standards	70
2.6.8.2.	qPCR Primer und Protokolle	70
2.6.8.3.	Inhibitionskontrollen.....	73
2.6.8.4.	Relative Genhäufigkeit	74
2.6.8.5.	Überprüfung der qPCR Ergebnisse.....	74
2.6.9.	Agarose-Gelelektrophorese	75
2.6.10.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	76
2.6.10.1.	Aufreinigung mit MinElute™.....	76
2.6.10.2.	Aufreinigung mit Filterplatten	76
2.6.10.3.	Aufreinigung durch Gelextraktion.....	76
2.6.11.	Klonierung	77
2.6.11.1.	Ligation	77
2.6.11.2.	Transformation.....	78
2.6.11.3.	Auswahl repräsentativer Klone („Blau-Weiß-Screening“).	79
2.6.12.	Sequenzierung.....	79
2.6.13.	Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (TRFLP) Analyse	79
2.6.13.1.	Markierung mit fluoreszenzmarkiertem Primer	80
2.6.13.2.	Mung Bean Endonuklease-Verdau	80
2.6.13.3.	Restriktionsverdau	80
2.6.13.4.	Denaturierende Polyamidacryl Gelelektrophorese (PAGE).....	81
2.6.14.	Pyrosequenzierung.....	82
2.6.14.1.	Aufbereitung der PCR-Produkte.....	83
2.6.14.2.	Ligation der Adapter und Pyrosequenzierung	84
2.6.15.	Sequenzanalysen.....	84
2.6.15.1.	Bereinigung des Sequenzdatensatzes aus der Pyrosequenzierung.....	84
2.6.15.2.	Sequenzen aus Genbibliotheken und isolierten Bakterien.....	85
2.6.15.3.	Berechnung eines Datensatz-basierten Grenzwertes zur Differenzierung von OTUs	86
2.6.16.	Stammbaumberechnungen.....	86
2.6.17.	Auswertung der Genbibliotheken	87
2.6.17.1.	Rarefaction-Analyse	87
2.6.17.2.	Diversitätsindizes und Coverage	87
2.6.18.	Sequenzhinterlegung.....	90
2.7.	Statistik.....	90
2.7.1.	Mittelwert und Standardabweichung	91
2.7.2.	Zu sichernde Differenz	91
2.8.	Verwendete Chemikalien und Gase	91
3.	Ergebnisse	92

3.1. 2,4-DCP Abbaupotential von feldfrischem Boden.....	92
3.1.1. Aerober 2,4-DCP Abbau in Bodenaufschlammungen	92
3.1.2. Anaerober 2,4-DCP Abbau in Bodenaufschlammungen	94
3.2. Einfluss von <i>Aporrectodea caliginosa</i> auf die Abnahme von 2,4-DCP in Boden und Drilosphäre	98
3.2.1. Abbau von 2,4-DCP in Bodensäulen	98
3.2.2. Abbau von 2,4-DCP in vorbehandelten Boden- und Drilosphärenproben.....	99
3.2.2.1. Abbau von 2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen	99
3.2.2.2. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen	100
3.2.3. Einfluss von <i>Aporrectodea caliginosa</i> auf die Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP in feldfrischem Boden	103
3.2.4. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP im Regenwurmgewebe.....	105
3.3. Potentiell 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen.....	106
3.3.1. Anreicherung, phylogenetische Analyse und Charakterisierung	106
3.3.1.1. Isolierung potentiell 2,4-DCP-verwertender Mikroorganismen ..	106
3.3.1.2. Untersuchung der 2,4-DCP-Toleranz von Isolat AR-200.....	108
3.3.1.3. Mineralisierung von [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP durch ausgesuchte Reinkulturen	109
3.3.2. Kultivierungsunabhängige Genmarkeranalyse der 2,4-DCP- und Phenol-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft	111
3.3.2.1. Phylogenetische Analyse der detektierten <i>tfdB</i> -Sequenzen mittels Pyrosequenzierung	111
3.3.2.2. Phylogenetische Analyse der detektierten <i>tfdB</i> - und <i>pheA</i> -Sequenzen mittels Genbibliotheken	121
3.3.3. Quantifizierung 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen.....	135
3.3.3.1. Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Anzahl kultivierbarer 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen.....	135
3.3.3.2. Einfluss von <i>A. caliginosa</i> und 2,4-DCP auf die Abundanz der strukturellen Gene <i>tfdB</i> , <i>tfdC</i> und <i>pheA</i>	139
3.4. Identifizierung 2,4-DCP-[¹³C]-verwertender Bacteria in Drilosphären- und Bodenmaterial mit Hilfe des 16S rRNA basierten Stablen-Isotopenversuches	147
3.4.1. Abbau von [¹² C]- und [¹³ C]-2,4-DCP in Bodensäulen.....	147
3.4.2. Abbau von [¹² C]- und [¹³ C]-2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen.....	148
3.4.3. Dichtegradientenzentrifugation	149
3.4.4. RNA Verteilung entlang des Dichtegradienten.....	150
3.4.5. TRFLP-Analyse	151
3.4.6. Erstellung der 16S rRNA Amplikon-Genbibliotheken	152
3.4.7. Pyrosequenzierungs-basierende Gradientenanalyse	153
3.4.8. Quantitative und qualitative Analyse der Amplikon-Genbibliotheken	155
3.4.8.1. Rarefaction-Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen	155
3.4.8.2. Mikrobielle Diversität	156
3.4.8.3. Phylogenetische Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen.....	161

3.5.	Einfluss von <i>A. caliginosa</i> und 2,4-DCP auf Denitrifizierer und Nitrifizierer im landwirtschaftlichen Boden.....	206
3.5.1.	Einfluss von <i>A. caliginosa</i> und 2,4-DCP auf die N ₂ O-Bildung in Bodensäulen.....	206
3.5.2.	Quantifizierung denitrifizierender und nitrifizierender Mikroorganismen.....	209
3.5.2.1.	Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Anzahl kultivierbarer Denitrifizierer.....	209
3.5.2.2.	Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Abundanz von Denitrifikations- und Nitrifikations-assoziierten Genen in Drilosphäre und Boden.....	211
3.5.3.	Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Diversität von Denitrifizierern.....	217
4.	Diskussion.....	221
4.1.	Aerober und anaerober Abbau von 2,4-DCP im Boden und in der Drilosphäre.....	221
4.2.	Aktive 2,4-DCP-[C]-assimilierende mikrobielle Gemeinschaft	226
4.2.1.	„Cross-Feeding“ – Limitation oder neue Möglichkeiten?.....	226
4.2.2.	Metabolisch aktive 2,4-DCP-verwertende <i>Bacteria</i> im Boden und der Drilosphäre.....	227
4.3.	Diversität und Abundanz potentiell 2,4-DCP-verwertender Bakterien.....	232
4.3.1.	Kultivierungsabhängige Analyse 2,4-DCP tolerierender oder potentiell abbauender Bakterien.....	232
4.3.2.	Kultivierungsunabhängige Analyse potentiell 2,4-DCP-abbauender Bakterien.....	235
4.3.3.	Abundanzen potentiell 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen.....	240
4.4.	Mikrobielle 2,4-DCP-abbauende Gemeinschaft – Vergleich der angewandten Methoden.....	243
4.5.	Einfluss von <i>A. caliginosa</i> und 2,4-DCP auf die N₂O-Bildung und die assoziierte mikrobielle Gemeinschaft.....	245
4.6.	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	251
5.	Zusammenfassung.....	254
6.	Summary.....	257
7.	Literaturverzeichnis.....	260
8.	Anhang.....	311
8.1.	Abbildungen.....	311
8.2.	Tabellen.....	315

9.	Publikationen	327
10.	Dankeschön!	329
11.	Erklärung	330

Abbildungen, Tabellen & Gleichungen

Abbildung 1:	Abbau von 2,4-DCP über den modifizierten <i>ortho</i> -Weg durch aerobe Bakterien, modifiziert nach Vedler <i>et al.</i> (2000) und Laemmli <i>et al.</i> (2000).....	6
Abbildung 2:	Organisation der am 2,4-D Abbau beteiligten <i>tfd</i> Gene auf dem Plasmid pJP4 von <i>Cupriavidus necator</i> JMP 134, modifiziert nach Ledger <i>et al.</i> (2006).....	7
Abbildung 3:	Postulierter anaerober Abbau von 2,4-DCP, modifiziert nach Zhang & Wiegel (1990).....	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Verdauungssystems eines Regenwurms am Beispiel von <i>Lumbricus terrestris</i> , modifiziert nach Horn <i>et al.</i> , 2003.	13
Abbildung 5:	N ₂ O-bildende Prozesse in der Umwelt, modifiziert nach Wrage <i>et al.</i> (2001).	18
Abbildung 6:	Darstellung des Versuchstandortes Klostergut Scheyern (A) und der Probenahmestelle im Areal 15 (B).	27
Abbildung 7:	Absorptionsspektrum von 2,4-DCP im wässrigen Überstand nach HPLC-Analyse.....	32
Abbildung 8:	Versuchsaufbau der zweistufigen CO ₂ -Falle.....	46
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der stabilen Isotopenbeprobung, angelehnt an Friedrich (2006).	56
Abbildung 10:	Fraktionierung	59
Abbildung 11:	Erste Ableitung der Schmelzkurve, aufgezeichnet während der Quantifizierung von <i>tfdC</i>	75
Abbildung 12:	Allgemeines Reaktionsprinzip der Pyrosequenzierung, nach Ronaghi (2001).....	83
Abbildung 13:	Abnahme von 2,4-DCP sowie Bildung von CO ₂ in oxischen Bodenaufschlämmungen mit feldfrischem Boden während neuntägiger Inkubation bei 15 °C und 150 rpm.	93
Abbildung 14:	Abnahme von 2,4-DCP sowie Bildung von CO ₂ in Bodenaufschlämmungen mit dreifach autoklaviertem bzw. feldfrischem Boden mit bzw. ohne Zusatz von 10 mM KCN sowie 2,4-DCP während achttägiger Inkubation bei 15 °C und 150 rpm.....	94

Abbildung 15:	2,4-DCP Abnahme und Bildung von N ₂ in anoxischen Bodenaufschlammungen mit feldfrischem Boden nach 142 Tagen Inkubation bei 15 °C und 150 rpm unter Argonatmosphäre.....	96
Abbildung 16:	Erfasste Prozessdaten aus anoxischen Bodenaufschlammungen mit feldfrischem Boden in Gegenwart von (A) Eisen (III), (B) Sulfat und (C) Nitrat als alternative, terminale Elektronenakzeptoren.	97
Abbildung 17:	Einfluss von <i>Aporrectodea caliginosa</i> auf die Abnahme von 2,4-DCP in Bodensäulen mit landwirtschaftlichem Boden aus Scheuern.....	99
Abbildung 18:	Einfluss einer <i>A. caliginosa</i> - und/ oder 2,4-DCP Vorbehandlung in Bodensäulen auf die initiale ¹⁴ CO ₂ -Bildung (in % des eingesetzten [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP) in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur.	101
Abbildung 19:	Wiederfindung des eingesetzten 2,4-DCP-[¹⁴ C] in Form von ¹⁴ CO ₂ , extra-hierbaren Rückständen (Acetonitril-Extrakt) sowie nach Verbrennung bei 600 °C (nicht-extrahierbare Rückstände) nach 300 Tagen Inkubation in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur.	102
Abbildung 20:	Einfluss von Regenwürmern auf die Abnahme von 2,4-DCP und Bildung von ¹⁴ CO ₂ in oxischen Mikrokosmen mit feldfrischem Boden.....	104
Abbildung 21:	Wiederfindung des verwendeten [U- ¹⁴ C]-2,4-DCP als ¹⁴ CO ₂ , extrahierbarer Rückstand (Acetonitril-Extrakt) sowie im Anschluss an die Verbrennung bei 600 °C als nicht-extrahierbarer Rückstand nach 69 Tagen Inkubation in oxischen Mikrokosmen mit bzw. ohne Einfluss von Regenwürmern bei Raumtemperatur.	105
Abbildung 22:	Wiederfindung von 2,4-DCP-[¹⁴ C] in Form von ¹⁴ CO ₂ , extrahierbaren Rückständen (Acetonitril-Extrakt) und in extrahiertem Material (nicht-extrahierbare Rückstände) sowie in der verbleibenden PBS-Lösung nach 37 Tagen Inkubation von Regenwurmgewebe und Kontrollansätzen in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur im Dunkeln..	106
Abbildung 23:	Relative Häufigkeiten isolierter Bakterienfamilien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen (I-III) und anoxischen (IV) Bedingungen bei 15 °C.	108
Abbildung 24:	Einfluss unterschiedlicher 2,4-DCP Konzentrationen auf das Wachstum von Isolat AR-200.....	109
Abbildung 25:	Wiederfindung von 2,4-DCP-[¹⁴ C] als ¹⁴ CO ₂ und gelöst im verbleibenden Überstand nach 129 Tagen Inkubation von Isolaten und Kontrollansätzen in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur im Dunkeln.....	110

Abbildung 26:	Einfluss verschiedener Grenzwerte für Sequenzähnlichkeit auf die Anzahl der detektierten OTUs am Beispiel des strukturellen Gens <i>tfdB</i>	112
Abbildung 27:	Repräsentative Rarefaction-Analyse von <i>tfdB</i> -Teilsequenzen aus der Amplikon-Genbibliothek von Gangwandmaterial ohne 2,4-DCP Vorbehandlung in Bodensäulen.	113
Abbildung 28:	Phylogenetische Analyse <i>in silico</i> translaterter Aminosäuresequenzen von <i>tfdB</i> -Genfragmenten nach Pyrosequenzierung in (A) Drilosphärenproben sowie (B) feldfrischem Boden (t_0) und Bodenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen bei 15 °C.....	116
Abbildung 29:	Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Pyrosequenzierung erhaltenen <i>tfdB</i> -Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex.....	117
Abbildung 30:	Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, <i>in silico</i> translaterter <i>tfdB</i> -Aminosäuresequenzen aus feldfrischem Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP Behandlung, basierend auf Pyrosequenzierungsdaten.....	121
Abbildung 31:	Repräsentative Rarefaction-Analyse von <i>tfdB</i> - und <i>pheA</i> - Teilsequenzen aus Genbibliotheken.	122
Abbildung 32:	Phylogenetische Analyse <i>in silico</i> translaterter <i>tfdB</i> -Aminosäuresequenzen in Genbibliotheken von feldfrischem Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen bei 15 °C.....	125
Abbildung 33:	Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Genbibliotheken erhaltenen <i>tfdB</i> -Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex.	126
Abbildung 34:	Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, <i>in silico</i> translaterter <i>tfdB</i> -Aminosäuresequenzen aus Genbibliotheken vom feldfrischen Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP Behandlung.....	128
Abbildung 35:	Relative Häufigkeiten detektierter, <i>in silico</i> translaterter <i>pheA</i> -Aminosäuresequenzen in Genbibliotheken von feldfrischem Boden zu Inkubationsbeginn sowie von Drilosphärenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen mit 2,4-DCP bei 15 °C.....	131

- Abbildung 36: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Genbibliotheken erhaltenen *pheA*-Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex..... 133
- Abbildung 37: Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, *in silico* translatierter *pheA*-Aminosäuresequenzen aus Genbibliotheken vom feldfrischen Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP Behandlung..... 134
- Abbildung 38: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) aerober, kultivierter 2,4-DCP Abbauer pro Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden sowie in Drilosphärenmaterial, vorinkubiert in Bodensäulen mit bzw. ohne 2,4-DCP..... 136
- Abbildung 39: Verhältnis der in 2,4-DCP-vorbehandelten und 2,4-DCP-unbehandelten Drilosphärenproben berechneten MPNs..... 137
- Abbildung 40: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) aerober, kultivierter 2,4-DCP Abbauer in vorbehandelten Bodenproben pro Gramm Trockengewicht. 138
- Abbildung 41: *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation..... 142
- Abbildung 42: *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen bezogen auf ein Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation..... 143
- Abbildung 43: Relative Genhäufigkeit (Relative Gene Frequency Ratio, RGFR) von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopien pro ng eingesetzter DNA in Drilosphärenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation..... 144
- Abbildung 44: *tfdC*- und *pheA*-Transkriptzahlen bezogen auf ng eingesetzter cDNA in den oberen 5 cm des Bodens zu Versuchsbeginn (t_0) sowie nach 2 Tagen, 10 Tagen und 33 Tagen (Beendigung der Bodensäuleninkubation).. 145
- Abbildung 45: Relative Genhäufigkeit (RGFR) von *tfdC*- und *pheA*-Transkripten pro ng eingesetzter cDNA in den oberen 5 cm des Bodens nach Inkubation in Bodensäulen..... 146
- Abbildung 46: Abnahme von [^{13}C]- bzw. [^{12}C]-2,4-DCP in Bodensäulen mit landwirtschaftlichem Boden aus Scheyern in Gegenwart oder Abwesenheit von *A. caliginosa*..... 148

- Abbildung 47: Schwebdichte der Fraktionen 1 bis 10 einer Kontrollgradientenlösung ohne RNA nach 67 h Zentrifugation bei 37.800 rpm und 20 °C des Zentrifugationslaufes 4..... 149
- Abbildung 48: Verteilung der RNA aus Kotkrümel-Proben von *A. caliginosa* nach 50-tägiger Inkubation in Mikrokosmen mit [¹²C]- bzw. [¹³C]-2,4-DCP entlang des Dichtegradienten. 151
- Abbildung 49: Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR-Amplifikation potentieller 16S rRNA Genfragmente (ca. 880 bp) aus cDNA der Gradientenfraktionen 1 bis 9 mit dem Primerpaar 27F-IRD700/907RM für die TRFLP-Analyse. 151
- Abbildung 50: TRFLP-Profil bakterieller 16S rRNA cDNA Sequenzen der Gradientenfraktionen 1 bis 9 nach 50-tägiger Inkubation in Mikrokosmen mit [¹²C]-bzw. [¹³C]-2,4-DCP. 152
- Abbildung 51: Gelelektrophoretische Überprüfung der PCR möglicher 16S rRNA Genfragmente (ca. 560 bp) aus cDNA der „schweren“ Fraktionen 2 bis 4 mit dem Primerpaar 341F und 907RM für die Pyrosequenzierung..... 153
- Abbildung 52: Relative Häufigkeiten repräsentativer, vorwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen in ¹²C- und ¹³C-Amplikon-Genbibliotheken von Bodenproben der oberen 5 cm aus Bodensäulen ohne Regenwurmbehandlung nach Pyrosequenzierung- und Jaguc2-Analyse entlang des Dichtegradienten.. 154
- Abbildung 53: Relative Häufigkeiten repräsentativer, rückwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen in ¹²C- und ¹³C-Amplikon-Genbibliotheken von Bodenproben der oberen 5 cm aus Bodensäulen ohne Regenwurmbehandlung nach Pyrosequenzierung- und Jaguc2-Analyse entlang des Dichtegradienten. 154
- Abbildung 54: Repräsentative Rarefaction-Analyse der nach Pyrosequenzierung und JAguc2-Auswertung erhaltenen 16S rRNA Teilsequenzen (ø 501 bp) aus dem Darminhalt von *A. caliginosa* nach Mikrokosmeninkubation mit 2,4-DCP auf Familien-Ebene..... 156
- Abbildung 55: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Amplikon-Genbibliotheken erhaltenen 16S rRNA-Datensatzes aus Bodensäulen-material basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex..... 162
- Abbildung 56: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Amplikon-Genbibliotheken erhaltenen 16S rRNA-Datensatzes nach Mikrokosmeninkubation basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex..... 182

Abbildung 57:	Relative Häufigkeiten von OTUs auf Familien-Ebene in den vereinigten „schweren“ Fraktionen von ^{13}C - und ^{12}C -Proben zum Zeitpunkt t_0 (feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation) nach Analyse der vorwärts- und rückwärtsgerichteten 16S rRNA Sequenzen.....	196
Abbildung 58:	Labelling Intensität der ^{13}C -markierten Taxa in den „schweren“ Fraktionen aus (A) Bodensäulen und (B) Mikrokosmen nach vergleichender Analyse der vorwärtsgerichteten 16S rRNA Teilsequenzen.....	197
Abbildung 59:	Labelling Intensität der ^{13}C -markierten Taxa in den „schweren“ Fraktionen aus (A) Bodensäulen und (B) Mikrokosmen nach vergleichender Analyse der rückwärtsgerichteten 16S rRNA Teilsequenzen.....	198
Abbildung 60:	Phylogenetische Stammbäume repräsentativer (A) vorwärtsgerichteter und (B) rückwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen (452 - 595 bp) aus cDNA von aktiven, 2,4-DCP- ^{13}C -Kohlenstoff-verwertenden Mikroorganismen nach Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP in Bodensäulen sowie Mikrokosmen.	206
Abbildung 61:	Kumulative N_2O -Bildung in Bodensäulen in Gegenwart und Abwesenheit von Regenwürmern und/ oder 2,4-DCP.....	207
Abbildung 62:	Lineare Anstiege der kumulativen N_2O -Bildung in Bodensäulen in Gegenwart und Abwesenheit von Regenwürmern und/ oder 2,4-DCP im Inkubationszeitraum 5 bis 21 Tage.....	208
Abbildung 63:	Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) kultivierter Denitrifizierer pro Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden (t_0) sowie der Drilosphäre nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre.	210
Abbildung 64:	Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) kultivierter Denitrifizierer in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorbehandelten Bodenproben pro Gramm Trockengewicht nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre.....	211
Abbildung 65:	<i>narG</i> -, <i>nirK</i> - und <i>nirS</i> -Genkopienzahlen pro ng DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.).....	214
Abbildung 66:	<i>nosZ</i> - und <i>amoA</i> -Genkopienzahlen pro ng DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.).....	215

Abbildung 67:	<i>nosZ</i> -Transkripte pro ng eingesetzter cDNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.).....	216
Abbildung 68:	TRFLP-Profil bakterieller <i>nosZ</i> DNA Sequenzen im feldfrischen Boden (t_0) sowie in Drilosphärenproben nach 19-tägiger Inkubation in Bodensäulen mit bzw- ohne Zugabe von 2,4-DCP.	217
Abbildung 69:	TRFLP-Profil bakterieller <i>nosZ</i> DNA Sequenzen in Bodenproben aus Bodensäulen mit und ohne Regenwurm- und 2,4-DCP Behandlung nach nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19 ($t_{end,19d}$)- und 41 ($t_{end,41d}$)-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.).....	219
Abbildung 70:	Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der nachgewiesenen TRFs aus feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubierten Drilosphären- und Bodenproben nach Bodensäuleninkubation basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex.....	220
Abbildung 71:	Biologische, chemische und physikalische Effekte von Regenwürmern auf terrestrische Habitate.	222
Abbildung 72:	Venn-Diagramm der durch Anreicherung (grün), SIP (blau) und struktureller Genmarkeranalyse von <i>tfdB</i> und <i>pheA</i> (rot) detektierten Familien.	245
Abbildung 73:	Zusammenfassende Darstellung des mikrobiellen 2,4-DCP Abbau- und N ₂ O-Bildungspotentials in Regenwurm-beeinflussten und Regenwurm-unbeeinflussten Bodenmaterial.	252
Abbildung-AH 1:	2,4-DCP Abnahme nach Inkubation in unterschiedlichen Gefäßen verschiedener Materialien.	311
Abbildung-AH 2:	Schwebdichte der fraktionierten Gradientenlösungen ohne RNA nach den Ultrazentrifugationsläufen 1 bis 4.....	311
Abbildung-AH 3:	<i>tfdB</i> -, <i>tfdC</i> - und <i>pheA</i> -Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in Prozent bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33 -tägiger Boden-säuleninkubation.....	312
Abbildung-AH 4:	<i>narG</i> -, <i>nirK</i> - und <i>nirS</i> -Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in % bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial.....	313

Abbildung-AH 5:	<i>nosZ</i> -, <i>amoA</i> _{Archaea} - und <i>amoA</i> _{Bacteria} -Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in % bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial.	314
Tabelle 1:	Physikalisch- chemische Kenndaten quantitativ bedeutsamer Chlorphenole (Shiu <i>et al.</i> , 1994).....	2
Tabelle 2:	Charakterisierung des verwendeten Bodens vom Kloostergut Scheyern.....	26
Tabelle 3:	Bodeneigenschaften der Trafo Wiese (Horn, 2004)..	27
Tabelle 4:	Parameter der GC Messungen.	29
Tabelle 5:	Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für die gemessenen Gase in Wasser bei 20 °C und 25 °C.	31
Tabelle 6:	Boden, verwendete Medien sowie Inkubationsbedingungen aller angesetzter Mikrokosmen.	41
Tabelle 7:	Zusammenfassung aller, mit vorbehandeltem Bodensäulenmaterial, angesetzten Mikrokosmen..	42
Tabelle 8:	Zusammenfassung aller vorbereiteten Mikrokosmen für den Mineralisierungsversuch.	43
Tabelle 9:	Mikrokosmenansatz zur Untersuchung des Regenwurmeinflusses auf die Mineralisierung sowie den Abbau von 2,4-DCP im landwirtschaftlichen Boden.	44
Tabelle 10:	Versuchsansätze zur Untersuchung einer Mineralisierung von 2,4-DCP in Regenwurmgewebe.....	45
Tabelle 11:	Sequenz, Position und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten verwendeten Primer.....	62
Tabelle 12:	Zusammensetzung der PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten.....	62
Tabelle 13:	PCR-Programme zur Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten.....	63
Tabelle 14:	Sequenz und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von <i>tdbB</i> -, <i>tdcC</i> - und <i>pheA</i> -Genfragmenten verwendeten Primer.....	64
Tabelle 15:	Zusammensetzung von PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von <i>tdbB</i> -, <i>tdcC</i> - und <i>pheA</i> -Genfragmenten.	64

Tabelle 16:	PCR-Programme zur Amplifizierung von <i>tfdB</i> -, <i>tfdC</i> - und <i>pheA</i> -Genfragmenten.....	65
Tabelle 17:	Sequenz und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von <i>narG</i> -, <i>nirK</i> -, <i>nirS</i> -, <i>nosZ</i> - und <i>amoA</i> -Genfragmenten verwendeten Primer.....	66
Tabelle 18:	Zusammensetzung von PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von <i>narG</i> -, <i>nirK</i> -, <i>nirS</i> -, <i>nosZ</i> - sowie <i>amoA</i> -Genfragmenten.	67
Tabelle 19:	Verwendete PCR-Programme zur Amplifizierung von <i>narG</i> -, <i>nirK</i> -, <i>nirS</i> -, <i>nosZ</i> - sowie <i>amoA</i> -Genfragmenten.	67
Tabelle 20:	Verwendete Primer für die M13-Kontroll-PCR.....	68
Tabelle 21:	M13-PCR Programm.....	69
Tabelle 22:	Sequenz und Schmelztemperatur der für die Quantifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten verwendeten Primer.....	71
Tabelle 23:	Zusammensetzung von qPCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von <i>tfdB</i> , <i>tfdC</i> , <i>pheA</i> und 16S rRNA-Genfragmenten	71
Tabelle 24:	Zusammensetzung von qPCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von <i>narG</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i> sowie <i>amoA</i> -Genfragmenten.	72
Tabelle 25:	Verwendete qPCR-Programme zur Amplifizierung von <i>tfdB</i> -, <i>tfdC</i> , <i>pheA</i> und 16S rRNA-Genfragmenten.....	72
Tabelle 26:	Verwendete qPCR-Programme zur Amplifizierung von <i>narG</i> -, <i>nirK</i> -, <i>nirS</i> -, <i>nosZ</i> - und <i>amoA</i> -Genfragmenten.....	73
Tabelle 27:	Für den Restriktionsverdau mit <i>MspI</i> und <i>HhaI</i> eingesetzte Chemikalien.....	81
Tabelle 28:	Erfasste Inkubationszeit für den kompletten Abbau von 100 µg 2,4-DCP durch vorbehandeltes Drilosphären- und Bodenmaterial in oxischen Mikrokosmen.....	100
Tabelle 29:	Einfluss einer Regenwurm- bzw. 2,4-DCP Vorbehandlung auf den Verbleib von 2,4-DCP-[¹⁴ C] in oxischen Mikrokosmen.	103
Tabelle 30:	Diversitätsanalyse von <i>tfdB</i> -Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material vor bzw- nach einer 33-tägigen Bodensäuleninkubation bei 15 °C.	114
Tabelle 31:	Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von <i>in silico</i> translatierten, repräsentativen <i>tfdB</i> -Aminosäuresequenzen aus Regenwurm- und/ oder 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Pyrosequenzierung.	118

Tabelle 32:	Diversitätsanalyse der <i>tfdB</i> -Genfragmente möglicher 2,4-DCP Abbauer in feldfrischem Boden, 2,4-DCP- und Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben sowie nur mit 2,4-DCP-vorinkubierten Bodenproben.	124
Tabelle 33:	Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von <i>in silico</i> translatierten, repräsentativen <i>tfdB</i> -Aminosäuresequenzen aus 2,4-DCP- und/ oder Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Erstellen von Genbibliotheken.....	127
Tabelle 34:	Diversitätsanalyse der <i>pheA</i> -Genfragmente möglicher Phenol-abbauender Bakterien in feldfrischem Boden, 2,4-DCP- und Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben sowie nur mit 2,4-DCP-vorinkubierten Bodenproben.	130
Tabelle 35:	Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von <i>in silico</i> translatierten, repräsentativen <i>pheA</i> -Aminosäuresequenzen aus 2,4-DCP- und/ oder Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Erstellen von Genbibliotheken.....	133
Tabelle 36:	Höchstwahrscheinliche Keimzahlen (MPN) anaerober, kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer in feldfrischem Boden pro Gramm Trockengewicht detektiert mit den alternativen Elektronenakzeptoren CO ₂ , Sulfat, Eisen (III) und Nitrat nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre.	139
Tabelle 37:	Diversitätsanalyse 16S rRNA Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material vor bzw. nach Bodensäuleninkubation.....	158
Tabelle 38:	Diversitätsanalyse 16S rRNA Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material nach Mikrokosmeninkubation.....	160
Tabelle 39:	Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Inkubation mit Regenwürmern und [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Bodensäulen.....	164
Tabelle 40:	Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus 2,4-DCP-unbehandeltem Bodenmaterial und aus Bodenproben nach Inkubation mit [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Bodensäulen.....	168
Tabelle 41:	Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Inkubation mit Regenwürmern und [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Bodensäulen.....	172
Tabelle 42:	Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus 2,4-DCP-unbehandeltem Bodenmaterial und aus Bodenproben nach Inkubation mit [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Bodensäulen.....	177

Tabelle 43:	Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Vorinkubation mit Regenwürmern und [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.....	183
Tabelle 44:	Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Regenwurm-unbehandelten Bodenproben nach Inkubation mit [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.....	187
Tabelle 45:	Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Vorinkubation mit Regenwürmern und [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.....	189
Tabelle 46:	Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Regenwurm-unbehandelten Bodenproben nach Inkubation mit [¹³ C]- bzw. [¹² C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.....	194
Tabelle 47:	Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge repräsentativer, vorwärtsgerichteter 16S rRNA Fragmente aus cDNA nach CAP-SIP mit [¹³ C]-2,4-DCP..	199
Tabelle 48:	Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge repräsentativer, rückwärtsgerichteter 16S rRNA Fragmente aus cDNA nach CAP-SIP mit [¹³ C]-2,4-DCP.	201
Tabelle-AH 1:	Verwendete Fraktionen und dazugehörige Barcodes für die 16S rRNA SIP Pyrosequenzierung.....	315
Tabelle-AH 2:	Verwendete Barcodes für die Pyrosequenzierung amplifizierter <i>tfdB</i> - Sequenzen.....	317
Tabelle-AH 3:	Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes I (vgl. 2.5.2.).	318
Tabelle-AH 4:	Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes II.....	320
Tabelle-AH 5:	Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes III	325
Tabelle-AH 6:	Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes IV.	326

Formel 1:	Einzelreaktionen der kompletten Denitrifikation (Zumft, 1992).....	19
Formel 2:	Berechnung des Wassergehaltes von Boden- und Drilo- sphärenproben.	28
Formel 3:	Gesamtstoffmenge eines Gases.....	30
Formel 4:	Stoffmenge in der Gasphase.	30
Formel 5:	Zustandsgleichung für ideale Gase.	30
Formel 6:	Physikalisch gelöster Anteil des Gases.....	30
Formel 7:	Chemisch gelöster Anteil des Gases.....	30
Formel 8:	Reaktionsgleichung der Bindung von $^{14}\text{CO}_2$ in Natronlauge.	46
Formel 9:	Berechnung der Labelling Intensität (LI).	57
Formel 10:	Berechnung des Kontrollgrenzwertes.....	57
Formel 11:	Berechnung der vorliegenden Kopienzahlen in Standards.	70
Formel 12:	Berechnung des Inhibitionsfaktors.	73
Formel 13:	Berechnung der relativen Genhäufigkeit.	74
Formel 14:	Berechnung der für die Ligation einzusetzenden DNA Menge.....	78
Formel 15:	Shannon-Index.....	87
Formel 16:	Varianz des Shannon-Index.....	87
Formel 17:	95 % Konfidenzintervall des Shannon-Index.....	88
Formel 18:	Evenness.....	88
Formel 19:	95 % Konfidenzintervall der Evenness.....	88
Formel 20:	Chao1 Schätzwert.....	88
Formel 21:	Varianz des Chao1 Schätzwertes.....	89
Formel 22:	Obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls des Chao1 Schätzwertes.	89
Formel 23:	Untere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls des Chao1 Schätzwertes.	89
Formel 24:	Coverage (C_o).....	89
Formel 25:	Mittelwertberechnung.....	91
Formel 26:	Standardabweichung.....	91

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	doppelt entsalztes Wasser
<i>amoA</i>	Ammonium-Monooxygenase kodierendes Gen
APS	Adenosin-5-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bl	unterer Bereich des Bodens in den Bodensäulen(5-10 cm)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
Bu	oberer Bereich des Bodens in den Bodensäulen (0-5 cm)
Bw	<i>engl.</i> Burrow wall (= Regenwurm-Gangwände)
bzw.	beziehungsweise
CAP-SIP	<i>engl.</i> Comparative Amplicon Pyrosequencing based Stable Isotope Probing (= vergleichender Amplikon–Pyrosequenzierungsbasierender stabiler Isotopenversuch)
cast	<i>engl.</i> (= Regenwurm-Kotkrümel)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
et al.	<i>lat.</i> et alia (= und andere)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FG	Frischgewicht
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDPE	<i>engl.</i> high density polyethylene (= Polyethylen mit hoher Dichte)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IRD	<i>engl.</i> infrared dye (=Markierung mit Infrarot-Farbstoff)
K	Kelvin
kBq	Kilobecquerel
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
lbf-in	<i>engl.</i> pound-force inch

LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
m	Meter
M	Molar, Mol pro Liter
mbar	Millibar
MCPA	2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure
MCS	<i>engl.</i> Multiple Cloning Site (= multiple Klonierungsstelle)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar, Millimol pro Liter
mol	Mol
MOPS	3- (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPN	<i>engl.</i> most probable number (= höchstwahrscheinliche Keimzahl)
N	Einheit normal
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid, als wässrige Lösung Natronlauge
<i>nap</i>	Gen der periplasmatischen Nitratreduktase
<i>nar</i>	Gen der membrangebundenen Nitratreduktase
<i>nir</i>	Gen der cytoplasmatischen Nitritreduktase
nm	Nanometer
Nm	Newtonmeter
N ₂ O	Lachgas
<i>nor</i>	NO-Reduktase kodierendes Gen
<i>nos</i>	N ₂ O-Reduktase kodierendes Gen
Nr.	Nummer
<i>nrf</i>	Gen der membrangebundenen Nitritreduktase
OD	Optische Dichte
OTU	<i>engl.</i> Operational Taxonomic Unit (= künstliche taxonomische Einheit)
O ₂	Sauerstoff
Pa	Pascal
PCP	Pentachlorphenol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>pheA</i>	Phenolhydroxylase kodierendes Gen
pM	Picomolar, Picomol pro Liter
PP	Polypropylen
PPE	Polyphenylenether
PPi	Pyrophosphat
ppb	<i>engl.</i> parts per billion (= Teile pro Milliarden Teile)
ppm	<i>engl.</i> parts per million (= Teile pro Millionen Teile)
PVC	Polyvinylchlorid

QIIME	<i>engl.</i> Quantitative Insights Into Microbial Ecology (= quantitative Einblicke in die mikrobielle Ökologie)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute (= Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
R ²	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunde
SIP	<i>engl.</i> Stable Isotope Probing (= stabiler Isotopenversuch)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>tfdB</i>	2,4-Dichlorphenol Hydroxylase kodierendes Gen
<i>tfdC</i>	3,5-Dichlorcatechol-1,2-Dioxygenase kodierendes Gen
TG	Trockengewicht
TRFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	<i>lat.</i> versus (= gegen, gegenübergestellt)
v/v	<i>engl.</i> volume per volume (= Volumenanteile)
w/v	<i>engl.</i> weight per volume (= Gewicht pro Volumen)
w/w	<i>engl.</i> weight per weight (= Gewichtsanteile)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar, Mikromol pro Liter
µmol	Mikromol
µS	Mikrosiemens
¹² C	am häufigsten vorkommendes stabiles Isotop des Kohlenstoffs
¹³ C	stabiles Isotop des Kohlenstoffs
¹⁴ C	radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
°C	Grad Celsius
2-MCP	2-Monochlorphenol
4-MCP	4-Monochlorphenol
2,4-DCP	2,4-Dichlorphenol
2,4,6-TCP	2,4,6-Trichlorphenol
2,4,5-TCP	2,4,5-Trichlorphenol
3,5-DCC	3,5-Dichlorcatechol
3,5-DCP	3,5-Dichlorphenol

1. Einleitung

1.1. 2,4-Dichlorphenol – Bildung und Schicksal in der Umwelt

1.1.1. Eigenschaften von Chlorphenolen

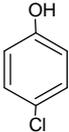
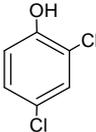
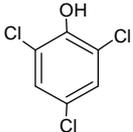
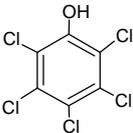
Durch ihre vielseitige Verwendung z.B. als Pestizide, Holzschutzmittel oder als Vorstufe für die Synthese einer Vielzahl von chemischen Verbindungen sind chlorphenolische Substanzen für die moderne menschliche Gesellschaft von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Ahlborg & Thunberg, 1980; Pera-Titus *et al.*, 2004). Die anthropogen bedingte Herstellung und der daraus resultierende Eintrag von Chlorphenolen in die Umwelt führten jedoch zu sichtbaren Folgen. Aufgrund ihrer hohen Toxizität, der Persistenz in Böden und aquatischen Systemen sowie ihrer Tendenz zur Bioakkumulation werden sie zu den prioritären Schadstoffen gezählt (Keith & Telliard, 1979), die gesundheitliche Schäden von verschiedensten Lebewesen verursachen. Die Gruppe der Chlorphenole umfasst 19 verschiedene Kongeneren, bestehend aus Mono-, Di-, Tri-, Tetrachlorphenolisomeren sowie Pentachlorphenol (Koch, 1995). Zu den quantitativ bedeutendsten chlorphenolischen Verbindungen zählen dabei 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP), Pentachlorphenol (PCP), 4-Monochlorphenol (4-MCP) sowie 2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP) (Jobst, 1995; Zettler, 1996). Die in die Umwelt eingebrachten Chlorphenole verteilen sich im Boden und Wasser sowie in der Luft entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften (Tabelle 1), die zudem die Bioverfügbarkeit und den Umfang möglicher Abbaureaktionen bestimmen. Mit zunehmendem Chlorierungsgrad nehmen die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck ab und damit verbunden steigt die Tendenz ihrer Bindung an Bodenpartikeln und folglich der Verbleib am Eintragungsort. Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}) gibt das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie einer Substanz an und wird u.a. als Mass für die Akkumulation in Geweben (Hermens *et al.*, 2013) sowie für die Tendenz zur Sorption an organische Phasen im Boden herangezogen. Lipophile Substanzen weisen einen positiven, hydrophile Substanzen einen negativen $\log K_{ow}$ auf. Da Chlorphenole schwache Säuren sind, wird ihr Umweltverhalten (Sorption, Persistenz, Flüchtigkeit) zusätzlich vom pH-Wert des Umweltmediums beeinflusst (Koch, 1995).

Die zunehmende Anzahl an Chlorsubstituenten erhöht zudem die Toxizität von Chlorphenolen. Die massgeblichen Wirkmechanismen sind dabei die Entkopplung der oxidativen und photosynthetischen Phosphorylierung sowie die Hemmung des Elektronentransportes mit der Folge, dass die Bildung von ATP in den Zellen inhibiert wird (Tissut *et al.*, 1987; Escher *et al.*, 1996). Chlorphenole können nach Exposition

histopathologische Veränderungen in Menschen und Tieren verursachen und besitzen genotoxische sowie mutagene Eigenschaften (Igbiosa *et al.*, 2013). Die Internationale Behörde für Krebsforschung sowie die Weltgesundheitsorganisation ordnen Chlorphenole der Gruppe der potentiell kanzerogenen Substanzen zu (IARC, 1991).

Die akute Toxizität von Chlorphenolen bei Ratten (LD₅₀, oral) liegt im Bereich von 500 mg bis 3600 mg pro Kilogramm Körpergewicht (Koch, 1995). Die bei Regenwürmern der Gattung *Eisenia* mittels Papierkontakt- Methode bestimmte letale Konzentration (LC₅₀) von Chlorphenolen wird mit $2,3 \times 10^{-5}$ bis $4,3 \times 10^{-6}$ mmol pro Kubikzentimeter Gewebeoberfläche angegeben und ist damit in etwa vergleichbar mit den Konzentrationen, die für Süßwasserorganismen ermittelt wurden (Miyazaki *et al.*, 2002). 2,4-DCP hemmt u.a. das Wachstum der Mikroalge *Chlorella* VT-1 mit einer LD₅₀ von 22,5 mg pro Liter (Scragg *et al.*, 2003) sowie den eigenen Abbau durch eine Reinkultur von *Pseudomonas putida* bei Konzentrationen (IC₅₀) von 250 mg pro Liter (Kargi & Eker, 2004). Aufgrund der genannten toxischen Eigenschaften wurde weltweit die Produktion und Verbreitung einiger dieser Verbindungen nahezu vollständig eingestellt.

Tabelle 1: Physikalisch- chemische Kenndaten quantitativ bedeutsamer Chlorphenole (Shiu *et al.*, 1994).

Verbindung	Strukturformel	Molare Masse (g/mol)	Wasserlöslichkeit (g/l)	Dampfdruck (Pa)	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (log K _{ow})
4-MCP		128,56	27,00	20,00	2,40
2,4-DCP		163,00	4,50	12,00	3,20
2,4,6-TCP		197,45	0,43	1,25	3,69
PCP		266,35	0,014	0,004	5,05

1.1.2. Ökologische Relevanz von 2,4-DCP

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 2,4-DCP als Modellverbindung eingesetzt. Der jährliche Bedarf dieser kommerziell bedeutenden Verbindung liegt bei ca. 6.000 t, wobei mehr als die Hälfte der Menge für die Produktion der Herbizide 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure (2,4-DP) verwendet wird (Drotleff *et al.*, 1992). Auch für die Herstellung des seit 1980 in der Bundesrepublik Deutschland und seit 1990 in Gesamtdeutschland verbotenen Herbizides Nitrofen wurde 2,4-DCP eingesetzt (Burke Hurt *et al.*, 1983). Der Eintrag von 2,4-DCP in die Umwelt kann auf vielfältige Weise erfolgen, z. B. direkt als industrieller Abfall oder indirekt als Abbauprodukt natürlicher und synthetischer Verbindungen. In der Bundesrepublik Deutschland werden die Einträge für 2,4-DCP auf 0,12 t bis 0,24 t pro Jahr in Oberflächenwasser und 0,9 t pro Jahr in die Atmosphäre geschätzt (Koch, 1995). Zum Schutz des Holzes vor Weiß- und Blaufäule wurden 2,4-DCP-haltige Holzschutzmittel in großen Mengen von der Holzverarbeitenden Industrie in Finnland eingesetzt - mit weitreichenden Folgen. Bis zu 47 mg 2,4-DCP pro Kilogramm Boden wurden in direkter Umgebung der Sägemühlen nachgewiesen (Kitunen *et al.*, 1985). Zudem zeigte sich eine Belastung des umliegenden Oberflächen- und Grundwassers (Valo *et al.*, 1984). Der Urin von angestellten Mitarbeitern wies mit 1,4 µg 2,4-DCP pro Liter im Vergleich zu nicht exponierten Personen eine bis zu 600-fach höhere 2,4-DCP Konzentration auf (Kitunen *et al.*, 1985; Obi-Osius *et al.*, 2005). Der jahrelange, intensive Einsatz des Pestizides 2,4-D in der Landwirtschaft führte in Folge zu einem vermehrten Vorkommen des primären Abbauproduktes 2,4-DCP in Böden und aquatischen Lebensräumen. So wurden im niederländischen Teil des Rheins bis zu 0,6 µg 2,4-DCP pro Liter, in der Weichsel bei Kiezmark bis zu 6 µg 2,4-DCP pro Liter detektiert (Wegman & Hofstee, 1979; Kot-Wasik *et al.*, 2004). Die Analyse von Oberflächenwasser des Gelben Flusses in China resultierte sogar in 2,4-DCP Konzentrationen von bis zu 20 µg pro Liter (Gao *et al.*, 2008). Chlorierte organische Schadstoffe wie 2,4-DCP stellen zunehmend auch ein Problem in der Abwasser- aufbereitung dar. Der bei der Behandlung von Abwasser in Abwasserbehandlungs- anlagen anfallende Klärschlamm findet unter anderem Anwendung als Düngemittel in der Landwirtschaft. Die Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) enthält Grenzwerte für die Belastung des Klärschlammes mit anorganischen und organischen Schadstoffen wie Schwermetalle und polychlorierte Biphenyle, nicht jedoch für Chlorphenole. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Untersuchung von westdeutschen Klärschlämmen aus den Jahren 1987 bis 1989 wurde eine 2,4-DCP Belastung von bis zu 13 µg pro Kilogramm Klärschlamm gezeigt (Jobst, 1995). Nach der landwirtschaftlichen Aufbringung eines 2,4-DCP kontaminierten Klärschlammes besteht folglich die Möglichkeit einer Anreicherung im Boden sowie in der Nahrungskette.

Allerdings sind organische Chlorverbindungen nicht nur anthropogenen Ursprungs. Auch in der Natur werden ähnliche oder sogar identische Substanzen in großen Mengen für die Übermittlung von Signalen oder zur Abwehr von Feinden synthetisiert. Bis zum Jahr 2005 wurden 2320 natürlich vorkommende organische Chlorverbindungen tabelliert, darunter auch 2,4-DCP (Gribble, 2005). Die Amerikanische Hundesecke *Dermacentor variabilis* (Ixodidae, Acari) synthetisiert 2,4-DCP, das zusammen mit dem Isomer 2,6-DCP als Pheromon zum Zwecke der Partnerwahl eingesetzt wird (Hanson *et al.*, 2002). Ein aus Boden isolierter, filamentöser Pilz der Gattung *Penicillium* produziert 2,4-DCP als Wachstumshormon und antibiotisch wirksame Substanz (Ando *et al.*, 1970). Zudem wurde die natürliche Bildung von 2,4-DCP im Boden eines niederländischen Douglasienwaldes nach einer Na^{37}Cl -Behandlung und einer Inkubationszeit von einem Jahr durch Hoekstra *et al.* (1999) beobachtet. Dabei wird die Bildung zum einen auf eine biogene *de novo* Synthese und zum anderen auf eine Chlorperoxidase-vermittelte Chlorierung aromatischer Verbindungen wie Phenol oder Huminstoffe zurückgeführt. Obwohl eine Reihe an wissenschaftlichen Untersuchungen die natürliche Bildung von Chlorphenolen belegen, ist bislang die quantitative Bedeutung im Vergleich zum anthropogen bedingten Eintrag nicht geklärt. Eine Beurteilung erfordert jedoch genaue Kenntnisse der biogeologischen Quellen und Senken dieser Substanzen.

1.1.3. Abbau und Transformation von 2,4-DCP

Das durch natürliche und / oder anthropogene Prozesse in die Umwelt gelangte 2,4-DCP unterliegt im Rahmen von Stoffkreisläufen verschiedenen Abbau- und Transformationsprozessen. Die Umsetzung von 2,4-DCP kann dabei sowohl abiotisch als auch biotisch stattfinden. Die Photokatalytische Oxidation mit Hilfe von Titanoxid stellt eine häufig verwendete abiotische Methode dar, um Schadstoffe in weniger toxische Verbindungen abzubauen. Studien mit 2,4-DCP führten zur Bildung von Phenol, 2- und 4-MCP sowie Chlorhydrochinon (Trillas *et al.*, 1996; Jian *et al.*, 2013). Nach elektrochemischen Oxidationsprozessen identifizierten Wang & Wang (2008) fünf aromatische und sieben aliphatische Abbauprodukte des 2,4-DCPs, darunter Phenol, Benzochinon und Fumarsäure. In Gegenwart von Eisenporphyrin, einem nicht-toxischen, biomimetischen Katalysator, wurden nach Inkubation mit 2,4-DCP dehalogenierte, hydroxylierte als auch dimerisierte Abbauprodukte detektiert (Fontaine *et al.*, 2013). Die Kopplung von abiotischen und biotischen Verfahren bietet weitere, effektive Möglichkeiten zur Dekontaminierung von 2,4-DCP. Immobilisierte, mit Titanoxid versetzte Zellkulturen von *Phanerochaete chrysosporium* bauen 79 % des initial eingesetzten 2,4-DCP innerhalb von 60 h ab (Chen *et al.*, 2013a). Der Einsatz einer von *Trametes versicolor* synthetisierten und durch Bindung an kupferbehandelte,

magnetische Silikapartikel immobilisierten Laccase resultierte in einer 2,4-DCP Abnahme von bis zu 92 % nach einer Inkubationszeit von 12 h (Wang *et al.*, 2013a). Der effizienten Beseitigung von 2,4-DCP aus der Umwelt mit Hilfe von chemischen und physikalischen Methoden stehen jedoch häufig hohe Kosten und die Bildung von toxischen Neben- und Abbauprodukten gegenüber.

Der Beitrag biologischer Transformations- und Abbauprozesse von Chlorphenolen ist in der Regel höher als z.B. der von Photodegradation und Sorptionsprozessen (Pignatello *et al.*, 1983) und äußert sich in der Existenz einer großen Vielfalt von Stoffwechselwegen (Reineke, 2001). Die *in situ* stattfindende Biodegradation bzw. Biotransformation werden dabei u.a. durch den pH-Wert, den Wassergehalt, die Verfügbarkeit von Sauerstoff, dem Redoxpotential, der Temperatur aber auch durch die Bioverfügbarkeit der Substrate beeinflusst und gesteuert (Holden & Firestone, 1997). 2,4-DCP ist eines der am weit verbreitetsten Chlorphenole in aquatischen Ökosystemen und führt in Folge zu einer Veränderung der dortigen Flora und Fauna (Fleming, 1995). Die Detoxifizierung von 2,4-DCP durch marine Mikroorganismen erfolgt u.a. über Konjugationsprozesse in deren Verlauf 2,4-DCP mittels Glucosyl- oder Gluthationtransferase an Glukose oder Gluthation gebunden wird (Yang *et al.*, 2002; Petroustos *et al.*, 2008). In Gegenwart von Mikroalgen der Gattungen *Chlorella* und *Anabaena* wurden etwa 55 % des eingesetzten 2,4-DCP nach fünf Tagen Inkubation unter photoautotrophen Bedingungen abgebaut (Hirooka *et al.*, 2003). Das in terrestrischen Ökosystemen eingebrachte 2,4-DCP kann durch verschiedene Vertreter aus dem Reich der Pilze transformiert und abgebaut werden. Bodenpilze der Gattungen *Penicillium* und *Mortierella* transformieren 2,4-DCP zu 3,5-Dichlorcatechol (3,5-DCC) sowie 4,6- und 3,5-Dichlorguajakol (Hofrichter *et al.*, 1994; Nakagawa *et al.*, 2006). Zudem ist *Mortierella* sp. zu einer Dechlorierung von 2,4-DCP befähigt, in dessen Folge Chlorhydrochinon und Hydrochinon als Produkte gebildet werden. Die Abspaltung der Chlorsubstituenten vor der Ringspaltung wurde u.a. auch für *Aspergillus niger* und den Lignin-abbauenden basidiomycetalen Pilz *Phanerochaete chrysosporium* beobachtet (Shailubhai *et al.*, 1983; Valli & Gold, 1991). Braunfäulepilze der Gattung *Gloeophyllum* transformieren 2,4-DCP zu 3,5-DCC und 4-Chlorcatechol und sind zudem zu einer Substratmineralisierung von bis zu 54 % befähigt (Fahr *et al.*, 1999). In einer umfangreichen Studie untersuchten Vroumsia *et al.* (2005) das 2,4-DCP Abbaupotential 90 verschiedener Pilze mit dem Ergebnis, dass annähernd die Hälfte der getesteten Organismen in der Lage waren 25 % und mehr des initial eingesetzten 2,4-DCP abzubauen.

Im Vergleich zu den Abbauprozessen in eukaryotischen Pilzen ist die 2,4-DCP Biodegradation durch prokaryotische Mikroorganismen ausführlich untersucht und beschrieben. Dabei erfolgt der Abbau von 2,4-DCP durch aerobe Bakterien

hauptsächlich über den modifizierten *ortho*-Weg (Abbildung 1). Der initiale Reaktionsschritt, die Hydroxlierung des Benzenrings, wird durch die FAD- haltige 2,4-DCP-6-Monooxygenase (2,4-DCP Hydroxylase; EC 1.14.13.20) in Gegenwart von Sauerstoff und unter Verwendung von NAD(P)H als Elektronendonator katalysiert. Das gebildete 3,5-DCC wird anschließend durch die intradiolisch ringspaltende Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase (EC 1.13.11.-) in 2,4-Dichlor-*cis, cis*-muconat umgewandelt. Die Abspaltung der Chlorsubstituenten erfolgt im Anschluss an die Ringspaltung und wird durch die Chlormuconatcycloisomerase und die Maleylacetatreduktase katalysiert (Schlömman, 1994; Vollmer *et al.*, 1993). Das Produkt 3-Oxoadipat wird aktiviert und in die Intermediate des Tricarbonsäurezyklus Acetyl-CoA und Succinyl-CoA überführt (Harwood & Parales, 1996).

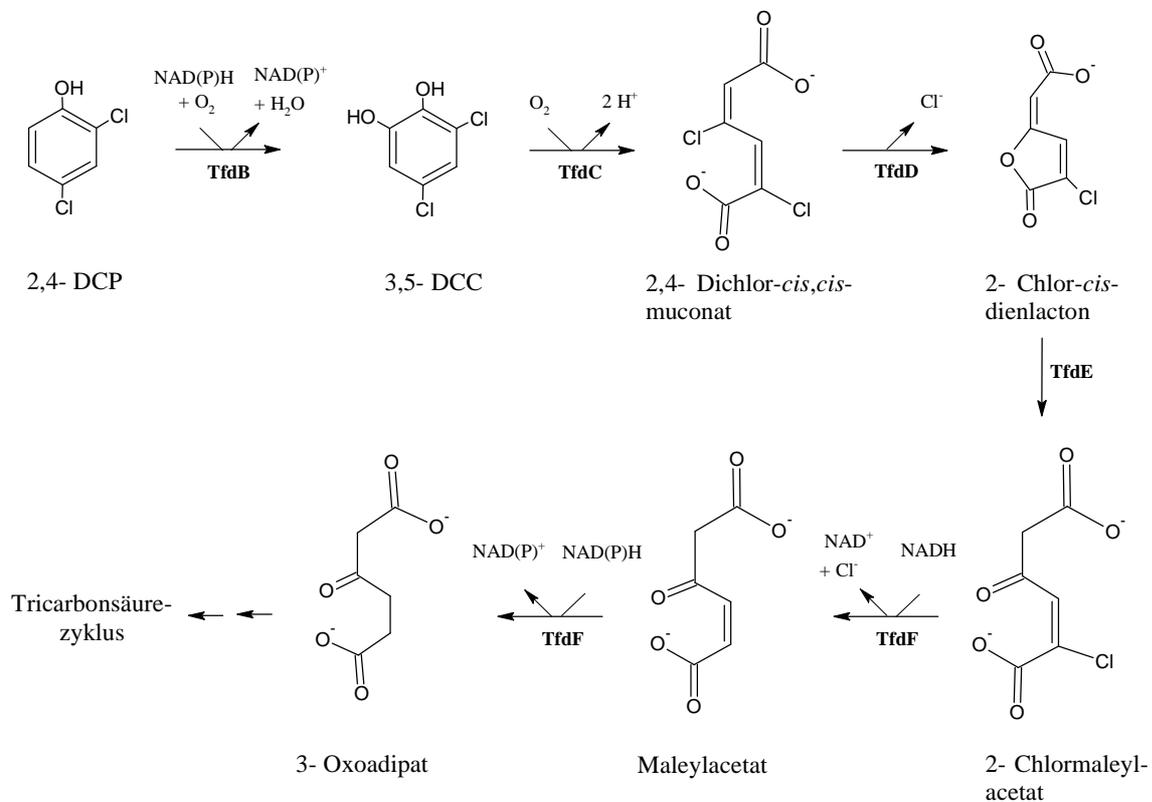


Abbildung 1: Abbau von 2,4-DCP über den modifizierten *ortho*-Weg durch aerobe Bakterien, modifiziert nach Vedler *et al.* (2000) und Laemmli *et al.* (2000). Die am Abbau beteiligten Enzyme sind mit Tfd gekennzeichnet. TfdB, 2,4-DCP Hydroxylase; TfdC, 3,5-DCC-1,2-Dioxygenase; TfdD, Chlormuconatcycloisomerase; TfdE, Dienlactonhydrolase; TfdF, Maleylacetatreduktase.

Der in Abbildung 1 dargestellte Abbauweg sowie die daran beteiligten Enzyme wurden anhand des Modellorganismus *Cupriavidus necator* JMP 134 (pJP4) (frühere taxonomische Bezeichnungen: *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* und *Wautersia eutropha*; Vandamme & Coenye, 2004) aufgeklärt. *C. necator* JMP 134 (pJP4) ist in der Lage, 2,4-D als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen

(Don & Pemberton, 1981), die dafür verantwortlichen Enzyme sind in einer 22 kb DNA-Region auf dem übertragbaren Plasmid pJP4 lokalisiert (Trefault *et al.*, 2004). Plasmid pJP4 besitzt für den 2,4-D Abbau zwei homologe, aber nicht identische Genmodule, das *tfd_I*-Cluster (*tfdC_ID_IE_IF_I* und *tfdB_I*) sowie das *tfd_{II}*-Cluster (*tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* und *tfdB_{II}*) (Abbildung 2). Die Nukleotidsequenzähnlichkeit zwischen *tfdB_I* und *tfdB_{II}* liegt dabei bei 68 %, zwischen *tfdC_I* und *tfdC_{II}* bei 63 % (Sakai *et al.*, 2007). Untersuchungen zeigten zudem das Vorkommen zweier regulatorisch wirkender Gene, *tfdS* und *tfdR*, die als Positiv- bzw. Negativregulatoren Einfluss auf die Expression von *tfdB* sowie *tfdA* und das *tfdCDEF* Operon nehmen (Harker *et al.*, 1989; Kaphammer & Olsen, 1990). Ihre eigentlichen Funktionen werden in der Literatur jedoch widersprüchlich diskutiert (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008).

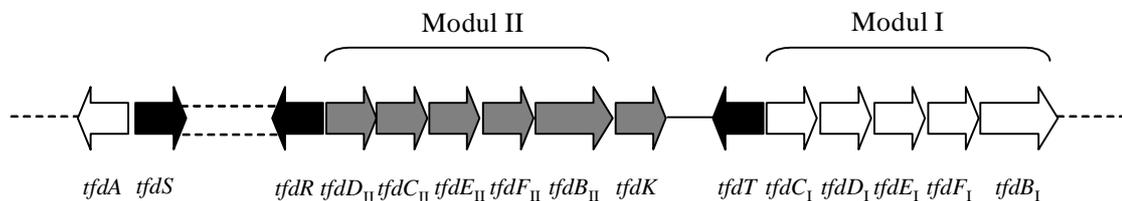


Abbildung 2: Organisation der am 2,4-D Abbau beteiligten *tfd* Gene auf dem Plasmid pJP4 von *Cupriavidus necator* JMP 134, modifiziert nach Ledger *et al.* (2006). Die Ausrichtung der Pfeile zeigt die Transkriptionsrichtung. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

Weitere, am *ortho*-Abbau von 2,4-DCP beteiligte Gene wurden auf den Plasmiden pEST4011 von *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* EST4002 (frühere taxonomische Bezeichnung: *Pseudomonas putida* PaW85; Mäe *et al.*, 1993; Vedler *et al.*, 2000), pRC10 von *Flavobacterium* sp. (Chaudhry & Huang, 1988), pRASC von *Burkholderia* sp. RASC (Suwa *et al.*, 1996) sowie auf pMAB1 von *Burkholderia cepacia* (frühere taxonomische Bezeichnung: *Pseudomonas cepacia* CSV90; Bhat *et al.*, 1994) nachgewiesen. Hoffmann *et al.* (2003) detektierten in *Delftia acidovorans* P4a zudem erstmals chromosomal codierte, am Abbau von 2,4-D beteiligte Gene der *tfd*-Familie. Alternativ zum modifizierten *ortho*-Abbauweg wurde eine *meta*-Spaltung des chloraromatischen Ringes in *Alcaligenes eutrophus* JMP222, resultierend in 2-Hydroxy-3,5-dichlor-6-oxo-hexa-2,4-diensäure als Ringspaltungsprodukt, beschrieben (Koh *et al.*, 1997). Im Hinblick auf die *in situ* Biodegradation von 2,4-DCP ist bislang nicht geklärt, welchem Abbauweg (*ortho* oder *meta*) die größere Bedeutung zukommt.

Die Umsetzung von 2,4-DCP kann, zusätzlich zu den bereits genannten Abbauwegen, auch durch FAD-haltige Phenol 2-Monooxygenasen (Phenolhydroxylasen) katalysiert werden (Pieper *et al.*, 1988; Ditzelmüller *et al.*, 1989). Phenolhydroxylasen (EC 1.14.13.7) hydroxylieren in Gegenwart von Sauerstoff und NAD(P)H Phenol zu Catechol (Kirchner *et al.*, 2003) und katalysieren damit den initialen Reaktionschritt des

Phenolabbau. Eine Vielzahl an Einzel- und Mehrkomponenten Phenolhydroxylasen wurden bereits identifiziert und beschrieben, wobei letztere als dominierend in der Umwelt angesehen werden (Peters *et al.*, 1997). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von *tfdB* und das für die Phenolhydroxylase kodierende Gen *pheA* zeigte eine Übereinstimmung von 46 % und weist auf eine evolutionäre Verwandtschaft beider Gene hin (Nurk *et al.*, 1991). Während das Substratspektrum der 2,4-DCP Hydroxylase jedoch ausschließlich substituierte Phenole umfasst, sind Phenolhydroxylasen in der Lage neben Phenol auch Amino-, Fluor-, Methyl- sowie Chlorphenole umzusetzen (Neujahr & Gaal, 1973; Straube, 1987; Fukuda, 1993).

Aerobe, 2,4-DCP-abbauende Bakterien werden anhand ihrer phylogenetischen Merkmale sowie ihrer am 2,4-DCP Abbau beteiligten Gene in drei Gruppen gegliedert (Kamagata *et al.*, 1997). Die erste Gruppe umfasst copiotrophe Bakterien der *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, darunter die Gattungen *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia* und *Variovorax* (Itoh *et al.*, 2004). In der zweiten Gruppe werden oligotrophe *Alphaproteobacteria* mit enger Verwandtschaft zu *Bradyrhizobium* sp. zusammengefasst. Mitglieder der dritten Gruppe gehören zur Gattung *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*) und sind ebenfalls copiotroph. Ergänzend zu den genannten Mikroorganismen wurden zudem Bakterien der Gattungen *Ochrobactrum* (Müller *et al.*, 1998), *Acinetobacter* (Paisio *et al.*, 2013), *Bacillus* (Wang *et al.*, 2000; Matafonova *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2008), *Flavobacterium* (Chaudhry & Huang, 1988), *Rhodococcus* (Finkel'shtein *et al.*, 2000) sowie *Micrococcus* (Gallizia *et al.*, 2003) mit der Fähigkeit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen zu metabolisieren, isoliert.

Obwohl in den unterschiedlichsten Ökosystemen eine Vielzahl an aktiven 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen nachgewiesen wurde, laufen Biodegradations- und Biotransformationprozesse von 2,4-DCP bei ungünstigen Umweltbedingungen nur langsam ab. Die Verbindung verbleibt länger am Eintragungsort und kann folglich in tiefere, zunehmend anoxische Bodenschichten gelangen. Der mikrobielle Abbau von 2,4-DCP in Abwesenheit von Sauerstoff wird durch die schrittweise Entfernung der Chlorsubstituenten, die sogenannte reduktive Dechlorierung (Abbildung 3), eingeleitet. Dieser Prozess ist von großer Umweltrelevanz, da geringer chlorierte Verbindungen im Allgemeinen weniger toxisch und durch aerobe sowie anaerobe Mikroorganismen leichter zu verwerten sind (Bryant & Schultz, 1994).

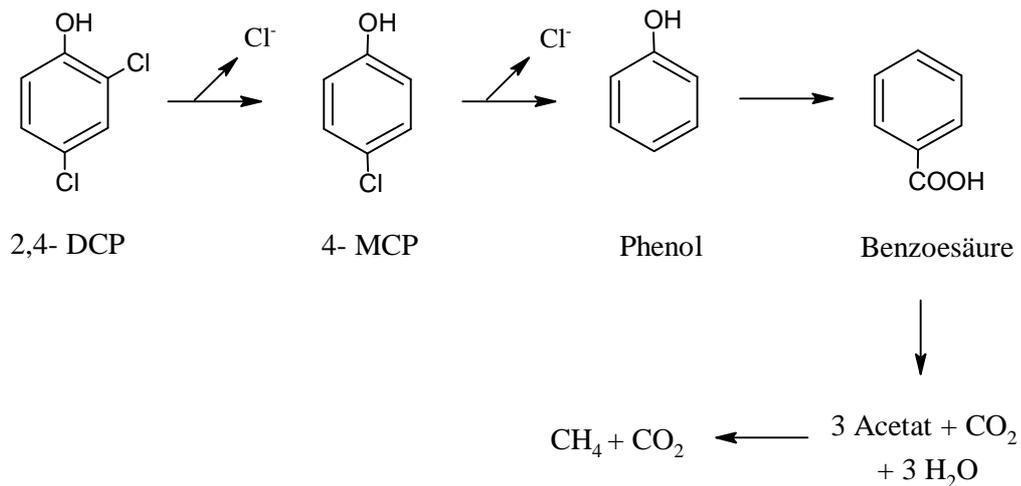


Abbildung 3: Postulierter anaerober Abbau von 2,4-DCP, modifiziert nach Zhang & Wiegel (1990).

In anoxischen Sedimentproben wurde 4-MCP als primäres 2,4-DCP Abbauprodukt detektiert (Kohring *et al.*, 1989 a & b; Zhang & Wiegel, 1990; Takeuchi *et al.*, 2000), das anschließend in einem zweiten Schritt zu Phenol dechloriert wird. Das gebildete Phenol wird durch eine Carboxylierungsreaktion in Benzoesäure umgewandelt, die nach einer Ringspaltung und nachfolgender Methanogenese zu Methan und CO₂ abgebaut wird (Abbildung 3; Zhang & Wiegel, 1990). Am postulierten Abbauweg sind mindestens fünf verschiedene Organismen beteiligt (Zhang & Wiegel, 1990); eine anaerobe Reinkultur, die 2,4-DCP komplett umsetzt, ist bislang nicht bekannt. Anaerobe Bakterien der Gattung *Desulfitobacterium* sind in der Lage, 2,4-DCP reduktiv zu 4-MCP zu dehalogenieren (Utkin *et al.*, 1994; Breitenstein *et al.*, 2001). Verantwortlich dafür ist die reduktive Chlorphenoldehalogenase, die die Entfernung des Chlorsubstituenten in *ortho*-Stellung katalysiert (Van de Pas *et al.*, 1999). Einige der isolierten Bakterien sind zudem befähigt die reduktive Dechlorierung an Wachstum zu koppeln. Bei der sogenannten Dehalorespiration fungiert die chloraromatische Verbindung als Elektronenakzeptor für metabolische Oxidationsprozesse (Holliger *et al.*, 1999). Dabei werden zwei Elektronen, die aus der Oxidation eines Elektronendonors wie Wasserstoff oder Formiat stammen, auf den Chloraromaten übertragen und der Chlorsubstituent wird als Anion abgespalten (Louie & Mohn, 1999). Die Bildung einer geringer chlorierten Verbindung ist an die Erzeugung eines Protonengradientens gekoppelt. Innerhalb der Zelle werden Protonen verbraucht, außerhalb freigesetzt. Die Energiekonservierung in Form von ATP erfolgt durch den Rückfluss der Protonen in die Zelle mit Hilfe einer membrangebundenen ATPase (Schlömman & Reineke, 2007).

1.2. Regenwürmer – Lebensweise und Einfluss auf ihre Umwelt

Der überwiegend positive Einfluss von Regenwürmern auf die Struktur und Fruchtbarkeit von Böden wurde bereits durch Plinius dem Älteren etwa 77 n. Chr. in dem Werk *Historia naturalis* dokumentiert. Mehr als tausend Jahre später widmete der britische Naturforscher Charles Darwin sein letztes Buch der Tätigkeit der Regenwürmer und postulierte darin die zentrale Rolle der Regenwürmer in der Boden- und Humusbildung (Darwin, 1881).

1.2.1. Habitate und ökologische Gruppen

Beinahe überall auf der Erde, ausgenommen in extrem kalten, trockenen oder sauren Regionen, sind Regenwürmer in Böden zu finden (Lee, 1985; Edwards & Bohlen, 1996; Makeschin, 1997). Mit einem Anteil an der Invertebratenbiomasse von bis zu 90 % stellen Regenwürmer die dominierende Makrofauna in Böden dar (Lee, 1985; Schachtschabel *et al.*, 1992). In europäischen Böden wurden pro Quadratmeter zwischen zehn und 1000, vereinzelt sogar bis zu 2000 Individuen gefunden (Schachtschabel *et al.*, 1992; Makeschin, 1997). Dabei sind in der Regel die Regenwurmabundanzen in Weide- und Wiesenböden höher als Garten- und Ackerböden (Lee, 1985; Makeschin, 1997). Böden von Nadelwäldern weisen aufgrund relativ niedriger pH-Werte sowie einer ungeeigneten Nahrung in Form von Nadelstreu eine vergleichsweise geringe Anzahl an Regenwürmern auf (Huhta, 1979).

Regenwürmer gehören zum Stamm der *Annelida* (Ringelwürmer) und werden taxonomisch zu den *Oligochaeta* (Wenigborster), einer Unterklasse innerhalb der Klasse der *Clitellata* (Gürtelwürmer), gezählt (Storch & Welsch, 2004). Weltweit gibt es zwischen 3000 und 6000 bekannte Arten, die 15 bis 21 verschiedenen Familien zugeordnet werden (Lee, 1985; Blakemore, 2003; Chang & James, 2011). Die Mehrheit der in Europa und der restlichen nördlichen Hemisphäre heimischen Regenwürmer gehört zu der Familie der *Lumbricidae*, die etwa 80 Arten umfasst (Makeschin, 1997). In Deutschland gibt es derzeit 39 verschiedene Arten in sechs Gattungen, die alle zu der Familie der *Lumbricidae* gezählt werden (Graff, 1983). Zu den bekanntesten und häufigsten einheimischen Regenwürmern gehören *Lumbricus terrestris* (Trivialname: Tauwurm), *Eisenia fetida* (Kompostwurm) sowie *Aporrectodea caliginosa* (Grau- bzw. Wiesenwurm) (Graff, 1983; Jänsch *et al.*, 2013).

Basierend auf ihren unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsweisen werden Regenwürmer in drei ökologische Gruppen (Ökotypen) eingeteilt (Bouché, 1977).

Danach werden epigäische, endogäische und anözische Formen unterschieden. Epigäische Regenwürmer (z.B. *Eisenia fetida*) leben in der Regel in der organischen Auflage oberhalb des Mineralbodens und ernähren sich überwiegend von Laub und leicht zersetztem Pflanzenstreu. Sie bilden selten Gangsysteme aus und nehmen somit nur wenig Mineralboden auf. Vertreter dieser Gruppe sind mit durchschnittlich einem bis vier Zentimeter Länge eher klein und weisen eine starke Pigmentierung der Kutikula auf (Bouché, 1977; Lee, 1985; Edwards & Bohlen, 1996). Endogäische Regenwürmer, zu denen auch der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte *Aporrectodea caliginosa* zählt, leben im oberen Bereich des Mineralbodens und bilden horizontale Gangsysteme aus. Sie fressen überwiegend Mineralboden, der mit organischem Kohlenstoff aus abgestorbenem Pflanzenmaterial angereichert ist. Die etwa fünf bis 15 Zentimeter großen Regenwürmer weisen keine oder nur eine schwache Pigmentierung der Kutikula auf (Makeschin, 1997). Anözische Regenwürmer (z.B. *Lumbricus terrestris*) leben in vertikalen Gangsystemen bis zu einer Tiefe von drei Metern. Ihre Nahrung besteht aus Mineralboden und Pflanzenstreu, die sie von der Bodenoberfläche in ihre Gänge ziehen. Die starke dorsale Pigmentierung sowie eine Größe von zehn bis 30 Zentimeter sind charakteristische Merkmale dieses Ökotyps.

1.2.2. Ökologische Relevanz

Regenwürmer sind aufgrund der Fähigkeit durch eine Vielzahl verschiedenster Aktivitäten den eigenen Lebensraum zu verändern und neue Lebensräume für andere Organismen zu schaffen wichtige Mitglieder der Bodengemeinschaft (Brown, 1995). Der Bodenbereich, der direkt dem Einfluss von Regenwürmern unterliegt, wird als Drilosphäre bezeichnet (Brown *et al.*, 2000). Sie umfasst neben der Körperoberfläche und dem Darm der Würmer auch die angelegten Bodengänge und die ausgeschiedenen Kotkrümel. Die Drilosphäre ist räumlich und zeitlich sehr dynamisch, wobei der Aktivität und der Verteilung der Regenwürmer eine entscheidende Rolle zukommt (Brown *et al.*, 2000). Regenwürmer zählen zu den Erstzersettern abgestorbener Biomasse und setzen im Boden große Mengen an organischen Materialien wie Streu, Wurzeln, tote Bodentiere aber auch Mikroorganismen, um (Lee, 1985). Zusammen mit dem aufgenommenen Mineralboden werden die organischen Substanzen im Verdauungstrakt mit Verdauungsschleim (Mucus) gründlich vermischt und nach der Darmpassage in Form von Kotkrümeln ausgeschieden (Judas, 1992; Edwards & Bohlen, 1996). Schätzungen gehen davon aus, dass pro Jahr 30 bis 90 Tonnen Bodenmaterial von Regenwurmpopulationen aufgenommen und wieder ausgeschieden werden (Scullion & Ramshaw, 1988; Makeschin, 1997).

Die auf der Bodenoberfläche oder direkt in den Gängen abgelegten Kotkrümel sind im Vergleich zum umgebenden Boden reich an löslichem organischen Kohlenstoff, Nitrat,

Ammonium sowie an den Nährelementen Phosphor, Kalzium, Magnesium und Kalium (Lunt & Jacobson, 1944; Parle, 1963b; Bhandari *et al.*, 1967). Kotkrümel haben damit nicht nur einen positiven Einfluss auf die Bodenfruchtbarkeit sondern wirken sich, aufgrund der Ausbildung von stabilen Bodenaggregaten, zudem günstig auf die Struktur des Bodens aus (Mansell *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004). Regenwurm Kot weist im Vergleich zum unbehandelten Boden eine höhere mikrobielle Aktivität und damit verbunden höhere Mineralisierungs-, Nitrifikations- und Denitrifikationsraten auf (Scheu, 1987; Elliott *et al.*, 1990; Parkin & Berry, 1994; Decaëns *et al.*, 1999). In Kotkrümeln wurden zudem Verbindungen mit Hormon-ähnlichen Wirkungen detektiert, die das Wachstum von Pflanzen fördern bzw. regulieren (Tomati *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2004). Regenwürmer sind auch für die Verbreitung von Pflanzensamen, Bakterien und Pilzen verantwortlich, die im Verdauungstrakt oder der Regenwurmoberfläche über weite Strecken transportiert werden können (Gange, 1993; Brown *et al.*, 2004).

Bei der Fortbewegung im Boden legen endogäische und anözische Regenwürmer Gangsysteme an, die zu einer besseren Bodenbelüftung, einer Erhöhung des Porenvolumens des Bodens sowie einer Steigerung der Wasserkapazität im Boden beitragen (Lee, 1985, Edwards, 2004). Regenwurmgänge verbessern die Struktur von verdichteten, landwirtschaftlich genutzten Böden (Langmaack *et al.*, 2002) und können zudem den Transport von Nährstoffen, aber auch von Pestiziden, in tiefere Bodenschichten begünstigen (Edwards *et al.*, 1993; Don *et al.*, 2008, Stromberger *et al.*, 2012). Die Gangwände sind durch sezernierten Mucus und die abgegebenen Kotkrümel gut stabilisiert und weisen im Vergleich zum umliegenden Boden einen höheren Wassergehalt und pH-Wert sowie höhere Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte auf (Edwards & Bohlen, 1996; Tiunov & Scheu, 1999; Tiunov & Dobrovolskaya, 2002). Die Anreicherung mit organischem Material führt zu einer hohen mikrobiellen Aktivität, die sich u.a. in einer höheren Denitrifikations- und Nitrifikationsrate widerspiegelt (Parkin & Berry, 1999). Regenwurmgänge dienen einer Vielzahl an Bodenorganismen als Lebensraum (Gorres *et al.*, 1997; Maraun *et al.*, 1999) und werden häufig von Pflanzenwurzeln für die Nährstoffaufnahme sowie für die Ausbreitung im Boden genutzt (Brown *et al.*, 2000).

1.2.3. Verdauungssystem

Das Verdauungssystem der Regenwürmer besteht aus Mundöffnung, Mundhöhle, Pharynx (Schlundkopf), Ösophagus (Speiseröhre), Kropf (Drüsenmagen), Muskelmagen, Darmkanal und Anus (Abbildung 4; Van Gansen, 1963; Edwards & Bohlen, 1996; Storch & Welsch, 2004). Die aufgenommene Nahrung wird mit dem im Pharynx

sezernierten Mucus, der die Verdauungsenzyme Amylase und Protease enthält, vermischt und im Kropf gesammelt. Anschließend wird der Nahrungsbrei im Muskelmagen mit Hilfe der chitinhaltigen Kutikula mechanisch zerkleinert. Im Darmkanal erfolgt die eigentliche Verdauung und Resorption der organischen Verbindungen, die durch wurmeigene und/ oder mikrobielle Amylasen, Cellulasen, Chitinasen, Lipasen, Proteasen, Xylanasen sowie weitere Glucosidasen aufgeschlossen werden (Tracey, 1951; Heran, 1956; Urbášek & Pižl, 1991; Curry & Schmidt, 2007; Nozaki *et al.*, 2009). Das Vorkommen und die Aktivität dieser Verdauungsenzyme sind dabei an die Ernährungsweise der Regenwürmer angepasst (Lattaud *et al.*, 1998; Curry & Schmidt, 2007). Die verdaute Nahrung wird anschließend über Darmepithelzellen aufgenommen. Eine dorsale Einfaltung, die Typhlosolis, vergrößert dabei die verdauende und resorbierende Oberfläche des Darmes. Unverdaute Bestandteile werden mit peritrophischen Membranen umhüllt und als Kotkrümel über den Anus ausgeschieden.

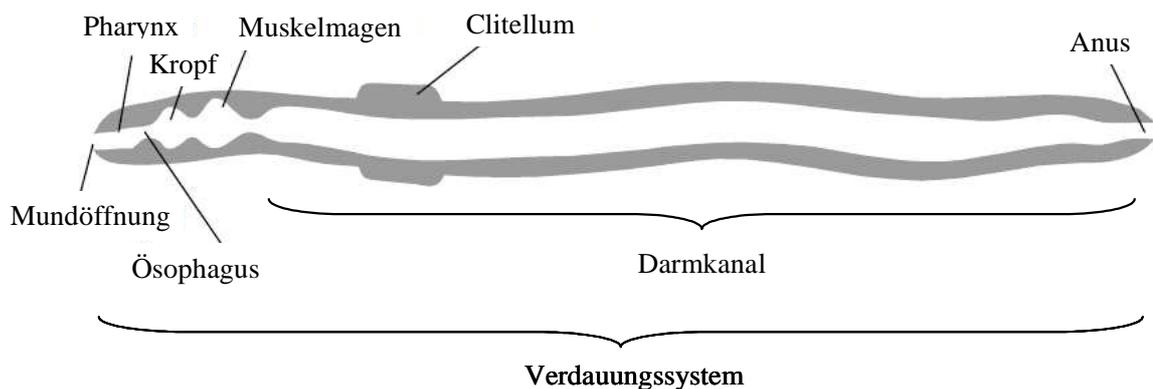


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verdauungssystems eines Regenwurms am Beispiel von *Lumbricus terrestris*, modifiziert nach Horn *et al.*, 2003.

Die Darmpassagezeit, also der Zeitraum den der Boden von der Aufnahme durch die Mundöffnung bis zur Ausscheidung durch den Anus benötigt, unterscheidet sich in den verschiedenen ökologischen Gruppen. Hartenstein *et al.* (1981) zeigten am Beispiel des epigäischen Regenwurms *Eisenia fetida*, dass unabhängig von Gewicht und Größe der Tiere die Darmpassage der aufgenommenen Nahrung 2,5 h dauert. Die Darmpassagezeit von *Aporrectodea caliginosa* liegt in einem Bereich von etwa 1 h bis 20 h, die von *Lumbricus terrestris* von 8 h bis 11 h (Barley, 1959; Martin, 1982; Wüst *et al.*, 2009a; Taylor & Taylor, 2014).

Bei einem angenommenen Darmvolumen von 450 mm^3 pro Wurm und einer Wurmdichte von bis zu 2000 Individuen pro m^2 , kann ein Quadratmeter Boden fast ein Liter Regenwurmdarm enthalten (Drake & Horn, 2007). Der Regenwurmdarm stellt ein

mobiles anoxisches Mikrohabitat in belüfteten Böden dar, das reich an abbaubaren organischen Verbindungen ist, einen neutralen pH-Wert besitzt und einen hohen Gehalt an Wasser, Nitrat, Nitrit, Ammonium sowie Aminosäuren aufweist (Horn *et al.*, 2003; Drake & Horn, 2007; Wüst *et al.*, 2009 a & b). Die *in situ* Bedingungen des Regenwurmdarms bieten somit ideale Voraussetzungen für anaerobe Bodenmikroorganismen, die zusammen mit der Nahrung in den Verdauungskanal gelangen. Der Regenwurmdarm wird als „mutualistisches Verdauungssystem“ beschrieben, in dem die aufgenommenen Mikroorganismen durch den leicht verwertbaren Kohlenstoff des abgesonderten Mucus stimuliert werden („priming effect“) und zu gleich den Abbau von komplexen organischen Verbindungen durch die Produktion von Exoenzymen unterstützen (Barois & Lavelle, 1986; Trigo & Lavelle, 1995; Brown & Doube, 2004). Die Keimzahlen von anaeroben als auch von aeroben Mikroorganismen im Regenwurmdarm liegen häufig deutlich über denen des umgebenden Bodens (Parle, 1963a; Karsten & Drake, 1995; Karsten & Drake, 1997; Schönholzer *et al.*, 1999; Ihssen *et al.*, 2003). So sind zum Beispiel die Zellzahlen von Denitrifikanten und allgemeinen Anaerobiern im Verdauungssystem des Regenwurms bis zu 4000 fach höher als im Boden (Karsten & Drake, 1995; Ihssen *et al.*, 2003).

Bislang wurde eine Vielzahl an Bakterien aus dem Verdauungssystem verschiedenster Regenwurmartens isoliert, darunter Vertreter der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* sowie der *Bacteroidetes* (Toyota & Kimura, 2000; Horn *et al.*, 2005; Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009; Byzov *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2009). Viele dieser Isolate sind Denitrifikanten, Nitrat- bzw. Nitritreduzierer oder Gärer (Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005; Drake & Horn, 2007). Zusätzlich konnten ascomycetale Pilze der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Fusarium* und *Alternaria* aus dem Verdauungstrakt von *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus terrestris* sowie *Eisenia fetida* isoliert und kultiviert werden (Byzov *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu anderen Invertebraten wie Termiten oder Schaben scheinen Regenwürmer keine endogene, spezifische Mikrobiota zu besitzen (Egert *et al.*, 2004; Warnecke *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2012). Zwar wurden Darmwand-assoziierte filamentöse Mikroorganismen in Regenwürmern detektiert (Jolly, 1993; Thakuria *et al.*, 2010), vergleichende molekularbiologische Analysen weisen jedoch darauf hin, dass diese ebenfalls aus dem Boden stammen und quantitativ weniger bedeutsam sind (Drake & Horn, 2007; Thakuria *et al.*, 2010).

1.2.4. Einfluss auf das Schicksal von Xenobiotika

Regenwürmer nehmen durch ihre Grabtätigkeiten und ihr Fraßverhalten direkt sowie indirekt Einfluss auf die Mikroflora und Fauna im Boden. Sie verändern physikalische

und chemische Bodenparameter und folglich die Diversität, Struktur und Aktivität biologischer Gemeinschaften in der Drilosphäre und dem gesamten Ökosystem Boden (Brown, 1995). Aufgrund ihrer Lebensweise sind Regenwürmer im ständigen Kontakt mit der festen und wässrigen Bodenphase und damit verbunden auch mit eingetragenen Schadstoffen wie Schwermetallen und Pestiziden. Ihre Aktivität beeinflusst das Schicksal dieser Verbindungen im Boden auf zweierlei Weisen. Zum einen verändern Regenwürmer die Mobilität und das Sorptionsverhalten von Pestiziden, zum anderen wird die mikrobielle Mineralisierung dieser Stoffe beeinflusst. Die durch Regenwürmer angelegten Gangsysteme erleichtern den Transport des Herbizides Atrazin nach Regenfällen in tiefere Bodenschichten (Edwards *et al.*, 1993; Sadeghi & Isensee, 1994). Zudem trägt die Aufnahme und Verdauung von Pestizid-belasteten Bodenpartikeln und organischem Material durch Regenwürmer zu einer größeren Verbreitung innerhalb der Bodenmatrix im Vergleich zum umliegenden Boden bei (Farenhorst *et al.*, 2000; Binet *et al.*, 2006). Die Gegenwart und Aktivität von Regenwürmern führt weiterhin zu einer erhöhten Sorption von Pestiziden. Binet *et al.* (2006) zeigten für Kotkrümel- und Darmproben von *Lumbricus terrestris* und *Aporrectodea caliginosa* eine Zunahme der Atrazinsorption aufgrund von gebildeten nicht-extrahierbaren Atrazintrückständen. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Bolan & Baskaran (1996) für die Herbizide Atrazin, 2,4-D und Metsulfuronmethyl in Kotkrümeln von *Lumbricus rubellus* und *Aporrectodea caliginosa* gemacht. Basierend auf einem höheren pH-Wert der Kotkrümel ist die Anzahl der negativen Oberflächenladungen erhöht und somit auch die Sorption der eingesetzten Verbindungen. Der anözische Regenwurm *Metaphire guillelmi* verändert das Sorptionsverhalten und damit verbunden die Bioverfügbarkeit der Chlorphenole 2,4-DCP, 2,4,6-TCP und PCP in landwirtschaftlichem Boden (Shan *et al.*, 2011). Die Autoren führen dabei die erhöhte Sorptionskapazität in den Kotkrümeln auf die veränderte Bodenstruktur nach der Darmassage zurück. Auch in den mit organischem Material angereicherten Gangwänden von *Lumbricus terrestris* wurde eine erhöhte Sorption der radioaktiv-markierten Herbizide Atrazin und Metachlor nachgewiesen (Farenhorst *et al.*, 2001).

Die Gegenwart von aktiven Regenwürmern im Boden nimmt des weiteren Einfluss auf die Mineralisierung der eingetragenen Schadstoffe. Dabei werden die Diversität und die Größe der im Boden vorkommenden Bakterien- und Pilzgemeinschaften sowie deren metabolische Aktivitäten durch zusätzlich verfügbare Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, aber auch von den durch die Regenwürmer abgesonderten Sekreten beeinflusst (Tret'yakova *et al.*, 1996; Tiunov & Dobrovolskaya, 2002; Khomyakov *et al.*, 2007; Oleynik & Byzov, 2008). Zudem sind Regenwürmer an der Verbreitung von Mikroorganismen, die zur Biotransformation und / oder Biodegradation von Herbiziden befähigt sind, beteiligt (Daane *et al.*, 1996 & 1997). Während die Mineralisierung von ¹⁴C-Catechol in Kotkrümeln des endogäischen Regenwurms

Octolasion tyrtaeum sowie von Atrazin in Kotkrümeln und Gangwänden des anözischen Regenwurms *Lumbricus terrestris* im Vergleich zum umliegenden Boden erhöht war (Butenschoen *et al.*, 2009; Monard *et al.*, 2010), zeigten Binet *et al.* (2006) und Kersanté *et al.* (2006) eine Abnahme der Atrazinmineralisierung in der Drilosphäre von *Lumbricus terrestris* und *Aporrectodea caliginosa* nach Langzeitinkubation. Die Anwesenheit von Regenwürmern im Boden reduziert nicht nur die Anzahl der Atrazin-abbauenden Bakterien sowie die am Abbau beteiligten strukturellen Gene (Kersanté *et al.*, 2006), sondern verändert auch die taxonomische Zusammensetzung der Atrazin-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft in der Drilosphäre (Monard *et al.*, 2011). Aufgrund der sich unterscheidenden Bodentypen, Regenwurmartentypen, chemischen Verbindungen und Versuchsanordnungen in den einzelnen Studien ist ein direkter Vergleich und somit eine eindeutige Aussage über den Einfluss von Regenwürmern auf das Schicksal von Pestiziden nur bedingt zulässig (Hickman & Reid, 2008).

Regenwürmer akkumulieren in Boden eingetragene Schwermetalle, Pestizide und organische Verbindungen in ihrem Gewebe und werden aufgrund dessen als empfindliche Bioindikatoren für Verunreinigungen des Bodens sowie zur Beurteilung der Bodenqualität herangezogen (Lord *et al.*, 1980; Haimi *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1995; Römbke *et al.*, 2005; Hallgren *et al.*, 2006). Die Aufnahme kann dabei entweder über einen passiven Diffusionsvorgang durch die äußere Membran des Regenwurms („dermale Absorption“) erfolgen oder während der Darmpassage im Zuge der Verdauung („intestinale Absorption“) stattfinden (Sinha *et al.*, 2008; Correia & Moreira, 2010). Regenwürmer sind jedoch in der Lage, die aufgenommenen Verbindungen mittels Sekretion von Esterasen, Phosphatasen und Transaminasen zu detoxifizieren. Die Gegenwart der Pestizide Aldicarb, Cypermethrin, Profenofos, Chlorfluazuron, Atrazin und Metalaxyl führte in *Aporrectodea caliginosa* zu einer Aktivitätszunahme der sauren und alkalischen Phosphatase sowie zweier Transaminasen (Mosleh *et al.*, 2003). Sanchez-Hernandez & Wheelock (2009) detektierten Karboxylesterasen im Gewebe des Verdauungstraktes, in der Zellwandmuskulatur und im Reproduktionsgewebe von *Lumbricus terrestris*. Nach Inkubation mit dem Insektizid Malathion zeigten Regenwürmer der Gattungen *Eisenia* und *Lumbricus* eine Inhibition der Enzymaktivität von Acetylcholin-, Butyrylcholin- und Karboxylesterase (Henson-Ramsey *et al.*, 2011). Die vorliegenden Ergebnisse legen eine Anwendung dieser Enzyme als mögliche Biomarker in Regenwürmern nahe.

1.3. N₂O – ein klimarelevantes Spurengas

Distickstoffmonoxid (N₂O, Lachgas) spielt als Treibhausgas eine wichtige Rolle im Prozess der Klimaerwärmung. Mit einem 300-mal stärkeren Klimaerwärmungspotential als CO₂ und einer globalen Lebensdauer von etwa 114 Jahren nimmt N₂O einen großen Einfluss auf die Umwelt (IPCC, 1996; IPCC, 2007). Treibhausgase wie CO₂, CH₄ und N₂O lassen die einfallende kurzwellige Sonnenstrahlung weitestgehend ungehindert auf die Erdoberfläche durch. Diese erwärmt sich und emittiert langwellige Infrarotstrahlung. Die Infrarotstrahlung wird in Folge von den Treibhausgasen absorbiert, wodurch die effektive Ausstrahlung von der Erde in das Weltall reduziert wird – die Erde erwärmt sich. Weiterhin kann das in die Stratosphäre gelangte N₂O mit atomarem Sauerstoff zu Stickstoffmonoxid reagieren, das zum Abbau von Ozon und damit zur Zerstörung der Ozonschicht beiträgt (Portmann *et al.*, 2012). Die globale atmosphärische N₂O-Konzentration ist von einem vorindustriellen Wert von etwa 270 ppb um 20 % auf etwa 320 ppb im Jahr 2005 angestiegen (IPCC, 2007). Neben den anthropogen-verursachten Emissionen durch eine Intensivierung der Landwirtschaft, das Verbrennen von Biomasse sowie industriellen Prozessen wird N₂O auch in terrestrischen und marinen Ökosystemen gebildet (Bange, 2000; Smith *et al.*, 2012). Etwa 62 % der gesamten jährlichen globalen N₂O-Emission wird auf natürliche und landwirtschaftlich genutzte Böden zurückgeführt (IPCC, 2007). Vor allem intensiv bewirtschaftete landwirtschaftliche Flächen, die mit Stickstoff-haltigen Düngemitteln behandelt werden, tragen zu einer Veränderung des globalen Stickstoffhaushaltes bei (Galloway *et al.*, 2008).

1.3.1. N₂O-bildende Prozesse

Die für die Bildung von N₂O im Boden verantwortlichen Prozesse, die Transformation von Ammonium, Nitrat und Nitrit, werden hauptsächlich von Mikroorganismen durchgeführt (Bremner, 1997; Bateman & Baggs, 2005). Dabei führen die Nitrifikation, Denitrifikation, „Nitrifikanten“ Denitrifikation sowie die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) zu einer signifikanten Bildung von N₂O (Abbildung 5; Bremner, 1997; Kool *et al.*, 2011). Die assimilatorische Nitratreduktion sowie abiotische Prozesse wie die Chemodenitrifikation führen im Vergleich dazu nur zur Bildung von geringen Mengen an N₂O (Bleakley & Tiedje, 1982; Bremner, 1997).

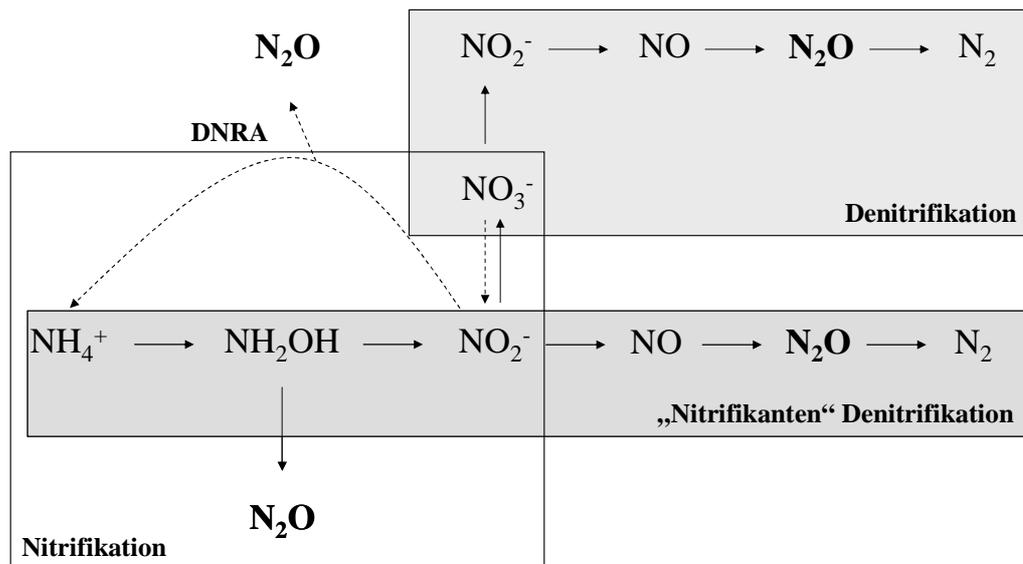


Abbildung 5: N₂O-bildende Prozesse in der Umwelt, modifiziert nach Wrage *et al.* (2001). Ammoniumoxidation und Nitritoxidation bilden zusammen die Nitrifikation. Abkürzungen: DNRA, dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium; NH₄⁺, Ammonium; NH₂OH, Hydroxylamin; NO₂⁻, Nitrit; NO₃⁻, Nitrat; NO, Stickstoffmonoxid; N₂O, Distickstoffmonoxid; N₂, Distickstoff.

1.3.1.1. Nitrifikation

Die Nitrifikation beschreibt die sequentielle Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat in Gegenwart von Sauerstoff, der als Elektronenakzeptor fungiert (Abbildung 5). Dieser obligat aerobe Prozess wird von zwei Gruppen chemolithoautotropher Mikroorganismen katalysiert, den Ammonium- und Nitritoxidierern. Ammoniumoxidierer setzen Ammonium mit Hilfe einer Ammonium-Monooxygenase (*amoA*-kodiert) zu Hydroxylamin um, das von der Hydroxylamin-Oxidoreduktase weiter zu Nitrit oxidiert wird (Wood, 1986; McCarty, 1999). Dabei kann die unvollständige Oxidation von Hydroxylamin zu einer N₂O-Bildung führen (Hooper & Terry, 1979; Stein, 2011). Bislang bekannte Ammonium-oxidierende Bakterien werden den Beta- und Gammaproteobakterien zugeordnet und gehören zu den Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* sowie *Nitrosococcus* (Head *et al.*, 1993). Die Isolierung von Ammonium-oxidierenden Archaeen (Könneke *et al.*, 2005, Hatzenpichler *et al.*, 2008), das häufige Vorkommen einer Archaeen-spezifischen Ammonium-Monooxygenase (Francis *et al.*, 2005) sowie die quantitative Dominanz von *Crenarcheota* in Ozeanen und Böden (Leininger *et al.*, 2006; Beman *et al.*, 2010) indizieren, dass Archaeen ebenfalls zur Nitrifikation befähigt sind und damit eine wichtige Rolle bei der Bildung von N₂O in extremen Lebensräumen spielen (Treusch *et al.*, 2005; Schauss *et al.*, 2009; Gubry-Rangin *et al.*, 2010). Das durch die Ammoniumoxidierer gebildete Nitrit wird in einer Folgereaktion mit einer Nitrit-Oxidoreduktase zu Nitrat umgesetzt (Abbildung 5). An

diesem Prozess sind aerobe Bakterien der Gattungen *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* und *Nitrococcus* beteiligt (Schramm, 2003). Neben den autotrophen Nitrifikanten sind auch heterotrophe Bakterien (u.a. *Alcaligenes faecalis*) und Pilze (u.a. *Absidia cylindrospora*) in der Lage, Ammonium zu Nitrit oder Nitrat zu oxidieren (Stroo *et al.*, 1986; Papen *et al.*, 1989). Im Gegensatz zur autotrophen Nitrifikation ist der heterotrophe Prozess jedoch nicht mit Zellwachstum und Biomasseproduktion verknüpft (Schlegel, 1992; Fuchs, 2007).

1.3.1.2. Denitrifikation

Das durch die Nitrifikanten freigesetzte Nitrat kann unter anoxischen Bedingungen von Denitrifikanten im Rahmen der Denitrifikation als alternativer Elektronenakzeptor genutzt werden. Bei der Denitrifikation erfolgt eine schrittweise Reduktion von Nitrat und Nitrit zu den Distickstoffgasen N_2O und / oder N_2 (Abbildung 5; Zumft, 1997). Die Mehrheit aller bislang bekannten Denitrifikanten sind fakultative Aerobier und bevorzugen O_2 als terminalen Elektronenakzeptor (Shapleigh, 2006). Unter anoxischen oder mikroaerophilen Bedingungen sowie in Gegenwart von Nitrat und / oder Nitrit werden die Denitrifikationsenzyme exprimiert (Zumft, 1997; Baker *et al.*, 1998). Elektronen werden auf Nitrat, Nitrit, NO und N_2O übertragen, wobei ein elektrochemischer Gradient über die Cytoplasmamembran aufgebaut wird (Zumft, 1997). Die Energiekonservierung erfolgt anschließend über die Elektronentransportkettenphosphorylierung (Zumft, 1997).

Eine vollständige Denitrifikation beschreibt die sequentielle Reduktion von Nitrat über die Intermediate Nitrit, NO und N_2O zu N_2 . Die für die einzelnen Schritte verantwortlichen Enzyme sind die Nitratreduktasen (Formel 1a), Nitritreduktasen (Formel 1b), NO -Reduktasen (Formel 1c) und N_2O -Reduktasen (Formel 1d).

Formel 1: Einzelreaktionen der kompletten Denitrifikation (Zumft, 1992).



Die Reduktion von Nitrat wird durch eine Cytoplasmamembran-assoziierte Nitratreduktase (*narGHI*-kodierte) und / oder eine periplasmatische Nitratreduktase

(*napAB*-kodiert) katalysiert (Formel 1a; Sears *et al.*, 1997; Philippot, 2005). Beide Enzyme besitzen Molybdän-Cofaktoren, Eisen-Schwefel-Zentren und Hämgruppen (Philippot & Hojberg, 1999; Richardson *et al.*, 2007). Während die Nitratreduktase NarGHI ausschließlich unter anaeroben Wachstumsbedingungen exprimiert wird, ist die periplasmatische Nitratreduktase NapAB auch in Gegenwart von Sauerstoff aktiv (Bell *et al.*, 1990; Siddiqui *et al.*, 1993). Ihre Aufgabe besteht dabei vermutlich in der Bereitstellung von Nitrit für die aerobe Denitrifikation (Zumft, 1997). Das von der Nitratreduktase gebildete Nitrit wird in einem nächsten Schritt von der Nitritreduktase im Periplasma zu NO umgesetzt (Formel 1b). Nitritreduktasen sind die Schlüsselenzyme der Denitrifikation, da sie die Umwandlung von Nitrit in NO, der ersten gasförmigen Stickstoffverbindung, katalysieren (Zumft, 1997; Hallin & Lindgren, 1999). Je nach Organismus wird die Nitritreduktion von einer Kuper (*nirK*-kodiert)- oder einer Cytochrom cd_1 (*nirS*-kodiert)-abhängigen Nitritreduktase durchgeführt. Die im Periplasma lokalisierten Enzyme können neben Nitrit auch Sauerstoff zu Wasser reduzieren (Rinaldo & Cutruzzolá, 2007). Obwohl beide Nitritreduktasen in einer Vielzahl von Bakterien und Archaeen nachgewiesen wurden, konnte bislang noch kein Organismus identifiziert werden, der sowohl NirK als auch NirS besitzt (Zumft, 1997; Heylen *et al.*, 2006; Shapleigh, 2006). Die Reduktion von NO zu N_2O (Formel 1c) findet an der Außenseite der Cytoplasmamembran statt und wird durch eine membranständige, häm- und eisenhaltige NO-Reduktase (*norBC*-kodiert) katalysiert. Da NO für viele Organismen toxisch ist, besitzen auch nicht-denitrifizierende Mikroorganismen NO-Reduktasen zur Detoxifizierung (Gomes *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006). Der abschließende Schritt der Denitrifikation, die Umwandlung von N_2O zu N_2 (Formel 1d), wird von der periplasmatischen N_2O -Reduktase (*nosZ*-kodiert) katalysiert. Die meisten N_2O -Reduktasen werden in Gegenwart von Acetylen gehemmt, was in Folge zu einer zusätzlichen N_2O -Emission führt (Yoshinari & Knowles, 1976). Daher wird Acetylen häufig zur Abschätzung der kompletten Denitrifikationsaktivität eingesetzt.

Der Denitrifikationsprozess wird durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst. Dabei spielen der pH-Wert, die Temperatur, der Wassergehalt, die Sauerstoff-, Nitrat- und Kohlenstoffverfügbarkeit sowie das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff eine entscheidende Rolle (Tiedje, 1988; Conrad, 1996). So wird beispielsweise die N_2O -Reduktase mit abnehmendem pH-Wert inhibiert und der Anteil an gebildetem N_2O erhöht sich (Knowles, 1982).

Die überwiegende Zahl der Denitrifikanten sind fakultative, heterotrophe Aerobier, die Zucker und / oder organische Säuren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Tiedje, 1988; Shapleigh, 2006). Autotrophe Denitrifikanten verwenden anorganische Schwefelverbindungen, Wasserstoff, Ammonium, Eisen (II) oder Nitrit als

Elektronendonatoren (Zumft, 1997). Die Gruppe der Denitrifikanten ist phylogenetisch sehr divers. Eine Vielzahl an denitrifizierenden Mikroorganismen sind innerhalb der *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- und *Epsilonproteobacteria* zu finden (Zumft, 1992 & 1997; Philippot, 2005). Die Fähigkeit zur Denitrifikation besitzen zudem auch Vertreter der *Firmicutes*, der *Actinobacteria* sowie der *Archaea* (Horn *et al.*, 2005; Shapleigh, 2006). Weiterhin sind ascomycetale Pilze wie z.B. *Fusarium oxysporum* in der Lage, Nitrat oder Nitrit zu gasförmigen Stickstoffverbindungen zu reduzieren (Bollag & Tung, 1972; Burth *et al.*, 1982; Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997). Die daran beteiligten Enzyme sind denen der Bakterien sehr ähnlich und in den Mitochondrien lokalisiert (Kobayashi *et al.*, 1996; Takaya *et al.*, 2003; Watsuji *et al.*, 2003). In Folge ihrer phylogenetischen Diversität sind 16S rRNA-basierte Methoden nicht für die Analyse der Denitrifikantendiversität geeignet. Daher werden strukturelle Markergene, die für verschiedene am Prozess der Denitrifikation beteiligte Enzyme kodieren, eingesetzt. Bislang wurden Primer für Nitrat- und Nitritreduktasegene (*narG*, *narH*, *napA*, *nirS* und *nirK*) sowie für NO- und N₂O-Reduktasegene (*norB* und *nosZ*) für die Untersuchung von verschiedensten Ökosystemen eingesetzt (Flanagan *et al.*, 1999; Hallin & Lindgren, 1999; Braker *et al.*, 2000; Michotey *et al.*, 2000; Petri & Imhoff, 2000; Philippot *et al.*, 2002; Braker & Tiedje, 2003; Throbäck *et al.*, 2004). Denitrifikanten und damit verbunden der Prozess der Denitrifikation sind in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen weit verbreitet (Sørensen, 1978; Palmer *et al.*, 2012; Palmer & Horn, 2012). Ihr Anteil an der Gesamtpopulation heterotropher Bakterien liegt dabei häufig zwischen 0,1 % und 5 % (Tiedje, 1988).

1.3.1.3. „Nitrifikanten“ Denitrifikation

Die „Nitrifikanten“ Denitrifikation stellt unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. ein erhöhter Wassergehalt, eine geringere Sauerstoffverfügbarkeit und ein niedriger pH-Wert, eine weitere wichtige N₂O-Quelle dar (Wrage *et al.*, 2001; Kool *et al.*, 2011). Dieser Prozess kann für bis zu 57 % der N₂O-Emissionen eines Bodens verantwortlich sein (Kool *et al.*, 2011). Ammonium-oxidierende Bakterien (z.B. *Nitrosomonas europaea*) oxidieren dabei Ammonium zu Nitrit, das in Gegenwart einer Kupfer-abhängigen, sauerstofftoleranten Nitritreduktase (*nirK*-kodiert) zu NO reduziert wird (Abbildung 5; Lawton *et al.*, 2013). Die sich anschließende Reduktion von NO zu N₂O wird von NO-Reduktasen katalysiert. Im Vergleich zur anaerob ablaufenden Denitrifikation werden die Reaktionen der „Nitrifikanten“ Denitrifikation durch die Gegenwart von Sauerstoff kaum inhibiert und führen zur Bildung von N₂O als Hauptprodukt (Dundee & Hopkins, 2001). Die eigentlichen Funktionen der „Nitrifikanten“ Denitrifikation in der Umwelt sind bislang noch weitestgehend unklar. Vermutlich dient sie der Detoxifikation von Nitrit, aber auch die Konservierung von Sauerstoff und die Bereitstellung von

Elektronen für die Oxidation von Hydroxylamin werden diskutiert (Poth & Focht, 1985; Beaumont *et al.*, 2002).

1.3.1.4. Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium

Die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) dient neben der Energiekonservierung auch der Detoxifikation von in der Zelle akkumuliertem Nitrit und der Bereitstellung von Ammonium für die Biosynthese. Nitrat wird unter Konservierung von Energie durch membrangebundene (*narG*-kodiert) und / oder periplasmatische Nitratreduktasen (*napAB*-kodiert) zu Nitrit umgesetzt (Abbildung 5). Das gebildete Nitrit wird im Anschluß entweder von einer membrangebundenen (*nrfA*-kodierten) oder einer cytoplasmatischen (*nirB*-kodierten) Nitritreduktase zu Ammonium reduziert (Sudesh & Cole, 2007). Dabei koppelt nur NrfA die Nitritreduktion an die Synthese von ATP und somit an eine Energiekonservierung (Simon, 2002). Als Elektronendonatoren werden häufig Formiat oder Wasserstoff verwendet. Dieser als respiratorische Ammonifikation bezeichnete Prozess läuft in einer Vielzahl von Mikroorganismen, die den Gamma-, Delta- und Epsilonproteobakterien zugeteilt werden, ab (Simon, 2002). Dissimilatorische Nitratreduzierer weisen häufig einen fermentativen Stoffwechsel auf und sind verstärkt in anoxischen Habitaten mit leicht verfügbaren organischen Kohlenstoffquellen, wie z.B. Klärschlamm und den Pansen, anzutreffen (Kaspar *et al.*, 1981; Kaspar & Tiedje, 1981). Im Verlauf der DNRA wird N₂O als Nebenprodukt einer wahrscheinlich unspezifischen Reaktion von Nitrit mit einer Nitratreduktase freigesetzt (Bleakley & Tiedje, 1982; Smith, 1983). Im Vergleich zur Denitrifikation, bei der N₂O das alleinige reduzierte Stickstoffendprodukt sein kann, ist die Wiederfindung des Nitrat-N in N₂O-N jedoch relativ gering (Tiedje, 1988).

1.3.2. Einfluss von Regenwürmern auf die N₂O-Bildung

Die Bildung und Freisetzung von N₂O wird durch eine Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren reguliert. Regenwürmer beeinflussen durch ihre Grabtätigkeiten und ihr Fraßverhalten die *in situ* Bedingungen von Böden und sind zudem in der Lage N₂O sowie N₂ zu emittieren (Karsten & Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Drake & Horn, 2006; Horn *et al.*, 2006b). Die Regenwurm-assoziierte N₂O- und N₂-Emission wird auf die Aktivität von aufgenommenen Denitrifikanten sowie nitrat- und nitritreduzierenden Mikroorganismen zurückgeführt (Matthies *et al.*, 1999; Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2006a; Depkat-Jakob *et al.*, 2010). Die Abwesenheit von Sauerstoff, der hohe Wassergehalt und die Verfügbarkeit von Nitrat und Nitrit sowie von organischen Kohlenstoffverbindungen im Regenwurmverdauungstrakt begünstigen

dabei den Denitrifikationsprozess. Die Freisetzung von N_2O wurde für eine Reihe unterschiedlicher Regenwurmfamilien, darunter *Lumbricidae*, *Megascolecidae* und *Glossoscolidae*, untersucht und beschrieben (Depkat-Jakob *et al.*, 2013). Vertreter dieser Familien, die unter *in situ*-nahen Bedingungen in Bodenmikrokosmen gehalten wurden, emittierten deutlich mehr N_2O als Boden alleine bzw. Regenwürmer ohne Boden (Matthies *et al.*, 1999; Borken *et al.*, 2000). Die Gegenwart von *Lumbricus terrestris* führte zu einem signifikanten Anstieg der kumulativen N_2O -Emission eines Waldbodens um 57 % (Borken *et al.*, 2000). Nebert *et al.* (2011) sowie Lubbers *et al.* (2013) zeigten eine signifikante Zunahme der N_2O -Emission eines Wiesenbodens nach Inkubation mit *Lumbricus rubellus*. Diesen Ergebnissen stehen jedoch Untersuchungen gegenüber, die keinen eindeutigen Effekt von Regenwürmern auf die kumulative N_2O -Emission in Böden beschreiben (Kuiper *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Vielmehr zeigte sich ein Einfluss von abiotischen Faktoren wie dem Wassergehalt oder eine Applikation von Pestiziden (Bertora *et al.*, 2007; Speratti *et al.*, 2007).

1.3.3. Einfluss von Xenobiotika auf die N_2O -Bildung

Schwermetalle sowie Pestizide und deren Abbauprodukte nehmen Einfluss auf die N_2O -bildenden Prozesse. So wurden inhibierende Effekte auf Teilreaktionen der Denitrifikation sowie auf die Abundanz der daran beteiligten strukturellen Gene *nirS* und *nosZ* nach Anwendung von 2,4-DCP, 3,5-DCP, 2,4,5-TCP und 4-Chlor-o-toluidin in verschiedenen Böden sowie in einer Reinkultur des denitrifizierenden Bakteriums *Paracoccus denitrificans* beobachtet (Bollag & Kurek, 1980; Pell *et al.*, 1998; Koutny & Zaoralkova, 2005; Holzem *et al.*, 2014). Die N_2O -Reduktase, die die abschließende Umwandlung von N_2O zu N_2 katalysiert, kann in ihrer Aktivität durch die Gegenwart von Schwermetallen gestört werden (Sakadevana *et al.*, 1999; Holtan-Hartwig *et al.*, 2002). Infolgedessen kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von N_2O in die Atmosphäre. Die Anwendung des Herbizides Simazin führte in einer Reihe von Studien zu einer Hemmung der Nitrifikation und der daran beteiligten Ammonium-oxidierenden Bakterien (Chang *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2014). Die Abundanz und die Zusammensetzung Ammonium-oxidierender Archaeengemeinschaften wurden durch die Gegenwart von Pestiziden hingegen kaum beeinflusst (Hernández *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2014).

Denitrifikation und Dechlorierung von Pentachlorphenol und Chlorphenolen können jedoch auch parallel, ohne inhibitorische Effekte, ablaufen (Sanford & Tiedje, 1997; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013b). Die beiden Prozesse werden von unterschiedlichen mikrobiellen Gemeinschaften durchgeführt, wobei die im Laufe der

Dechlorierung anfallenden Abbauprodukte als mögliche Kohlenstoffquelle für denitrifizierende Mikroorganismen dienen (Sanford & Tiedje, 1997). Yeomans & Bremner (1985) untersuchten den Einfluss von 20 Herbiziden unterschiedlichster Konzentrationen auf die Denitrifikation anhand drei verschiedener Böden. Keine der eingesetzten Verbindungen zeigte bei Einsatz der niedrigsten Konzentration einen signifikanten Effekt. Bei Erhöhung der angewendeten Stoffmenge konnten sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte beobachtet werden. Die abweichenden und teils widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Xenobiotika auf N₂O-bildende Prozesse vielschichtig und von verschiedenen Parametern abhängig ist. So sind vor allem die eingesetzten Verbindungen und die gewählten Konzentrationen, die vorliegende Nitratkonzentration sowie der untersuchte Bodentyp von großer Bedeutung.

1.4. Zielstellung & Hypothesen

Die natürliche Vielfalt chloraromatischer Verbindungen führte im Verlauf der Evolution dazu, dass eine Reihe von Mikroorganismen die Befähigung zum Abbau dieser Substanzen erlangten und damit verbunden einen Vorteil in der Konkurrenz um Kohlenstoff- und / oder Energiequellen (Lechner, 2007). Dabei reflektiert dieser mikrobielle Abbau das Prinzip der „mikrobiellen Unfehlbarkeit“ (Alexander, 1965), dem zur Folge jede natürlich auftretende Verbindung mikrobiell abbaubar ist. Dementsprechend werden auch strukturverwandte Verbindungen anthropogener Herkunft umgesetzt. Jedoch können die Abwesenheit geeigneter Mikroorganismen, unzureichende Umweltbedingungen sowie eine schlechte Bioverfügbarkeit der Verbindungen das Wirken des Prinzips einschränken, so dass einige Substanzen als persistent erscheinen. Regenwürmer stellen in den meisten Böden die dominierende Bodentierpopulation dar (Lee, 1985), die einen starken Einfluss auf physikalische und chemische Bodenparameter sowie auf die mikrobielle Gemeinschaft im Boden nimmt. Somit besteht die Möglichkeit, dass Regenwürmer die Biodegradation und / oder die Immobilisierung von Xenobiotika im Boden (positiv) beeinflussen können. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Gegenwart von Regenwürmern einerseits zu einer Beschleunigung des Abbaus, andererseits zu einer Verstärkung von Sorptionsvorgängen unterschiedlichster Schadstoffe führt (Hickman & Reid, 2008). Die Bildung und Emission des Treibhausgases N₂O ist aufgrund des hohen Klimaerwärmungspotentiales dieser Verbindung von großer Bedeutung. Regenwürmer emittieren *in situ* N₂O und können für bis zu 57 % der Gesamt-N₂O-Emission eines Bodens verantwortlich sein (Borken *et al.*, 2000). Schadstoffe, in Form von Pestiziden und deren Abbauprodukte, beeinflussen N₂O-bildende Prozesse wie Denitrifikation und Nitrifikation in Böden (Pell *et al.*, 1998).

In wie weit sich der Einfluss des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa* auf die Bodenstruktur und die mikrobielle Gemeinschaft auf einen Abbau von 2,4-DCP sowie die Gegenwart dieser chloraromatischen Verbindung im Boden auf die N₂O-Bildung auswirkt, ist bislang weitestgehend unklar und wenig untersucht. Der vorliegenden Arbeit lagen daher folgende Hypothesen und Ziele zugrunde:

- (1) Landwirtschaftlicher Boden und die Drilosphäre beherbergen bislang unbekannte, aktive Mikroorganismen, die 2,4-DCP umsetzen.
 - Bestimmung der 2,4-DCP Biodegradation in der Drilosphäre und im Boden unter oxischen und anoxischen Bedingungen.
 - Isolierung und Charakterisierung potentieller 2,4-DCP Abbauer.
 - Kultivierungsabhängige sowie kultivierungsunabhängige Quantifizierung relevanter 2,4-DCP Abbauer.
 - Diversitätsanalyse potentieller 2,4-DCP Abbauer aus Drilosphären- und Bodenproben.
 - Identifizierung von aktiven, 2,4-DCP-abbauenden Bakterien im Boden und der Drilosphäre.

- (2) 2,4-DCP inhibiert die N₂O-Bildung und das Wachstum von Denitrifizierern und Nitrifizierern in der Drilosphäre.
 - Bestimmung des Effektes von 2,4-DCP auf die Bildung von N₂O in Bodensäulen.
 - Kultivierungsabhängige sowie kultivierungsunabhängige Quantifizierung von Denitrifizierern und Nitrifizierern.
 - Bestimmung des Effektes von 2,4-DCP auf die Diversität denitrifizierender Bakterien.

2. Material & Methoden

2.1. Untersuchungsstandorte und Regenwürmer

2.1.1. Boden

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Boden stammte von der Versuchsstation Klostergut Scheyern (48°30,0'N, 11°20,7'O; Tabelle 2) etwa 40 km nördlich von München. Der tonig, lehmige Boden unterliegt im Zuge des integrierten Pflanzenbaus landwirtschaftlicher Nutzung und wurde letztmalig im Mai 2004 mit MCPA behandelt (Acker-Schlagkartei 2004; <http://fam.weihenstephan.de/scheyern/bewirtschaftung.html>). Die Versuchsstation ist in 21 Sektionen unterteilt; die Probennahme erfolgte im Areal 15 (Abbildung 6).

Tabelle 2: Charakterisierung des verwendeten Bodens vom Klostergut Scheyern.

Eigenschaften	Bodenprobe aus 0-10 cm Tiefe
pH (H ₂ O)	5,87 (± 0,59) ^a
Ton: Silt: Sand (%) ^b	22:36:42
Bodentyp ^b	Dystric Cambisol ^c
Gesamtkohlenstoff (%) ^{d,e}	1,01
Gesamtstickstoff (%) ^{d,e}	0,12
Nitrat (µg/g) ^{d,e}	2,13
Nitrit (µg/g) ^{d,e}	< DL ^f
Eisen (mg/g) ^{d,e}	14,00

^a, Mittelwert aus 7 Messungen

^b, Fuka *et al.*, 2008

^c, nach WRB (World Reference Base for Soil)

^d, Mittelwerte von 2 parallelen Analysen, durchgeführt von der Zentralen Analytik der Universität Bayreuth

^e, bezogen auf das Frischgewicht des Bodens

^f, Detektionslimit = 0,5 mg/l

Die Bodenproben wurden durch Stephan Schulz im Juni 2009, April 2010 sowie April 2011 dem Versuchsareal 15 entnommen und bis zur weiteren Verwendung für maximal vier Wochen bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde der Boden homogenisiert und anschließend gesiebt (Analysesieb 2 mm; Retsch GmbH, Haan, Deutschland).

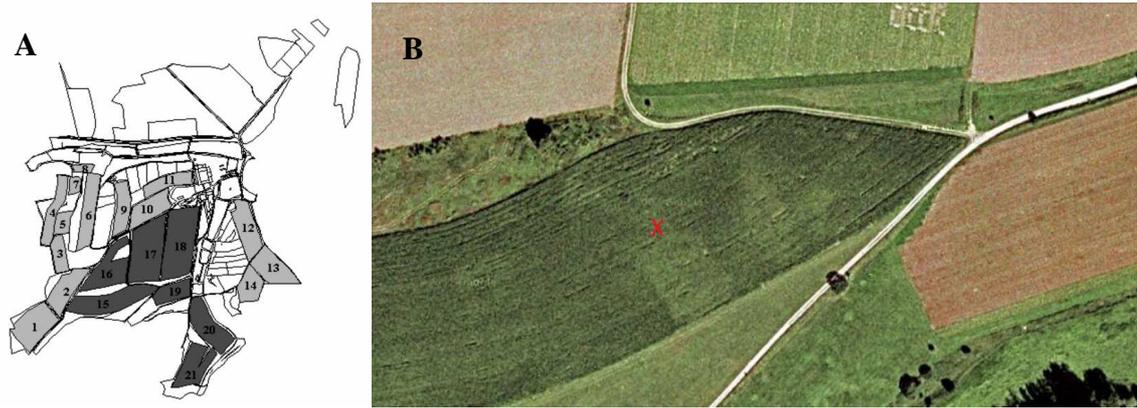


Abbildung 6: Darstellung des Versuchstandortes Klostergut Scheyern (A) und der Probenahmestelle im Areal 15 (B). Photo: Stephan Schulz, 2009

2.1.2. Regenwürmer

Adulte Regenwürmer der Spezies *Aporrectodea caliginosa* (Grauwurm) wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn von der Trafo Wiese (4 km südwestlich von Bayreuth, Tabelle 3) aus einer Tiefe von etwa 20 cm mittels Spaten und Gartenschaufel entnommen. Die Entnahme erfolgte an zufällig ausgewählten Stellen, die mindestens einen Meter voneinander entfernt waren. Die Regenwürmer wurden 24 h bei 15 °C im Versuchsboden gelagert und anschließend zur Darmentleerung für 24 h auf feuchten Zellstoff gelegt (Zorn *et al.*, 2005). Die so behandelten Würmer wurden für Bodensäulen- und Mikrokosmenversuche eingesetzt.

Tabelle 3: Bodeneigenschaften der Trafo Wiese (Horn, 2004). Abkürzungen: TC, Gesamtkohlenstoff; TN, Gesamtstickstoff; TG, Trockengewicht.

Bodenart	pH (H ₂ O)	TC (g/kg _{TG})	TN (g/kg _{TG})	Nitrat (mM) ^a	Nitrit (mM) ^a
sandig, toniger Lehm	6,8	39	3,3	0,32	0,04

^a, bezogen auf den Wassergehalt des Bodens

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Extraktion von 2,4-DCP

Die Extraktion von 2,4-DCP aus Bodenproben erfolgte modifiziert nach Kohring *et al.* (1989a). Bodenproben wurden im Verhältnis 1:2 mit Acetonitril versetzt und bei 15 °C für 1 h im Überkopfschüttler vermischt. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert

(15.000 rpm, 30 min, RT; Beckman Instruments, München) und der Überstand dekantiert. Der Extraktionsvorgang wurde mit dem vorliegenden Bodenpellet wiederholt. Der gesammelte Überstand wurde filtriert (HPLC Nylon Filter, 0,2 µm, Infochroma, Zug, Schweiz) und die 2,4-DCP Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, vgl. 2.2.5.) bestimmt. Die Messung der 2,4-DCP Konzentration in Bodenaufschlämmungen erfolgte nach fünfminütiger Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C; 1-15K Sartorius Mikrozentrifuge, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz) der Ansätze und dem anschließenden Entfernen des Überstandes auf die oben beschriebene Weise. Die Extraktionseffizienz dieser Methode lag bei $99,4 \pm 12,6$ % (n = 16).

2.2.2. Trockengewicht und Wassergehalt

Trockengewicht und Wassergehalt von Boden- und Drilosphärenproben wurden durch Wiegen vor und nach 48-stündiger Trocknung bei 60 °C (Schachtschabel *et al.*, 1992) im Trockenschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt (Formel 2).

Formel 2: Berechnung des Wassergehaltes von Boden- und Drilosphärenproben.

$$\text{Wassergehalt (\%)} = \frac{m_f - m_t}{m_f} * 100$$

m_f , Bodenfrischgewicht; m_t , Bodentrockengewicht

2.2.3. Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert von Bodenproben und Bodenaufschlämmungen wurde mit einer Ingold Combination pH Glaselektrode (U457-S7/110, Steinbach) und einem WTW pH 330 digital pH-Meter (Wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim) gemessen. Bodenproben wurden mit dem doppelten Volumen A. bidest versetzt und homogenisiert. Die Messung des pH-Wertes erfolgte nach 15 min.

2.2.4. Gaschromatographische Messungen

Die Konzentrationen der Gase Kohlenstoffdioxid, Distickstoffmonooxid, Stickstoff und Sauerstoff wurden mit Hewlett-Packard Co. (Palo Alto, CA, USA) 5890 Series II Gaschromatographen (GC) bestimmt. Die verwendeten Säulen und Einstellungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für die Entnahme der Gasproben wurden sterile Spritzen verwendet, die vor und nach jeder Probennahme mit sterilem Argon gespült wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software EuroChrom (Version V3.05, Knauer, Berlin) und externen Standards.

Tabelle 4: Parameter der GC Messungen.

Gase	CO ₂	N ₂ O	O ₂ /N ₂
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor	Elektroneneinfangdetektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
Säule	Chromosorb 102 2 m x 1/8'' (Alltech, Unterhaching)	Porapak Q80/100, 4 m x 1/8'' (Supelco Bellefonte, USA)	Molekularsieb, 2 m x 1/8'' (Alltech, Unterhaching)
Ofentemperatur	40 °C	60 °C	60 °C
Injektortemperatur	150 °C	150 °C	150 °C
Detektortemperatur	175 °C	300 °C	175 °C
Trärgas	Helium	95 % Argon 5 % Methan	Argon
Flussrate	15 ml / min	20 ml / min	33 ml / min
Retentionszeiten	1,8 min	4,3 min	1,1 min (O ₂) 1,3 min (N ₂)
Injektionsvolumen	100 µl	200 µl	100 µl

Für die Berechnung der Gaskonzentration in den Ansätzen wurde der Gasdruck mittels Druckmesser (TensioCheck TC 1090, Tensio-Technik, Geisenheim) bestimmt. Die Gesamtstoffmenge eines Gases (n_{ges}) in den Inkubationsflaschen setzt sich aus der Stoffmenge in der Gasphase (n_{gas}) und dem physikalisch gelösten Anteil ($n_{\text{gel,p}}$) zusammen. Für CO₂ wird zusätzlich der chemisch gelöste Anteil ($n_{\text{gel,c}}$), in Form von HCO₃⁻, berücksichtigt (Formel 3).

Formel 3: Gesamtstoffmenge eines Gases.

$$n_{ges} = n_{gas} + n_{gel,p} + n_{gel,c}$$

Die Stoffmenge in der Gasphase berechnet sich nach Formel 4.

Formel 4: Stoffmenge in der Gasphase.

$$n_{gas} = V_{gas} * \frac{C}{V_{akt,mol}} * \frac{p_{akt} + p_{\ddot{u}}}{p_{akt}}$$

n_{gas} , Stoffmenge in der Gasphase (μmol); V_{gas} , Volumen der Gasphase (ml); C, gemessene Gaskonzentration (ppm); $V_{akt,mol}$, Molvolumen des Gases unter aktuellen Bedingungen (ml); p_{akt} , aktueller Luftdruck (mbar); $p_{\ddot{u}}$, Überdruck im Gefäß (mbar).

Das Molvolumen des Gases ($V_{akt,mol}$) wurde mit der Zustandsgleichung für ideale Gase (Formel 5) bestimmt.

Formel 5: Zustandsgleichung für ideale Gase.

$$V_{akt,mol} = \frac{p_1 * V_1 * T_{akt}}{T_1 * p_{akt}}$$

p_1 , Luftdruck (mbar) unter Standardbedingungen; V_1 , Molvolumen (ml) unter Standardbedingungen; T_1 , Temperatur (K) unter Standardbedingungen; T_{akt} , aktuelle Temperatur (K).

Der physikalisch und chemisch gelöste Anteil des Gases errechnet sich nach Formel 6 und Formel 7.

Formel 6: Physikalisch gelöster Anteil des Gases.

$$n_{gel,p} = V_f * \frac{C}{V_{akt,mol}} * \alpha * \frac{p_{akt} + p_{\ddot{u}}}{p_{akt}}$$

V_f , Volumen der flüssigen Phase (ml); α , Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient (Tabelle 5).

Formel 7: Chemisch gelöster Anteil des Gases.

$$n_{gel,c} = n_{gel,p} * 10^{-pKa+pH}$$

Tabelle 5: Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α für die gemessenen Gase in Wasser bei 20 °C und 25 °C.

Gas	Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient α		Referenz
	20 °C (293,15 K)	25 °C (298,15 K)	
CO ₂	0,850	0,740	Blachnik (1998)
N ₂ O	0,674	0,602	Gmelin (1936)
O ₂	0,031	0,028	Gmelin (1958)
N ₂	0,047	0,043	Gmelin (1936)

2.2.5. Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Messungen (HPLC)

Die Konzentration von 2,4-DCP im Boden und in Bodenaufschlämmungen wurde mittels HPLC bestimmt. Extrakte und wässrige Überstände (vgl. 2.2.1.) wurden filtriert (HPLC Nylon Filter, 0,2 μ m, Infochroma, Zug, Schweiz) und anschließend in HPLC Probenflaschen (VWR International, Darmstadt) überführt. Die Analyse erfolgte mit einem Agilent Technologies 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Böblingen), der mit einem 1200 Series Diodenarray-Detektor (Agilent Technologies, Böblingen), einem Autosampler, einer MultoHigh 100 RP 18-5 μ (250 x 4 mm) Säule sowie einer Vorsäule (20 x 4 mm) (beide CS Chromatographie, Langerwehe) ausgestattet war. Als mobile Phase wurde ein 20 mM Natriumacetat (pH 3) – 50 % Acetonitrilpuffer mit einer Flussrate von 1 ml / min verwendet. Die Säulen-, Injektor- und Detektortemperatur war 30 °C; das Injektionsvolumen der Proben und Standards lag bei 50 μ l. Die Identifizierung und Quantifizierung der chemischen Verbindungen erfolgte anhand mitgeführter externer Standards mit der Software ChemStation (Version B.04.01; Agilent Technologies, Böblingen). Die Reinheit der erfassten Peaks sowie die Substratidentität wurden anhand der aufgenommenen Absorptionsspektren in einem Bereich von 210 nm bis 340 nm unter Verwendung einer Spektrenbibliothek abgeklärt (Abbildung 7).

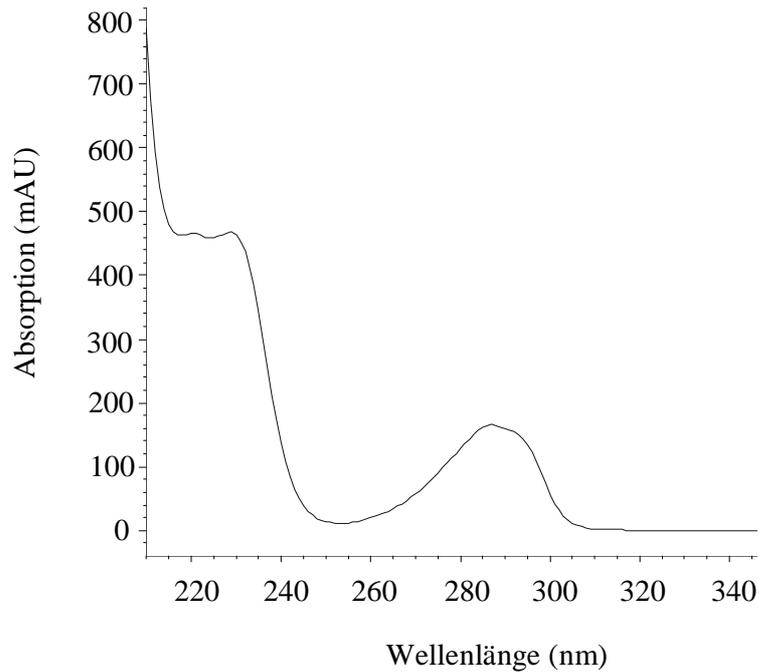


Abbildung 7: Absorptionsspektrum von 2,4-DCP im wässrigen Überstand nach HPLC-Analyse. Die erfassten Absorptionsmaxima lagen bei 230 nm und 290 nm.

2.2.6. Colorimetrische Messungen

2.2.6.1. Ammonium

Die Messung der Ammoniumkonzentrationen erfolgte modifiziert nach Gadkari (1984) in Mikrotiterplatten (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien). 100 μ l Probe wurde mit 50 μ l Natrium-Phenolat (2 % w/v), 25 μ l Natrium-Nitroprussid (0,005 % w/v) und 25 μ l Natrium-Hypochlorid-NaOH-Lösung (112,5 mM NaOH, 10 % Chlorbleichlauge) vermischt und bei 30 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mittels Spektralphotometer (μ Quant, BioTek, Bad Friedrichshall) bei einer Wellenlänge von 630 nm ausgelesen. Standards wurden bei jeder Messung mitgeführt.

2.2.6.2. Eisen (II)

Lösliches Eisen (II) wurde modifiziert nach Tamura *et al.* (1974) bestimmt. Dafür wurden 10 μ l Probe mit 490 μ l 0,5 N HCl versetzt und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend filtriert (HPLC Nylon Filter, 0,2 μ m, Infochroma, Zug, Schweiz) um störende Bodenpartikel zu entfernen. Zu 450 μ l Probenvolumen wurden 50 μ l Acetatpuffer (200 g Ammoniumacetat, 250 ml Eisessig,

ad 500 ml A. bidest) und 50 µl Phenanthrolin-Lösung (0,5 % w/v 1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat) gegeben. 100 µl des orange-roten Eisen-Phenanthrolinkomplexes wurden innerhalb von 5 min in eine Mikrotiterplatte überführt und bei einer Wellenlänge von 512 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Standards wurden bei jeder Messung mitgeführt.

2.2.6.3. Nitrat

Für die Nitratbestimmung modifiziert nach Velghe & Claeys (1985) wurden 85 µl Probe und 4 µl 5 %iges (w/v, 5 g, ad 100 ml A. bidest) Resorzinol in Mikrotiterplatten vermischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 111 µl konzentrierter Schwefelsäure (36 N). Nach vorsichtigem Durchmischen der Ansätze erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 360 nm in einem Spektralphotometer.

2.2.6.4. Nitrit

Die Nitritkonzentrationen wurden modifiziert nach Harrigan & Mc Cance (1966) in Mikrotiterplatten bestimmt. 80 µl Probe bzw. Standards wurden mit 80 µl einer frischen 1:1 Mischung von Grieß A (0,2 g Naphtylamin-7-Sulfonsäure, 120 ml A. bidest, 30 ml Eisessig) und Grieß B (0,5 g Sulfanilsäure, 120 ml A. bidest, 30 ml Eisessig) versetzt und 15 min bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (µQuant, BioTek, Bad Friedrichshall) bei einer Wellenlänge von 550 nm.

2.2.6.5. Sulfat

Die Quantifizierung von Sulfat erfolgte modifiziert nach der Methode von Tabatabai (1982). 100 µl Probe wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und mit 10 µl HCl (0,5 N) sowie 10 µl Barium-Gelatine-Reagenz (0,6 g Gelatine, ad 200 ml A. bidest, 8 g Bariumchlorid Dihydrat) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die entstandene Trübung wurde bei einer Wellenlänge von 420 nm in einem Spektralphotometer gemessen.

2.3. Nährmedien und Kultivierungstechniken

Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden mit A. bidest hergestellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Die Sterilisation erfolgte bei 1 bar Überdruck für 25 min bei feuchter Hitze. Hitzelabile Verbindungen wurden sterilfiltriert (Cellulose-

Acetatfilter, 0,2 μm ; Nalgene Rochester, NY, USA) und den Medien nach Autoklavieren und Abkühlen hinzugefügt.

2.3.1. Flüssigmedien

2.3.1.1. Oxische Flüssigmedien

2.3.1.1.1. Mineralsalzmedium nach Liu et al. (2011a)

NH_4Cl	760 mg
KH_2PO_4	340 mg
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	445,5 mg
$\text{CaCl} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	18,1 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	71,2 mg
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	4,98 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,785 mg
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,81 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,44 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
Hefeextrakt	500 mg
pH 6,6	
ad A. bidest	1000 ml

Vor dem Autoklavieren wurde das Mineralsalzmedium 1:10 mit A. bidest verdünnt und wird nachfolgend als MSM_{10} bezeichnet.

2.3.1.1.2. SOC-Medium nach Hanahan (1983)

Trypton	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl (1 M)	1 ml
KCl (1 M)	0,25 ml
ad A. bidest	90 ml
Nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugeben:	
Mg^{2+} -Stammlösung (2 M)	1 ml
Glukose-Stammlösung (2 M)	1 ml
pH 7	
ad A. bidest	100 ml

Die 2 M Mg^{2+} -Stammlösung wurde aus 20,33 g $MgCl_2$ und 24,65 g $MgSO_4$ (ad 100 ml A. bidest) hergestellt. Für die Glukose-Stammlösung wurden 36 g Glukose in 80 ml A. bidest gelöst und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt. Beide Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.3.1.1.3. PBS-Medium nach Sambrook & Russell (2001)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	0,9 g
KH_2PO_4	0,24 g
pH 7,4	
ad A. bidest	1000 ml

2.3.1.1.4. LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
pH 7,0	
ad A. bidest	1000 ml

2.3.1.2. Anoxische Flüssigmedien

Anoxische Flüssigmedien wurden unter größtmöglichem Sauerstoffausschluss nach der modifizierten Hungate-Technik (Daniel & Drake, 1993) mit Argon als Gasphase in 500 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) hergestellt. Die Flaschen wurden mit Butylgummistopfen und Aluminiumdeckel verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.1.2.1. MSM_{10} -Medien

MSM_{10} , Nitrat (A)

KNO_3	50,55 g
pH 6,6	
ad MSM_{10}	1000 ml

MSM ₁₀ , Nitrat (B)	
KNO ₃	0,243 g
pH 6,6	
MSM ₁₀ , Sulfat	
Na ₂ SO ₄	0,341 g
pH 6,6	
MSM ₁₀ , Eisen	
Fe(III)Cl ₃ x 6 H ₂ O	1,296 g
pH 5,77	
ad MSM ₁₀	400 ml

Die MSM₁₀, Eisen -Lösung wurde nach der Herstellung sterilfiltriert und vor jedem Gebrauch manuell homogenisiert.

2.3.1.2.2. *TSB*_{Denitrifikanten}

Tryptic Soy Broth w/o Dextrose (TSB)	11 g
Glukose	0,144 g
KNO ₃	0,202 g
ad A. bidest	400 ml

2.3.1.2.3. *Weitere Flüssigmedien*

FM _{Nitrat}	
KNO ₃	0,304 g
pH 6,74	
FM _{Sulfat}	
Na ₂ SO ₄	0,426 g
pH 6,64	
FM _{Eisen}	
Fe(III)Cl ₃ x 6 H ₂ O	1,62 g
pH 5,42	
ad A. bidest	500 ml

2.3.2. Stammlösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die eingesetzten 2,4-DCP- und Glukosestammlösungen in sterilem A. bidest angesetzt und vor jeder Verwendung auf eine Kontamination überprüft.

2.3.3. Festmedien

Alle oxischen und anoxischen Festmedien enthielten 1,5 % (w/v) Agar und wurden in sterile Kunststoff-Petrischalen (\varnothing 8,5 cm) gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.3.3.1. Oxische Festmedien

2.3.3.1.1. TSB

Tryptic Soy Broth w/o Dextrose (TSB)	2,7 g
Agar	15 g
ad A. bidest	1000 ml

2.3.3.1.2. LB-Platten

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH 7,0	
ad A. bidest	1000 ml

2.3.3.1.3. LB-Platten mit Ampicillin/ IPTG/ X-Gal

Für die Auswahl repräsentativer Klone (vgl. 2.6.11.3.) wurden LB-Platten (vgl. 2.3.3.1.2.) mit Ampicillin, Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) verwendet. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 50 °C wurden 1 ml einer Ampicillin-Stammlösung

(100 mg/ ml), 1 ml einer IPTG-Stammlösung (0,5 M) sowie 1,6 ml einer X-Gal-Stammlösung (50 mg/ ml in N,N'-Dimethylformamid) zugegeben.

2.3.3.1.4. Nähragar-Platten

Pepton	5 g
Rindfleischextrakt	3 g
Agar	15 g
pH 6,8	
ad A. bidest	1000 ml

2.3.3.2. Anoxisches Festmedium

Anoxisches TSB-Festmedium wurde nach der modifizierten Hungate-Technik (Daniel & Drake, 1993) in 500 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) mit Argon als Gasphase hergestellt. In einer Anaerobenkammer (Mecaplex, Grenchen, Schweiz) wurde das Medium in Petrischalen gegossen und anschließend in Anaeroben-Töpfen (Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm) mit Argon als Gasphase überführt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.3.3.2.1. *TSB_{anoxisch}*

Tryptic Soy Broth w/o Dextrose (TSB)	1,08 g
KNO ₃	202,2 mg
Agar	6 g
ad A. bidest	400 ml

2.4. Inkubationsversuche

Der Einfluss von Regenwürmern auf den Abbau und die Mineralisierung von 2,4-DCP sowie der Effekt von 2,4-DCP auf die Bildung von N₂O wurden mit Hilfe von Bodensäulen und Mikrokosmen untersucht. Die am Abbau beteiligten Mikroorganismen wurden durch die Verwendung stabiler Isotope markiert und identifiziert. Durch den Einsatz von radioaktiv-markiertem [U-¹⁴C]-2,4-DCP konnte eine Mineralisierung in Regenwurm-assoziiertem Material sowie in Bodenproben geprüft werden.

2.4.1. 2,4-DCP Abbau in Bodensäulen

Der Abbau von 2,4-DCP im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern (vgl. 2.1.1.) wurde in abgedunkelten PVC-Kunststoffsäulen [(Durchmesser: 10 cm, Höhe: 30 cm), (Wissenschaftliche Werkstätten, Bayreuth)] im Rahmen zweier unabhängiger Bodensäuleninkubationsversuche untersucht. Der dafür eingesetzte Boden wurde im Juni 2009 sowie im April 2010 durch Stephan Schulz dem Versuchsareal 15 entnommen. Der Wassergehalt des gesiebten Bodens wurde mit sterilem A. bidest bzw. einer, in sterilem A. bidest hergestellten, 2,4-DCP-Stammlösung (vgl. 2.3.2.) auf $22 \pm 3,8$ % [(w/w), (n = 6)] (Liu *et al.*, 2011a&b) eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von frischem, klein geschnittenem Gras [1,8 % (w/w)]. Der Ansatz wurde manuell homogenisiert und $1,1 \pm 0,08$ kg (n = 21) des Bodens Portionsweise in die Säulen überführt und mit der Hand verfestigt. Insgesamt wurden vier verschiedene Ansätze vorbereitet:

- a) Regenwürmer & 2,4-DCP
- b) nur Regenwürmer
- c) nur 2,4-DCP
- d) Kontrolle mit A. bidest

Den Bodensäulen mit Regenwürmern wurden sieben bis zwölf adulte Regenwürmer (vgl. 2.1.2.) mit einer Gesamtbiomasse von $8,46 \pm 0,84$ g (n = 118) zugesetzt (Liu *et al.*, 2011a). Die eingesetzte 2,4-DCP Konzentration von $22,3 \pm 3,0$ mg (n = 6) pro kg Trockengewicht Boden entspricht den in industriell kontaminierten Böden gemessenen 2,4-DCP Werten (Kitunen *et al.*, 1985). Im Rahmen von Vorversuchen wurden zudem 2,4-DCP Konzentrationen in einem Bereich von 20 mg bis 60 mg pro kg Trockengewicht Boden im Hinblick auf ihre Toxizität gegenüber Regenwürmern untersucht. Mit steigender 2,4-DCP Konzentration wurde dabei eine Zunahme der

Mortalität von 30 % auf 100 % beobachtet. Boden, der für die stabile Isotopenbeprobung (vgl. 2.6.5.) verwendet wurde, erhielt anstelle des [^{12}C]-2,4-DCP (Reinheit ≥ 99 %) [U- ^{13}C]-markiertes 2,4-DCP (99 atom-% [^{13}C], Reinheit ≥ 97 %). Anschließend wurden die Kunststoffssäulen durch einen PVC-Deckel mit kreisrunder Öffnung (Durchmesser: 2 cm) verschlossen und bei 15 °C im Dunkeln inkubiert. Die Entnahme von etwa 10 g Boden erfolgte jeden zweiten Tag von der Oberfläche und diente zur 2,4-DCP Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.2.1., 2.2.5.). Sofern kein 2,4-DCP mehr detektiert wurde, erfolgte die komplette Beprobung der Säulen. Dafür wurde der Boden durch vorsichtiges Schütteln aus den Säulen gelöst und horizontal in zwei, etwa gleich große, Hälften geteilt. Die sich auf der Bodenoberfläche angehäuften Kotkrümel sowie die äußere Schicht (< 2 mm; Bouche, 1975) der Gangwände wurden mit einem sterilen Spatel entfernt und in sterile Probengefäße überführt. Der Darminhalt der Regenwürmer wurde nach Betäubung der Tiere mit CO_2 und 20 %igem Ethanol durch behutsames Ausdrücken von anterior nach posterior gewonnen und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bodenproben der oberen 5 cm sowie aus dem Bereich 5 bis 10 cm wurden unter Ausschluss von Drilosphären-Material mit einem sterilen Spatel entnommen und in sterile 50 ml PP- Röhrrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Regenwurm- und Bodenproben für maximal 24 h bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Lagerung der Proben, die für molekularbiologische Untersuchungen verwendet wurden, erfolgte bei -80 °C.

2.4.2. 2,4-DCP Abbau in Mikrokosmen

2.4.2.1. Aerober und anaerober 2,4-DCP Abbau in Bodenaufschlammungen

2,4-DCP Abbauversuche wurden als Duplikate oder Triplikate in 150 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) mit Aluminiumdeckel und Butylgummistopfen durchgeführt (Tabelle 6). Dafür wurde 10 g feldfrischer Boden (vgl. 2.1.1.) mit 40 ml Medium vermischt und der Ansatz mit einer, in sterilem A. bidest hergestellten, 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) versetzt. Die Endkonzentration des Substrates im Inkubationsansatz betrug dabei 100 μM bzw. 200 μM . Die Inkubation erfolgte bei 15 °C im Dunkeln und auf einem Kreisschüttler (150 rpm; KS 501 D, Jahnke & Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen). Zusätzlich zu den Negativkontrollen ohne Bodenmaterial wurden Ansätze mit „sterilem“ Boden sowie mit Kaliumcyanid, einem wirksamen Hemmstoff der Atmungskette, mitgeführt. Somit war es möglich aerobe biotische und abiotische Prozesse zu unterscheiden.

Tabelle 6: Boden, verwendete Medien sowie Inkubationsbedingungen aller angesetzter Mikrokosmen.

Boden	Medium (vgl. 2.3.1.)	2,4-DCP Behandlung ^a	Atmosphäre
Feldfrisch	MSM ₁₀		
	A. bidest	+/-	Sauerstoff
	A. bidest + KCN ^b		
	MSM ₁₀ , Nitrat (A)	+	
	FM _{Nitrat}		Argon
	FM _{Sulfat}	+/-	
Steril ^c	A. bidest	+/-	Sauerstoff
	A. bidest + KCN		
ohne	MSM ₁₀	+	Sauerstoff

^a, +/- mit bzw. ohne 2,4-DCP

^b, KCN Endkonzentration im Ansatz betrug 10 mM (Watanabe *et al.*, 1996)

^c, nach dreimaligem Autoklavieren

2.4.2.2. Aerober 2,4-DCP Abbau in vorbehandelten Regenwurm- und Bodenproben

Um den Effekt einer Regenwurm- und/oder 2,4-DCP Vorbehandlung auf den 2,4-DCP Abbau zu untersuchen sowie 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen zu identifizieren, wurden vorbehandelte Regenwurm- und Bodenproben (vgl. 2.4.1.) in sterile 10 ml Hungate Kulturröhrchen überführt und mit A. bidest versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer [¹²C]- bzw. [U-¹³C]-2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml bzw. für den SIP-Versuch 0,2 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen (Tabelle 7). Die Glasröhrchen wurden danach mit Butylgummistopfen und Kunststoffschraubdeckel verschlossen und bei 15 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Abschätzung des abiotischen 2,4-DCP Abbaus wurde eine Substratkontrolle ohne Bodenmaterial mitgeführt. Die Abnahme von 2,4-DCP in den Mikrokosmen wurde durch regelmäßige Probennahme verfolgt. Dafür wurden etwa 200 µl der homogenisierten Aufschlämmung mit einer sterilen Spritze entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, RT) und Entnahme des Überstandes erfolgte die 2,4-DCP Extraktion mit etwa 500 µl Acetonitril

(vgl. 2.2.1.). Der Überstand sowie der Extrakt wurden in HPLC-Probenflaschen überführt und mittels HPLC (vgl. 2.2.5.) vermessen.

Tabelle 7: Zusammenfassung aller, mit vorbehandeltem Bodensäulenmaterial, angesetzten Mikrokosmen. Abkürzung: SIP, stable isotope probing (vgl. 2.6.5.).

Ansatz	Eingesetztes Material (g)	A. bidest (ml)	2,4-DCP ($\mu\text{g}/\text{Ansatz}$)
2,4-DCP Abbau			
Darminhalt ^a	0,1	4,9	100
Gangwände, Kotkrümel ^a	1,0	4,0	100
Boden (0-5 cm, 5-10 cm) ^a	1,0	4,0	100
Kontrolle	0,0	5,0	100
SIP-Versuch			
<i>[¹²C]-2,4-DCP</i>			
Darminhalt ^a	0,1	4,9	40
Gangwände, Kotkrümel ^a	1,0	4,0	40
Boden (0-5 cm, 5-10 cm) ^a	1,0	4,0	40
<i>[¹³C]-2,4-DCP</i>			
Darminhalt ^a	0,4	4,6	40
Gangwände, Kotkrümel ^a	1,0	4,0	40
Boden (0-5 cm, 5-10 cm) ^a	1,0	4,0	40

^a, Proben stammen aus den Bodensäuleninkubationen (vgl. 2.4.1.).

Mikrokosmen, die für den SIP-Versuch vorbereitet wurden, erhielten alle 10 Tage frische [¹²C]- bzw. [U-¹³C]-2,4-DCP-Stammlösung (0,2 mg/ ml). Gleichzeitig wurde die Gasphase in den Hungate Kulturröhrchen mit 40 ml steriler Luft gespült, um (a) eine aerobe Inkubation zu gewährleisten und (b) eine Akkumulation von ¹³CO₂ zu minimieren (Liu *et al.*, 2011b). Nach einer Inkubationsdauer von 50 Tagen und einem Gesamt- 2,4-DCP-Verbrauch von 300-425 μg pro Gramm Frischgewicht eingesetztes Material erfolgte die Probengewinnung mittels Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, RT). Die Pellets wurden anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.3. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP

2.4.3.1. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP in vorbehandelten Regenwurm- und Bodenproben

Die Bildung von ¹⁴CO₂ und somit eine Mineralisierung von 2,4-DCP in vorinkubiertem Regenwurm- und Bodenmaterial (vgl. 2.4.1.) wurde mittels Bodenaufschlammungen untersucht. Dafür wurden die Proben in sterile 10 ml Hungate Kulturröhrchen überführt und mit sterilem A. bidest versetzt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe einer [¹²C]- und [U-¹⁴C]-2,4-DCP-Stammlösung (0,48 mg/ ml bzw. 3,9 µg/ ml, vgl. 2.3.2.). Als abiotische Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Bodenmaterial mitgeführt (Tabelle 8). Die Röhrchen wurden mit Butylgummistopfen und Kunststoffschraubdeckel verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung des gebildeten ¹⁴CO₂ (vgl. 2.4.3.4.) erfolgte in regelmäßigen Abständen.

Tabelle 8: Zusammenfassung aller vorbereiteten Mikrokosmen für den Mineralisierungsversuch.

Ansatz	Eingesetztes Material (g)	A. bidest (ml)	[¹² C]-2,4-DCP (µg/Ansatz)	[U- ¹⁴ C]-2,4-DCP (µg/Ansatz)	Radioaktivität (kBq/Ansatz)
Darminhalt ^a	0,4	2,0	12	0,1	1,11
Gangwände ^a , Kotkrümel ^a	1,0	4,0	24	0,2	2,23
Boden (0-5 cm, 5-10 cm) ^a	1,0	4,0	24	0,2	2,33
Kontrolle	0,0	5,0	24	0,2	2,42

^a, Proben stammen aus den Bodensäuleninkubationen (vgl. 2.4.1.).

2.4.3.2. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP in feldfrischem Boden mit und ohne Regenwurm

Der direkte Einfluss von Regenwürmern auf die 2,4-DCP Mineralisierung in feldfrischem Boden wurde mit Hilfe von Mikrokosmen untersucht. 65,50 ± 0,32 g (n = 8) gesiebter und mit Gras vermischter Boden (vgl. 2.1.1., 2.4.1.) wurde mit einer [¹²C]- sowie [U-¹⁴C]-2,4-DCP-Stammlösung (0,34 mg/ ml bzw. 3,9 µg/ ml, vgl. 2.3.2.) versetzt, homogenisiert und in 150 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) überführt (Tabelle 9). Den Ansätzen mit Regenwürmern wurde je ein adulter

Wurm mit einer Biomasse von $1,00 \pm 0,25$ g ($n = 4$) zugesetzt. Die Flaschen wurden anschließend mit Aluminiumdeckeln und Butylgummistopfen verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Beprobung erfolgte täglich (vgl. 2.4.3.4.). Um zeitgleich den Abbau von 2,4-DCP zu verfolgen, wurden Kontrollansätze nur mit [^{12}C]-2,4-DCP mitgeführt. Die Bestimmung der [^{12}C]- 2,4-DCP Konzentration erfolgte mittels HPLC (vgl. 2.2.5.).

Tabelle 9: Mikrokosmenansatz zur Untersuchung des Regenwurmeinflusses auf die Mineralisierung sowie den Abbau von 2,4-DCP im landwirtschaftlichen Boden. Abkürzungen: TG, Trockengewicht; RW, Regenwurm; +/-, mit bzw. ohne Regenwurm

Ansatz	pH	Wassergehalt (%) ^a	[^{12}C]/[^{14}C]-2,4-DCP ($\mu\text{g/gTG}$) ^a	Radioaktivität (kBq/Ansatz)
<i>[^{14}C]-2,4-DCP</i>				
+/- RW	6,21	24,9	20,1	4,85
<i>[^{12}C]-2,4-DCP</i>				
+/- RW	6,21	24,9	19,7	-

^a, Mittelwerte aus zwei Messungen.

2.4.3.3. Mineralisierung von [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-2,4-DCP in Regenwurmgewebe

Eine Reihe an wissenschaftlichen Untersuchungen beschreiben die Aufnahme und Akkumulation von Pestiziden und organischen Schadstoffen in verschiedene Regenwurmgewebe (u.a. Ebert, 1992; Gevaio *et al.*, 2001). Karboxylesterasen (EC 3.1.1.1.) dienen der Detoxifikation unterschiedlichster Insektizide (z.B. Carbamate und Pyrethroide) und wurden im Gewebe von *Lumbricus terrestris* detektiert (Sanchez-Hernandez & Wheelock, 2009, Sanchez-Hernandez *et al.*, 2009). Im Verlauf der hydrolytischen Reaktion wird u.a. CO_2 als Endprodukt gebildet (Sogorb & Vilanova, 2002). Enzyme, die an einem Abbau von 2,4-DCP beteiligt sind, konnten jedoch im Regenwurmgewebe bislang nicht nachgewiesen werden.

Um eine mögliche Mineralisierung von 2,4-DCP durch Regenwurmgewebe zu untersuchen, wurden zwölf adulte, mit sterilem Wasser gereinigte Regenwürmer der Gattung *Aporrectodea caliginosa* eingesetzt. Sechs Tiere wurden zur Darmentleerung für 24 h bei 15°C auf feuchten Zellstoff gelegt (vgl. 2.1.2.). Die restlichen Tiere wurden parallel unter gleichen Bedingungen im landwirtschaftlichen Boden inkubiert. Die Betäubung aller Regenwürmer erfolgte anschließend durch eine 30-minütige Begasung mit CO_2 . Die komplette Darmentleerung, der bereits vorher auf Zellstoff inkubierten Tiere, wurde durch behutsames Ausdrücken (vgl. 2.4.1.) vorgenommen. Im

Anschluss wurden die betäubten Würmer mit einer sterilen Schere in kleine, etwa 0,5 cm große Stücke geschnitten, in sterile 10 ml Hungate Kulturröhrchen überführt und mit PBS-Medium (vgl. 2.3.1.1.3.) versetzt. Insgesamt wurden sechs verschiedene Versuchsansätze vorbereitet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Versuchsansätze zur Untersuchung einer Mineralisierung von 2,4-DCP in Regenwurmgewebe. Abkürzungen: RW, Regenwurm; AB, Antibiotika.

Ansatz	Eingesetztes Material (g) ^a	PBS-Medium (ml)	[¹² C]/[¹⁴ C]-2,4-DCP (µg/Ansatz)	Radioaktivität (kBq/Ansatz)
<i>RW ohne Darm^b</i>				
+ AB ¹ & Azid ²	0,42	2,00	9,7	1,21
- AB & Azid	0,37	2,35	9,7	1,21
<i>RW mit Darm^c</i>				
+ AB & Azid	0,43	2,00	9,7	1,21
- AB & Azid	0,39	2,35	9,7	1,21
<i>Kontrollen^d</i>				
+ AB & Azid	0,00	2,40	9,7	1,21
- AB & Azid	0,00	2,75	9,7	1,21

^a, Mittelwerte; ^b, Ansatz in Triplikaten; ^c, Ansatz in Duplikaten; ^d, ein Versuchsansatz
¹, je 50 µl Polymyxin B (2 mg/ml), Clindamycin (0,32 mg/ml) und Ampicillin (2 mg/ml)
², 200 µl Natriumazid (1,3 mg/ml)

Um eine mikrobielle 2,4-DCP Mineralisierung auszuschließen, wurde einigen Ansätzen Antibiotika und Natriumazid hinzugefügt (Tabelle 10). Die Hungate Kulturröhrchen wurden anschließend mit Butylgummistopfen und Plastikdeckeln verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Probennahme erfolgte in regelmäßigen Abständen (vgl. 2.4.3.4.).

2.4.3.4. ¹⁴CO₂-Probennahme und Messung

Die Menge an gebildetem ¹⁴CO₂ wurde mit Hilfe einer zweistufigen CO₂-Falle bestimmt (Abbildung 8). Dabei wurden die Probengefäße (z.B. Hungate Kulturröhrchen; vgl. 2.4.3.1., 2.4.3.2.) über sterile Kanülen (0,9 x 70 mm, Sterican[®], Braun, Melsungen) und Silikonschläuche (ø 0,8 mm) mit zwei aufeinander folgenden und mit jeweils 1 ml

0,5 M NaOH gefüllte, 2 ml PP-Schraubreaktionsgefäße (VWR International, Darmstadt) verbunden (Abbildung 8).

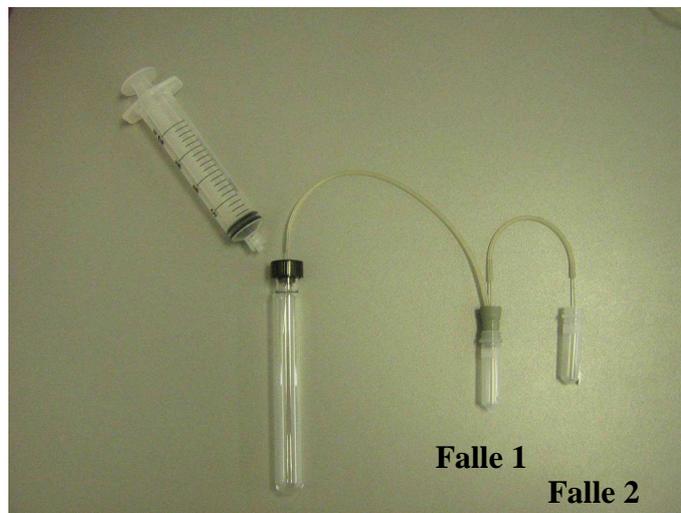
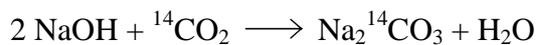


Abbildung 8: Versuchsaufbau der zweistufigen CO₂-Falle. Die Gasphase des Hungate Kulturröhrchens wurde über sterile Schläuche und Kanülen mit zwei Schraubreaktionsgefäßen (Falle 1 und Falle 2) verbunden.

Die Falle 1 wurde zusätzlich durch einen Butylgummistopfen luftdicht abgeschlossen (Abbildung 8), um ein Austreten von nicht gebundenem ¹⁴CO₂ zu verhindern. Die komplette Gasphase wurde anschließend zweimal mit Hilfe einer sterilen 20 ml Spritze ausgetauscht, wobei das gebildete ¹⁴CO₂ in der vorgelegten Natronlauge nach folgender Reaktion gebunden wurde (Formel 8, Gonod *et al.*, 2006).

Formel 8: Reaktionsgleichung der Bindung von ¹⁴CO₂ in Natronlauge.



Je 100 µl der Natronlauge wurden nachfolgend in, mit 5 ml Szintillationscocktail (EcoLume™ Liquid, MP Biomedicals, Eschwege) gefüllten, 20 ml HDPE-Vials (VWR International, Deutschland), überführt und der Ansatz für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der emittierten β-Elektronen durch ein Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 6500, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

2.4.3.5. ¹⁴C-Wiederfindung in den Inkubationsansätzen

Die Wiederfindungsrate von radioaktiv-markiertem Kohlenstoff in Bodenaufschlämmungen (vgl. 2.4.3.1.) wurde nach nachfolgendem Verfahren bestimmt. Am

Ende der Inkubationszeit erfolgte zuerst die Entnahme des wässrigen Überstandes mit Hilfe einer Pasteurpipette. Dem verbleibenden Boden wurden 100 µl einer 2 M HCl Lösung zugesetzt, um noch gebundene Carbonate als $^{14}\text{CO}_2$ frei zusetzen. Die Ansätze wurden verschlossen und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Probennahme (vgl. 2.4.3.4.). Der extrahierbare 2,4-DCP Anteil wurde durch die nachfolgende Zugabe von 2 ml Acetonitril ermittelt (vgl. 2.2.1.). Die Ansätze wurden mit Acetonitril homogenisiert, für 48 h inkubiert und der Acetonitrilüberstand mittels Pasteurpipette entnommen. Die Bodenproben wurden zur Bestimmung des nicht-extrahierbaren 2,4-DCP Anteils bei 60 °C für mindestens 72 h im Trockenschrank getrocknet und im Anschluss 10 min bei 600 °C verbrannt (C/N Analyzer, Multi N/C 2100, Feststoffmodul HT1300, Analytik Jena, Jena). Das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ wurde in 10 ml einer 1 M NaOH aufgefangen. Je 100 µl der gewonnen Proben wurden in 5 ml Szintillationscocktail überführt und vermessen (vgl. 2.4.3.4.).

Für den feldfrischen Boden (vgl. 2.4.3.2.) sowie das Regenwurmgewebe (vgl. 2.4.3.3.) erfolgte die Bestimmung der ^{14}C -Wiederfindung in abweichender Form. Nach der Entnahme des wässrigen Überstandes (Regenwurmgewebe) erfolgte die Extraktion von 2,4-DCP mit 2 ml Acetonitril und die anschließende Inkubation für 48 h. Der Acetonitrilüberstand wurde entnommen und der Boden, die Regenwürmer sowie das Regenwurmgewebe für mindestens 72 h bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Proben wurden bei 600 °C für 10 min verbrannt. Jeweils 100 µl der gewonnen Proben wurden in 5 ml Szintillationscocktail überführt und vermessen (vgl. 2.4.3.4.).

2.4.4. N₂O-Bildung in Bodensäulen

Der Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die N₂O-Bildung im landwirtschaftlichen Boden von Scheyern wurde mit Bodensäulen untersucht (vgl. 2.4.1.). Die Säulen wurden für 23 h mit einem PVC-Deckel luftdicht abgeschlossen. Die Gas-Probennahme erfolgte im Anschluss durch die 2 cm große, durch ein Teflon Septum abgedichtete, Öffnung mit einer 1 ml Spritze. Die N₂O-Konzentration wurde mittels Gaschromatographie (vgl. 2.2.4.) bestimmt. Nach der Probennahme wurden die Säulen für 1 h geöffnet, um zum einen eine ausreichende Sauerstoffversorgung in den Säulen zu gewährleisten und zum anderen, um Bodenproben für die Bestimmung der 2,4-DCP Konzentration zu gewinnen (vgl. 2.2.1.). Die Messung der N₂O-Bildung wurde zeitlich an den Abbau von 2,4-DCP gekoppelt und nach vollständigem Verschwinden des Substrates beendet.

2.5. Mikrobiologische Methoden

2.5.1. Stammhaltung und Kultivierung von *Cupriavidus necator* JMP134

Das im Rahmen der Mineralisierungsversuche (vgl. 2.5.2.2.) sowie in PCR-Reaktionen (vgl. 2.6.7.) als Positivkontrolle eingesetzte gramnegative Bakterium *Cupriavidus necator* JMP134 (Makkar & Casida, 1987; DSM Nr. 4058) wurde von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Aufgrund des übertragbaren Plasmids pJP4 besitzt *C. necator* JMP134 die Fähigkeit, 2,4-DCP abzubauen und zu mineralisieren und wurde in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen als Modellorganismus herangezogen. *Cupriavidus necator* JMP134 wurde auf verfestigtem TSB-Medium (vgl. 2.3.3.1.1.) für 72 h bei 25 °C kultiviert und über kürzere Zeiträume (≤ 30 Tage) mit Parafilm verschlossenen bei 4 °C verwahrt. Für eine längerfristige Stammhaltung wurde das Bakterium in Form einer Glycerinkultur bei -80 °C gelagert. Dafür wurden 350 μ l einer Zellsuspension in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 150 μ l zuvor autoklaviertem Glycerin (50 %, v/v) homogenisiert und anschließend bei RT für 1 h inkubiert. Die Reinheit der Kultur wurde in regelmäßigen Abständen anhand von Vereinzelungsausstrichen überprüft.

2.5.2. Isolierung & Charakterisierung 2,4-DCP-abbauender Bakterien

2.5.2.1. Anreicherung von 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen

Für die Isolierung von 2,4-DCP-abbauenden Bakterien aus dem landwirtschaftlich genutzten Boden sowie aus Regenwurm-assoziiertem Material unter aeroben (I-III) und anaeroben (IV) Bedingungen wurden vier verschiedene Anreicherungsansätze angewendet:

- I) Etwa 0,1 – 1,0 g Drilosphären- und Boden-Material (vgl. 2.4.1.) wurden in 10 ml Hungate Kulturröhrchen überführt und mit 4,0 – 4,9 ml MSM₁₀ (vgl. 2.3.1.1.1.) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.). Die Abnahme des eingesetzten 2,4-DCPs wurde anhand von HPLC-Messungen (vgl. 2.2.5.) in regelmäßigen Abständen überprüft. Sofern kein 2,4-DCP mehr detektiert wurde, erfolgte die erneute Zugabe von 100 μ l 2,4-DCP (1 mg/ ml). Nach jeweils etwa 25 Tagen wurden 0,5 ml der Ansätze in frische 4,5 ml MSM₁₀ transferiert und mit 100 μ l einer 2,4-

DCP-Stammlösung (1 mg/ ml) supplementiert. Nachdem 0,6 mg 2,4-DCP konsumiert wurden, erfolgte die Ausplattierung von 200 µl Aliquots auf verfestigtem TSB-Medium (vgl. 2.3.3.1.1.).

II) 1 g feldfrischer Boden wurde zusammen mit 45 ml MSM₁₀ (vgl. 2.3.1.1.1.) und 3 ml einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) in 150 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) bei 150 rpm auf einem Kreisschüttler (KS 501 D, Jahnke & Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen) inkubiert. Die 2,4-DCP Abnahme wurde anhand von HPLC-Messungen (vgl. 2.2.5.) in regelmäßigen Abständen bestimmt. Sofern kein 2,4-DCP mehr nachgewiesen werden konnte, wurden 5 ml des Ansatzes in 45 ml MSM₁₀ überführt, mit 3 ml einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml) versetzt und die Inkubation fortgesetzt. Nach einem Gesamtverbrauch von 21 mg 2,4-DCP wurden 100 µl Aliquots auf verfestigtem TSB-Medium (vgl. 2.3.3.1.1.) ausplattiert.

III) 5 ml der mit 2,4-DCP vorbehandelten oxischen Bodenaufschlämmungen (vgl. 2.4.2.1.) wurden in 150 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz), gefüllt mit 45 ml MSM₁₀ (vgl. 2.3.1.1.1.), transferiert und mit 5 ml einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) supplementiert. Die Inkubation wurde bei 150 rpm auf einem Kreisschüttler durchgeführt. Die 2,4-DCP Abnahme wurde anhand von HPLC-Messungen (vgl. 2.2.5.) in regelmäßigen Abständen bestimmt. Nach 15 Tagen und dem kompletten Verschwinden von 2,4-DCP wurde ein 5 ml Aliquot in 45 ml MSM₁₀ überführt und erneut mit 5 ml 2,4-DCP (1 mg/ ml) versetzt. Nach 37 Tagen Inkubation erfolgte die Ausplattierung von 100 µl auf verfestigtem TSB-Medium (vgl. 2.3.3.1.1.).

IV) Isolationsversuche unter anoxischen Bedingungen wurden in 150 ml Glasflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) mit Argon als Gasphase durchgeführt. Dafür wurden 5 ml Bodensuspension dem vorangegangenen anaeroben Mikrokosmenversuch (vgl. 2.4.2.1.) entnommen und in 45 ml MSM_{10, Nitrat (A)} (vgl. 2.3.1.2.1.) überführt. Nach Zugabe von 3 ml einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) erfolgte die Anreicherung bei 150 rpm auf einem Kreisschüttler. Sofern kein 2,4-DCP mittels HPLC detektiert wurde, erfolgte die erneute Supplementation mit 3 ml einer 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml). Nach einer Inkubationszeit von 98 Tagen wurden 5 ml des Ansatzes in 45 ml MSM_{10, Nitrat (A)} überführt, mit 3 ml 2,4-DCP (1 mg/ ml) versetzt und anschließend weiter inkubiert. Nach einem Gesamtverbrauch von 12 mg 2,4-DCP wurden 100 µl Aliquots auf verfestigtem TSB_{anoxisch}-Medium (vgl. 2.3.3.2.) ausplattiert. Die Platten wurden anschließend in Sauerstoff-freien Anaeroben-

Töpfen [(Durchmesser: 14 cm, Höhe: 33 cm), (Wissenschaftliche Werkstätten, Bayreuth)] unter Argonatmosphäre inkubiert.

Alle Anreicherungsansätze wurden bei 15 °C im Dunkeln durchgeführt. Nach einer Inkubation von sieben bis 14 Tagen wurden Kolonien unterschiedlicher Morphologie zufällig ausgewählt und als Vereinzlungsausstriche auf neue TSB-Platten überführt. Die Reinheit der Isolate wurde anhand der Einheitlichkeit der Koloniemorphologie sowie der Sequenzanalyse der 16S rRNA Gene (vgl. 2.6.12) festgestellt. Die Isolate wurden auf verfestigtem TSB-Medium über kürzere Zeiträume (≤ 30 Tage) mit Parafilm verschlossenen bei 4 °C verwahrt. Für eine längerfristige Stammhaltung wurden die Isolate in Form einer Glycerinkultur bei -80 °C gelagert (vgl. 2.5.1.).

2.5.2.2. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP durch ausgewählte Isolate

Insgesamt elf verschiedene Isolate (vgl. 2.5.2.1.) wurden für Abbauversuche mit [U-¹⁴C]-2,4-DCP eingesetzt. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 30 °C auf Nähragarplatten (vgl. 2.3.3.1.4.) wurden zwei Impfösen Zellmaterial in 30 ml MSM₁₀ (vgl. 2.3.1.1.1.) resuspendiert und mit 2,5 ml einer sterilen Glukose-Stammlösung (10 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) versetzt. Die Ansätze wurden bei 25 °C und 125 rpm für weitere 48 h inkubiert. Nach der Kultivierung erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation (13.000 rpm, RT, 10 min; J2-21 Zentrifuge, Beckman Instruments, München). Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 10 ml MSM₁₀ gewaschen. Die Zellen wurden anschließend im 6 ml MSM₁₀ resuspendiert und die Optische Dichte (OD_{660nm}) der Zellsuspension bestimmt. Die Abbauversuche wurden in sterilen 10 ml Hungate Kulturröhrchen mit etwa 4 ml MSM₁₀ durchgeführt. Durch das Hinzufügen der entsprechenden Menge an Zellsuspension wurden die gewünschte OD_{660nm} von 0,1 sowie ein Gesamtinkubationsvolumen von 7 ml eingestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe einer [¹²C]- und [¹⁴C]-2,4-DCP-Stammlösung (0,48 mg/ ml bzw. 3,9 µg/ ml, vgl. 2.3.2.). Die Gesamtaktivität im Ansatz betrug dabei 2,27 kBq bei einer 2,4-DCP Konzentration von 17 µg pro Milliliter. Die Hungate Kulturröhrchen wurden anschließend mit Butylgummistopfen und Plastikdeckeln verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Probennahme erfolgte alle drei bis vier Tage (vgl. 2.4.3.4.). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit dem Referenzstamm *Cupriavidus necator* JMP134 (vgl. 2.5.1.) und zur Abschätzung des abiotischen Abbaus eine Substratkontrolle ohne Zellmaterial mitgeführt.

2.5.2.3. 2,4-DCP Toleranz- und Toxizitätstest

Zur Bestimmung der akuten Toxizität von 2,4-DCP wurde ein Untersuchungsansatz, angelehnt an Singer-Bohne *et al.* (1993), vorbereitet. Dafür wurden 30 ml MSM₁₀ (vgl. 2.3.1.1.1.) in sterile 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Glukosevorinkubierten Zellen (vgl. 2.5.2.2.) so angeimpft, dass eine Anfangs-OD_{660nm} von 0,16 erreicht wurde. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml einer Glukosestammlösung (10 mg/ ml, vgl. 2.3.2.). Nachdem die Zellen das erste Drittel der logarithmischen Wachstumsphase erreicht hatten, wurde 2,4-DCP kristallin in Konzentrationen von 0,24 mg, 0,49 mg, 1,2 mg, 2,4 mg und 4,9 mg pro Ansatz hinzugefügt. Zur Ermittlung der Wachstumsraten wurde ein Kontrollansatz nur mit Glukose sowie nur mit MSM₁₀ mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und 125 rpm. Das Wachstum der Zellen wurde stündlich über die Messung der OD_{660 nm} verfolgt.

2.5.3. Lebend-Keimzahlbestimmung

Die Anzahl kultivierbarer Mikroorganismen wurde mittels MPN-Methode (most probable number) bestimmt (Alef, 1991; De Man, 1975). Dieses Verfahren liefert einen statistischen Schätzwert der Konzentration der Mikroorganismen, die in der Lage sind, in einem definierten Medium unter definierten Bedingungen zu wachsen (Bast, 1999). Die Versuchsansätze wurden, aufgrund von auftretenden Sorptionsvorgängen des eingesetzten Substrates 2,4-DCP an Kunststoffoberflächen und damit einhergehend ein Konzentrationsverlust von bis zu 80 % nach 48 h Inkubation (Abbildung-AH 1), in Glasreagenzgläsern mit Wattestopfen durchgeführt.

2.5.3.1. 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen

Für die Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl von 2,4-DCP-abbauenden Organismen in Boden- und Drilosphärenmaterial nach Bodensäuleninkubation (vgl. 2.4.1.) wurden 0,5 bis 2 g Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit steriler Saline (NaCl, 130 mM) vermischt. Aufgrund eines geringeren Gesamtprobenvolumens wurden 0,05 bis 0,1 g des Darminhaltes in einem Verhältnis von 1:100 mit steriler Saline versetzt. Die Suspensionen wurden über Nacht bei 15 °C in einem Überkopfschüttler homogenisiert. In sterilen Reagenzgläsern wurden unter aeroben Bedingungen serielle Verdünnungsreihen in MSM₁₀ (oxisch, vgl. 2.3.1.1.1.) bzw. in MSM₁₀, MSM₁₀, Nitrat (B), MSM₁₀, Eisen oder MSM₁₀, Sulfat (alle anoxisch, vgl. 2.3.1.2.1.) von 10⁻¹ bis 10⁻⁹ hergestellt. 1,8 ml der verschiedenen Medien wurden in sterile Reagenzgläser überführt und mit

0,2 ml der jeweiligen Verdünnung inokuliert. Für jede Verdünnungsstufe wurden drei Parallelen angeimpft. Nach Zugabe von 40 µl einer in sterilem A. bidest hergestellten 2,4-DCP-Stammlösung (1 mg/ ml, vgl. 2.3.2.) wurden die Reagenzgläser mit sterilen Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen und bei 15 °C im Dunkeln für 30 Tage inkubiert. Anoxische Ansätze wurden in Anaeroben-Töpfen unter Argonatmosphäre für 60 Tage bei 15 °C inkubiert. Als Referenzen wurden Substratkontrollen ohne Inokulum zur Abschätzung des abiotischen Abbaus mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeiten erfolgte die 2,4-DCP Konzentrationsbestimmung mittels HPLC (vgl. 2.2.5.). Reagenzgläser mit Inokulum, in denen die 2,4-DCP Konzentration ≤ 75 % der 2,4-DCP Konzentration in den sterilen Kontrollansätzen entsprach, wurden als positiv gewertet (Merini *et al.*, 2007).

2.5.3.2. Denitrifikanten

Die wahrscheinlichste Keimzahl denitrifizierender Mikroorganismen in Boden- und Drilosphärenmaterial (vgl. 2.4.1.) wurde in TSB_{Denitrifikanten} mit Glukose und Nitrat (vgl. 2.3.1.2.2.) bestimmt. 180 µl des Mediums wurden in die Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte verteilt und mit 20 µl der jeweiligen Verdünnung (vgl. 2.5.3.1.) inokuliert. Für jede Verdünnungsstufe wurden fünf Parallelen angeimpft; Kontrollen ohne Inokulum wurden zusätzlich mitgeführt. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und anschließend in einem Anaeroben-Topf mit Argon als Gasphase bei 15 °C im Dunkeln inkubiert. Vertiefungen, die nach etwa 60 Tagen Trübungen aufwiesen, wurden als wachstumspositiv gewertet. Wachstumspositive Vertiefungen, in denen weniger als 20 % des eingesetzten Nitrat-Stickstoffes in Nitrat, Nitrit und Ammonium wieder gefunden wurde, wurden als denitrifikationspositiv gewertet (Horn, 2004).

2.6. Molekularbiologische Methoden

Die Diversität der am 2,4-DCP Abbau beteiligten Mikroorganismen wurde durch molekularbiologische, kultivierungsunabhängige Methoden und Techniken untersucht. 16S rRNA-SIP und anschließende Pyrosequenzierung wurden eingesetzt, um aktive 2,4-DCP Abbauer zu identifizieren. Für die Bestimmung des Einflusses von Substrat und/oder von Regenwürmern auf die Anzahl und Zusammensetzung 2,4-DCP-abbauender Bakterien wurden die strukturellen Gene *tfdB*, *tfdC* und *pheA* amplifiziert und quantifiziert sowie Genbibliotheken angelegt. Die Anzahl von Nitrifizierern und Denitrifizierern wurden anhand von *narG*, *nirK*, *nirS*, *amoA* und *nosZ* bestimmt.

2.6.1. Extraktion von DNA und RNA

Die Extraktion von Nukleinsäuren (DNA und RNA) aus Boden- und Drilosphärenproben (vgl. 2.4.1.) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Griffiths *et al.* (2000). Alle Versuchsschritte wurden in sterilen RNase- und DNase-freien Reaktionsgefäßen durchgeführt. Puffer, Lösungen sowie Überstände wurden mit Filter-Pipettenspitzen pipettiert, um mögliche Kontaminationen der Nukleinsäuren zu vermeiden.

Bis zu 0,6 g Probenmaterial wurde zusammen mit etwa 1 g ausgebackenen Zirkoniumkugeln (0,5 g \varnothing 0,1 mm, 0,5 g \varnothing 0,5 mm; Carl Roth, Karlsruhe) in ein 2 ml PP-Schraubreaktionsgefäß (VWR International, Darmstadt) überführt und anschließend mit 500 μ l warmen Extraktionspuffer (60 °C, 5 % CTAB, 350 mM NaCl, 120 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8) sowie 500 μ l Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8) versetzt. Der Aufschluss erfolgte durch zweimaliges Schütteln in einem Bead-Beater (Fast Prep FP 120, Thermo Savant, USA) bei 5,5 m / s für 30 s. Um ein Überhitzen der Probe zu verhindern, wurden die Ansätze zwischen den beiden Aufschlüssen für 2 bis 3 min auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 13.000 x g (1-15K Sartorius Mikrozentrifuge, Sigma, Osterode im Harz). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zentrifugiert (4 °C, 15 min, 13.000 x g). Der Überstand wurde entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurde so viel an Präzipitationspuffer (30 % PEG 6000, 0,1 M Hepes, pH 7) zu dem Überstand gegeben, bis die Lösung keine Trübung mehr zeigte. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für 2,5 h auf Eis und wurde durch eine nachfolgende Zentrifugation (4 °C, 15 min, 13.000 x g) beendet. Das vorliegende Pellet wurde zweimal mit 500 μ l eiskaltem Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen, um ebenfalls gefällte Salze zu entfernen. Nach gründlichem Entfernen des Ethanols wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 55 μ l RNase/ DNase-freiem Wasser (Gibco[®], Life Technologies GmbH, Darmstadt) gelöst. Zur Minimierung von störenden, präzipitierten Huminsäuren wurde das Reaktionsgefäß für zwei bis drei Minuten bei 65 °C in einem Thermoblock (Thermomixer[®] comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach der Zentrifugation (4 °C, 1 min, 13.000 x g) wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Erfolg der Extraktion wurde spektralphotometrisch überprüft (vgl. 2.6.4.1.). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.6.2. Enzymatische Auftrennung von DNA und RNA

DNA und RNA wurden durch enzymatischen Verdau aufgetrennt. DNA wurde durch die Inkubation von 20 µl Nukleinsäureextrakt (vgl. 2.6.1.) mit 1 µl RNase A (10 µg/µl; Fermentas, St. Leon-Roth) für 20 min bei Raumtemperatur gewonnen. RNA wurde durch die Inkubation von 30 µl Nukleinsäureextrakt (vgl. 2.6.1.) mit 3,2 µl DNase Puffer (10x) und 1 µl DNase I (1 U/µl; Fermentas, St. Leon-Roth) bei 37 °C für 45 min erhalten. Die enzymatische Auftrennung wurde durch die Fällung mit Isopropanol und NaCl (vgl. 2.6.3.) beendet.

2.6.3. Präzipitation von Nukleinsäuren

Im Anschluss an den RNase A- bzw. DNase I-Verdau erfolgte die Fällung mit 0,7 Volumen eiskaltem Isopropanol (100 %, -20 °C) und 0,1 Volumen 5 M NaCl pro 1 Volumen Nukleinsäurelösung (vgl. 2.6.2.; Sambrook & Russell, 2001). Die Inkubation erfolgte über Nacht (mindestens für 12 h) bei -20 °C. Nach Zentrifugation (15 °C, 30 min, 18.000 x g) wurde das DNA- oder RNA-Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 40 µl RNase/ DNase-freiem Wasser (Gibco[®], Life Technologies GmbH, Darmstadt) gelöst. Die Quantifizierung der DNA und RNA wurde mittels Quant-iT[™] Pico- bzw. RiboGreen Reaktionskit (Invitrogen, Karlsruhe; vgl. 2.6.4.2.) durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.6.4. Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.6.4.1. Spektralphotometrie

Die Qualität der extrahierten Nukleinsäuren (vgl. 2.6.1.) sowie die DNA-Konzentrationen in PCR Proben wurden mit einem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) und dazugehöriger Software bestimmt. Mit einem Probenvolumen von 2 µl wurden die Absorptionen bei 280 nm, 260 nm und 230 nm gemessen. Der Absorptionskoeffizient A_{260}/A_{280} beschreibt die Reinheit von DNA und RNA und gibt Auskunft über mögliche Verunreinigungen mit Proteinen und Phenol. Ein Koeffizient von 1,6 bis 2,0 gilt dabei als ideal (Sambrook & Russell, 2001). Huminsäuren zeigen eine starke Absorption bei 230 nm, so dass ein Absorptionskoeffizient A_{260}/A_{230} von < 2,0 auf Kontaminationen mit Huminsäuren hinweist (Tsutsuki & Kuwatsuka, 1979).

2.6.4.2. Fluoreszenz-basierende Quantifizierung

Aufgetrennte und gefällte DNA und RNA (vgl. 2.6.3.), aufgereinigte PCR-Produkte (vgl. 2.6.10.) sowie PCR-Produkte, die für die TRFLP-Analyse (vgl. 2.6.13.) eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe einer auf Fluoreszenz-basierenden Methode quantifiziert. Diese Methode ermöglicht eine sensitive und genaue Quantifizierung sehr geringer Nukleinsäuremengen. Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte in Mikrotiterplatten mittels Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit und dem Quant-iT™ RiboGreen Reaktionskit (beide Invitrogen, Karlsruhe). Die Proben sowie externe Standards mit bekannten Konzentrationen wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und in die Mikrotiterplatte überführt. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz durch ein FLx800 Mikroplatten Fluorometer (BioTek, Bad Friedrichshall) und der Software Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall).

2.6.5. Stabile Isotopenbeprobung (RNA-SIP)

Die Stabile Isotopenbeprobung beschreibt eine Methode zur Identifikation von nicht kultivierten Mikroorganismen, die unter möglichst naturnahen Bedingungen ein mit Isotopen (z.B. ^{13}C) markiertes Substrat bzw. dessen Abbauprodukte assimilieren und für die Synthese von Biomolekülen verwenden (Boschker *et al.*, 1998, Friedrich, 2006). Metabolisch aktive Substrat-verwertende Mikroorganismen bauen folglich das „schwere“ ^{13}C Isotop in ihre Nukleinsäuren ein, wodurch sich die Dichte der Nukleinsäuren erhöht. Nach Extraktion der Nukleinsäuren erfolgt die Auftrennung der DNA von der RNA. Im Rahmen der rRNA basierten stabilen Isotopenbeprobung (RNA-SIP) wird die „schwere“ ^{13}C -markierte RNA von der „leichten“ ^{12}C -RNA mittels Dichtegradientenzentrifugation (isopyknische Dichtegradientenzentrifugation, Ultrazentrifugation) und anschließender Fraktionierung getrennt (Abbildung 9). Die RNA aus den einzelnen Fraktionen wird präzipitiert und über die Reverse Transkription (RT-PCR) in cDNA transkribiert. Aktive ^{13}C -Substrat-verwertende Mikroorganismen werden abschließend über molekularbiologische Techniken (Pyrosequenzierung der 16S cDNA, TRFLP-Analyse) identifiziert.

Die RNA basierte stabile Isotopenbeprobung wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um aktive 2,4-DCP-Kohlenstoff-verwertende Bakterien im landwirtschaftlich genutzten Boden sowie der Drilosphäre nach Inkubation in Bodensäulen und Mikrokosmen zu identifizieren.

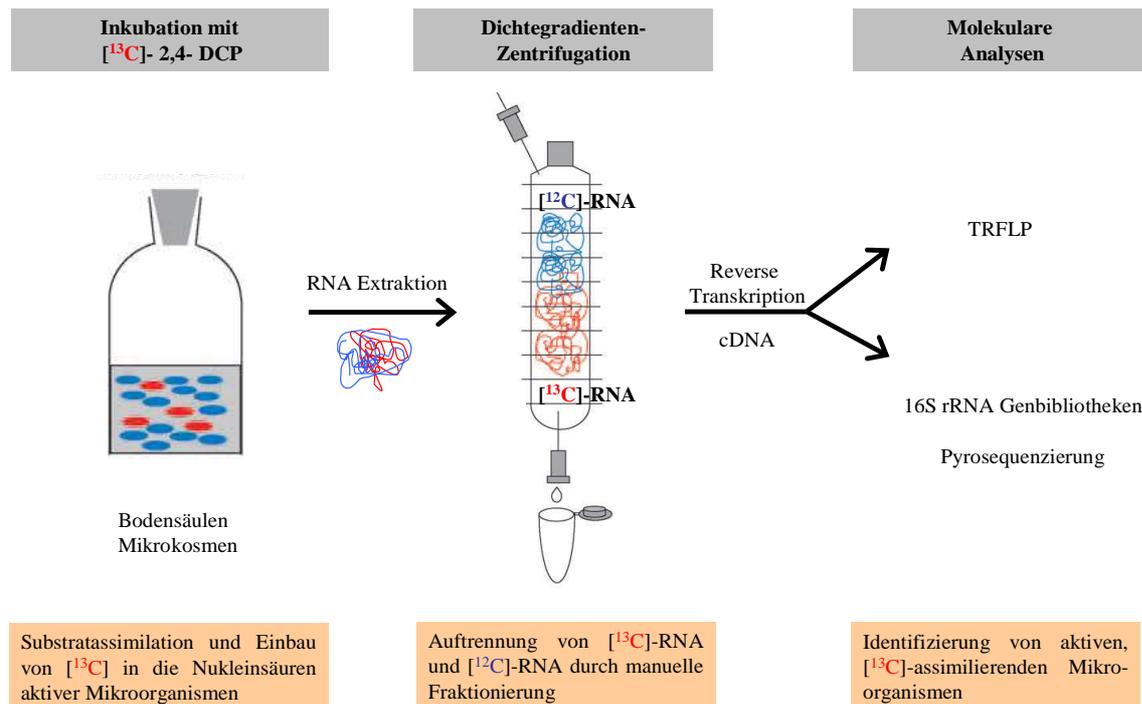


Abbildung 9: Schematische Darstellung der stabilen Isotopenbeprobung, angelehnt an Friedrich (2006).

Um die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen [z.B durch Verschiebung von G+C-reicher ^{12}C -RNA in die „schweren“ Fraktionen, (Liu *et al.*, 2011b; Lüders *et al.*, 2004)] zu minimieren, erfolgte die Analyse und Identifizierung aktiver 2,4-DCP Abbauer anhand einer Reihe von definierten Vorgaben. Alle Resultate basieren auf dem Vergleich der relativen Häufigkeiten der detektierten Taxa in „schweren“ Fraktionen von ^{13}C - und ^{12}C -2,4-DCP inkubierten Proben. 16S rRNA Genbibliotheken wurden von jeweils drei „schweren“ Fraktionen (vgl. 2.6.5.5.) jeder Probe generiert, *in silico* vereinigt und anschließend zusammen analysiert. Die nachfolgenden vier Kriterien wurden als Grundlage für eine erfolgreiche Markierung der OTUs (nähere Definition vgl. 2.6.15.1., 2.6.15.3.) herangezogen (Dallinger & Horn, 2014):

- I) Eine größere relative Häufigkeit der OTUs in den „schweren“ Fraktionen der ^{13}C -Proben als in den „schweren“ Fraktionen der Kontroll- ^{12}C -Proben.
- II) Eine größere relative Häufigkeit der OTUs in den „schweren“ Fraktionen der ^{13}C -Proben am Ende der Inkubation (t_{end}) im Vergleich zum Beginn der Versuche (t_0).
- III) Eine gleiche oder geringere relative Häufigkeit der OTUs in den „schweren“ Fraktionen der ^{12}C -Kontrollproben zum Zeitpunkt t_{end} als zum Zeitpunkt t_0 .

IV) Für OTUs, die die Kriterien I – III erfüllen: eine Labelling Intensität (LI) von mindestens 5 % (Liu *et al.*, 2011b).

Die Labelling Intensität ist ein Schätzwert, der die assimilierte Menge von ^{13}C durch ein Taxon beschreibt (Liu *et al.*, 2011b) und nach Formel 9 berechnet wurde.

Formel 9: Berechnung der Labelling Intensität (LI).

$$LI_n = \frac{R_n^{13\text{C}} - R_n^{12\text{C}}}{\sum_1^j LI_i} \times 100$$

n , Taxon; $R_n^{13\text{C}}$, relative Häufigkeit eines Taxons in den schweren Fraktionen der ^{13}C -Amplikon-Genbibliothek; $R_n^{12\text{C}}$, relative Häufigkeit eines Taxons in den schweren Fraktionen der ^{12}C -Amplikon-Genbibliothek; j , Anzahl der markierten Taxa; i , Index von 1 bis j

Die im Verlauf der Fraktionierung (vgl. 2.6.5.3), der Erstellung der Amplikon-Genbibliotheken (vgl. 2.6.7.1., 2.6.15.1.) sowie der Pyrosequenzierung erfolgten Eingriffe in die *in situ* auftretende OTU Verteilung führen zu künstlichen Variationen und können in Folge die relativen Häufigkeiten von OTUs in den jeweiligen „schweren“ Fraktionen beeinflussen. Um diesen Effekt auf ein Minimum zu reduzieren, wurde ein Kontrollgrenzwert eingeführt. Für die Grenzwertberechnung wurden die aufgetretenen Differenzen der relativen Häufigkeiten der detektierten OTUs in den „schweren“ Fraktionen der ^{13}C -Proben und der „schweren“ Fraktionen der ^{12}C -Kontrollproben zum Zeitpunkt t_0 herangezogen. Die mittlere Differenz (\pm Standardabweichungen) der Vorwärtsprimer-basierenden Analyse lag bei $0,34 \pm 0,28$ ($n = 22$), die der Rückwärtsprimer-basierenden Analyse bei $0,41 \pm 0,36$ ($n = 23$). Die ermittelten Differenzen zeigen, dass die experimentell-bedingten Abweichungen minimal waren. Unterschiede zwischen den relativen Häufigkeiten von ^{13}C - und ^{12}C -Proben wurden als signifikant betrachtet, wenn sie einen errechneten Kontrollgrenzwert von 1,18 (Vorwärtsprimer-basierende Analyse) bzw. 1,49 (Rückwärtsprimer-basierende Analyse) überschritten (Formel 10). Mit diesem Grenzwert wurden die errechneten Differenzen zu 99,7 % von Zufallsgrößen bereinigt und können somit als gesichert angesehen werden (Westgard *et al.*, 1981; Gove *et al.*, 2013).

Formel 10: Berechnung des Kontrollgrenzwertes.

$$GW = MD_{t_0} + 3 \times \sigma$$

GW, Grenzwert; MD_{t_0} , mittlere Differenz der ^{13}C - und ^{12}C -Proben zum Zeitpunkt t_0 ; σ , Standardabweichung

2.6.5.1. Allgemeine Vorbereitungen

Alle eingesetzten Materialien wurden vor Gebrauch ausgebacken (Messkolben, Messzylinder, Glasflaschen, Spatel; 12 h, 200 °C) oder mit DEPC behandelt (Gummistopfen, Magnetrührer) und anschließend autoklaviert. Die Reinigung der Arbeitsflächen erfolgte direkt vor der Benutzung mit 70 % Ethanol und RNase-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH, Darmstadt). Für die Herstellung des Gradientenpuffers sowie die Resuspendierung der RNA wurde DEPC-Wasser (999 ml A. bidest, 1 ml DEPC; Inkubation für 4 h bei 37 °C, anschließend autoklavieren) verwendet.

2.6.5.2. Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation

Für die Herstellung der Gradientenlösung (Soll-Schwebdichte: $1,790 \pm 0,05$ g / ml; Ist-Schwebdichte: $1,809 \pm 0,004$ g / ml) wurden pro Zentrifugationsansatz 4,61 ml Cäsium-Trifluoracetat (CsTFA, Schwebdichte: $2,00 \pm 0,05$ g / ml, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 175 µl Formamid sowie etwa 800 µl Gradientenpuffer (Schwebdichte: 1,026 g / ml; 100 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 8) verwendet. Die Dichte der Gradientenlösung wurde bei 25 °C durch Auswiegen vor jedem Zentrifugationslauf bestimmt und gegebenenfalls durch die Zugabe von Gradientenpuffer neu eingestellt. Bis zu 500 ng der gefällten und quantifizierten RNA (vgl. 2.6.3., 2.6.4.2.) wurden mit 1 ml Gradientenlösung gemischt und anschließend in 4,9 ml Zentrifugenröhrchen (OptiSeal™ Polyallomer Tube, 13 x 48 mm, Beckman Coulter, Palo Alto, USA) überführt. Die Röhrchen wurden mit Gradientenlösung aufgefüllt, durch ein PPE-Verschlussstopfen geschlossen und ausgewogen. Der maximale Gewichtsunterschied betrug dabei 0,05 g. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Aluminium Distanzhalter in einen Vti 65.2 Titanium Rotor (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) überführt und mit Befestigungsschrauben versehen. Mit Hilfe eines Drehmomentschlüssels (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) wurden die Schrauben mit einem Anzugsmoment von 60 bis 70 lbf-in (etwa 6,8 bis 7,9 Nm) festgezogen. ¹²C- und ¹³C-RNA wurde durch isopyknische Zentrifugation bei 37.800 rpm für 67 h und 20 °C (LE-70 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto, USA) aufgetrennt. Um die ausgebildeten Gradienten nicht zu beeinflussen, wurde der Rotor am Ende der Zentrifugation auslaufen gelassen.

Insgesamt wurden vier Zentrifugationsläufe mit 30 Proben (vgl. 2.4.1., 2.4.2.2.) durchgeführt. Mindestens eine Leerprobe (Gradientenlösung ohne RNA) wurde in

jedem Lauf mitgeführt, um die Schwebdichte in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen (vgl. 2.6.5.4.).

2.6.5.3. Fraktionierung



Die Fraktionierung der Proben wurde manuell mit einer Gradientenpumpe (Econo Pump 1, Bio Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Dafür wurden die Zentrifugenröhrchen behutsam dem Rotor entnommen und in ein Stativ eingespannt. Eine sterile Nadel (23G x 1''), die über einen Silikonschlauch (\varnothing 1,6 mm) mit der Gradientenpumpe verbunden war, wurde direkt unter den Verschlussstopfen vorsichtig in das Röhrchen eingeführt. Mit einer zweiten Nadel erfolgte die Öffnung des Bodens. Die Gradientenpumpe wurde mit einer Flussrate von 0,45 ml / min gestartet und steriles DEPC-Wasser, gefärbt mit Coomassie Brilliantblau (5 g / l), auf die RNA-Gradientenlösung gepumpt (Abbildung 10).

Abbildung 10: Fraktionierung einer Probe.

Pro Probe wurden elf Fraktionen mit einem Volumen von etwa 400 μ l aufgefangen, wobei die letzte Fraktion teilweise mit DEPC-Wasser verunreinigt war und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Im Anschluss an die Fraktionierung erfolgten die Bestimmung der Schwebdichte (vgl. 2.6.5.4.) sowie die Fällung der RNA (vgl. 2.6.5.5.). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.6.5.4. Bestimmung der Schwebdichte

Die Schwebdichte wurde in den Fraktionen eins bis zehn des mitgeführten Leerwertes ohne RNA durch Auswiegen bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem Wasserbad bei 25 °C für 30 bis 60 min temperiert, durch vortexen homogenisiert und 100 μ l Aliquots auf einer analytischen Waage (Analytic AC 120 S, Sartorius, Garching) ausgewogen. Die Messungen wurden insgesamt zehnmal wiederholt und Mittelwerte gebildet. Der daraus resultierende lineare Graph bildete die Grundlage zur Auswahl der „schweren“ Fraktionen, die für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

2.6.5.5. Präzipitation der RNA

Die RNA aus den Fraktionen eins bis zehn aller Proben wurde nach Degelmann *et al.* (2009) gefällt. 100 µl jeder Fraktion wurden mit 65 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2), 6,8 µl Glykogen (10 mg/ml, autoklaviert) sowie 510 µl eiskaltem Ethanol (96 %, -20 °C) vermischt und über Nacht (mindestens 12 h) bei -20 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C, 14.000 x g, 20 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mittels RiboGreen (vgl. 2.6.4.2.) quantifiziert. Ein Teil der Proben wurde direkt für die Reverse Transkription (vgl. 2.6.6.) eingesetzt, der verbleibende Rest wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Anhand der vorliegenden Dichtebestimmungen (vgl. 2.6.5.4.) und der RNA-Verteilungen wurden für 28 Proben jeweils drei „schwere“ Fraktionen für die anschließenden Untersuchungen ausgewählt. Für zwei Proben erfolgte eine Untersuchung des kompletten Gradientens (Fraktionen eins bis zehn).

2.6.6. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Darmstadt) in einem PeqStar Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) und einem LabCycler (SensoQuest GmbH, Göttingen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die cDNA Synthese erfolgte dabei nach folgendem Programm: Inkubation bei 25 °C für 5 min, Inkubation bei 50 °C für 2 h und anschließend die Deaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min. Die Ansätze wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und die cDNA nachfolgend mit Isopropanol und NaCl (vgl. 2.6.3.) gefällt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.6.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ist ein Verfahren für die direkte Amplifizierung von DNA- und cDNA-Fragmenten aus Nukleinsäuregemischen. Das zu amplifizierende Fragment wird dabei durch Primer definiert, die die Zielsequenz flankieren (Saiki *et al.*, 1988). Eine PCR läuft in drei Schritten ab: (1) Denaturierung der Matrizen-DNA (Template), (2) Anlagerung der spezifischen Primer an die einzelsträngige DNA und (3) Verlängerung der komplementären Stränge durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Lewin, 1998). PCR Reaktionen wurden in einem LabCycler (SensoQuest GmbH, Göttingen), einem PeqStar Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bzw. in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die eingesetzten Primer wurden von Biomers (biomers.net GmbH, Ulm) und von Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen. Bei allen PCR-Reaktionen wurden eine Negativkontrolle (Ansatz mit PCR Wasser oder RNA anstatt der Matrizen-DNA) und – falls vorhanden- eine Positivkontrolle mitgeführt. Der Erfolg der PCR wurde stets mit einem Agarosegel (vgl. 2.6.9.) überprüft.

2.6.7.1. Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von 16S rRNA Genen

Für die Reinheits- und Identitätsanalyse der Isolate (vgl. 2.5.2.1.), die Herstellung von qPCR-Standards (vgl. 2.6.8.1.) sowie für die TRFLP-Analyse (vgl. 2.6.13.) und Pyrosequenzierung (vgl. 2.6.14.) wurden Teilstücke der 16S rRNA Gene amplifiziert (Tabelle 11). Für die Pyrosequenzierung wurden die Primer 341F und 907RM (Tabelle 11) mit einem sechs Nukleotide umfassenden Barcode modifiziert, um eine spätere Zuordnung der einzelnen Sequenzen in die jeweiligen ¹³C- und ¹²C-Amplikon-Genbibliotheken zu ermöglichen (Tabelle-AH 1).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl, 50 µl oder 100 µl durchgeführt (Tabelle 12). Die eingesetzte (c)DNA-Menge lag dabei zwischen 37 ng und 400 ng pro Ansatz. Als Positivkontrolle wurde in *A. bidest* suspendiertes Zellmaterial von *Cupriavidus necator* (vgl. 2.5.1.) mitgeführt.

Tabelle 11: Sequenz, Position und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten verwendeten Primer. Vorwärts gerichtete Primer sind mit F gekennzeichnet, rückwärts gerichtete Primer mit R.

Primer	Zielgruppe	Sequenz (5´- 3´) ^a	Position ^b	T _m (°C) ^c	Referenz
27F	<i>Bacteria</i>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	8-25	46-48	Lane (1991)
27F- IRD700 ^d	<i>Bacteria</i>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	8-25	46-48	Lane (1991)
341F (GM5)	<i>Bacteria</i>	CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357	58	Muyzer <i>et al.</i> (1998)
907RM	<i>Bacteria</i>	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	907-926	54-56	Lane (1991)
1492R	<i>Bacteria</i>	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1492- 1504	52	Lane (1991)

^a, M (A oder C) nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

^b, Positionen bezogen auf die 16S rRNA von *Escherichia coli* (ACCX80725).

^c, Schmelztemperatur

^d, Markierung des Primers am 5´-Ende mit IRD700 Infrarot-Farbstoff.

Tabelle 12: Zusammensetzung der PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)			
	27F 1492R	27F 907RM	27F-IRD700 907 RM	341F 907RM
5Prime-Mastermix (2,5 x) ^a	20	20	20	20
Mg ²⁺ (25 mM)	2	5	2	2
Vorwärtsprimer ^b (10 µM)	3	2	3	3
Rückwärtsprimer ^b (10 µM)	3	2	3	3
BSA (3 mg/ ml)	-	2	-	-
Matrizen (c)DNA	2-4	2	3,5	3,5
PCR-Wasser ^c	ad 50	ad 50	ad 50	ad 50

^a, 5Prime-Mastermix (2,5 x; 5Prime, Hamburg) enthält *Taq* DNA Polymerase (62,5 U/ml), 2,5 x *Taq* Reaktionspuffer (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8,3, 4 mM Mg²⁺, 0,5 % Igepal[®]-CA630), 500 µM dNTP und Stabilisatoren

^b, Beschreibung der Primer in Tabelle 11

^c, 0,2 µm filtriertes, autoklaviertes *A. bidest*

Die verwendeten PCR-Protokolle zur Amplifizierung der 16S rRNA Gene sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: PCR-Programme zur Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten.

Nummer	Schritt	Primerpaare ^a		
		27F 1492R	27F ^b 907RM	341F 907RM
		Temperatur (°C)/ Zeit (min:s)		
1	Anfangsdenaturierung	95/ 10:00	95/ 5:00	94/ 3:00
2	Denaturierung	95/ 1:00	95/ 1:00	94/ 0:30
3	Annealing	40/ 1:00	40/ 1:00	65/ 0:30
4	Elongation	72/ 1:30	72/ 1:30	72/ 1:30
5	Zyklus Schritt 2-4	5 x	4 x	19 x, dabei die Annealing- Temperatur pro Zyklus um je 0,5 °C absenken („touch down“)
6	Denaturierung	95/ 1:00	95/ 1:00	94/ 0:30
7	Annealing	43/ 1:00	50/ 0:30	55/ 0:30
8	Elongation	72/ 1:30	72/ 1:30	72/ 1:30
9	Zyklus 6-8	35 x	30 x	14 x
10	End-Elongation	72/ 5:00	72/ 10:00	72/ 3:00
11	Ende	4/ ∞	4/ ∞	4/ ∞
Fragmentlänge (bp)		~ 1500	~ 920	~ 560

^a, Beschreibung der Primer in Tabelle 11

^b, Primer wurde auch als IRD-700-markierte Variante eingesetzt

2.6.7.2. Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genen

Für die Charakterisierung und Quantifizierung der 2,4-DCP-abbauenden, mikrobiellen Gemeinschaft mittels Genbibliotheken (vgl. 2.6.11.), Pyrosequenzierung (vgl. 2.6.14.) sowie qPCR (vgl. 2.6.8.) wurden *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Teilsequenzen amplifiziert (Tabelle 14).

Tabelle 14: Sequenz und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genfragmenten verwendeten Primer. Vorwärts gerichtete Primer sind mit F gekennzeichnet, rückwärts gerichtete Primer mit R.

Primer	Sequenz (5'-3') ^a	T _m (°C)	Referenz
tfdB F	CSC ACA TCA CCA ACC ARC	50-53	Huong <i>et al.</i> (2007)
tfdB R	CRG GCT GGA TSA CCC ART A	51-55	Huong <i>et al.</i> (2007)
tfdC F	GTG TGG CAY TCG ACG CCG GAY	58-62	Lillis <i>et al.</i> (2010)
tfdC R	CCG CCY TCG AAG TAG TAY TGG GT	57-60	Lillis <i>et al.</i> (2010)
pheA F	GTG CTG ACS AAY CTG YTG TTC	52-56	Baldwin <i>et al.</i> (2003)
pheA R	CGC CAG AAC CAY TTR TC	45-50	Baldwin <i>et al.</i> (2003)

^a, S (G oder C), R (A oder G), Y (C oder T) nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Die Primer *tfdB* F und *tfdB* R wurden für die Pyrosequenzierung mit einem sechs Nukleotide umfassenden Barcode modifiziert (vgl. 2.6.7.1., Tabelle-AH 2). Die eingesetzte DNA-Menge lag zwischen 37 ng und 81 ng pro Ansatz. In jedem PCR Lauf wurde in *A. bidest* suspendiertes Zellmaterial von *Cupriavidus necator* (vgl. 2.5.1.) als Positivkontrolle mitgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus folgenden Komponenten (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammensetzung von PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genfragmenten.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)	
	<i>tfdB</i> & <i>pheA</i>	<i>tfdC</i>
5Prime-Mastermix (2,5 x) ^a	10	10
Mg ²⁺ (25 mM)	2,5	1,5
Vorwärtsprimer ^b (10µM)	1	2
Rückwärtsprimer ^b (10 µM)	1	2
BSA (3 mg/ml)	1	1,5
Matrizen DNA	1	1
PCR-Wasser	ad 25	ad 25

^a, 5Prime GmbH, Hamburg

^b, Beschreibung der Primer in Tabelle 14

Die zur Anwendung gekommenen PCR-Programme sind in Tabelle 16 zusammengefasst aufgelistet.

Tabelle 16: PCR-Programme zur Amplifizierung von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genfragmenten.

Nummer	Schritt	<i>tfdB</i> & <i>pheA</i> ^a	<i>tfdC</i> ^a
		Temperatur (°C) / Zeit (min:s)	
1	Anfangsdenaturierung	94/ 8:00	94/ 3:00
2	Denaturierung	94/ 1:00	94/ 1:00
3	Annealing	50/ 1:00	51/ 2:00
4	Elongation	72/ 1:00	72/ 2:00
5	Zyklus Schritt 2-4	30 x	40 x
6	End-Elongation	72/ 2:00	72/ 7:00
7	Ende	8/ ∞	8/ ∞
Fragmentlänge (bp)		~ 580 (<i>tfdB</i>), ~ 200 (<i>pheA</i>)	~ 280

^a, Beschreibung der Primer in Tabelle 14

2.6.7.3. Primer und PCR-Protokolle für die Amplifizierung von *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- sowie *amoA*-Genen

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer zur Amplifizierung von Teilstücken der Nitratreduktase-Gene (*narG*), der Nitritreduktase- Gene (*nirK*, *nirS*), der N₂O-Reduktase-Gene (*nosZ*) sowie der Ammonium-Monooxygenase-Gene von Bakterien und Archaeen (*amoA*) sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Sequenz und Schmelztemperatur der für die Amplifizierung von *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- und *amoA*-Genfragmenten verwendeten Primer. Vorwärts gerichtete Primer sind mit F gekennzeichnet, rückwärts gerichtete Primer mit R.

Primer	Zielgen	Sequenz (5' - 3') ^a	T _m (°C) ^b	Referenz
1960 F	<i>narG</i>	TAY GTS GGS CAR GAR AA	42-50	Philippot <i>et al.</i> (2002)
2650 R	<i>narG</i>	TTY TCR TAC CAB GTB GC	40-50	Philippot <i>et al.</i> (2002)
F1aCu	<i>nirK</i>	ATC ATG GTS CTG CCG CG	52	Hallin & Lindgren (1999)
R3Cu	<i>nirK</i>	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT	52-54	Hallin & Lindgren (1999)
Cd3aF	<i>nirS</i>	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	54-56	Throbäck <i>et al.</i> (2004)
R3cd	<i>nirS</i>	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	51-53	Throbäck <i>et al.</i> (2004)
nosZ F ^c	<i>nosZ</i>	CGC TGT TCI TCG ACA GYC AG	53-55	Rich <i>et al.</i> (2003)
nosZ R	<i>nosZ</i>	ATG TGC AKI GCR TGG CAG AA	49-53	Rich <i>et al.</i> (2003)
amoA 1F	<i>amoA</i> , <i>Bacteria</i>	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	50	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
amoA 2R	<i>amoA</i> , <i>Bacteria</i>	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	56-58	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
amoA 19F	<i>amoA</i> , <i>Archaea</i>	ATG GTC TGG CTW AGA CG	47	Leininger <i>et al.</i> (2006)
amoA 616r48x	<i>amoA</i> , <i>Archaea</i>	GCC ATC CAB CKR TAN GTC CA	48-58	Schauss <i>et al.</i> (2009)

^a, Y (C oder T); S (G oder C); R (A oder G); B (C, G oder T); K (G oder T); W (A oder T); N (A, C, G oder T) nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry); I, Inosin

^b, Schmelztemperatur (berechnet mit Oligo Calc, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

^c, der Primer wurde auch als IRD-700-markierte Variante für die TRFLP-Analyse eingesetzt

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus nachfolgenden Komponenten zusammen (Tabelle 18) und beinhaltete zwischen 2 ng bis 59 ng (c)DNA pro Ansatz.

Tabelle 18: Zusammensetzung von PCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- sowie *amoA*-Genfragmenten.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)		
	<i>narG</i> , <i>nirK</i> & <i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i>
5Prime-Mastermix (2,5 x) ^a	10	10	10
Mg ²⁺ (25 mM)	0,5	1	1,5
Vorwärtsprimer (10 µM/ 100 pM) ^b	1	1	1,5
Rückwärtsprimer (10 µM/ 100 pM) ^b	1	1	1,5
BSA (3 mg/ml)	1	1	1
Matrizen (c)DNA	1	1	1
PCR-Wasser	ad 25	ad 25	ad 25

^a, 5Prime GmbH, Hamburg

^b, Primerkonzentration für *narG*-, *nirK*-, *nirS*- und *nosZ*-Ansätze: 100 pM; für *amoA*-Ansatz: 10 µM; Beschreibung der Primer in Tabelle 17

Die zur Amplifizierung verwendeten PCR-Protokolle sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Verwendete PCR-Programme zur Amplifizierung von *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- sowie *amoA*-Genfragmenten.

Nr.	Schritt	<i>narG</i>	<i>nirK</i> & <i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i> (Archaea)	<i>amoA</i> (Bacteria)
		Temperatur (°C) / Zeit (min:s)				
1	Anfangsdenaturierung	- ^a	-	94/ 10:00	94/ 5:00	94/ 5:00
2	Denaturierung	95/ 5:00	95/ 5:00	94/ 0:30	94/ 0:45	94/ 0:45
3	Annealing	64/ 1:00	64/ 1:00	58/ 1:00	55/ 0:45	60/ 0:45
4	Elongation	72/ 1:00	72/ 1:00	72/ 1:00	72/ 0:45	72/ 0:45
5	Zyklus Schritt 2-4	10 x	10 x	12 x, dabei - 0,5 °C („touch down“)	40 x	40 x

Nr.	Schritt	<i>narG</i>	<i>nirK</i> & <i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i> (Archaea)	<i>amoA</i> (Bacteria)
		Temperatur (°C) / Zeit (min:s)				
6	Denaturierung	95/ 0:30	95/ 0:30	94/ 0:30	-	-
7	Annealing	62/ 0:30	57/ 1:00	52/ 1:00	-	-
8	Elongation	72/ 2:00	72/ 1:00	72/ 1:00	-	-
9	Zyklus 6-8	35 x	35 x	30 x	-	-
10	End-Elongation	72/ 10:00	72/ 10:00	72/ 10:00	72/ 10:00	72/ 10:00
11	Ende	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞
Fragmentlänge (bp)		~ 670	~ 470 / ~420	~ 700	~ 620	~ 490

^a, nicht zutreffend

2.6.7.4. M13-Kontroll-PCR

Die M13-PCR wurde im Anschluss an eine Klonierung (vgl. 2.6.11.) zur Identifikation von Klonen mit inserthaltigem pGEM-T-Vektor durchgeführt. Dafür wurde in PCR-Wasser gelöstes Zellmaterial von vorausgewählten „positiven“ Klonen direkt als Matrize eingesetzt. Die verwendeten Primer (Tabelle 20) lagern sich dabei an die Enden der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) des pGEM-T-Vektors an (Sambrook & Russell, 2001). M13-PCR-Produkte wurden aufgereinigt (vgl. 2.6.10.1., 2.6.10.2.), sequenziert (vgl. 2.6.12.) und für phylogenetische Analysen sowie die Herstellung von qPCR Standards (vgl. 2.6.8.1.) eingesetzt.

Tabelle 20: Verwendete Primer für die M13-Kontroll-PCR. Abkürzung: MCS, multiple cloning site.

Primer	Zielgen	Sequenz (5´- 3´)	T _m (°C) ^a	Referenz
M13 uniF	pGEM-T, MCS	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	48	Messing (1983)
M13 revR	pGEM-T, MCS	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	48	Messing (1983)

^a, Schmelztemperatur

Ein Reaktionsmix bestand dabei in der Regel aus folgenden Komponenten:

10 x Reaktionspuffer (Bilatec, Viernheim) ^a	2,5 µl
Mg ²⁺ (25 mM)	1,5 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
Nukleotidmix (2 mM; Eppendorf)	2,5 µl
Crystal <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/µl; Bilatec)	0,1 µl
Matrizen DNA	1,0 µl
PCR-Wasser	ad 25 µl

^a, beinhaltet 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,8 M Tris-HCl (pH 9,4-9,5), 0,2 % (w/v) Tween-20

Das zur Amplifizierung verwendete PCR Programm ist in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: M13-PCR Programm.

Nummer	Schritt	Temperatur (°C) / Zeit (min:s)
1	Anfangsdenaturierung	94/ 5:00
2	Denaturierung	94/ 1:00
3	Annealing	54/ 1:00
4	Elongation	72/ 1:30
5	Zyklus Schritt 2-4	35 x
6	End-Elongation	72/ 5:00
7	Ende	8/ ∞

2.6.8. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren mit der minimale Unterschiede in der Genexpression erfasst werden können (Heid *et al.*, 1996). Die Quantifizierung der PCR-Produkte wird unter anderem durch den Einsatz von DNA-Farbstoffen, in diesem Fall SYBR Green I, ermöglicht. Dieser stabile, nicht spezifische Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenzemission ansteigt. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert dabei direkt mit der Fluoreszenz-Intensität. Die Messung erfolgt am Ende des Elongationsschrittes in jedem Zyklus. Mitgeführte Standards mit bekannter Kopienanzahl ermöglichen die Quantifizierung der Zielgene in den Umweltproben. Als

Grundlage dient hierbei der sogenannte C_t -Wert (*engl.* Cycle threshold), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz der Proben signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der C_t -Wert ist dabei abhängig von der Konzentration der zu Anfang der Reaktion eingesetzten DNA-Menge. Eine lineare Standardkurve, die sich aus den gemessenen C_t -Werten sowie aus dem dekadischen Logarithmus der DNA-Menge der Standards ergibt, bildet die Grundlage für eine Quantifizierung der jeweiligen Gene und Transkripte.

Alle qPCR Reaktionen der vorliegenden Arbeit wurden in einem iCycler iQ5 Multicolor Real Time PCR Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Die erfassten Daten wurden mit Hilfe der Software iQ5 Optical System (Version 2.0) analysiert.

2.6.8.1. Herstellung von qPCR Standards

Zur Quantifizierung von Genkopienzahlen in Umweltproben wurden in jedem qPCR Lauf Standards mit bekannter Konzentration integriert. Diese Standards wurden mittels Klonierung (vgl. 2.6.11.) und anschließender M13-PCR (vgl. 2.6.7.4.) hergestellt. Die PCR-Produkte wurden mit Filterplatten (vgl. 2.6.10.2.) und mittels Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit quantifiziert (vgl. 2.6.4.2.). Die Anzahl der vorliegenden Genkopien pro Mikroliter Standard wurde mit nachfolgender Formel (Formel 11) berechnet.

Formel 11: Berechnung der vorliegenden Kopienzahlen in Standards.

$$n_{Ko} (\mu l^{-1}) = \frac{6,022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{L_{Fr} (bp) * 660 \text{ g mol}^{-1}} * 10^{-9} * c_{DNA} (ng / \mu l)$$

n_{Ko} , Anzahl der Genkopien; $6,022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, Avogadro-Konstante; L_{Fr} , Ziellänge + 217 bp (Vektorrest); 660 g/mol, durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaares; c_{DNA} , mit PicoGreen bestimmte Produktkonzentration nach der M13-PCR

Die Lagerung der Standards erfolgte bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Für die qPCR Messungen wurden Verdünnungen von 10^9 bis 10^1 Molekülen pro Mikroliter direkt vor der Verwendung hergestellt.

2.6.8.2. qPCR Primer und Protokolle

Die eingesetzten Primer zur Quantifizierung der 2,4-DCP Hydroxylase (*tfdB*), 3,5-DCC-1,2-Dioxygenase (*tfdC*), der Phenolhydroxylase (*pheA*) sowie der an der

Nitrifikation und Denitrifikation beteiligten *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- und *amoA*-Genen wurden in Absatz 2.6.7.2/3. aufgeführt. 16S rRNA Genkopienzahlen wurden nach Muyzer *et al.* (1998) mit nachfolgenden Primern bestimmt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Sequenz und Schmelztemperatur der für die Quantifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten verwendeten Primer. Der vorwärts gerichtete Primer ist mit F gekennzeichnet, der rückwärts gerichtete Primer mit R.

Primer	Zielgen	Sequenz (5´- 3´)	T _m (°C) ^a	Referenz
Eub341F	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	CCT ACG GGA GGC AGC AG	58	Muyzer <i>et al.</i> (1998)
Eub534R	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	ATT ACC GCG GCT GCT GG	52	Muyzer <i>et al.</i> (1998)

^a, Schmelztemperatur

(c)DNA-Proben wurden vor der Verwendung 1:20, 1:100 oder 1:5000 mit PCR-Wasser verdünnt. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus nachfolgenden Komponenten zusammen (Tabelle 23, Tabelle 24).

Tabelle 23: Zusammensetzung von qPCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von *tfdB*, *tfdC*, *pheA* und 16S rRNA-Genfragmenten.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)		
	<i>tfdB</i> & <i>pheA</i>	<i>tfdC</i>	16S rRNA
SensiMix SYBR & Fluorescein Kit ^a	10	10	10
Vorwärtsprimer (10 µM) ^b	1	2	1,5
Rückwärtsprimer (10 µM) ^b	1	2	1,5
BSA (3 mg/ml)	1	1	-
Matrizen (c)DNA	5	5	5
PCR-Wasser	ad 20	ad 20	ad 20

^a, SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde) beinhaltet hitzeaktive DNA Polymerase, ultra-reine dNTPs, MgCl₂ (6 mM), Fluorescein, SYBR[®] Green I

^b, Beschreibung der Primer in Tabelle 14 und Tabelle 22

Tabelle 24: Zusammensetzung von qPCR Reaktionsansätzen für die Amplifizierung von *narG*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* sowie *amoA*-Genfragmenten.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)			
	<i>narG</i> & <i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i>
SensiMix SYBR & Fluorescein Kit ^a	10	10	10	10
Vorwärtsprimer (10 µM/ 100 pM) ^b	0,35	0,2	0,1	1,5
Rückwärtsprimer (10 µM/ 100 pM) ^b	0,35	0,2	0,1	1,5
Mg ²⁺ (25 mM)	1,2	1,2	1,2	-
BSA (3 mg/ml)	0,1	-	0,1	-
Matrizen (c)DNA	5,0	5,0	5,0	5,0
PCR-Wasser	ad 20	ad 20	ad 20	ad 20

^a, SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde) beinhaltet hitzeaktive DNA Polymerase, ultra-reine dNTPs, MgCl₂ (6 mM), Fluorescein, SYBR[®] Green I

^b, Primerkonzentration für *narG*-, *nirK*-, *nirS*- und *nosZ*-Ansätze: 100 pM; für *amoA*-Ansätze: 10 µM; Beschreibung der Primer in Tabelle 17

In jedem qPCR Lauf wurden Standards in acht Verdünnungsstufen sowie vier Negativkontrollen mitgeführt. Die zur Anwendung gekommenen PCR-Programme sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 zusammengefasst aufgelistet.

Tabelle 25: Verwendete qPCR-Programme zur Amplifizierung von *tfdB*-, *tfdC*, *pheA* und 16S rRNA-Genfragmenten.

Nr.	Schritt	<i>tfdB</i>	<i>tfdC</i>	<i>pheA</i>	<i>16S</i>
		Temperatur (°C) / Zeit (min:s)			
1	Anfangsdenaturierung	94/ 8:00	94/ 8:00	94/ 8:00	95/ 5:00
2	Denaturierung	94/ 1:00	94/ 1:00	94/ 0:40	95/ 0:30
3	Annealing	54/ 1:00	54/ 2:00	50/ 0:40	55,7/ 0:25
4	Elongation	72/ 1:00	72/ 2:00	72/ 0:40	72/ 0:25
5	Zyklus Schritt 2-4	40 x	40 x	40 x	35 x
6	End-Elongation	72/ 2:00	72/ 2:00	72/ 2:00	72/ 5:00
7	Schmelzkurve	65-95/ 0:10 (+ 0,1 °C/ Zyklus)	65-95/ 0:10 (+ 0,1 °C/ Zyklus)	65-95/ 0:10 (+ 0,1 °C/ Zyklus)	70-95/ 0:10 (+ 0,15 °C/ Zyklus)
8	Ende	20/ ∞	20/ ∞	20/ ∞	20/ ∞

Tabelle 26: Verwendete qPCR-Programme zur Amplifizierung von *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- und *amoA*-Genfragmenten.

Nr.	Schritt	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i>
		Temperatur (°C) / Zeit (min:s)				
1	Anfangsdenaturierung	95/ 10:00	95/ 10:00	95/ 5:00	95/ 8:00	94/ 5:00
2	Denaturierung	95/ 0:45	95/ 1:00	94/ 0:45	95/ 0:30	94/ 0:45
3	Annealing	64/ 0:45	55/ 1:00	55/ 0:45	63/ 0:30	55-60 ^a / 0:45
4	Elongation	75/ 0:20	83,5/ 0:18	72/ 0:45	72/ 0:45	72/ 0:45
5	Zyklus Schritt 2-4	40 x	50 x	40 x	35 x	40 x
6	End-Elongation	72/ 5:00	72/ 5:00	72/ 5:00	72/ 5:00	72/ 5:00
7	Schmelzkurve	65-95/ 0:10 (+ 0,5 °C/ Zyklus	65-95/ 0:10 (+ 0,5 °C/ Zyklus	65-95/ 0:10 (+ 0,5 °C/ Zyklus	-	65-95/ 0:10 (+ 0,5 °C/ Zyklus)
8	Ende	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞	8/ ∞

^a, Annealing Temperatur für *amoA* (*Archaea*): 55 °C; für *amoA* (*Bacteria*): 60 °C

2.6.8.3. Inhibitionskontrollen

Alle eingesetzten (c)DNA Proben wurden vor der Verwendung mit PCR-Wasser verdünnt, um eine mögliche Störung der qPCR durch mitextrahierte PCR-inhibierende Verbindungen (z.B. Huminsäuren) zu minimieren. Ob eine Inhibition vorlag, wurde anhand von mitgeführten Inhibitionskontrollen für jede Probe in jedem PCR Lauf geprüft und die erfassten Daten gegebenenfalls korrigiert. Proben wurden dafür mit einem definierten Standard versetzt und im Anschluss an eine Messung erfolgte die Berechnung des Inhibitionsfaktors (IF) nach folgender Formel (Formel 12; Zaprasis *et al.*, 2010).

Formel 12: Berechnung des Inhibitionsfaktors.

$$IF = \frac{n_{(Probe+Standard)} - n_{Probe}}{n_{Standard}}$$

$n_{(Probe+Standard)}$, Anzahl der gemessenen Kopien in der mit definiertem Standard vermischten Probe; n_{Probe} , Anzahl der gemessenen Kopien in der Probe; $n_{Standard}$, Anzahl der gemessenen Kopien im definiertem Standard

Der Inhibitionsfaktor liegt im Bereich von 0 bis 1, wobei 0 eine totale Inhibition und 1 keine Störung der qPCR bedeutet. Aufgrund der unterschiedlichen Nukleinsäure-Extraktionseffizienzen in den einzelnen Proben werden die gemessenen Gen- und Transkriptkopienzahlen pro Nanogramm (c)DNA angegeben.

2.6.8.4. Relative Genhäufigkeit

Um den Einfluss von unterschiedlichen Faktoren (z.B. Regenwurm, 2,4-DCP) auf die Anzahl von Genen und Transkripten in Drilosphären- und Bodenproben zu bestimmen, wurde die relative Genhäufigkeit (RGFR, *engl.* Relative Gene Frequency Ratio) als Hilfsmittel eingeführt (Formel 13; Liu *et al.*, 2011a).

Formel 13: Berechnung der relativen Genhäufigkeit.

$$RGFR = \frac{n_{+Faktor}}{n_{-Faktor}}$$

$n_{+Faktor}$, Anzahl der gemessenen Kopienzahlen in den Proben mit Einfluss (z.B. Regenwurm); n_{Faktor} , Anzahl der gemessenen Kopienzahlen in den Proben ohne Einfluss (z.B. Regenwurm)

Ein positiver Effekt (d.h. Stimulation) eines Faktors liegt dabei vor, wenn der errechnete RGFR-Wert > 1 ist, ein negativer Effekt (d.h. Inhibition), wenn der RGFR-Wert < 1 ist.

2.6.8.5. Überprüfung der qPCR Ergebnisse

Schmelzkurven von Standards und Proben wurden in jedem qPCR Lauf aufgezeichnet und verglichen, um die Spezifität der qPCR Ansätze und Protokolle zu gewährleisten. Bei der Schmelzkurvenanalyse werden die DNA-Fragmente durch kontinuierliches Erhöhen der Temperatur aufgeschmolzen. Die Doppelstränge denaturieren bei einer für sie spezifischen Temperatur, wobei der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Die Fluoreszenz nimmt ab. Spezifische PCR-Produkte weisen im Vergleich zu amplifizierten Primerdimeren einen höheren Schmelzpunkt auf, so dass eine Unterscheidung möglich ist (Abbildung 11, Schnerr *et al.*, 2001).

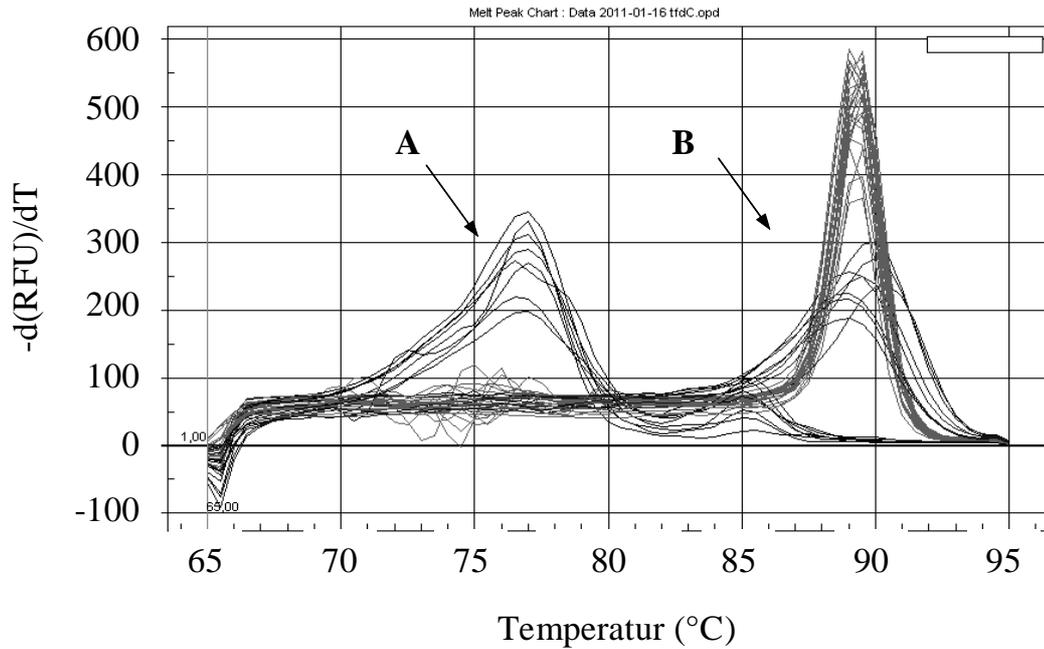


Abbildung 11: Erste Ableitung der Schmelzkurve, aufgezeichnet während der Quantifizierung von *tfdC*. Maxima zeigen die Schmelzpunkte der PCR-Produkte an. A, Primerdimere; B, spezifische *tfdC* PCR-Produkte.

Zusätzlich erfolgte die Überprüfung der Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.6.9.) und Sequenzierung (vgl. 2.6.12.) einzelner Proben.

Die Quantifizierung des *nosZ*-Genfragmentes erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Marianna Weller 2010, qPCR Messungen von *nirK*, *nirS*, *narG* sowie *amoA* wurden im Laufe der Bachelorarbeit von Christian Hofmann 2011 durchgeführt.

2.6.9. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten nach ihrer Größe wurde Agarose-Gelelektrophorese im horizontalen System durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Agarose (1 %, w/v) wurde in 1 x TAE Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8) durch kurzes Erhitzen gelöst und nach Abkühlung auf etwa 60 °C mit 0,05 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA wodurch sich das Anregungsspektrum verändert und eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht auftritt. Das flüssige Agarosegel wurde anschließend in vorbereitete Gelapparaturen gegossen, nach kompletter Verfestigung in die Elektrophoresekammer überführt und mit Laufpuffer (1 x TAE) überschichtet. 5 µl Probe wurden mit 1 µl 6 x Ladepuffer (0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 55 % Glycerin) gemischt, in die Geltaschen aufgetragen und die Elektrophorese mit

einer Spannung von 90 V durchgeführt. Als Längenstandards wurden 2 µl MWM-1 (200-10000 bp, Bilatec, Viernheim) verwendet. Nach dem Lauf (20 bis 30 min) wurden die Banden auf einem UV-Tisch (UVT-20 M, Herolab, Wiesloch) visualisiert und durch eine Canon PowerShot G5 (Canon, Krefeld) und der Software Remote Capture dokumentiert.

2.6.10. Aufreinigung von PCR-Produkten

2.6.10.1. Aufreinigung mit MinElute™

PCR-Produkte, die für die Erstellung von Genbibliotheken eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe von MinElute™ PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) angelehnt an den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Lagerung der aufgereinigten Proben erfolgte bei -20 °C.

2.6.10.2. Aufreinigung mit Filterplatten

16S rRNA PCR-Produkte der Isolate (vgl. 2.5.2.1.) sowie PCR-Produkte nach dem Mung Bean Endonuklease-Verdau (vgl. 2.6.13.2.) wurden mittels MultiScreen PCR₉₆ Filter Plate (Millipore Cooperation, Bedford, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss in 30 µl RNase/ DNase-freiem Wasser (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) gelöst und in sterile Reaktionsgefäße transferiert. Die Lagerung der gereinigten Proben erfolgt bei -20 °C.

2.6.10.3. Aufreinigung durch Gelextraktion

PCR-Produkte, die für die TRFLP-Analyse (vgl. 2.6.13.) eingesetzt sowie die PCR-Produkte, die zur Anfertigung von Amplikon-Genbibliotheken mittels Pyrosequenzierung (vgl. 2.6.14.) amplifiziert wurden, wurden durch Gelextraktion aufgereinigt. Dafür wurde ein 1 %iges Agarosegel mit modifiziertem TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 8; Millipore, Bedford, USA) hergestellt und die Proben in vorbereitete Vertiefungen überführt. Die Gelelektrophorese (vgl. 2.6.9.) wurde für 60 min bei 70 V durchgeführt. Die erhaltenen Banden wurden auf einem UV-Tisch (UVT-20 M, Herolab, Wiesloch) mit sterilem Skalpell ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (Montage DNA Gel Extraction Kit, Millipore, Bedford, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Proben für die TRFLP-Analyse wurden anschließend im Kühlschrank bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Proben

für die Pyrosequenzierung wurden mit Isopropanol und NaCl gefällt (vgl. 2.6.3.) und das Pellet in 12 µl RNase/ DNase-freiem Wasser (Gibco[®], Life Technologies GmbH, Darmstadt) resuspendiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.6.11. Klonierung

Die Klonierung ist die Einführung eines (un)bekannten DNA-Fragments in einen Vektor (Ligation) und die anschließende Überführung in eine kompetente Wirtszelle (Transformation). Strukturelle sowie 16S rRNA Gene wurden nach der PCR Amplifizierung (vgl. 2.6.7.) mittels pGEM[®]-T Vektor System II (Promega, Madison, USA) und T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben kloniert.

2.6.11.1. Ligation

Der für die Ligation verwendete linearisierte pGEM[®]-T Vektor besitzt neben einem Ampicillinresistenzgen eine multiple Klonierungsstelle (MCS), die innerhalb des Gens für die β-Galactosidase (*lacZ*) liegt. Durch Einbau fremder DNA wird die Expression der β-Galactosidase in den Wirtszellen verhindert. Durch diese fehlende Enzymaktivität können nach Abschluss der Klonierung Insert-positive von Insert-negativen Klonen unterschieden werden (vgl. 2.6.11.3.). Für einen Ligationsansatz wurden nachfolgende Komponenten zusammenpipettiert, gemischt und über Nacht in einem Wasserbad (Ausgangstemperatur 25 °C) bei 4 °C inkubiert.

2 x Rapid Ligation Buffer ^a	2,5 µl
pGEM [®] -T Vektor (50 ng/µl)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss U/µl)	0,5 µl
PCR Produkt (4-45 ng DNA)	1,5 µl
PCR-Wasser	ad 5 µl

^a, beinhaltet 60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP und 10 % (v/v) Polyethylenglykol

Um eine gute Ligationseffizienz zu erzielen, sollte das Verhältnis von Insert zu Vektor nach Herstellerangaben bei 1:1 liegen. Die optimale Menge ist abhängig von der Länge des Inserts und wurde nach Formel 14 berechnet.

Formel 14: Berechnung der für die Ligation einzusetzenden DNA Menge.

$$m_{DNA}(ng) = \frac{m_{Vektor}(ng) * L_{Fr}(bp)}{L_{Vektor}(bp)} * Verh\u00e4ltnis_{(Insert/Vektor)}$$

m_{Vektor} , Menge des eingesetzten Vektors (25 ng); L_{Fr} , Länge des Inserts; L_{Vektor} , Länge des Vektors (3000 bp)

2.6.11.2. Transformation

Die Transformation beschreibt die Aufnahme der vorbereiteten Vektoren durch kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stamms JM 109 (High Efficiency > 10⁸ cfu/μg). Die verwendeten Zellen sind so vorbehandelt, dass sie leicht Plasmide aufnehmen und wurden von Ralf Mertel (Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth) nach folgendem Protokoll hergestellt. Aus einer Glycerinkultur wurde mit einer sterilen Impföse Zellmaterial abgenommen und auf einer LB-Platte (vgl. 2.3.3.1.2.) ausgestrichen. Nachdem Kolonien gewachsen waren, wurde eine davon gepickt, in 5 ml LB-Medium (vgl. 2.3.1.1.4.) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 1 ml der Übernachtskultur wurden 50 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{660nm} von 0,5 bei 37 °C und 120 rpm für etwa fünf Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend in sterile 50 ml Nunc Röhrchen überführt und für 15 min, 4.000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in eiskaltem Transformationspuffer 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (v/v), pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 8,0; sterilfiltriert) resuspendiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte in 210 μl-Portionen bei -80 °C. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und für die Transformation eingesetzt. Dafür wurden 5 μl des Ligationsansatzes in 100 μl kompetente Zellen überführt und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 55 s bei genau 42 °C im Thermoblock (Thermomixer[®] comfort, Eppendorf, Hamburg) einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Den Ansätzen wurden 950 μl SOC-Medium (vgl. 2.3.1.1.2.) zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 90 min inkubiert. Zur Zellgewinnung erfolgte die Zentrifugation bei 2.000 rpm für 6 min. Etwa 700 μl des Überstandes wurden entfernt und die verbleibende Zellsuspension auf zwei vorbereitete LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten (vgl. 2.3.3.1.3.) pipettiert und mit sterilen Glaskugeln gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.6.11.3. Auswahl repräsentativer Klone („Blau-Weiß-Screening“)

Das „Blau-Weiß-Screening“ (Blau-Weiß-Selektion) basiert auf der Unterbrechung des *lacZ*-Gens durch Insertion eines fremden DNA-Fragments. Die verwendeten Agarplatten enthielten das farblose X-Gal, das durch die β -Galactosidase in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgesetzt wird. Klone, die einen Vektor mit Insert enthalten, können trotz Induktion des Lac-Operons mit IPTG keine aktive β -Galactosidase exprimieren und bleiben weiß. Bei Klonen, die einen Vektor ohne Insert enthalten, erfolgt die Expression der β -Galactosidase und die Kolonien erscheinen blau. Daher wurden alle weißen Kolonien mittels sterilen Zahnstochern in 20 μ l PCR-Wasser resuspendiert und im Anschluss, zur Überprüfung der Insertlänge, eine M13-Kontroll-PCR durchgeführt (vgl. 2.6.7.4.). Die Lagerung der Klone erfolgte kurzfristig bei 4 °C, ansonsten bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.6.12. Sequenzierung

M13-PCR-Produkte sowie 16S rRNA Genfragmente isolierter Bakterien wurden nach der Aufreinigung (vgl. 2.6.10.2.) durch Macrogen (Kumchun-ku Seoul, Südkorea) nach der Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Als Sequenzierprimer wurden M13 uniF (Tabelle 20) sowie 27F und 1492R (Tabelle 11) gewählt.

2.6.13. Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (TRFLP) Analyse

Die TRFLP-Methodik ermöglicht eine schnelle Beschreibung der mikrobiellen Diversität unterschiedlichster Lebensräume (Liu *et al.*, 1997). Ausgewählte Gene werden dabei mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Primern mittels PCR amplifiziert. Die terminal-markierten Amplifikationsprodukte werden anschließend mit einem Restriktionsenzym verdaut und die so erhaltenen terminal-markierten Restriktionsfragmente (tRF) auf einem Polyacrylamidgel (PAGE) der Länge nach aufgetrennt. Anhand der vorliegenden, sich voneinander unterscheidenden tRF-Muster lassen sich phylogenetisch unterschiedliche Populationen identifizieren (Schütte *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Proben des SIP-Versuches (vgl. 2.6.5.) mittels 16S rRNA cDNA-basierender TRFLP analysiert und miteinander verglichen, um die Anreicherung der RNA mit dem „schweren“ Isotop ^{13}C zu überprüfen. Zur Charakterisierung der Denitrifikantendiversität in Drilosphären- und Bodenproben

wurden weiterhin TRFLP-Bandenmuster von *nosZ*-Genfragmenten durch Marianna Weller (2010) generiert.

2.6.13.1. Markierung mit fluoreszenzmarkiertem Primer

Im Rahmen des SIP-Versuches sowie für die Untersuchung der Denitrifikantendiversität wurden bei einer PCR zur Amplifizierung des 16S rRNA- bzw. des *nosZ*-Genfragments ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD700 markierter Vorwärtsprimer (Tabelle 11, Tabelle 17) eingesetzt. Die PCR wurde wie oben beschrieben (vgl. 2.6.7.1., 2.6.7.3.) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über Gelextraktion aufgereinigt (vgl. 2.6.10.3.).

2.6.13.2. Mung Bean Endonuklease-Verdau

Die mit dem Farbstoff IRD700 markierten PCR-Produkte wurden vor der TRFLP-Analyse mit Hilfe der Mung Bean Nuklease (New England Biolabs, Ipswich, USA) von einzelsträngigen Überhängen befreit, um die mögliche Bildung von störenden Pseudo-tRFs zu verhindern (Egert & Friedrich, 2003). Dafür wurden 100 µl des aufgereinigten PCR-Produktes (vgl. 2.6.13.1.) mit 11 µl Reaktionspuffer NEB2 (10 x) und 0,4 µl Mung Bean Endonuklease (10 U/µl) gemischt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch Aufreinigung mittels MultiScreen PCR₉₆ Filter Platten (vgl. 2.6.10.2.). Die Proben wurden anschließend in 30 µl PCR-Wasser aufgenommen und für den Restriktionsverdau eingesetzt.

2.6.13.3. Restriktionsverdau

Aufgereinigte 16S rRNA PCR-Produkte wurden im Anschluss an den Mung Bean Endonuklease-Verdau mit *MspI* (5' → 3' Schnittstelle: C[^]CGG; New England Biolabs, Ipswich, USA), *nosZ* PCR-Produkte mit *HhaI* (5' → 3' Schnittstelle: GCG[^]CCG; New England Biolabs, Ipswich, USA) verdaut. Für den Restriktionsverdau wurden nachfolgende Komponenten eingesetzt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Für den Restriktionsverdau mit *MspI* und *HhaI* eingesetzte Chemikalien.

Reagenzien (Konzentration)	Volumen (µl)	
	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>
Reaktionspuffer NEB4 (10 x) ^a	1	0,12
BSA (100 x)	0,1	0,06
Restriktionsenzym (100 U/ µl oder 20 U/ µl) ^b	0,025	0,15
PCR Produkt	7	6
PCR-Wasser	ad 10	ad 7,2

^a, beinhaltet 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat und 1 mM DTT, pH 7,9

^b, *MspI*: 100 U/ µl; *HhaI*: 20 U/ µl

Der Verdau mit *MspI* wurde bei 37 °C für 4 h in einem LabCycler (SensoQuest GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die Enzyme wurden im Anschluss bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Der *HhaI* Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht. Eine Inaktivierung der eingesetzten Enzyme fand bei 65 °C für 20 min statt. Die verdauten Proben wurden mittels Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit quantifiziert (vgl. 2.6.4.2.) und gegebenenfalls mit PCR-Wasser auf eine Konzentration von etwa 0,3 ng bis 0,5 ng pro Mikroliter verdünnt.

2.6.13.4. Denaturierende Polyamidacryl Gelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde in einem Licor NEN 4300 DNA Analyzer (Licor, Lincoln, USA) durchgeführt. Zwei Borosilikatglasplatten (25 mm x 25 mm x 5 mm; Licor, Lincoln, USA) wurden dafür sorgfältig mit A. bidest, Ethanol (70 %) und Isopropanol (80 %) fusselfrei gereinigt. Zur Stabilisierung der Geltaschen wurden 250 µl einer 1:1 Lösung aus 10 %-iger Essigsäure und Bind-Silane (PlusOne, GE Healthcare, Piscataway, USA) auf die Innenseite der Glasplatten im Bereich der Kammregion aufgetragen. Nach erfolgter Trocknung wurde die Gelgießvorrichtung nach Herstellerangaben zusammengebaut und die Apparatur leicht schräg auf Papiertücher platziert. Das Polyacrylamidgel wurde aus 15 g Harnstoff (Roche Pharma, Reinach, Schweiz), 3,75 ml 40 % Acrylamid/ Bis Solution (37,5:1; 2,6 % C; Bio-Rad, Hercules, USA), 6 ml 5 x TBE Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8, ad 1000 ml A. bidest) und 9,25 ml A. bidest durch langsames Verrühren (etwa 100 rpm) bei 50 °C auf einem Magnetrührer hergestellt. Das Gel wurde anschließend filtriert (ø 0,2 µm), um überschüssige nicht gelöste Salze zu entfernen. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 175 µl 10 %

Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 17 μl N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Ultra-Pure; Invitrogen, Karlsruhe) gestartet. Das Gel wurde zügig und luftblasenfrei in die vorbereitete Gelapparatur gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Polymerisierung erfolgte horizontal bei 37 °C für 45 min. Nach dem Aushärten des Gels wurde die Gelapparatur in den DNA Analyzer eingebracht, die Puffertanks befestigt und mit 1 x TBE Puffer befüllt. Der Probenkamm wurde entfernt und die Geltaschen mit Puffer gespült, um Harnstoffreste zu entfernen. Bevor die Proben aufgetragen wurden, erfolgte ein Vorlauf bei 1200 V und 45 °C für 25 min. Für die Gelelektrophorese wurden 2 μl der Proben bzw. des Längenstandards (50-700 bp; Size Standard IRDye 700, Licor, Lincoln, USA) im Verhältnis 1:1 mit der Stop Solution (Licor, Lincoln, USA) gemischt, bei 95 °C für 3 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. 0,6 μl der Proben und 0,5 μl des Längenstandards wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 1200 V und 45 °C für 4 h durchgeführt. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte mit der Software GelQuest (Version 2.6.3., Sequentix, Klein Raden).

2.6.14. Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung, ein Hochdurchsatzverfahren zur DNA Analyse, basiert auf einer Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) im Zuge der DNA Synthese (Ronaghi, 2001). Das am Ende von mehreren Reaktionen emittierte Licht verhält sich dabei proportional zu den eingebauten Nukleotiden (Abbildung 12).

Zu Beginn der in der vorliegenden Arbeit angewendeten 454 GS-FLX Pyrosequenzierung werden etwa 30 bp lange Sequenzierungsadapter an die barcode-markierten PCR-Produkte ligiert (vgl. 2.6.14.2.). Adaptermoleküle sind Oligonukleotide, die Startpunkte für die sich anschließenden Amplifikations- und Sequenzierungsreaktionen darstellen. Die Adapter-gebundenen Einzelmoleküle werden einzeln an 28 μm große DNA-Capture Beads verankert und somit immobilisiert. Im Verlauf einer sich anschließenden Emulsions-PCR erfolgt die Amplifizierung und Vervielfältigung der Einzelmoleküle innerhalb von Emulsionstropfen. Die mit einer Vielzahl von Kopien des Einzelmoleküls beladenen DNA-Capture Beads werden in Vertiefungen einer PicoTiter-Platte transferiert, in denen die DNA-Synthese und Sequenzierung abläuft (Margulies *et al.*, 2005).

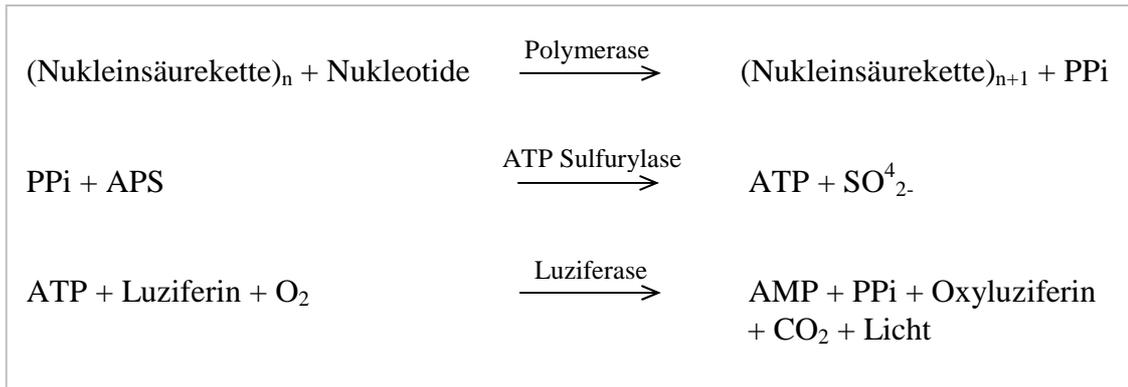


Abbildung 12: Allgemeines Reaktionsprinzip der Pyrosequenzierung, nach Ronaghi (2001). Abkürzungen: PPi, Pyrophosphat; APS, Adenosin-5-Phosphosulfat; ATP, Adenosintriphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat.

Schrittweise werden die vier verschiedenen dNTPs in die Ansätze gegeben. Wenn das zugegebene dNTP komplementär zur nächsten Base der Matrize ist, erfolgt der Einbau durch die DNA Polymerase. Als Nebenprodukt wird Pyrophosphat freigesetzt. Die ATP Sulfurylase synthetisiert aus PPi und APS ein Molekül ATP, das in einer weiteren Reaktion von der Luziferase zusammen mit Luziferin und Sauerstoff in Licht und Oxyluziferin umgewandelt wird. Die Lichtemission wird erfasst, quantifiziert, ausgewertet und als Signalpeaks dargestellt. Werden zwei oder drei gleiche Nukleotide in einer Runde eingebaut, erhöht sich die Lichtproduktion entsprechend (Mühlhardt, 2009). Überschüssige dNTPs werden durch das Enzym Apyrase zu dNDP und Phosphat abgebaut. Im Anschluss erfolgt nun die Zugabe eines der drei verbleibenden dNTPs und die Reaktionskaskade (Abbildung 12) beginnt von vorn.

2.6.14.1. Aufbereitung der PCR-Produkte

16S rRNA barcode-markierte PCR-Produkte von jeweils drei „schweren“ Fraktionen der ¹²C- und ¹³C-Behandlungen des SIP-Versuches (vgl. 2.6.5.) sowie barcode-markierte *tfdB*-Genfragmente (vgl. 2.6.7.2.) wurden nach der Gelextraktion (vgl. 2.6.10.3.) mittels PicoGreen dsDNA Kit quantifiziert (vgl. 2.6.4.2.). Proben mit unterschiedlichen Barcodes wurden zu gleichen Anteilen vereinigt, um eine vergleichbare Sequenzausbeute zu gewährleisten. Die vereinigten Proben wurden anschließend mit dem PreCR Repair Mix (New England Biolabs, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Die in dem PreCR Repair Mix enthaltenen Enzyme sollen mögliche Schädigungen der DNA (z.B. Thymindimere; Särkinen *et al.*, 2012), die u.a. im Verlauf der Gelextraktion aufgetreten sind, reparieren. Das in 30 µl PCR-Wasser resuspendierte DNA Pellet wurde mittels PicoGreen dsDNA Kit quantifiziert (vgl. 2.6.4.2.). Die für die Pyrosequenzierung eingesetzte DNA Menge lag zwischen 343 ng

und 1530 ng. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (LoBind[®] Tube, Eppendorf, Hamburg).

2.6.14.2. Ligation der Adapter und Pyrosequenzierung

Die Ligation der 30 bp langen Sequenzierungsadapter A (CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA G) und B (CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA G) an die aufbereiteten barcode-markierten PCR-Produkte (vgl. 2.6.14.1.) sowie die anschließende Pyrosequenzierung wurde von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genomische und Angewandte Mikrobiologie der Universität Göttingen (Göttingen Genomics Laboratory, Göttingen) mit einem Roche GS-FLX 454 Pyrosequenzierer und den entsprechenden GS-FLX Titanium Series Komponenten (Roche, Mannheim) durchgeführt.

2.6.15. Sequenzanalysen

2.6.15.1. Bereinigung des Sequenzdatensatzes aus der Pyrosequenzierung

Die Fehlerrate der Pyrosequenzierung ist mit durchschnittlich 1,07 % relativ gering (Gilles *et al.*, 2011) und damit vergleichbar mit der Sanger-Methode (Quince *et al.*, 2011). Jedoch ist eine Wiederholung der Sequenzierung wie bei der Klonierung nicht möglich. Folglich ist es nötig, fehlerhafte oder zu kurze Sequenzen auszusortieren. Fehlersequenzierungen treten vor allem bei der Sequenzierung von Homopolymeren auf, wenn die tatsächliche Länge dieser Homopolymere nicht richtig erkannt wird (Quince *et al.*, 2009). Sequenzen einer ausgewählten Probe (Gangwände, Bodensäulenversuch; vgl. 2.4.1.) wurden mit Hilfe der QIIME Software (Caporaso *et al.*, 2010) gefiltert und analysiert. Dieses Programm vereinigt PyroNoise, das die Muster der aufgenommenen Lichtintensitäten gruppiert mit der Anwendung von SeqNoise, das zur Herstellung eines Sequenz-basierten Alignments herangezogen wird. Die so erhaltenen Daten wurden in einer vergleichenden Analyse den mit Hilfe der Software JAguc2 (Nebel *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 2012) erzeugten, nicht-qualitätsgeprüften Daten gegenübergestellt, um die Funktionalität von JAguc2 bei den gewählten Grenzwerten zu überprüfen.

Sequenzen mit fehlerhaften Primer oder Barcode sowie Sequenzen mit einer Länge von weniger als 350 bp (*16S rRNA*) bzw. 300 bp (*tfdB*) wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Das „Sequenzen-Clustering“, also das Zusammenfassen und Zuordnen ähnlicher Sequenzen in OTUs (*engl.* operational taxonomic unit), erfolgte mit der

Software JAguc2 basierend auf einem Grenzwert von 87,7 % (Familien-Ebene, 16S rRNA, Yarza *et al.*, 2010) bzw. 80 % (*tfdB*, vgl. 2.6.15.3.) mit Hilfe des Average-Linkage-Verfahrens sowie einem paarweisen Sequenzalignment. Huse *et al.* (2010) zeigten, dass die Anwendung dieser Algorithmen eine künstliche Überschätzung der Diversität in den Proben reduziert. OTUs, die eine relative Häufigkeit von ≥ 1 % in den Amplikon-Genbibliotheken besaßen, wurden für weitere Analysen eingesetzt.

Repräsentative vorwärts- sowie rückwärtsgerichtete 16S rRNA Gensequenzen wurden im Anschluss mit Bellerophon [Greengenes; http://greengenes.lbl.gov/206_cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi; (DeSantis *et al.*, 2006)] oder DECIPHER [<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>; (Wright *et al.*, 2012)] auf Chimären getestet und gegebenenfalls ersetzt. Die als ^{13}C -markiert betrachteten Sequenzen (vgl. 2.6.5.) wurden mittels SILVA aligned [<http://www.arb-silva.de/aligner/>; (Pruesse *et al.*, 2007)], in MEGA 5.0 [<http://www.megasoftware.net/> (Tamura *et al.*, 2011)] importiert und manuell überarbeitet. Die phylogenetische Zuordnung der OTUs erfolgte mittels Nukleotid-BLAST (blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) und wurde anschließend durch eine Vergleichsanalyse mit LIBCOMPARE (Konfidenzgrenzwert: 80 %; <http://rdp.cme.msu.edu/>) überprüft. Nicht identifizierbare Sequenzen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Repräsentative Sequenzen wurden zusammen mit Referenzsequenzen in einen phylogenetischen Baum eingerechnet (vgl. 2.6.16.); zur Abschätzung der Diversität wurden unterschiedliche Diversitätsindizes berechnet (vgl. 2.6.17.).

Aufgrund einer Sequenzüberlappung von mehr als 300 bp wurden vorwärts- und rückwärtsgerichte *tfdB*-Sequenzen vor dem „Sequenzen-Clustering“ vereinigt und zusammen mit der Software JAguc2 analysiert. Repräsentative Sequenzen der jeweiligen OTUs wurden in MEGA 5.0 importiert und nach *in silico* Translation in Aminosäuresequenzen per ClustalW aligned. Die phylogenetische Zuordnung der OTUs erfolgte mittels Protein-BLAST (blastp und blastx; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nicht identifizierbare Sequenzen wurden von Stammbaumberechnungen (vgl. 2.6.16.) sowie Diversitätsanalysen (vgl. 2.6.17.) ausgeschlossen.

2.6.15.2. Sequenzen aus Genbibliotheken und isolierten Bakterien

Die durch MacroGen sequenzierten M13- und 16S rRNA PCR-Produkte wurden anhand vorliegender Sequenzierungschromatogramme qualitätsgeprüft und anschließend in MEGA 5.0 importiert. M13-Sequenzen wurden von Vektorresten bereinigt und mit der Software JAguc2 auf Basis einer Sequenzähnlichkeit von 80 % (vgl. 2.6.15.3.) in OTUs

zusammengefasst. Referenzsequenzen der jeweiligen OTUs wurden in MEGA 5.0 importiert und nach *in silico* Translation in Aminosäuresequenzen per ClustalW aligned. Die phylogenetische Zuordnung der OTUs erfolgte mittels Protein-BLAST (blastp und blastx; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Sequenzen wurden anschließend in einen phylogenetischen Stammbaum eingerechnet, um die OTUs bekannten Organismen zuzuordnen (vgl. 2.6.16.). Verschiedene Diversitätsindizes wurden zur Abschätzung der Diversität in den einzelnen Proben herangezogen (vgl. 2.6.17.). Fehlerhafte oder nicht identifizierbare Sequenzen wurden von diesen Analysen ausgeschlossen. 16S rRNA Genfragmente isolierter Bakterien wurden anhand der Sequenzierungschromatogramme manuell nachbearbeitet. Die phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Sequenzen erfolgte mittels Nukleotid-BLAST (blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.6.15.3. Berechnung eines Datensatz-basierten Grenzwertes zur Differenzierung von OTUs

Die *tfdB*-Sequenzen, die durch die Pyrosequenzierung erhalten wurden, wurden mit der Software JAguc2 bei verschiedenen Grenzwerten für Sequenzähnlichkeiten (100, 99, 98, 97, 96, 95 usw.) in OTUs zusammengefasst. Die errechnete Anzahl der OTUs wurde gegen die entsprechenden Grenzwerte aufgetragen. Derjenige Grenzwert, bei dem sich das Plateau der Kurve einstellte und sich die Anzahl der OTUs nicht mehr wesentlich veränderte (Abbildung 26), wurde als Datensatz-basierter Grenzwert zur Differenzierung der OTUs gewählt (Stacheter *et al.*, 2012).

2.6.16. Stammbaumberechnungen

Alignierte und nacheditierte 16S rRNA Sequenzen aus der Pyrosequenzierung (vgl. 2.6.15.1.) sowie *tfdB*- und *pheA*-Gensequenzen (vgl. 2.6.15.1., 2.6.15.2.) wurden für die Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen mit MEGA 5.0 herangezogen. Es wurden drei unterschiedliche Methoden mit einem Bootstrap-Test von 10.000 Replikaten parallel angewendet: (a) Maximum Parsimony (Close-Neighbor-Interchange Algorithmus), (b) Maximum Likelihood (Dayhoff-Model) und (c) Neighbour-Joining (p-distance Methode). Aus den resultierenden Stammbäumen wurde ein Konsensusbaum erstellt und aufgetretene Unterschiede kenntlich gemacht.

2.6.17. Auswertung der Genbibliotheken

2.6.17.1. Rarefaction-Analyse

Die Rarefaction-Methode stellt eine Möglichkeit zur Abschätzung der zu erwartenden Artenanzahl in vorliegenden Proben dar. Ein flacher Verlauf der Rarefaction-Kurve indiziert, dass der Großteil der Diversität innerhalb einer Genbibliothek erfasst wurde. Ein steiler Verlauf hingegen weist daraufhin, dass bei größerem Erfassungsaufwand eine höhere Diversität zu erwarten ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Rarefaction-Analyse mit der frei erhältlichen Software aRarefactWin (Version 1.3; <http://www.uga.edu/~strata/AnRareReadme.html>) basierend auf dem analytischen Annäherungsalgorithmus nach Hurlbert (1971).

2.6.17.2. Diversitätsindizes und Coverage

Die Berechnung der verschiedenen Diversitätskenngrößen sowie der Coverage erfolgte mit Microsoft Excel 2003 (Redmond, USA).

2.6.17.2.1. Shannon- Index

Der Shannon-Index (Shannon, 1948) ist eine mathematische Größe und dient zur Beschreibung der Diversität in den betrachteten Proben. Er berücksichtigt sowohl die Artenzahl als auch die Anzahl der Individuen je Art (Formel 15 bis Formel 17).

Formel 15: Shannon-Index.

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i \quad , \text{ mit } p_i = \frac{n_i}{N}$$

s , Anzahl der Arten; n_i , Anzahl der Individuen; N , Gesamtzahl der Individuen

Formel 16: Varianz des Shannon-Index.

$$\text{var}(H') = \frac{\sum_{i=1}^s p_i \cdot (\ln p_i)^2 - H'^2}{N} + \frac{s-1}{2N^2}$$

Formel 17: 95 % Konfidenzintervall des Shannon-Index.

$$KI(95\%) = H' \pm 1,96 * \sqrt{var}$$

2.6.17.2.2. Evenness

Die Äquität oder auch Artengleichheit (*engl.* Evenness) gibt an, wie abundant eine Art in einem bestimmten Biotop ist, bezogen auf die Zahl der Individuen der anderen in diesem Biotop vorkommenden Arten (Back & Türkay, 2001). Die Berechnung der Evenness (J') sowie des 95 % Konfidenzintervalls erfolgte nach folgenden Formeln (Formel 18 und Formel 19).

Formel 18: Evenness.

$$J' = \frac{H'}{\ln s}$$

H' , Shannon-Index; s , Gesamtzahl der Arten

Formel 19: 95 % Konfidenzintervall der Evenness.

$$KI(95\%) = \frac{H' \pm 1,96 * \sqrt{var}}{\ln s}$$

2.6.17.2.3. Chao1

Der nicht-parametrische Schätzwert Chao1 (Chao, 1984) gibt die tatsächlich vorliegende Artenvielfalt in einer untersuchten Probe an und wurden nach Formel 20 berechnet.

Formel 20: Chao1 Schätzwert.

$$Chao1 = s + \frac{n_1 * (n_1 - 1)}{2 * (n_2 + 1)}$$

s , Anzahl der Arten in der Probe; n_1 , Anzahl der Singletons (Sequenzen/OTUs, die nur einmal in der Probe vorkommen); n_2 , Anzahl der Doubletons (Sequenzen/OTUs, die zweimal in der Probe vorkommen)

Zur Berechnung der oberen und unteren Grenze des 95 % Konfidenzintervalls wurden nachfolgende Formeln verwendet (Formel 21 bis Formel 23).

Formel 21: Varianz des Chao1 Schätzwertes.

$$var = \frac{n_1 * (n_1 - 1)}{2 * (n_2 + 1)} + \frac{n_1 * (2 * n_1 - 1)^2}{4 * (n_2 + 1)^2} + \frac{n_1^2 * n_2 * (n_1 - 1)^2}{4 * (n_2 + 1)^4}$$

Formel 22: Obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls des Chao1 Schätzwertes.

$$OG = s + \left(\exp \left(1,96 * \sqrt{\ln \left(1 + \frac{var}{(Chao1 - s)^2} \right)} \right) \right) * (Chao1 - s)$$

Formel 23: Untere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls des Chao1 Schätzwertes.

$$UG = s + \frac{Chao1 - s}{\exp \left(1,96 * \sqrt{\ln \left(1 + \frac{var}{(Chao1 - s)^2} \right)} \right)}$$

2.6.17.2.4. Coverage

Die Coverage ist eine Kenngröße für den Anteil der detektierten OTUs an der Gesamtzahl der OTUs in einer Genbibliothek (Singleton *et al.*, 2001). Die Berechnung erfolgte nach Formel 24.

Formel 24: Coverage (Co).

$$Co(\%) = \frac{n_{ges} - n_1}{n_{ges}} * 100$$

n_{ges} , Gesamtzahl der untersuchten Sequenzen/Klone; n_1 ; Anzahl der Singletons (Sequenzen/Klone, die nur einmal in der Probe vorkommen)

2.6.18. Sequenzhinterlegung

Alle Gensequenzen aus der vorliegenden Arbeit wurden in der öffentlich zugänglichen Datenbank des European Bioinformatics Institute (EMBL Nucleotide Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/embl>) hinterlegt. 16S rRNA Sequenzen der Isolate sind unter den Zugangsnummern (accession numbers) HE603855 bis HE603914 zugänglich. 16S rRNA-Gensequenzen des SIP-Versuches wurden unter den Zugangsnummern ERA090571 (Submission), ERP001239 (Studie), ERS097014-ERS097031 (Proben), ERX070280-ERX070383 (Experimente), ERR092269-ERR092372 (Läufe) im GenBank's Short Read Archive (SRA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) hinterlegt. *tfdB*- und *pheA*-Genfragmente aus den Genbibliotheken sind unter den Zugangsnummern LN554218 bis LN554244 zugänglich. Repräsentative *tfdB*-Teilsequenzen aus der Pyrosequenzierung sind unter den Zugangsnummern LN558703 bis LN558760 zugänglich.

2.7. Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie der Regressionsgeraden und der dazugehörigen Bestimmtheitsmaße (R^2) erfolgte mittels Microsoft Excel 2003 (Redmond, USA) und SigmaPlot 10.0 (Systac Software Inc., CA, USA). Die statistische Auswertung der Prozessdaten erfolgte mit der Software PAST (Hammer *et al.*, 2001). Dabei wurden die Daten vor der Analyse anhand des Shapiro-Wilk Tests (Royston, 1995) auf Normalverteilung überprüft. Die angenommene Nullhypothese, dass die Daten normalverteilt sind, wurde abgelehnt, sobald die Wahrscheinlichkeit kleiner war als der kritische P-Wert von 0,05. Unterschiede zwischen den Proben wurden als signifikant betrachtet, wenn $p \leq 0,05$ war.

Auf Basis des Bray-Curtis Ähnlichkeitskoeffizienten wurden nicht-metrische multidimensionale Skalierungen (NMDS) sowie nicht-parametrische multivariate Varianzanalysen (NPMANOVA) durchgeführt. Die Güte der NMDS-Ordination wurde anhand von Stress-Werten beurteilt. Dabei geben die Stress-Werte an, wie stark die Distanzen in der endgültigen Darstellung von den Distanzen innerhalb der Originaldaten abweichen. Je geringer die Werte ausfallen, desto besser wurde die originale Datenstruktur in der Ordination beibehalten. In der Regel gilt ein Stress von weniger als 0,05 als sehr gut, von weniger als 0,1 als gut mit keinem Risiko einer Falschinterpretation und Stress in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,2 als noch akzeptabel (Clarke, 1993).

2.7.1. Mittelwert und Standardabweichung

Die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (S) wurden nach Formel 25 und Formel 26 berechnet, bei denen n die Anzahl der Werte darstellt (Precht *et al.*, 2005).

Formel 25: Mittelwertberechnung.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Formel 26: Standardabweichung.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]}$$

2.7.2. Zu sichernde Differenz

MPN-Daten können als signifikant unterschiedlich betrachtet werden, wenn die Differenz der dekadischen Logarithmen einen festgelegten Grenzwert (zu sichernde Differenz) überschreitet. Der zu überschreitende Wert für MPN-Ansätze, die als Triplikate vorliegen, beträgt 0,948; für Ansätze mit fünf Parallelen bei 0,733 (Alef & Nannipieri, 1995).

2.8. Verwendete Chemikalien und Gase

Deionisiertes, doppelt-entsalztes Wasser (A. bidest) wurde mittels Seralpur Pro 90 CN (Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach) hergestellt und wies stets eine Leitfähigkeit von weniger als 0,55 μS pro cm auf.

Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Gase von Applichem (Darmstadt), Bioline (Luckenwalde), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Campro Scientific (Berlin), Dr. Ehrenstorfer (Augsburg), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), Linde AG (Höllenbergkreuth), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim) sowie VWR (Darmstadt) bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. 2,4-DCP Abbaupotential von feldfrischem Boden

3.1.1. Aerober 2,4-DCP Abbau in Bodenaufschlammungen

Im Verlauf der Inkubation wurde eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme von 2,4-DCP in den Bodenaufschlammungen beobachtet (Abbildung 13). Nach sieben bzw. neun Tagen konnte in den Ansätzen kein 2,4-DCP mittels HPLC nachgewiesen werden. Die mitgeführte abiotische Substratkontrolle wies nach Beendigung der Inkubation einen Gesamt-2,4-DCP-Verlust von 16 % auf (Daten nicht gezeigt). Die bereits durch Wang *et al.* (2000) beschriebene 2,4-DCP Abnahme von etwa 20 % in Substratkontrollen ist dabei mit großer Wahrscheinlichkeit auf Verdunstungs- sowie Sorptionsvorgänge zurück zu führen. Die zeitgleich zum 2,4-DCP Abbau erfasste CO₂-Konzentration war zu Beginn der Inkubation für die Bodenkontrolle ohne 2,4-DCP mit 4,7 µmol CO₂ pro Gramm Trockengewicht am höchsten (Abbildung 13). Nach viertägiger Inkubation wiesen die unterschiedlichen Ansätze sehr ähnliche CO₂-Konzentrationen mit nur geringen Abweichungen auf. Im weiteren Verlauf des Versuches konnte ein Anstieg der CO₂-Konzentrationen bis auf 13,8 µmol pro Gramm Trockengewicht in den oxischen Bodenaufschlammungen beobachtet werden (Abbildung 13). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die Bildung von CO₂ in feldfrischem Boden weder von der Gegenwart des eingesetzten 2,4-DCP noch von der verwendeten 2,4-DCP Konzentration wesentlich beeinflusst wurde.

Inwiefern die detektierte CO₂-Bildung mit der beobachteten 2,4-DCP Abnahme korreliert, wurde mit Hilfe von dreifach autoklaviertem, inaktivem Boden sowie durch den Einsatz von Kaliumcyanid (KCN), ein Hemmstoff der Atmungskette, in oxischen Bodenaufschlammungen mit bzw. ohne Zugabe von 2,4-DCP untersucht. Die Abnahme von 2,4-DCP in den Ansätzen mit inaktiviertem Boden mit bzw. ohne KCN erfolgte gleichmäßig und ohne auffallende Verzögerung (Abbildung 14). Nach einer Inkubationszeit von acht Tagen wurde eine Gesamt-2,4-DCP Abnahme in Bodenaufschlammungen ohne KCN von 98 % und in Bodenaufschlammungen mit KCN von 75 % beobachtet. Eine CO₂-Bildung konnte nur in Bodenaufschlammungen ohne Zusatz von 2,4-DCP und KCN innerhalb der letzten zwei Inkubationstage nachgewiesen werden (Abbildung 14). Feldfrischer Boden zeigte in Abwesenheit von KCN eine kontinuierliche Abnahme des eingesetzten Substrates 2,4-DCP (Abbildung 14). Nach achttägiger Inkubation konnte kein 2,4-DCP mittels HPLC detektiert werden. Im Vergleich dazu wurden in KCN-supplementierten Ansätzen am Ende der Inkubation

noch 74 % des initial eingesetzten 2,4-DCP detektiert (Abbildung 14). Im Verlauf der Inkubation wurden deutliche Unterschiede in der CO_2 -Bildung in den KCN-unbehandelten sowie KCN-behandelten Ansätzen sichtbar (Abbildung 14). Nach achttägiger Inkubation wurden in KCN-unsupplementierten Bodenaufschlämmungen bis zu $10,4 \mu\text{mol CO}_2$ pro Gramm Trockengewicht nachgewiesen, wohingegen in KCN-supplementierten Bodenaufschlämmungen maximal $3,9 \mu\text{mol CO}_2$ pro Gramm Trockengewicht detektiert werden konnten. Zudem wurde in Ansätzen mit 2,4-DCP Zugabe eine höhere CO_2 -Bildung nachgewiesen als in den Ansätzen ohne 2,4-DCP (Abbildung 14 B).

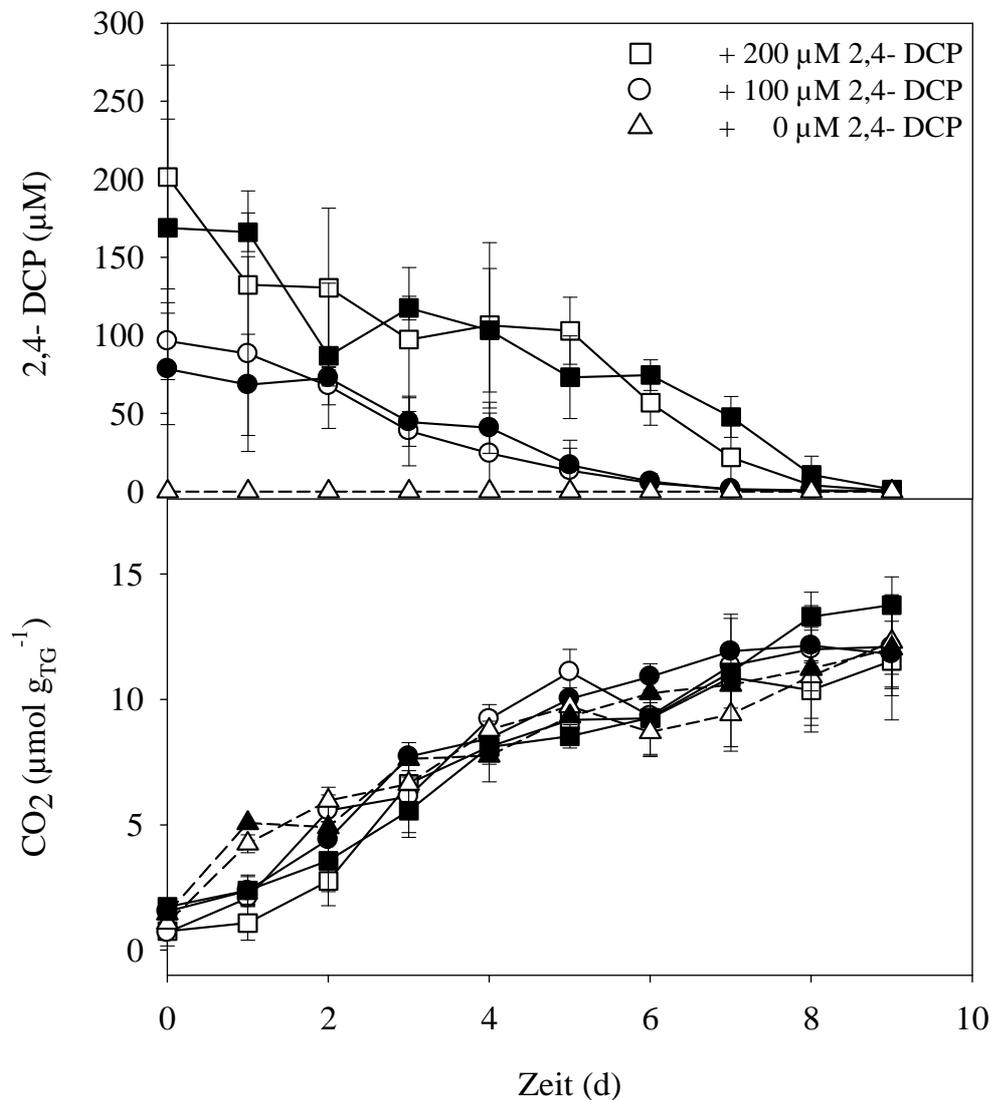


Abbildung 13: Abnahme von 2,4-DCP sowie Bildung von CO_2 in oxischen Bodenaufschlämmungen mit feldfrischem Boden während neuntägiger Inkubation bei 15°C und 150 rpm . Dargestellt sind die aus zwei unabhängigen Versuchen errechneten Mittelwerte von Triplikaten (Ansatz mit 2,4-DCP) sowie Duplikaten (Kontrollansatz ohne 2,4-DCP) mit dazugehörigen Standardabweichungen. Symbole: Abbaueversuch 1 (weiß); Abbaueversuch 2 (schwarz).

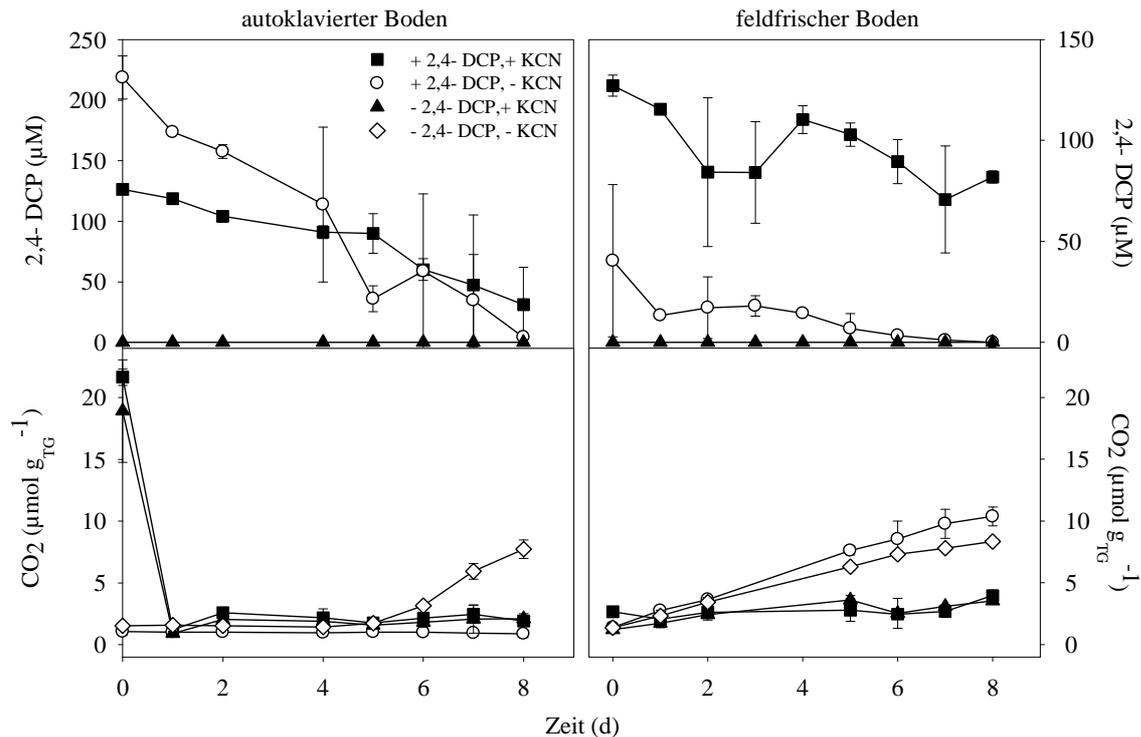


Abbildung 14: Abnahme von 2,4-DCP sowie Bildung von CO₂ in Bodenaufschlammungen mit dreifach autoklaviertem bzw. feldfrischem Boden mit bzw. ohne Zusatz von 10 mM KCN sowie 2,4-DCP während achttägiger Inkubation bei 15 °C und 150 rpm. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten; die Fehlerbalken geben den höchsten und niedrigsten erfassten Wert an.

Die anhand von oxischen Bodenaufschlammungen gewonnenen Ergebnisse deuten an, dass (a) die Abnahme von 2,4-DCP im autoklavierten, inaktiven Boden eher durch Sorptionsvorgänge der Verbindung an Bodenpartikel als durch eine stattfindende Mineralisierung verursacht wird und (b) die Bildung von CO₂ im feldfrischen Boden mit größter Wahrscheinlichkeit auf einen biologischen Abbau zurück zu führen ist.

3.1.2. Anaerober 2,4-DCP Abbau in Bodenaufschlammungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben dem aeroben 2,4-DCP Abbau (vgl. 3.1.1.) auch die Abnahme von 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart verschiedener alternativer Elektronenakzeptoren untersucht. Dafür wurden in einem ersten Versuchsansatz Bodenaufschlammungen mit feldfrischem Boden in MSM_{10, Nitrat} hergestellt und unter Argonatmosphäre bei 15 °C inkubiert. Die Abnahme von 2,4-DCP in allen Ansätzen erfolgte dabei gleichmäßig und ohne auffallende Verzögerung (Abbildung 15), jedoch wesentlich langsamer als in den oxischen Vergleichsansätzen (Abbildung 13). Nach 37 Tagen konnten noch mehr als 31 % des initial eingesetzten 2,4-DCP mittels HPLC detektiert werden. Um eine Limitation des Elektronenakzeptors

und, damit verbunden, eine mögliche Einschränkung des 2,4-DCP Abbaus zu vermeiden, erfolgte die Zugabe von Nitrat nach 70- bzw. 127-tägiger Inkubation (Abbildung 15). Nach insgesamt 142 Tagen und einem Gesamt-2,4-DCP-Verbrauch von mehr als 96 % wurde die Inkubation der Versuchsansätze beendet. Die parallel zur 2,4-DCP Abnahme erfasste N_2 -Bildung wies für die verschiedenen Ansätze mit bzw. ohne 2,4-DCP nur geringe Unterschiede auf (Abbildung 15). So lag die durchschnittliche tägliche N_2 -Bildungsrate pro Gramm Trockengewicht Boden bis zur ersten Nitratzugabe für 2,4-DCP-supplementierte Ansätze bei etwa $0,19 \mu\text{mol}$ und für die Bodenkontrolle ohne 2,4-DCP bei $0,2 \mu\text{mol}$. Am Ende der Inkubation wurden in Bodenaufschlammungen mit 2,4-DCP bis zu $26,7 \mu\text{mol } N_2$ pro Gramm Trockengewicht des eingesetzten Bodens nachgewiesen, in den 2,4-DCP-unbehandelten Kontrollansätzen $27,4 \mu\text{mol } N_2$ pro Gramm Trockengewicht (Abbildung 15). Mitgeführte abiotische Substratkontrollen zeigten im Verlauf der Inkubation keine N_2 -Bildung (Daten nicht gezeigt), wiesen jedoch eine 2,4-DCP Abnahme von 64 % auf. Die Verwendung von Aluminiumfolie zur Einschränkung einer möglichen Photodegradation wirkte sich positiv auf die 2,4-DCP Konzentration in den abiotischen Kontrollansätzen aus und senkte den Substratverlust um 20 %.

Die nicht detektierten Abbauprodukte wie 4-Chlorphenol oder Methan sowie der hohe Substratverlust in den abiotischen Kontrollen legen die Vermutung nahe, dass die Abnahme von 2,4-DCP im landwirtschaftlichen Boden in Abwesenheit von Sauerstoff vielmehr auf abiotische Prozesse (u. a. Sorption, Photodegradation) als auf einen biologischen Abbau durch Mikroorganismen zurück zuführen war. Zudem verdeutlichen die erzielten Ergebnisse, dass die eingesetzten 2,4-DCP Konzentrationen unter den gewählten Inkubationsbedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Bildung von N_2 und damit auf eine Denitrifikation nehmen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der 2,4-DCP Abbau in anoxischen Flüssigmedien mit Sulfat, Eisen (III) oder Nitrat als alternative, terminale Elektronenakzeptoren ohne zusätzliche Kohlenstoffquellen untersucht (vgl. 2.4.2.1.). Dabei konnte in allen Ansätzen während der 145-tägigen Inkubation eine beständige Abnahme der 2,4-DCP Konzentration beobachtet werden (Abbildung 16 A – C), so dass am Ende der Inkubation $8,6 \mu\text{M}$ bis $12,3 \mu\text{M}$ 2,4-DCP in den Bodenproben verblieben. Parallel zur 2,4-DCP Konzentrationsbestimmung wurde die Bildung von Eisen (II) und Stickstoff sowie die Abnahme von Sulfat in den Bodenaufschlammungen erfasst. Eine sichtbare Eisen (III)-Reduktion erfolgte in 2,4-DCP-behandelten und unbehandelten Mikrokosmen nach 68-tägiger Inkubation (Abbildung 16 A). Nach 99 Tagen stieg die Eisen (II)-Konzentration sowohl in den 2,4-DCP-supplementierten Ansätzen als auch in den Kontrollen ohne 2,4-DCP sprunghaft an und resultierte in Endkonzentrationen von

128 μM bzw. 208 μM Eisen (II) (Abbildung 16 A). Das eingesetzte Sulfat wurde im Verlauf der Inkubation nur zu geringen Teilen reduziert (Abbildung 16 B). Insgesamt wurde eine Abnahme in den 2,4-DCP-supplementierten Ansätzen von 1,6 mM, in den Kontrollansätzen ohne 2,4-DCP von 2,2 mM Sulfat beobachtet. Die erfasste N_2 -Bildung in mit Nitrat versetzten Bodenaufschlämmungen mit bzw. ohne 2,4-DCP Zugabe zeigte keine auffälligen Verzögerungen und unterschied sich nur gering von dem vorangegangenen Versuch in $\text{MSM}_{10, \text{Nitrat}}$ (Abbildung 15, Abbildung 16 C).

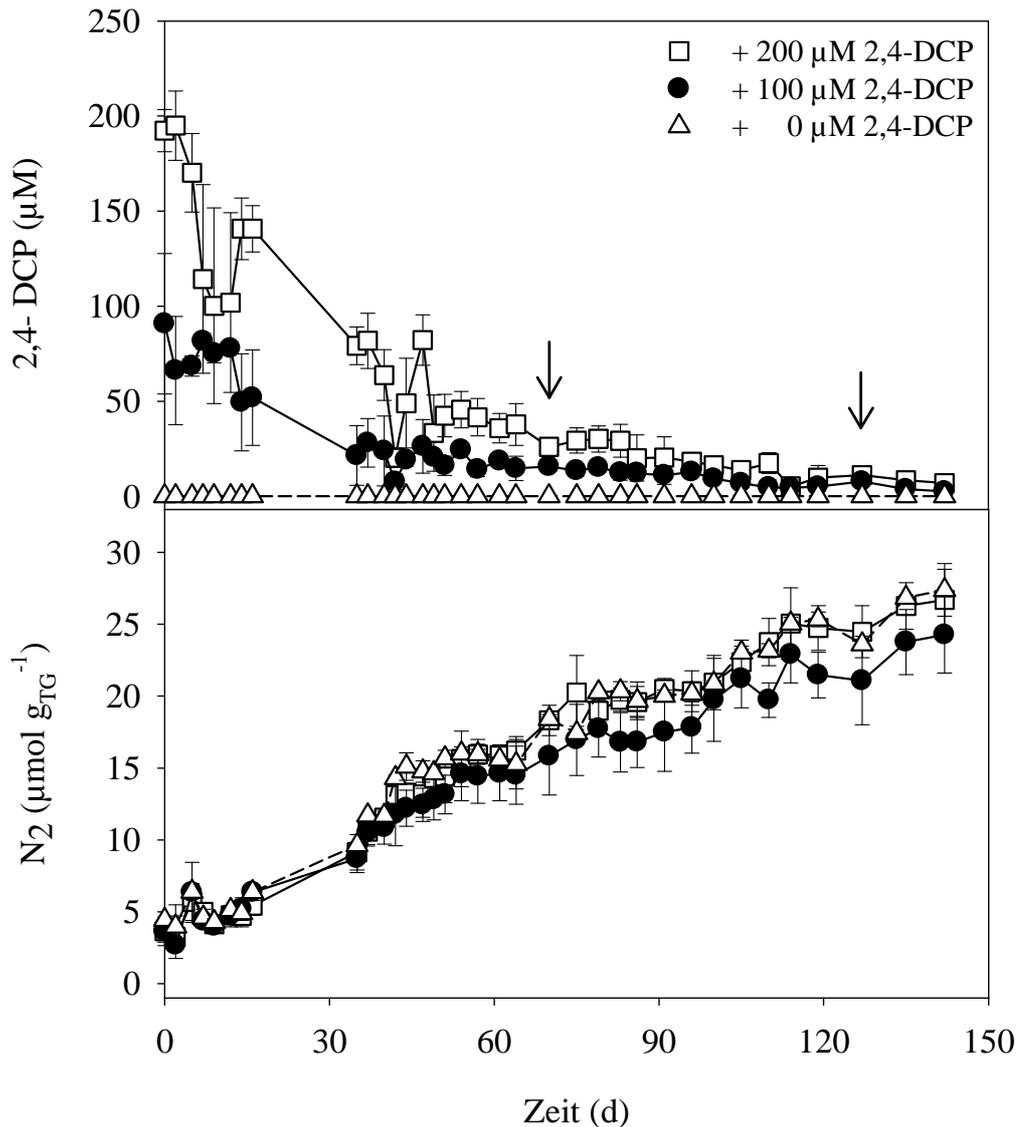


Abbildung 15: 2,4-DCP Abnahme und Bildung von N_2 in anoxischen Bodenaufschlämmungen mit feldfrischem Boden nach 142 Tagen Inkubation bei 15 °C und 150 rpm unter Argonatmosphäre. Die Sauerstoffkonzentration in den Ansätzen betrug während des gesamten Inkubationszeitraumes $\leq 0,4\%$. Als Medium diente $\text{MSM}_{10, \text{Nitrat}}$ (vgl. 2.3.1.2.1.), das 5 mM Nitrat enthielt. Die Pfeile indizieren die Zugabe von 2 ml $\text{MSM}_{10, \text{Nitrat}}$ in die anoxischen Bodenaufschlämmungen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm höchster und niedrigster gemessener Wert) von Duplikaten.

Die detektierten N_2 -Werte lagen nach Beendigung des Versuches in 2,4-DCP-supplementierten Ansätzen bei 203 μmol und bei 212 μmol in den Kontrollansätzen ohne 2,4-DCP.

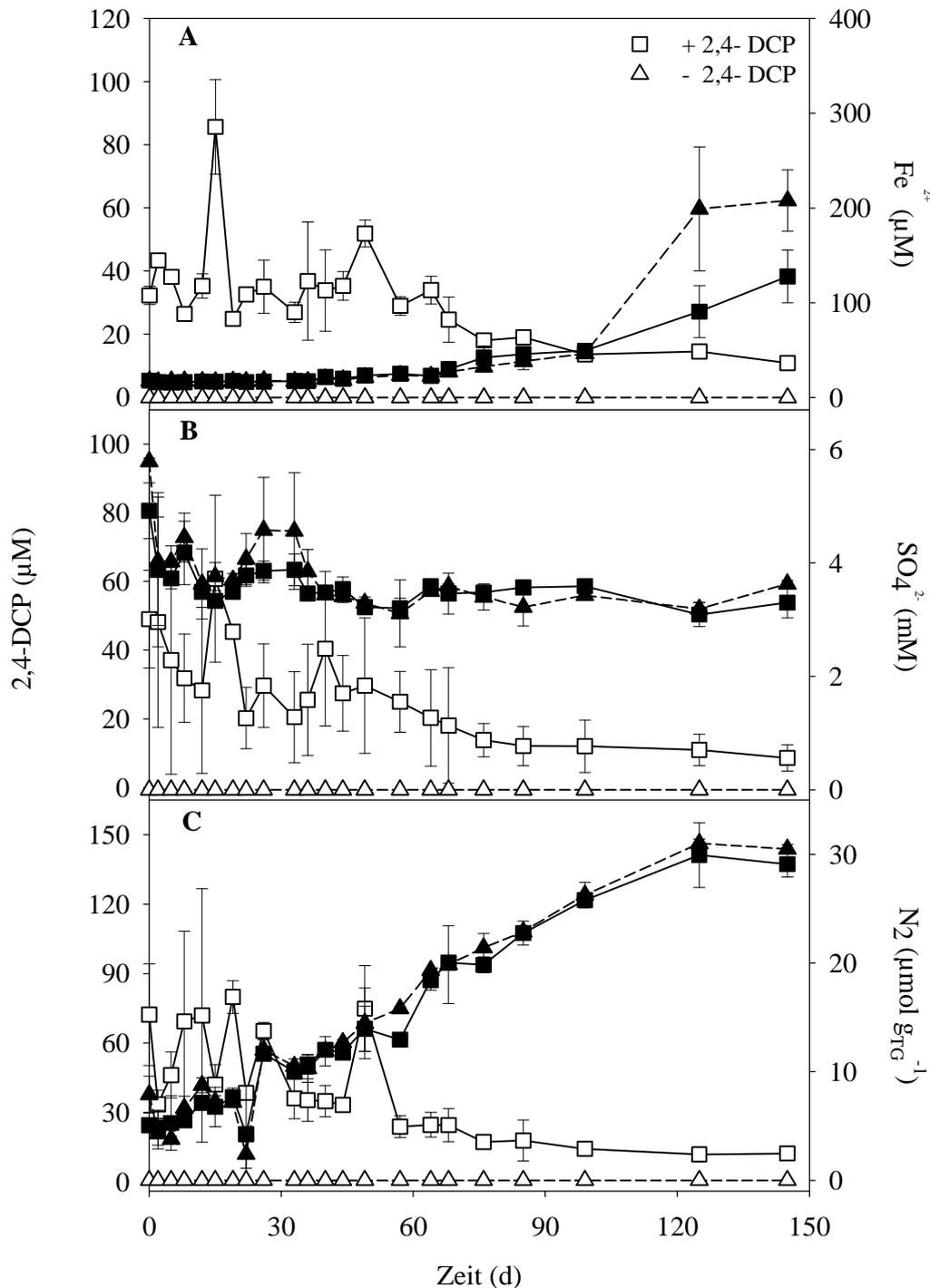


Abbildung 16: Erfasste Prozessdaten aus anoxischen Bodenaufschlammungen mit feldfrischem Boden in Gegenwart von (A) Eisen (III), (B) Sulfat und (C) Nitrat als alternative, terminale Elektronenakzeptoren. Als Medien wurden anoxische Flüssigmedien, die 9 mM Fe(III)Cl_3 sowie 5 mM Na_2SO_4 bzw. KNO_3 enthielten, verwendet (vgl. 2.3.1.2.3.). Datenpunkte stellen Mittelwerte (\pm höchster und niedrigster gemessener Wert) von Duplikaten dar. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C und 150 rpm. Symbole: 2,4-DCP (weiß); Eisen(II)-, Sulfat- und N_2 -Messwerte (schwarz).

Die durch die anoxischen Bodenaufschlammungen erzielten Ergebnisse deuten an, dass eine anaerobe 2,4-DCP Biodegradation im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern unter den gewählten Bedingungen stattfand, aber im Vergleich zum aeroben Abbau eine eher untergeordnete Rolle spielte.

3.2. Einfluss von *Aporrectodea caliginosa* auf die Abnahme von 2,4-DCP in Boden und Drilosphäre

Regenwürmer stellen aufgrund ihrer Biomasse eine dominierende Bodentierpopulation dar, die durch das Graben und ihre Ausscheidungen die terrestrische Umgebung stark beeinflusst. Der Abbau von 2,4-DCP wurde in Gegenwart sowie in Abwesenheit des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa* mittels Bodensäulen (vgl. 2.4.1.) und verschiedenen Mikrokosmen (vgl. 2.4.2.) untersucht, um einen möglichen, bislang noch unbekanntem Effekt von Invertebraten auf die Biodegradation von Chlorphenolen zu beschreiben.

3.2.1. Abbau von 2,4-DCP in Bodensäulen

Die Abnahme von 2,4-DCP in Bodensäulen mit bzw. ohne Regenwürmer erfolgte zügig und ohne auffällige Verzögerung (Abbildung 17). Die detektierbare 2,4-DCP Konzentration nahm in Regenwurm-supplementierten Bodensäulen nach zwei Tagen um 57 % ab und nach insgesamt 18 Tagen Inkubation wurde kein 2,4-DCP mittels HPLC mehr nachgewiesen (Abbildung 17). Im Vergleich dazu erfolgte die Abnahme von 2,4-DCP in Bodensäulen ohne Regenwurmzusatz langsamer. Nach zwei Tagen konnten noch 74 % des initial eingesetzten 2,4-DCP nach der Extraktion detektiert werden. Das zu Beginn des Versuches zur Verfügung gestellte 2,4-DCP war nach 33-tägiger Inkubation komplett verbraucht und durch HPLC-Analysen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 17). Die Überlebensrate der eingesetzten Regenwürmer in den Bodensäulen lag nach Beendigung der Inkubation bei 100 %.

Das aus dem Bodensäulenversuch gewonnene Drilosphären- und Bodenmaterial wurde anschließend für weiterführende Mikrokosmenversuche (vgl. 3.2.2.), Anreicherungsansätze (vgl. 3.3.1.) sowie molekularbiologische Untersuchungen (vgl. 3.3.2.) verwendet.

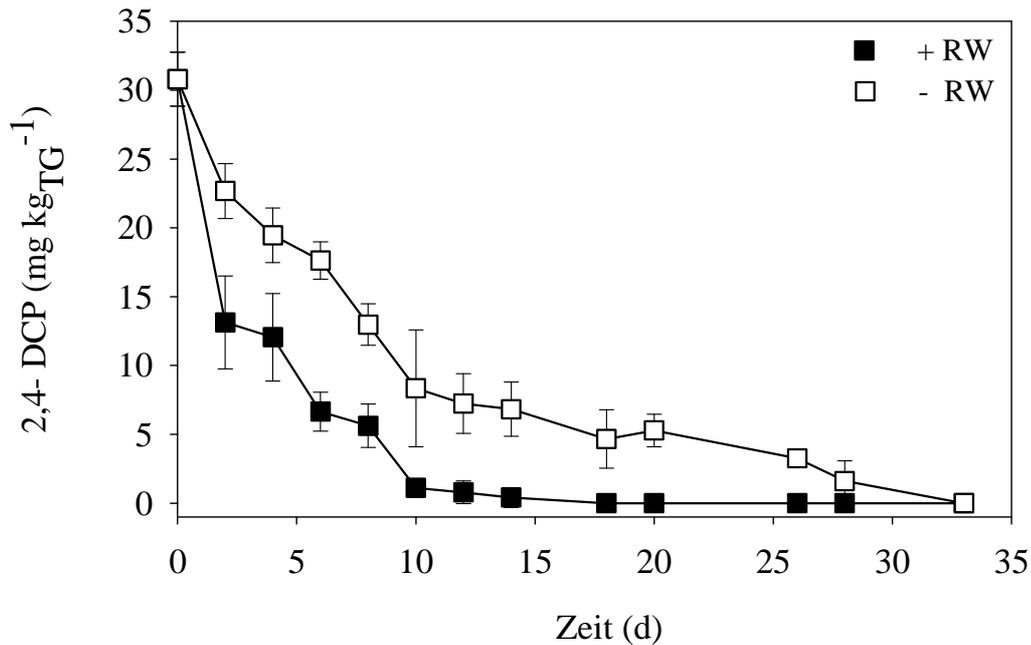


Abbildung 17: Einfluss von *Aporrectodea caliginosa* auf die Abnahme von 2,4-DCP in Bodensäulen mit landwirtschaftlichem Boden aus Scheyern. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten (\pm Standardabweichungen). Die Inkubation der Säulen erfolgte im Dunkeln bei 15 °C. Abkürzung: + RW, mit Regenwurm; - RW, ohne Regenwurm.

3.2.2. Abbau von 2,4-DCP in vorbehandelten Boden- und Drilosphärenproben

Im Verlauf des Bodensäulenversuches (vgl. 3.2.1.) zeigte sich ein positiver Effekt von Regenwürmern der Gattung *Aporrectodea* auf die Abnahme von 2,4-DCP im landwirtschaftlichen Boden. Um einen möglichen Einfluss dieser Regenwurm- und/oder 2,4-DCP Vorbehandlung auf das 2,4-DCP Abbaupotential von Boden- und Drilosphärenproben zu untersuchen, wurden oxische Mikrokosmen in Form von Bodenaufschlammungen vorbereitet (vgl. 2.4.2.2.).

3.2.2.1. Abbau von 2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen

Unabhängig von einer 2,4-DCP Vorbehandlung erfolgte der komplette Abbau von 2,4-DCP in Kotkrümelproben innerhalb von 12 Tagen und damit zwei Tage schneller als in den Proben von Gangwänden und den Regenwurm-vorbehandelten oberen und unteren Bodenschichten (Tabelle 28). Nach 17 Tagen konnte in Ansätzen mit 2,4-DCP-vorbehandeltem Darminhalt kein 2,4-DCP mittels HPLC detektiert werden, wohingegen in den korrespondierenden unbehandelten Proben eine komplette Abnahme von 2,4-DCP erst nach 26 Tagen nachgewiesen wurde (Tabelle 28). Bodenproben aus

Regenwurm-unbehandelten Bodensäulen zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Proben ohne Regenwurmeinfluss ein deutlich geringeres 2,4-DCP Abbaupotential, was anhand der Inkubationszeiten von 26 bis 31 Tagen sichtbar wurde (Tabelle 28). Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Regenwurmvorbehandlung (a) die Biodegradation von 2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen beschleunigt und (b) größeren Einfluss auf die 2,4-DCP Biodegradation nimmt als eine Vorbehandlung mit 2,4-DCP selbst.

Tabelle 28: Erfasste Inkubationszeit für den kompletten Abbau von 100 µg 2,4-DCP durch vorbehandeltes Drilosphären- und Bodenmaterial in oxischen Mikrokosmen. Proben wurden aus Bodensäuleninkubationen gewonnen. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C im Dunkeln.

Vorbehandlung	Zeit (d)				
	Kotkrümel	Gangwände	Darminhalt	Boden (0-5 cm)	Boden (5-10 cm)
+ Regenwürmer					
+ 2,4-DCP	12	14	17	14	14
- 2,4-DCP	12	14	26	14	14
- Regenwürmer					
+ 2,4-DCP	n.a. ¹	n.a.	n.a.	26	26
- 2,4-DCP	n.a.	n.a.	n.a.	26	31

¹, nicht anwendbar

Die mitgeführte abiotische Substratkontrolle wies nach Beendigung der Inkubation einen Gesamt-2,4-DCP-Verlust von 25 % auf und entsprach damit den bereits beschriebenen Ergebnissen aus den Abbauprobungen mit feldfrischem Boden (vgl. 3.1.1.).

3.2.2.2. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen

Die Fähigkeit von vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben aus Bodensäuleninkubationen zu einer Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP wurde mit Hilfe von oxischen Mikrokosmen untersucht. Die initiale ¹⁴CO₂-Bildung innerhalb der ersten sieben bis elf Tagen Inkubation in Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelten Proben (außer Darminhalt) lag im Bereich von 0,7 % bis 0,9 % CO₂ pro Tag und war damit höher als in den restlichen Ansätzen (Abbildung 18). Dabei konnte ein

signifikanter, positiv stimulierender Einfluss von Regenwürmern auf die initiale $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung beobachtet werden (Tabelle 29).

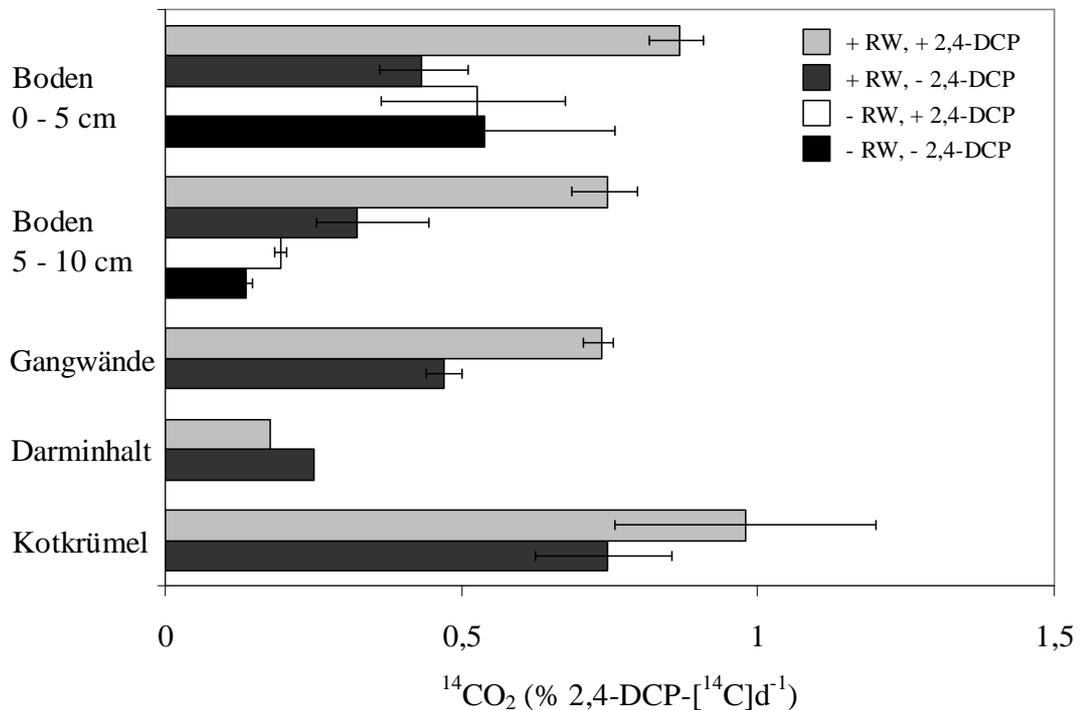


Abbildung 18: Einfluss einer *A. caliginosa*- und/ oder 2,4-DCP Vorbehandlung in Bodensäulen auf die initiale $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung (in % des eingesetzten $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -2,4-DCP) in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur. Das Probenmaterial entstammt dem jeweiligen aufgeführten Bodensäulenansatz. Dargestellte Werte sind Mittelwerte von Duplikaten (außer Darminhalt), die nach 7-11 Tagen Inkubation erfasst wurden. Aufgrund des geringen Probenvolumens des Darminhalts konnten keine Replikate angesetzt werden. Fehlerbalken indizieren den höchsten bzw. niedrigsten gemessenen Wert. Abkürzung: + RW, mit Regenwurm; - RW, ohne Regenwurm.

Nach 300-tägiger Inkubation wurden 36 % bis 67 % des eingesetzten $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -2,4-DCP als $^{14}\text{CO}_2$ aus den Drilosphären- und Bodenproben freigesetzt (Abbildung 19). Wie bereits für die initiale $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung beschrieben, konnte dabei die stärkste $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung für Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelte Proben nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in der mitgeführten abiotischen Substratkontrolle war am Ende der Inkubationszeit vernachlässigbar und entsprach etwa 6 % des eingesetzten 2,4-DCP- ^{14}C (Daten nicht gezeigt). In Regenwurm-vorbehandelten Bodenproben war die ^{14}C -Wiederfindung in Form nicht-extrahierbarer Rückstände nach der Verbrennung im Allgemeinen signifikant höher als in den korrespondierenden unbehandelten Proben [(27,3 % \pm 5,0 % vs. 16,7 % \pm 1,7 %), (Abbildung 19, Tabelle 29)], was darauf hin deutet, dass Regenwürmer die Sorption von 2,4-DCP an Oberflächen und / oder die Assimilation von 2,4-DCP in Biomasse fördern. Im

Vergleich dazu wurde kein signifikanter Effekt einer 2,4-DCP Vorbehandlung auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung- und Wiederfindung sowie auf den Anteil an extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen in Drilosphären- und Bodenproben beobachtet (Tabelle 29).

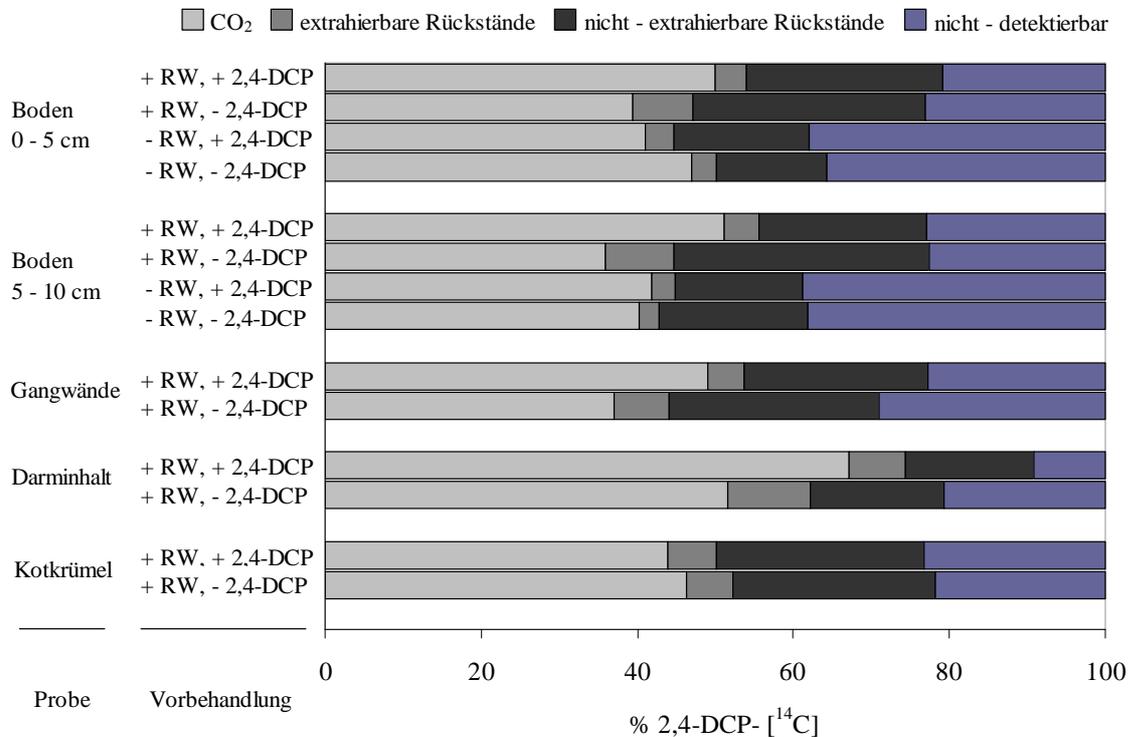


Abbildung 19: Wiederfindung des eingesetzten 2,4-DCP- ^{14}C in Form von $^{14}\text{CO}_2$, extrahierbaren Rückständen (Acetonitril-Extrakt) sowie nach Verbrennung bei $600\text{ }^\circ\text{C}$ (nicht-extrahierbare Rückstände) nach 300 Tagen Inkubation in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur. Das Probenmaterial entstammt dem jeweiligen aufgeführten Bodensäulenansatz. Dargestellte Werte sind Mittelwerte von Duplikaten (außer Darminhalt). Abkürzung: + RW, mit Regenwurm; - RW, ohne Regenwurm.

Die gesammelten Ergebnisse verdeutlichen, dass 2,4-DCP in Regenwurm-beeinflussten Bereichen sowie im umgebenden Boden durch eine aktive mikrobielle Gemeinschaft mineralisiert und damit abgebaut wird.

Tabelle 29: Einfluss einer Regenwurm- bzw. 2,4-DCP Vorbehandlung auf den Verbleib von 2,4-DCP-[¹⁴C] in oxischen Mikrokosmen. Daten, die vom Darmmaterial stammen, wurden aufgrund fehlender Replikate von der Analyse ausgeschlossen. Aufgeführte Werte wurden mittels Permutations- *t*-Test (n = 9999) berechnet.

Erfasste Parameter	Regenwürmer ^a		2,4-DCP ^b	
	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
¹⁴ CO ₂ -Bildung d ⁻¹	2,278	0,048*	1,666	0,130
¹⁴ CO ₂ -Wiederfindung	0,486	0,622	1,983	0,077
Extrahierbare Rückstände	3,490	0,007*	- 1,379	0,191
Nicht-extrahierbare Rückstände	5,093	0,001*	- 0,926	0,361
Nicht-detektierbar	- 13,038	0,001*	- 0,129	0,897

^a, die Berechnung erfolgte auf Grundlage von Mittelwerten Regenwurm-vorbehandelter Proben (unabhängig von einer 2,4-DCP Vorinkubation)

^b, die Berechnung erfolgte auf Grundlage von Mittelwerten 2,4-DCP-vorbehandelter Proben (unabhängig von einer Regenwurm Vorinkubation)

*, signifikante Unterschiede (*p* < 0,05)

3.2.3. Einfluss von *Aporrectodea caliginosa* auf die Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP in feldfrischem Boden

¹⁴C-Abbauversuche in oxischen Mikrokosmen zeigten ein hohes Mineralisierungspotential der vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben aus Bodensäuleninkubationen. Um einen möglichen direkten Einfluss von Regenwürmern auf die Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP nachzuweisen, wurde feldfrischer, landwirtschaftlicher Boden mit und ohne Regenwurm bei Raumtemperatur unter oxischen Bedingungen inkubiert und die Abnahme von 2,4-DCP sowie die Bildung von ¹⁴CO₂ mittels HPLC und Szintillationszähler verfolgt. Dabei zeigten Regenwurm-supplementierte Ansätze im Vergleich zu den Regenwurm-unbehandelten Ansätzen eine schnellere Abnahme von 2,4-DCP (Abbildung 20). So konnte nach drei Tagen noch ein Drittel des eingesetzten 2,4-DCP detektiert werden. Nach 20- bzw. 28-tägiger Inkubation wurde kein 2,4-DCP mehr im Boden mit bzw. ohne Regenwurm nachgewiesen und der Abbauversuch beendet (Abbildung 20). Die Bildung von ¹⁴CO₂ konnte in allen Ansätzen zu jedem Zeitpunkt beobachtet werden. Während der ersten sechs Tage lag die tägliche ¹⁴CO₂-Bildungsrate für Regenwurm-supplementierte Ansätze bei 0,8 % sowie bei 1,1 % für Regenwurm-unsupplementierte Ansätze (Abbildung 20). Im weiteren Verlauf der Inkubation wiesen unsupplementierte Proben eine stärkere Zunahme an ¹⁴CO₂ auf als die korrespondierenden Ansätze mit

Regenwurm. Insgesamt wurden nach 69 Tagen 15 % (mit Regenwurm) bzw. 18 % (ohne Regenwurm) des eingesetzten ^{14}C als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt (Abbildung 20).

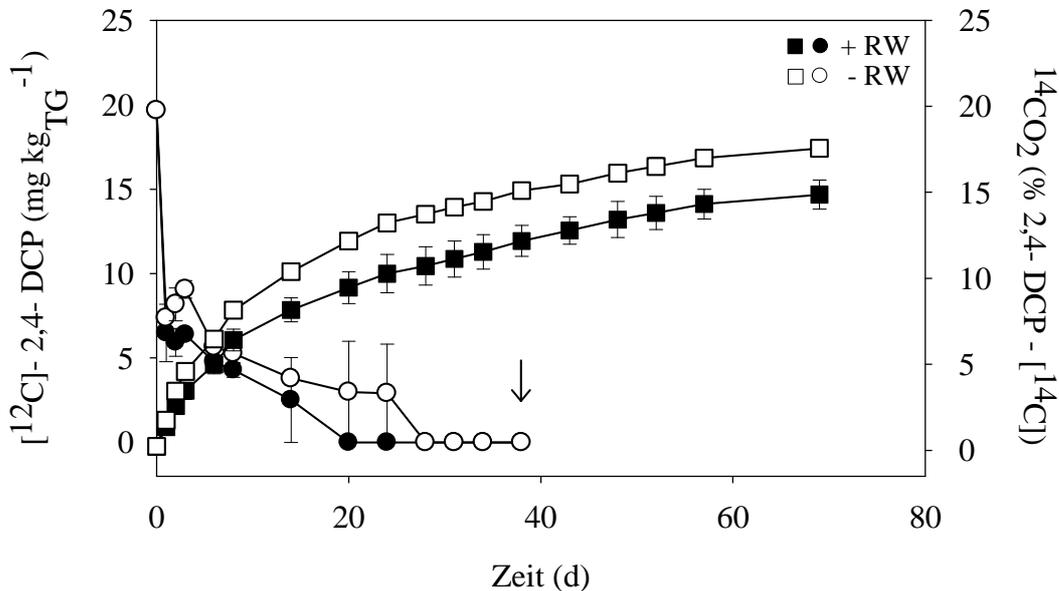


Abbildung 20: Einfluss von Regenwürmern auf die Abnahme von 2,4-DCP und Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ in oxischen Mikrokosmen mit feldfrischem Boden. Die Inkubation erfolgte für 69 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln. Datenpunkte stellen Mittelwerte (\pm Standardabweichungen) von Duplikaten dar. Der Pfeil markiert die Beendigung der [^{12}C]-2,4-DCP Kontrollansätze. Symbole: Kreis, Abnahme von [^{12}C]-2,4-DCP; Quadrat, Bildung von $^{14}\text{CO}_2$.

Die vorliegende Diskrepanz zwischen der erfassten 2,4-DCP Abnahme und der parallel stattfindenden Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ in den beiden Ansätzen legt die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit von Regenwürmern die biologische Verfügbarkeit von 2,4-DCP, u.a. durch Aufnahme in das eigene Gewebe oder durch einen Sorptions-fördernden Effekt, mindert und damit die CO_2 -Bildung über einen bestimmten Zeitraum verringert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Boden- und Regenwurmproben nach Beendigung der Inkubation auf ^{14}C -Rückstände untersucht. Der nach der Extraktion im Boden verbliebene ^{14}C -Anteil betrug dabei in beiden Fällen 67 % bis 68 % des eingesetzten 2,4-DCP- ^{14}C (Abbildung 21). Im untersuchten Regenwurmgewebe konnten nach Acetonitrilextraktion und anschließender Verbrennung bei 600 °C insgesamt 7 % des zu Inkubationsbeginn vorliegenden ^{14}C wiedergefunden werden (Abbildung 21). Die erzielten Ergebnisse deuten an, dass durch die Aufnahme von [U- ^{14}C]-2,4-DCP in das Regenwurmgewebe die Substratkonzentration im Boden abnimmt und folglich die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung geringer ist als in den Regenwurm-unbehandelten Proben. Ein stimulierender Effekt der Regenwürmer auf die Sorption an Oberflächen konnte anhand des durchgeführten Versuches nicht gezeigt werden.

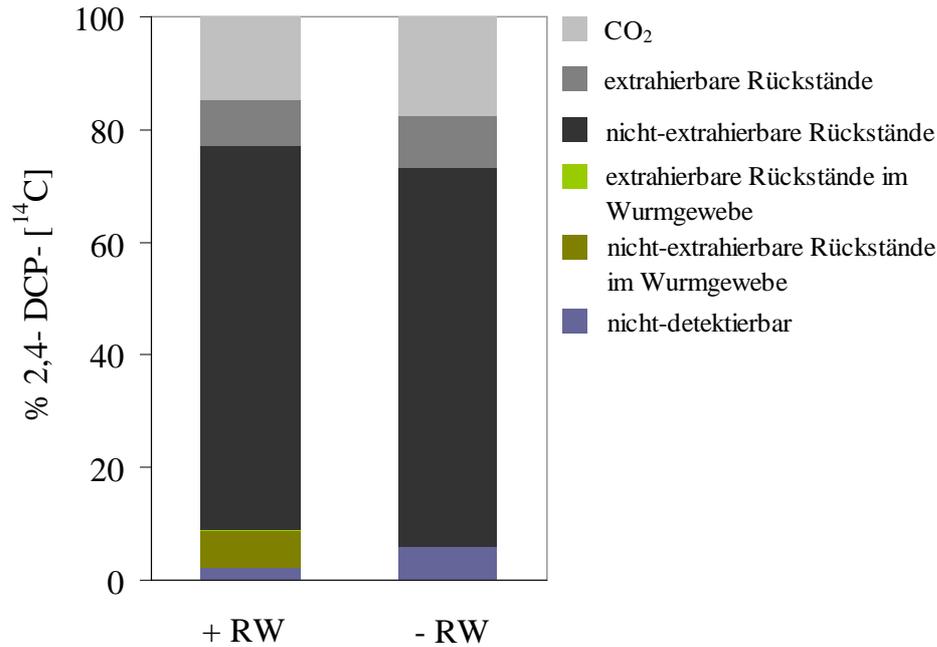


Abbildung 21: Wiederfindung des verwendeten [U-¹⁴C]-2,4-DCP als ¹⁴CO₂, extrahierbarer Rückstand (Acetonitril-Extrakt) sowie im Anschluss an die Verbrennung bei 600 °C als nicht-extrahierbarer Rückstand nach 69 Tagen Inkubation in oxischen Mikrokosmen mit bzw. ohne Einfluss von Regenwürmern bei Raumtemperatur. Dargestellte Werte sind Mittelwerte von Duplikaten. Abkürzung: + RW, mit Regenwurm; - RW, ohne Regenwurm.

3.2.4. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP im Regenwurmgewebe

Mit Hilfe von oxischen Mikrokosmen konnte gezeigt werden, dass Regenwürmer 2,4-DCP im Gewebe akkumulieren. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Untersuchung kamen Sanchez-Hernandez & Wheelock (2009) zu dem Ergebnis, dass das Gewebe des anözischen Regenwurms *Lumbricus terrestris* nach Inkubation mit dem Pestizidmetabolit Chlorpyrifos-Oxon eine erhöhte Aktivität von Karboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aufwies. Diese Enzyme spalten Karboxylester und können somit u.a. zu einer Detoxifizierung von Insektiziden beitragen (Sogorb & Vilanova, 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein [U-¹⁴C]-2,4-DCP Abbauversuch mit Gewebe von *Aporrectodea caliginosa* unter oxischen Bedingungen durchgeführt (vgl. 2.4.3.3.). Um mögliche mikrobielle Effekte auf die Mineralisierung bewerten zu können, wurden Kontrollansätze mit Antibiotika sowie Natriumazid mitgeführt. Nach 37 Tagen Inkubation waren die erfassten ¹⁴CO₂-Werte für alle Ansätze sehr ähnlich und lagen im Bereich von 3,6 % bis 4,1 % des eingesetzten 2,4-DCP-[¹⁴C] (Abbildung 22). Der Anteil der im Regenwurmgewebe detektierten ¹⁴C-Rückstände betrug für Ansätze ohne bzw. mit Darminhalt 5,1 % und 8,7 % des eingesetzten 2,4-DCP-[¹⁴C] (Abbildung 22) und entsprach in etwa dem nach dem Mikrokosmenversuch erfassten Wert. Die

vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass unter den gewählten Bedingungen eine Akkumulation von 2,4-DCP- ^{14}C , aber keine Mineralisierung von $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -2,4-DCP im untersuchten Regenwurmgewebe stattfand.

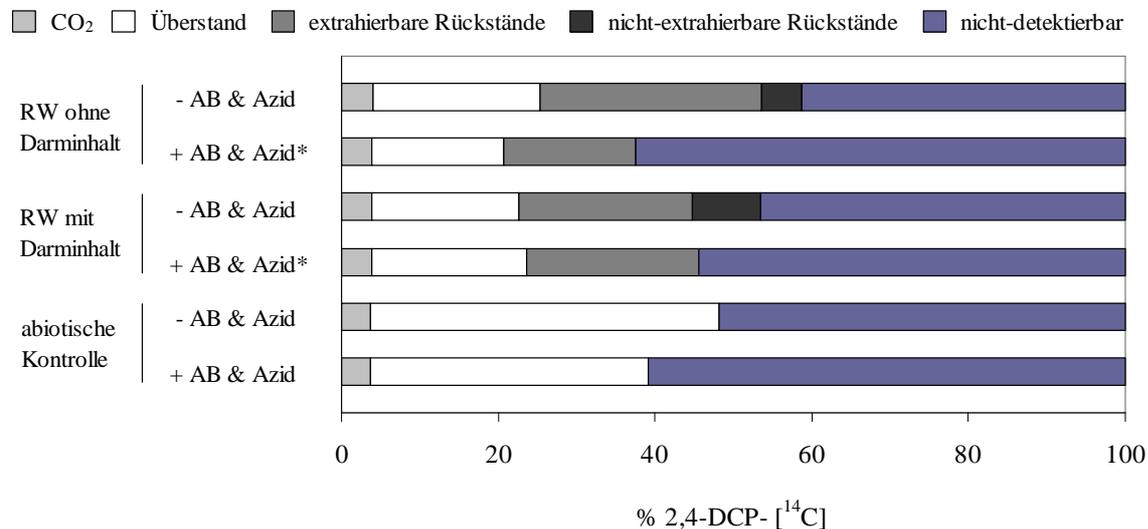


Abbildung 22: Wiederfindung von 2,4-DCP- ^{14}C in Form von $^{14}\text{CO}_2$, extrahierbaren Rückständen (Acetonitril-Extrakt) und in extrahiertem Material (nicht-extrahierbare Rückstände) sowie in der verbleibenden PBS-Lösung nach 37 Tagen Inkubation von Regenwurmgewebe und Kontrollansätzen in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abkürzungen: RW, Regenwurm, + AB, mit Antibiotika; - AB, ohne Antibiotika. *, Regenwurmansätze mit Natriumazid wurden nach Beendigung des Versuches nicht verbrannt. Abgebildete Daten zeigen Mittelwerte aus Triplikaten (Ansätze ohne Darminhalt), Duplikaten (Ansätze mit Darminhalt) sowie die einfach erfassten Messwerte der abiotischen Kontrollansätze.

3.3. Potentiell 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen

3.3.1. Anreicherung, phylogenetische Analyse und Charakterisierung

3.3.1.1. Isolierung potentiell 2,4-DCP-verwertender Mikroorganismen

Potentiell, *in situ*-relevante 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen wurden aus 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben sowie feldfrischem Boden unter oxischen und anoxischen Bedingungen isoliert. Insgesamt konnten 306 Isolate aus den vier Anreicherungsansätzen gewonnen werden. Die phylogenetische Zuordnung erfolgte mit Hilfe der 16S rRNA, wobei die analysierten Sequenzen eine Länge von $629 \text{ bp} \pm 71 \text{ bp}$ ($n = 306$) aufwiesen. Die erhaltenen Isolate zeigten eine 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von $\geq 99 \%$ zu bekannten Bodenmikroorganismen (Tabelle-AH 3

bis Tabelle-AH 6) und stellen mit aller Wahrscheinlichkeit keine neuen Arten dar (Stackebrandt & Ebers, 2006).

Im Verlauf des Anreicherungsansatzes I wurden 60 Isolate gewonnen und zu insgesamt zwölf verschiedenen Familien aus vier Phyla zugeordnet (Abbildung 23). In der Drilosphäre sowie den oberen 5 cm des Bodens wurden überwiegend Gammaproteobakterien (u.a. *Pseudomonadaceae*) mit relativen Häufigkeiten von bis zu 75 % detektiert. Zudem konnten Bakterien aus den Familien *Bacillaceae* (nächst verwandter Organismus: *Bacillus weihenstephanensis*) und *Flavobacteriaceae* (nächst verwandter Organismus: *Chryseobacterium* sp.) isoliert werden (Tabelle-AH 3). Im Vergleich dazu gehörte die Mehrzahl der Isolate aus der unteren Bodenschicht zur Familie der *Sphingobacteriaceae* (nächst verwandter Organismus: *Pedobacter* sp.).

Nach Inkubation von feldfrischem Boden mit 2,4-DCP (Anreicherungsansatz II) wurden 193 Bakterien isoliert und anhand ihrer 16S rRNA 13 unterschiedlichen Familien zugeordnet (Abbildung 23). Die als 2,4-DCP Abbauer bekannten Familien *Pseudomonadaceae* und *Nocardiaceae* waren dabei mit relativen Abundanzen von 38 % bzw. 21 % am häufigsten vertreten. Weiterhin konnten *Enterobacteriaceae*- sowie *Microbacteriaceae*-verwandte Isolate mit erhöhten Abundanzen detektiert werden (Abbildung 23).

Im Verlauf des Anreicherungsansatzes III wurden 24 Isolate aus 2,4-DCP-vorbehandeltem Boden isoliert. Zehn Reinkulturen wurden mit 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten von 99 % bis 100 % den *Enterobacteriaceae* (Gattung *Serratia*) zugeordnet, weitere sechs Isolate den *Oxalobacteraceae* (Gattung *Janthinobacterium*) (Abbildung 23). Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Anreicherungen konnten im Verlauf des dritten Anreicherungsansatzes keine *Actinobacteria* isoliert werden.

Ein mikrobieller 2,4-DCP Abbau unter anoxischen Bedingungen wurde durch Zhang & Wiegel (1990) beschrieben. Basierend auf den dargelegten Ergebnissen wurde eine Anreicherung anaerober, 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen durchgeführt. Dabei wurden 29 Isolate gewonnen und zu vier Familien aus den drei Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* sowie *Bacteroidetes* zugeordnet (Abbildung 23). Der Grossteil der erhaltenen Isolate (52 %) wurde dabei kultivierten Bakterien der Familie *Pseudomonadaceae* zugeordnet, aber auch *Enterobacteriaceae*-verwandte Isolate waren mit einer relativen Häufigkeit von 38 % dominierend. Weiterhin konnten *Clostridiaceae*- und *Flavobacteriaceae*-verwandte Isolate mit Abundanzen von 7 % bzw. 3 % gewonnen werden.

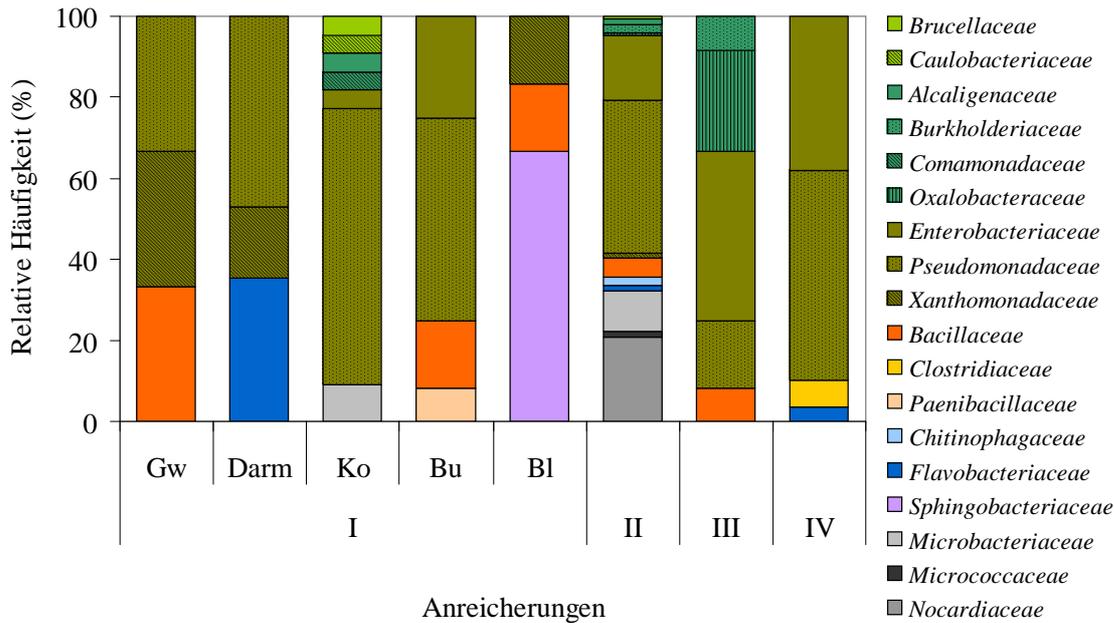


Abbildung 23: Relative Häufigkeiten isolierter Bakterienfamilien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen (I-III) und anoxischen (IV) Bedingungen bei 15 °C. Abkürzungen: I, Anreicherungsansatz I mit vorbehandeltem Drilosphären- und Bodenmaterial; II, Anreicherungsansatz II mit feldfrischem Boden; III, Anreicherungsansatz III mit 2,4-DCP-vorinkubiertem Boden; IV, anoxischer Anreicherungsansatz IV mit 2,4-DCP-vorinkubiertem Boden; Gw, Gangwände; Darm, Darminhalt, Ko, Kotkrümel, Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm).

Die gesammelten Daten aus den Anreicherungsansätzen I bis IV zeigen, dass feldfrischer Boden sowie 2,4-DCP-vorbehandelte Drilosphären- und Bodenproben ein breites Spektrum möglicher 2,4-DCP-abbauender Bakterien beherbergen.

3.3.1.2. Untersuchung der 2,4-DCP-Toleranz von Isolat AR-200

Um einen möglichen toxischen Effekt von erhöhten 2,4-DCP Konzentrationen auf Reinkulturen zu untersuchen, wurde ein Toxizitätstest, angelehnt an Singer- Bohne *et al.* (1993), durchgeführt. Dafür wurden Zellen des Isolates AR-200 (nächst kultivierter Verwandter: *Janthinobacterium lividum*, HQ824941) mit Glukose vorinkubiert und anschließend mit unterschiedlich hohen 2,4-DCP-Mengen versetzt. Das stärkste Wachstum nach 96 h zeigte der Kontrollansatz ohne 2,4-DCP nur mit Glukose, Ansätze mit 2,4-DCP wiesen im Vergleich dazu ein geringeres Zellwachstum auf (Abbildung 24). Unterschiede zwischen den einzelnen Proben konnten dabei nicht detektiert werden.

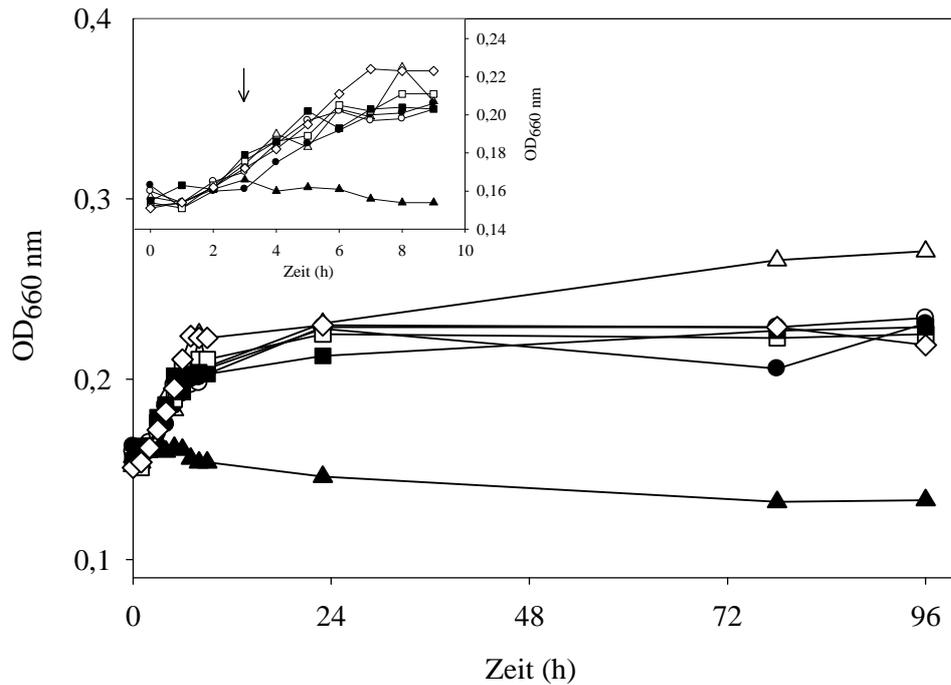


Abbildung 24: Einfluss unterschiedlicher 2,4-DCP Konzentrationen auf das Wachstum von Isolat AR-200. Das verkleinerte Diagramm zeigt den Inkubationszeitraum von 0 h bis 9 h, der Pfeil markiert die Zugabe von 2,4-DCP (vgl. 2.5.2.3.). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz nur mit Glukose, als Negativkontrolle ein Ansatz nur mit MSM₁₀-Medium mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und 125 rpm. Symbole: Dreieck (weiß), Glukose-Kontrolle; Dreieck (schwarz), Medium-Kontrolle; Kreis (weiß), 8 mg/l 2,4-DCP; Kreis (schwarz), 16 mg/l 2,4-DCP; Quadrat (weiß), 40 mg/l 2,4-DCP; Quadrat (schwarz), 80 mg/l 2,4-DCP; Raute (weiß), 160 mg/l 2,4-DCP.

Die gewählten 2,4-DCP Konzentrationen im Bereich von 8 mg 2,4-DCP pro Liter bis 160 mg 2,4-DCP pro Liter zeigten zwar einen leicht inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum von Isolat AR-200, jedoch führte die Zugabe von 2,4-DCP zu keiner drastischen Abnahme der optischen Dichte (Abbildung 24). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Isolat AR-200 auch bei erhöhten 2,4-DCP Konzentrationen zum Wachstum befähigt ist und somit einen potentiellen 2,4-DCP Abbauer darstellt. Die mitgeführte Negativkontrolle zeigte während der 96-stündigen Inkubation eine deutliche Abnahme der optischen Dichte (Abbildung 24) und belegt, dass das beobachtete Wachstum in den restlichen Ansätzen auf Glukose und / oder 2,4-DCP zurückzuführen ist.

3.3.1.3. Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP durch ausgesuchte Reinkulturen

Die Fähigkeit einiger Isolate 2,4-DCP zu mineralisieren, wurde mit Hilfe von radioaktiv-markiertem 2,4-DCP untersucht. Dafür wurden elf Reinkulturen aus den Familien der *Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Brucellaceae*, *Caulobacteraceae*,

Chitinophagaceae, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Xanthomonadaceae*, der als 2,4-DCP Abbauer beschriebene *Cupriavidus necator* JMP134 als Positivkontrolle (vgl. 2.5.1.) sowie eine abiotische Substratkontrolle mit 120 µg $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ -2,4-DCP inkubiert. Die erfassten Werte für das nach 129 Tagen Inkubation gebildete $^{14}\text{CO}_2$ lagen lediglich für die mitgeführte Positivkontrolle deutlich über der abiotischen Negativkontrolle ohne Zellmaterial (Abbildung 25). Isolat AR-94b1 (nächst kultivierter Verwandter: *Chitinophaga* sp., JN590375) zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle zwar ein erkennbar geringeres Mineralisierungspotential, wies jedoch als einzige Reinkultur gegenüber der Negativkontrolle eine leicht erhöhte $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung auf (Abbildung 25). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die eingesetzten Isolate unter den gewählten Bedingungen nur bedingt zu einer Mineralisierung von 2,4-DCP befähigt sind, jedoch die Gegenwart des Substrates in *in situ* relevanten Konzentrationen tolerieren. Am Ende der Inkubation wurden etwa 62 % der eingesetzten Radioaktivität im flüssigen Überstand nachgewiesen; weitere 30 % waren mit den angewendeten Methoden nicht detektierbar (Abbildung 25).

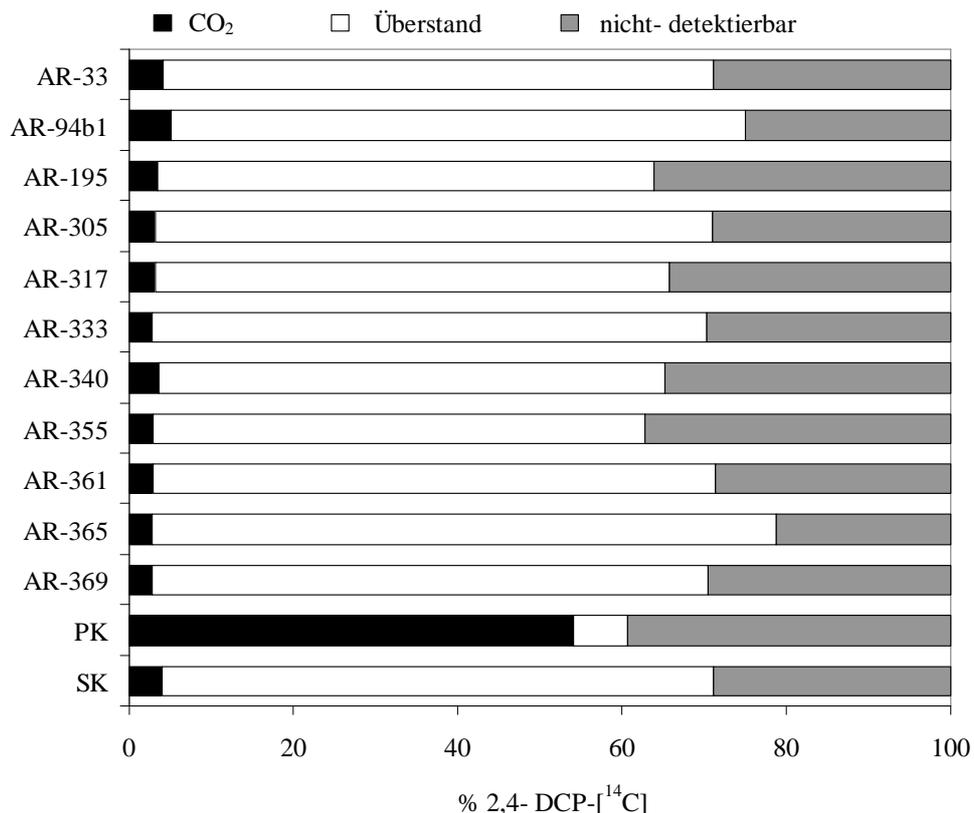


Abbildung 25: Wiederfindung von 2,4-DCP-[^{14}C] als $^{14}\text{CO}_2$ und gelöst im verbleibenden Überstand nach 129 Tagen Inkubation von Isolaten und Kontrollansätzen in oxischen Mikrokosmen bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abkürzungen: PK, Positivkontrolle *Cupriavidus necator*; SK, abiotische Substratkontrolle.

3.3.2. Kultivierungsunabhängige Genmarkeranalyse der 2,4-DCP- und Phenol-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft

Die potentiell am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Mikroorganismen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der strukturellen Gene *tfdB* und *pheA* phylogenetisch gruppiert und bekannten Gensequenzen zugeordnet. Die Analyse erfolgte zum einen mittels Pyrosequenzierung und zusätzlich durch das Erstellen von Genbibliotheken mittels Klonierung. Die Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden kann die vorliegende Diversität so genau wie möglich abschätzen und beurteilen, ermöglicht einen Vergleich der Ergebnisse und minimiert die jeweiligen Nachteile der einzelnen Technik (vgl. 4.4.).

3.3.2.1. Phylogenetische Analyse der detektierten *tfdB*-Sequenzen mittels Pyrosequenzierung

Aus DNA Proben der Bodensäulenversuche wurden *tfdB*-Genfragmente für die Pyrosequenzierung und die sich anschließende Erstellung von Amplikon-Genbibliotheken amplifiziert. Die Amplifikation der Genfragmente war für alle Proben erfolgreich und lieferte Banden mit der gewünschten Fragmentlänge.

Insgesamt wurden 23.820 *tfdB*-Teilsequenzen in 15 Amplikon-Genbibliotheken mit einer durchschnittlichen Sequenzlänge von 431 bp \pm 2 bp nach durchgeführter Pyrosequenzierung analysiert. Aufgrund einer Sequenzüberlappung von mehr als 300 bp wurden vorwärts- und rückwärtsgerichtete Sequenzen vereinigt und zusammen mittels JAguc2 analysiert (vgl. 2.6.15.1.). Die Zuordnung in OTUs basierte auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Dieser Grenzwert wurde durch ein schrittweises Clustering der *tfdB*-Sequenzen durch JAguc2 mit Sequenzunterschieden von 0 % bis 100 % bestimmt (vgl. 2.6.15.3.; Palmer *et al.*, 2012). Mit zunehmender Sequenzähnlichkeit nahm die Anzahl der OTUs ab und stabilisierte sich im Bereich von 12 % bis 40 % Sequenzunterschied (Abbildung 26). Der für die *tfdB*-Analyse gewählte Grenzwert von 80 % Sequenzähnlichkeit (entspricht einem Sequenzunterschied von 20 %) lag zudem in einem Bereich, der durch Untersuchungen anderer struktureller Gene [(u.a. 70 % bis 89 % für *narG*, *nosZ*, *LmPH*), (Basile & Erjiman, 2010; Palmer *et al.*, 2009)] bestätigt wurde und wurde somit als geeignet betrachtet. Die durchgeführte Vergleichsanalyse einer ausgewählten Probe mit der Software QIIME (Quince *et al.*, 2011) führte zu identischen Cluster-Ergebnissen (65 OTUs vs. 64 OTUs) und belegt damit, dass JAguc2 für die Analyse von Pyrosequenzierungsdaten mit dem Datensatz-basierten Grenzwert von 80 % geeignet ist.

Die amplifizierten *tfdB*-Teilfragmente wurden anhand des ermittelten Grenzwertes anschließend in 58 OTUs zusammengefasst.

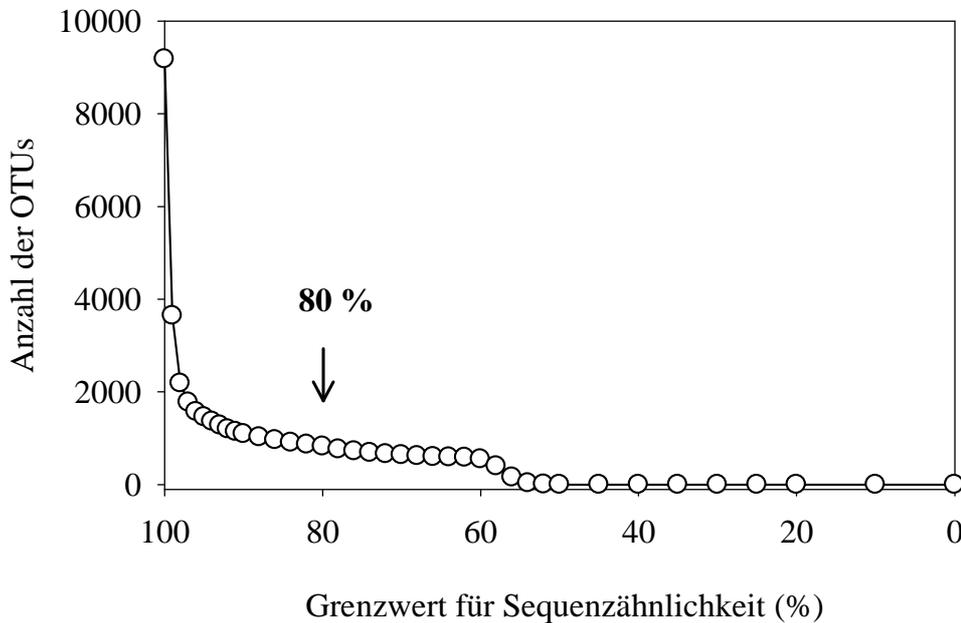


Abbildung 26: Einfluss verschiedener Grenzwerte für Sequenzähnlichkeit auf die Anzahl der detektierten OTUs am Beispiel des strukturellen Gens *tfdB*. Der Pfeil markiert den für weitere Analysen verwendeten Grenzwert von 80 %.

Rarefaction-Analysen der 15 Amplikon-Genbibliotheken wurden erstellt, um die zu erwartende Anzahl an OTUs abzuschätzen (Abbildung 27). Für fast alle Proben wurde ein abflachender Kurvenverlauf beobachtet, was darauf hin deutet, dass der Probenumfang für die Diversitätsanalyse möglicher 2,4-DCP Abbauer ausreichend war und der Großteil der Diversität erfasst wurde. Coverages der untersuchten Amplikon-Genbibliotheken lagen in einem Bereich von 91,4 % bis 98,5 %.

Im feldfrischen, landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern wurden 15 OTUs, basierend auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %, detektiert (Tabelle 30). Shannon-Index und Evenness waren mit Werten von 2,15 bzw. 0,79 hoch und indizieren eine hohe *tfdB*-Biodiversität. Nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen wurden in Drilosphärenproben zehn bis 15 OTUs nachgewiesen (Tabelle 30). Die Diversitätsindizes lagen im Bereich von 1,92 bis 2,29 (Shannon) bzw. 0,78 bis 0,89 (Evenness) und waren vergleichbar mit den ermittelten Werten im feldfrischen Boden. Die vorliegenden Unterschiede zwischen 2,4-DCP-vorbehandelten und 2,4-DCP-unvorbehandelten Drilosphärenproben waren nicht signifikant (t-Test: $H' p > 0,05$; $J' p > 0,05$), so dass ein Einfluss einer 2,4-DCP Vorinkubation auf die Diversität von *tfdB*-Genen in Gangwänden, Darminhalt und Kotkrümeln nicht gezeigt werden konnte.

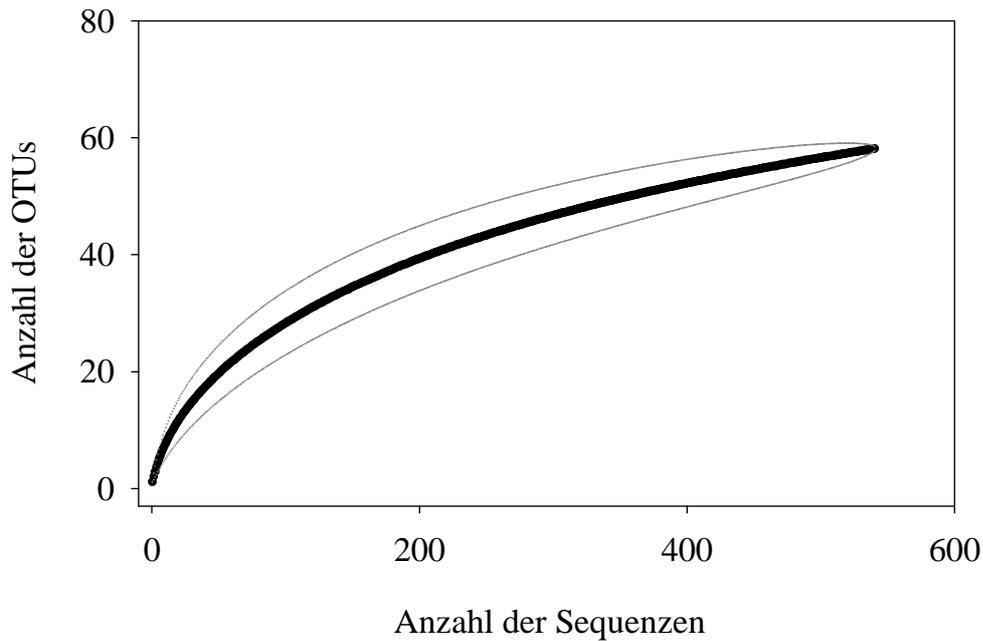


Abbildung 27: Repräsentative Rarefaction-Analyse von *tfdB*-Teilsequenzen aus der Amplikon-Genbibliothek von Gangwandmaterial ohne 2,4-DCP Vorbehandlung in Bodensäulen. Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Die grauen Linien geben das obere und untere 95 % Konfidenzintervall an.

In Bodenproben der oberen 5 cm wurden elf bis 16 OTUs detektiert (Tabelle 30), in den korrespondierenden Bodenproben der unteren 5 cm bis 10 cm zehn bis 16 OTUs. Für beide Schichten wurde kein signifikanter Einfluss von 2,4-DCP und Regenwürmern auf die Diversität von *tfdB*-Genen nachgewiesen (t-Test: 2,4-DCP, $H' p > 0,05$, $J' p > 0,05$; Regenwürmer, $H' p > 0,05$, $J' p > 0,05$). Unterschiede wurden jedoch hinsichtlich der Bodentiefe beobachtet. Shannon-Index und Evenness waren in den oberen Bodenschichten mit Werten von 2,13 bis 2,51 bzw. 0,86 bis 0,90 höher (t-Test: $H' p > 0,05$, $J' p < 0,05$) als in den unteren Bodenschichten, was darauf hin deutet, dass die phylogenetische Diversität von *tfdB* abhängig von der Bodentiefe ist.

Detektierte OTUs mit einer relativen Häufigkeit von ≥ 1 % in den Amplikon-Genbibliotheken wurden mittels Protein-BLAST phylogenetisch analysiert. In feldfrischem, landwirtschaftlich genutztem Boden aus Scheyern wurden 15 OTUs nachgewiesen und den Phyla der *Alpha*- und *Betaproteobacteria* sowie den *Actinobacteria* zugeordnet (Abbildung 28, Abbildung 30). Die aufgetretenen Unterschiede zwischen diesen OTUs und bereits bekannten *tfdB*-Sequenzen lagen im Bereich von 13 % bis 44 %, was darauf hin deutet, dass der Boden aus Scheyern Bakterien mit phylogenetisch neuen *tfdB*-Aminosäuresequenzen beherbergt.

Tabelle 30: Diversitätsanalyse von *tfdB*-Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material vor bzw. nach einer 33-tägigen Bodensäuleninkubation bei 15 °C. Zahlen in Klammern geben die untere und obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls an. Abkürzung: RW, Regenwurm

Probe & Vorbehandlung	Anzahl OTUs ^a	Anzahl Sequenzen ^a	Shannon ^b	Evenness ^b
t ₀ ^c	15	1427	2,15 (2,09; 2,20)	0,79 (0,77; 0,81)
Gangwände				
+ 2,4-DCP	10	389	1,93 (1,85; 2,00)	0,84 (0,80; 0,87)
- 2,4-DCP	15	449	2,29 (2,21; 2,37)	0,85 (0,82; 0,88)
Darminhalt				
+ 2,4-DCP	11	980	1,92 (1,87; 1,98)	0,80 (0,78; 0,83)
- 2,4-DCP	10	579	1,99 (1,93; 2,05)	0,86 (0,84; 0,89)
Kotkrümel				
+ 2,4-DCP	11	954	2,13 (2,09; 2,18)	0,89 (0,87; 0,91)
- 2,4-DCP	14	1070	2,06 (2,00; 2,12)	0,78 (0,76; 0,80)
0- 5 cm Boden				
+ RW, + 2,4-DCP	12	688	2,15 (2,09; 2,21)	0,87 (0,84; 0,89)
+ RW, - 2,4-DCP	11	532	2,13 (2,07; 2,19)	0,89 (0,87; 0,91)
- RW, + 2,4-DCP	12	1007	2,13 (2,08; 2,17)	0,86 (0,84; 0,87)
- RW, - 2,4-DCP	16	1607	2,51 (2,47; 2,54)	0,90 (0,89; 0,92)
5 -10 cm Boden				
+ RW, + 2,4-DCP	10	1136	1,83 (1,78; 1,89)	0,80 (0,77; 0,82)
+ RW, - 2,4-DCP	11	1748	2,09 (2,06; 2,12)	0,87 (0,86; 0,89)
- RW, + 2,4-DCP	16	1744	2,26 (2,22; 2,31)	0,82 (0,80; 0,83)
- RW, - 2,4-DCP	14	2476	2,11 (2,07; 2,15)	0,80 (0,78; 0,81)

^a, Relative Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken ≥ 1 %.

^b, Die Berechnung der Diversitätsindizes erfolgte nur für überprüfte *tfdB*-Teilsequenzen mit einer relativen Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken ≥ 1 %.

^c, Feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation.

Dominierende OTUs waren die zu den *Actinobacteria* zählenden OTU 45 und OTU 53 mit relativen Häufigkeiten von 20 % bzw. 35 %. Insgesamt wurden etwa 76 % aller detektierten *tfdB*-Sequenzen aus feldfrischem Boden dem Phylum der *Actinobacteria* (*Arthrobacter*, *Mycobacterium*) zugeordnet (Abbildung 28). OTU 21 (nächst verwandte

tfdB-Sequenz: *Sphingomonas* sp.) wurde nur vor der Bodensäuleninkubation zum Zeitpunkt t_0 mit einer relativen Häufigkeit von 2 % nachgewiesen (Abbildung 28).

In 2,4-DCP-vorinkubierten Proben von Gangwänden, Darminhalt und Kotkrümeln wurden zehn bis elf OTUs detektiert, die mit Sequenzen von *Alpha*- und *Betaproteobacteria* sowie *Actinobacteria* verwandt waren (Abbildung 28, Abbildung 30). *Comamonadaceae*-verwandte *tfdB*-Sequenzen (OTU 29 und 30) waren mit einer relativen Häufigkeit von 46 % dominierend in den Gangwänden und wurden ebenfalls mit erhöhter Abundanz (16 %) in den Kotkrümeln nachgewiesen. Actinobakterielle *tfdB*-Sequenzen wurden mit einer relativen Häufigkeit von etwa 88 % in Proben des Darminhaltes sowie mit einer relativen Häufigkeit von 57 % in Kotkrümelproben detektiert. Etwa ein Drittel der gefundenen OTUs wiesen einen Sequenzunterschied zu bekannten *tfdB*-Sequenzen von bis zu 44 % auf, was darauf hin deutet, dass bislang unkultivierte, potentiell 2,4-DCP-verwertende Bakterien in der 2,4-DCP-beeinflussten Drilosphäre vorkommen. In 2,4-DCP-unvorbehandelten Drilosphärenproben wurde zehn bis 15 OTUs detektiert (Abbildung 28), wobei sich die phylogenetische Zusammensetzung im Vergleich zu den korrespondierenden Drilosphärenproben mit 2,4-DCP Vorbehandlung unterschied (Abbildung 29). Während *Comamonadaceae*-verwandte *tfdB*-Sequenzen (OTU 31) mit einer relativen Häufigkeit von 1,3 % ausschließlich in Gangwandproben nachgewiesen wurden, dominierten actinobakterielle *tfdB*-Sequenzen mit relativen Abundanzen von bis zu 86 % die Amplikon-Genbibliotheken von Gangwänden, Darminhalt und Kotkrümeln (Abbildung 28).

Die phylogenetische Analyse der in Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben detektierten *tfdB*-Sequenzen zeigte eine Dominanz von *Comamonadaceae*-verwandten Sequenzen (OTU 29 und 30) mit relativen Häufigkeiten in den Amplikon-Genbibliotheken von 39 % bis 57 % (Abbildung 28). Im Vergleich dazu wurden in 2,4-DCP-unvorbehandelten Bodenproben keine dieser Sequenzen nachgewiesen. Diese Daten bestätigen die erzielten Ergebnisse der Drilosphärenproben und weisen darauf hin, dass Mikroorganismen aus der Familie der *Comamonadaceae* nach einer Vorinkubation mit 2,4-DCP eine erhebliche Rolle am Abbau von 2,4-DCP spielen. Actinobakterielle *tfdB*-Sequenzen dominierten die Amplikon-Genbibliotheken von Regenwurm- oder 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben sowie die unbehandelten Kontrollansätze mit relativen Häufigkeiten von bis zu 86 % (Abbildung 28). Weiterhin wurden *Bradyrhizobiaceae*-verwandte *tfdB*-Sequenzen mit einer erhöhten Abundanz von bis zu 26 % detektiert, was auf weitere mögliche 2,4-DCP Abbauer hinweist.

OTU 58, das einer *Verrucomicrobium*-verwandten Oxidoreduktasesequenz zugeordnet wurde (Abbildung 30), wurde ausschließlich in Regenwurm-unbeeinflussten, mit 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben der oberen 5 cm nachgewiesen (Abbildung 28). Die Sequenzähnlichkeit zu *tfdB*-Sequenzen kultivierter Organismen bzw zu Umweltproben lag bei 73 % und unterstreicht das Vorkommen von phylogenetisch neuen *tfdB*-Sequenzen in diesen Bodenproben.

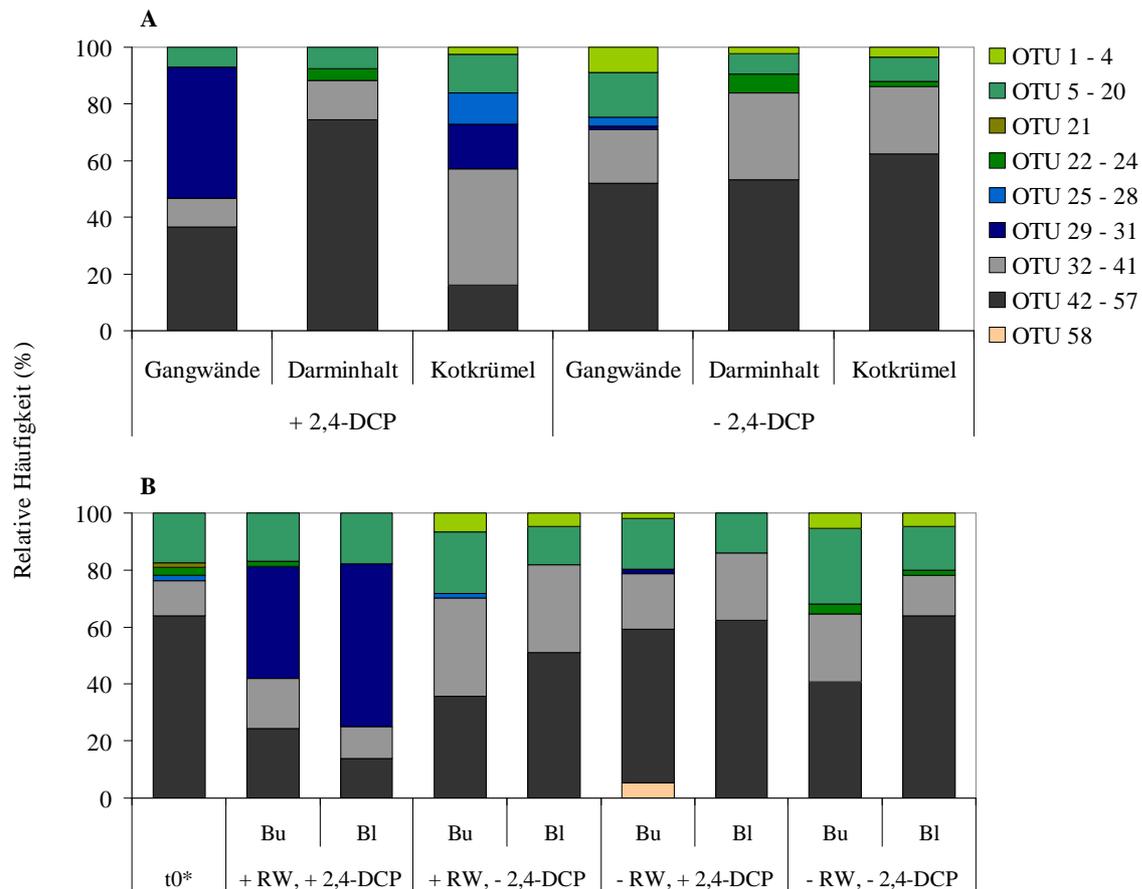


Abbildung 28: Phylogenetische Analyse *in silico* translaterter Aminosäuresequenzen von *tfdB*-Genfragmenten nach Pyrosequenzierung in (A) Drilosphärenproben sowie (B) feldfrischem Boden (t_0) und Bodenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen bei 15 °C. Abkürzungen: Bu, 0-5 cm Bodenprobe; Bl, 5-10 cm Bodenprobe; + RW, mit Regenwurm; - RW, ohne Regenwurm; + 2,4-DCP, mit 2,4-DCP; - 2,4-DCP, ohne 2,4-DCP. *, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation. Phylogenetische Zuordnung der OTUs: siehe Tabelle 31.

In Anwesenheit von Regenwürmern wurde die phylogenetische Zusammensetzung der im Boden und der Drilosphäre vorkommenden *tfdB*-Sequenzen signifikant durch die Zugabe von 2,4-DCP in die Bodensäulen beeinflusst [NPMANOVA: $p < 0,05$; Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex (Bray & Curtis, 1957); Abbildung 29]. Ein signifikanter Einfluss von Regenwürmern auf die phylogenetische Zusammensetzung *tfdB*-tragender

Bakterien konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (NPMANOVA: $p > 0,05$; Abbildung 29). Unterschiede in der OTU-Zusammensetzung der einzelnen Drilosphären- und Bodenproben konnten zudem mittels NMDS gezeigt werden. Nah beieinander liegende Datenpunkte wurden als ähnlich bewertet, weit auseinander liegende dagegen als unähnlich. Gangwand-, Kotkrümel- und Bodenproben nach Inkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung folglich von den restlichen Drilosphären- und Bodenproben (Abbildung 29).

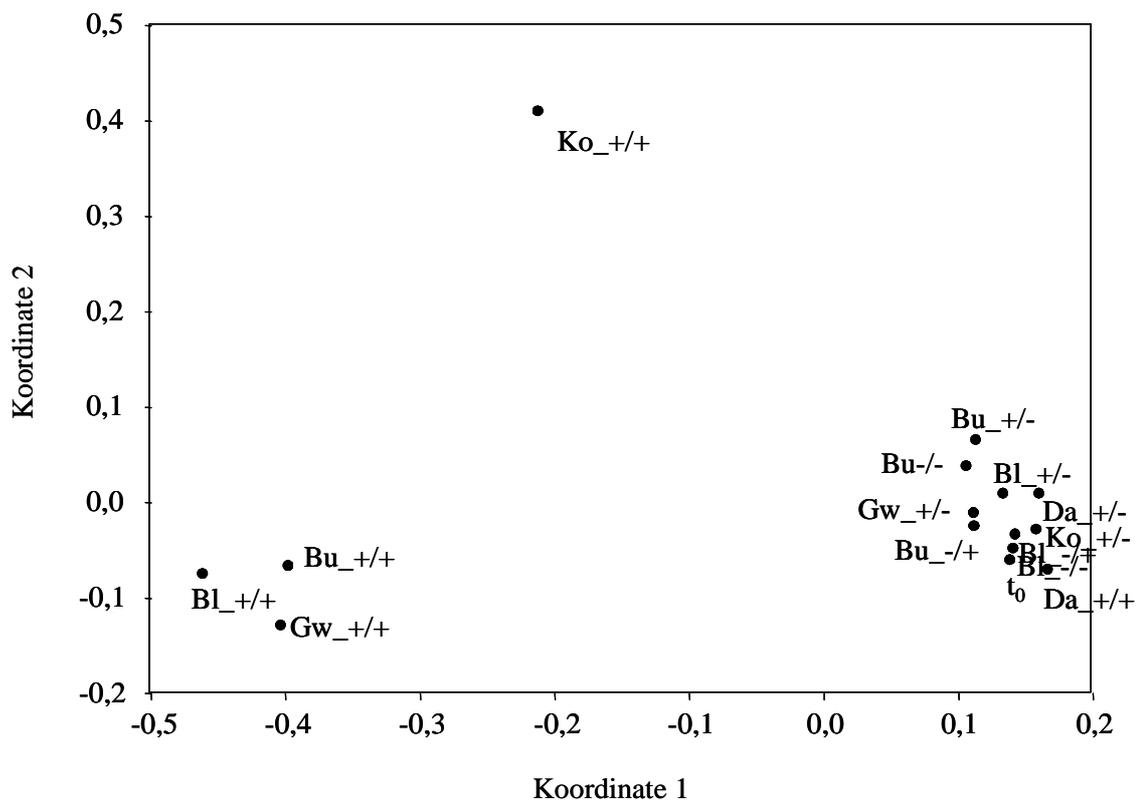


Abbildung 29: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Pyrosequenzierung erhaltenen *tfdB*-Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,09. Abkürzungen: t_0 , feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation; Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +/+, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; +/-, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern; -/+, Bodensäuleninkubation mit 2,4-DCP; -/-, Bodensäuleninkubation ohne Regenwürmer und 2,4-DCP.

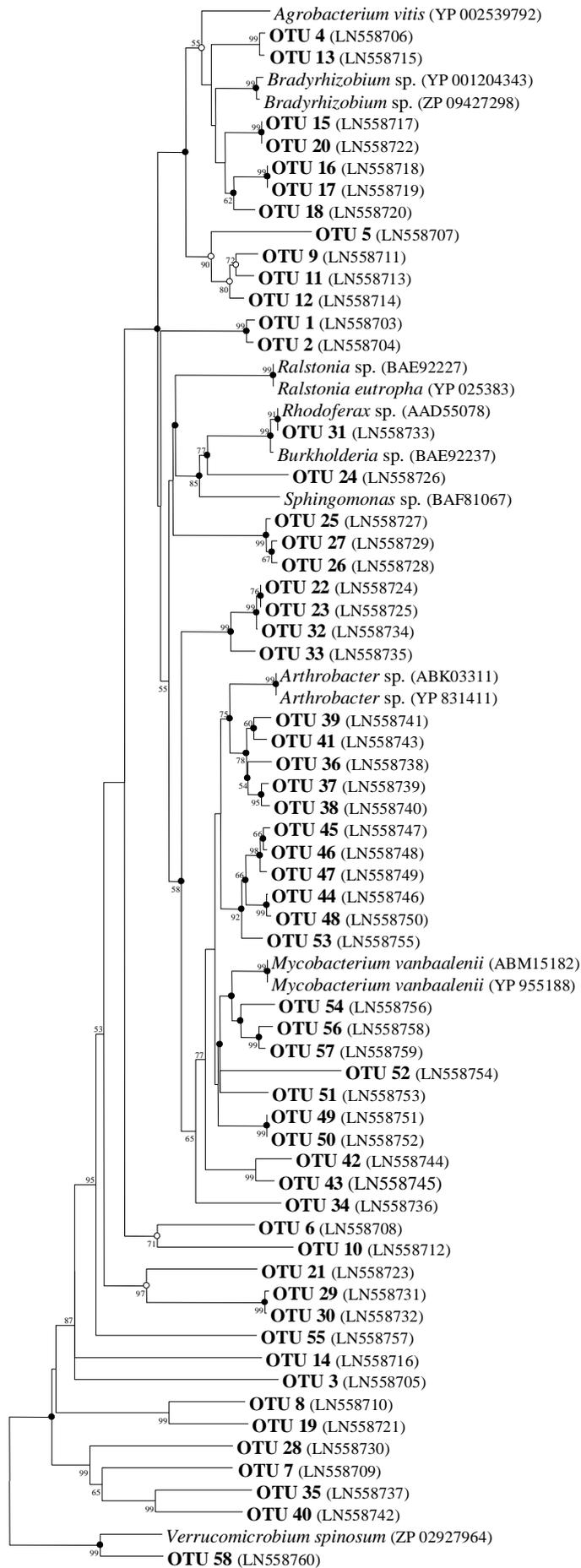
Tabelle 31: Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von *in silico* translatierten, repräsentativen *tfdB*-Aminosäuresequenzen aus Regenwurm- und/ oder 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Pyrosequenzierung. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; Ä, Sequenzähnlichkeit.

OTU ^a	Länge (AS)	Nächster verwandte <i>tfdB</i> -Sequenz, Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
1	144	<i>Agrobacterium vitis</i> (YP002539792)	65
2	159	<i>Agrobacterium vitis</i> (YP002539792)	65
3	117	<i>Agrobacterium vitis</i> (YP002539792)	60
4	165	<i>Agrobacterium vitis</i> (YP002539792)	76
5	145	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	56
6	161	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (YP001204343)	62
7	160	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	80
8	140	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	70
9	159	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	72
10	102	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (YP001204343)	72
11	159	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (YP001204343)	73
12	113	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	75
13	149	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	76
14	165	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	79
15	143	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	79
16	148	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	83
17	159	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (YP001204343)	82
18	149	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	84
19	148	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ZP09427298)	85
20	158	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (YP001204343)	84
21	93	<i>Sphingomonas</i> sp. (BAF81067)	56
22	166	<i>Burkholderia</i> sp. (BAE92237)	61
23	166	<i>Burkholderia</i> sp. (BAE92237)	62
24	131	<i>Burkholderia</i> sp. (BAE92237)	66
25	161	<i>Ralstonia eutropha</i> (YP025383)	61
26	156	<i>Ralstonia</i> sp. (BAE92227)	63
27	165	<i>Ralstonia</i> sp. (BAE92227)	64
28	160	<i>Ralstonia eutropha</i> (YP025391)	99
29	152	<i>Rhodofera</i> sp. (AAD55078)	70

OTU ^a	Länge (AS)	Nächster verwandte <i>tfdB</i> -Sequenz, Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
30	156	<i>Rhodoferax</i> sp. (AAD55078)	84
31	168	<i>Rhodoferax</i> sp. (AAD55078)	99
32	150	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	65
33	166	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	65
34	166	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	68
35	131	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	77
36	174	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	77
37	141	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	78
38	157	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	78
39	174	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	78
40	120	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	79
41	157	<i>Arthrobacter</i> sp. (ABK03311)	80
42	165	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	68
43	148	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	76
44	170	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	79
45	157	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	80
46	167	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	80
47	171	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	80
48	140	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	81
49	148	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	83
50	165	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	83
51	167	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	83
52	100	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	84
53	166	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	84
54	168	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	84
55	166	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	85
56	151	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	86
57	166	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	87
58	158	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> (ZP02927964)	73

^a, Die Sequenzen wurden basierend auf einem Grenzwert von 80 % in OTUs zusammengefasst (vgl.).

^b, Sequenzähnlichkeit basiert auf Protein-BLAST (blastp und blastx).



0.05

Abbildung 30: Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, *in silico* translaterter *tfdB*-Aminosäuresequenzen aus feldfrischem Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP-Behandlung, basierend auf Pyrosequenzierungsdaten. Die Berechnung erfolgte nach dem „p-Distance“-Modell (Nei & Kumar, 2000). Die Sequenzen wurden auf Grundlage eines Datensatz-basierten Grenzwertes von 80 % in OTUs zusammengefasst (vgl. 2.6.15.3.). Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) > 50 % an. Schwarze Knotenpunkte an den Verzweigungen indizieren übereinstimmende Ergebnisse mit dem „Maximum-Likelihood“- und dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus; weiße Knotenpunkte zeigen eine Übereinstimmung mit dem „Maximum-Likelihood“- oder dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus. Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken sind in Klammern angegeben. Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 %.

3.3.2.2. Phylogenetische Analyse der detektierten *tfdB*- und *pheA*-Sequenzen mittels Genbibliotheken

Der Einfluss von *Aporrectodea caliginosa* und/ oder 2,4-DCP auf die phylogenetische Zusammensetzung und Diversität potentieller 2,4-DCP- sowie Phenolabbauer wurde mit Hilfe der strukturellen Gene *tfdB* und *pheA* untersucht. Dafür wurden Genbibliotheken von 2,4-DCP- und / oder Regenwurm-vorinkubierten Drilosphären- und Bodenproben erstellt und analysiert. Insgesamt wurden 290 *tfdB*- und 741 *pheA*-Aminosäuresequenzen in 16 Genbibliotheken nach *in silico* Translation überprüft. Die Zuordnung in OTUs erfolgte, basierend auf den Ergebnissen der Pyrosequenzierung von *tfdB*-Teilsequenzen (vgl. 3.2.2.1.), mit einer Sequenzähnlichkeit von 80 % mit der Software JAguc2. Analog zur Pyrosequenzierung wurden anschließend Rarefaction-Analysen der 16 Genbibliotheken erstellt. Für fast alle Proben wurde dabei ein abflachender Kurvenverlauf beobachtet, was darauf hin deutet, dass der Probenumfang für die Diversitätsanalyse möglicher 2,4-DCP- sowie Phenolabbauer ausreichend war und der Großteil der Diversität erfasst wurde (Abbildung 31).

Coverages der Genbibliotheken lagen in einem Bereich von 80 % bis 98,3 % (*tfdB*) sowie von 95 % bis 100 % (*pheA*). Zudem stimmte der nicht-parametrische Schätzwert Chao1 mit der tatsächlich detektierten Anzahl an OTUs in vielen Genbibliotheken überein (Tabelle 32, Tabelle 34). Diese Ergebnisse indizieren, dass die Anzahl untersuchter Sequenzen für die phylogenetische Analyse potentieller 2,4-DCP- sowie Phenol-verwertender Mikroorganismen geeignet war.

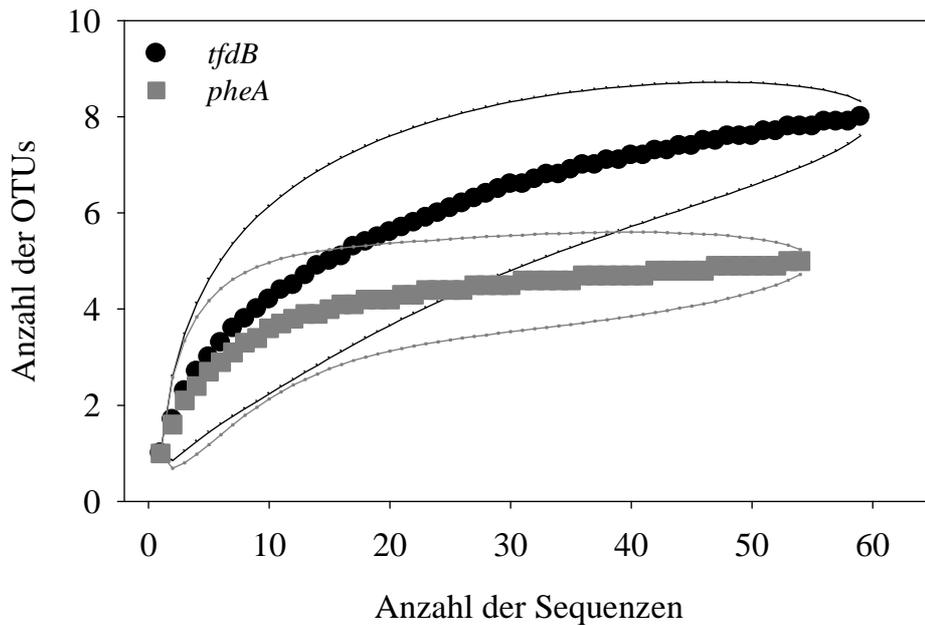


Abbildung 31: Repräsentative Rarefaction-Analyse von *tfdB* - und *pheA* -Teilsequenzen aus Genbibliotheken. Dargestellt sind die Analysen von 2,4-DCP-vorbehandelten Gangwand-Proben (*tfdB*) und Bodenproben der unteren 5-10 cm nach Inkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP (*pheA*). Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Die dünnen Linien geben das 95 % Konfidenzintervall an.

3.3.2.2.1. *tfdB*-basierende Analyse der 2,4-DCP-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft

tfdB-Teilsequenzen im feldfrischen landwirtschaftlichen Boden wurden, basierend auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 % sieben OTUs zugeordnet. Der Shannon-Diversitätsindex sowie die Evenness waren mit Werten von 1,1 bzw. 0,56 vergleichsweise niedrig (Tabelle 32) und weisen auf eine geringe *tfdB*-Biodiversität im unbehandelten Boden aus Scheyern hin.

In 2,4-DCP-vorinkubierten Drilosphärenproben wurden nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen vier bis sieben OTUs detektiert. Die berechneten Diversitätsindizes lagen in einem Bereich von 0,66 bis 1,45 (Shannon) bzw. 0,44 bis 0,74 (Evenness). Dabei konnte für Gangwandproben eine höhere *tfdB*-Diversität als zu Beginn der Inkubation sowie im Vergleich zu den Proben des Darminhaltes und Kotkrümeln festgestellt werden (Tabelle 32). Zudem wies die Überlappung der 95 % Konfidenzintervalle des Shannon-Diversitätsindex und Evenness von Darminhalt und Kotkrümeln auf keine signifikanten Unterschiede beider Proben hin.

In Regenwurm- und 2,4-DCP-behandelten Bodenproben der oberen und unteren 5 cm wurden am Ende der Inkubation fünf bis sechs OTUs nachgewiesen. Die Shannon-

Diversitätsindizes sowie die Evenness lagen mit Werten von bis zu 0,88 bzw. 0,55 im Bereich der Proben des Darminhaltes und der Kotkrümel, aber etwas unterhalb der t_0 -Probe (Tabelle 32). In den korrespondierenden Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss wurden jeweils fünf OTUs detektiert. Die Abwesenheit von Regenwürmern in der unteren Bodenschicht führte zu einer annähernd vergleichbaren *tfdB*-Biodiversität wie in den untersuchten Gangwänden (Tabelle 32). Ein Vergleich der Diversitätsindizes zeigte keine signifikanten Unterschiede (t-Test: $H' p > 0,05$; $J' p < 0,05$) zwischen Regenwurm-vorbehandelten und unvorbehandelten (Boden)Proben.

Die detektierten *tfdB*-Teilsequenzen wurden insgesamt zu 16 OTUs zusammengefasst (Abbildung 32, Abbildung 34). In feldfrischem landwirtschaftlichem Boden aus Scheyern wurden sieben OTUs aus den Phyla der *Proteobacteria* sowie den *Actinobacteria* nachgewiesen. Die vorliegenden Sequenzunterschiede zwischen diesen OTUs und bereits bekannten *tfdB*-Sequenzen lagen im Bereich von 1 % bis 28 %, was darauf hindeutet, dass der eingesetzte Boden Mikroorganismen mit phylogenetisch neuen *tfdB*-Aminosäuresequenzen beherbergt. Dominierendes OTU war das actinobakterielle, *Mycobacteriaceae*-verwandten OTU 1 mit einer relativen Häufigkeit von 72 %. Insgesamt wurden etwa 80 % aller detektierten *tfdB*-Sequenzen aus feldfrischem Boden dem Phylum der *Actinobacteria* zugeordnet (Abbildung 32). OTU 16 (nächst verwandte *tfdB*-Sequenz: *Sphingomonas* sp.; Abbildung 34) wurde ausschließlich in Proben vor einer 2,4-DCP Behandlung zum Zeitpunkt t_0 mit einer Häufigkeit von 4 % nachgewiesen. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierungsanalyse von *tfdB*-Sequenzen und zeigt, dass sowohl das Erstellen von Genbibliotheken als auch die Amplikon-Pyrosequenzierung vergleichbare, geeignete Methoden zur phylogenetischen Analyse mikrobieller Gemeinschaften darstellen.

tfdB-Teilsequenzen aus 2,4-DCP-vorinkubierten Gangwand-, Darminhalt- und Kotkrümelproben wurden fünf Familien aus den Phyla der *Proteobacteria* und *Actinobacteria* zugeordnet (Abbildung 32). In den Gangwänden dominierte das mit den *Comamonadaceae*-verwandte OTU 15 sowie das den *Mycobacteriaceae* zugeordnete OTU 1 mit relativen Häufigkeiten von 32 % bzw. 43 %. Der Großteil der im Darm- und Kotkrümelmaterial detektierten *tfdB*-Sequenzen fielen mit actinobakteriellen 2,4-DCP Hydroxylasesequenzen (nächst verwandte *tfdB*-Sequenz: *Mycobacterium vanbaalenii* ABM 15182) zusammen und dominierten mit relativen Häufigkeiten von bis zu 97 % die Genbibliotheken (Abbildung 32). Die den *Rhodobacteraceae* und *Streptomycetaceae* zugeordneten OTUs 12 und 14 konnten nur in Kotkrümelproben nach Inkubation mit 2,4-DCP nachgewiesen werden.

Tabelle 32: Diversitätsanalyse der *tfdB*-Genfragmente möglicher 2,4-DCP Abbauer in feldfrischem Boden, 2,4-DCP- und Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben sowie nur mit 2,4-DCP-vorinkubierten Bodenproben. Drilosphären- und Bodenproben wurden nach 33-tägiger Inkubation bei 15 °C aus Bodensäulen entnommen. Die Zuordnung in ein OTU erfolgte mit einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Zahlen in Klammern geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Vorbehandlung	Probe	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs	Chao1	Shannon	Evenness
	<i>tfdB</i>					
feldfrisch	t ₀	25	7	12 (6 – 42)	1,08 (0,59 – 1,58)	0,56 (0,30 – 0,81)
	Gangwände	60	7	7 (7)	1,45 (1,22 – 1,67)	0,74 (0,63 – 0,86)
+ Regenwurm,	Darminhalt	32	4	5 (5)	0,66 (0,32 – 1,00)	0,48 (0,23 – 0,72)
+ 2,4-DCP	Kotkrümel	43	7	10 (7-32)	0,86 (0,48 – 1,24)	0,44 (0,25 – 0,64)
	Boden (0-5 cm)	39	5	5 (5)	0,88 (0,55 – 1,22)	0,55 (0,34 – 0,76)
	Boden (5-10 cm)	56	6	7,5 (7-23)	0,78 (0,49 – 1,08)	0,44 (0,27 – 0,60)
- Regenwurm,	Boden (0-5 cm)	20	5	7 (7)	0,98 (0,52 – 1,44)	0,61 (0,32 – 0,90)
+ 2,4-DCP	Boden (5-10 cm)	15	5	5 (5)	1,32 (0,90 – 1,75)	0,82 (0,56 – 1,09)

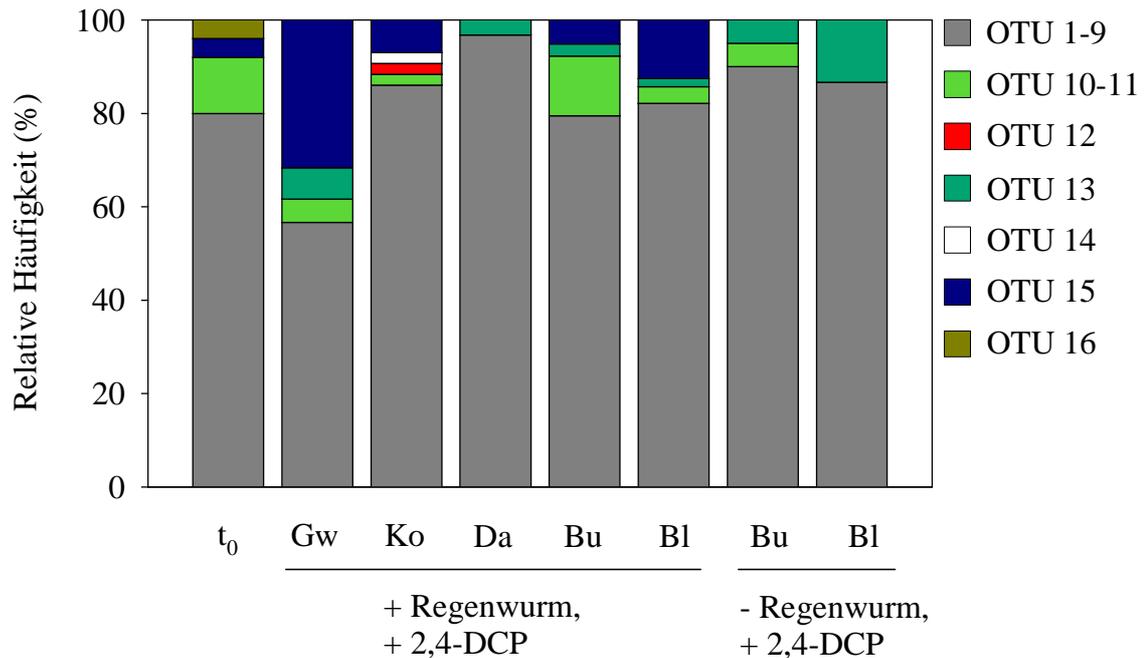


Abbildung 32: Phylogenetische Analyse *in silico* translaterter *tfdB*-Aminosäuresequenzen in Genbibliotheken von feldfrischem Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen bei 15 °C. Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation; Gw, Gangwände; Ko, Kotkrümel; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm). Phylogenetische Zuordnung der OTUs: siehe Tabelle 33.

In den mit 2,4-DCP und/ oder Regenwürmer-vorbehandelten oberen und unteren Bodenschichten wurden fünf bis sechs OTUs aus den Phyla der *Proteobacteria* sowie den *Actinobacteria* nachgewiesen. Dominante *tfdB*-Genotypen konnten dem *Mycobacteriaceae*-verwandten OTUs 1 bis 9 zugeordnet werden, die mit relativen Häufigkeiten von 79 % bis 90 % in den jeweiligen Genbibliotheken vertreten waren (Abbildung 32). Das den *Comamonadaceae*-zugeordnete OTU 15 wurde mit einer relativen Häufigkeit von bis zu 12,5 % nur in Regenwurm-vorbehandelten Bodenproben detektiert.

Die Anwesenheit von Regenwürmern in den Bodensäulen führte zu einer geringen Veränderung der phylogenetische Zusammensetzung der im Boden und der Drilosphäre detektierten *tfdB*-Sequenzen (Abbildung 32, Abbildung 33), die jedoch nicht signifikant war (NPMANOVA: $p > 0,05$; Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex).

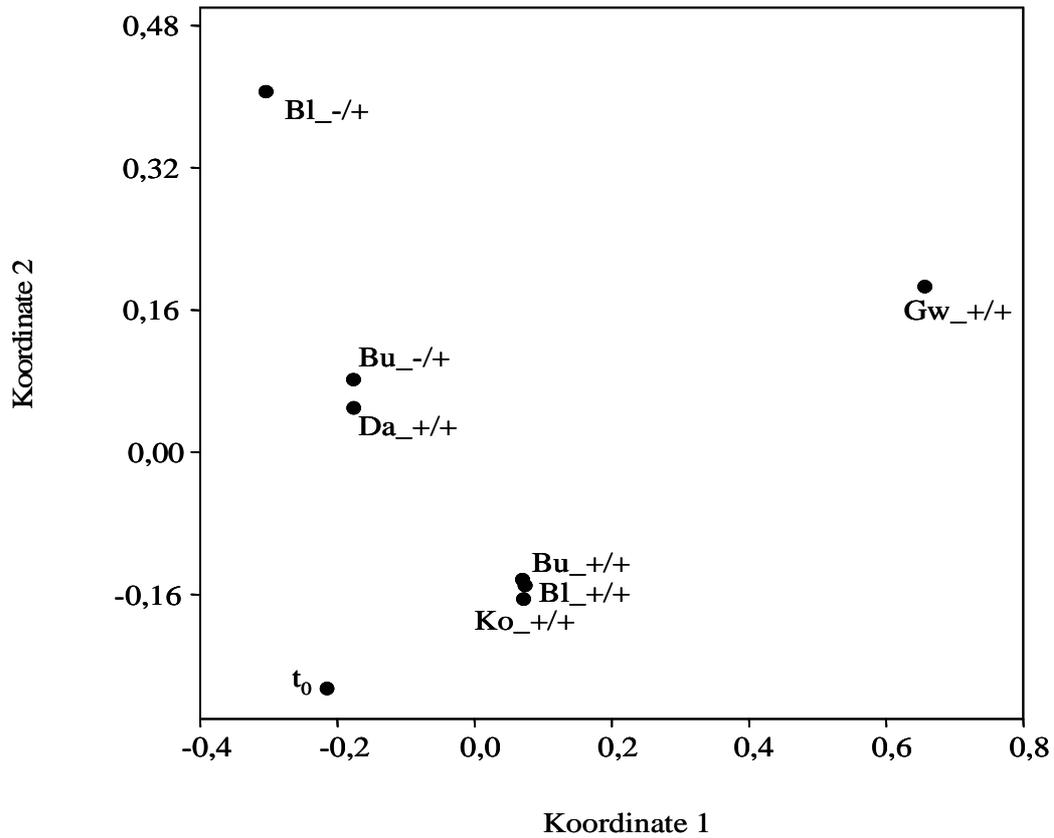


Abbildung 33: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Genbibliotheken erhaltenen *tfdB*-Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,12. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation; Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +/+, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; -/+, Bodensäuleninkubation mit 2,4-DCP.

Tabelle 33: Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von *in silico* translatierten, repräsentativen *tfdB*-Aminosäuresequenzen aus 2,4-DCP- und/ oder Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Erstellen von Genbibliotheken. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; Ä, Sequenzähnlichkeit.

OTU ^a	Länge (AS)	Nächster verwandte <i>tfdB</i> -Sequenz, Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
1	189	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	83
2	188	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	85
3	188	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	78
4	172	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	83
5	166	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	73
6	172	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	76
7	172	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	74
8	166	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	79
9	172	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (ABM15182)	72
10	174	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (WP006203888)	78
11	174	<i>Mesorhizobium</i> sp. (WP023808927)	93
12	174	<i>Rhodobacter</i> sp. (WP023663995)	84
13	190	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (WP006610061)	85
14	172	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (WP003994210)	72
15	172	<i>Rhodoferax</i> sp. (AAD55078)	99
16	172	<i>Sphingomonas</i> sp. (BAE92240)	91

^a, Die Sequenzen wurden basierend auf einem Grenzwert von 80 % in OTUs zusammengefasst.

^b, Sequenzähnlichkeit basiert auf Protein-BLAST (blastp und blastx).

Die phylogenetische Analyse von *tfdB*-Teilsequenzen mittels Pyrosequenzierung und Genbibliotheken zeigte für die untersuchten Drilosphären- und Bodenproben im Allgemeinen ähnliche Ergebnisse. Die vorliegenden Unterschiede, in erster Linie die Anzahl der detektierten OTUs und damit verbunden eine veränderte Diversität, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Anzahl an verfügbaren Sequenzen (23.820 vs. 290) für die durchgeführte Datenanalyse zurückzuführen. Dennoch konnten beide angewandten Methoden übereinstimmend die dominierenden Taxa identifizieren und eine „Anreicherung“ von *Proteobacteria* in 2,4-DCP- und Regenwurm-vorbehandelten Proben aufzeigen.

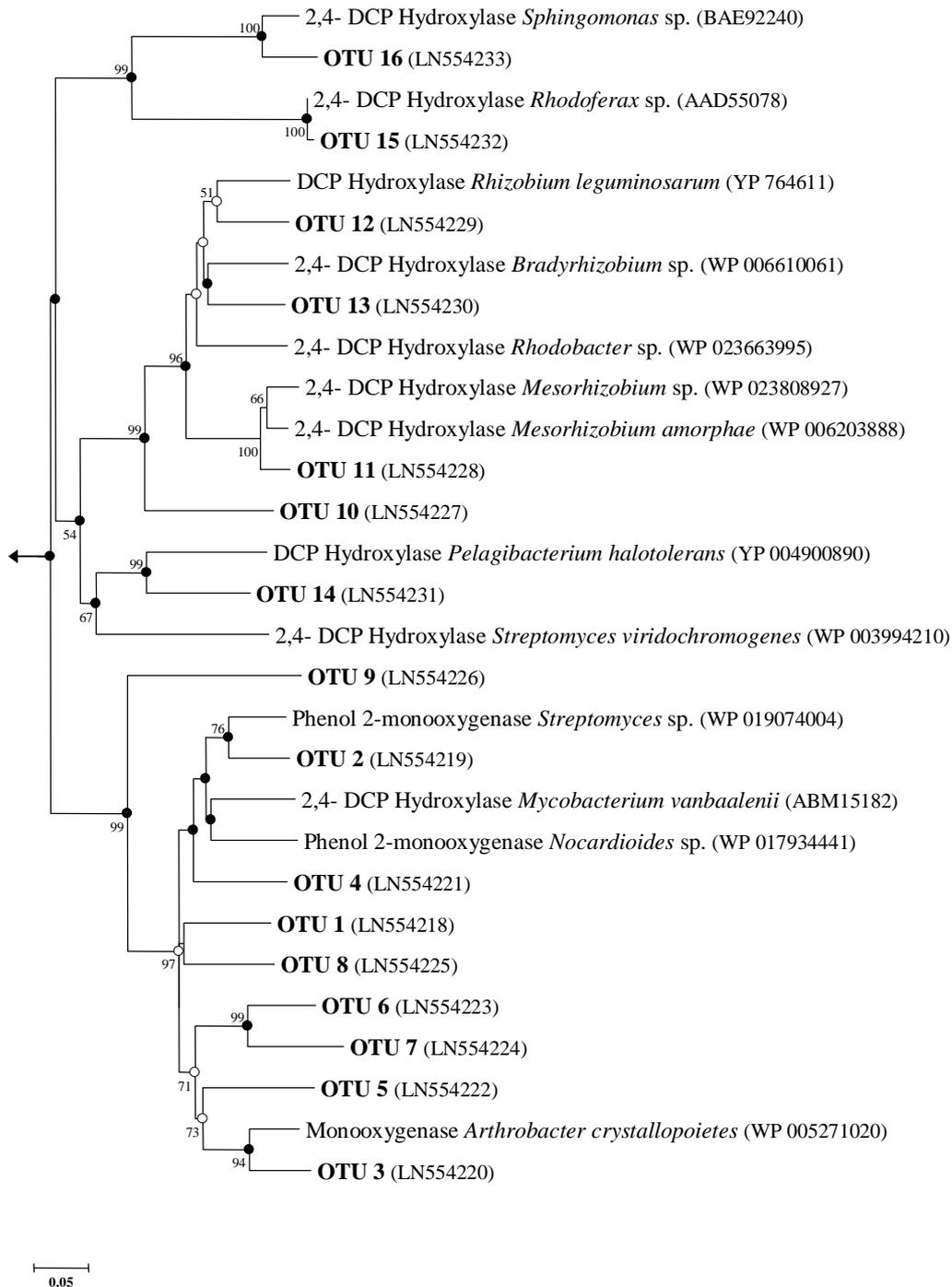


Abbildung 34: Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, *in silico* translaterter *tfdB*-Aminosäuresequenzen aus Genbibliotheken vom feldfrischen Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP-Behandlung. Die Sequenzen wurden auf Grundlage eines Datensatz-basierten Grenzwertes von 80 % in OTUs zusammengefasst (vgl. 2.6.15.3.). Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) > 50 % an. Schwarze Knotenpunkte an den Verzweigungen indizieren übereinstimmende Ergebnisse mit dem „Maximum-Likelihood“- und dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus; weiße Knotenpunkte zeigen eine Übereinstimmung mit dem „Maximum-Likelihood“- oder dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus. Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken sind in Klammern angegeben. Als Referenzsequenz wurde die Gensequenz der 2,4-DCP Hydroxylase von *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 (ZP07299583) herangezogen und in der Abbildung mit dem Pfeil dargestellt. Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 %.

3.3.2.2.2. *pheA*-basierende Analyse der 2,4-DCP-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft

Im unbehandelten, feldfrischen landwirtschaftlichen Boden wurden 134 *pheA*-Teilsequenzen detektiert und mit Hilfe der Software JAguc2 drei OTUs zugeordnet (Tabelle 34). Der Shannon-Diversitätsindex sowie die Evenness waren mit Werten von 0,36 bzw. 0,33 niedrig (Tabelle 34) und deuten somit, ähnlich wie die *tfdB*-Sequenzanalyse, auf eine geringe Biodiversität von Phenol-abbauenden Bakterien im Boden vor 2,4-DCP- und/ oder Regenwurmbehandlung hin. Sechs bzw. vier OTUs wurden in 2,4-DCP-vorinkubierten Gangwand- und Kotkrümelproben detektiert. Der nicht-parametrische Schätzwert Chao1, der Shannon-Diversitätsindex sowie die Evenness waren dabei höher als zum Zeitpunkt t_0 und lagen zudem deutlich über den berechneten Werten des Darminhaltes (Tabelle 34), was darauf hin weist, dass die Diversität von *pheA*-Teilsequenzen in den oxischen Bereichen Regenwurm-beeinflusster Kompartimente höher war als im anoxischen Regenwurmdarm und dem feldfrischen Boden aus Scheyern.

pheA-Teilsequenzen der oberen und unteren Bodenschichten aus Bodensäulen mit 2,4-DCP- und Regenwurmbehandlung wurden drei bis vier OTUs zugeordnet (Tabelle 34). Die Shannon-Diversitätsindizes sowie die Evenness lagen mit Werten von bis zu 0,83 bzw. 0,60 im Bereich der Gangwand- und Kotkrümelproben, aber deutlich oberhalb der t_0 - und Darminhaltprobe (Tabelle 34). In den korrespondierenden Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss wurden vier und sieben OTUs nachgewiesen. Die Abwesenheit von Regenwürmern führte dabei zu einer verringerten, jedoch nicht signifikant unterschiedlichen (t-Test: $H' p > 0,05$; $J' p < 0,05$) *pheA*-Biodiversität im Vergleich zu Regenwurm-beeinflussten Bodenproben (Tabelle 34).

Die detektierten *pheA*-Aminosäuresequenzen aus Drilosphären- und Bodenproben wurden, basierend auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %, elf OTUs zugeordnet (Abbildung 35, Abbildung 37). *pheA*-Sequenzen aus feldfrischem Boden vor der Bodensäuleninkubation wurden mit einer relativen Häufigkeit von 90 % den grampositiven *Pseudonocardiaceae* zugeordnet (Abbildung 35). Zudem wurden *Comamonadaceae*-verwandte *pheA*-Sequenzen (OTU 1) mit einer relativen Häufigkeit von 10 % detektiert. Die vorliegenden Sequenzunterschiede zwischen diesen OTUs und bereits bekannten *pheA*-Sequenzen lagen im Bereich von 5 % bis 49 % (Tabelle 35), was darauf hindeutet, dass der untersuchte Boden Mikroorganismen mit phylogenetisch neuen *pheA*-Aminosäuresequenzen beherbergt.

Tabelle 34: Diversitätsanalyse der *pheA*-Genfragmente möglicher Phenol-abbauender Bakterien in feldfrischem Boden, 2,4-DCP- und Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben sowie nur mit 2,4-DCP-vorinkubierten Bodenproben. Drilosphären- und Bodenproben wurden nach 33-tägiger Inkubation bei 15 °C aus Bodensäulen entnommen. Die Zuordnung in ein OTU erfolgte mit einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Zahlen in Klammern geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Vorbehandlung	Probe	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs	Chao1	Shannon	Evenness
	<i>pheA</i>					
feldfrisch	t ₀	134	3	3 (3)	0,36 (0,23 – 0,49)	0,33 (0,21 – 0,45)
	Gangwände	113	6	7,5 (7 – 23)	0,85 (0,69 – 1,01)	0,47 (0,39 – 0,56)
+ Regenwurm,	Darminhalt	41	2	2 (2)	0,32 (0,11 – 0,52)	0,46 (0,17 – 0,76)
+ 2,4-DCP	Kotkrümel	91	4	5 (5)	0,78 (0,65 – 0,90)	0,56 (0,47 – 0,65)
	Boden (0-5 cm)	100	3	3 (3)	0,63 (0,51 – 0,75)	0,57 (0,46 – 0,68)
	Boden (5-10 cm)	55	4	5 (5)	0,83 (0,65 – 1,01)	0,60 (0,47 – 0,73)
- Regenwurm,	Boden (0-5 cm)	101	7	12 (12)	0,63 (0,59 – 0,68)	0,33 (0,30 – 0,35)
+ 2,4-DCP	Boden (5-10 cm)	106	4	5 (5)	0,40 (0,23 – 0,57)	0,29 (0,16 – 0,41)

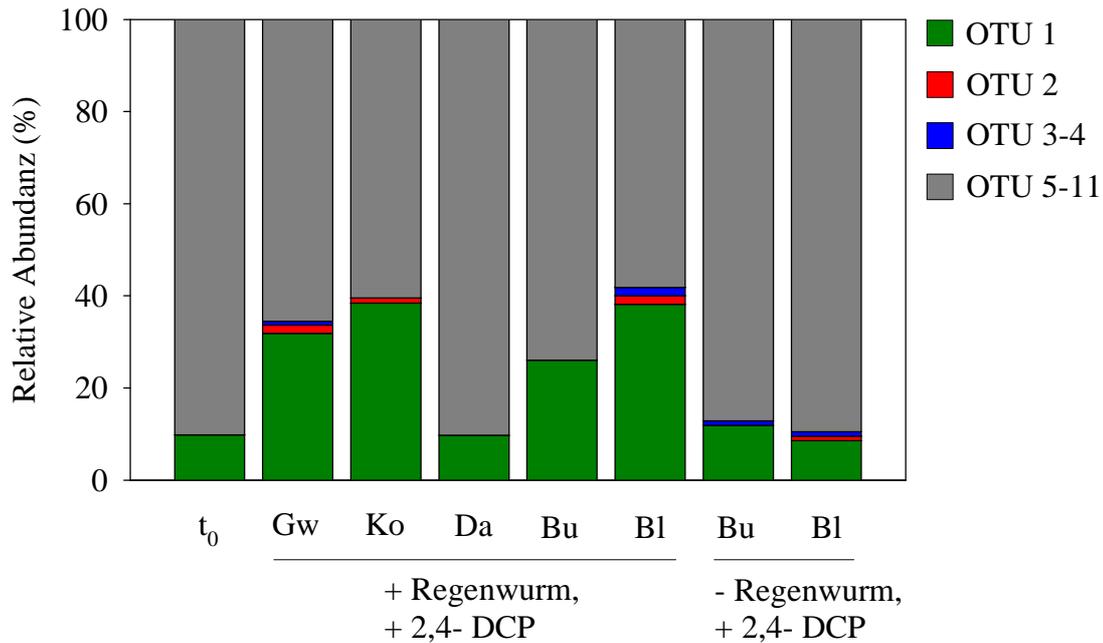


Abbildung 35: Relative Häufigkeiten detektierter, *in silico* translaterter *pheA*-Aminosäuresequenzen in Genbibliotheken von feldfrischem Boden zu Inkubationsbeginn sowie von Drilosphärenproben nach 33-tägiger Inkubation in Bodensäulen mit 2,4-DCP bei 15 °C. Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 80 %. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden; Gw, Gangwände; Ko, Kotkrümel; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm). Phylogenetische Zuordnung der OTUs: siehe Tabelle 35.

In Proben aus Regenwurmangängen, Darminhalt und Kotkrümeln wurden *pheA*-Sequenzen von vier Familien nachgewiesen und den *Beta*-, *Gamma*- sowie den *Actinobacteria* zugeordnet (Abbildung 35, Abbildung 37). Die Drilosphäre wurde, ebenso wie feldfrischer Boden, hauptsächlich von *Pseudonocardiaceae*-verwandten *pheA*-Sequenzen mit relativen Häufigkeiten von bis zu 90 % dominiert. Gangwand- und Kotkrümelmaterial wurde von dem *Pseudonocardiaceae*-verwandten OTU 5 sowie dem *Comamonadaceae*-zugeordneten OTU 1 mit relativen Häufigkeiten von bis zu 64 % bzw. 38 % dominiert. Zudem waren *Pseudomonadaceae*- (OTU 2) und *Burkholderiaceae*- (OTU 4) verwandte *pheA*-Sequenzen mit jedoch geringen Abundanzen nachweisbar. Der Großteil der im Darm detektierten *pheA*-Sequenzen fielen mit actinobakteriellen Phenolhydroxylasesequenzen (nächst verwandte *pheA*-Sequenz: *Pseudonocardia dioxanivorans* YP004330880,) zusammen und dominierten mit einer relativen Häufigkeit von 90 % die Genbibliothek.

Die phylogenetische Analyse der in Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben detektierten *pheA*-Sequenzen zeigte eine Dominanz von *Pseudonocardiaceae*-verwandten Sequenzen (OTU 5) mit relativen Häufigkeiten in den Genbibliotheken von 58 % und 73 % (Abbildung 35). Weiterhin konnten

Comamonadaceae-verwandte (OTU 1) Sequenzen mit relativen Häufigkeiten von bis zu 38 % nachgewiesen werden. Im unteren Bereich der Bodensäulen wurden zudem *pheA*-Sequenzen aus den Familien der *Pseudomonadaceae* (OTU 2) sowie der *Burkholderiaceae* (OTU 4) detektiert (Abbildung 35). Actinobakterielle *pheA*-Sequenzen (OTU 5) dominierten die Genbibliotheken von 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss mit relativen Häufigkeiten von bis zu 89 % (Abbildung 35). Mit erhöhter Abundanz wurde zusätzlich das, den *Comamonadaceae* zugeordnete, OTU 1 detektiert. OTU 3, das einer *Burkholderia*-verwandten Phenolhydroxylase zugeordnet wurde (Tabelle 35), konnte ausschließlich in den oberen 5 cm der Regenwurm-unbeeinflussten, mit 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenprobe nachgewiesen werden (Abbildung 35).

Die durchgeführte nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) Analyse des erhaltenen *pheA*-Datensatzes weist auf Unterschiede in der OTU-Zusammensetzung der einzelnen Drilosphären- und Bodenproben hin. Ein signifikanter Einfluss von endogäischen Regenwürmern auf die phylogenetische Zusammensetzung *pheA*-tragender Bakterien in der Drilosphäre sowie im umgebenden Boden konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (NPMANOVA: $p > 0,05$; Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex).

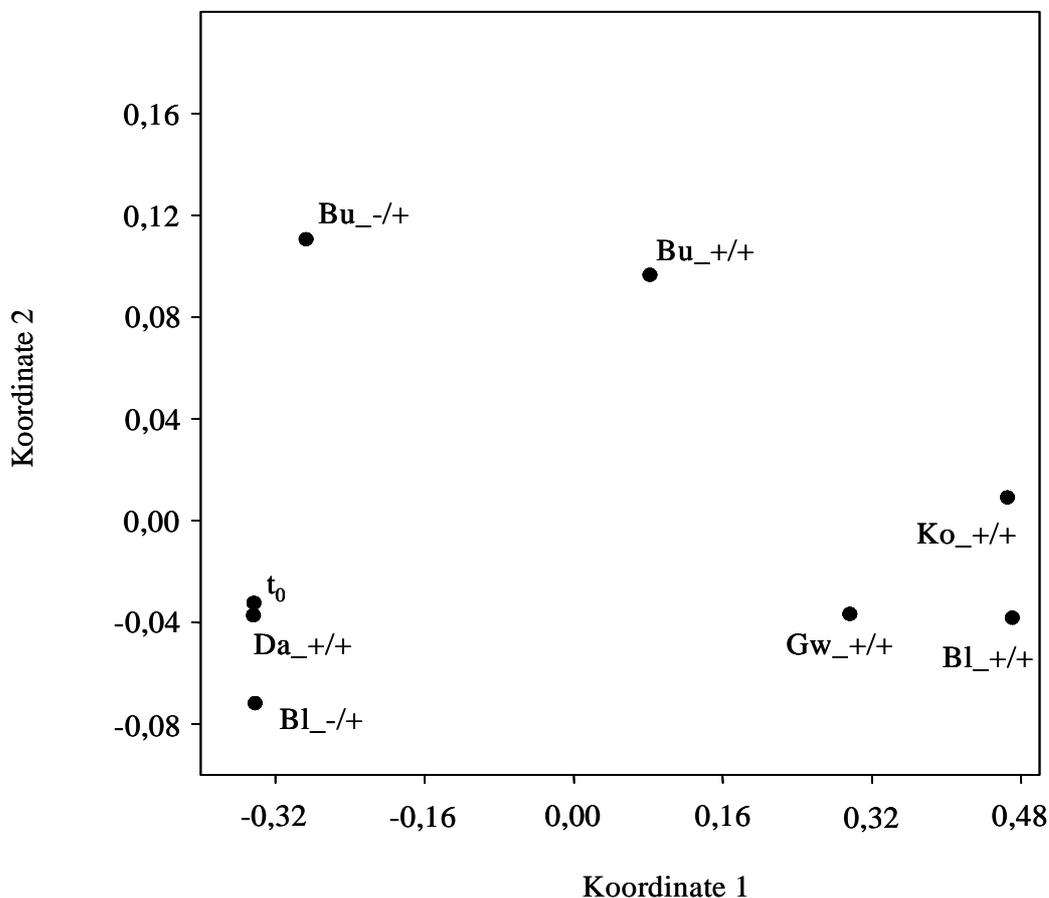


Abbildung 36: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Genbibliotheken erhaltenen *pheA*-Datensatzes basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,00. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation; Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +/+, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; -/+, Bodensäuleninkubation mit 2,4-DCP.

Die nach Pyrosequenzierung und Klonierung erzielten Ergebnisse deuten an, dass (a) den Bakterien aus dem Phylum der *Actinobacteria* sowie Vertreter der *Comamonadaceae* offensichtlich ein erhebliche Rolle am Abbau von 2,4-DCP zukommt und (b) die Gegenwart von Regenwürmern in Bodensäulen statistisch zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der *tfdB*- und *pheA*-tragenden mikrobiellen Gemeinschaft nimmt, nachweislich jedoch einen positiven Einfluss auf die Abundanz *Comamonadaceae*-verwandter Taxa ausübt.

Tabelle 35: Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge von *in silico* translatierten, repräsentativen *pheA*-Aminosäuresequenzen aus 2,4-DCP- und/ oder Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben nach Erstellen von Genbibliotheken. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; Ä, Sequenzähnlichkeit.

OTU ^a	Länge (AS)	Nächster verwandte <i>pheA</i> - Sequenz, Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
1	54	<i>Comamonas sp.</i> (BAA74747)	95
2	55	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ADP69159)	84
3	68	<i>Burkholderia brasilensis</i> (ABM87946)	86
4	54	<i>Burkholderia unamaei</i> (ABO72595)	41
5	54	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004330880)	89
6	52	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	51
7	64	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	52
8	64	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	52
9	55	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	51
10	64	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	53
11	64	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> (YP004331255)	48

^a, Die Sequenzen wurden basierend auf einem Grenzwert von 80 % in OTUs zusammengefasst.

^b, Sequenzähnlichkeit basiert auf Protein-BLAST (blastp und blastx).

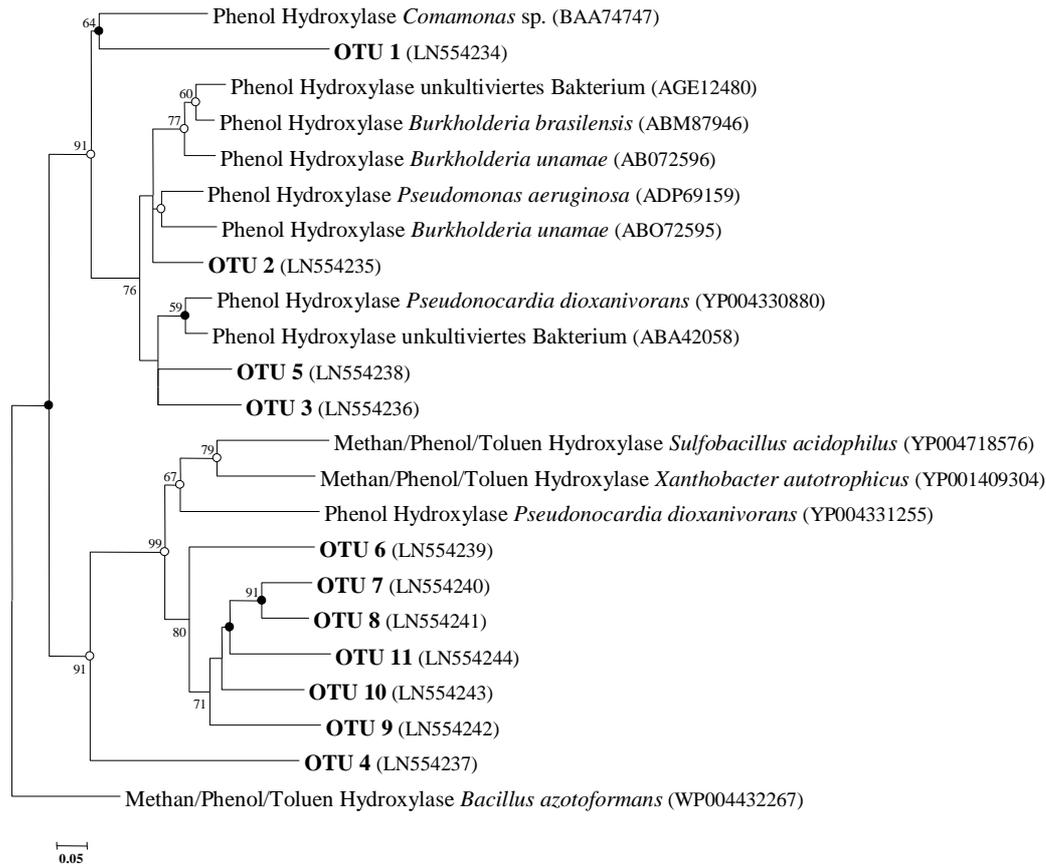


Abbildung 37: Phylogenetischer „Neighbour-Joining“ Stammbaum repräsentativer, *in silico* translaterter *pheA*-Aminosäuresequenzen aus Genbibliotheken vom feldfrischen Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach 33-tägiger Bodensäuleninkubationen mit bzw. ohne Regenwürmer und / oder 2,4-DCP Behandlung. Die Sequenzen wurden auf Grundlage eines Datensatz-basierten Grenzwertes von 80 % in OTUs zusammengefasst (vgl. 2.6.15.3.). Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) > 50 % an. Schwarze Knotenpunkte an den Verzweigungen indizieren übereinstimmende Ergebnisse mit dem „Maximum-Likelihood“- und dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus; weiße Knotenpunkte zeigen eine Übereinstimmung mit dem „Maximum-Likelihood“- oder dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus. Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken sind in Klammern angegeben. Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 %.

3.3.3. Quantifizierung 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen

3.3.3.1. Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Anzahl kultivierbarer 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen

3.3.3.1.1. Keimzahlbestimmung unter oxischen Bedingungen

Die Keimzahlbestimmung erfolgte in Reagenzgläsern in drei Replikaten im Rahmen zweier von einander unabhängiger, identisch durchgeführter Analysen. Der für eine erste Keimzahlbestimmung verwendete Boden wurde im Juni 2009, der für die zweite Keimzahlbestimmung verwendete Boden im April 2010 dem Versuchsareal 15 der Versuchsstation Klostersgut Scheyern entnommen. Die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) aerober, kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer pro Gramm Trockengewicht feldfrischen Bodens vor Inkubationsbeginn lag im Bereich von $2,4 \times 10^3$ bis $1,4 \times 10^4$ (Abbildung 38), was auf eine eher durchschnittliche Abundanz potentieller 2,4-DCP Abbauer in Regenwurm- und 2,4-DCP-unbehandeltem landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern hinweist.

Nach 30-tägiger Inkubation bei 15 °C waren die MPN in 2,4-DCP-vorbehandelten Gangwänden und Kotkrümeln bis zu 7800 x bzw. 200 x höher als im unbehandelten, feldfrischen Boden (Abbildung 38). Zudem wurden signifikante Unterschiede in den MPN zwischen 2,4-DCP-vorbehandelten und 2,4-DCP-unvorbehandelten Drilosphärenproben detektiert (Abbildung 39). In 2,4-DCP-vorbehandelten Gangwänden und Kotkrümeln wurden Keimzahlen von bis zu $1,9 \times 10^7$ bzw. $2,9 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe bestimmt, während in den korrespondierenden Ansätzen ohne 2,4-DCP Vorbehandlung die MPN im Bereich von $9,7 \times 10^3$ bzw. $2,8 \times 10^4$ lagen. Diese auffallenden Differenzen in den Gangwänden und Kotkrümeln deuten darauf hin, dass die Anzahl kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer stark durch die Gegenwart von 2,4-DCP beeinflusst wurde. Die MPN in den Proben aus dem Regenwurmdarm zeigten im Vergleich zum Inkubationsbeginn keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 38). Während im Rahmen eines ersten MPN-Ansatzes die Keimzahlen pro Gramm Trockengewicht in den 2,4-DCP-unvorbehandelten Darmproben im Vergleich zu den 2,4-DCP-vorbehandelten Proben leicht erhöht waren (Abbildung 38 A), wurde für die entsprechenden Darmproben im Rahmen eines zweiten MPN-Ansatzes ein umgekehrtes Ergebnis erfasst (Abbildung 38 B).

Diese inkonsistenten Resultate in den Darmproben sowie der geringe Unterschied in den MPN im Vergleich zum Inkubationsbeginn weisen darauf hin, dass die Anzahl

kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer im Darm von *Aporrectodea caliginosa* weder durch eine Vorinkubation mit dem Substrat 2,4-DCP noch durch die gewählten Inkubationsbedingungen wesentlich beeinflusst wurden.

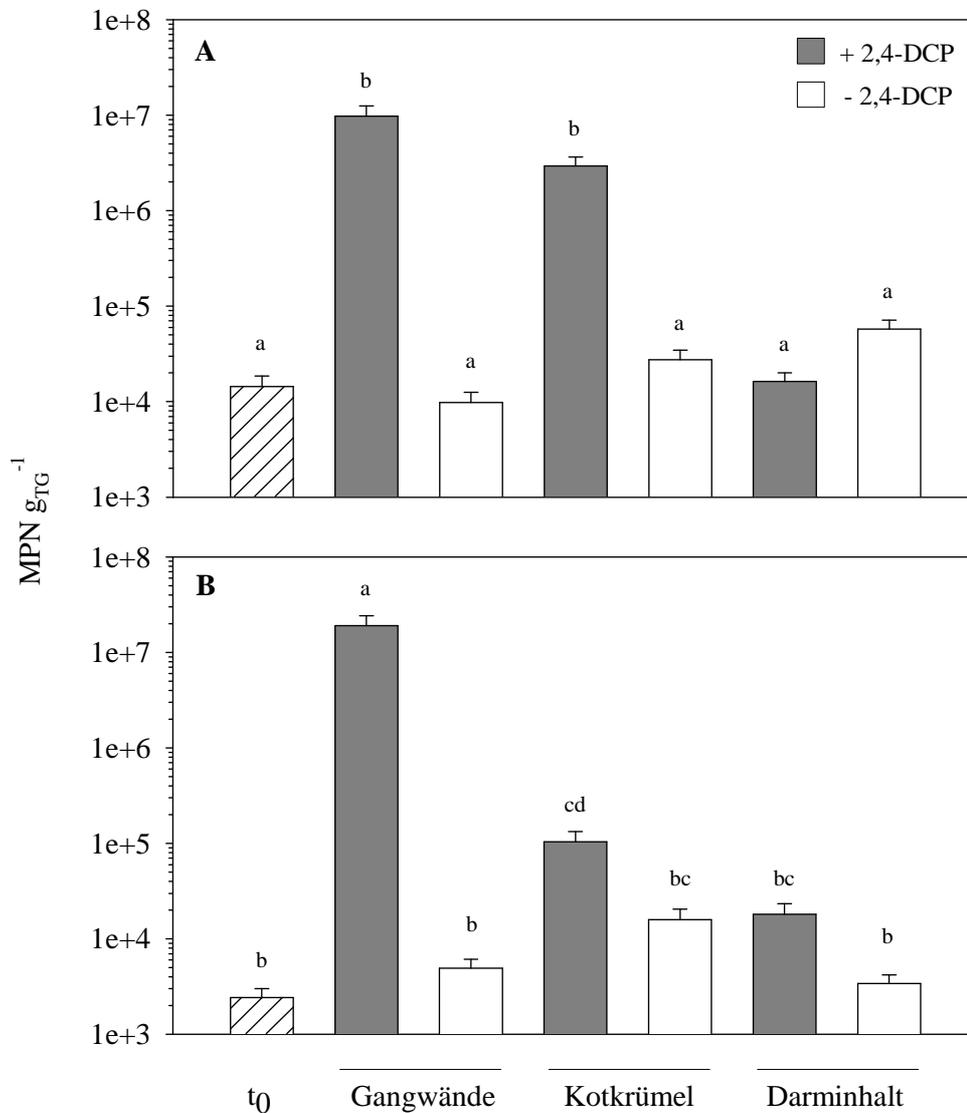


Abbildung 38: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) aerober, kultivierter 2,4-DCP Abbauer pro Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden sowie in Drilosphärenmaterial, vorinkubiert in Bodensäulen mit bzw. ohne 2,4-DCP. Die Bestimmung der MPN wurde anhand von drei Parallelen im Rahmen zweier von einander unabhängigen MPN-Ansätze (A, B) mit Proben aus zwei Bodensäuleninkubationen durchgeführt (vgl. 2.4.1.). Die Inkubationsbedingungen waren für beide Ansätze identisch. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem die tatsächliche Keimzahl mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand der zu sichernden Differenz ermittelt wurde (vgl. 2.7.2.).

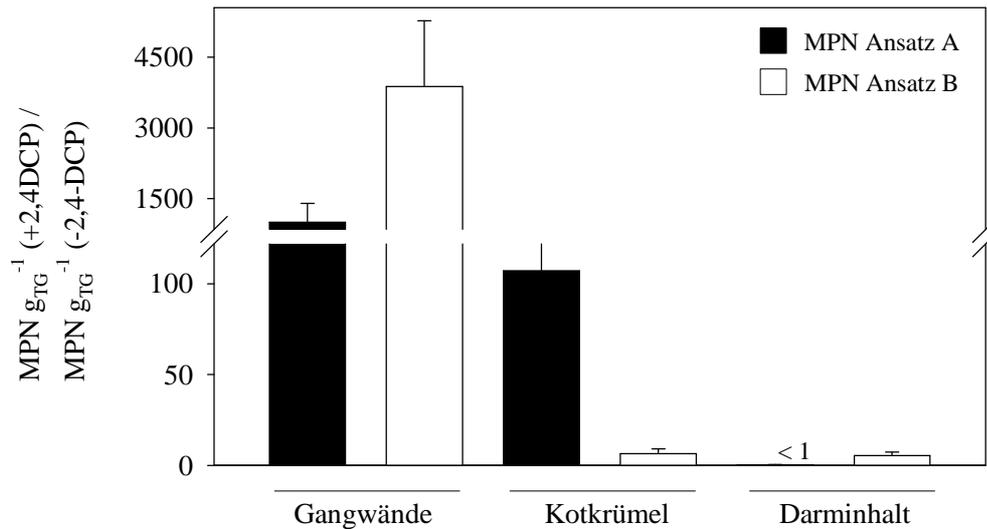


Abbildung 39: Verhältnis der in 2,4-DCP-vorbehandelten und 2,4-DCP-unbehandelten Drilosphärenproben berechneten MPNs. Dargestellt sind die im Rahmen zweier von einander unabhängigen MPN-Ansätze (A, B) ermittelten Werte. Fehlerbalken stellen die mittels Fehlerfortpflanzung errechneten Abweichungen dar.

In 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben waren die MPN kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer in der Regel signifikant höher als in den korrespondierenden unbehandelten Proben (Abbildung 40). So wurden Keimzahlen pro Gramm Trockengewicht von bis zu $9,1 \times 10^5$ in den oberen Bodenschichten und bis zu $1,4 \times 10^6$ in den unteren Bodenschichten detektiert. Zudem zeigten 2,4-DCP-vorbehandelte Proben signifikante Unterschiede in den MPN zu den Proben zum Zeitpunkt t_0 . Diese Beobachtungen sind konsistent mit den erzielten Ergebnissen der Drilosphärenproben und unterstreichen, dass eine Vorinkubation mit 2,4-DCP die Wachstumsfähigkeit 2,4-DCP-verwertender Mikroorganismen mutmaßlich stimuliert.

Während im Rahmen eines ersten MPN-Ansatzes Regenwurm-vorbehandelte Bodenproben signifikant höhere Keimzahlen als die entsprechenden unbehandelten Bodenproben aufwiesen (Abbildung 40A), führte die Anwesenheit von Regenwürmern im Rahmen eines zweiten MPN-Ansatzes zu signifikant niedrigeren bzw. zu kaum veränderten MPN in den oberen und unteren Bodenschichten (Abbildung 40B). Anhand der bestimmten Keimzahlen konnte zudem kein signifikanter Einfluss der Bodentiefe auf die Anzahl möglicher 2,4-DCP Abbauer nachgewiesen werden (Abbildung 40).

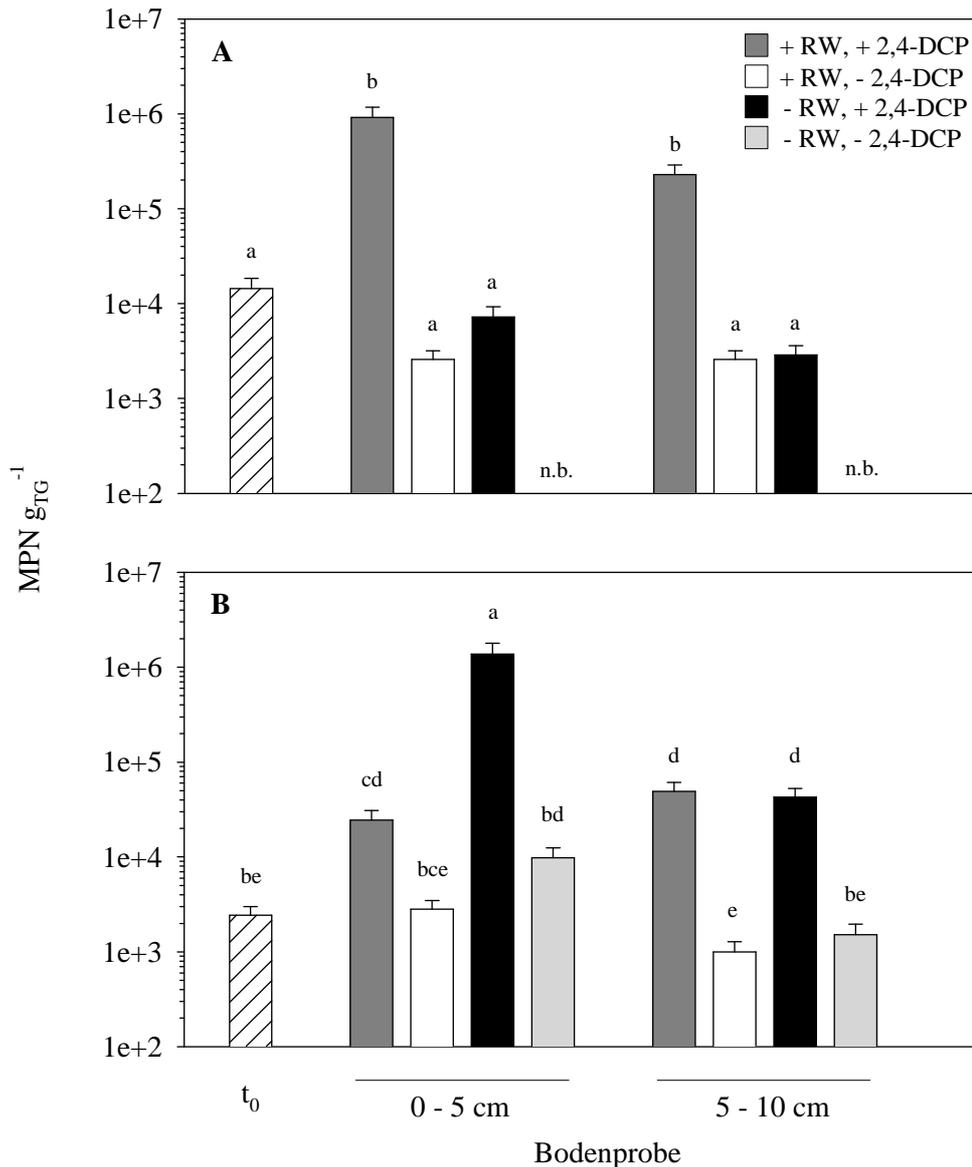


Abbildung 40: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) aerober, kultivierter 2,4-DCP Abbauer in vorbehandelten Bodenproben pro Gramm Trockengewicht. Die Bestimmung der MPN wurde anhand von drei Parallelen im Rahmen zweier von einander unabhängigen MPN-Ansätze (A, B) mit Proben aus zwei Bodensäuleninkubationen durchgeführt (vgl. 2.4.1.). Die Inkubationsbedingungen waren für beide Ansätze identisch. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem die tatsächliche Keimzahl mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand der zu sichernden Differenz ermittelt wurde (vgl. 2.7.2.). Abkürzung: RW, Regenwurm; n.b., nicht bestimmt.

3.3.3.1.2. Keimzahlbestimmung unter anoxischen Bedingungen

Die Bestimmung der Keimzahl von anaeroben 2,4-DCP-verwertenden Mikroorganismen im feldfrischen Boden nach 60-tägiger Inkubation war nicht für alle Ansätze erfolgreich (Tabelle 36). Die detektierten MPN pro Gramm Trockengewicht

lagen dabei im Bereich von 0 bis $9,3 \times 10^2$ und waren damit bis auf eine Ausnahme signifikant niedriger als der oxische Vergleichsansatz (Abbildung 38). Diese Beobachtung unterstützt die erhaltenen Ergebnisse aus den anoxischen Mikrokosmenversuchen (vgl. 3.1.2.) und deutet an, dass der 2,4-DCP Abbau in Abwesenheit von Sauerstoff im landwirtschaftlichen Boden von Scheyern im Vergleich zum aeroben Abbau eine eher untergeordnete Rolle spielte.

Tabelle 36: Höchstwahrscheinliche Keimzahlen (MPN) anaerober, kultivierbarer 2,4-DCP Abbauer in feldfrischem Boden pro Gramm Trockengewicht detektiert mit den alternativen Elektronenakzeptoren CO₂, Sulfat, Eisen (III) und Nitrat nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre. Die Bestimmung der MPN wurde anhand von drei Parallelen im Rahmen zweier von einander unabhängigen MPN-Ansätze (A, B) mit Proben aus zwei Bodensäuleninkubationen durchgeführt (vgl. 2.4.1.). In Klammern sind die Konfidenzintervalle mit 95 % Wahrscheinlichkeit angegeben.

MPN Ansatz	MPN g _{TG} ⁻¹			
	CO ₂	Sulfat	Eisen (III)	Nitrat
A	9,3 x 10 ² (2,6 x 10 ² ; 3,4 x 10 ³)	5,8 x 10 ¹ (1,4 x 10 ¹ ; 2,3 x 10 ²)	1,9 x 10 ¹ (2,3; 1,5 x 10 ²)	2,2 x 10 ¹ (3,1; 1,5 x 10 ²)
B	5,4 x 10 ² (1,3 x 10 ² ; 2,2 x 10 ³) ^a	2,1 x 10 ¹ (3,0; 1,4 x 10 ²)	_{-b}	-

^a, kein signifikanter Unterschied zum oxischen Vergleichsansatz

^b, In den Ansätzen mit MSM_{10, Eisen} sowie MSM_{10, Nitrat} wurden am Ende der Inkubation keine kultivierbaren 2,4-DCP Abbauer detektiert.

3.3.3.2. Einfluss von *A. caliginosa* und 2,4-DCP auf die Abundanz der strukturellen Gene *tfdB*, *tfdC* und *pheA*

Zur Bestimmung des Einflusses von Regenwürmern und / oder 2,4-DCP auf die Abundanz möglicher 2,4-DCP-verwertender Bakterien in Drilosphären- und Bodenproben nach Inkubation in Bodensäulen erfolgte die Quantifizierung der für den Abbau von 2,4-DCP verantwortlichen strukturellen Gene *tfdB* (kodiert eine 2,4-DCP Hydroxlyase), *tfdC* (kodiert eine 3,5-DCC-1,2-Dioxygenase) sowie *pheA* (kodiert eine Phenolhydroxylase) mittels quantitativer Real-Time PCR (vgl. 2.6.8.). Die *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen pro ng DNA im feldfrischen Boden lagen bei $7,5 \times 10^3$, $4,8 \times 10^4$ sowie $2,6 \times 10^3$ (Abbildung 41), pro Gramm Trockengewicht Boden bei $4,4 \times 10^6$, $3,2 \times 10^7$ und $1,5 \times 10^6$ (Abbildung 42), was einem Anteil von bis zu 3 % an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft entsprach (Abbildung-AH 3). Dieser hohe Anteil indiziert eine etablierte 2,4-DCP-verwertende mikrobielle Gemeinschaft im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern.

Die *tfdB*-Genkopienzahlen in 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphärenproben variierten von $5,2 \times 10^3$ bis $1,1 \times 10^4$ *tfdB*-Genen pro ng DNA ($1,5 \times 10^6$ bis $6,9 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe) und waren um das 13 bis 94-fache höher (t-Test: $p < 0,05$) als in den korrespondierenden Proben ohne 2,4-DCP Vorinkubation (Abbildung 41, Abbildung 42). Die Relative Genhäufigkeit (RGFR, vgl. 2.6.8.4.) von *tfdB*-Genen war in den Proben von Gangwänden und Kotkrümeln mit 94 bzw. 39 am höchstens (Abbildung 43) und indiziert einen stimulierenden Effekt einer 2,4-DCP Vorinkubation auf mögliche 2,4-DCP Abbauer.

Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelte Bodenproben der oberen sowie der unteren Bodenschicht wiesen mit $1,1$ bis $1,3 \times 10^4$ *tfdB*-Genkopien pro ng DNA ($5,9 \times 10^6$ bis $6,9 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe) eine ähnliche Anzahl von *tfdB*-Genen auf (Abbildung 41, Abbildung 42). Im Vergleich zu den entsprechenden 2,4-DCP-unbehandelten Bodenproben lag die Anzahl der *tfdB*-Gene pro ng DNA damit bis zu 44-mal höher (t-Test: $p < 0,05$). In den Bodenproben ohne Regenwurmvorbehandlungen wurden *tfdB*-Genkopienzahlen von $1,1$ bis $5,6 \times 10^3$ pro ng DNA ($3,5 \times 10^5$ bis $2,6 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe) nachgewiesen, wobei die Anzahl der Genkopien in den Kontrollansätzen ohne 2,4-DCP Behandlung um das 5-fache höher lag (Abbildung 41, Abbildung 42). Die gesammelten Daten lassen vermuten, dass eine Vorbehandlung mit Regenwürmern und 2,4-DCP zu einem erhöhten Vorkommen potentieller 2,4-DCP Abbauer führt und sind somit konsistent mit (I) den erzielten Ergebnissen aus dem aeroben 2,4-DCP Abbau in Mikrokosmen und (II) den erhöhten MPN in Drilosphären- und Bodenproben nach Inkubation mit 2,4-DCP. Zudem wurden nur geringe Unterschiede in den *tfdB*-Genkopienzahlen zwischen der oberen und unteren Bodenschicht detektiert, was darauf hin deutet, dass die Abundanz 2,4-DCP-verwertender Bakterien unabhängig von der Bodentiefe war.

Die erfassten *tfdC*-Genkopienzahlen in Drilosphären- und Bodenproben lagen im Bereich von $1,5 \times 10^4$ bis $1,0 \times 10^5$ pro ng DNA ($4,6 \times 10^6$ bis $5,3 \times 10^7$ pro Gramm Trockengewicht Probe; Abbildung 41, Abbildung 42), was einem Anteil an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft von bis zu 4 % entsprach (Abbildung-AH 3). Die bestimmte Relative Genhäufigkeit RGFR von *tfdC*-Genen war in Proben der Gangwände mit einem Wert von 6 am höchsten (Abbildung 43) und unterstreicht damit die Bedeutung einer 2,4-DCP Vorinkubation für ein erhöhtes Vorkommen 2,4-DCP-abbauender Bakterien in der Drilosphäre.

Die Anzahl der detektierten *tfdC*-Gene in Regenwurm- und 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben war signifikant höher (t-Test: $p < 0,05$) als in dem nur mit Regenwürmern oder nur mit 2,4-DCP-behandelten Bodenmaterialien, jedoch nur leicht erhöht (t-Test: $p > 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten Bodenproben (Abbildung 41). Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl Regenwürmer als auch 2,4-DCP einen stimulierenden Effekt auf *tfdC*-tragende Bodenbakterien haben.

Die Quantifizierung des durch *pheA* kodierten Enzyms Phenolhydroxylase diente der Erfassung von Phenol-abbauenden Mikroorganismen, die an einer Mineralisierung von Chlorphenolen beteiligt sein können (Al-Thani *et al.*, 2007). Die *pheA*-Genkopiezahlen in 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphärenproben variierten von 3,4 bis $5,7 \times 10^3$ *pheA*-Genen pro ng DNA ($1,5 \times 10^6$ bis $2,9 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe) und waren bis zu 41-mal höher (t-Test: $p < 0,05$) als in den korrespondierenden Proben ohne 2,4-DCP Vorbehandlung (Abbildung 41, Abbildung 42). Der stärkste Einfluss von 2,4-DCP auf die Anzahl der *pheA*-Gene wurde für die Gangwände mit einer Relativen Genhäufigkeit von 41 nachgewiesen (Abbildung 43).

In Regenwurm- und 2,4-DCP-vorinkubierten Bodenproben wurden bis zu $9,1 \times 10^3$ *pheA*-Genkopien pro ng DNA ($5,7 \times 10^6$ pro Gramm Trockengewicht Probe) detektiert. Bodenproben ohne Einfluss von Regenwürmern bzw. 2,4-DCP wiesen im Vergleich dazu signifikant niedrigere (t-Test: $p < 0,05$) *pheA*-Genkopien auf (Abbildung 41, Abbildung 42). Diese Daten sind konsistent mit den erzielten Ergebnissen der *tfdB*-Quantifizierung und verdeutlichen den positiven Effekt von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Anzahl Phenol-abbauender Bakterien im landwirtschaftlichen Boden.

Die anhand der strukturellen Gene *tfdB*, *tfdC* und *pheA* erfassten 2,4-DCP Abbauer im feldfrischen Boden sowie in den Kontrollansätzen ohne 2,4-DCP und Regenwürmern nach Bodensäuleninkubation unterschieden sich in ihrer Abundanz zum Teil deutlich von denen der mittels MPN-Methode detektierten Organismen. So konnte eine bis zu 5400-fach höhere Abundanz 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen im feldfrischen Boden sowie eine 5800-fach höhere Abundanz in den unbehandelten Kontrollen nach Bodensäuleninkubation durch qPCR Analysen aufgezeigt werden. Keim- und Genkopiezahlen in 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben wiesen im Vergleich dazu keine oder nur geringe Abweichungen auf. Die beobachteten Diskrepanzen zwischen kultivierungsunabhängigen, molekularbiologischen Methoden wie die quantitative PCR und kultivierungsabhängigen Techniken wie die MPN-Methode basieren mit aller Wahrscheinlichkeit darauf, dass mittels ersterer Methode sowohl aktive als auch inaktive Mikroorganismen nachgewiesen werden können, die auch in Abwesenheit von 2,4-DCP im Boden vorliegen. Letztere Technik hingegen detektiert und quantifiziert ausschließlich die aktiven Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft. Gleichwohl führten in der vorliegenden Arbeit sowohl die MPN-Methode als auch die qPCR Analyse zu den gleichen Schlussfolgerungen und geben in Kombination einen umfassenden quantitativen Einblick in die mikrobielle 2,4-DCP-abbauende Gemeinschaft.

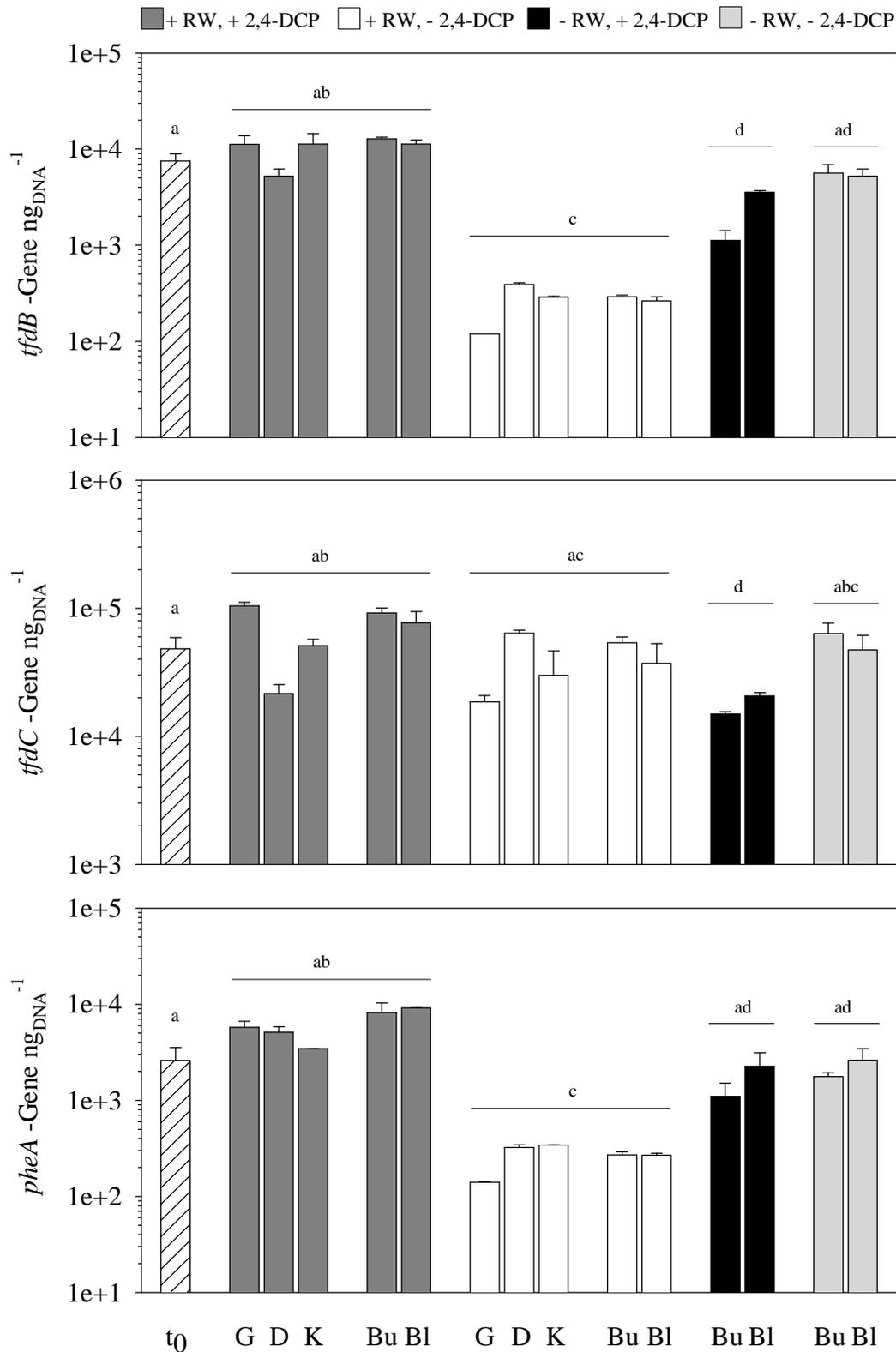


Abbildung 41: *ffdB*-, *ffdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation. Dargestellte Kopienzahlen sind Mittelwerte aus zwei qPCR-Messungen; Fehlerbalken geben den höchsten erfassten Wert an. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand eines t-Tests bestimmt wurde. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; D, Darminhalt; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

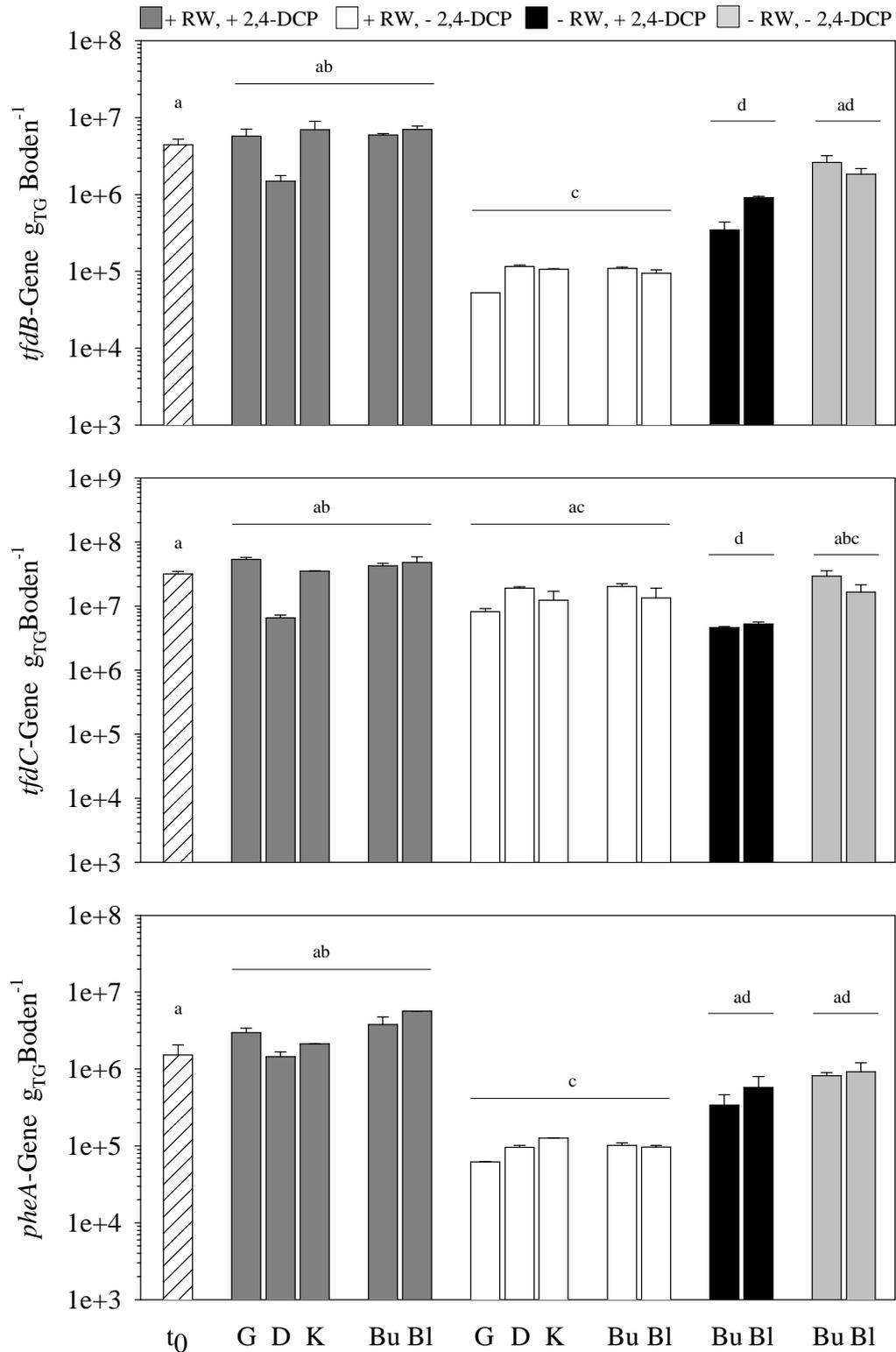


Abbildung 42: *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen bezogen auf ein Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation. Dargestellte Kopienzahlen sind Mittelwerte aus zwei qPCR-Messungen; Fehlerbalken geben den höchsten erfassten Wert an. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand eines t-Tests bestimmt wurde. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; D, Darminhalt; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens; TG, Trockengewicht.

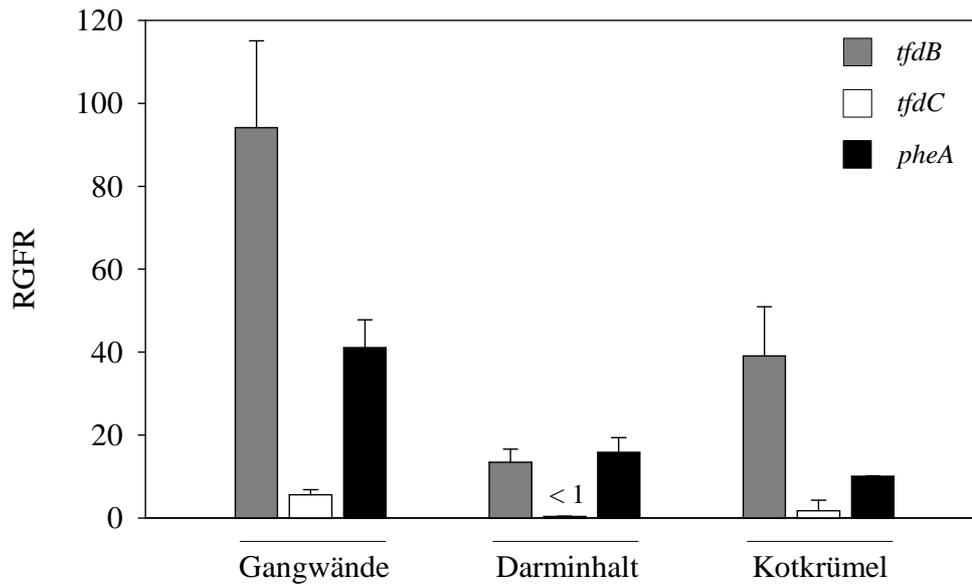


Abbildung 43: Relative Genhäufigkeit (Relative Gene Frequency Ratio, RGFR) von *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopien pro ng eingesetzter DNA in Drilosphärenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation. Verglichen werden Kopienzahlen aus 2,4-DCP-vorbehandelten Proben mit 2,4-DCP-unbehandelten Proben (+/+ vs. +/-). Vorliegende Daten sind Mittelwerte von Duplikaten; Fehlerbalken geben den höchsten berechneten Wert an.

Metabolisch aktive 2,4-DCP- und Phenol-verwertende Mikroorganismen in Bodenproben wurden anhand der Gentranskripte im Verlauf der Bodensäuleninkubation zu den Zeitpunkten t_0 (Inkubationsbeginn), t_2 (nach zwei Tagen), t_{10} (nach zehn Tagen) sowie am Versuchsende nach 33 Tagen quantifiziert. Die Amplifizierung von *tfdB*-Transkripten aus Bodenproben war für keinen Zeitpunkt erfolgreich. *tfdC*- und *pheA*-Transkripte wurden für alle Bodenproben und für jeden Zeitpunkt detektiert (Abbildung 44). Im feldfrischen Boden zum Zeitpunkt t_0 wurden $2,3 \times 10^1$ *tfdC*- bzw. $1,1 \times 10^2$ *pheA*-Transkripte pro ng cDNA erfasst (Abbildung 44). Nach zwei Tagen zeigte sich in beiden Fällen eine Abnahme der Gentranskripte von bis zu 84 %, was mit der beobachteten, schnellen Abnahme des Substrates 2,4-DCP in den Bodensäulen einhergeht (Abbildung 17). Die Relative Genhäufigkeit zum Zeitpunkt t_{2d} zeigte mit den ermittelten Werten von maximal 1,6 bzw. 1,2 einen neutralen Effekt von Regenwürmern und / oder 2,4-DCP auf die Anzahl aktiver 2,4-DCP- und Phenol-abbauender Bakterien (Abbildung 45). Im Verlauf der Inkubation wurde eine Zunahme der *tfdC*-Transkripte beobachtet, die jedoch nur für Proben mit einer 2,4-DCP Vorbehandlung in einer signifikant höheren (t-Test: $p < 0,05$) Transkriptzahl im Vergleich zu t_0 resultierte (Abbildung 44). Die Relative Genhäufigkeit war zudem für die untersuchte Einflussgröße 2,4-DCP in Abwesenheit von Regenwürmern mit einem Wert von 6 am höchsten (Abbildung 45).

Die Anzahl der detektierten *pheA*-Transkripte in Regenwurm- und / oder 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben erhöhte sich nach zehn Tagen Inkubation leicht, blieb

aber unter dem zu Inkubationsbeginn erfassten Wert (Abbildung 44). Bodenproben ohne vorherigen Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP wiesen am Ende der Inkubation die höchsten *pheA*-Transkriptzahlen auf, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich (t-Test: $p > 0,05$) zu t_0 waren. Die Relative Genhäufigkeit für alle Proben war < 1 (Abbildung 45), was auf einen inhibierenden Effekt von Regenwürmern und Substrat auf die Aktivität von Phenol-abbauenden Bakterien schließen lässt.

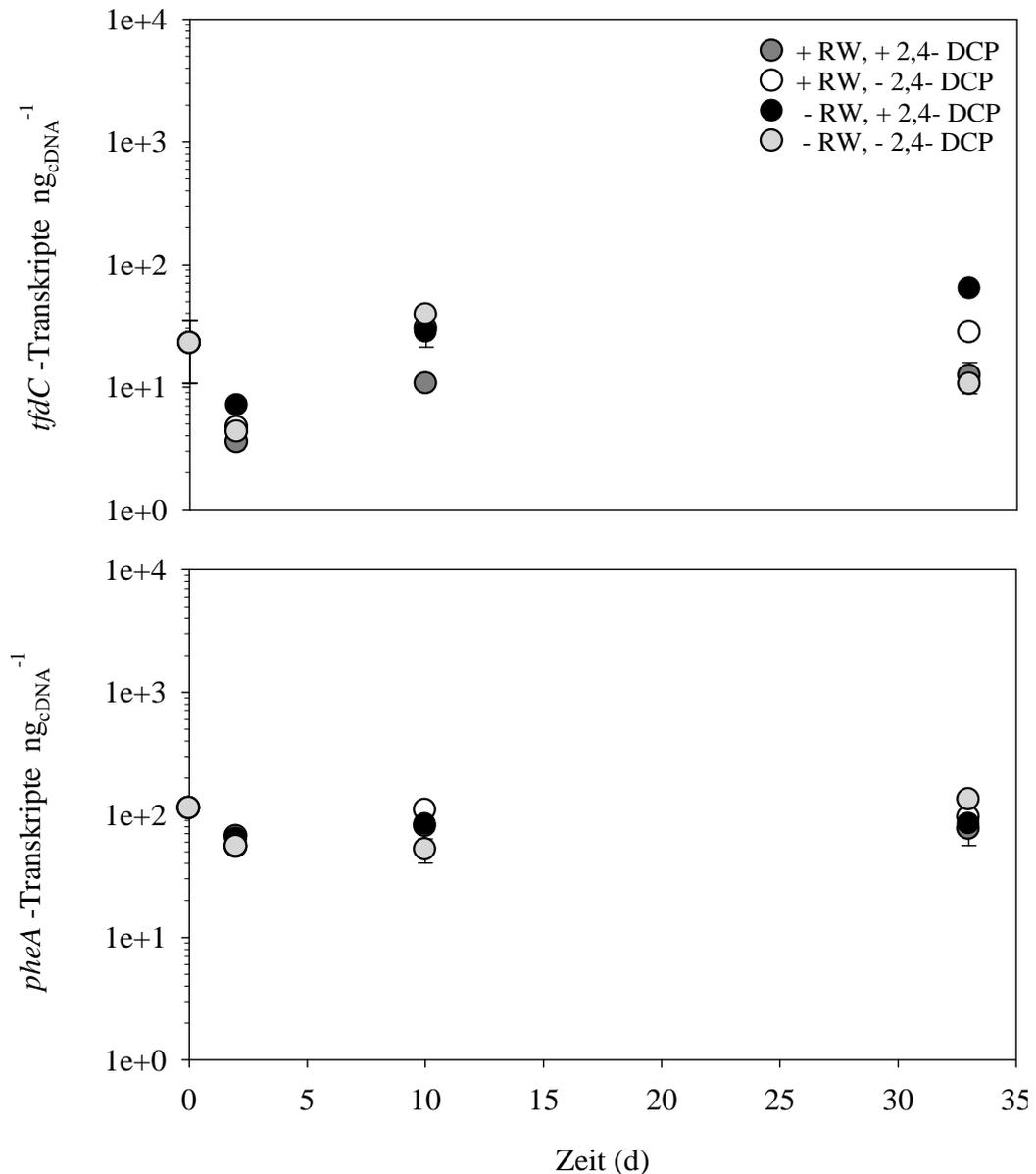


Abbildung 44: *tfdC*- und *pheA*-Transkriptzahlen bezogen auf ng eingesetzter cDNA in den oberen 5 cm des Bodens zu Versuchsbeginn (t_0) sowie nach 2 Tagen, 10 Tagen und 33 Tagen (Beendigung der Bodensäuleninkubation). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikaten; Fehlerbalken zeigen den höchsten und niedrigsten erfassten Wert. Abkürzung: RW, Regenwurm.

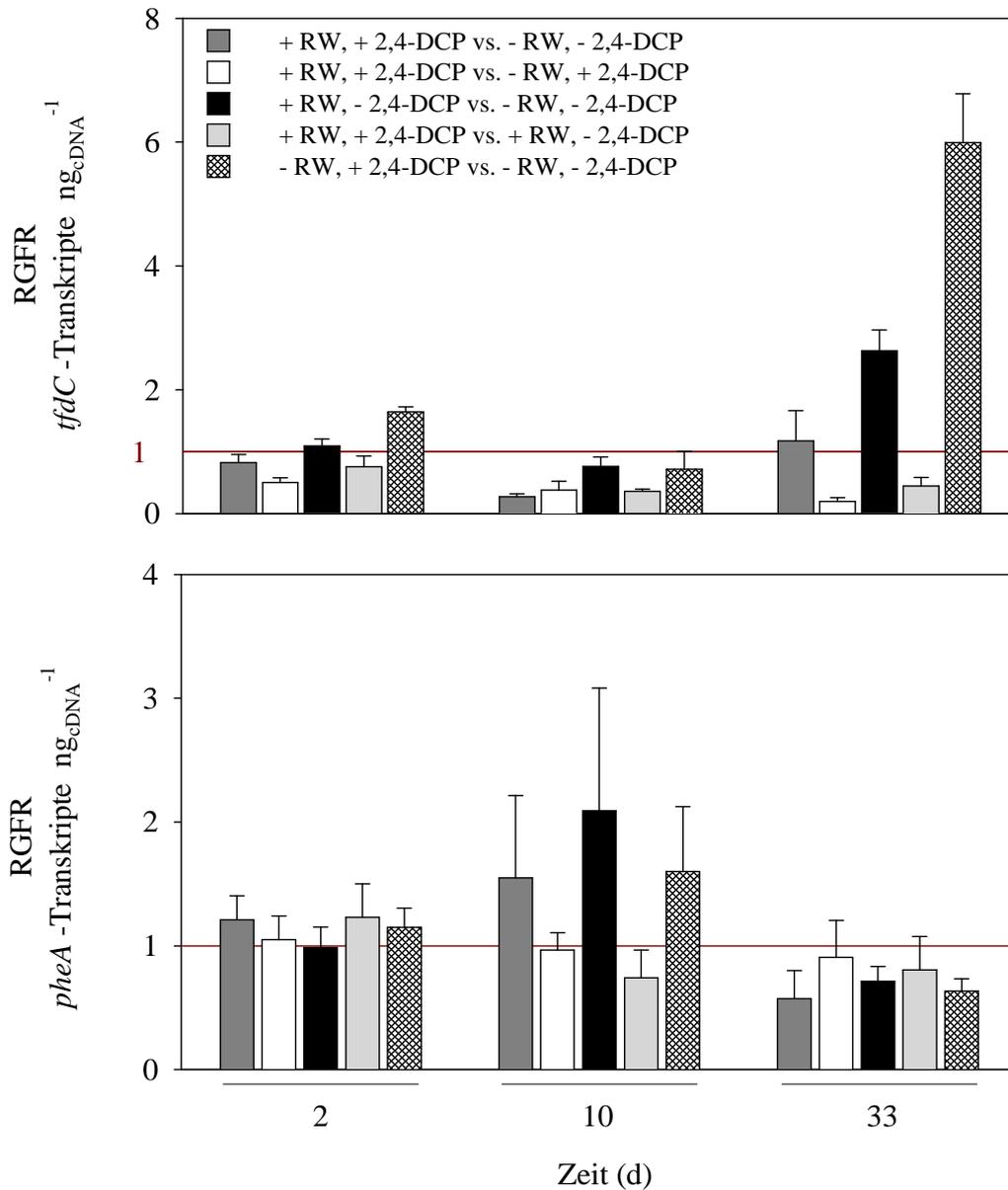


Abbildung 45: Relative Genhäufigkeit (RGFR) von *tfdC*- und *pheA*-Transkripten pro ng eingesetzter cDNA in den oberen 5 cm des Bodens nach Inkubation in Bodensäulen. Gezeigt werden der Effekt von (a) Regenwürmern und 2,4-DCP (dunkelgrau), (b) Regenwürmern in Gegenwart von 2,4-DCP (weiß), (c) Regenwürmern in Abwesenheit von 2,4-DCP (schwarz), (d) 2,4-DCP in Gegenwart von Regenwürmern (hellgrau) und (e) 2,4-DCP in Abwesenheit von Regenwürmern (weiß-schraffiert). Abgebildete Daten stellen Mittelwerte von Duplikaten dar; Fehlerbalken geben den höchsten berechneten Wert an. Eine RGFR von > 1 (rote Linie) zeigt einen stimulierenden, von < 1 einen inhibierenden Effekt des jeweils untersuchten Faktors.

Da die detektierten *tfdC*- und *pheA*-Gentranskriptzahlen deutlich unter den erfassten Genkopienzahlen lagen, war der Einfluss von Regenwürmern und / oder 2,4-DCP auf die Expression der am Abbau von 2,4-DCP und Phenol beteiligten strukturellen Gene marginal.

3.4. Identifizierung 2,4-DCP-¹³C-verwertender Bacteria in Drilosphären- und Bodenmaterial mit Hilfe des 16S rRNA basierten Stablen-Isotopenversuches

Die Methodik des Stablen Isotopenversuches („stable isotope probing“, SIP) wurde eingesetzt, um aktive 2,4-DCP-¹³C-verwertende Bakterien der Domäne *Bacteria* nach Inkubation mit ¹³C-2,4-DCP in Bodensäulen und Mikrokosmen unter oxischen Bedingungen zu identifizieren.

3.4.1. Abbau von ¹²C- und ¹³C-2,4-DCP in Bodensäulen

Die Abnahme von ¹²C- sowie ¹³C-2,4-DCP erfolgte in allen, mit 2,4-DCP-versetzten, Bodensäulen gleichmäßig und ohne auffällige Verzögerungen (Abbildung 46). Dabei konnte kein Unterschied zwischen dem ¹²C-2,4-DCP und dem ¹³C-markierten 2,4-DCP beobachtet werden. Nach 3-tägiger Inkubation wurde eine Substratabnahme von bis zu 81 % für ¹³C-2,4-DCP-supplementierte und bis zu 83 % für ¹²C-2,4-DCP-supplementierte Bodensäulen detektiert (Abbildung 46). Nach 19 Tagen (Bodensäulen mit Regenwürmern) bzw. 41 Tagen (Bodensäulen ohne Regenwürmer) lag die 2,4-DCP Konzentration unter dem Detektionslimit. Die jeweiligen Inkubationsansätze wurden daraufhin umgehend beendet, um eine (negative) Beeinflussung der aktiven, 2,4-DCP-Kohlenstoff-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft zu minimieren. Die Überlebensrate der eingesetzten Regenwürmer in den ¹²C- und ¹³C-2,4-DCP Inkubationsansätzen lag bei 100 %.

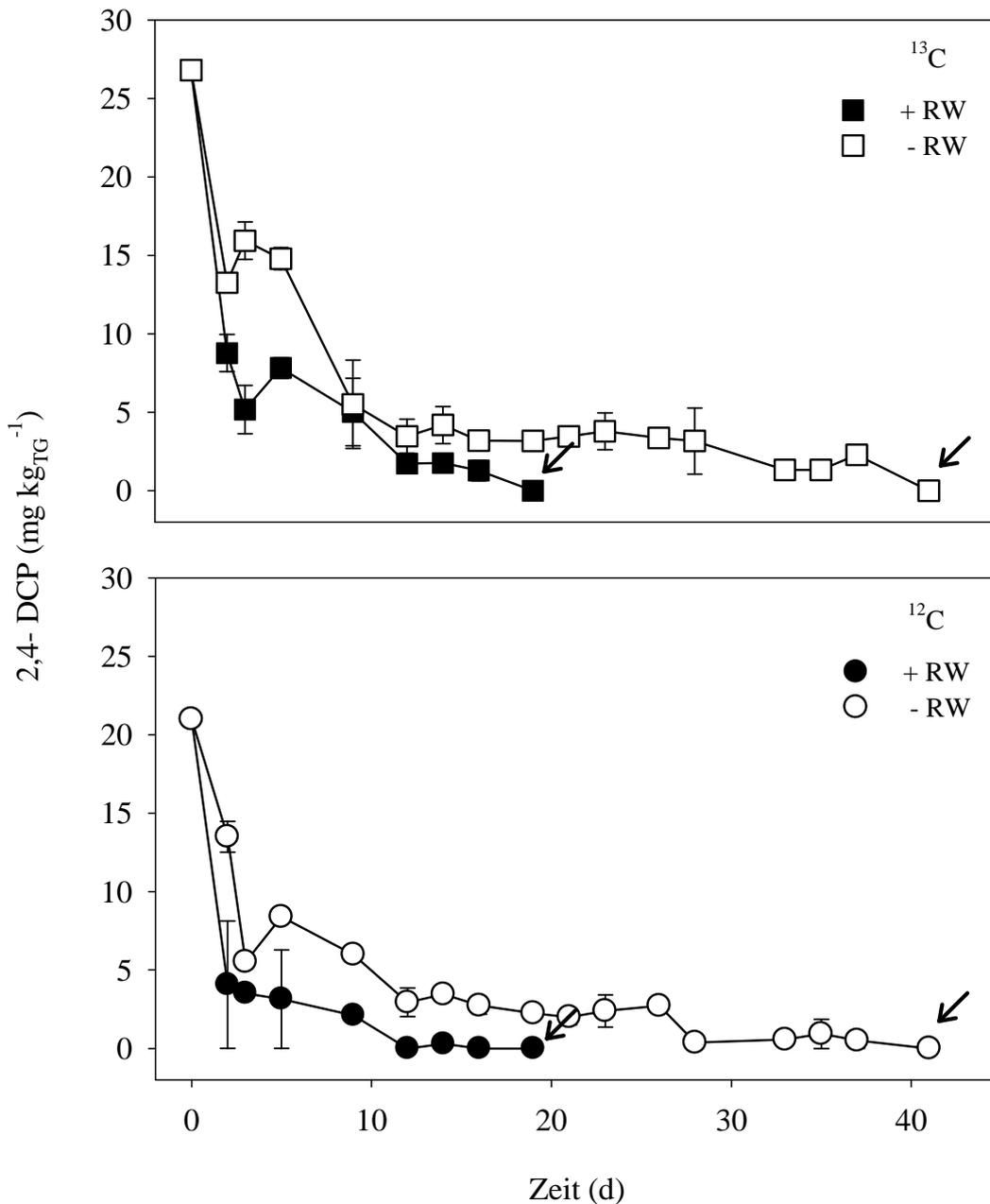


Abbildung 46: Abnahme von ^{13}C - bzw. ^{12}C -2,4-DCP in Bodensäulen mit landwirtschaftlichem Boden aus Scheyern in Gegenwart oder Abwesenheit von *A. caliginosa*. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C im Dunkeln. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei Replikaten; die Fehlerbalken geben den höchsten und niedrigsten gemessenen Wert an. Die Pfeile zeigen die Beendigung der Inkubation für die jeweiligen Ansätze. Abkürzung: RW, Regenwurm. 13C, Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP; 12C, Inkubation mit ^{12}C -2,4-DCP.

3.4.2. Abbau von ^{12}C - und ^{13}C -2,4-DCP in oxischen Mikrokosmen

Im Hinblick auf eine verstärkte Anreicherung 2,4-DCP- ^{13}C -assimilierender Bakterien wurden Drilosphären- und Bodenproben nach Beendigung der Bodensäuleninkubation (vgl. 3.4.1., Abbildung 46) in Form von Bodenaufschlämmungen mit etwa 40 μg ^{12}C -

oder [^{13}C]-2,4-DCP pro Gramm Frischgewicht inkubiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurde eine Substratabnahme von mehr als 90 % in [^{12}C]- und [^{13}C]-2,4-DCP-supplementierten Mikrokosmen detektiert (Daten nicht gezeigt). [^{12}C]- und [^{13}C]-2,4-DCP wurde nach komplettem Abbau in regelmäßigen Abständen den Mikrokosmen zugesetzt. Die Konzentrationsbestimmung mittels HPLC zeigte für alle Ansätze im Verlauf der Inkubation einen 2,4-DCP Verbrauch und weist folglich auf eine Anreicherung von 2,4-DCP- ^{13}C -verwertende Bakterien hin.

3.4.3. Dichtegradientenzentrifugation

Die nach Extraktion und Aufreinigung erhaltene RNA aus Bodensäulen- und Mikrokosmenversuchen wurde mit Hilfe einer CsTFA-Dichtegradientenzentrifugation in die isotopisch „schwere“ ^{13}C -RNA aktiver 2,4-DCP [^{13}C]-assimilierender Bakterien und in die isotopisch „leichte“ ^{12}C -RNA der restlichen mikrobiellen Gemeinschaft aufgetrennt. Im Anschluss an die Fraktionierung erfolgte die Bestimmung der Schwebdichte in den einzelnen Fraktionen anhand eines Kontrollgradienten ohne RNA (Abbildung 47).

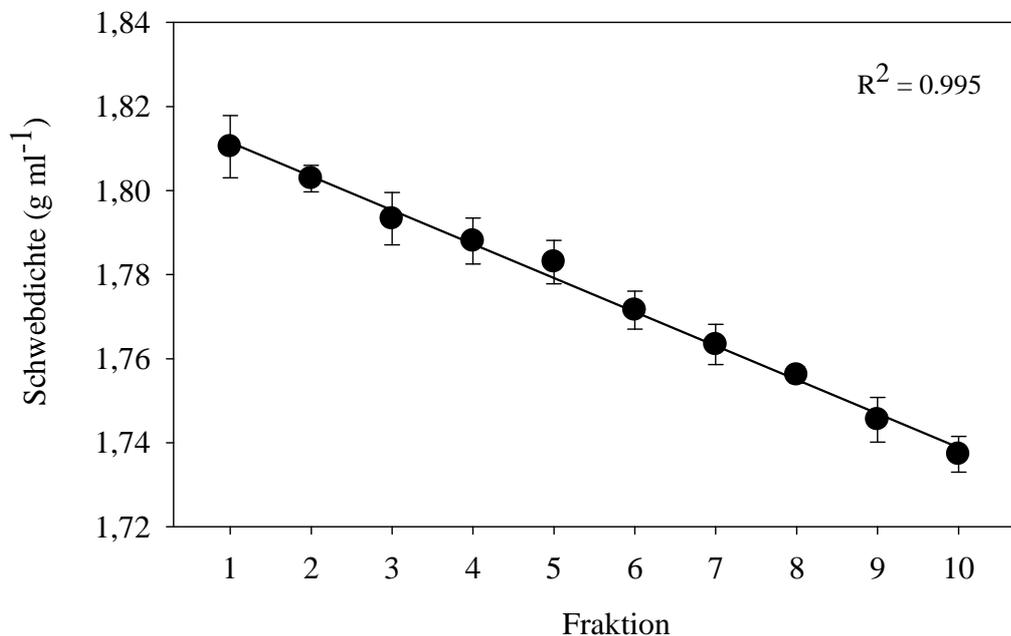


Abbildung 47: Schwebdichte der Fraktionen 1 bis 10 einer Kontrollgradientenlösung ohne RNA nach 67 h Zentrifugation bei 37.800 rpm und 20 °C des Zentrifugationslaufes 4. Die Messung der Dichte erfolgte bei 20 °C. Dargestellte Messwerte sind Mittelwerte von zehn Wiederholungsmessungen (\pm Standardabweichung). Die Linie zeigt die lineare Regression mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 .

Während der 67-stündigen Zentrifugation bei 37.800 rpm bildete sich ein linearer, reproduzierbarer Gradient mit einer Schwebdichte von $1,759 \pm 0,019$ g pro ml bis $1,837 \pm 0,02$ g pro ml (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 4$) aus. Für die Identifizierung aktiver Mikroorganismen wurde in der vorliegenden Arbeit die „schwere“, vollständig ^{13}C -markierte rRNA aus Ansätzen mit [^{13}C]-2,4-DCP mit der „schweren“ unmarkierten ^{12}C -rRNA aus den Ansätzen mit [^{12}C]-2,4-DCP verglichen. Auf diese Weise können mögliche „falsch-positive“ Ergebnisse, die durch die Migration „schwerer“, G+C-reicher rRNA in die „schweren“ Fraktionen auftreten, minimiert werden. Mit Hilfe der RNA Quantifizierung wurde für jede Drilosphären- und Bodenprobe drei repräsentative „schwere“ Fraktionen zur weiteren Verwendung ausgewählt. Kontrollanalysen eines kompletten Gradienten mittels TRFLP und Pyrosequenzierung wurden zur Überprüfung einer erfolgreichen ^{13}C -Markierung sowie zur Bestätigung der Fraktionenauswahl herangezogen.

3.4.4. RNA Verteilung entlang des Dichtegradienten

Die fraktionierte RNA wurde präzipitiert und anschließend quantifiziert. Die Verteilung der RNA in den einzelnen Fraktionen wurde für alle Proben bestimmt. Die RNA-Wiederfindung in den Fraktionen eins bis zehn für die ^{13}C -Proben betrug dabei $97,3 \pm 10,6 \%$, für die ^{12}C -Proben $94,8 \pm 14,5 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 15$). Nach der Inkubation in Mikrokosmen wiesen mehr als 80 % der wiedergefundenen ^{12}C -RNA in der Kotkrümel-Probe eine Schwebdichte von $1,777$ g pro ml bis $1,798$ g pro ml auf (Abbildung 48). Anhand der RNA-Verteilungskurve der ^{13}C -Probe wurde eine Verschiebung der RNA in die „schweren“ Fraktionen beobachtet. Der Großteil ($> 60 \%$) der ^{13}C -RNA wies eine Schwebdichte von $1,798$ g pro ml bis $1,832$ g pro ml auf (Abbildung 48). Die aufgetretene Verschiebung der RNA-Verteilung nach Inkubation mit [^{13}C]-2,4-DCP weist auf eine erfolgreiche Anreicherung des „schweren“ ^{13}C -Isotops in der RNA hin und zeigt eine Markierung von 2,4-DCP- ^{13}C -assimilierender Bakterien.

Nach Literaturangaben weist eine vollständig ^{13}C -markierte rRNA, extrahiert aus einer Reinkultur von *Methylobacterium extorquens*, eine mittleren Schwebdichte von $1,815$ g pro ml auf (Lüders *et al.*, 2004). Basierend auf diesem Wert wurden für jede ^{13}C - und ^{12}C -Probe drei Fraktionen (Abbildung 48, Tabelle-AH 1) mit einer mittleren Schwebdichte von $1,812$ g pro ml $\pm 0,017$ g pro ml als „schwer“ definiert, in cDNA transkribiert und für weitere molekularbiologische Untersuchungen herangezogen.

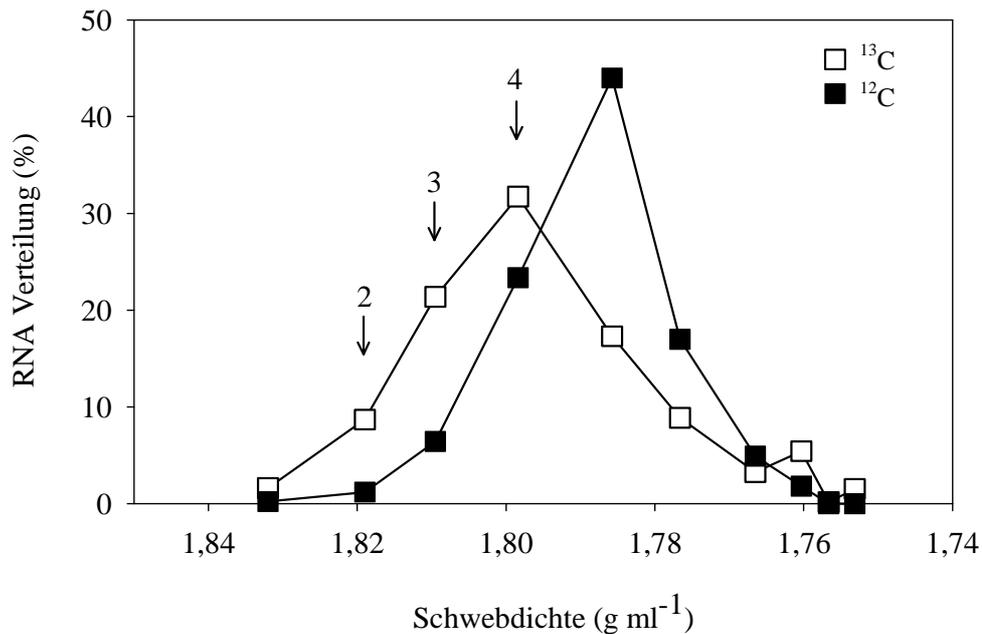


Abbildung 48: Verteilung der RNA aus Kotkrümel-Proben von *A. caliginosa* nach 50-tägiger Inkubation in Mikrokosmen mit [¹²C]- bzw. [¹³C]-2,4-DCP entlang des Dichtegradienten. Dargestellt sind Werte von jeweils einem Replikat. Pfeile markieren die „schweren“ Fraktionen (2 bis 4), die für weitere Analysen verwendet wurden. 13C, Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP; 12C, Inkubation mit [¹²C]-2,4-DCP.

3.4.5. TRFLP-Analyse

Eine Anreicherung der RNA mit ¹³C sowie die Auswahl der „schweren“ Fraktionen anhand der RNA-Verteilung wurden mit Hilfe der TRFLP-Analyse überprüft. Dafür wurden exemplarisch für ¹²C- und ¹³C-Bodenproben (5-10 cm; Regenwurmbehandlung; Mikrokosmen) die bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente aus der cDNA der Fraktionen eins bis neun amplifiziert. Die Amplifikation der 16S rRNA Gene war für alle Proben erfolgreich (Abbildung 49).

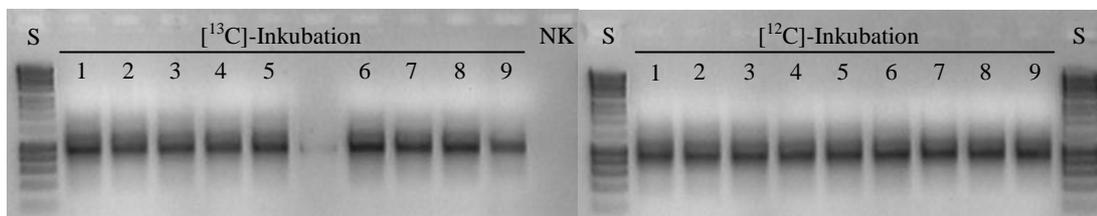


Abbildung 49: Gelelektrophoretische Kontrolle der PCR-Amplifikation potentieller 16S rRNA-Genfragmente (ca. 880 bp) aus cDNA der Gradientenfraktionen 1 bis 9 mit dem Primerpaar 27F-IRD700/907RM für die TRFLP-Analyse. Dargestellt sind die Ergebnisse für ein Replikat der Bodenprobe (5-10 cm) nach Mikrokosmeninkubation, vorinkubiert mit Regenwürmern und [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP. Abkürzungen: S, Längenstandard MWM-1; NK, Negativkontrollen mit PCR-Wasser.

Nach dem sich anschließenden Restriktionsverdau mit *MspI* zeigten die TRFLP-Profile der bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente aus ^{12}C - und ^{13}C -Proben deutliche Unterschiede (Abbildung 50). Die „schweren“ und die „leichten“ Fraktionen der ^{13}C -Inkubation unterschieden sich zudem in der Zusammensetzung ihrer Restriktionsfragmente. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich belegen, dass (a) die Auftrennung von ^{12}C -RNA und ^{13}C -RNA erfolgreich war, (b) Bakterien aus Drilosphären- und Bodenproben 2,4-DCP- ^{13}C assimilierten und in ihre Nukleinsäuren einbauten und (c) die anhand der RNA-Verteilung ausgewählten „schweren“ Fraktionen zur vergleichenden Analyse geeignet sind.

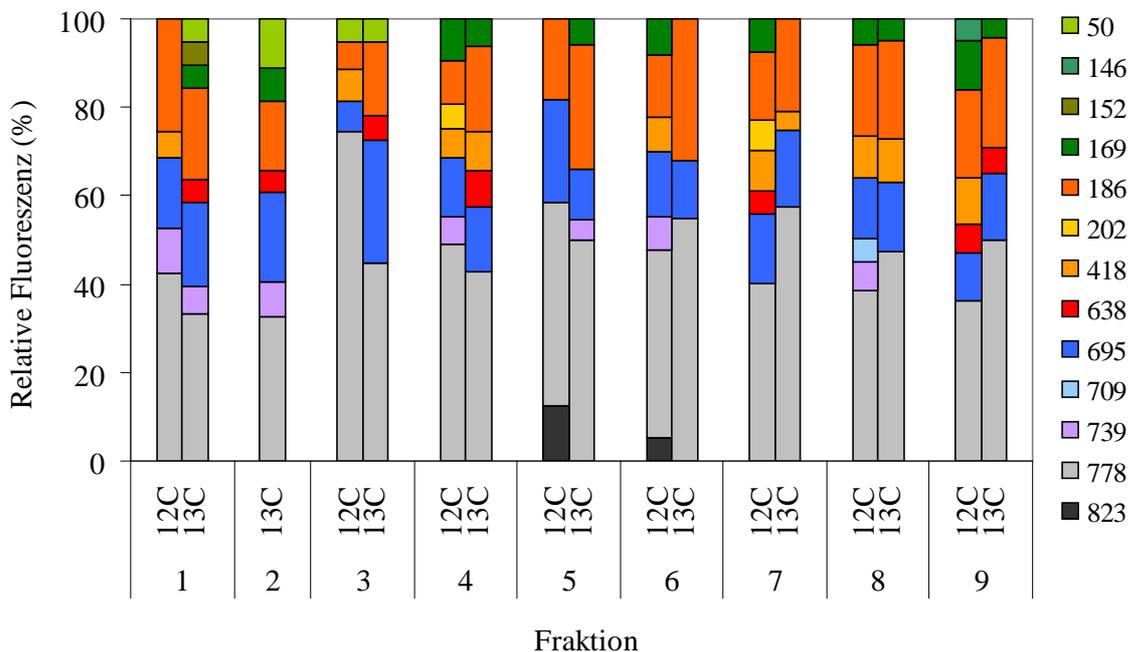


Abbildung 50: TRFLP-Profil bakterieller 16S rRNA cDNA Sequenzen der Gradientenfractionen 1 bis 9 nach 50-tägiger Inkubation in Mikrokosmen mit ^{12}C - bzw. ^{13}C -2,4-DCP. Abgebildet sind die nach TRFLP-Analyse detektierten terminalen Restriktionsfragmente (50-823 bp) für ein Replikat der Bodenproben (5-10 cm) nach Vorinkubation mit Regenwürmern. Abkürzungen: 12C, Inkubation mit ^{12}C -2,4-DCP; 13C, Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP.

3.4.6. Erstellung der 16S rRNA Amplikon-Genbibliotheken

Aus der cDNA der ausgewählten „schweren“ Fraktionen von ^{12}C - und ^{13}C -Inkubationen wurden 16S rRNA-Genfragmente (ca. 560 bp) für die Pyrosequenzierung und die anschließende Erstellung von Amplikon-Genbibliotheken amplifiziert. Die Amplifikation der Genfragmente war für alle Proben erfolgreich und lieferte Banden mit der gewünschten Fragmentlänge (Abbildung 51). Die aufgereinigten und

quantifizierten PCR-Produkte wurden zu gleichen Teilen vereinigt und für die Pyrosequenzierung eingesetzt. Insgesamt wurden 32 Amplikon-Genbibliotheken erstellt, um die Abundanz und Diversität der *Bacteria* in den „schweren“ Fraktionen der ^{12}C - und ^{13}C -Proben zu vergleichen und aktive 2,4-DCP- ^{13}C -assimilierende Mikroorganismen zu identifizieren.

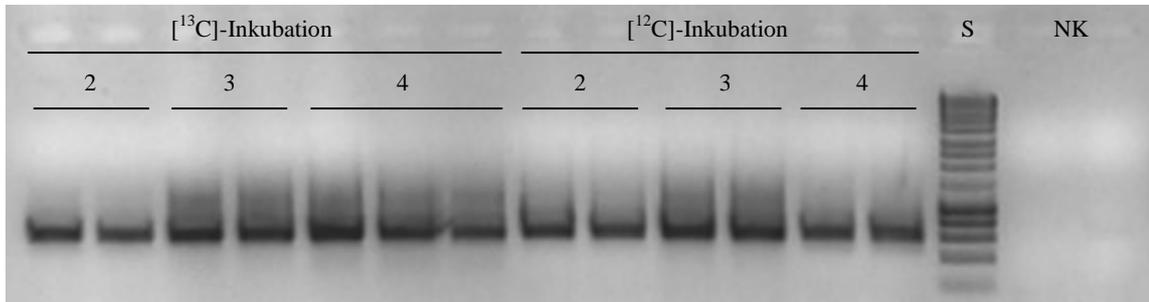


Abbildung 51: Gelelektrophoretische Überprüfung der PCR möglicher 16S rRNA-Genfragmente (ca. 560 bp) aus cDNA der „schweren“ Fraktionen 2 bis 4 mit dem Primerpaar 341F und 907RM für die Pyrosequenzierung. Abgebildet sind die Ergebnisse für ein Replikat des Bodens (0-5 cm) nach Mikrokosmenversuch, vorinkubiert mit Regenwürmern und ^{13}C - bzw. ^{12}C -2,4-DCP. Abkürzungen: S, Längenstandard MWM-1; NK, Negativkontrollen mit PCR-Wasser.

3.4.7. Pyrosequenzierungs-basierende Gradientenanalyse

Zusätzlich zur TRFLP-Analyse wurden die Anreicherung von ^{13}C -markierter RNA sowie die vorgenommene Auswahl der „schweren“ Fraktionen anhand von Pyrosequenzierungsdaten überprüft. Dafür wurden exemplarisch die relativen Häufigkeiten detektierter OTUs (Familien-Ebene, Sequenzähnlichkeit $\geq 87,7\%$) in den 16S rRNA Amplikon-Genbibliotheken der ^{12}C - und ^{13}C -Inkubationen von Bodenproben (0-5 cm) aus Bodensäulenansätzen ohne Regenwurm entlang des gesamten Gradienten verglichen (Abbildung 52, Abbildung 53). Die erfassten Profile zeigten sowohl deutliche Unterschiede zwischen ^{12}C - und ^{13}C -Proben als auch zwischen „schweren“ und „leichten“ Fraktionen. Unter anderem konnte das den *Sphingomonadaceae*-zugeordnete OTU nur in den „schweren“ Fraktionen der ^{13}C -Inkubation nachgewiesen werden (Abbildung 52, Abbildung 53). Diese Ergebnisse unterstützen die TRFLP-Daten und weisen darauf hin, dass (a) im Laufe der Bodensäuleninkubation aktive Mikroorganismen 2,4-DCP- ^{13}C assimilierten und in ihrer RNA anreicherten und (b) die als „schwer“ definierten Fraktionen für eine Identifizierung ^{13}C -2,4-DCP-metabolisierender Bakterien geeignet sind.

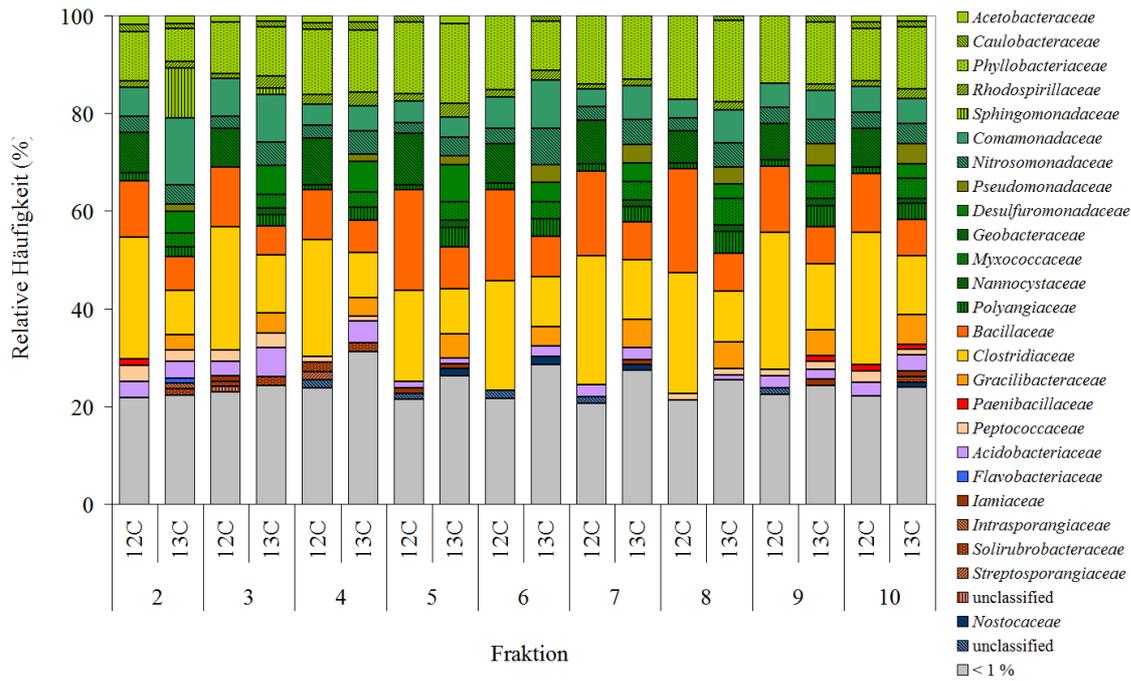


Abbildung 52: Relative Häufigkeiten repräsentativer, vorwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen in ^{12}C - und ^{13}C -Amplikon-Genbibliotheken von Bodenproben der oberen 5 cm aus Bodensäulen ohne Regenwurmbehandlung nach Pyrosequenzierung- und Jaguc2-Analyse entlang des Dichtegradienten. 12C, Inkubation mit [^{12}C]-2,4-DCP; 13C, Inkubation mit [^{13}C]-2,4-DCP.

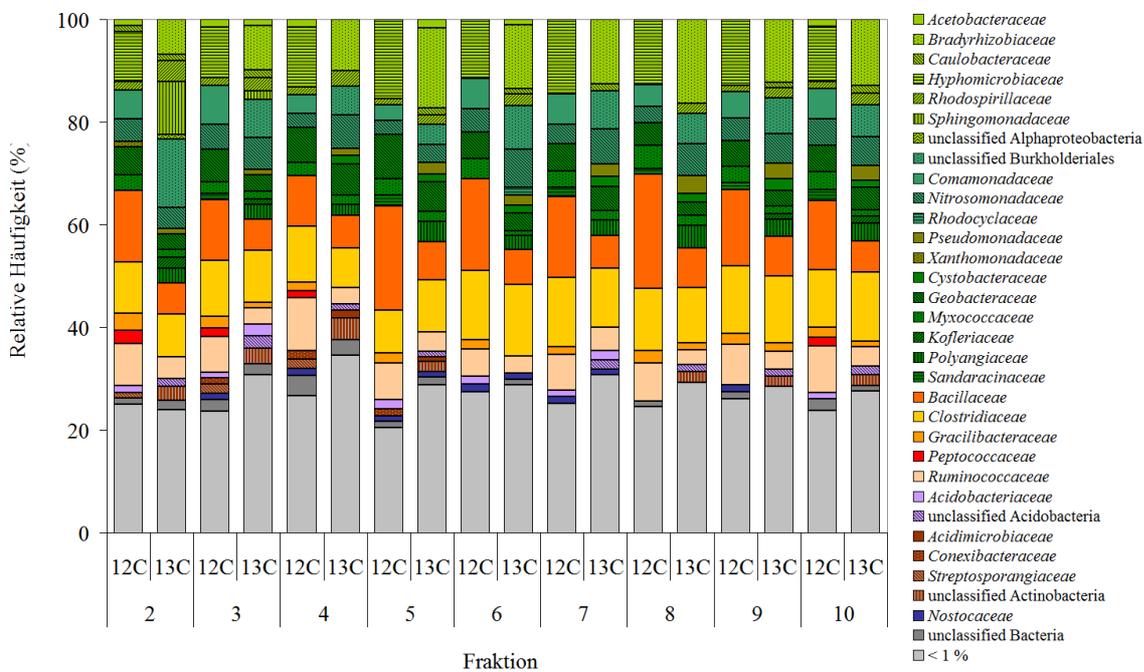


Abbildung 53: Relative Häufigkeiten repräsentativer, rückwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen in ^{12}C - und ^{13}C -Amplikon-Genbibliotheken von Bodenproben der oberen 5 cm aus Bodensäulen ohne Regenwurmbehandlung nach Pyrosequenzierung- und Jaguc2-Analyse entlang des Dichtegradienten. 12C, Inkubation mit [^{12}C]-2,4-DCP; 13C, Inkubation mit [^{13}C]-2,4-DCP.

3.4.8. Quantitative und qualitative Analyse der Amplikon-Genbibliotheken

Insgesamt wurden 582.484 16S rRNA Teilsequenzen, davon 337.291 vorwärtsgerichtete und 245.193 rückwärtsgerichtete Sequenzen, mit Hilfe der Software JAguc2 analysiert. Die durchschnittliche Sequenzlänge in den Amplikon-Genbibliotheken betrug dabei $501 \text{ bp} \pm 16 \text{ bp}$ (vorwärts) bzw. $498 \text{ bp} \pm 17 \text{ bp}$ [(rückwärts), (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 16$)]. Die durchgeführte Vergleichsanalyse mit Hilfe der QIIME Software bestätigte die durch JAguc2 berechneten Ergebnisse und zeigte, dass JAguc2 für die Analyse von Pyrosequenzierungsdaten auf Familien-Ebene geeignet ist. Die Coverage auf Familien-Ebene (Sequenzähnlichkeit $\geq 87,7 \%$) für 16S rRNA Sequenzen aus den 32 Genbibliotheken lag im Durchschnitt bei $98,5 \% \pm 0,5 \%$ (vorwärts) sowie bei $98,4 \% \pm 0,8 \%$ (rückwärts). Die hohen Coverage-Werte deuten darauf hin, dass die Diversität aller Amplikon-Genbibliotheken zum Großteil erfasst wurde.

3.4.8.1. Rarefaction-Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen

Die zu erwartende Anzahl an OTUs auf Familien-Ebene wurde mit Hilfe der Rarefaction-Methode für jede Amplikon-Genbibliothek abgeschätzt (Abbildung 54). Der Vergleich der Rarefaction-Kurven von ^{12}C - und ^{13}C -Inkubationen zeigte im Allgemeinen, dass sich die 95 %-Konfidenzintervalle über einen Großteil des Kurvenverlaufes überlappten und somit nicht signifikant unterschiedlich waren (Abbildung 54). Der abflachende Kurvenverlauf weist zudem auf einen ausreichenden Probenumfang hin und belegt, dass der Großteil der Diversität für die ausgewählten „schweren“ Fraktionen der ^{12}C - und ^{13}C -Inkubationen gut erfasst wurde.

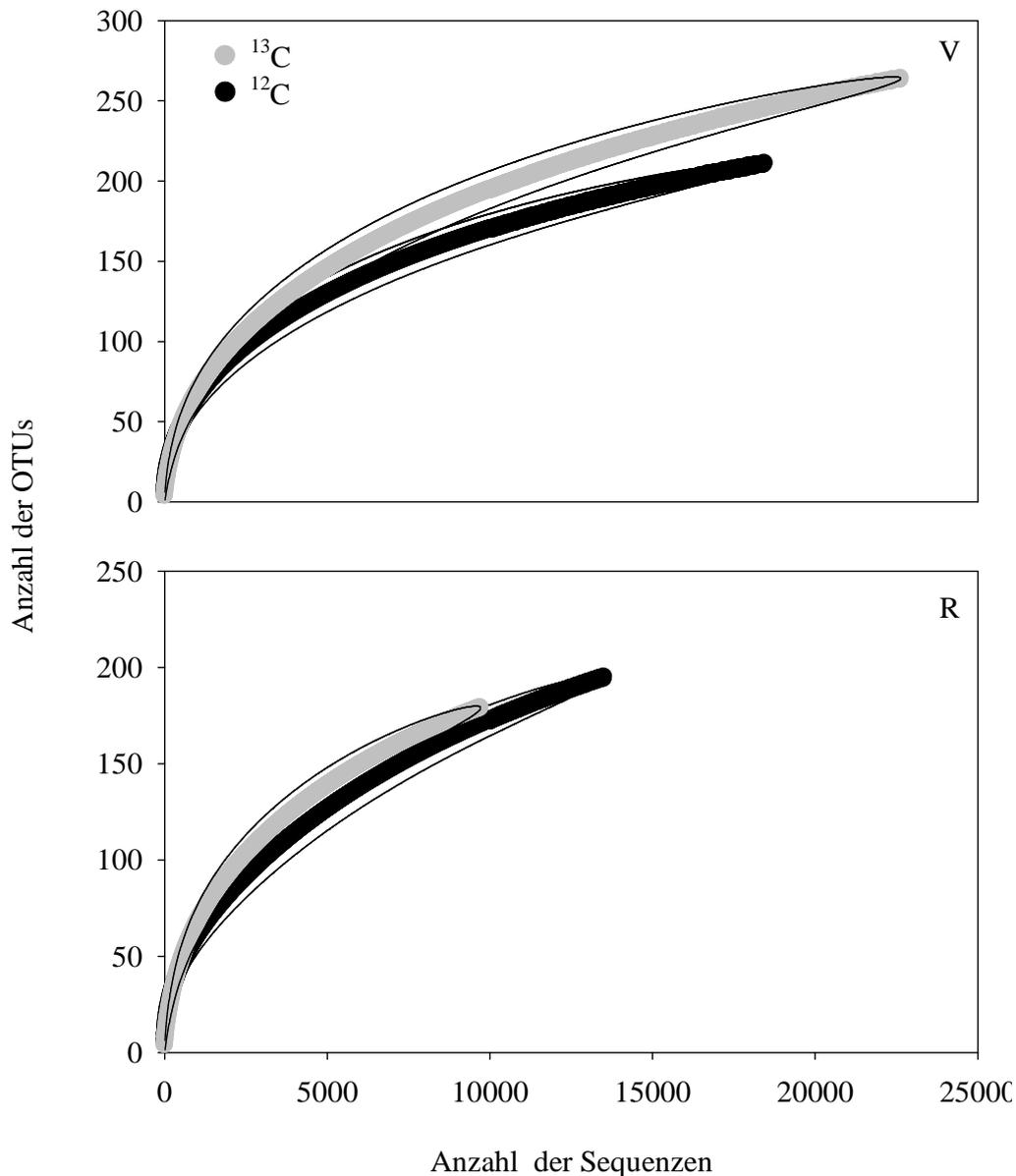


Abbildung 54: Repräsentative Rarefaction-Analyse der nach Pyrosequenzierung und JAguc2-Auswertung erhaltenen 16S rRNA Teilsequenzen (ϕ 501 bp) aus dem Darminhalt von *A. caliginosa* nach Mikrokosmeninkubation mit 2,4-DCP auf Familien-Ebene. Die schwarzen Linien geben die 95 % Konfidenzintervalle an. Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 87,7 % (Familien-Ebene; Yarza *et al.*, 2010). ^{13}C , Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP; ^{12}C , Inkubation mit ^{12}C -2,4-DCP. Abkürzungen: V, Analyse der vorwärtsgerichteten Sequenzen; R, Analyse der rückwärtsgerichteten Sequenzen.

3.4.8.2. Mikrobielle Diversität

Die Anzahl der detektierten OTUs in den aus ^{12}C -Bodensäulenproben erstellten Genbibliotheken war in der Regel höher als in den ^{13}C -Vergleichsproben, ebenso wie der nicht-parametrischen Schätzwert Chao1 (Tabelle 37). Der Vergleich der Biodiversität anhand des Shannon-Index sowie der Evenness in ^{12}C - und ^{13}C -

Inkubationen zeigte keine signifikanten Unterschiede (t-Test: $p > 0,05$) und unterstützt die Ergebnisse der Rarefaction-Analyse. Die bakterielle Diversität nach 41 Tagen Inkubation in Bodensäulen ohne Regenwürmer und 2,4-DCP entsprach in etwa der zu Beginn des Inkubationsansatzes (Tabelle 37). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die gewählten Inkubationsbedingungen keine signifikanten Auswirkungen auf die Biodiversität hatten. Das Drilosphärenmaterial wies im Vergleich zu den Bodenproben einen signifikant niedrigeren Shannon-Index auf (t-Test: $H'_{\text{Gangwände, Darminhalt, Kotkrümmel}}$ vs. $H'_{\text{Boden + Regenwürmer}}$ $p < 0,05$; $H'_{\text{Gangwände, Darminhalt, Kotkrümmel}}$ vs. $H'_{\text{Boden - Regenwürmer}}$ $p < 0,05$), was auf einen selektiven Effekt von Regenwürmern auf die Diversität von Bodenbakterien hindeutet.

Nach Inkubation in Mikrokosmen und einem Gesamt-2,4-DCP Verbrauch von bis zu 425 μg kam es zu einer deutlichen Abnahme der Diversität in den Drilosphären- und Bodenproben. Die Anzahl der detektierten OTUs pro Genbibliothek verringerte sich im Durchschnitt von 305 (nach Bodensäuleninkubation) auf 223 (nach Mikrokosmeninkubation). Der durchschnittliche Shannon-Index von Gangwänden, Darminhalt und Kotkrümmeln sank von 3,41 auf 2,92 (t-Test: $p < 0,05$), der Shannon-Index der Bodenproben von 3,70 auf 3,22 [(t-Test: $p < 0,05$), (Tabelle 37, Tabelle 38)]. Der beobachtete, signifikante Rückgang der Biodiversität nach verlängerter Inkubation und erhöhter 2,4-DCP Konzentration deutet darauf hin, dass potentielle 2,4-DCP-Kohlenstoff-verwertende bzw. 2,4-DCP-tolerante Bakterien angereichert wurden.

Tabelle 37: Diversitätsanalyse 16S rRNA Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material vor bzw. nach Bodensäuleninkubation. Zahlen in Klammern geben die untere und obere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls an. Rückwärtsgerichtete Proben sind mit - r markiert. Abkürzung: RW, Regenwurm.

Probe	Anzahl OTUs	Shannon	Evenness	Chao1
t_0^a				
^{13}C	359	3,79 (3,76; 3,81)	0,64 (0,64; 0,65)	536 (468; 646)
^{12}C	540	3,88 (3,95; 3,90)	0,62 (0,61; 0,62)	746 (680; 843)
^{13}C -r	391	3,96 (3,92; 3,99)	0,66 (0,66; 0,67)	547 (491; 635)
^{12}C -r	582	4,00 (3,97; 4,03)	0,63 (0,62; 0,63)	752 (700; 828)
Gangwände				
^{13}C	208	3,25 (3,21; 3,29)	0,61 (0,60; 0,62)	284 (249; 349)
^{12}C	287	3,70 (3,67; 3,73)	0,65 (0,65; 0,66)	397 (353; 469)
^{13}C -r	196	3,33 (3,28; 3,39)	0,63 (0,62; 0,64)	242 (220; 285)
^{12}C -r	282	3,80 (3,76; 3,84)	0,67 (0,67; 0,68)	381 (341; 447)
Darminhalt				
^{13}C	203	3,10 (3,07; 3,14)	0,58 (0,58; 0,59)	266 (237; 320)
^{12}C	248	3,11 (3,08; 3,15)	0,56 (0,56; 0,57)	361 (313; 444)
^{13}C -r	246	3,22 (3,17; 3,26)	0,58 (0,58; 0,59)	401 (339; 503)
^{12}C -r	314	3,21 (3,18; 3,25)	0,56 (0,55; 0,56)	405 (369; 463)
Kotkrümmel				
^{13}C	368	3,44 (3,41; 3,47)	0,60 (0,59; 0,60)	456 (404; 539)
^{12}C	320	3,53 (3,51; 3,56)	0,60 (0,59; 0,60)	552 (486; 654)
^{13}C -r	296	3,56 (3,52; 3,60)	0,63 (0,62; 0,63)	440 (386; 524)
^{12}C -r	397	3,66 (3,63; 3,68)	0,61 (0,61; 0,62)	558 (504; 641)
0-5 cm Boden + RW				
^{13}C	306	3,56 (3,52; 3,60)	0,62 (0,62; 0,63)	529 (447; 659)
^{12}C	390	3,67 (3,64; 3,71)	0,62 (0,61; 0,62)	583 (519; 681)
^{13}C -r	344	3,75 (3,70; 3,79)	0,64 (0,63; 0,65)	626 (531; 769)
^{12}C -r	422	3,81 (3,77; 3,85)	0,63 (0,62; 0,64)	645 (573; 750)

Probe	Anzahl OTUs	Shannon	Evenness	Chao1
5-10 cm Boden + RW				
¹³ C	402	3,49 (3,46; 3,52)	0,58 (0,58; 0,59)	533 (485; 608)
¹² C	310	3,76 (3,74; 3,78)	0,65 (0,65; 0,66)	417 (373; 493)
¹³ C -r	410	3,49 (3,46; 3,52)	0,58 (0,58; 0,59)	553 (503; 629)
¹² C -r	327	3,84 (3,82; 3,87)	0,66 (0,66; 0,67)	412 (377; 473)
0-5 cm Boden - RW				
¹³ C	357	3,95 (3,92; 3,99)	0,67 (0,67; 0,68)	510 (455; 596)
¹² C	239	3,58 (3,55; 3,62)	0,65 (0,65; 0,66)	331 (292; 399)
¹³ C -r	478	4,20 (4,16; 4,24)	0,68 (0,67; 0,69)	831 (722; 988)
¹² C -r	302	3,73 (3,69; 3,77)	0,65 (0,65; 0,66)	448 (393; 536)
5-10 cm Boden - RW				
¹³ C	234	3,61 (3,57; 3,65)	0,66 (0,65; 0,67)	317 (279; 388)
¹² C	236	3,48 (3,44; 3,48)	0,64 (0,63; 0,64)	324 (286; 393)
¹³ C -r	203	3,74 (3,70; 3,79)	0,70 (0,70; 0,71)	262 (234; 316)
¹² C -r	209	3,61 (3,57; 3,66)	0,68 (0,67; 0,68)	262 (236; 314)
Kontroll-Boden ^b				
0-5 cm	378	3,88 (3,83; 3,93)	0,65 (0,65; 0,66)	523 (472; 603)
5- 10 cm	338	3,73 (3,68; 3,78)	0,64 (0,63; 0,65)	443 (404; 505)
0-5 cm -r	440	3,95 (3,90; 4,01)	0,65 (0,64; 0,66)	642 (577; 737)
5- 10 cm -r	458	4,03 (3,97; 4,08)	0,66 (0,65; 0,67)	650 (588; 741)

^a, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation

^b, ohne Regenwurm- und 2,4-DCP-Behandlung

13C, Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP; 12C, Inkubation mit [¹²C]-2,4-DCP

Tabelle 38: Diversitätsanalyse 16S rRNA Teilsequenzen in Amplikon-Genbibliotheken aus Material nach Mikrokosmeninkubation. Zahlen in Klammern geben die untere und obere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls an. Rückwärtsgerichtete Proben sind mit - r markiert. Abkürzung: RW, Regenwurm.

Probe	Anzahl OTUs	Shannon	Evenness	Chao1
Gangwände				
¹³ C	189	2,70 (2,66; 2,74)	0,51 (0,51; 0,52)	256 (225; 312)
¹² C	247	3,50 (3,47; 3,54)	0,64 (0,63; 0,64)	347 (305; 418)
¹³ C -r	196	2,75 (2,71; 2,79)	0,52 (0,51; 0,53)	331 (274; 431)
¹² C -r	232	3,55 (3,51; 3,59)	0,65 (0,64; 0,66)	367 (309; 469)
Darminhalt				
¹³ C	264	1,62 (1,59; 1,65)	0,29 (0,29; 0,30)	357 (318; 424)
¹² C	211	2,62 (2,60; 2,65)	0,49 (0,49; 0,49)	303 (261; 381)
¹³ C -r	179	1,69 (1,65; 1,73)	0,33 (0,32; 0,33)	240 (211; 294)
¹² C -r	195	2,55 (2,52; 2,58)	0,48 (0,48; 0,49)	266 (235; 323)
Kotkrümmel				
¹³ C	414	3,40 (3,37; 3,43)	0,56 (0,56; 0,57)	629 (559; 734)
¹² C	291	3,48 (3,44; 3,51)	0,61 (0,60; 0,61)	414 (366; 494)
¹³ C -r	504	3,53 (3,50; 3,57)	0,57 (0,56; 0,57)	693 (634; 778)
¹² C -r	324	3,59 (3,55; 3,62)	0,62 (0,61; 0,63)	498 (433; 602)
0-5 cm Boden + RW				
¹³ C	202	3,24 (3,19; 3,29)	0,61 (0,60; 0,62)	300 (254; 376)
¹² C	153	3,41 (3,36; 3,46)	0,68 (0,67; 0,69)	244 (198; 337)
¹³ C -r	132	3,17 (3,11; 3,23)	0,65 (0,64; 0,66)	210 (169; 298)
¹² C -r	108	3,30 (3,23; 3,36)	0,70 (0,69; 0,70)	128 (116; 158)
5-10 cm Boden + RW				
¹³ C	180	2,80 (2,77; 2,84)	0,54 (0,53; 0,55)	270 (227; 353)
¹² C	178	3,40 (3,37; 3,43)	0,66 (0,65; 0,66)	218 (196; 255)
¹³ C -r	160	2,94 (2,89; 2,99)	0,58 (0,57; 0,59)	233 (198; 301)
¹² C -r	167	3,51 (3,47; 3,55)	0,69 (0,68; 0,69)	212 (189; 259)

Probe	Anzahl OTUs	Shannon	Evenness	Chao1
0-5 cm Boden - RW				
¹³ C	235	2,76 (2,72; 2,80)	0,51 (0,50; 0,51)	368 (313; 462)
¹² C	186	3,03 (2,99; 3,07)	0,58 (0,57; 0,59)	255 (223; 314)
¹³ C -r	134	2,56 (2,50; 2,62)	0,52 (0,51; 0,53)	187 (160; 241)
¹² C -r	142	3,05 (2,98; 3,11)	0,61 (0,60; 0,63)	247 (195; 349)
5-10 cm Boden - RW				
¹³ C	284	3,30 (3,27; 3,33)	0,58 (0,58; 0,59)	385 (344; 455)
¹² C	238	3,66 (3,63; 3,69)	0,67 (0,66; 0,67)	294 (269; 341)
¹³ C -r	301	3,55 (3,51; 3,60)	0,62 (0,61; 0,63)	450 (394; 542)
¹² C -r	204	3,78 (3,73; 3,84)	0,71 (0,70; 0,72)	302 (259; 378)

¹³C, Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP; ¹²C, Inkubation mit [¹²C]-2,4-DCP

3.4.8.3. Phylogenetische Analyse von 16S rRNA cDNA Sequenzen

3.4.8.3.1. Identifizierung von metabolisch aktiven *Bacteria*

Detektierte „Familien-OTUs“ mit einer relativen Häufigkeit von ≥ 1 % in den Amplikon-Genbibliotheken wurden mit Hilfe von BLASTn phylogenetisch analysiert. Die Auswertung der Bibliotheken zeigte dabei eine diverse, aktive mikrobielle Gemeinschaft im landwirtschaftlichen Boden sowie in Drilosphären- und Bodenproben nach einer Inkubation in Bodensäulen. Im feldfrischen Boden zu Inkubationsbeginn wurden insgesamt 23 metabolisch aktive Familien nachgewiesen und den Phyla *Proteobacteria* (37,6 %), *Firmicutes* (10,2 %), *Acidobacteria* (8,5 %), *Actinobacteria* (7,8 %) und *Cyanobacteria* (3,5 %) zugeordnet bzw. als nicht-klassifizierte *Bacteria* (3,2 %) bezeichnet (Tabelle 40, Tabelle 42). *Hyphomicrobiaceae*, *Bacillaceae* und *Acidobacteriaceae* wiesen dabei die höchsten relativen Abundanzen innerhalb der Genbibliotheken auf. Nach einer 19- bzw. 41-tägigen Inkubation in Bodensäulen wurden 49 klassifizierte und sieben nicht-klassifizierte Familien in Drilosphären- und Bodenproben detektiert und den Phyla *Proteobacteria* (\emptyset 37,4 %, 18,8 - 59,1 %), *Firmicutes* (\emptyset 24,7 %, 6,7 - 48,6 %), *Bacteroidetes* (\emptyset 6,0 %, 0 - 24,3 %), *Acidobacteria* (\emptyset 1,6 %, 0 - 4,0 %), *Actinobacteria* (\emptyset 4,2 %, 0 - 12 %), *Cyanobacteria* (\emptyset 0,8 %, 0 - 3,2 %), *Chloroflexi* (\emptyset 0,5 %, 0 - 3,0 %), „*Tenericutes*“ (\emptyset 0,2 %, 0 - 3,2 %) zugeordnet sowie als nicht-klassifizierte *Bacteria* (\emptyset 0,9 %, 0 - 3,4 %) bezeichnet (Tabelle 39, Tabelle 41). Zu den dominierenden Familien (relative Häufigkeit ≥ 11 %) innerhalb der

Drilosphäre zählten *Clostridiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobiaceae* sowie *Xanthobacteraceae*. Regenwurm-beeinflusste Bodenproben zeigten eine ähnliche mikrobielle Zusammensetzung. Neben den bereits in der Drilosphäre detektierten dominanten Familien *Clostridiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Flavobacteriaceae* und *Hyphomicrobiaceae* wurden *Comamonadaceae*-Verwandte, *Bacillaceae* sowie *Geobacteraceae* nachgewiesen. In Bodenproben aus 2,4-DCP-behandelten Bodensäulen ohne *Aporrectodea caliginosa* wurden die dominierenden Familien den *Alphaproteobacteria* (*Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*) sowie den *Firmicutes* (*Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptococcaceae*) zugeordnet. Kontrollproben ohne Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP wurden von Mikroorganismen der Familien *Clostridiaceae*, *Geobacteraceae*, *Bacillaceae* und *Phyllobacteriaceae* dominiert.

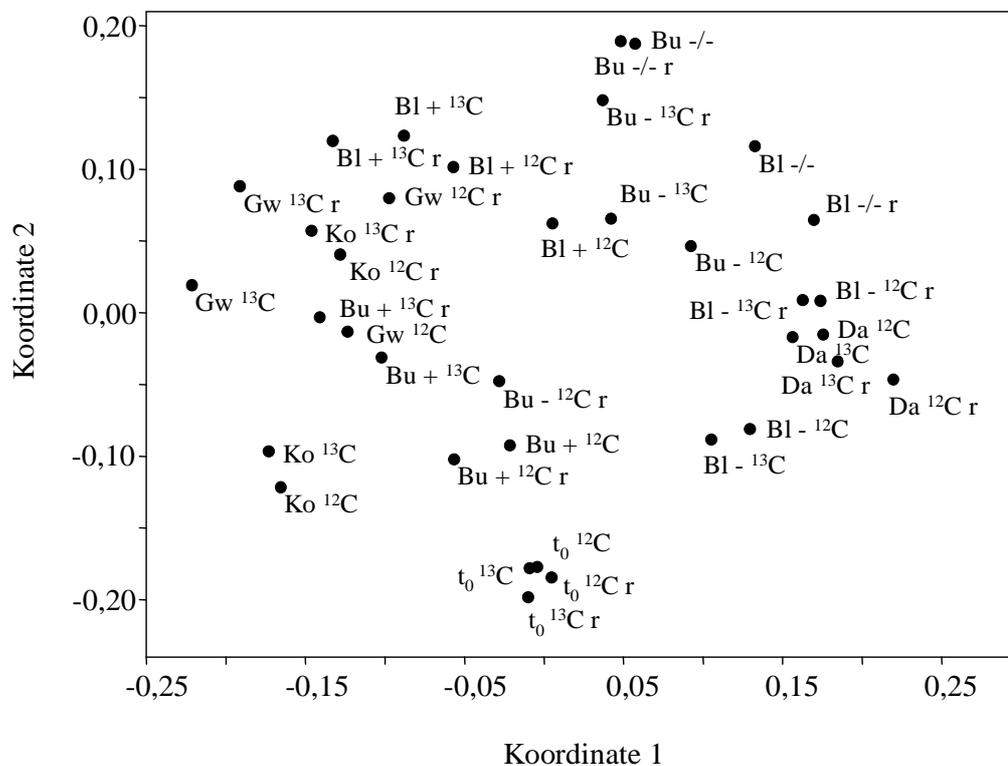


Abbildung 55: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Amplikon-Genbibliotheken erhaltenen 16S rRNA-Datensatzes aus Bodensäulenmaterial basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,2625. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation; Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern; -, Bodensäuleninkubation ohne Regenwürmer; -/-, Kontrollansatz ohne Regenwürmer und 2,4-DCP; 12C, Inkubation mit [¹²C]-2,4-DCP; 13C, Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP. Daten der Rückwärtsanalyse sind mit einem „r“ gekennzeichnet.

Statistische Analysen der Amplikon-Genbibliotheken mit Hilfe der nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS) sowie der nicht-parametrischen multivariaten Varianzanalyse (NPMANOVA) basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex zeigten, dass (a) die gewonnenen Daten aus der vorwärts- und rückwärtsgerichteten Sequenzanalyse keine signifikanten Unterschiede aufweisen ($p > 0,05$), (b) sich Drilosphären- und Regenwurm-vorbehandelte Bodenproben in ihrer phylogenetischen Zusammensetzung signifikant von Regenwurm-unbehandelten Bodenproben unterscheiden ($p < 0,05$), (c) der Einsatz von 2,4-DCP in Bodensäulen zu einer signifikanten Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung führt ($p < 0,05$) und (d) die Inkubationsbedingungen kaum einen Einfluss auf die phylogenetische Zusammensetzung der detektierten Mikroorganismen im Boden nimmt (t_0 vs. Kontrollansatz ohne Regenwurm und 2,4-DCP, $p > 0,05$) (Abbildung 55).

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen aus der Biodiversitätsanalyse und verdeutlichen einen möglichen selektiven Effekt von endogäischen Regenwürmern auf die Biodiversität potentieller 2,4-DCP-assimilierender Bakterien.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales,</i>										
	<i>Aeromonadaceae</i>	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonadales,</i>										
	<i>Moraxellaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	1,1
	<i>Pseudomonadaceae</i>	23,1	5,4	5,6	-	6,6	7,0	12,9	-	11,4	4,6
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>										
	<i>Geobacteraceae</i>	3,0	3,8	-	1,2	-	-	4,2	11,7	4,4	8,1
	<i>Myxococcales,</i>										
	<i>Myxococcaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-
	<i>Polyangiaceae</i>	1,5	2,8	1,5	1,7	7,4	4,0	2,8	2,7	1,0	1,5
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i>										
	<i>Bacillaceae</i>	3,3	5,0	6,0	7,7	-	-	4,4	11,0	10,6	6,7
	<i>Paenibacillaceae</i>	-	-	1,0	1,8	4,7	6,4	-	-	-	-
	<i>Clostridiales,</i>										
	<i>Clostridiaceae</i>	3,4	5,9	38,6	34,5	7,1	4,7	4,5	1,2	8,2	13,6
	<i>Peptococcaceae</i>	-	-	-	-	1,4	1,2	2,1	2,7	-	2,2

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Firmicutes</i>	unclassified <i>Firmicutes</i>	-	-	1,4	3,2	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriales</i> ,										
	<i>Flavobacteriaceae</i>	7,7	10,5	-	-	19,2	11,1	14,9	3,8	9,3	4,7
	<i>Sphingobacteriales</i> ,										
	<i>Cytophagaceae</i>	2,0	1,1	-	-	3,8	2,2	-	-	1,1	-
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	2,6	3,2	-	-	1,3	2,0	-	-	-	-
	unclassified	-	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i> ,										
	<i>Acidobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,9	2,6	1,1	3,2
	<i>Acidobacteria</i> Gp3	1,5	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales</i>										
	<i>Acidimicrobiaceae</i>	-	-	1,5	1,2	-	-	-	1,1	-	-
	<i>Iamiaceae</i>	1,6	1,3	1,0	1,5	2,0	1,5	1,7	2,3	-	-
	unclassified	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	2,7
	<i>Actinomycetales</i> ,										
	<i>Microbacteriaceae</i>	-	-	1,4	1,2	-	-	-	1,3	-	-

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales,</i> <i>Nocardiodaceae</i>	-	-	1,4	1,6	-	-	-	1,2	-	-
	<i>Solirubrobacterales,</i> <i>Solirubrobacteraceae</i>	-	1,1	5,2	4,9	1,1	1,1	2,1	4,2	1,2	1,7
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales</i>										
	<i>Nostocaceae</i>	1,0	-	3,2	2,1	-	-	-	1,1	-	-
	<i>Microchaetaceae</i>	-	-	-	-	1,2	1,6	-	-	-	-
<i>Chloroflexi</i>	unclassified <i>Chloroflexi</i>	1,2	1,3	2,5	3,0	-	-	-	-	-	-
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		6742	9301	7515	12248	12636	18659	8434	11220	16890	19265

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

^b, nächst verwandte Spezies: *Ideonella* sp. OTSz A 277 (FM886860; Sequenzähnlichkeit 97 %)

*, Relative Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken < 1 %

Tabelle 40: Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus 2,4-DCP-unbehandeltem Bodenmaterial und aus Bodenproben nach Inkubation mit [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Bodensäulen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Proteobacteria</i>										
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales,</i>									
	<i>Caulobacteraceae</i>	1,3	1,3	-*	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhizobiales,</i>									
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	-	11,8	9,5	-	-	19,5	19,6	
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	9,9	11,0	-	-	11,5	12,2	-	-	
	<i>Rhodospirillales,</i>									
	<i>Acetobacteraceae</i>	1,3	1,6	1,7	1,5	1,4	1,6	3,2	3,6	
	<i>Rhodospirillaceae</i>	1,8	1,5	1,5	1,4	1,1	1,1	3,1	3,1	
	<i>Sphingomonadales,</i>									
	<i>Sphingomonadaceae</i>	3,9	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales,</i>									
	<i>Comamonadaceae</i>	9,6	6,1	-	-	2,5	1,1	2,9	2,8	
	Incertae sedis ^c	-	-	2,1	1,3	-	-	-	-	
	<i>Nitrosomonadales,</i>									
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	4,5	2,9	1,3	1,1	6,0	1,1	2,3	2,1	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales,</i> <i>Pseudomonadaceae</i>	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i> <i>Desulfuromonadaceae</i>	5,8	-	-	-	-	-	-	1,0	-
	<i>Geobacteraceae</i>	-	8,5	-	-	19,5	10,9	-	-	-
	<i>Myxococcales,</i> <i>Myxococcaceae</i>	2,9	-	5,5	4,0	-	-	-	-	-
	<i>Polyangiaceae</i>	2,3	1,2	1,5	-	-	-	-	4,9	4,4
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i> <i>Bacillaceae</i>	6,5	11,5	6,7	6,6	9,6	12,5	8,2	8,3	
	<i>Paenibacillaceae</i>	-	1,1	1,0	-	-	-	1,7	1,2	
	<i>Clostridiales,</i> <i>Clostridiaceae</i>	10,2	24,8	27,7	36,6	3,6	16,4	-	-	
	<i>Gracilibacteraceae</i>	3,7	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Peptococcaceae</i>	1,7	2,4	11,1	5,4	-	1,4	3,3	3,8	
	<i>Ruminococcaceae</i>	-	-	-	-	3,9	9,3	-	-	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriales</i> , unclassified	-	-	-	-	3,6	-	-	-	
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i> , <i>Acidobacteriaceae</i>	4,0	3,9	2,8	3,3	1,2	-	9,5	10,0	
	<i>Solibacterales</i> , <i>Solibacteraceae</i>	-	-	-	-	1,2	-	-	-	
	unclassified <i>Acidobacteria</i>	-	-	-	-	1,3	1,3	-	-	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales</i> , <i>Acidimicrobiaceae</i>	-	-	-	-	-	1,1	2,2	2,3	
	<i>Iamiaceae</i>	-	-	1,6	2,6	-	-	1,7	1,3	
	<i>Actinomycetales</i> , <i>Actinosynnemataceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,1	-	
	<i>Nocardioideaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,2	1,2	
	<i>Streptosporangiaceae</i>	-	1,0	-	-	-	-	-	-	
	<i>Solirubrobacterales</i> , <i>Solirubrobacteraceae</i>	1,6	1,1	1,2	1,9	-	-	2,4	2,9	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales</i>									
	<i>Nostocaceae</i>	-	-	-	-	1,5	1,0	3,8	3,5	
	<i>Microchaetaceae</i>	-	-	1,8	1,6	-	-	-	-	
	unclassified <i>Bacteria</i>	-	-	-	-	1,0	-	2,3	2,9	
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		8723	7047	6876	6170	5877	5117	21146	15601	

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

^b, feldfrischer Boden vor Inkubation in Bodensäulen

^c, nächst verwandte Spezies: *Rubrivivax gelatinosus* (D16214; Sequenzähnlichkeit 97 %)

*, Relative Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken < 1 %

Tabelle 41: Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Inkubation mit Regenwürmern und [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Bodensäulen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Proteobacteria</i>											
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i> ,										
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-*	-	-	-	-	-	8,5	12,3	-	-
	<i>Rhodobiaceae</i>	7,1	10,2	-	-	10,9	14,5	-	-	7,0	12,1
	<i>Xanthobacteraceae</i>	-	-	10,2	15,0	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhodospirillales</i> ,										
	<i>Acetobacteraceae</i>	1,4	1,7	2,1	2,3	2,1	2,4	2,0	3,1	1,6	1,9
	<i>Rhodospirillaceae</i>	2,0	1,8	3,1	2,2	1,6	2,7	2,1	2,9	-	-
	unclassified <i>Alphaproteobacteria</i>	-	-	-	-	-	1,1	-	-	1,4	2,6
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i> ,										
	<i>Comamonadaceae</i>	19,6	16,2	-	-	6,7	10,5	8,7	8,6	18,3	8,1
	<i>Nitrosomonadales</i> ,										
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	1,7	1,5	-	-	2,8	5,1	2,5	1,7	-	2,2
	<i>Rhodocyclales</i>										
	<i>Rhodocyclaceae</i>	1,1	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales,</i>										
	<i>Aeromonadaceae</i>	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonadales,</i>										
	<i>Moraxellaceae</i>	1,4	2,5	-	-	-	-	-	-	3,8	1,6
	<i>Pseudomonadaceae</i>	19,9	3,2	5,6	-	7,5	7,4	12,9	-	11,5	4,9
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>										
	<i>Geobacteraceae</i>	3,3	4,4	-	-	-	-	4,6	11,8	4,1	8,6
	<i>Myxococcales,</i>										
	<i>Myxococcaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-
	<i>Polyangiaceae</i>	1,6	1,9	1,4	1,1	6,5	3,2	-	-	-	1,8
	<i>Sandaracinaceae</i>	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-
	unclassified	-	-	-	-	-	-	2,9	2,3	-	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i>										
	<i>Bacillaceae</i>	2,8	4,7	6,4	7,4	3,2	5,1	4,2	9,6	9,6	6,0
	<i>Paenibacillaceae</i>	-	-	-	1,7	-	1,0	-	-	-	-
	<i>Clostridiales,</i>										
	<i>Clostridiaceae</i>	3,3	5,7	37,0	34,4	6,3	3,0	3,8	-	5,5	6,7

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiales,</i>										
	<i>Lachnospiraceae</i>	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-
	<i>Peptococcaceae</i>	1,1	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ruminococcaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriales,</i>										
	<i>Flavobacteriaceae</i>	7,0	7,3	-	-	16,9	9,4	11,5	2,5	8,2	3,8
	<i>Sphingobacteriales,</i>										
	<i>Cytophagaceae</i>	1,0	-	-	-	2,2	1,3	-	-	-	-
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	1,2	1,8	-	-	1,1	-	-	-	-	-
	unclassified	-	3,2	-	-	1,3	1,9	-	-	-	-
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales,</i>										
	<i>Acidobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	1,2
	<i>Solibacterales,</i>										
	<i>Solibacteraceae</i>	1,1	2,1	-	-	1,1	-	-	-	-	1,9
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales,</i>										
<i>Acidimicrobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	2,2	3,0	-	-	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial										
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>										
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales,</i>											
	<i>Iamiaceae</i>	-	-	1,2	1,3	-	-	-	2,3	-	-	
	unclassified	-	-	-	-	1,6	-	-	-	1,6	2,5	
	<i>Actinomycetales,</i>											
	<i>Nakamurellaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	
	<i>Nocardioideaceae</i>	-	-	1,6	2,1	-	-	-	1,1	-	-	
	<i>Thermomonosporaceae</i>	-	-	1,8	1,6	-	-	-	-	-	-	
	<i>Gaiellales,</i>											
	<i>Gaiellaceae</i>	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Solirubrobacterales,</i>											
<i>Solirubrobacteraceae</i>	1,6	1,6	4,7	4,8	1,7	1,7	-	-	-	-		
unclassified <i>Actinobacteria</i>	-	-	1,4	1,5	-	-	2,4	3,8	1,6	2,5		
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales</i>											
	<i>Nostocaceae</i>	-	1,1	1,9	1,6	-	1,5	-	1,0	-	-	
<i>Tenericutes</i>	" <i>Candidatus Lumbricincola</i> " ^b	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
	unclassified <i>Bacteria</i>	-	-	2,8	3,1	1,7	1,5	1,7	3,4	1,7	2,0
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		4310	6290	5980	11127	8048	15095	5750	9200	12850	14129

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

^b, Bezeichnung ist laut „List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature“ (Euzéby, 2010) nicht valide.

*, Relative Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken < 1 %

Tabelle 42: Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus 2,4-DCP-unbehandeltem Bodenmaterial und aus Bodenproben nach Inkubation mit [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Bodensäulen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Proteobacteria</i>										
<i>Alphaproteobacteria</i>										
	<i>Caulobacteriales,</i>									
	<i>Caulobacteraceae</i>	1,3	1,1	-*	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhizobiales,</i>									
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	10,1	-	-	-	-	19,3	18,9	
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	-	-	11,2	11,9	-	-	-	-	
	<i>Rhodospirillales,</i>									
	<i>Acetobacteraceae</i>	1,0	1,4	2,5	1,7	1,2	1,3	3,1	3,2	
	<i>Rhodospirillaceae</i>	2,2	1,6	1,4	2,0	-	1,6	3,8	2,9	
	<i>Sphingomonadales,</i>									
	<i>Sphingomonadaceae</i>	4,0	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Betaproteobacteria</i>										
	<i>Burkholderiales,</i>									
	<i>Comamonadaceae</i>	-	5,8	-	-	3,3	-	-	-	
	Incertae sedis	8,8 ^c	-	2,2 ^d	-	-	-	3,0 ^e	3,3	

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C		
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadales,</i> <i>Nitrosomonadaceae</i>	5,6	4,2	2,5	1,7	7,9		1,4		2,9	2,7
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales,</i> <i>Pseudomonadaceae</i>	1,2	-	-	-	-		-		-	-
	<i>Xanthomonadales,</i> <i>Xanthomonadaceae</i>	-	-	-	-	-		-		1,1	-
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i> <i>Desulfuromonadaceae</i>	-	-	-	-	-		-		1,1	1,1
	<i>Geobacteraceae</i>	3,9	6,1	-	-	17,9		4,9		-	-
	<i>Myxococcales,</i> <i>Cystobacteraceae</i>	1,1	-	4,2	4,1	-		-		-	-
	<i>Kofleriaceae</i>	1,3	-	-	-	-		-		1,3	-
	<i>Myxococcaceae</i>	1,5	2,7	-	-	-		-		-	-
	<i>Polyangiaceae</i>	2,7	-	2,1	1,6	-		-		4,4	4,5
	unclassified <i>Deltaproteobacteria</i>		-	-	-	-	-		-		1,2

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Bodensäulenmaterial								
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	- <i>Aporrectodea caliginosa</i>								
		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)		t ₀ ^b
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	ohne 2,4-DCP	ohne 2,4-DCP	¹³ C	¹² C	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales</i> ,									
	<i>Acidimicrobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,5	1,7	
	unclassified	1,1	-	1,5	-	-	-	1,8	1,3	
	<i>Actinomycetales</i> ,									
	<i>Micromonosporaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,0	-	
	<i>Nocardioideaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,3	
	<i>Streptosporangiaceae</i>	-	1,5	-	-	-	-	-	-	
	<i>Solirubrobacterales</i> ,									
	<i>Conexibacteraceae</i>	-	1,2	-	-	-	-	-	-	
	<i>Solirubrobacteraceae</i>	-	-	2,3	2,8	-	-	2,4	4,1	
	unclassified <i>Actinobacteria</i>	2,2	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales</i> ,									
	<i>Nostocaceae</i>	-	1,0	1,6	1,3	-	-	3,6	2,9	
unclassified <i>Bacteria</i>		2,3	2,5	1,9	2,0	-	1,3	3,5	4,0	
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		8204	6728	4375	5275	5035	5288	9843	17121	

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

^b, feldfrischer Boden vor Inkubation in Bodensäulen

^c, nächst verwandte Spezies: *Leptothrix* sp. FC118 (JQ946030; Sequenzähnlichkeit 98 %)

^d, nächst verwandte Spezies: *Methylidium petroleiphilum* PM1 (CP000555; Sequenzähnlichkeit 99 %)

^e, nächst verwandte Spezies: *Rubrivivax* sp. JA309 (FN995214; Sequenzähnlichkeit 95 %)

*, Relative Häufigkeit in den Amplikon-Genbibliotheken < 1 %

Nach 50-tägiger Inkubation in Mikrokosmen und einem Gesamt-2,4-DCP-Verbrauch von 300 bis 425 µg pro Gramm Frischgewicht wurden insgesamt 49 metabolisch aktive Familien in Drilosphären- und Bodenproben nachgewiesen und den *Proteobacteria* (ø 59,2 %, 41 - 82 %), *Firmicutes* (ø 12,6 %, 4,8 - 21,3 %), *Bacteroidetes* (ø 2,1 %, 0 - 16,8 %), *Acidobacteria* (ø 5,4 %, 0 - 29,5 %), *Actinobacteria* (ø 2,7 %, 0 - 9,6 %), *Cyanobacteria* (ø 0,73 %, 0 - 2,7 %) und *Chloroflexi* (ø 0,25 %, 0 - 1,9 %) zugeordnet sowie als nicht-klassifizierte *Bacteria* (ø 1,49 %, 0 - 4,1 %) bezeichnet (Tabelle 43 bis Tabelle 46). Die Drilosphärenproben wurden von Familien aus den Phyla der *Proteobacteria* (*Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhodobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*), *Firmicutes* (*Clostridiaceae*) sowie *Bacteroidetes* (*Flavobacteriaceae*) dominiert (Tabelle 43, Tabelle 45). In Bodenproben aus Regenwurm-behandelten Bodensäulen wurden vor allem Bakterien der Familien *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhodobiaceae*, *Sphingomonadaceae* sowie *Comamonadaceae* angereichert. Die höchsten relativen Abundanzen in Bodenproben ohne Regenwurmvorbehandlung wiesen Familien aus den Subphyla der *Alpha*-, *Beta*- und *Deltaproteobacteria* (*Sphingomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Geobacteraceae*) auf sowie Familien, die den *Clostridiaceae* und *Holophagaceae* zugeordnet wurden (Tabelle 44, Tabelle 46).

Statistische Analysen der Amplikon-Genbibliotheken mit Hilfe der nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS) sowie der nicht-parametrischen multivariaten Varianzanalyse (NPMANOVA) basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex zeigten, ähnlich wie für die Bodensäulendaten, dass (a) die erhaltenen Datensätze aus der vorwärts- und rückwärtsgerichteten Sequenzanalyse keine signifikanten Unterschiede aufweisen ($p > 0,05$) und (b) sich Drilosphären- und Regenwurm-vorbehandelte Bodenproben in ihrer phylogenetischen Zusammensetzung signifikant von Regenwurm-unbehandelten Bodenproben unterscheiden ($p < 0,05$) (Abbildung 56). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich die phylogenetische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Darminhalt signifikant von den restlichen untersuchten Proben unterscheidet ($p < 0,05$) (Abbildung 56).

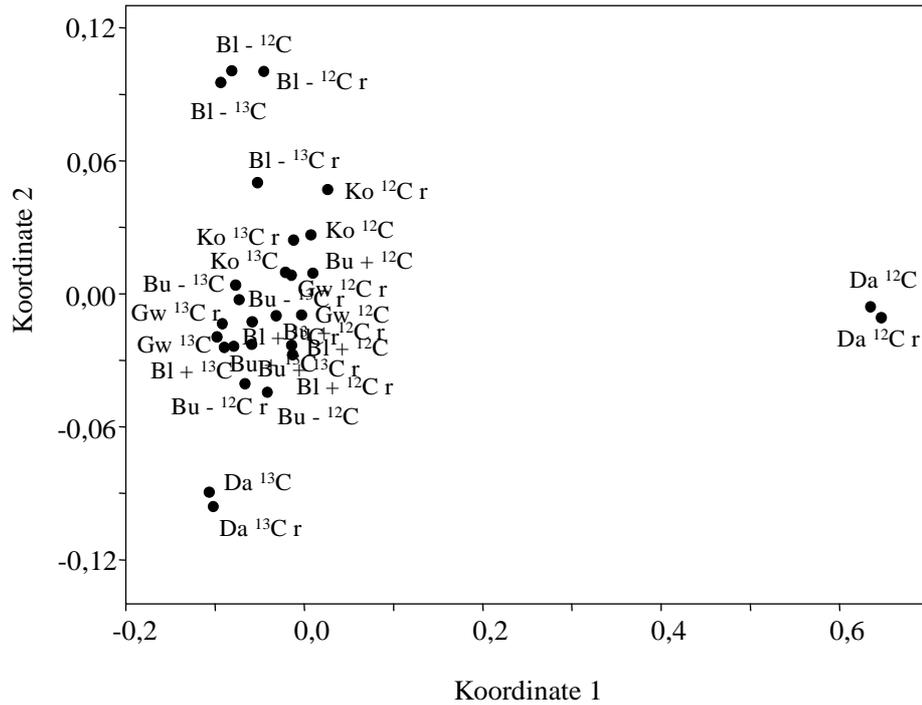


Abbildung 56: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) des nach Erstellen von Amplikon-Genbibliotheken erhaltenen 16S rRNA-Datensatzes nach Mikrokosmeninkubation basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,2079. Abkürzungen: Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern; -, Bodensäuleninkubation ohne Regenwürmer; 12C, Inkubation mit [^{12}C]-2,4-DCP; 13C, Inkubation mit [^{13}C]-2,4-DCP. Daten der Rückwärtsanalyse sind mit einem „r“ gekennzeichnet.

Tabelle 43: Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Vorinkubation mit Regenwürmern und [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Proteobacteria</i>											
<i>Alphaproteobacteria</i>											
	<i>Caulobacterales,</i>										
	<i>Caulobacteraceae</i>	2,8	2,5	-*	-	1,8	2,2	2,4	2,1	2,4	3,4
	<i>Rhizobiales,</i>										
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	16,2	18,6	1,8	4,1
	<i>Methylobacteriaceae</i>	-	-	-	6,4	-	-	-	-	-	-
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	-	-	-	-	21,2	18,9	-	-	-	-
	<i>Rhodobiaceae</i>	6,3	18,3	1,5	1,5	-	-	-	-	14,1	17,3
	unclassified	-	-	-	-	-	-	9,5	8,9	-	-
	<i>Rhodospirillales,</i>										
	<i>Acetobacteraceae</i>	2,6	3,2	-	-	2,5	3,1	1,6	2,4	3,9	2,9
	<i>Rhodospirillaceae</i>	1,3	2,3	-	-	2,0	3,1	2,4	2,3	-	-
	<i>Sphingomonadales,</i>										
	<i>Sphingomonadaceae</i>	26,5	4,8	-	-	3,7	1,7	8,8	3,5	17,9	3,3

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales,</i>										
	<i>Alcaligenaceae</i>	-	-	-	8,6	-	-	-	-	-	-
	<i>Burkholderiaceae</i>	-	-	-	3,8	-	-	-	-	-	-
	<i>Comamonadaceae</i>	23,7	8,2	70,4	-	16,6	9,9	22,5	13,0	25,8	11,8
	<i>Oxalobacteraceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,0	2,6	-	-
	<i>Nitrosomonadales,</i>										
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	-	-	-	-	1,3	2,3	-	-	1,8	2,0
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales,</i>										
	<i>Rhodocyclaceae</i>	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonadales,</i>										
<i>Moraxellaceae</i>	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	2,9	
<i>Pseudomonadaceae</i>	5,4	2,4	8,9	35,2	1,8	5,1	-	5,1	-	4,0	
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>										
	<i>Geobacteraceae</i>	-	1,3	1,2	-	-	-	1,6	1,4	-	1,6
	<i>Pelobacteraceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales,</i> <i>Polyangiaceae</i>	-	1,0	-	-	1,5	1,4	1,0	1,2	-	1,2
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i> <i>Bacillaceae</i>	3,1	9,0	1,7	1,4	8,0	8,0	6,9	10,3	4,0	5,6
	<i>Paenibacillaceae</i>	-	1,3	-	2,5	1,3	1,6	-	1,0	-	1,4
	<i>Clostridiales,</i> <i>Clostridiaceae</i>	2,3	9,8	3,2	11,0	6,7	11,7	2,0	8,3	1,4	6,0
	<i>Peptococcaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	1,9
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriales,</i> <i>Flavobacteriaceae</i>	-	1,9	-	16,8	1,9	2,1	-	1,7	-	-
	<i>Sphingobacteriales,</i> <i>Cytophagaceae</i>	-	-	-	-	1,7	-	1,2	-	-	-
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales,</i> <i>Acidobacteriaceae</i>	-	1,0	-	-	1,0	2,5	1,0	3,2	1,4	3,3
	<i>Holophagales,</i> <i>Holophagaceae</i>	9,1	4,1	-	-	-	-	3,7	-	5,9	6,6

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacterales</i> , <i>Solibacteraceae</i>	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales</i> , <i>Iamiaceae</i>	-	1,8	-	-	-	-	2,4	2,3	2,1	2,2
	unclassified	-	-	-	-	2,2	1,9	1,5	1,1	-	-
	<i>Actinomycetales</i> , <i>Microbacteriaceae</i>	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-
	<i>Solirubrobacterales</i> , <i>Solirubrobacteraceae</i>	-	1,4	-	-	1,4	1,5	2,3	1,8	2,0	1,8
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales</i> , <i>Nostocaceae</i>	-	2,7	-	-	1,3	1,7	1,1	1,7	-	1,3
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineales</i> , <i>Anaerolineaceae</i>	-	-	-	-	1,6	1,9	-	-	-	-
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		7836	7332	22636	18443	13124	9442	4903	3696	8526	8922

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

*, Relative Häufigkeit in Amplikon-Genbibliothek < 1 %

Tabelle 44: Phylogenetische Zuordnung vorwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Regenwurm-unbehandelten Bodenproben nach Inkubation mit [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial			
		- <i>Aporrectodea caliginosa</i>			
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Proteobacteria</i>					
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteriales,</i>				
	<i>Caulobacteraceae</i>	1,2	1,5	1,9	1,7
	<i>Rhizobiales,</i>				
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	-*	-	7,6	6,4
	<i>Rhodobiaceae</i>	3,8	6,8	-	-
	<i>Rhodospirillales,</i>				
	<i>Acetobacteraceae</i>	1,7	2,0	2,5	2,6
	<i>Rhodospirillaceae</i>	-	2,9	1,7	1,7
	<i>Sphingomonadales,</i>				
	<i>Sphingomonadaceae</i>	29,5	-	19,1	15,6
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales,</i>				
	<i>Burkholderiaceae</i>	1,2	1,6	12,5	10,4
	<i>Comamonadaceae</i>	24,1	18,1	-	-
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales,</i>				
	<i>Pseudomonadaceae</i>	-	1,8	-	2,0
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>				
	<i>Geobacteraceae</i>	8,3	3,6	15,5	7,6
	<i>Myxococcales,</i>				
	<i>Cystobacteraceae</i>	1,2	1,7	-	-
	<i>Myxococcaceae</i>	-	-	1,9	2,2
	<i>Polyangiaceae</i>	-	1,0	-	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i>				
	<i>Bacillaceae</i>	2,7	7,5	2,2	2,3
	<i>Clostridiales,</i>				
	<i>Clostridiaceae</i>	5,5	3,5	11,1	18,6
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriales,</i>				
	<i>Cytophagaceae</i>	1,2	-	-	-
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	-	1,2	-	1,5

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial			
		- <i>Aporrectodea caliginosa</i>			
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales,</i> <i>Acidobacteriaceae</i>	3,8	4,0	3,7	5,7
	<i>Holophagales,</i> <i>Holophagaceae</i>	-	25,5	-	-
<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacterales,</i> <i>Solirubrobacteraceae</i>	-	1,4	-	-
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales,</i> <i>Microchaetaceae</i>	-	-	-	1,3
	<i>Nostocaceae</i>	-	1,1	-	-
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		8601	6491	12514	7396

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

*, Relative Häufigkeit in Amplikon-Genbibliothek < 1 %.

Tabelle 45: Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Drilosphären- und Bodenmaterial nach Vorinkubation mit Regenwürmern und [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Proteobacteria</i>											
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i> ,										
	<i>Caulobacteraceae</i>	1,9	1,9	-*	-	1,7	2,4	-	1,7	2,1	3,0
	<i>Rhizobiales</i> ,										
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,4	1,8	-	-
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	-	-	-	19,2	18,4	-	-	-	-
	<i>Methylobacteriaceae</i>	-	-	-	6,9	-	-	-	-	-	-
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	5,4	16,3	-	-	-	-	16,6	17,1	-	-
	<i>Rhodobiaceae</i>	-	-	1,7	1,6	-	-	-	-	14,0	15,5
	<i>Rhodospirillales</i> ,										
	<i>Acetobacteraceae</i>	2,0	3,0	-	-	2,3	2,9	1,9	2,6	3,2	3,0
	<i>Rhodospirillaceae</i>	1,1	2,3	-	-	2,7	3,5	3,1	3,1	1,8	4,7
	unclassified	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-
	<i>Sphingomonadales</i> ,										
	<i>Sphingomonadaceae</i>	19,7	3,4	-	-	2,7	1,7	4,6	1,9	14,4	1,9

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales,</i>										
	<i>Alcaligenaceae</i>	-	-	-	7,2	-	-	-	-	-	-
	<i>Burkholderiaceae</i>	-	4,1	-	4,6	-	-	-	-	2,7	2,1
	<i>Comamonadaceae</i>	29,2	10,7	66,0	-	17,6	8,9	24,9	19,4	25,5	11,6
	<i>Nitrosomonadales,</i>										
<i>Nitrosomonadaceae</i>	1,8	-	-	-	2,1	3,3	-	-	-	-	
	<i>Rhodocyclales,</i>										
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales,</i>										
	<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonadales,</i>										
	<i>Moraxellaceae</i>	1,1	1,7	-	-	-	-	-	-	-	3,4
	<i>Pseudomonadaceae</i>	6,5	2,9	13,1	38,1	1,4	5,0	-	3,7	-	3,4
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>										
	<i>Desulfuromonadaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
	<i>Geobacteraceae</i>	-	1,4	-	-	1,3	-	2,3	1,3	-	1,5
	<i>Pelobacteraceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,5	1,6	-	-

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Acidobacteria</i>	<i>Holophagales,</i>										
	<i>Holophagaceae</i>	9,5	4,2	-	-	-	-	3,3	-	6,4	6,6
	<i>Solibacterales,</i>										
	<i>Solibacteraceae</i>	-	-	-	-	-	-	1,2	2,3	-	1,4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales,</i>										
	<i>Iamiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	2,2	2,4	2,1	2,2
	unclassified	-	2,4	-	-	2,6	2,5	1,0	-	-	-
	<i>Actinomycetales,</i>										
	<i>Microbacteriaceae</i>	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-
	<i>Solirubrobacterales,</i>										
	<i>Solirubrobacteraceae</i>	-	1,8	-	-	-	-	2,9	2,0	2,0	1,8
	<i>Thermoleophilales,</i>										
	<i>Thermoleophilaceae</i>	-	-	-	-	2,3	2,4	-	-	-	-
	unclassified <i>Actinobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	5,6
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales,</i>										
	<i>Nostocaceae</i>	-	1,5	-	-	1,4	1,7	-	1,1	-	1,1

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial									
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	+ <i>Aporrectodea caliginosa</i>									
		Gangwände		Darminhalt		Kotkrümel		Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
	unclassified <i>Bacteria</i>	-	1,5	-	-	2,3	2,8	2,0	1,3	2,1	2,2
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		6449	6088	9714	13517	14930	9512	2808	2067	4489	5221

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

*, Relative Häufigkeit in Amplikon-Genbibliothek < 1 %.

Tabelle 46: Phylogenetische Zuordnung rückwärtsgerichteter 16S rRNA cDNA Sequenzen aus Regenwurm-unbehandelten Bodenproben nach Inkubation mit [¹³C]- bzw. [¹²C]-2,4-DCP in Mikrokosmen.

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial			
		- <i>Aporrectodea caliginosa</i>			
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Proteobacteria</i>					
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteriales,</i>				
	<i>Caulobacteraceae</i>	-*	1,7	2,1	3,0
	<i>Rhizobiales,</i>				
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	3,5	6,0	-	-
	<i>Rhizobiaceae</i>	-	-	7,4	6,2
	<i>Rhodospirillales,</i>				
	<i>Acetobacteraceae</i>	1,8	1,4	2,5	1,8
	<i>Rhodospirillaceae</i>	1,1	3,8	3,2	2,9
	<i>Sphingomonadales,</i>				
	<i>Sphingomonadaceae</i>	26,7	-	12,7	8,6
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales,</i>				
	<i>Comamonadaceae</i>	32,1	26,2	9,3	7,5
	<i>Oxalobacteraceae</i>	1,7	1,9	-	-
	<i>Nitrosomonadales,</i>				
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	-	-	8,3	5,1
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales,</i>				
	<i>Pseudomonadaceae</i>	-	2,3	1,3	2,4
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales,</i>				
	<i>Geobacteraceae</i>	7,2	4,4	16,5	11,6
	<i>Myxococcales,</i>				
	<i>Myxococcaceae</i>	1,0	1,5	-	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales,</i>				
	<i>Bacillaceae</i>	3,2	8,2	3,1	2,1
	<i>Clostridiales,</i>				
	<i>Clostridiaceae</i>	4,0	2,3	9,5	14,3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriales,</i>				
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	-	-	-	1,6
	unclassified <i>Bacteroidetes</i>	-	-	-	5,8

Phylogenetische Zuordnung ^a		Relative Häufigkeit von Sequenzen (%) in Mikrokosmenmaterial			
		- <i>Aporrectodea caliginosa</i>			
Phylum, Subphylum	Ordnung, Familie	Boden (0-5 cm)		Boden (5-10 cm)	
		¹³ C	¹² C	¹³ C	¹² C
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales,</i> <i>Acidobacteriaceae</i>	1,4	1,6	1,1	-
	<i>Holophagales,</i> <i>Holophagaceae</i>	-	16,7	-	-
	<i>Solibacterales,</i> <i>Solibacteraceae</i>	1,8	1,3	-	-
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocales,</i> <i>Nostocaceae</i>	-	1,5	-	-
unclassified <i>Bacteria</i>		-	-	2,6	4,1
Anzahl Sequenzen in der Amplikon-Genbibliothek		3710	2882	6154	3004

^a, die Zuordnung zu phylogenetischen Taxa erfolgte mit Hilfe von BLASTn (Zhang *et al.*, 2000).

* , Relative Häufigkeit in Amplikon-Genbibliothek < 1 %.

3.4.8.3.2. Identifizierung von aktiven 2,4-DCP-[¹³C]-assimilierenden *Bacteria*

Aktive 2,4-DCP-[¹³C]-assimilierende Mikroorganismen wurden mit Hilfe des so genannten „CAP-SIP Ansatzes“ („Comparative Amplicon Pyrosequencing based Stable Isotope Probing“, Dallinger & Horn, 2014) identifiziert. Diese vergleichende Methodik wurde für umfangreiche Datensätze entwickelt und stellt eine Optimierung bisher angewandter SIP-Strategien (Liu *et al.*, 2011b; Lüders *et al.*, 2004; Pilloni *et al.*, 2011) dar. Anstelle klassischer Fingerprint-Methoden wurden dafür in der vorliegenden Arbeit die *in silico* vereinigten, „schweren“ Fraktionen von ¹³C- und ¹²C-Behandlungen zu Beginn sowie am Ende der Inkubation zur Identifikation aktiver 2,4-DCP- [¹³C]-assimilierender Bakterien herangezogen. Ein Vergleich der relativen Häufigkeiten detektierter OTUs in den Amplikon-Genbibliotheken der „schweren“ Fraktionen von ¹³C- und ¹²C-Proben zum Zeitpunkt t_0 (Inkubationsbeginn mit feldfrischem Boden) zeigte eine durchschnittliche Differenz (\pm Standardabweichung) von $0,34 \pm 0,28$ Prozentpunkten (vorwärts) bzw. $0,41 \pm 0,36$ Prozentpunkte (rückwärts) (Abbildung 57). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die von außen erfolgten Eingriffe, z.B. aufgrund der Fraktionierung oder Pyrosequenzierung, nur einen minimalen Effekt hatten und somit für die weiteren Analysen vernachlässigbar sind.

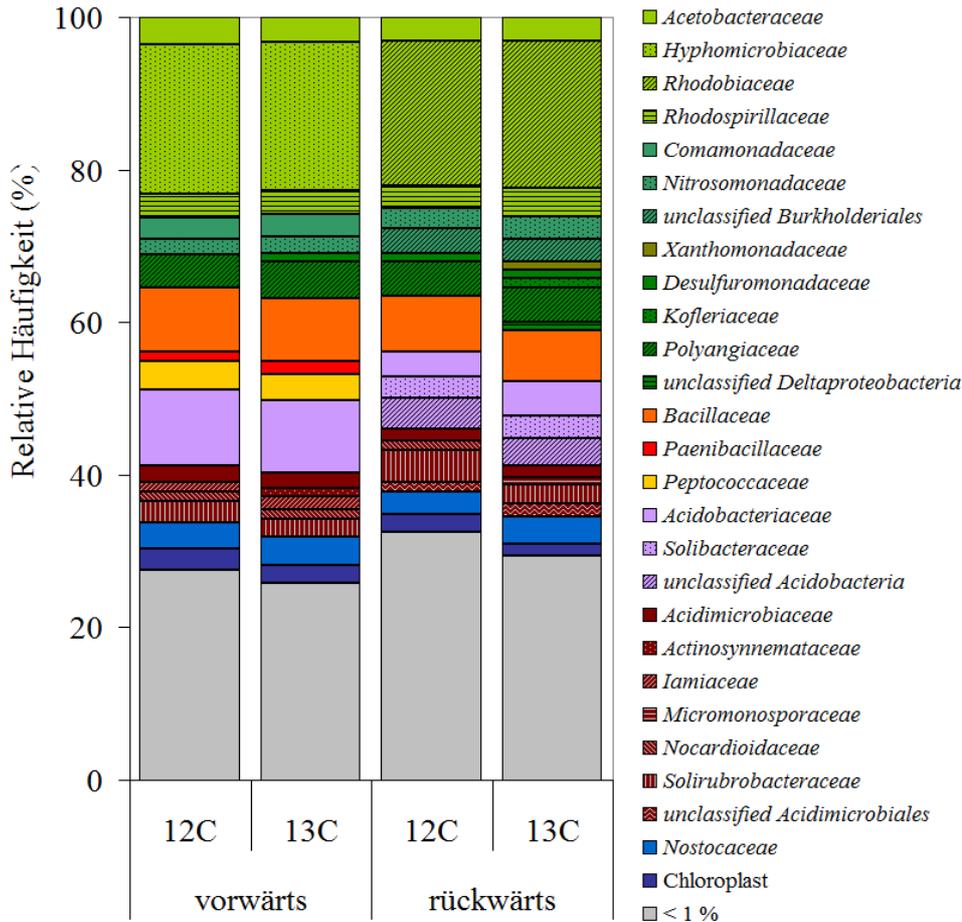


Abbildung 57: Relative Häufigkeiten von OTUs auf Familien-Ebene in den vereinigten „schweren“ Fraktionen von ^{13}C - und ^{12}C -Proben zum Zeitpunkt t_0 (feldfrischer Boden vor Bodensäuleninkubation) nach Analyse der vorwärts- und rückwärtsgerichteten 16S rRNA Sequenzen. Die Zuordnung in ein OTU basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 87,7 %. 13C, Inkubation mit [^{13}C]-2,4-DCP; 12C, Inkubation mit [^{12}C]-2,4-DCP.

Anhand der festgelegten Kriterien (vgl. 2.6.5.) wurden nach Inkubation in Bodensäulen und Mikrokosmen 18 OTUs auf Familien-Ebene als ^{13}C -markiert betrachtet und somit als aktive 2,4-DCP- [^{13}C] Verwerter identifiziert (Abbildung 58, Abbildung 59). Die große Anzahl der detektierten Familien weist dabei auf eine hohe Diversität der am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Bakterien hin.

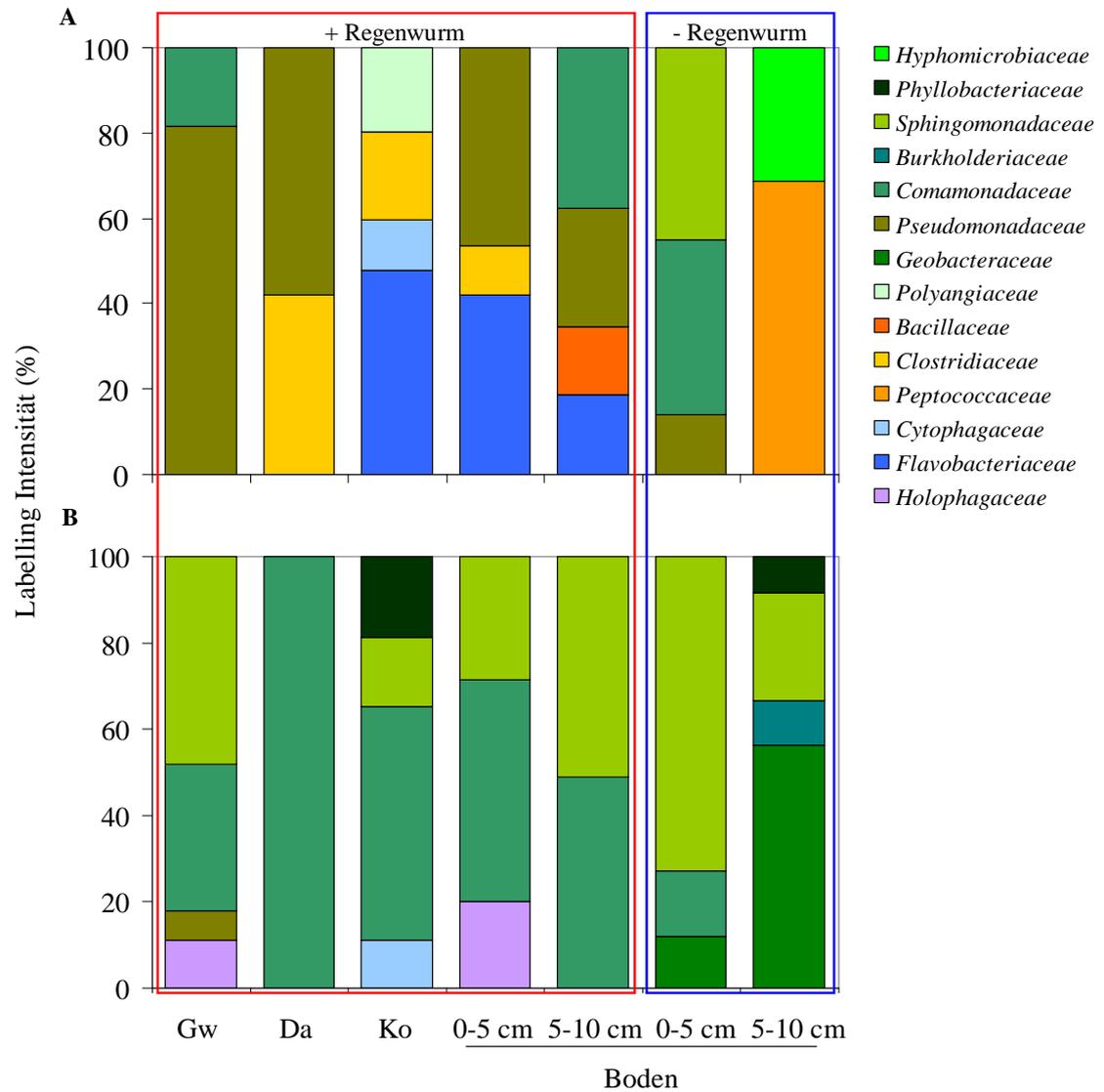


Abbildung 58: Labelling Intensität der ^{13}C -markierten Taxa in den „schweren“ Fraktionen aus (A) Bodensäulen und (B) Mikrokosmen nach vergleichender Analyse der vorwärtsgerichteten 16S rRNA Teilsequenzen. Abkürzungen: Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Ko, Kotkrümel.

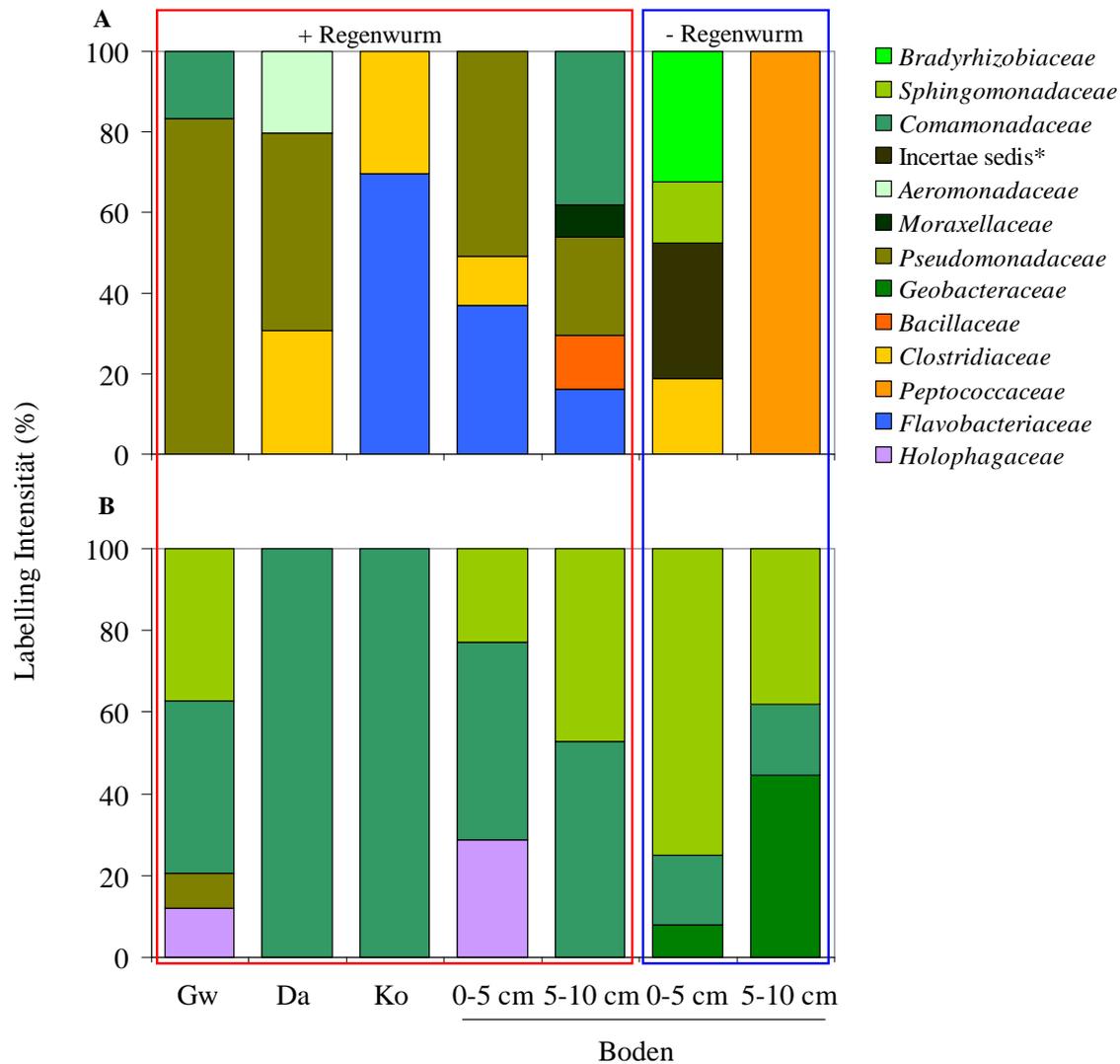


Abbildung 59: Labelling Intensität der ^{13}C -markierten Taxa in den „schweren“ Fraktionen aus (A) Bodensäulen und (B) Mikrokosmen nach vergleichender Analyse der rückwärtsgerichteten 16S rRNA Teilsequenzen. Abkürzungen: Gw, Gangwände; Da, Darminhalt; Ko, Kotkrümel. *, nächst verwandte Spezies: *Leptothrix* sp. FC118 (JQ946030; Sequenzähnlichkeit 98 %)

Sequenzähnlichkeiten von ^{13}C -markierten repräsentativen 16S rRNA Teilsequenzen zu bekannten kultivierten Mikroorganismen lagen im Bereich von 90 % bis 100 % (Tabelle 47, Tabelle 48), was daraufhin deutet, dass sowohl bekannte als auch bisher unbekannte Bakterien 2,4-DCP-Kohlenstoff assimilierten und damit zum Abbau von 2,4-DCP in Bodensäulen und Mikrokosmen beitrugen.

Tabelle 47: Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge repräsentativer, vorwärtsgerichteter 16S rRNA Fragmente aus cDNA nach CAP-SIP mit [¹³C]-2,4-DCP. Die aufgeführten Sequenzen zeigen die aktiv am Abbau von [¹³C]-2,4-DCP beteiligten Mikroorganismen. Die Zuordnung basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 87,7 % (Familienebene).

Repräsentative Sequenz ^a	Länge (bp)	Nächster kultivierter Mikroorganismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
Gangwände			
Bw BoS 1	535	<i>Polaromonas</i> sp. (JX950032)	98
Bw BoS 2	547	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Bw MK 1	545	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	98
Bw MK 2	545	<i>Geothrix fermentans</i> (NR036779)	91
Bw MK 3	537	<i>Variovorax</i> sp. (JQ977443)	97
Bw MK 4	545	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ164217)	94
Darminhalt			
Gut BoS 1	545	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	98
Gut BoS 2	559	<i>Clostridium</i> sp. (JX575132)	94
Gut MK 1	595	<i>Comamonas</i> sp. (JF928565)	99
Kotkrümmel			
Cast BoS 1	538	<i>Clostridium frigidicarnis</i> (AB610573)	100
Cast BoS 2	544	<i>Chondromyces lanuginosus</i> (FJ176774)	90
Cast BoS 3	536	<i>Flavobacterium</i> sp. (HM149209)	98
Cast BoS 4	539	<i>Adhaeribacter terreus</i> (AB682158)	91
Cast MK 1	552	<i>Mesorhizobium</i> sp. (FJ959375)	99
Cast MK 2	551	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	93
Cast MK 3	542	<i>Comamonas</i> sp. (JF722672)	92
Cast MK 4	522	<i>Sporocytophaga</i> sp. (FJ372724)	93
Boden mit RW-Behandlung			
Bu ++ BoS 1	544	<i>Pseudomonas</i> sp. (HF678957)	98
Bu ++ BoS 2	547	<i>Clostridium</i> sp. (AY949856)	100
Bu ++ BoS 3	535	<i>Flavobacterium</i> sp. (HM113609)	95
Bu ++ MK 1	516	<i>Geothrix fermentans</i> (NR036779)	98
Bu ++ MK 2	522	<i>Variovorax</i> sp. (KC294017)	99
Bu ++ MK 3	537	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99

Repräsentative Sequenz ^a	Länge (bp)	Nächster kultivierter Mikroorganismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
Boden mit RW-Behandlung			
Bl +/- BoS 1	553	<i>Bacillus</i> sp. (EU372969)	95
Bl +/- BoS 2	538	<i>Ideonella</i> sp. (FM886860)	97
Bl +/- BoS 3	544	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Bl +/- BoS 4	533	<i>Flavobacterium</i> sp. (EF523606)	95
Bl +/- MK 1	532	<i>Polaromonas</i> sp. (JX950032)	97
Bl +/- MK 2	553	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99
Boden ohne RW-Behandlung			
Bu +/- BoS 1	548	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	94
Bu +/- BoS 2	533	<i>Polaromonas</i> sp. (JX950032)	98
Bu +/- BoS 3	544	<i>Pseudomonas migulae</i> (AF501370)	93
Bu +/- MK 1	545	<i>Polaromonas</i> sp. (JX950032)	99
Bu +/- MK 2	564	<i>Geobacter bemidjiensis</i> (NR075007)	93
Bu +/- MK 3	558	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	92
Bl +/- BoS 1	550	<i>Hyphomicrobium</i> sp. (AB552869)	92
Bl +/- BoS 2	553	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (NR041320)	91
Bl +/- MK 1	558	<i>Mesorhizobium thioganicum</i> (AB675379)	98
Bl +/- MK 2	557	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	95
Bl +/- MK 3	563	<i>Geobacter bemidjiensis</i> (NR075007)	98
Bl +/- MK 4	540	<i>Burkholderia</i> sp. (AJ011508)	96

^a, Abkürzungen: Bw, Gangwände; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); BoS, Bodensäulen-Material; MK, Mikrokosmen-Material; RW, Regenwürmer; +/+, Inkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; +/-, Inkubation nur mit 2,4-DCP

^b, Sequenzähnlichkeit basiert auf BLAST-Analyse

Tabelle 48: Phylogenetische Zuordnung und Sequenzlänge repräsentativer, rückwärtsgerichteter 16S rRNA Fragmente aus cDNA nach CAP-SIP mit [¹³C]-2,4-DCP. Die aufgeführten Sequenzen zeigen die aktiv am Abbau von [¹³C]-2,4-DCP beteiligten Bakterien. Die Zuordnung basiert auf einer Sequenzähnlichkeit von 87,7 % (Familienebene).

Repräsentative Sequenz ^a	Länge (bp)	Nächster kultivierter Mikroorganismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
Gangwände			
Bw BoS 1	541	<i>Polaromonas</i> sp. (JX950032)	92
Bw BoS 2	555	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Bw MK 1	552	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Bw MK 2	543	<i>Methylibium</i> sp. (JQ977655)	96
Bw MK 3	534	<i>Geothrix fermentans</i> (NR036779)	98
Bw MK 4	555	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	96
Darminhalt			
Gut BoS 1	543	<i>Clostridium</i> sp. (KC762211)	99
Gut BoS 2	557	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Gut BoS 3	554	<i>Aeromonas hydrophila</i> (EU700096)	94
Gut MK 1	533	<i>Comamonas</i> sp. (928559)	100
Kotkrümmel			
Cast BoS 1	532	<i>Clostridium</i> sp. (Y15985)	99
Cast BoS 2	539	<i>Flavobacterium</i> sp. (HM149209)	99
Cast MK 1	588	<i>Variovorax</i> sp. (JQ977660)	100
Boden mit RW-Behandlung			
Bu ++ BoS 1	544	<i>Clostridium</i> sp. (GQ906581)	99
Bu ++ BoS 2	552	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	98
Bu ++ BoS 3	524	<i>Flavobacterium</i> sp. (EU109724)	99
Bu ++ MK 1	535	<i>Geothrix fermentans</i> (NR036779)	98
Bu ++ MK 2	537	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99
Bu ++ MK 3	465	<i>Variovorax</i> sp. (KC294017)	99

Repräsentative Sequenz ^a	Länge (bp)	Nächster kultivierter Mikroorganismus (Zugangsnummer)	Ä (%) ^b
Boden mit RW-Behandlung			
Bl ++ BoS 1	530	<i>Flavobacterium</i> sp. (AM934637)	98
Bl ++ BoS 2	538	<i>Bacillus</i> sp. (FJ348046)	99
Bl ++ BoS 3	533	<i>Acidovorax</i> sp. (JQ977203)	99
Bl ++ BoS 4	557	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC211303)	97
Bl ++ BoS 5	518	<i>Acinetobacter</i> sp. (FM955885)	99
Bl ++ MK 1	452	<i>Sphingomonas</i> sp. (HM191725)	99
Bl ++ MK 2	527	<i>Variovorax</i> sp. (KC294017)	99
Boden ohne RW-Behandlung			
Bu -/+ BoS 1	551	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99
Bu -/+ BoS 2	561	<i>Clostridium cellobioparum</i> (X71856)	90
Bu -/+ BoS 3	545	<i>Leptothrix</i> sp. (JQ946030)	98
Bu -/+ BoS 4	523	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (EF569643)	100
Bu -/+ MK 1	562	<i>Geobacter bemidjiensis</i> (NR075007)	97
Bu -/+ MK 2	535	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99
Bu -/+ MK 3	537	<i>Variovorax</i> sp. (JF958157)	98
Bl -/+ BoS 1	558	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (NR041320)	91
Bl -/+ MK 1	541	<i>Geobacter bemidjiensis</i> (NR075007)	97
Bl -/+ MK 2	538	<i>Novosphingobium</i> sp. (AJ000920)	99
Bl -/+ MK 3	527	<i>Variovorax</i> sp. (KC294017)	99

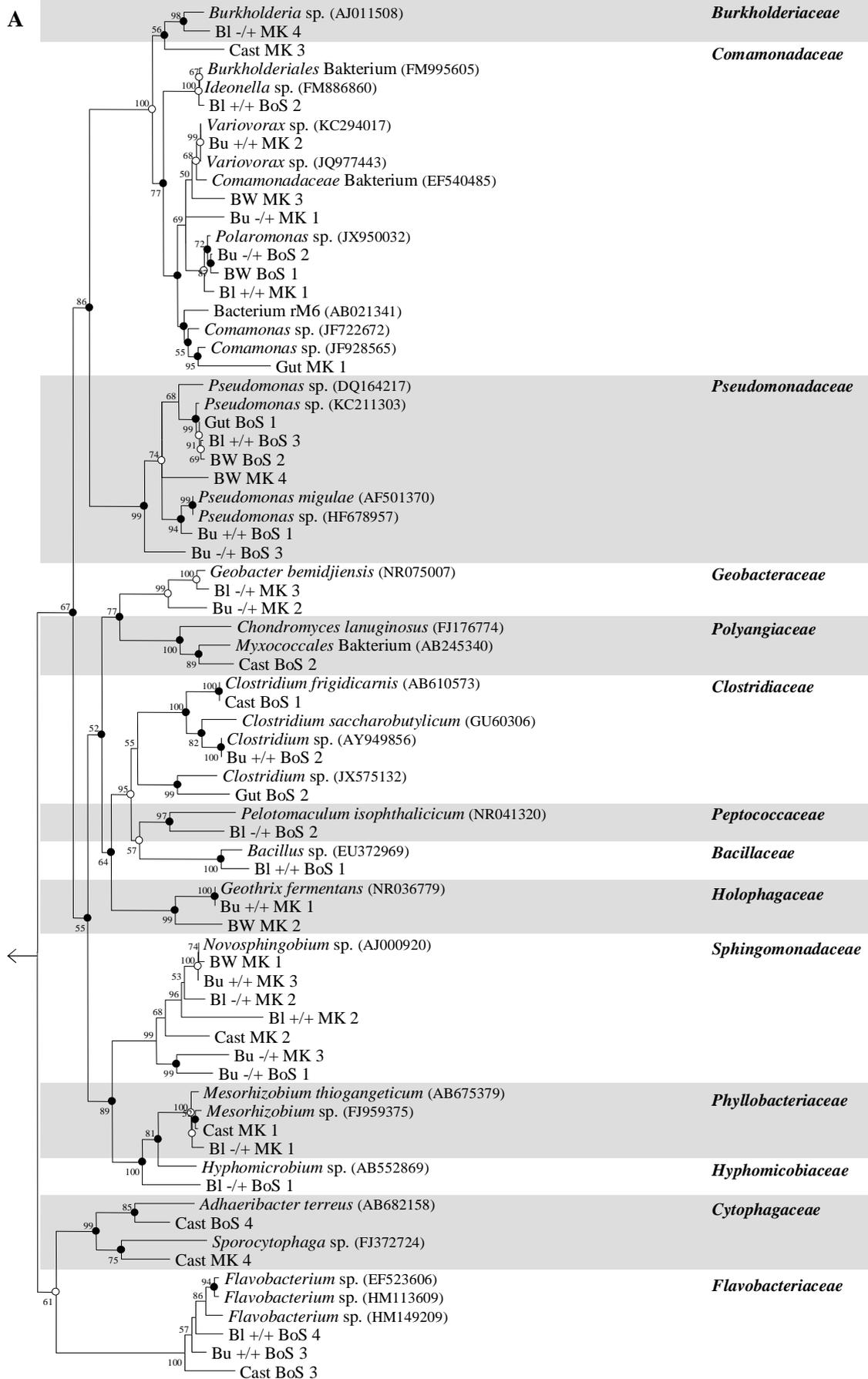
^a, Abkürzungen: Bw, Gangwände; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); BoS, Bodensäulen-Material; MK, Mikrokosmen-Material; RW, Regenwürmer; ++, Inkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; +/-, Inkubation nur mit 2,4-DCP

^b, Sequenzähnlichkeit basiert auf BLAST-Analyse

Nach Inkubation in Bodensäulen mit Regenwürmern und einem 2,4-DCP Verbrauch von 25 µg pro Gramm Trockengewicht wurden in der Drilosphäre sowie in den Bodenproben von 0 bis 5 cm und 5 bis 10 cm zwei bis fünf ¹³C-markierte Familien nachgewiesen. *Pseudomonadaceae* dominierten die aktive 2,4-DCP-verwertende mikrobielle Gemeinschaft in den Gangwänden, dem Darminhalt sowie im umliegenden Boden mit einer Labelling Intensität von bis zu 83 % (Abbildung 58, Abbildung 59). Die den *Flavobacteriaceae*-zugeordneten, ¹³C-markierte Sequenzen waren eng mit

Sequenzen von *Flavobacterium* sp. verwandt und wurden ausschließlich in Regenwurm-vorbehandelten Proben detektiert (Tabelle 47, Tabelle 48). Dabei lag die höchste Labelling Intensität in den Kotkrümeln vor. *Comamonadaceae*-zugeordnete 16S rRNA Teilsequenzen konnten in den Gangwänden und Bodenproben (5-10 cm) mit einer Labelling Intensität von bis zu 38 % nachgewiesen werden. Bakterien der Familie *Clostridiaceae* wurden im Darminhalt, in Kotkrümeln sowie in den oberen 5 cm des Bodens mit einer Labelling Intensität von bis zu 42 % als 2,4-DCP- ^{13}C Verwerter identifiziert. Weitere, in Regenwurm-vorbehandelten Proben detektierte, ^{13}C -markierte Sequenzen wurden den *Gammaproteobacteria* (*Aeromonadaceae*, *Moraxellaceae*), *Deltaproteobacteria* (*Polyangiaceae*), *Firmicutes* (*Bacillaceae*) und den *Bacteroidetes* (*Cytophagaceae*) zugeordnet (Tabelle 47, Tabelle 48, Abbildung 58 bis Abbildung 60). Ein Großteil der ^{13}C -markierten Familien wurde beständig in mehr als einer Regenwurm-vorbehandelten Probe nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die „Markierung“ vielmehr durch Regenwürmer beeinflusst wurde als zufällig stattfand. Ein bis vier ^{13}C -markierte OTUs auf Familien-Ebene aus den Phyla der *Proteobacteria* und *Firmicutes* wurden in Bodenproben ohne Regenwurmvorbehandlung detektiert. Im Boden der oberen 0 bis 5 cm wurden *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae* bzw. *Comamonadaceae*-Verwandte, *Pseudomonadaceae* sowie *Clostridiaceae* mittels CAP-SIP als aktive 2,4-DCP- ^{13}C Abbauer identifiziert. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Analyse des kompletten Gradienten der ^{12}C - und ^{13}C -Inkubationen verifiziert (Abbildung 52, Abbildung 53). *Hyphomicrobiaceae* und *Peptococcaceae* wurden ausschließlich im Verlauf der Bodensäuleninkubation in 5 bis 10 cm Bodentiefe markiert, was ein weiterer Hinweis auf den selektiven Einfluss von Regenwurmaktivitäten auf die bakteriellen 2,4-DCP- ^{13}C Assimilatoren ist.

Nach der Inkubation von Drilosphären- und Bodenmaterial aus den Bodensäulenansätzen in Mikrokosmen wurden ein bis vier ^{13}C -markierte Familien-OTUs nachgewiesen (Abbildung 58, Abbildung 59, Tabelle 47, Tabelle 48). *Sphingomonadaceae* und *Comamonadaceae* waren dabei mit Labelling Intensitäten von bis zu 100 % die dominierenden Taxa, wohingegen *Phyllobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Holophagaceae* sowie *Cytophagaceae* mit Labelling Intensitäten von 7 % bis 28 % scheinbar eine eher untergeordnete Rolle im 2,4-DCP- ^{13}C Fluss spielten (Abbildung 58, Abbildung 59). Die den *Geobacteraceae*-zugeordneten ^{13}C -markierte Sequenzen waren eng mit Sequenzen von *Geobacter bemidjensis* verwandt und wurden ausschließlich in Bodenproben ohne Regenwurmvorbehandlung detektiert (Tabelle 47, Tabelle 48). Eine Vielzahl der 16S rRNA Sequenzen repräsentativer ^{13}C -markierter OTUs wies eine Sequenzähnlichkeit zu kultivierten Mikroorganismen von ≤ 97 % auf (Tabelle 47, Tabelle 48), was darauf schließen lässt, dass bisher unbekannte 2,4-DCP-Kohlenstoff-verwertende Bakterien mit Hilfe des gewählten Versuchsansatzes angereichert werden konnten.



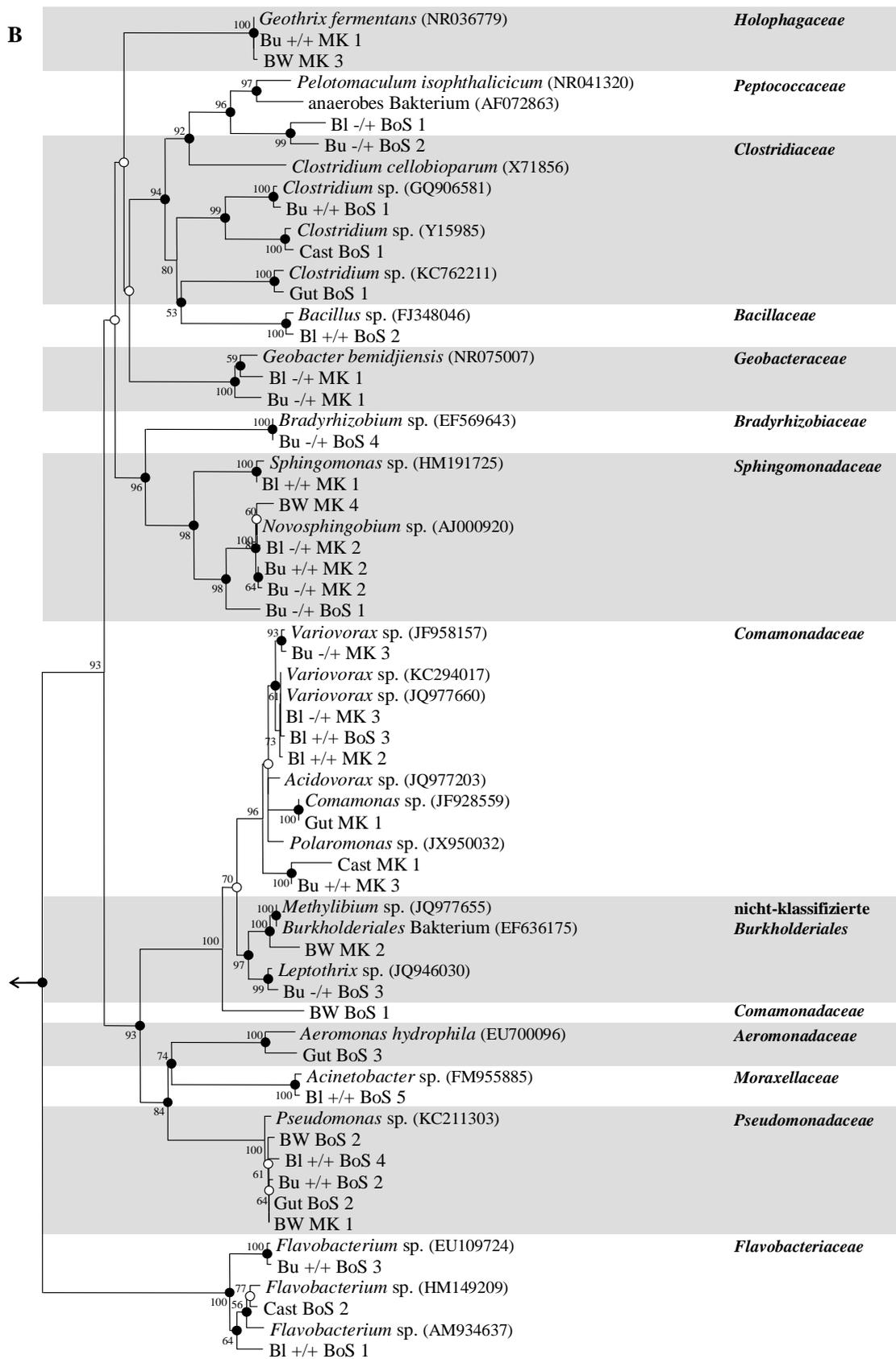


Abbildung 60: Phylogenetische Stammbäume repräsentativer (A) vorwärtsgerichteter und (B) rückwärtsgerichteter 16S rRNA Teilsequenzen (452 - 595 bp) aus cDNA von aktiven, 2,4-DCP- ^{13}C -Kohlenstoff-verwertenden Mikroorganismen nach Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP in Bodensäulen sowie Mikrokosmen. Die Berechnung erfolgte auf Nukleinsäureebene mit dem „Neighbour-Joining“ Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) nach dem „p-Distance“ Modell (Nei & Kumar, 2000). Zahlen an den Verzweigungen geben die Bootstrap-Werte (Prozent von 10.000 Bootstrap-Replikaten) > 50 % an. Schwarze Knotenpunkte an den Verzweigungen indizieren übereinstimmende Ergebnisse mit dem „Maximum-Likelihood“- und dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus; weiße Knotenpunkte zeigen eine Übereinstimmung mit dem „Maximum-Likelihood“- oder dem „Maximum-Parsimony“-Algorithmus. Als Referenzsequenz wurde die 16S rRNA Gensequenz von *Methanosarcina barkeri* (AF028692) herangezogen und in der Abbildung mit dem Pfeil dargestellt. Die Zugangsnummern öffentlicher Datenbanken sind in Klammern angegeben. Der Balken zeigt einen Sequenzunterschied von 5 %. Abkürzungen: BW, Gangwände; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); BoS, Bodensäulen- Material; MK, Mikrokosmen- Material; +/+, Inkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; -/+, Inkubation nur mit 2,4-DCP.

3.5. Einfluss von *A. caliginosa* und 2,4-DCP auf Denitrifizierer und Nitrifizierer im landwirtschaftlichen Boden

Endogäische Regenwürmer der Spezies *Aporrectodea caliginosa* sind in der Lage, *in vivo* N_2O zu emittieren (Matthies *et al.*, 1999). Zudem können Pestizide und deren Abbauprodukte stimulierenden als auch inhibierenden Einfluss auf die Denitrifikation sowie Nitrifikation in Böden nehmen (Pell *et al.*, 1998). Um einen möglichen Effekt von Regenwürmern und/ oder 2,4-DCP auf die N_2O -Bildung und die daran beteiligten Mikroorganismen zu zeigen, wurden Bodensäulen mit feldfrischem, landwirtschaftlichem Boden in Gegenwart bzw. Abwesenheit von *A. caliginosa* und 2,4-DCP inkubiert. Die Bestimmung der Abundanz von Denitrifizierern und Nitrifizierern erfolgte mit Hilfe der MPN-Methode sowie durch Quantifizierung der strukturellen Gene *amoA*, *nirK*, *nirS*, *narG* und *nosZ*. Zusätzlich wurde die Diversität denitrifizierender Bakterien anhand einer TRFLP-Analyse bestimmt. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen zweier Bachelorarbeiten (Marianna Weller, 2010; Christian Hofmann, 2011) durchgeführt.

3.5.1. Einfluss von *A. caliginosa* und 2,4-DCP auf die N_2O -Bildung in Bodensäulen

Die Bildung von N_2O in Regenwurm- und ^{12}C -2,4-DCP-supplementierten und unsupplementierten Bodensäulen, die gleichzeitig für den stabilen Isotopenversuch verwendet wurden (vgl. 2.4.1.), wurde täglich durch gaschromatographische Messungen

verfolgt. In allen Ansätzen konnte innerhalb der ersten zwei Tage eine zügige Bildung von N_2O beobachtet werden (Abbildung 61). Dabei lag die tägliche Bildungsrate bei durchschnittlich $36,1 \text{ nmol N}_2\text{O}$ pro Gramm Frischgewicht Boden für Bodensäulen mit Regenwürmern und bei $14,1 \text{ nmol N}_2\text{O}$ pro Gramm Frischgewicht Boden für Regenwurm-unbehandelte Bodensäulen. Im weiteren Verlauf der Inkubation bis zum Versuchsende ging die N_2O -Bildung zurück, so dass nach 19 Tagen in Regenwurm-behandelten Bodensäulen eine kumulative N_2O -Konzentration von $71 \text{ nmol N}_2\text{O}$ pro Gramm Frischgewicht in Gegenwart von 2,4-DCP und $83 \text{ nmol N}_2\text{O}$ pro Gramm Frischgewicht in Abwesenheit von 2,4-DCP detektiert wurde (Abbildung 61). Regenwurm-unbehandelte Bodensäulen wurden aufgrund einer verzögerten 2,4-DCP Abnahme (Abbildung 46) weiter bei 15°C inkubiert. Nach 37 Tagen erfolgte die letzte Messung des N_2O -Gehaltes in den Bodensäulen, die in einer kumulativen N_2O -Konzentration von 31 nmol pro Gramm Frischgewicht in Anwesenheit von 2,4-DCP und $41 \text{ nmol N}_2\text{O}$ pro Gramm Frischgewicht in Abwesenheit von 2,4-DCP resultierte (Abbildung 61).

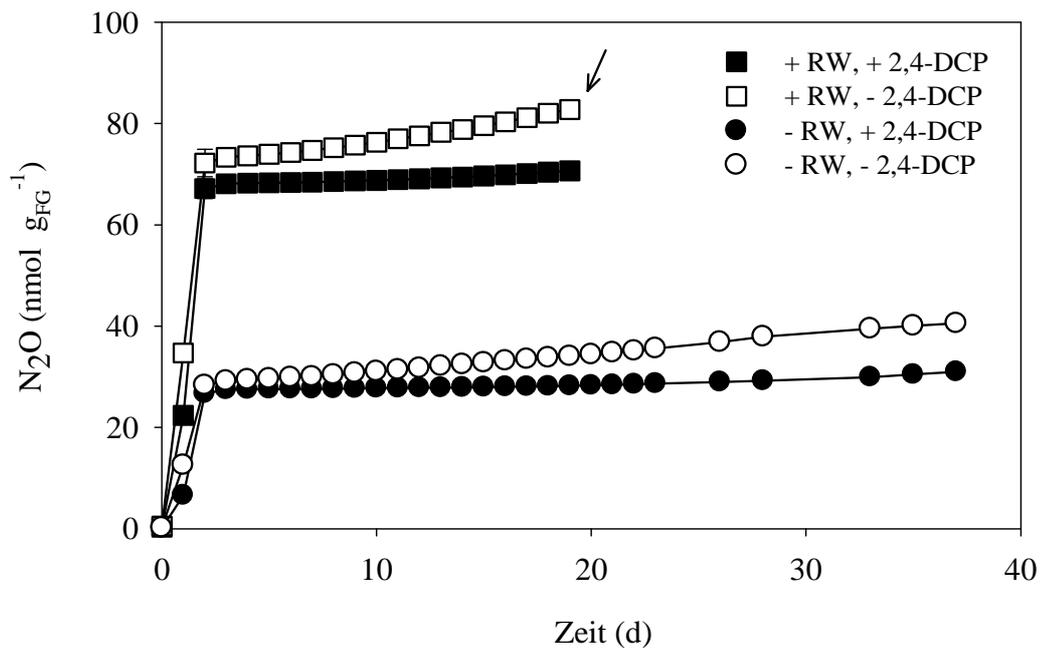


Abbildung 61: Kumulative N_2O -Bildung in Bodensäulen in Gegenwart und Abwesenheit von Regenwürmern und/ oder 2,4-DCP. Der Pfeil indiziert den Zeitpunkt des Versuchsendes der mit Regenwürmern behandelten Säulen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten (\pm höchster und niedrigster gemessener Wert). Die Inkubation erfolgte bei 15°C im Dunkeln. Abkürzung: RW, Regenwurm

Die Zugabe von 2,4-DCP in landwirtschaftlichen Boden führte im Inkubationszeitraum von drei bis 20 Tagen zu einem signifikanten Unterschied in der N_2O -Bildung (Abbildung 61, Abbildung 62). Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass 2,4-DCP als

Substrat in der eingesetzten Konzentration keinen direkten Einfluss genommen hat, da in diesem Zeitraum die größte 2,4-DCP Menge bereits abgebaut bzw. assimiliert wurde (Abbildung 46).

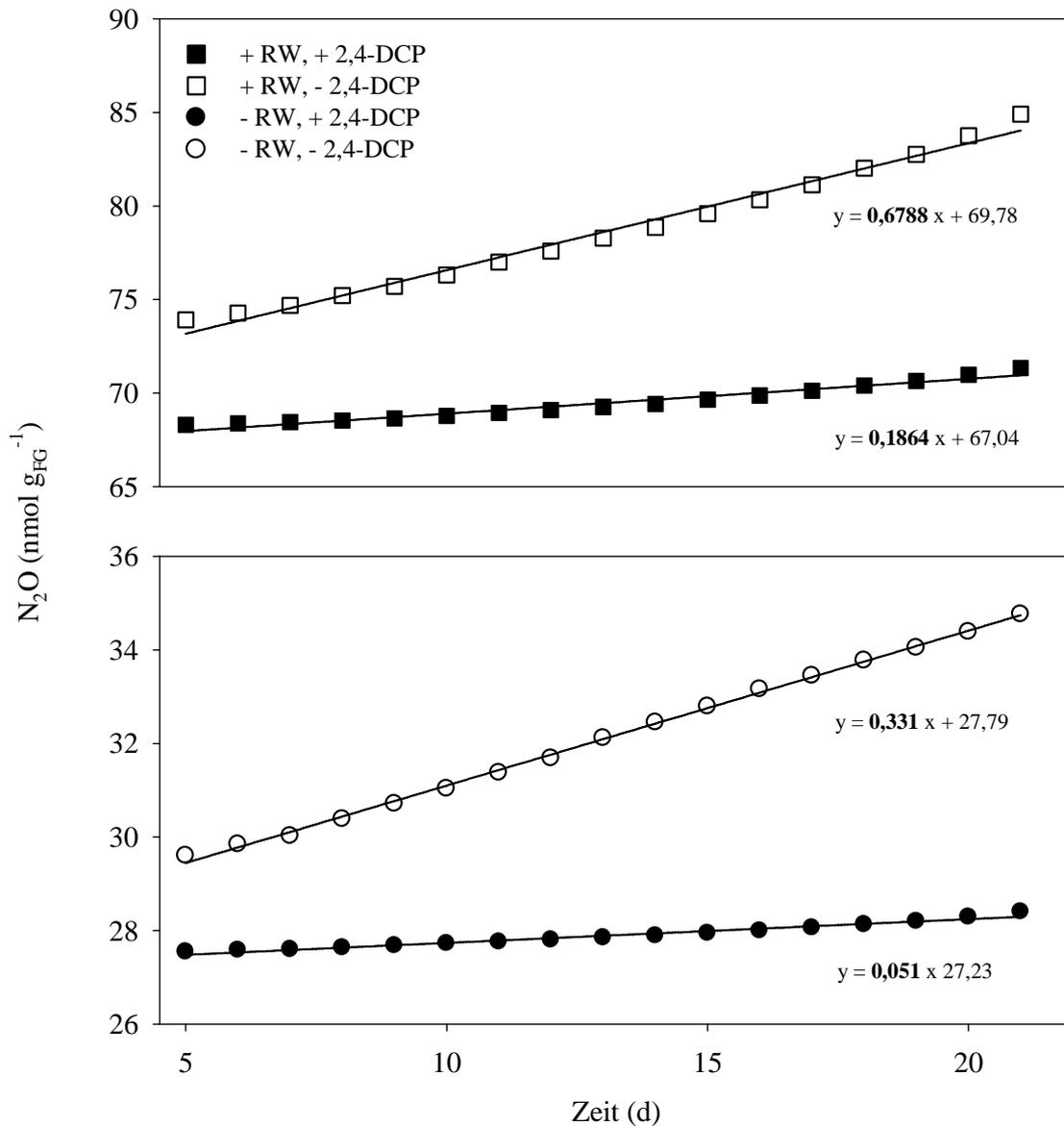


Abbildung 62: Lineare Anstiege der kumulativen N_2O -Bildung in Bodensäulen in Gegenwart und Abwesenheit von Regenwürmern und/ oder 2,4-DCP im Inkubationszeitraum 5 bis 21 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten (\pm höchster und niedrigster gemessener Wert). Die Inkubation erfolgte bei 15 °C im Dunkeln. Abkürzung: RW, Regenwurm

Vielmehr ist der beobachtete Effekt in der Tatsache begründet, dass durch die Gegenwart von 2,4-DCP die am Abbau beteiligten Mikroorganismen angereichert und stimuliert wurden und sich somit das Verhältnis zu den vorliegenden Denitrifikanten änderte. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen untermauert (Abbildung 38, Abbildung 40, Abbildung 63, Abbildung 64). So konnten in

der 2,4-DCP-vorbehandelten Drilosphäre bis zu 10^7 2,4-DCP Abbauer, aber nur 10^4 Denitrifikanten detektiert werden. Dem gegenüber steht die 2,4-DCP-unbehandelte Drilosphäre mit bis zu 10^4 2,4-DCP Abbauer und bis zu 10^8 Denitrifikanten. Folglich kann der aufgetretene Unterschied in der N_2O -Bildung u.a. auf die Abundanz der im Boden vorkommenden Denitrifikanten zurückgeführt werden.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass (a) die Anwesenheit von *A. caliginosa* in landwirtschaftlichem Boden zu einer signifikant höheren (t-Test: $p < 0,05$) N_2O -Bildung führte, (b) der Einfluss von 2,4-DCP auf die N_2O -Bildung innerhalb der ersten 48 Stunden unter den gewählten Inkubationsbedingungen vernachlässigbar und nicht signifikant ist (t-Test: $p > 0,05$) und (c) Bodensäulen supplementiert mit 2,4-DCP im Inkubationszeitraum von drei bis 20 Tagen eine signifikant niedrigere N_2O -Bildung aufwiesen (t-Test: $p < 0,05$).

3.5.2. Quantifizierung denitrifizierender und nitrifizierender Mikroorganismen

3.5.2.1. Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Anzahl kultivierbarer Denitrifizierer

Die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) kultivierbarer Denitrifizierer im feldfrischen, landwirtschaftlichen Boden vor Inkubationsbeginn lag bei $9,5 \times 10^4$ pro Gramm Trockengewicht (Abbildung 63). Nach 60-tägiger Inkubation unter Argonatmosphäre bei 15°C zeigten die MPN in 2,4-DCP-behandelten sowie unbehandelten Gangwandproben keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum feldfrischen Boden (Abbildung 63). Kotkrümel wiesen dagegen mit Keimzahlen von bis zu $1,4 \times 10^4$ pro Gramm Probe signifikant niedrigere Werte als der unbehandelte Boden auf, wobei kein Einfluss einer 2,4-DCP Vorbehandlung beobachtet werden konnte. Die MPN in 2,4-DCP-vorbehandelten Darmproben waren im Vergleich zum Inkubationsbeginn signifikant niedriger, wohingegen 2,4-DCP-unbehandelte Darmproben 6000-fach höhere Keimzahlen aufwiesen als der feldfrische Boden (Abbildung 63). Die erfassten Daten deuten darauf hin, dass (a) die Anzahl kultivierbarer Denitrifizierer im Darm von Regenwürmern stark durch die Gegenwart von 2,4-DCP beeinflusst wird und (b) der Regenwurmdarm ein „Hotspot“ für die mikrobielle Denitrifikation innerhalb der Drilosphäre darstellt.

In 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben waren die MPN kultivierbarer Denitrifizierer beständig signifikant höher als in den korrespondierenden unbehandelten Bodenproben

(Abbildung 64). So wurden Keimzahlen von bis zu $9,8 \times 10^6$ in der oberen Bodenschicht und bis zu $1,5 \times 10^6$ in der unteren Bodenschicht pro Gramm Trockengewicht detektiert. Zudem wiesen 2,4-DCP-vorbehandelte Bodenproben signifikant höhere MPN auf als feldfrischer, unbehandelter Boden zu Inkubationsbeginn (Abbildung 64). Diese Daten deuten an, dass kultivierbare Denitrifizierer in den Bodenproben nicht durch die Gegenwart des eingesetzten 2,4-DCP inhibiert werden. Die Anwesenheit von Regenwürmern in den Bodensäulen führte in den oberen Bodenschichten zu signifikant höheren Keimzahlen (Abbildung 64). Die detektierten MPN pro Gramm Trockengewicht waren dabei in Regenwurm-vorbehandelten Proben bis zu 9 x höher als in den Regenwurm-unbehandelten Bodenproben. Die wahrscheinlichste Keimzahl kultivierbarer Denitrifizierer in den unteren 5 cm der Bodensäulen zeigte dagegen keine signifikante Beeinflussung durch Regenwürmer (Abbildung 64).

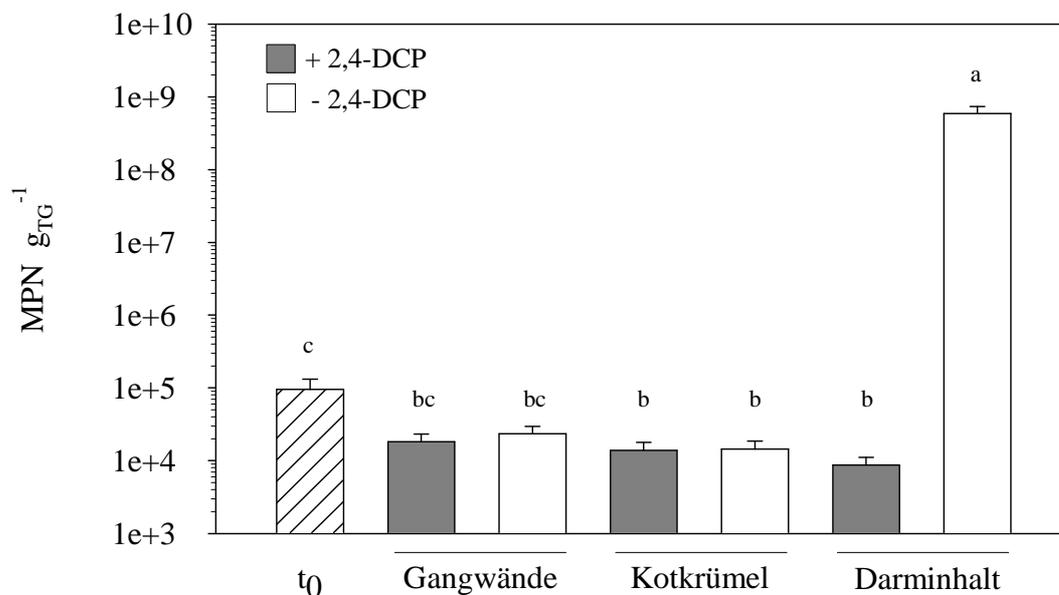


Abbildung 63: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) kultivierter Denitrifizierer pro Gramm Trockengewicht in feldfrischem Boden (t₀) sowie der Drilosphäre nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre. Die Bestimmung der MPN wurde anhand von fünf Parallelen durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem die tatsächliche Keimzahl mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand der zu sichernden Differenz bestimmt wurde (vgl. 2.7.2.).

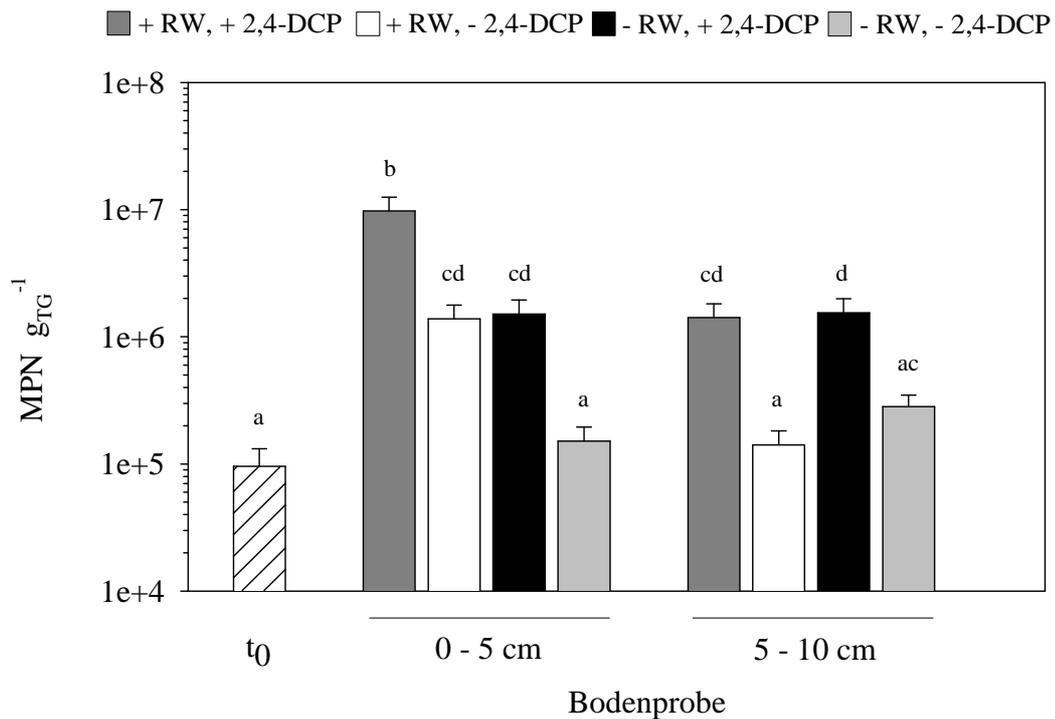


Abbildung 64: Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number, MPN) kultivierter Denitrifizierer in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorbehandelten Bodenproben pro Gramm Trockengewicht nach 60 Tagen Inkubation bei 15 °C unter Argonatmosphäre. Die Bestimmung der MPN wurde anhand von fünf Parallelen durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem die tatsächliche Keimzahl mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt. Abkürzung: RW, Regenwurm. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand der zu sichernden Differenz bestimmt wurde (vgl. 2.7.2.).

Die durch die Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl erhaltenen Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen der anoxischen Bodenaufschlammungen supplementiert mit 2,4-DCP (vgl. 3.1.2.) sowie mit den Resultaten der N_2O -Messung während der Bodensäuleninkubation. Diese lassen vermuten, dass der Einfluss von 2,4-DCP unter den gewählten Inkubationsbedingungen auf die Anzahl der kultivierbaren Denitrifizierer im landwirtschaftlichen Boden und somit auf die Denitrifikation im Vergleich zum Einflussfaktor Regenwurm vernachlässigbar gering ist.

3.5.2.2. Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Abundanz von Denitrifikations- und Nitrifikations-assoziierten Genen in Drilosphäre und Boden

Der Einfluss des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa* sowie von 2,4-DCP auf die Abundanz und Aktivität von denitrifizierenden und nitrifizierenden Mikroorganismen in Drilosphären- und Bodenproben nach Inkubation in Bodensäulen wurde durch die Quantifizierung der strukturellen Gene *narG* (Nitratreduktase

kodierendes Gen), *nirK* und *nirS* (Nitritreduktase kodierende Gene), *nosZ* (N₂O-Reduktase kodierendes Gen) und *amoA* (Ammonium-Monooxygenase kodierendes Gen) untersucht. Aufgrund von aufgetretenen Problemen im Verlauf der Nukleinsäureextraktion und der nachfolgenden Genamplifikation mittels qPCR wurden die *narG*-, *nirK*-, *nirS*- und *amoA*-Genkopienzahlen aus Kotkrümelproben nach 2,4-DCP Inkubation für weitergehende Analysen ausgeschlossen.

Im feldfrischen, unbehandelten Boden wurden $3,3 \times 10^3$ *narG*- Genkopien pro ng DNA detektiert (Abbildung 65), was einem Anteil von 1 % an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft entsprach (Abbildung-AH 4). Nach 2-tägiger Bodensäuleninkubation und einem gleichzeitigen Anstieg der N₂O-Konzentration konnten 1,3-fach bis 3,1-fach erhöhte *narG*-Genkopienzahlen pro ng DNA in Bodenproben der oberen 5 cm detektiert werden (Abbildung 65). Dabei wiesen Regenwurm-vorbehandelte Bodenproben generell höhere Genkopienzahlen auf als die korrespondierenden Bodenproben ohne Regenwurmbehandlung. Die *narG*-Genkopienzahlen in Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben variierten von $1,2 \times 10^3$ bis $1,6 \times 10^4$ pro ng eingesetzter DNA und waren bis zu 364 mal höher (t-Test: $p > 0,05$) als in den Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss (Abbildung 65). Zudem konnte kein signifikanter Einfluss von 2,4-DCP (t-Test: $p > 0,05$) auf die Abundanz von *narG* nachgewiesen werden.

Im feldfrischen, landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern wurden zu Inkubationsbeginn $9,7 \times 10^3$ *nirK*- sowie $3,1 \times 10^3$ *nirS*-Genkopien pro ng eingesetzter DNA erfasst (Abbildung 65), was einem Anteil von 3 % bzw. 0,9 % an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft entsprach (Abbildung-AH 4). Die Anzahl der detektierten *nirK*-Gene in Bodenproben nach 2-tägiger Inkubation lag in einem Bereich von $6,9 \times 10^2$ bis $2,5 \times 10^3$ pro ng DNA und damit deutlich unter dem Ausgangswert zum Zeitpunkt t_0 . Im Vergleich dazu blieben die *nirS*-Genkopienzahlen nach 2-tägiger Bodensäuleninkubation nahezu unverändert (Abbildung 65). In Drilosphären- und Bodenproben aus Regenwurm-supplementierten Bodensäulen wurden *nirK*-Gene mit Abundanzen von $1,3 \times 10^3$ bis $1,2 \times 10^5$ Genkopien pro ng DNA detektiert. Bodenproben ohne Regenwurmbehandlung wiesen mit $7,6 \times 10^4$ bis $1,5 \times 10^5$ *nirK*-Genen pro ng DNA höhere (t-Test: $p > 0,05$) *nirK*-Genzahlen als Bodenproben mit Regenwurmbehandlung auf (Abbildung 65). Die Abundanz der *nirS*-Gene in DNA-Extrakten aus Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben variierte von $1,3 \times 10^3$ bis $7,5 \times 10^3$ Genkopien pro ng DNA und war bis zu 1000-fach höher (t-Test: $p = 0,05$) als in den korrespondierenden Proben ohne Regenwurmeinfluss. Die Zugabe von 2,4-DCP zeigte, ähnlich wie für *narG* beschrieben, keinen signifikanten Einfluss (t-Test: $p > 0,05$) auf die Abundanz der für die Nitritreduktase-kodierenden Gene *nirK* und *nirS*.

Die *nosZ*-Genkopienzahl pro ng DNA lag vor Inkubationsbeginn bei $7,6 \times 10^2$ (Abbildung 66), was einem Anteil von 0,2 % an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft entsprach (Abbildung-AH 5). Während nach 2-tägiger Bodensäuleninkubation für 2,4-DCP-supplementierte Bodenproben eine geringe Abnahme der *nosZ*-Genkopienzahl beobachtet wurde, wiesen 2,4-DCP-unbehandelte Bodenproben im Vergleich zum Inkubationsbeginn ähnliche *nosZ*-Genkopienzahlen auf (Abbildung 66). In der Drilosphäre sowie in Regenwurm-beeinflussten Bodenproben wurden am Ende der Inkubation bis zu $4,9 \times 10^3$ *nosZ*-Genkopien pro ng DNA detektiert. Im Vergleich dazu konnten in Regenwurm-unbehandelten Bodenproben bis zu 195-fach niedrigere (t-Test: $p > 0,05$) *nosZ*-Genkopien pro ng DNA erfasst werden. Ein signifikanter Einfluss von 2,4-DCP auf die Abundanz *nosZ*-tragender Bodenbakterien konnte anhand der vorliegenden Daten nicht gezeigt werden (t-Test: $p > 0,05$).

Die für die Ammonium-Monooxygenase kodierenden Gene *amoA_{Archaea}* und *amoA_{Bacteria}* wurden in feldfrischem Boden mit Genkopienzahlen von $5,2 \times 10^1$ und $1,4 \times 10^3$ pro ng DNA detektiert (Abbildung 66), was einem Anteil von 0,02 % bzw. 0,44 % an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft entsprach (Abbildung-AH 5). Nach 2-tägiger Inkubation in Bodensäulen wurden 2,5-fach bis 4-fach höhere *amoA_{Archaea}*-Genkopienzahlen pro ng DNA erfasst. Detektierte *amoA_{Bacteria}*-Genkopienzahlen in 2,4-DCP-unbehandelten Bodenproben waren nach 2-tägiger Bodensäuleninkubation bis zu 1,9-fach geringer als zum Zeitpunkt t_0 , während die korrespondierenden Ansätze mit 2,4-DCP nahezu unveränderte Werte aufwiesen (Abbildung 66). Die *amoA_{Archaea}*-Genkopienzahlen in Regenwurm-vorbehandelten Drilosphären- und Bodenproben variierten nach Beendigung der Bodensäulen von $2,4 \times 10^1$ bis $1,5 \times 10^3$ pro ng eingesetzter DNA und wiesen damit keine signifikanten Unterschiede (t-Test: $p > 0,05$) zu den Regenwurm-unbehandelten Bodenproben auf (Abbildung 66). Zudem wurde die Abundanz *amoA_{Bacteria}*-tragender Bodenbakterien ebenfalls nicht signifikant (t-Test: $p > 0,05$) durch die Gegenwart von Regenwürmern beeinflusst.

Bodensäulen, supplementiert mit dem endogäischen Regenwurm *A. caliginosa*, wiesen nach Beendigung der Inkubation deutlich mehr (t-Test: $p < 0,05$) *amoA_{Bacteria}*-Gene als *amoA_{Archaea}*-Gene pro ng eingesetzter DNA auf, wohingegen in Regenwurm-un-supplementierten Bodensäulen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass (a) die eingesetzte, *in situ* relevante 2,4-DCP Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Abundanz der strukturellen Gene *narG*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* sowie *amoA* nimmt, (b) die Abundanz der Nitritreduktasen und der N_2O -Reduktase positiv durch die eingesetzten Regenwürmer beeinflusst wird und (c) den *amoA_{Bacteria}*-tragende Mikroorganismen unter den gewählten Bedingungen nach Inkubation mit Regenwürmern im Vergleich zu den Archaeen eine bedeutende Rolle im Rahmen des Nitrifikationsprozesses zukommt.

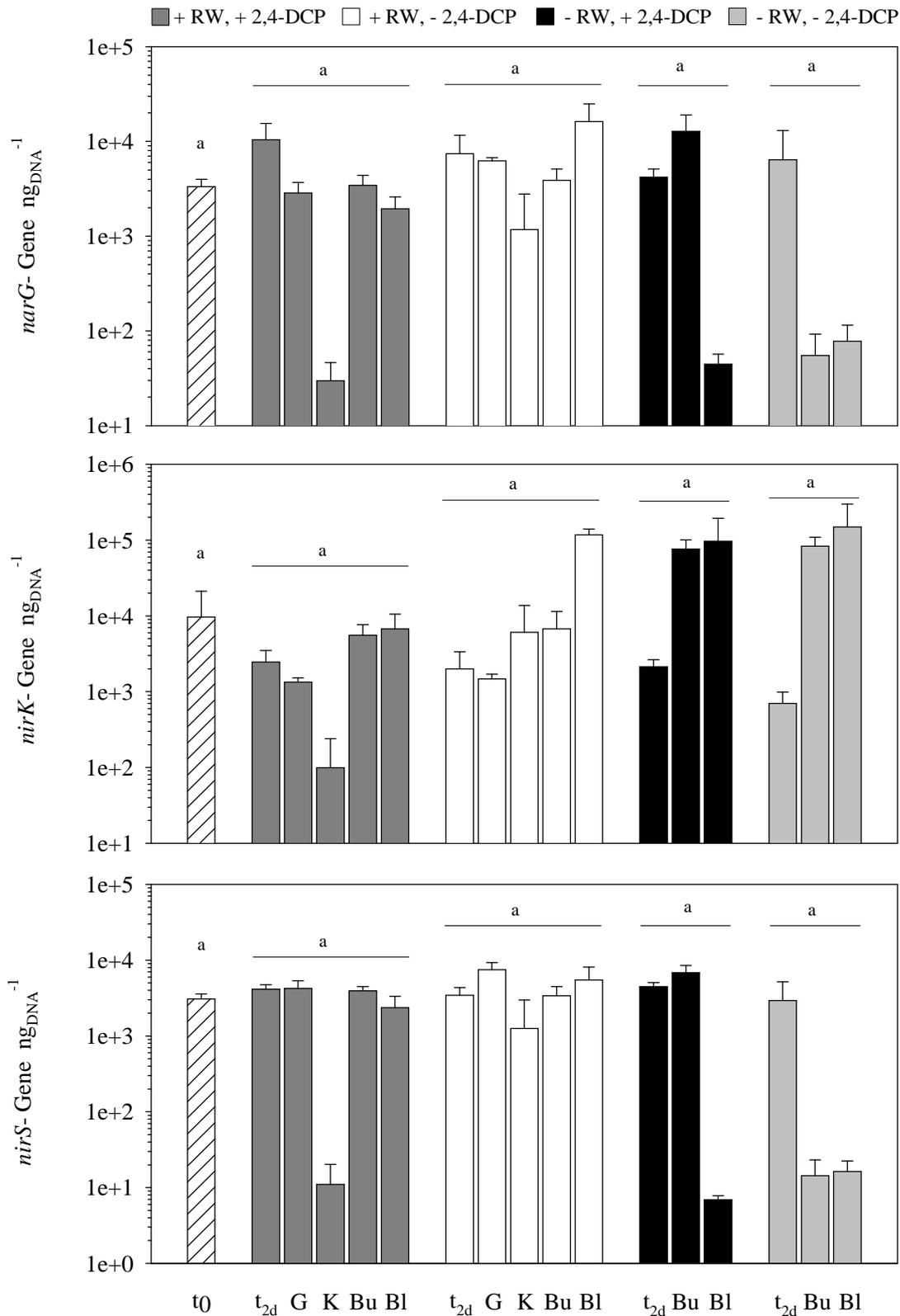


Abbildung 65: *narG*-, *nirK*- und *nirS*-Genkopienzahlen pro ng DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubiertem Drilosphaeren- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.). Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus zwei qPCR-Messungen; Fehlerbalken geben den höchsten erfassten Wert an. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand eines t-Tests bestimmt wurde. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

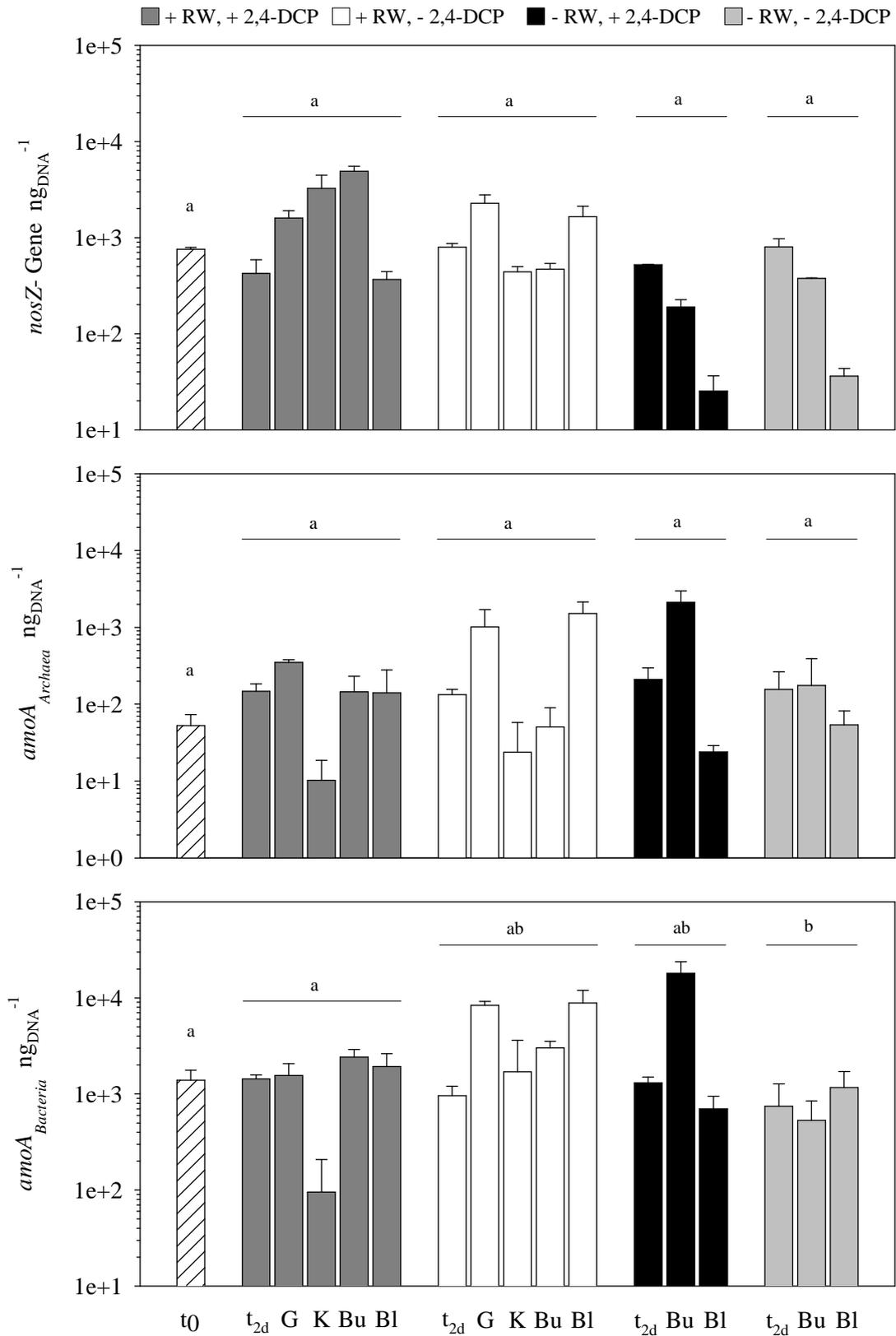


Abbildung 66: *nosZ*- und *amoA*-Genkopienzahlen pro ng DNA in feldfrischem Boden (t₀) sowie vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.). Dargestellte Kopienzahlen sind Mittelwerte aus zwei qPCR-Messungen; Fehlerbalken geben den höchsten erfassten Wert an. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand eines t-Tests bestimmt wurde. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

Metabolisch aktive Denitrifizierer wurden anhand von *nosZ*-Gentranskripten im Verlauf der Bodensäuleninkubation zu den Zeitpunkten t_0 (Inkubationsbeginn), t_{2d} (nach zwei Tagen) sowie am Versuchsende nach 19 bzw. 41 Tagen quantifiziert (vgl. 3.5.1.). Dabei wurden *nosZ*-Transkripte für alle untersuchten Drilosphären- und Bodenproben für jeden Zeitpunkt detektiert (Abbildung 67). Im feldfrischen Boden vor Inkubationsbeginn wurden 7,6 *nosZ*-Transkripte pro ng eingesetzter cDNA detektiert, was auf eine geringe Aktivität denitrifizierender Bakterien im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern hinweist. Die Zugabe von 2,4-DCP und / oder Regenwürmern führte nach zwei Tagen zu einem Anstieg der *nosZ*-Transkripte auf bis zu $4,1 \times 10^1$ pro ng cDNA (Abbildung 67). Nach Beendigung der Bodensäuleninkubation wiesen die untersuchten Gangwandproben geringere *nosZ*-Transkriptzahlen auf als das Kotkrümelmaterial (Abbildung 67), was vermutlich auf die vorherrschenden oxischen Bedingungen in den Regenwurmgangwänden zurück zu führen ist. In der Drilosphäre sowie in Regenwurm-beeinflussten Bodenproben wurden am Ende der Inkubation bis zu $4,0 \times 10^1$ *nosZ*-Transkripte pro ng cDNA detektiert; Regenwurm-unbeeinflusste Proben wiesen bis zu $2,9 \times 10^2$ *nosZ*-Transkripte pro ng cDNA auf (Abbildung 67). Dabei konnte anhand der vorliegenden qPCR-Daten kein signifikanter Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Aktivität *nosZ*-tragender Bodenbakterien nachgewiesen werden (t-Test: $p > 0,05$).

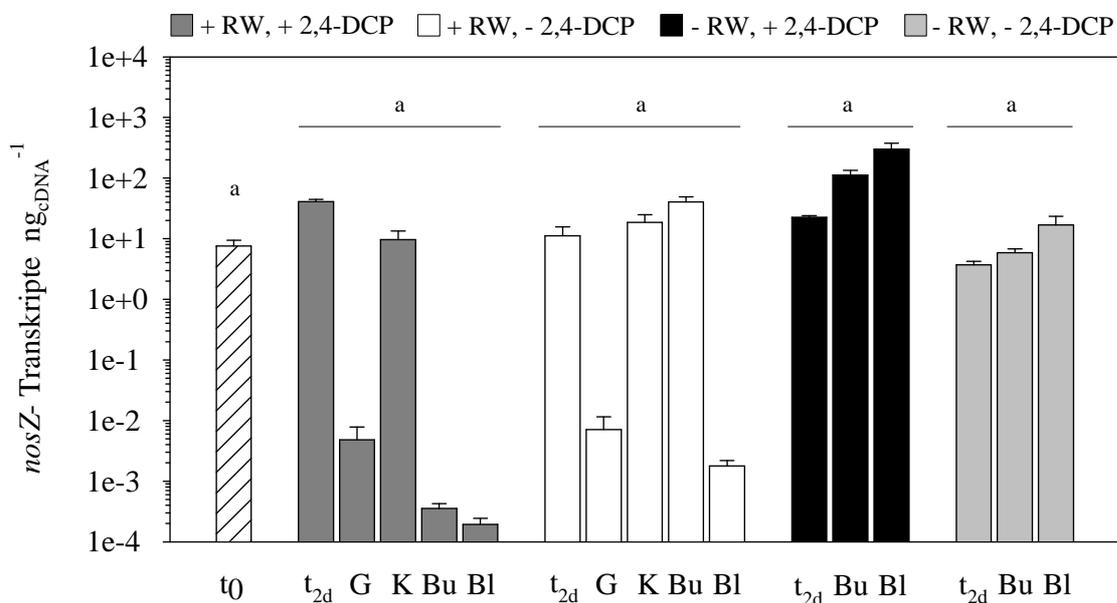


Abbildung 67: *nosZ*-Transkripte pro ng eingesetzter cDNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 2-tägiger (t_{2d}) sowie 19- und 41-tägiger Bodensäuleninkubation (vgl. 3.5.1.). Dargestellte Kopienzahlen sind Mittelwerte von Triplikaten; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Unterschiedliche Buchstaben indizieren einen signifikanten Unterschied, der anhand eines t-Tests bestimmt wurde. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

3.5.3. Einfluss von Regenwürmern und 2,4-DCP auf die Diversität von Denitrifizierern

Die Diversität denitrifizierender Bakterien im feldfrischen, landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern sowie in vorinkubierten Drilosphären- und Bodenproben wurde mit Hilfe der TRFLP-Analyse durch Marianna Weller im Rahmen einer Bachelorarbeit bestimmt. Aus DNA-Proben amplifizierte *nosZ*-Genfragmente wurden dafür mit dem Restriktionsenzym *HhaI* verdaut und anschließend mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Die erhaltenen Bandenmuster im feldfrischem Boden, den Gangwand- sowie Kotkrümelproben zeigten bis zu acht TRFs (Terminale Restriktionsfragmente, Abbildung 68) mit einer relativen Fluoreszenz von 0,7 % bis 92,2 %. Das TRF 357 bp, das indikativ für *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Depkat-Jakob *et al.*, 2010) ist, war dabei in allen untersuchten Proben dominierend. Die TRFs 148 bp und 408 bp können unkultivierten Bodenbakterien aus der Klasse der *Betaproteobacteria* zugeordnet werden (Depkat-Jakob *et al.*, 2010) und waren nach 19-tägiger Bodensäuleninkubation in Gangwand- und Kotkrümelproben mit relativen Fluoreszenzen von 3,9 % und 5,4 % detektierbar (Abbildung 68). Die vorliegenden Daten weisen zudem darauf hin, dass eine Vorbehandlung mit 2,4-DCP zu keiner entscheidenden Veränderung der Diversität von denitrifizierenden Bakterien in der Drilosphäre führt.

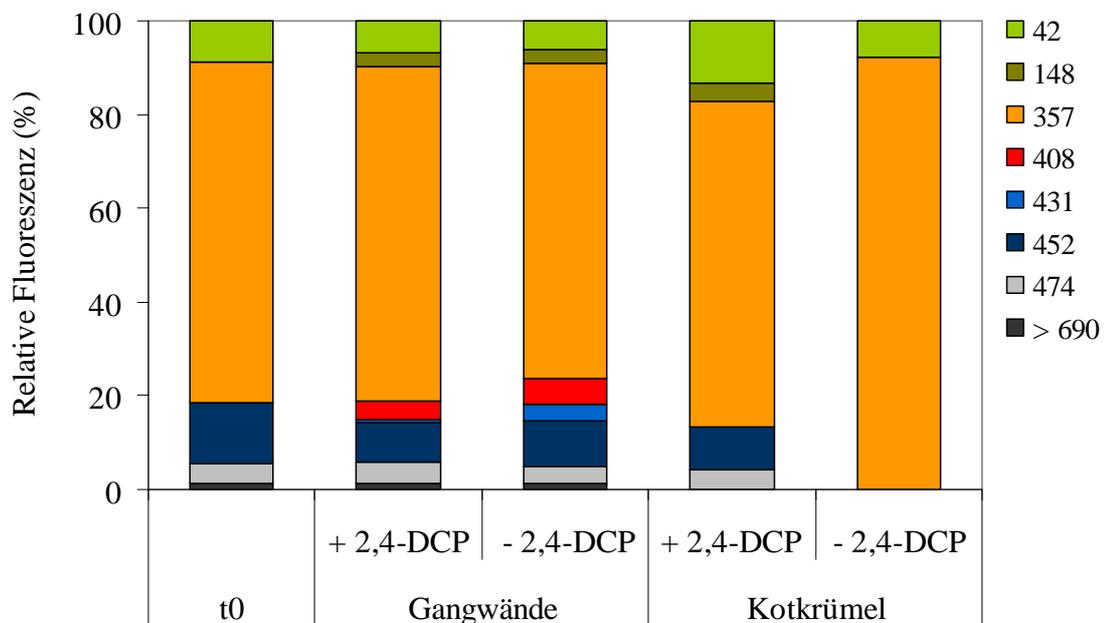


Abbildung 68: TRFLP-Profil bakterieller *nosZ* DNA Sequenzen im feldfrischen Boden (t_0) sowie in Drilosphärenproben nach 19-tägiger Inkubation in Bodensäulen mit bzw. ohne Zugabe von 2,4-DCP. Abgebildet sind die nach TRFLP-Analyse detektierten terminalen Restriktionsfragmente (42-690 bp). Aufgrund des geringen Probenvolumens konnte keine Analyse des Darminhaltes erfolgen.

Aufgrund der detektierten, zügigen N_2O -Bildung in allen Bodensäulenansätzen innerhalb der ersten zwei Tage (Abbildung 61) wurden Bodenproben des Zeitpunktes t_{2d} hinsichtlich ihrer *nosZ*-Diversität untersucht. Das erhaltene TRFLP-Profil zeigte dabei vier bis fünf TRFs mit relativen Fluoreszenzen von 2,3 % bis 74,4 % (Abbildung 69). Bodenproben aus Regenwurm-supplementierten Bodensäulen zeigten unabhängig von einer 2,4-DCP Vorbehandlung ähnliche Bandenmuster, die von dem TRF 357 bp dominiert wurde (Abbildung 69). 2,4-DCP-vorinkubierte Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss wiesen vier unterschiedliche TRFs auf, wobei das den *Alphaproteobacteria* zugeordnete TRF 42 bp mit einer relativen Fluoreszenz von 63,8 % dominant war. In den Kontrollansätzen ohne Regenwürmer und 2,4-DCP wurden fünf TRFs detektiert, deren relative Fluoreszenzen im Vergleich zum Inkubationsbeginn annähernd unverändert waren (Abbildung 69).

Nach 19-tägiger Inkubation und dem kompletten Verschwinden des Substrates aus dem Boden wurden fünf bis sieben TRFs mit relativen Fluoreszenzen von 1,2 % bis 74,9 % in Regenwurm-vorbehandelten Bodenproben detektiert (Abbildung 69). Unabhängig von Bodentiefe und 2,4-DCP Behandlung war das TRF 357 bp dominierend. Das den *Betaproteobacteria* zugeordnete TRF 408 bp konnte mit einer relativen Fluoreszenz von bis zu 16,9 % nur in 2,4-DCP-unsupplementierten Bodenproben nachgewiesen werden. Bodenproben ohne eine vorangegangene Regenwurmbehandlung wiesen nach 41-tägiger Inkubation und durchgeführtem Restriktionsverdau drei bis sechs unterschiedliche TRFs auf (Abbildung 69). Das TRF der Länge 357 bp war dabei, wie bereits für die untersuchten Drilosphären- und Bodenproben beschrieben, mit einer relativen Fluoreszenz von bis zu 82,9 % dominierend. Zudem wurden die betaproteobakteriellen TRFs 148 bp und 408 bp mit höheren relativen Fluoreszenzen in 2,4-DCP-unbehandelten Bodenproben detektiert.

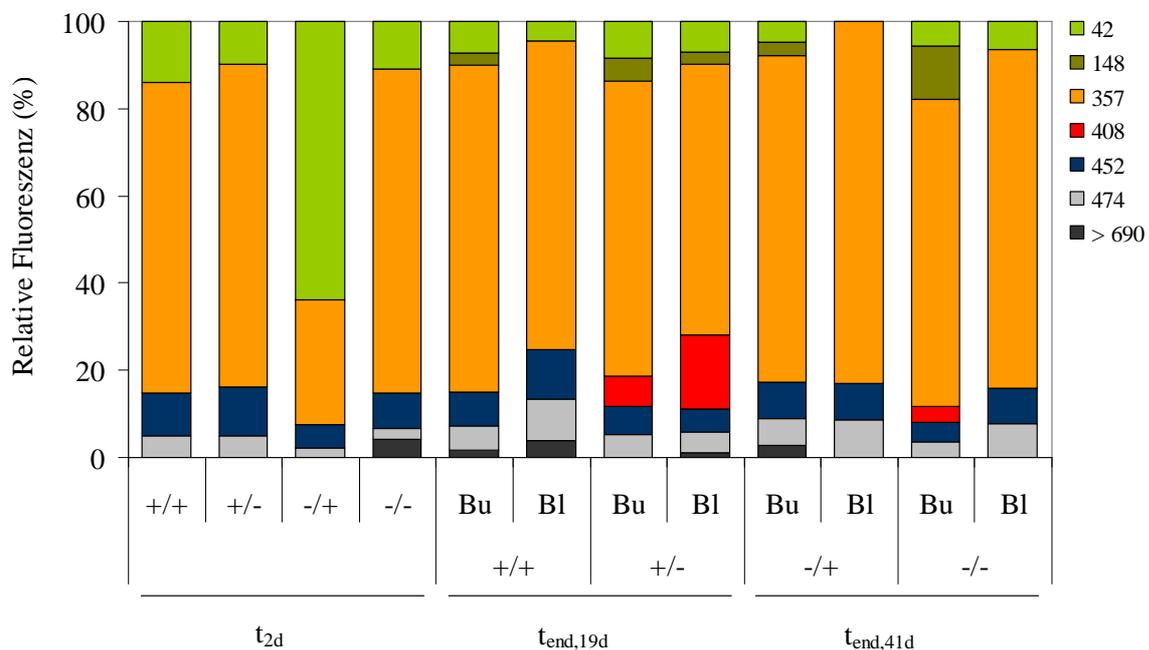


Abbildung 70: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der nachgewiesenen TRFs aus feldfrischem Boden (t_0) sowie vorinkubierten Drilosphären- und Bodenproben nach Bodensäuleninkubation basierend auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitsindex. Der errechnete Stress-Wert liegt bei 0,149. Abkürzungen: t_{2d} , Proben nach 2-tägiger Bodensäuleninkubation; Ko, Kotkrümel; Gw, Gangwände; Bu, obere Schicht des Bodens (0-5 cm); Bl, untere Schicht des Bodens (5-10 cm); +/+, Bodensäuleninkubation mit Regenwürmern und 2,4-DCP; +/-, Bodensäuleninkubation nur mit Regenwürmer; -/+, Bodensäuleninkubation nur mit 2,4-DCP; -/-, Kontrollansatz ohne Regenwürmer und 2,4-DCP.

4. Diskussion

4.1. Aerober und anaerober Abbau von 2,4-DCP im Boden und in der Drilosphäre

Die aerobe 2,4-DCP Biodegradation durch Bakterien erfolgt mit Hilfe der 2,4-DCP Hydroxylase über die Bildung von 3,5-Dichlorcatechol als zentrales Intermediat (Abbildung 1). Diese Verbindung kann anschließend entweder über eine *ortho*- (intradiolische-) oder eine *meta*- (extradiolische-) Ringspaltung des aromatischen Ringes abgebaut werden. Die dafür verantwortlichen Enzyme, die Chlorcatechol-1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.1) bzw. die Chlorcatechol-2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2), wurden bereits in ein und demselben Organismus nachgewiesen (Kilpi *et al.*, 1980; Pieper *et al.*, 1988; Koh *et al.*, 1997; Pérez-Pentoya *et al.*, 2008; Guzik *et al.*, 2009) und dienen in Form ihrer strukturellen Gene als Marker für die an der Ringspaltung beteiligten Bakterien (Alfreider *et al.*, 2003; Qureshi *et al.*, 2009; Lillis *et al.*, 2010). Beide Abbauwege führen dabei in der Regel zu transienten Intermediaten des zentralen Stoffwechsels und können zur Energiekonservierung oder zum Aufbau von Biomasse genutzt werden (Van der Meer *et al.*, 1992). Der mikrobielle Abbau von 2,4-DCP kann durch die Gegenwart zusätzlicher Kohlenstoffquellen stimuliert werden. Flüchtige organische Verbindungen wie Monoterpene weisen eine dem 2,4-DCP ähnliche chemische Struktur auf und führten in Studien zu einer Erhöhung der 2,4-DCP Mineralisierungsrate in Böden (Rhodes *et al.*, 2007; McLoughlin *et al.*, 2009). *Pseudomonas* sp. zeigte einen erhöhten 2,4-DCP Verbrauch in Gegenwart von Glukose (Ziagova & Liakopoulou-Kyriakides, 2007), ebenso wie *Comamonas testosteroni*, der co-metabolisch mit Glukose 4-Chlorphenol abbaute (Tobajas *et al.*, 2012). *Pseudomonadaceae*- und *Comamonadaceae*-verwandte Taxa wurden in Bodensäulen mit Regenwurmeinfluss als dominierende 2,4-DCP-[¹³C] Verwerter identifiziert (Abbildung 58, Abbildung 59) und konnten zudem mit 2,4-DCP aus den entsprechenden Proben isoliert werden (Abbildung 23). Die Drilosphäre, d.h. die durch Regenwürmer-beeinflusste Bodenzone, ist durch einen im Vergleich zum umliegenden Boden erhöhten Anteil an organischen Kohlenstoff gekennzeichnet (Drake & Horn, 2007; Don *et al.*, 2008). *Aporrectodea caliginosa* stimulierte die Abnahme von 2,4-DCP in Bodensäulen (Abbildung 17) und oxischen Mikrokosmen (Tabelle 28) sowie die Mineralisierung von [U-¹⁴C]-2,4-DCP in Gangwänden, Kotkrümeln und Bodenproben nach einer Bodensäuleninkubation (Abbildung 18). Diese Ergebnisse sind konsistent mit anderen Studien, die einen „Regenwurmeffekt“ auf den mikrobiellen Abbau von Xenobiotika nachweisen konnten (Hickman & Reid, 2008). So erhöhten Regenwürmer

in einer Untersuchung von Liu *et al.* (2011a) zum einen die MCPA-Abbaufähigkeit des eingesetzten landwirtschaftlichen Bodens aus Scheyern und zum anderen die Replikation der am Abbau beteiligten Mikroorganismen. Es kann folglich angenommen werden, dass Boden mit einer hohen Dichte an Regenwürmern eine mikrobielle Gemeinschaft beherbergt, die Xenobiotika effizienter transformiert und abbaut als Boden mit einer geringen Dichte an Regenwürmern.

Regenwürmer werden aufgrund ihrer Fähigkeit die eigene Umwelt zu ändern oder sogar neue Habitate für andere Organismen zu schaffen als „Ökosystem-Ingenieure“ bezeichnet (Peterson & Luxton, 1982). Durch die Grabtätigkeit, das Anlegen von Gangwänden sowie die Aufnahme, den Verdau und das Ausscheiden von großen Mengen an Boden und organischem Material werden u.a. die Bodenstruktur positiv beeinflusst, die Verfügbarkeit von Nährstoffen verbessert und eine Reihe an Bodenmikroorganismen in ihrem Wachstum stimuliert (Abbildung 71). Auf diesem Wege können Regenwürmer zumindest theoretisch die Faktoren, die eine Bioremediation limitieren, verändern.

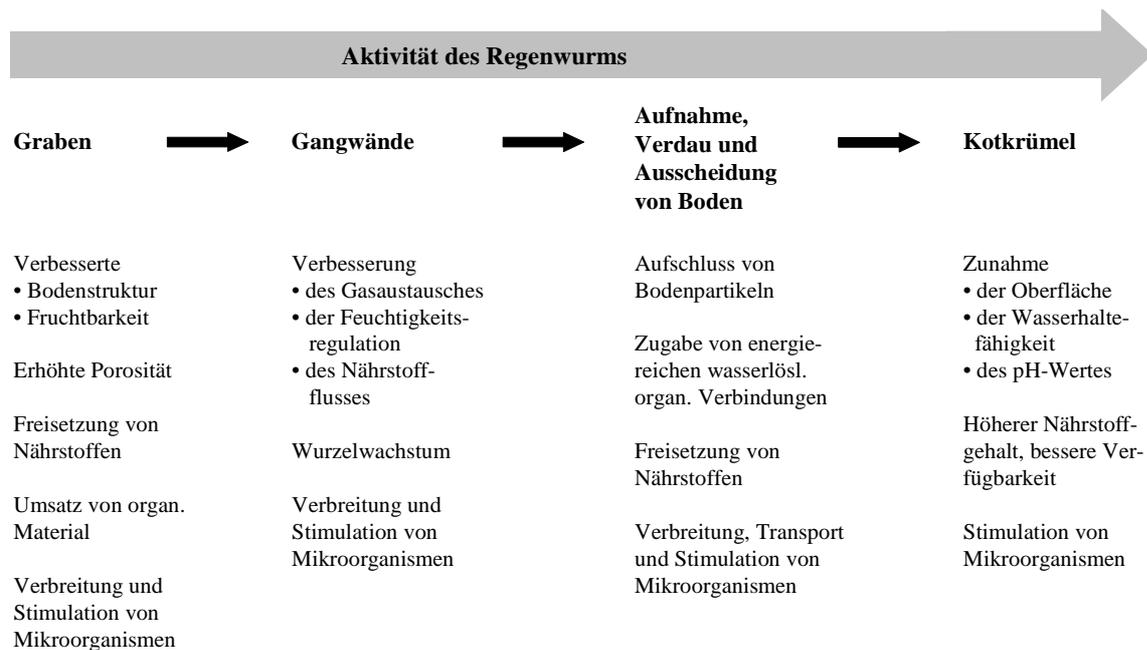


Abbildung 71: Biologische, chemische und physikalische Effekte von Regenwürmern auf terrestrische Habitate. Modifiziert nach Römbke *et al.*, (2005) und Hickman & Reid (2008).

Die beobachtete 2,4-DCP Abnahme im landwirtschaftlichen Boden kann durch eine Vielzahl an Prozessen bedingt sein. Mineralisierung, Bioakkumulation in das Regenwurmgewebe, Sorption an die Bodenmatrix sowie die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen, die eine Assimilation in mikrobielle Biomasse einschließt, können potentiell zu einem Verschwinden des eingesetzten 2,4-DCP beitragen (Hägglom, 1992; Vangestel & Ma, 1993; Frankki *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden

Arbeit zeigte Bioakkumulation von 2,4-DCP in das Regenwurmgewebe war mit 5 % bis 7 % gering (Abbildung 21) und unterstützt die Beobachtungen von Vangestel & Ma (1993), die ebenfalls geringe Bioakkumulationsfaktoren für Dichlorphenole in Regenwurmversuchen nachwiesen. Zusätzlich zu dieser Studie konnten Shan *et al.* (2014) für den anözischen Regenwurm *Metaphire guillelmi* eine Bioakkumulation von etwa 1 % des initial eingesetzten Catechols zeigen. Durchgeführte 2,4-DCP Mineralisierungsversuche mit Regenwurmgewebe führten zu dem Ergebnis, dass es unter oxischen Bedingungen zu keinem Abbau von 2,4-DCP kommt (Abbildung 22). Basierend auf diesen Daten ist anzunehmen, dass die Bioakkumulation von 2,4-DCP im Verlauf der Bodensäuleninkubation eine eher untergeordnete Rolle spielt und für die detektierte 2,4-DCP Abnahme von geringer Bedeutung ist. Regenwürmer verändern durch ihre Grabtätigkeit und ihr Fraßverhalten physikalische und chemische Bodenparameter. Die Sorption von Chlorphenolen und anderen Xenobiotika kann durch die Gegenwart von Regenwürmern stimuliert werden und führt infolgedessen zu einer Veränderung der Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen in der Drilosphäre (Bolan & Baskaran, 1996; Farenhorst *et al.* 2001; Binet *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2011). Demzufolge ist es möglich, dass die beobachtete Abnahme der 2,4-DCP Konzentration in Regenwurm-supplementierten Bodensäulen (Abbildung 17) sowie oxischen Mikrokosmen mit feldfrischem Boden (Abbildung 20) zum Teil auf Sorptionsprozesse zurückgeführt werden kann. Dieser Annahme stehen jedoch eine Erhöhung der initialen 2,4-DCP Mineralisierung und eine verstärkte Bildung von nicht-extrahierbaren 2,4-DCP Rückständen in Regenwurm-vorbehandelten Proben nach Inkubation in oxischen Mikrokosmen gegenüber (Abbildung 18, Tabelle 29). Als nicht-extrahierbare Rückstände werden die an organische Bodenbestandteile adsorbierten (xenobiotischen) Verbindungen und deren primäre Abbauprodukte bezeichnet (Senesi, 1992; Barriuso *et al.*, 2008). Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass nicht-extrahierbare Rückstände ihren Ursprung auch in biogenen Verbindungen wie Fett- und Aminosäuren haben können (Nowak *et al.*, 2011; Nowak *et al.*, 2013). Die Bildung solcher nicht-extrahierbaren Rückstände ist dabei im wesentlichen von der Struktur der organischen Bodenbestandteile, den physiko-chemischen Eigenschaften der eingetragenen Verbindung, dem Vorhandensein extrazellulärer oxidativer Enzyme sowie der Aktivität der Bodenmikroorganismen abhängig (Botterweck *et al.*, 2014). Der Anteil an nicht-extrahierbaren 2,4-DCP Rückständen in sterilem und nicht-sterilem Boden wurde durch Benoit & Barriuso (1997) nach 21 Tagen Inkubation bestimmt. Es wurde gezeigt, dass im unsterilen Boden etwa 50 % des initial eingesetzten 2,4-DCP-[C] als nicht-extrahierbare Rückstände vorliegen, wohingegen steriler Boden kaum Spuren dieser Rückstände aufwies. Die im unsterilen Boden nachgewiesenen nicht-extrahierbaren 2,4-DCP Rückstände setzen sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit aus 2,4-DCP-[C]-haltigen Amino- und Fettsäuren zusammen, die durch 2,4-DCP-[C] assimilierende Mikroorganismen gebildet wurden. Diese Organismen tragen folglich zu einem Abbau

von 2,4-DCP sowie zur Bildung von organischen Bodenbestandteilen nach dem Zelltod bei (Benoit & Barruiso, 1997; Miltner *et al.*, 2011; Nowak *et al.*, 2011). Der in der vorliegenden Arbeit angewandte „CAP-SIP“-Ansatz konnte eine mikrobielle Assimilation von 2,4-DCP-[C] in Bodensäulen und Mikrokosmen eindeutig belegen (Abbildung 58, Abbildung 59). Die gesammelten Daten lassen letztendlich den Schluss zu, dass (a) im landwirtschaftlichen Boden sowie in der Drilosphäre eine mikrobielle 2,4-DCP Mineralisierung und eine Assimilation des 2,4-DCP-[C] stattfindet und (b) die Anwesenheit von Regenwürmern die 2,4-DCP Abnahme in Bodensäulen aufgrund einer erhöhten 2,4-DCP Mineralisierung und Assimilation durch entsprechende Mikroorganismen stimuliert.

Unabhängig von der Gegenwart des endogäischen Regenwurms *A. caliginosa* wurden in der vorliegenden Arbeit 2,4-DCP Abbauprobversuche in Form von Bodenaufschlammungen mit feldfrischem Boden aus Scheyern durchgeführt, um ein mögliches Abbaupotential abschätzen zu können. Die beobachtete 2,4-DCP Abnahme erfolgte dabei ohne Verzögerung bei gleichzeitiger Bildung von CO₂ (Abbildung 13). Mitgeführte sterile Kontrollen sowie Kontrollansätze mit Kaliumcyanid zeigten hingegen keinen nennenswerten 2,4-DCP Abbau sowie CO₂-Bildung (Abbildung 14). Ein biologischer Abbau von 2,4-DCP ist somit anzunehmen. Diese Annahme wird durch ¹⁴C-Mineralisierungsversuche gestützt, die eine Mineralisierung von etwa 40 % des initial eingesetzten 2,4-DCP nach 130 Tagen Inkubation in unbehandeltem Boden zeigten (Daten nicht gezeigt). Die gewonnenen Ergebnisse sind dabei konsistent mit anderen Studien, die eine aufgetretene 2,4-DCP Mineralisierung im Bereich von 19% bis 39 % des eingesetzten 2,4-DCPs beschreiben (Shaw & Burns, 1998; Boucard *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2007). Der Abbau bzw. die Mineralisierung von 2,4-DCP in feldfrischem Ackerboden verweist auf das Potential eines 2,4-DCP Katabolismus, das sehr wahrscheinlich durch das Vorkommen von 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen bedingt ist (Shaw & Burns, 1998; Boucard *et al.*, 2005). Eine Reihe an Bodenmikroorganismen, die in unkontaminierten Böden detektiert wurden, besitzen eine durch *tfdB*-kodierte 2,4-DCP Hydroxylase (Vallaeyts *et al.*, 1996; Kamagata *et al.*, 1997). Solch eine weite Verbreitung dieser Enzymes könnte zum einen ihren Ursprung in der Tatsache haben, dass unterschiedliche Pflanzen phenolische Verbindungen synthetisieren (Perestrelo *et al.*, 2012; Gevrenova *et al.*, 2013), die als strukturelle Analoga für 2,4-DCP fungieren. Zum anderen können die für einen 2,4-DCP Abbau verantwortlichen Gene auch mittels horizontalem Gentransfer übertragen werden (Neilson *et al.*, 1994; Huong *et al.*, 2007).

Landwirtschaftliche Böden sind in der Regel belüftete und wasserungesättigte Habitate, in denen oxische und anoxische Mikrozonen parallel vorliegen können. Die Verteilung

und Größe dieser Mikrozonen sind dabei sehr variabel und unterliegen einem raschen Wandel (Zausig *et al.*, 1993; Totsche *et al.*, 2010). Solch eine Kompartimentierung ermöglicht es, dass aerobe sowie anaerobe Bodenmikroorganismen nebeneinander bestehen und eingetragene (xenobiotische) Verbindungen zeitgleich durch beide Gruppen transformiert oder abgebaut werden können. Der mikrobielle Abbau von 2,4-DCP in Abwesenheit von Sauerstoff wurde für Süßwassersedimente und methanogenen Schlamm in Gegenwart verschiedener terminaler Elektronenakzeptoren beschrieben (Kohring *et al.*, 1989 a & b; Zhang & Wiegel, 1990; Takeuchi *et al.*, 2000). In welchem Maße landwirtschaftlicher Boden aus Scheyern zu einem anaeroben 2,4-DCP Abbau befähigt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Bodenaufschlammungen und unterschiedlichen terminalen Elektronenakzeptoren (Nitrat, Eisen (III) sowie Sulfat) überprüft. Dabei konnte für alle Ansätze im Verlauf der Inkubation eine Abnahme der 2,4-DCP Konzentration beobachtet werden (Abbildung 16). Mögliche Abbauprodukte wie 4-Chlorphenol, Phenol oder Methan wurden jedoch nicht detektiert. Unter denitrifizierenden Inkubationsbedingungen wurde unabhängig von der Gegenwart des eingesetzten 2,4-DCP sowie zusätzlicher Kohlenstoffquellen eine N₂-Bildung beobachtet (Abbildung 15, Abbildung 16). Sulfat und Eisen (III) wurden im Vergleich zum Nitrat nur teilweise und zeitlich verzögert reduziert (Abbildung 16). Die reduktive Dechlorierung, der initiale Schritt des anaeroben 2,4-DCP Abbaues, beschreibt die schrittweise Entfernung der Chlorsubstituenten und führt im Falle von 2,4-DCP zur Entstehung von Phenol, das anschließend als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Wachstum eingesetzt werden kann (Field & Sierra- Alvarez, 2008). Dieser Prozess unterliegt jedoch dem Einfluss unterschiedlichster Faktoren (Mohn & Tiedje, 1992; Pavlostathis *et al.*, 2003). So ist die Art und Konzentration des alternativen Elektronenakzeptors ebenso entscheidend wie die gewählte Inkubationstemperatur, die Bioverfügbarkeit des eingesetzten Substrates, zusätzliche Nährstoffe wie Zucker oder Aminosäuren sowie das Auftreten spezifischer metabolischer Inhibitoren wie Bromethan und Molybdat (Kohring *et al.*, 1989b; Zhang & Wiegel, 1990; Sanford & Tiedje, 1996; Häggblom *et al.*, 2000; Warner *et al.*, 2002). Weiterhin kann die Art der Inkubation (z.B. starkes Schütteln) den Verlauf der Reaktion beeinflussen (Juteau *et al.*, 1995). Der abschließende Schritt des anaeroben 2,4-DCP Abbaus umfasst, im Rahmen der Methanogenese, die Umwandlung von CO₂ und Wasserstoff sowie von Acetat zu Methan. Dieses Produkt konnte in keiner der anoxischen Bodenaufschlammungen nachgewiesen werden. Möglicherweise spielen dabei die eigentlich oxische Herkunft des eingesetzten Bodens und das Vorhandensein anderer alternativer Elektronenakzeptoren wie Nitrat und Eisen eine nicht unerhebliche Rolle für eine Inhibition der Methanogenese (Schellenberger *et al.*, 2009). Zusätzlich können im Verlauf einer sogenannten Dehalorespiration Elektronen von Wasserstoff und/ oder Acetat auf 2,4-DCP als Elektronenakzeptor übertragen werden (Utkin *et al.*, 1994), was die Verfügbarkeit dieser Verbindungen für die Methanogenese einschränkt. Das Fehlen

möglicher Abbauprodukte kann andererseits auch auf eine stattgefundene Assimilation von 2,4-DCP-[C] hinweisen. Bislang gibt es jedoch noch keine wissenschaftlichen Studien, die eine Stabile Isotopenbeprobung mit 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen durchgeführt haben. Eine Aussage über eine eventuelle Assimilation in Abwesenheit von Sauerstoff ist daher nicht möglich.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass ein anaerober 2,4-DCP Abbau im natürlicherweise überwiegend belüfteten landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern in Gegenwart der alternativen Elektronenakzeptoren Nitrat, Eisen und Sulfat stattfinden kann, der aber im Vergleich zum aeroben Abbau langsamer und weniger effizient abläuft. Diese Daten wie auch die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen (vgl. 3.3.3.1.2.) führten zu dem Entschluss, den Stablen Isotopenversuch unter oxischen Bedingungen durchzuführen.

4.2. Aktive 2,4-DCP-[C]-assimilierende mikrobielle Gemeinschaft

4.2.1. „Cross-Feeding“ – Limitation oder neue Möglichkeiten?

Die Methode der Stablen Isotopenbeprobung (SIP) ermöglicht es unkultivierte Mikroorganismen, die an spezifischen Abbauprozessen von natürlichen sowie anthropogen-erzeugten Verbindungen beteiligt sind, zu identifizieren (Manefield *et al.*, 2004). Voraussetzung dafür ist, dass der Katabolismus eines ^{13}C -markierten Substrates an den Anabolismus von ^{13}C -markierten Nukleotiden gekoppelt wird (Dumont *et al.*, 2011). Die Interpretation von SIP-Versuchen und den daraus resultierenden Ergebnissen wird jedoch durch das Auftreten von „Cross-Feeding“ erschwert (Neufeld *et al.*, 2007). Im Verlauf dieses Prozesses werden Taxa, die nicht direkt das markierte Substrat sondern ein durch die primären Abbauer produziertes Abbauprodukt assimilieren, markiert (Dumont & Murrell, 2005). Um die Wahrscheinlichkeit eines solchen „Cross-Feedings“ im Verlauf der Bodensäuleninkubation zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit (a) eine *in situ* relevante, d.h. geringe 2,4-DCP Konzentration eingesetzt, (b) auf eine Belüftung der Bodensäulen und, damit verbunden, auf einen Austausch von $^{13}\text{CO}_2$ mit atmosphärischen $^{12}\text{CO}_2$ geachtet, (c) die Inkubation der Bodensäulen nach komplettem Verbrauch von 2,4-DCP sofort beendet und somit die Inkubationszeit minimiert und (d) die Identifizierung aktiver, am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Bakterien auf Basis eines RNA-SIPs durchgeführt. Die Inkubation des vorbehandelten Materials als Bodenaufschlammungen in Mikrokosmen konnte aufgrund des geringeren Probenvolumens hingegen nicht unter *in situ* relevanten Bedingungen erfolgen. Obwohl somit die Wahrscheinlichkeit eines „Cross-

Feedings“ erhöht ist, bieten Mikrokosmen-basierte SIP Untersuchungen die Möglichkeit neue und bislang nicht detektierte 2,4-DCP Abbauer anzureichern und zu identifizieren (Liu *et al.*, 2011b; Dallinger & Horn, 2014).

Auf der anderen Seite ermöglicht ein „Cross-Feeding“ die Beschreibung und Charakterisierung mikrobieller Nahrungsnetze und Kohlenstoffflüsse, die auch *in situ* auftreten können. Park & Ka (2003a, b) isolierten Bakterien der Gattungen *Sphingomonas* und *Herbaspirillum* aus landwirtschaftlichem Boden, die nur syntroph in der Lage sind die Phenoxyalkansäure-Herbizide MCPA und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) abzubauen. Basierend auf diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass ein „Cross-Feeding“ unter Laborbedingungen nie ganz ausgeschlossen werden kann, wurden detektierte Taxa, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit 2,4-DCP-[¹³C] assimilierten, als Teil der 2,4-DCP-abbauenden bakteriellen Gemeinschaft betrachtet, die aktiv zur Detoxifizierung von 2,4-DCP im Boden und der Drilosphäre beitragen.

4.2.2. Metabolisch aktive 2,4-DCP-verwertende *Bacteria* im Boden und der Drilosphäre

Eine Vielzahl an unterschiedlichen prokaryotischen Taxa assimilierte 2,4-DCP-[¹³C] im Verlauf der Bodensäulen- bzw. Mikrokosmeninkubation unter oxischen Bedingungen. Insgesamt konnten 18 Taxa (Familien-Ebene) aus den Phyla der *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* sowie *Acidobacteria* als aktive 2,4-DCP-[¹³C] Verwerter identifiziert werden (Abbildung 58, Abbildung 59).

Flavobacteriaceae- und *Cytophagaceae*-verwandte Taxa wurden ausschließlich in Regenwurm-beeinflussten Bodenproben sowie in Kotkrümeln von *A. caliginosa* als dominante 2,4-DCP-[¹³C] Verwerter detektiert (Abbildung 58, Abbildung 59). Vertreter dieser Familien sind in der Regel aerobe bis mikroaerophile Organismen, die ubiquitär in terrestrischen und aquatischen Habitaten nachweisbar und am Abbau zahlreicher Biopolymere beteiligt sind (Stanier, 1940; Bernardet *et al.*, 1996). *Flavobacteriaceae*-verwandte Taxa konnten im Darm des Zuckerrohr-Rüsselkäfers *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae; Rinke *et al.*, 2011), im Gastrointestinaltrakt des Holzverwertenden Schwarzlinien-Harnischwels *Panaque nigrolineatus* (McDonald *et al.*, 2012) sowie im Darminhalt und Kotkrümeln von anözischen und endogäischen Regenwürmern detektiert werden (Horn *et al.*, 2005; Nechitaylo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011b; Bernard *et al.*, 2012). *Flavobacteriaceae*- und *Cytophagaceae*-zugeordnete Taxa wurden aus Schwermetall- und Pestizidbelasteten Böden, Sedimenten sowie Grundwasser isoliert, wobei einige dieser Isolate befähigt sind, polyzyklische

aromatische Kohlenwasserstoffe und Chlorphenole abzubauen (Männistö *et al.*, 1999; Pires *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2014; Khianngam *et al.*, 2014). Molekulare Untersuchungen zeigten das Vorkommen des am 2,4-D Abbau beteiligten Plasmids pRC10 mit den strukturellen Genen *tfdA* und *tfdB* in *Flavobacterium* sp. (Chaudry & Huang, 1988). Watanabe *et al.* (1998) amplifizierten zudem ein Teilfragment einer Mehrkomponenten Phenolhydroxylase aus *Cytophaga* sp., die potentiell am Abbau von 2,4-DCP beteiligt sein kann. Dennoch fehlen bislang Hinweise auf eine direkte Beteiligung *Flavobacteriaceae*- und *Cytophagaceae*-verwandter Taxa am Abbau von *in situ* relevanten 2,4-DCP Konzentrationen in Böden. Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte gehäufte Vorkommen 2,4-DCP-¹³C-verwertender Bakterien des Phylums *Bacteroidetes* in Regenwurm-beeinflussten Proben verdeutlicht, dass *Flavobacteriaceae* und *Cytophagaceae* wichtige und bisher unterschätzte „Mitglieder“ in der 2,4-DCP-[C]-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft im Boden darstellen.

In Bodensäulen und Mikrokosmen wurden nach Inkubation mit 2,4-DCP in An- oder Abwesenheit von Regenwürmern am häufigsten die den *Proteobacteria* zugeordneten Familien *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae* und *Comamonadaceae* detektiert (Abbildung 58, Abbildung 59). Vertreter dieser gramnegativen Familien sind als aerobe Verwerter aromatischer Verbindungen ausführlich beschrieben und weisen ein breites Spektrum Xenobiotika-abbauender Enzyme auf (Schwien *et al.*, 1988; Häggblom, 1992; Müller *et al.*, 2004; Cupples & Sims, 2007; Huong *et al.*, 2007; Suzuki & Hiraishi, 2007; Liu *et al.*, 2013). Regenwurm-beeinflusste Proben nach Bodensäuleninkubation, mit Ausnahme der Kotkrümel, wurden von *Pseudomonas*-verwandten Taxa (93- 98 % 16S rRNA Genähnlichkeit) dominiert. Aufgrund der metabolischen Vielseitigkeit und des großen Anpassungspotentials sind Bakterien der Gattung *Pseudomonas* in der Umwelt weit verbreitet (Palleroni, 1992; Dos Santos *et al.*, 2004). Natürliche und synthetische aromatische Substanzen können durch verschiedene *Pseudomonas*-Arten transformiert und abgebaut werden. Phenolhydroxylasen wurden u.a. in *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. corrugata* und *P. stutzeri* nachgewiesen (Peters *et al.*, 1997; Heinaru *et al.*, 2000; Futamata *et al.*, 2001). Die Fähigkeit mit 2,4-D und 2,4-DCP als alleinige Kohlenstoffquellen zu wachsen und der Besitz der dafür erforderlichen Enzyme (Evans *et al.*, 1971; Tyler & Finn, 1974; Kilpi *et al.*, 1980; Greer *et al.*, 1990; Radjendirane *et al.*, 1991; Bhat *et al.*, 1994; Lillis *et al.*, 2010) bestätigen die Annahme, dass Vertreter der Gattung *Pseudomonas* wichtige 2,4-DCP-[C] Verwerter in den in dieser Arbeit untersuchten Bodensäulen darstellen. Die zu den *Sphingomonadaceae* gehörenden Gattungen *Novosphingobium* und *Sphingomonas* nutzten 2,4-DCP-¹³C und wurden während der Inkubation in Mikrokosmen mit erhöhten 2,4-DCP Konzentrationen angereichert (Abbildung 58, Abbildung 59). Alphaproteobakterielle *Sphingomonadaceae*, vor allem Arten der Gattung *Sphingomonas*, sind in der Lage, eine Vielzahl

an unterschiedlichen aromatischen Verbindungen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und tragen auf diesem Weg zum Abbau teils toxischer Schadstoffe bei (White *et al.*, 1996; Tirola *et al.*, 2002). *Sphingomonas herbicidovorans* ist befähigt verschiedene Phenoxyalkansäure-Herbizide wie 2,4-D, MCPA, Mecoprop sowie Dichlorprop mit Hilfe der spezifischen Enzyme R/SdpA, TfdB und DccA abzubauen (Kohler, 1999; Müller *et al.*, 2004). Lang *et al.* (2005) konnten durch *tfdC*- und *tfdC2*-kodierte Chlorocatechol 1,2-Dioxygenasen in *Sphingomonas* sp. TFD44 detektieren. Alphaproteobakterielle Oxygenasegene (u.a. *tfdA* und *cadA*) sind zudem nachweislich quantitativ mit einem MCPA Abbau in Drilosphären- und Bodenproben verknüpft (Zaprasis *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2013). ¹³C-markierte betaproteobakterielle *Comamonadaceae*-verwandte Taxa wurden den Gattungen *Comamonas*, *Variovorax*, *Polaromonas* sowie *Ideonella* (92- 99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) zugeordnet. Das eisenreduzierende Bakterium *Comamonas koreensis* CY01 ist in der Lage, 2,4-D über eine reduktive Dechlorierung zu 4-Chlorphenol umzuwandeln (Wu *et al.*, 2010). *Variovorax*-verwandte Taxa konnten nach Inkubation mit 5 mM [¹³C]-2,4-DCP als dominante Verwerter und Primärabbauer mittels DNA-SIP identifiziert werden (Neumann *et al.*, 2014). Für verschiedene *Polaromonas*-Arten wurde ein Abbau von umweltrelevanten organischen Verbindungen beschrieben. Die Assimilation von ¹³C-markiertem Kohlenstoff aus Toluol sowie Benzol durch *Polaromonas* sp. (Sun *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011) konnte ebenso wie ein Abbau von Naphthalen durch *P. naphthalenivorans* (Jeon *et al.*, 2004) gezeigt werden. Dennoch, direkte Hinweise auf ein Wachstum mit und / oder eine Assimilation von *in situ* relevanten 2,4-DCP Konzentrationen durch *Polaromonas*- und *Ideonella*-verwandten Taxa gibt es bislang nicht. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen legen somit die Vermutung nahe, dass zusätzlich zu den bereits bekannten 2,4-DCP-abbauenden *Comamonadaceae* noch weitere Vertreter dieser Familie befähigt sind, 2,4-DCP-[C] zu assimilieren.

Die den *Deltaproteobacteria* zugeordneten Familien *Polyangiaceae* und *Geobacteraceae* wurden in Kotkrümeln nach Inkubation in Bodensäulen bzw. in Bodenproben ohne Regenwurmeinfluss nach Inkubation in Mikrokosmen als 2,4-DCP-[¹³C] Assimilierer identifiziert (Abbildung 58, Abbildung 59). *Polyangiaceae* werden zu den Myxobakterien gezählt; ubiquitär verbreitete, gleitende, aerobe heterotrophe Bakterien, die durch die Fähigkeit Biomakromoleküle abzubauen, gekennzeichnet sind (Reichenbach & Dworkin, 1992). Mit Hilfe hydrolytischer Exoenzyme ernähren sich einige Vertreter *in situ* von anderen Bakterien und Hefen und werden aufgrund dieser Lebensweise auch als „Mikroräuber“ bezeichnet (Singh, 1947). Es besteht somit die Möglichkeit, dass *Polyangiaceae*-verwandte Taxa im Verlauf der Bodensäuleninkubation über den Abbau ¹³C-markierter Biomasse markiert wurden. Andererseits

konnte für *Anaeromyxobacter dehalogenans* eine reduktive Dehalogenierung von 2-Chlorphenol (Strycharz *et al.*, 2010) sowie ein Wachstum mit 2,6- und 2,5-Dichlorphenol (Sanford *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Eine direkte Beteiligung *Polyangiaceae*-verwandter Taxa am Abbau von 2,4-DCP kann insofern nicht ganz ausgeschlossen werden. *Geobacteraceae*-verwandte Taxa wurden ausschließlich in Regenwurm-unbehandelten Bodenproben nach Mikrokosmeninkubation als aktive 2,4-DCP-[¹³C] Verwerter detektiert. Vertreter dieser eisenreduzierenden Familie sind in anoxischen Sedimenten weit verbreitet, wo sie ein breites Spektrum aromatischer Verbindungen wie Benzol, Toluol und Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Zhang *et al.*, 2014; Kunapuli *et al.*, 2010; Schleinitz *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten Duldhardt *et al.* (2007), dass *Geobacter sulfurreducens* in Gegenwart von 2,4-DCP zum Wachstum befähigt ist. Der Nachweis von reduktiven Dehalogenasen in *Geobacter lovleyi* im Rahmen einer Genomanalyse (Wagner *et al.*, 2012) legt die Vermutung nahe, dass *Geobacteraceae*-verwandte Taxa möglicherweise das in den tieferen, sauerstoffärmeren Bodenschichten der Bodensäulen durch eine reduktive Dechlorierung aus 2,4-DCP gebildete Phenol verwerten und somit Teil der aktiven 2,4-DCP-[¹³C] verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft sind.

Clostridiaceae, *Peptococcaceae* und *Bacillaceae* aus dem Pylum der *Firmicutes* wurden vor allem im Darminhalt, den Kotkrümeln sowie in Bodenproben mit bzw. ohne Regenwurmeinfluss nach der Bodensäuleninkubation detektiert (Abbildung 58, Abbildung 59). ¹³C-markierte *Bacillaceae*-verwandte Taxa wurden ausschließlich der Gattung *Bacillus* (95-99 % 16S rRNA Genähnlichkeit) zugeordnet. Nach derzeitigem Stand umfasst die Gattung *Bacillus* mehr als 200 endosporenbildende Arten (Euzéby, 2010), deren Stoffwechsel in der Regel obligat aerob oder fakultativ aerob sind. *Bacillus*-Arten sind ubiquitär in terrestrischen und aquatischen Habitaten verbreitet und weisen ein breites Enzymspektrum für den Abbau (komplexer) organischer Verbindungen auf (Logan & De Vos, 2009). Eine Beteiligung am Abbau von organischen Schadstoffen wie 2,4-DCP, Profenofos, Naphthalen und 4-Chlor-2-nitrophenol (Wang *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2002; Matafonova *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2008; Arora, 2012; Salunkhe *et al.*, 2013) konnte für eine Reihe an *Bacillus*-Arten ebenso gezeigt werden, wie das Vorkommen der dafür verantwortlichen Enzyme (Kim & Oriel, 1995; Duffner & Müller, 1998; Kirchner *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2014). *Bacillaceae*-verwandte Taxa wurden im Intestinaltrakt, Darminhalt und Kotkrümeln von Regenwürmern detektiert (Hong *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011b; Schulz *et al.*, 2015). Im Zuge der Passage durch den Regenwurmverdauungstrakt kann es zu einer Keimungsstimulation der im Boden vorkommenden Bacilli-Endosporen kommen (Fischer *et al.*, 1997), infolgedessen sich die Abundanzen *Bacillaceae*-verwandter Taxa in Regenwurm-beeinflussten Bereichen erhöht. Vertreter der Familien *Clostridiaceae*

und *Peptococcaceae* sind in der Regel obligate Anaerobier, die zum Teil Sauerstoff tolerieren können (Ezaki, 2009; Wiegel, 2009). Tiefere Schichten der Bodensäulen sowie Kotkrümel wiesen im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben einen höheren Wasseranteil auf, was die Bildung von anoxischen Mikrohabitaten stimulieren kann (Zausig & Horn, 1992). Der Darm von Regenwürmern ist anoxisch und bietet daher ideale Bedingungen für aufgenommene heterotrophe Bodenbakterien, die zu einer Anaerobiose befähigt sind (Horn *et al.*, 2003 & 2005; Drake & Horn, 2007; Wüst *et al.*, 2009b & 2011). In der Tat konnten *Clostridiaceae*-verwandte Taxa als aktive Anaerobier im Darm von *Lumbricus terrestris* identifiziert werden (Schmidt *et al.*, 2011; Wüst *et al.*, 2011). Der mikrobielle Abbau von 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen, d.h. eine reduktive Dechlorierung mit Phenol als Intermediat, wurde in Süßwassersedimenten und Schlammproben nachgewiesen (Zhang & Wiegel, 1990; Takeuchi *et al.*, 2000). *Clostridiaceae*- und *Peptococcaceae*-verwandte Taxa sind zu (reduktiven) Dechlorierungsprozessen befähigt (Madsen & Licht, 1992; Utkin *et al.*, 1994; Bao *et al.*, 2012). Die Gattungen *Desulfitobacterium* und *Dehalobacter* (beide *Peptococcaceae*) sind zudem in der Lage Chlorethene, Chlorbenzene sowie Chlorphenole im Rahmen der Dehalorespiration als Elektronenakzeptoren zu verwenden (Utkin *et al.*, 1994; Holliger *et al.*, 1999; Breitenstein *et al.*, 2001; Van de Pas *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2011; Vandermeeren *et al.*, 2014). Eine 16S rRNA Sequenzähnlichkeit von nur 91 % für *Pelotomaculum*-verwandte 2,4-DCP-[C] Verwerter (Tabelle 47, Tabelle 48) verweist auf phylogenetisch neue Organismen innerhalb der *Peptococcaceae*, die zusammen mit bereits bekannten anaeroben *Firmicutes* ein Teil der mikrobiellen 2,4-DCP-abbauenden Gemeinschaft in anoxischen Mikrozonon bilden.

In Mikrokosmen nach Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP wurde in Gangwandproben sowie in Regenwurm-beeinflussten Bodenproben der oberen 5 cm die den *Acidobacteria* zugeordnete Familie *Holophagaceae* detektiert (Abbildung 58, Abbildung 59). ¹³C-markierte *Holophagaceae*-verwandte Taxa konnten ausschließlich *Geothrix fermentans* (91- 98 % 16S rRNA Genähnlichkeit) zugeordnet werden. *G. fermentans* gilt als strikter Anaerobier, der in Gegenwart unterschiedlichster organischer Säuren wie Acetat, Propionat und Laktat als Elektronendonatoren und Eisen (III) als Elektronenakzeptor wachsen kann (Coates *et al.*, 1999). Bislang gibt es jedoch keine direkten Hinweise darauf, dass *Geothrix*-verwandte Taxa am Abbau von Schadstoffen beteiligt sind. Bakterien des Phylums *Acidobacteria* sind weit verbreitet. Entsprechende 16S rRNA Sequenzen wurden in Süßwasser, Wald- und Wüstenböden, Klärschlamm, mikrobiellen Matten heißer Quellen sowie in der Käferschnecke *Acanthopleura japonica* und im Asiatischen Eschenprachtkäfer *Agrilus planipennis* nachgewiesen (Barns *et al.*, 1999; Layton *et al.*, 2000; Chanal *et al.*, 2006; Fukunga *et al.*, 2008; Vasanthakumar *et al.*,

2008; Foesel *et al.*, 2014). Obwohl *Acidobacteria* weltweit vertreten sind und ihre phylogenetische Breite mit dem Phylum der *Proteobacteria* vergleichbar ist, konnten bisher nur wenige Vertreter als Reinkultur isoliert und beschrieben werden (Eichorst *et al.*, 2007; Foesel *et al.*, 2013). *Holophaga foetida*, ein homoacetogener Vertreter aus der Familie der *Holophagaceae*, wurde unter anaeroben Bedingungen aus Süßwasserschlamm isoliert und ist in der Lage, aromatische Verbindungen wie 5-Hydroxyvanillat und Pyrogallol zu Acetat abzubauen (Liesack *et al.*, 1994). Die Genomanalyse dreier Acidobakterien lässt vermuten, dass eine Reihe von einfachen Zuckern, aber auch komplexe Substrate wie Cellulose und Chitin als Kohlenstoffquellen dienen können (Ward *et al.*, 2009). Regenwurmangänge sind im Vergleich zum umliegenden Boden mit organischem Material angereichert und könnten somit für Acidobakterien ein geeignetes Habitat darstellen. Die Markierung mit 2,4-DCP- ^{13}C in Gangwänden und Regenwurm-beeinflussten Bodenproben indiziert die Gegenwart aktiver Acidobakterien und deutet an, dass Vertreter der *Acidobacteria* mit großer Wahrscheinlichkeit eine bedeutende, bisher unentdeckte Rolle beim mikrobiellen (Schad)Stoffumsatz in der Drilosphäre spielen.

4.3. Diversität und Abundanz potentiell 2,4-DCP-verwertender Bakterien

Der landwirtschaftliche Boden aus Scheyern besitzt die Fähigkeit 2,4-DCP in An- und Abwesenheit von Sauerstoff und Regenwürmern abzubauen (Abbildung 13, Abbildung 17, Abbildung 46). Die daran beteiligten Mikroorganismen konnten im Rahmen einer kultivierungsunabhängigen Stablen Isotopenbeprobung (SIP) identifiziert werden (vgl. 3.4.). In Ergänzung zu dieser Methode wurde die potentiell 2,4-DCP-abbauende mikrobielle Gemeinschaft qualitativ sowie quantitativ mittels Anreicherung, Genmarkeranalyse, Keimzahlbestimmung und qPCR charakterisiert (vgl. 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3.).

4.3.1. Kultivierungsabhängige Analyse 2,4-DCP tolerierender oder potentiell abbauender Bakterien

Mögliche *in situ* relevante 2,4-DCP-abbauende Mikroorganismen wurden unter oxidischen und anoxischen Bedingungen isoliert. Ein Großteil der Isolate konnte den bereits im Rahmen des SIP-Versuches als 2,4-DCP-[C] Verwerter identifizierten Familien der *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae* sowie *Flavobacteriaceae* zugeordnet werden. Neben diesen Familien wurden Vertreter

der *Oxalobacteraceae* (nächst verwandte Gattung: *Janthinobacterium*), der *Enterobacteriaceae* (nächst verwandte Gattungen: *Serratia* und *Enterobacter*) und der *Xanthomonadaceae* (nächst verwandte Gattungen: *Luteibacter* und *Stenotrophomonas*) isoliert.

Die zu den *Betaproteobacteria* gehörenden Isolate wurden ausschließlich *Janthinobacterium lividum* (99-100 % 16S rRNA Genähnlichkeit) zugeordnet (Tabelle-AH 4, Tabelle-AH 5). *J. lividum* ist ein gramnegatives aerobes Bakterium, das durch seine dunkelviolette Färbung charakterisiert ist und am Abbau verschiedenster Biopolymere beteiligt sein kann (Gleave *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2008). *J. lividum* ist in der Lage auf Toluol zu wachsen und co-metabolisch Trichlorethen abzubauen (Fries *et al.*, 1997). Weiterhin wurden die für den Abbau des Herbizides Terbutylazin benötigten Enzyme in einem aus Grundwasser isolierten *J. lividum* amplifiziert (Barra Caracciolo *et al.*, 2010). Vertreter der Gattung *Janthinobacterium* konnten nach Inkubation mit bis zu 25 mg pro Liter MCPA in Sedimentproben nachgewiesen werden (Gözdereliler *et al.*, 2013). Inwieweit die den *Janthinobacterium*-zugeordneten Isolate in der Lage sind 2,4-DCP zu tolerieren, wurde anhand eines Toxizitätstestes bestimmt (vgl. 2.5.2.3.). Dabei zeigte sich, dass auch bei erhöhten 2,4-DCP Konzentrationen von bis zu 0,16 g pro Liter ein Wachstum in Gegenwart von Glukose möglich ist (Abbildung 24). Ob die *Janthinobacterium*-zugeordneten Isolate befähigt sind, 2,4-DCP zu mineralisieren, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mehr untersucht werden. Vertreter der gammaproteobakteriellen Familien *Enterobacteriaceae* und *Xanthomonadaceae* sind ubiquitär in terrestrischen und aquatischen Habitaten verbreitet. Zudem treten einige Arten als Krankheitserreger bei Menschen, Tieren sowie Pflanzen auf (Grimont & Grimont, 2006). Während *Enterobacteriaceae* fakultativ aerobe Organismen sind, gelten *Xanthomonadaceae* hingegen als obligate Aerobier. Eine Vielzahl an Studien beschreibt die Fähigkeit von *Enterobacter*-, *Serratia*- und *Stenotrophomonas*-Arten (Chlor)Phenole sowie Polyhydroxyphenole wie Tannine abzubauen und als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können (Padmanabhan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Guzik *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011; Karn, 2014). *Luteibacter*-verwandte Arten wurden u.a. aus der Rhizosphäre von Gerste isoliert (Johansen *et al.*, 2005) und werden aufgrund ihrer für das Wurzelwachstum positiven Eigenschaften zu den Pflanzenwachstums-fördernden Bakterien („plant growth promoting bacteria“, PGPB) gezählt (Guglielmetti *et al.* 2013). Caliz *et al.* (2011) zeigten für *Luteibacter rhizovicina* eine hohe Resistenz gegenüber 2,4,6-Tri- und Pentachlorphenol und konnten zudem die Fähigkeit zum Abbau dieser Verbindungen nachweisen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden repräsentative Isolate aus den Familien der *Enterobacteriaceae* und *Xanthomonadaceae* auf ein mögliches 2,4-DCP Mineralisierungspotential untersucht. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen konnte jedoch keine nennenswerte CO₂-Bildung beobachtet werden (Abbildung 25). Da im Verlauf der Inkubation keine Abnahme der Optischen Dichte auftrat (Daten nicht

gezeigt), ist anzunehmen, dass *in situ* relevante 2,4-DCP Konzentrationen durch die eingesetzten Isolate dennoch toleriert werden können.

Neben Proteobakterien wurden im Rahmen der unterschiedlichen Anreicherungen mit 2,4-DCP auch Bakterien aus den Phyla der *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* isoliert (Abbildung 23). *Sphingobacteriaceae*-verwandte Isolate konnten ausschließlich der Gattung *Pedobacter* zugeordnet werden (Tabelle-AH 3), die nach derzeitigem Stand 49 beschriebene Arten umfasst (Euzéby, 2010). *Pedobacter*-verwandte Arten sind ubiquitär verbreitet und wurden aus Waldböden, Sedimenten, Kompost, Süßwasser und Gletschermaterial isoliert (An *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2014). Obwohl *Pedobacter*-zugeordnete Taxa nach einer Inkubation mit Phenol oder MCPA in Böden nachgewiesen wurden (Hutalle-Schmelzer *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011b), gibt es bislang keine direkten Hinweise auf eine Beteiligung an einem 2,4-DCP Abbau. Im Vergleich dazu sind Vertreter der actinobakteriellen Familien *Microbacteriaceae* und *Nocardiaceae* befähigt (chlor)phenolische und polyzyklische aromatische Verbindungen abzubauen und als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten (Kästner *et al.*, 1994; Finkel'shtein *et al.*, 2000; Trifonova *et al.*, 2008). Vor allem die obligat aeroben *Rhodococcus*-Arten (*Nocardiaceae*) sind in der Lage, umweltsistente Verbindungen wie Chlorbenzole, Nitro- und Chlorphenole, polychlorierte Biphenyle sowie Vinylchlorid abzubauen (Apajalathi & Salkinoja-Salonen, 1986; Häggblom *et al.*, 1989; Ewers *et al.*, 1990; Masai *et al.*, 1995; Witthuhn *et al.*, 2006). *R. erythropolis* mineralisiert 2,4-DCP in Konzentrationen von bis zu 50 mg pro Liter (Goswami *et al.*, 2002); *R. opacus* kann in Gegenwart von bis zu 120 mg 2,4-DCP pro Liter wachsen und diese Verbindung zu 3,5-Dichlorcatechol umwandeln (Finkel'shtein *et al.*, 2000). Aufgrund der nachgewiesenen Abbaufähigkeiten actinobakterieller Mikroorganismen wurde stellvertretend Isolat AR-33 (nächst verwandter Organismus: *Leifsonia lichenia*) auf ein mögliches 2,4-DCP Mineralisierungspotential untersucht. Nach 129 Tagen Inkubation konnte jedoch keine nennenswerte CO₂-Bildung in den oxischen Ansätzen detektiert werden (Abbildung 25). Da auch in diesem Fall im Verlauf der Inkubation keine Abnahme der Optischen Dichte erfolgte, kann angenommen werden, dass Isolat AR-33 *in situ* relevante 2,4-DCP Konzentrationen tolerieren und möglicherweise unter veränderten Inkubationsbedingungen abbauen bzw. mineralisieren kann.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten 2,4-DCP Mineralisierungsversuche mit ausgewählten Isolaten zeigten für keinen Organismus nennenswerte CO₂-Bildungen (Abbildung 25). Die Fähigkeit 2,4-DCP abzubauen, ist in der Regel an das Vorhandensein einer 2,4-DCP Hydroxylase und weiterer spezifischer Enzyme (Abbildung 2) gebunden. Diese sind fast ausschließlich auf Plasmiden lokalisiert und werden in ihrer Aktivität von regulatorisch wirkenden Genen gesteuert. Zu den

Substraten, die den Abbau von 2,4-DCP induzieren können, gehören u.a. 2,4-D, 4-Chlorcatechol und 4-Chlor-2-methylphenol (Beadle & Smith, 1982; Kaphammer & Olsen, 1990; Makdessi & Lechner, 1997). Hingegen führten verschiedene Chlorphenole, darunter auch 2,4-DCP, zu keiner Induktion der 2,4-DCP Hydroxylase (Pieper *et al.*, 1989). Die für den Abbau von Xenobiotika verantwortlichen degradativen Plasmide werden in Abwesenheit eines selektiven Drucks nicht dauerhaft beherbergt und können rasch aus den Zellen eliminiert werden (Romantschuk *et al.*, 2000). Mit 2,4-D isolierte Reinkulturen verloren nach mehrmaligem Überführen und Kultivierung ohne 2,4-D die Fähigkeit zum Abbau (Pemberton & Fisher, 1977). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Bakterien wurden in Abwesenheit von 2,4-DCP auf Agar kultiviert. In Folge dessen besteht die Möglichkeit, dass die Fähigkeit zum 2,4-DCP Abbau aufgrund des fehlenden selektiven Drucks im Laufe der weiteren Kultivierung verloren gegangen ist.

4.3.2. Kultivierungsunabhängige Analyse potentiell 2,4-DCP-abbauender Bakterien

In Ergänzung zu den Anreicherungsansätzen wurde die mikrobielle 2,4-DCP-verwertende Gemeinschaft der Drilosphäre sowie des umliegenden Bodens mittels kultivierungsunabhängigen Genmarkeranalysen der strukturellen Gene *tfdB* (kodiert eine 2,4-DCP Hydroxylase) und *pheA* (kodiert eine Phenolhydroxylase) phylogenetisch analysiert. Dabei kamen im Falle von *tfdB* zwei unterschiedliche Methoden, Pyrosequenzierung und „klassische“ Klonierung, zum Einsatz (vgl. 3.3.2.).

Im Rahmen beider *tfdB*-Genmarkeranalysen wurden überwiegend *Actinobacteria*-sowie *Alpha*- und *Betaproteobacteria*-verwandte OTUs detektiert (Abbildung 28, Abbildung 32, Tabelle 31, Tabelle 33). *Comamonadaceae*-zugeordnete *tfdB*-Teilsequenzen dominierten 2,4-DCP-vorbehandelte Drilosphären und Bodenproben und unterstreichen somit die Bedeutung dieser Familie für den Abbau und die Mineralisierung von 2,4-DCP. Ebenfalls dominierend und in allen untersuchten Proben nachweisbar, waren *Mycobacteriaceae*-zugeordnete *tfdB*-Sequenzen (Abbildung 28, Abbildung 32). Die zu den Actinobakterien gehörende Familie der *Mycobacteriaceae* umfasst derzeit etwa 170 beschriebene Arten und 13 Unterarten der Gattung *Mycobacterium*, die alle einen obligat aeroben Stoffwechsel aufweisen (Euzéby, 2010; Lory, 2014). Es wird angenommen, dass der überwiegende Teil der Arten saprophytisch lebt, was durch die Isolation aus unterschiedlichsten terrestrischen und aquatischen Habitaten untermauert wird. Daneben existieren aber auch einige obligat parasitär lebende Arten wie *M. tuberculosis* und *M. leprae*, die auf Wirte angewiesen sind. Im

Allgemeinen lassen sich Vertreter der Gattung *Mycobacterium* in zwei Hauptgruppen unterteilen (Hartmans *et al.*, 2006): die langsamwachsenden mit einer Generationszeit von etwa sechs bis 24 Stunden (z.B. *M. tuberculosis*) und die raschwachsenden mit einer Generationszeit von etwa einer bis vier Stunden (z.B. *M. vanbaalenii*). Charakteristisch für Mykobakterien ist zudem das Vorkommen von Mycolsäuren als Bestandteile der Zellwand. Diese sind zum einen für die Säurefestigkeit und zum anderen für die Widerstandsfähigkeit bei ungünstigen äußeren Lebensbedingungen zu überdauern, verantwortlich. Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit amplifizierte *Mycobacteriaceae-tfdB*-Teilsequenzen wurden ausschließlich einer 2,4-DCP Hydroxylase von *M. vanbaalenii* zugeordnet (Tabelle 31, Tabelle 33). Bakterien dieser Art sind als Abbauer einer Vielzahl von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Phenanthren und Anthracen beschrieben (Moody *et al.*, 2001; Kweon *et al.*, 2014). Eine bislang unveröffentlichte Genomanalyse zeigte zudem das Vorkommen einer 2,4-DCP Hydroxylase. Vertreter der *Mycobacteriaceae* konnten jedoch weder durch den stabilen Isotopenbeprobungsversuch noch durch eine gezielte Anreicherung mit 2,4-DCP als potentielle 2,4-DCP Verwerter im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz liegt in dem Prozess des horizontalen Gentransfers. Auf diesem Wege wird z.B. das degradative Plasmid pJP4 (trägt für den 2,4-D Abbau kodierende Gene) nicht nur entlang der Abstammungslinie sondern auch in artfremde Organismen übertragen (Don & Pemberton, 1981; Ka & Tiedje, 1994; Neilson *et al.*, 1994; DiGiovanni *et al.*, 1996; Bathe *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Huong *et al.*, 2007a). Folglich können phylogenetische Bäume struktureller Gene und der korrespondierenden 16S rRNA Gene voneinander abweichen (Itoh *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2007). Eine weitere Erklärung kann in der nicht ganz einfachen Anreicherung und Isolierung von Bakterien der Gattung *Mycobacterium* liegen. Im Vergleich zu vielen anderen Bodenbakterien wachsen *Mycobacterium*-Arten relativ langsam und werden so leicht von schnellerwachsenden Mikroorganismen verdrängt (Hartmans *et al.*, 2006). Zum anderen bedürfen einige Arten für ein optimales Wachstum spezielle Nährmedien (Portaels *et al.*, 1988). Zusätzlich zu den *Mycobacteriaceae*-zugeordneten *tfdB*-Teilsequenzen konnten actinobakterielle *Micrococcaceae*-verwandten *tfdB*-Fragmente (nächst verwandter Organismus: *Arthrobacter* sp.) in allen Proben unabhängig von einer 2,4-DCP- und / oder Regenwurmbehandlung amplifiziert werden (Abbildung 28). Die Gattung *Arthrobacter* umfasst überwiegend im Boden lebende, obligat aerobe Bakterien, die eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber Austrocknung und Nahrungsmangel aufweisen (Jones & Keddie, 2006). Zudem besitzen Vertreter dieser Gattung eine enorme Vielseitigkeit hinsichtlich ihrer Ernährung. So können (chlor)phenolische Verbindungen ebenso abgebaut werden wie Herbizide, Phenanthren und Nikotin (Sharpee *et al.*, 1973; Westerberg *et al.*, 2000; Rousseaux *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Kallimanis *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den Mycobakterien konnten *Arthrobacter*-

Arten nach Inkubation mit 2,4-DCP aus dem eingesetzten landwirtschaftlichen Boden isoliert werden (Tabelle-AH 4). Kultivierungsabhängige sowie kultivierungsunabhängige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vertreter der Gattung *Arthrobacter* ein Teil der potentiell 2,4-DCP-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft der Drilosphäre und dem Boden darstellen.

Alphaproteobakterielle *Bradyrhizobiaceae*-verwandte *tfdB*-Sequenzen (nächst verwandter Organismus: *Bradyrhizobium* sp.) waren in allen untersuchten Proben mit relativen Abundanzen von bis zu 26 % nachweisbar (Abbildung 28, Abbildung 32, Tabelle 31, Tabelle 33). Im Rahmen des Stablen Isotopenversuches konnten Vertreter dieser Familie als aktive 2,4-DCP-[C] Verwerter nach Inkubation in Bodensäulen identifiziert werden (Abbildung 59). Die Gattung *Bradyrhizobium* beschreibt gramnegative Stickstoff-fixierende Bakterien, die in der Lage sind mit verschiedenen Hülsenfrüchten eine Symbiose einzugehen (Sadowsky & Graham, 2006). Dabei fixieren die Bakterien atmosphärischen Stickstoff und wandeln diesen zu Ammonium um, was anschließend durch Pflanzen assimiliert werden kann. Neben ihrer Fähigkeit Stickstoff zu fixieren, ist eine Reihe an *Bradyrhizobium*-Arten in der Lage, ein breites Spektrum an (chlor)phenolischen Verbindungen als Kohlenstoffquellen zu nutzen (Latha & Mahadevan, 1997; Vela *et al.*, 2002). Harborne (1980) verweist in seiner Studie auf die Möglichkeit, dass durch Pflanzen abgesonderte aromatische Verbindungen als chemische Lockmittel für potentielle Symbionten dienen können. Die Verwertung dieser Substanzen stellt einen selektiven Vorteil für das saprophytische als auch für das symbiontische Überleben im Boden und im Wirtsorganismus dar. Die sogenannte Chemotaxis beschreibt die Beeinflussung der Fortbewegung durch einen chemischen Gradienten. Bakterien mit dieser Fähigkeit sind in der Lage, aktiv auf die Gegenwart geringer Mengen organischer Verbindungen zu reagieren und somit die optimalen Bedingungen für ihr Wachstum aber auch für ihr Überleben zu finden (Hawkins & Harwood, 2002; Pandey & Jain, 2002). Bisher untersuchte 2,4-D Abbauer werden aufgrund ihrer Phylogenie und den am Abbau beteiligten Genen in drei Klassen unterteilt, wobei Abbauer der Klasse III zu den *Bradyrhizobium*-Arten innerhalb der *Alphaproteobacteria* gezählt werden (Kamagata *et al.*, 1997). Die meisten Vertreter weisen sowohl ein *tfdA α* -Gen als auch die *cadAB*-Gene auf (Itoh *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2004; Huong *et al.*, 2007b). Eine weitere Studie zeigte zudem das Vorkommen verschiedener *tfdB*-Gene (Huong *et al.*, 2007a). Neben 2,4-D kann zudem das Insektizid Methoxychlor durch *B. elkanii* komplett zu CO₂ abgebaut werden (Satsuma *et al.*, 2013). Die vorliegenden Daten indizieren, dass *Bradyrhizobium*-verwandte Arten eine nicht ganz unwichtige Rolle für den Abbau von 2,4-DCP in landwirtschaftlichen Böden spielen. Da diese Gattung zudem in Regenwurm-assoziierten Habitaten nachgewiesen wurde (Horn *et al.*, 2006a; Wüst *et al.*, 2009b), kann auch eine Beteiligung am 2,4-DCP Abbau in der Drilosphäre nicht ausgeschlossen werden.

Sphingomonadaceae-verwandte *tfdB*-Sequenzen konnten ausschließlich im feldfrischen Boden vor einer Bodensäuleninkubation mit einer relativen Häufigkeit von bis zu 4 % detektiert werden (Abbildung 28, Abbildung 32). Interessanterweise zeigte sich dieses Ergebnis sowohl in den analysierten Pyrosequenzierungsdaten als auch in den untersuchten Klonsequenzen. Im Allgemeinen kann festgestellt werden, dass Pyrosequenzierung und klassische Klonierung dieselben dominanten *tfdB*-tragenden Taxa identifizieren konnten und somit ähnliche Ergebnisse erzielen. Unterschiede in der aufgetretenen Diversität lassen sich mit der unterschiedlichen Anzahl der analysierten Sequenzen (23.820 vs. 290) erklären. Eine Reihe an Studien haben sich mit dem Einfluss von Sequenzierungsmethoden (Pyrosequenzierung vs. Klonierung mit anschließender Sanger-Sequenzierung) auf Diversitätsparameter und phylogenetische Zusammensetzung auseinandergesetzt (Jones *et al.*, 2009; Kröber *et al.*, 2009; Edgcomb *et al.*, 2011; Santoferrara *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), mit den übereinstimmenden Erkenntnissen, dass beide Methoden (a) zu annähernd identischen Resultaten führen, (b) die dominierenden Taxa identifizieren können und (c) abweichende Diversitätsindizes aufgrund der sich unterscheidenden Sequenzanzahl bedingen.

Die Umsetzung von 2,4-DCP und dem unter anoxischen Bedingungen daraus gebildeten Phenols wird durch Phenolhydroxylasen katalysiert (Pieper *et al.*, 1988; Kirchner *et al.*, 2003). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von *tfdB* und das für die Phenolhydroxylase kodierende Gen *pheA* zeigte eine 46 %ige Übereinstimmung und weist auf eine evolutionäre Verwandtschaft beider Gene hin (Nurk *et al.*, 1991). Genau wie *tfdB*-Gene können auch Phenolhydroxylase-Gene über horizontalen Gentransfer übertragen werden (Zhang *et al.*, 2004). Im Rahmen der *pheA*-Genmarkeranalyse wurden *Actinobacteria*- sowie *Beta*- und *Gammaproteobacteria*-verwandte *pheA*-Teilsequenzen detektiert (Abbildung 35, Tabelle 35). Die den *Comamonadaceae*- sowie *Pseudomonadaceae*-zugeordneten OTUs 1 und 2 wurden verstärkt in Regenwurmbeeinflussten Proben nach einer 2,4-DCP Behandlung nachgewiesen (Abbildung 35). Der erneute Nachweis beider Familien indiziert eine wichtige Rolle im Abbauprozess von 2,4-DCP. Ebenfalls dominierend mit relativen Häufigkeiten von bis zu 90 % und in allen untersuchten Proben nachweisbar, waren *Pseudonocardiaceae*-zugeordnete *pheA*-Sequenzen (Abbildung 35). Die Familie der *Pseudonocardiaceae* wird innerhalb des Phylums *Actinobacteria* zu den *Actinomycetales* gezählt. Sie umfasst derzeit 31 beschriebene aerobe Arten, die in aquatischen und terrestrischen Habitaten weit verbreitet sind (Goodfellow & Maldonado, 2006; Euzéby, 2010). Es wurde gezeigt, dass Vertreter der *Pseudonocardiaceae* am Abbau von organischem Biopolymeren wie Cellulose und von Pentachlorphenol beteiligt sind können (Malfait *et al.*, 1984; Webb *et al.*, 2001). Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit amplifizierte *Pseudonocardiaceae*-*pheA*-Teilsequenzen wurden ausschließlich einer Phenolhydroxylase von *Pseudonocardia dioxanivorans* zugeordnet (Tabelle 35). Die Gattung *Pseudonocardia* weist

eine Reihe von versierten Schadstoffabbauern auf. So mineralisieren und transformieren *P. benzenivorans* und *P. dioxanivorans* verschiedene Monofluorphenole, 1,2,3,5-Tetrachlorbenzen und 1,4-Dioxan (Kampfer & Kroppenstedt, 2004; Mahendra & Alvarez-Cohen, 2005; Kim *et al.*, 2010). *P. chloroethenivorans* kann Phenol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen sowie Chlorethen abbauen (Lee *et al.*, 2004). *Pseudonocardia* sp. wurde aufgrund seiner Fähigkeit auf Tetrahydrofuran zu wachsen, isoliert (Kohlweyer *et al.*, 2000). Anhand der vorliegenden Literatur und des gehäuftten Auftretens *Pseudonocardia*-zugeordneter *pheA*-Sequenzen kann geschlussfolgert werden, dass Actinobakterien der Gattung *Pseudonocardia* einen Teil der 2,4-DCP-[C]-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft im Boden darstellt, die zur Detoxifikation von 2,4-DCP und / oder Phenol im Boden und der Drilosphäre beitragen kann.

Mit geringeren Abundanzen nachweisbar, waren *Burkholderiaceae*-verwandte OTUs (OTU 3 und 4). Wie auch die *Comamonadaceae* gehört die Familie der *Burkholderiaceae* zu der Ordnung *Burkholderiales* innerhalb der *Betaproteobacteria*. Bakterien dieser Familie sind obligat oder fakultativ aerob und besiedeln eine Vielzahl an terrestrischen und aquatischen Habitaten (Coenye, 2014). Zu den Gattungen innerhalb der *Burkholderiaceae* gehören u.a. *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea* sowie *Ralstonia* (Euzéby, 2010). Eine Reihe an Arten mit der Fähigkeit (polyzyklische) aromatische Verbindungen und Herbizide abzubauen, konnten bislang identifiziert und beschrieben werden (Matsui *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011b; Arora *et al.*, 2014), darunter der als Modellorganismus für den 2,4-D Abbau eingesetzte *Cupriavidus necator* JMP 134 (pJP4). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls *Burkholderiaceae*-verwandte Taxa nach Inkubation mit 2,4-DCP in Bodensäulen des SIP-Versuches und in den Anreicherungsansätzen nachgewiesen (Tabelle 47, Tabelle-AH 4). *Burkholderiaceae*-zugeordnete *pheA*-Teilsequenzen gehörten ausschließlich zu einer Phenolhydroxylase in der Gattung *Burkholderia* (Tabelle 35). *Burkholderia*-verwandte Bakterien werden, sofern sie in der Lage sind 2,4-D abzubauen, der „Abbauer-Klasse“ I zugeteilt und tragen die an einer Verwertung beteiligten Gene *tfdA* und *tfdB* häufig auf einem übertragbaren Plasmid (Itoh *et al.*, 2004). Weiterhin konnten verschiedene *Burkholderia*-Arten isoliert werden, die zum Abbau des Herbizides 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) befähigt sind (Rice *et al.*, 2005; Huong *et al.*, 2007b). Zusammen mit denen in der Literatur gewonnen Erkenntnisse indizieren die in dieser Arbeit erzielten kultivierungsabhängigen sowie kultivierungsunabhängigen Ergebnisse, dass Vertreter der Gattung *Burkholderia* auch ein Teil der potentiell 2,4-DCP-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft der Drilosphäre und des Bodens darstellen.

Die in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Bakterien durchgeführten Untersuchungen geben zahlreiche Hinweise darauf, dass die Diversität dieser Gruppe im landwirtschaftlichen Boden und der Drilosphäre größer ist als bisher vermutet wurde.

4.3.3. Abundanzen potentiell 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen

Die vorliegende Arbeit ist eine von bislang sehr wenigen Studien, die die Abundanz von 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen in Böden sowie in der Drilosphäre untersucht hat. MPN-Methode und quantitative PCR wurden eingesetzt, um die Reaktion der 2,4-DCP-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft auf eine Behandlung mit 2,4-DCP und / oder Regenwürmern zu bestimmen (vgl. 2.5.3.1., 2.6.8.). Die Kombination beider Methoden ermöglicht es nicht nur die Anzahl der am Abbau beteiligten kultivierbaren Mikroorganismen zu erfassen, sondern auch die dafür verantwortlichen strukturellen Gene unkultivierter Organismen zu quantifizieren (Holben *et al.*, 1992). Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit themenrelevanter Literatur werden nachfolgend Studien über 2,4-D-abbauende mikrobielle Gemeinschaften in die Diskussion einbezogen. Der Abbau von 2,4-D verläuft unter aeroben Bedingungen ausschließlich über die Bildung von 2,4-DCP, das soweit bekannt, unter optimierten Laborbedingungen, nicht als Dead-end Produkt auftritt (Müller & Babel, 2001). Es kann somit angenommen werden, dass 2,4-D positive MPN Replikate ebenfalls positiv für 2,4-DCP waren.

Landwirtschaftlicher Boden aus Scheyern wurde letztmalig im Mai 2004 mit MCPA behandelt. MPNs aerober 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen im feldfrischen Boden vor Inkubation mit 2,4-DCP und / oder Regenwürmern waren mit Zellzahlen von $2,4 \times 10^3$ bis $1,4 \times 10^4$ pro Gramm Trockengewicht Boden (Abbildung 38) zum Teil bis zu 10.000 x höher als die von 2,4-D(CP) Abbauern in bereits untersuchten Böden und Wasserproben zu Inkubationsbeginn (Loos *et al.*, 1979; Fournier, 1980; Ou, 1984; Martani & Seto, 1991; Holben *et al.*, 1992; Merini *et al.*, 2007). Zudem zeigten Liu *et al.* (2011a, 2013) sowie Zaprasis *et al.* (2010) mittels MPN und qPCR Ansatz, dass Boden aus Scheyern MCPA Abbauer mit einer Häufigkeit von etwa 10^4 Zellen pro Gramm Trockengewicht Boden sowie die für den Abbau verantwortlichen strukturellen Gene *tfdA α* , *cadA* und *r/sdpA* beherbergt. Die Quantifizierung der am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Gene *tfdB*, *tfdC* sowie *pheA* im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab Genkopienzahlen von bis zu $4,8 \times 10^4$ pro ng eingesetzter DNA (Abbildung 41), was einem Anteil von etwa 3 % an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft entsprach. Diese Daten indizieren eine etablierte, robuste Schadstoff-abbauende Gemeinschaft im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern. Die anschließende Zugabe von 2,4-DCP

resultierte zum einen in einer Stimulation des Wachstums 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen (Abbildung 38 bis Abbildung 40), zum anderen führte es zu einer signifikanten Erhöhung der *tfdB* und *pheA* Genkopien (Abbildung 41, Abbildung 43). 2,4-DCP-behandelte Proben wiesen bis zu 94 x höhere *tfdB*- und bis zu 41 x höhere *pheA*-Genkopien verglichen mit 2,4-DCP-unbehandelten Proben auf. Zudem wirkte sich eine Supplementation mit 2,4-DCP positiv auf die Abbaukapazität in oxischen Mikrokosmen aus (Tabelle 28). Diese Beobachtungen sind konsistent mit einer Reihe an Studien, die ebenfalls einen stimulierenden Effekt von 2,4-D(CP) und MCPA auf die Abundanz relevanter Abbauer bzw. der strukturellen Gene nachweisen konnten (Bælum *et al.*, 2008; Lillis *et al.*, 2010; Zabaloy *et al.*, 2010; Ditterich *et al.*, 2013). Wenn eine natürliche mikrobielle Gemeinschaft xenobiotischen Verbindungen ausgesetzt wird, kommt es in Folge dessen zu einer durch Biomasseproduktion und Veränderung der metabolischen Aktivität charakterisierten Stressantwort. Diese Antwort resultiert schlussendlich in Gemeinschaften, die besser an die veränderten Umweltbedingungen angepasst sind (Barkay & Pritchard, 1988). Die Akklimatisierung hängt dabei von drei Prozessen ab: Anreicherung von Mikroorganismen, die die geeigneten katabolischen Fähigkeiten aufweisen, genetische Adaptation (z.B. Gentransfer) und Induktion der Enzymaktivität (Spain *et al.*, 1980; van der Meer *et al.*, 1992; de Liphthay *et al.*, 2002). So führte der wiederholte Kontakt zu Herbiziden in einer Studie von de Liphthay *et al.* (2003) zu einer Veränderung in der bakteriellen Gemeinschaft sowie zu einer erhöhten Anzahl an Herbizid-abbauenden Organismen und den jeweiligen strukturellen Genen.

Auch die Gegenwart des endogäischen Regenwurms *A. caliginosa* in Bodensäulen resultierte in erhöhten Zell- und Genkopiezahlen. MPNs aerober 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen in 2,4-DCP-vorbehandelten Gangwänden und Kotkrümeln waren im Vergleich zum feldfrischen Boden sowie zum umliegenden Boden signifikant höher (Abbildung 38). Genkopiezahlen von *tfdB*, *tfdC* und *pheA* sowie *tfdC* Transkripte zeigten im Allgemeinen eine höhere Abundanz in Regenwurm-beeinflussten Proben verglichen zu den unbehandelten Proben (Abbildung 41, Abbildung 44). Regenwürmer haben einen signifikanten Einfluss auf die initiale ¹⁴CO₂-Bildung sowie auf die Abnahme der 2,4-DCP Konzentration in oxischen Mikrokosmen mit vorinkubierten Proben (Abbildung 18, Tabelle 29). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse indizieren, dass vor allem Kotkrümel und Gangwände des endogäischen Regenwurms *A. caliginosa* im besonderen Maße befähigt sind, 2,4-DCP abzubauen. Im Vergleich zum umliegenden Boden weisen sowohl Kotkrümel als auch Gangwände aufgrund höherer Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte eine aktivere, heterotrophe mikrobielle Gemeinschaft auf (Zhang & Schrader, 1993; Tiunov & Scheu, 1999; Don *et al.*, 2008). Die gute Verfügbarkeit von Sauerstoff, Wasser und Nährstoffen bietet zudem ideale Bedingungen für aerobe Bodenmikroorganismen (Devliegher & Verstraete, 1997; Tiunov & Scheu, 1999; Tiunov & Dobrovolskaya, 2002). Der Abbau von

chlorphenolischen Verbindungen wie 2,4-DCP und MCPA kann durch zusätzliche Kohlenstoffquellen und eine gewisse Bodenfeuchtigkeit stimuliert werden (Helweg, 1987; Ziagova & Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Tobajas *et al.*, 2012). Regenwurmgänge sind mit sezerniertem Mucus und Kotkrümeln überzogen, was zum einen zu einer Stabilisierung der Gangwände und somit zur Belüftung des Bodens beiträgt (Edwards & Bohlen, 1996; Edwards, 2004). Zum anderen kann der abgegebene Mucus einen selektiven stimulierenden Einfluss auf bestimmte mikrobielle Taxa nehmen (Oleynik & Byzov, 2008). Die durch Regenwürmer angelegten Gangsysteme beeinflussen die Mobilität, das Sorptionsverhalten und den Abbau von Xenobiotika (Edwards *et al.*, 1993; Sadeghi & Isensee, 1994; Farenhorst *et al.*, 2000; Kersanté *et al.*, 2006) und tragen zusätzlich zu der Verbreitung von Schadstoff-abbauenden Mikroorganismen bei (Daane *et al.*, 1996, 1997). Folglich stellen Gangwände dynamische Habitate im Boden dar, in denen aktive, aerobe Schadstoffabbauer optimale Wachstums- und Abbaubedingungen finden. Bodenproben aus Regenwurm-vorinkubierten Bodensäulen (in Gegenwart von 2,4-DCP) wiesen ähnlich wie Proben der Drilosphäre hohe Keimzahlen aerober 2,4-DC-abbauender Mikroorganismen auf (Abbildung 38, Abbildung 40). Zudem wurden erhöhte Abundanzen der strukturellen Gene *tfdB*, *tfdC* und *pheA* sowie eine verstärkte 2,4-DCP Abbaufähigkeit detektiert (Abbildung 41, Tabelle 28). Die besonderen biochemischen Charakteristika der Gangwände reichen bis zu einem Zentimeter in den umliegenden Boden hinein (Tiunov & Scheu, 1999; Tiunov & Dobrovolskaya, 2002; Andriuzzi *et al.*, 2013). In Folge dessen kann auch der eigentlich nicht-drilosphärische Boden durch Grabaktivitäten der Regenwürmer beeinflusst worden sein.

MPNs anaerober 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen im feldfrischen Boden lagen nach 60 Tagen Inkubation unter Argonatmosphäre im Bereich von 0 bis $9,3 \times 10^2$ Zellen pro Gramm Trockengewicht Boden (Tabelle 36) und waren damit signifikant niedriger als der oxische Vergleichsansatz (Abbildung 38). Die gemachten Beobachtungen gehen mit den erzielten Ergebnissen aus den anoxischen Mikrokosmenversuchen einher und belegen erneut, dass der in der Regel belüftete landwirtschaftliche Boden aus Scheyern 2,4-DCP in Abwesenheit von Sauerstoff umsetzen kann. Dies erfolgt jedoch vergleichsweise langsam und weniger effizient als unter aeroben Inkubationsbedingungen.

4.4. Mikrobielle 2,4-DCP-abbauende Gemeinschaft – Vergleich der angewandten Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe an Methoden für die Erfassung und Charakterisierung der mikrobiellen 2,4-DCP-abbauenden Gemeinschaft im Regenwurm-beeinflussten sowie unbeeinflussten Boden eingesetzt. Die Kombination aus kultivierungsabhängigen (Anreicherung, Isolation) und kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen (Genbibliotheken, SIP) Verfahren ermöglicht zum einen die Schaffung eines vielschichtigen Bildes der mikrobiellen Gemeinschaft und zum anderen ein besseres Verständnis ihrer Funktion *in situ*. Weiterhin können etwaige Nachteile der einzelnen Methoden eingegrenzt werden. So lässt sich schätzungsweise weniger als 1 % der gesamten bakteriellen Gemeinschaft eines Standortes mit bislang bekannten Verfahren kultivieren und isolieren (Amann *et al.*, 1995; Rappé & Giovannoni, 2003). Mikroorganismen mit geringen Abundanzen, die im Vergleich zu ihrem Vorkommen jedoch einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf ihre Umwelt nehmen, können mit kultivierungsabhängigen Methoden leicht durch schnell wachsende, an die gewählten Kultivierungsmedien angepassten Organismen verdrängt und folglich übersehen werden (Liesack *et al.*, 1997; Molnár *et al.*, 2008; Gagic *et al.*, 2015). Die Entwicklung kultivierungsunabhängiger molekularbiologischer Methoden machte es möglich, die eingeschränkte Detektion und ungenaue Klassifizierung von Mikroorganismen zu umgehen und somit tiefere Einblicke in die mikrobielle Gemeinschaft *in situ* zu erhalten (Yoccoz, 2012). Die Diversität einer mikrobiellen Population kann über Sequenzvergleiche der 16S rRNA erfolgen. Auch strukturelle Gene können zur Abschätzung und Bewertung des metabolischen Potentials unkultivierter Organismen herangezogen werden (Baldwin *et al.*, 2003; Huong *et al.*, 2007b; Lillis *et al.*, 2010). Jedoch unterscheiden die in der Regel PCR-basierten Techniken nicht zwischen aktiven, ruhenden oder sogar toten Zellen. Die anhand von molekularbiologischen Daten berechnete Biodiversität unterliegt dem Einfluss einer Vielzahl von Parametern: Handhabung und Lagerung der Proben, Effizienz der DNA-Extraktion, Auswahl der Primer und anschließende PCR-Amplifikation, Sequenzierungspräzision sowie der Auswertung der erhaltenen Daten (Sergeant *et al.*, 2012; Cruaud *et al.*, 2014; Deiner *et al.*, 2015). Aufgrund dieser Einflussfaktoren sollten die durch kultivierungsunabhängige Methoden erzielten Ergebnisse sorgfältig analysiert und interpretiert werden.

Mit Hilfe von kultivierungsabhängigen sowie kultivierungsunabhängigen Techniken wurde in der vorliegenden Arbeit ein breites Spektrum phylogenetisch unterschiedlicher Bakterien detektiert, die potentiell am Abbau von 2,4-DCP in der Drilosphäre und dem umliegenden Boden beteiligt waren (Abbildung 72). Dabei konnten drei Familien (*Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*) mit allen eingesetzten

Methoden und insgesamt sieben Familien mit jeweils zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden (Abbildung 72). Die Detektierbarkeit dieser Methoden war somit sehr ähnlich und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Obwohl die Anreicherung und Kultivierung von Mikroorganismen unter Laborbedingungen limitiert ist, konnten elf verschiedene Familien aus vier Phyla ausschließlich durch direkte Isolation gewonnen werden. *Bacillaceae*-, *Clostridiaceae*- sowie *Flavobacteriaceae*-verwandte Taxa wurden sowohl mittels Anreicherung als auch mittels 16S rRNA SIP detektiert. Diese Ergebnisse indizieren, dass eine Korrelation zwischen der Detektierbarkeit von aktiven und abundanten Bakterien vorliegt. *Mycobacteriaceae* und *Holophagaceae* wurden ausschließlich durch kultivierungsunabhängige Methoden als potentielle 2,4-DCP Abbauer identifiziert (Abbildung 72), was mit den bisherigen Erkenntnissen übereinstimmt, dass Vertreter beider Familien im Labor nur bedingt kultivierbar sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten indizieren, dass die Anwendung unterschiedlicher Methoden für die Erfassung und Beschreibung der am Abbau von 2,4-DCP beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft essentiell ist. Nur mit Hilfe verschiedener Ansätze kann die vorliegende Biodiversität so genau wie möglich abgeschätzt und beurteilt werden.

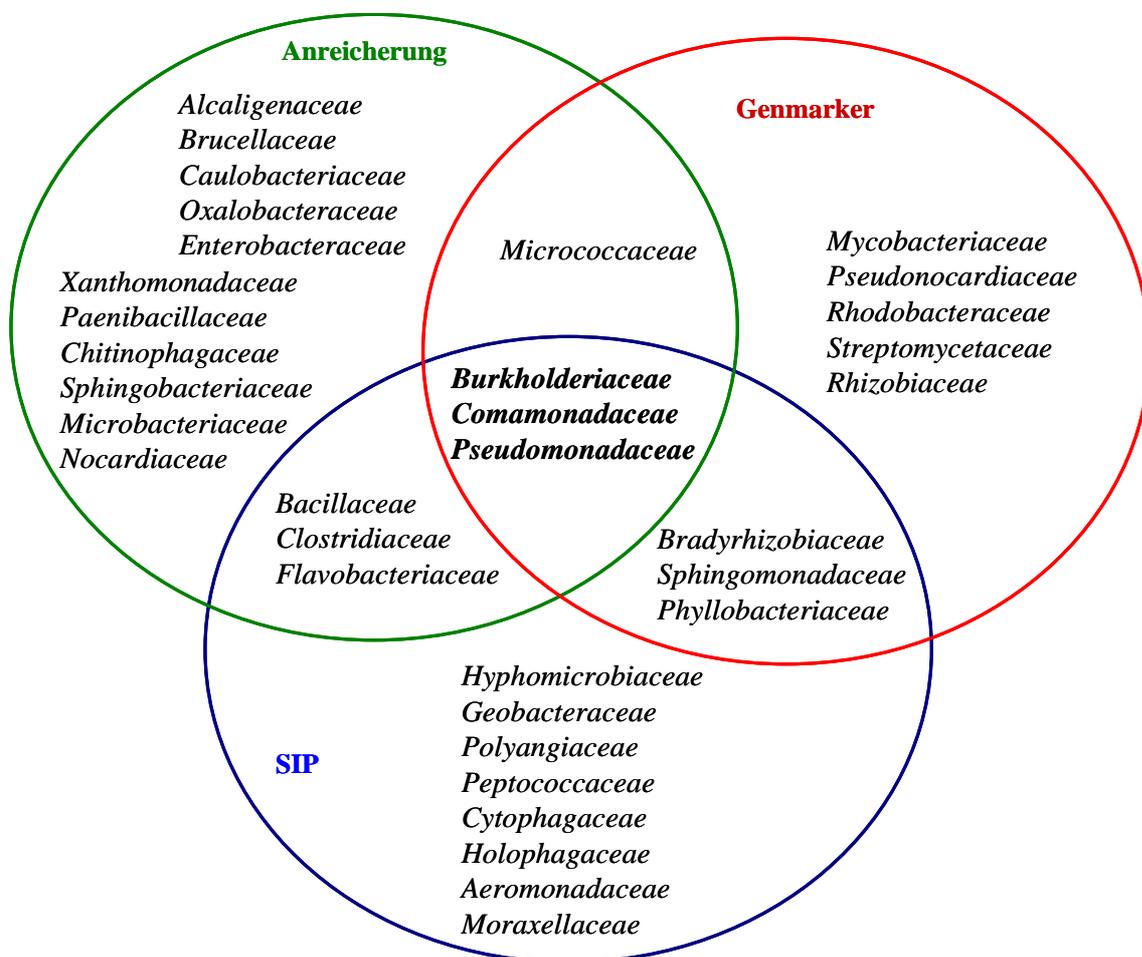


Abbildung 72: Venn-Diagramm der durch Anreicherung (grün), SIP (blau) und struktureller Genmarkeranalyse von *tfdB* und *pheA* (rot) detektierten Familien. Familien innerhalb der Schnittmengen zweier Kreise indizieren übereinstimmende Ergebnisse der angewandten Methoden. Fettgedruckte Familien konnten mit Hilfe aller Verfahren nachgewiesen werden.

4.5. Einfluss von *A. caliginosa* und 2,4-DCP auf die N₂O-Bildung und die assoziierte mikrobielle Gemeinschaft

Landwirtschaftlich genutzter Boden ist eine bedeutende Quelle für die anthropogen bedingte N₂O-Emission. Die Freisetzung von N₂O ist dabei abhängig vom Bodentyp, dem Einsatz von Stickstoff, von der gewählten Fruchtfolge sowie von klimatischen und saisonalen Bodenbedingungen (Kim & Dale, 2008; Millar *et al.*, 2010; Pendall *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012). Zusätzlich regulieren eine Vielzahl physikalischer, chemischer und biologischer Faktoren die für die Bildung von N₂O im Boden verantwortlichen Prozesse. Der Einfluss von Xenobiotika sowie von Regenwürmern auf die N₂O-Bildung im landwirtschaftlichen Boden aus Scheyern wurde mit Hilfe von Bodensäulen supplementiert mit endogäischen Regenwürmern und / oder 2,4-DCP sowie Kontrollen ohne Wurm und 2,4-DCP untersucht (vgl. 2.4.1., 2.4.4.). Innerhalb der ersten zwei Tage konnte in allen Ansätzen eine zügige N₂O-Bildung beobachtet werden (Abbildung 61). Dabei war die kumulative N₂O-Bildung in Regenwurm-supplementierten Säulen signifikant höher als in den Regenwurm-unbehandelten Säulen (Abbildung 61, Abbildung 62). Regenwürmer beeinflussen durch ihr Grab- und Fraßverhalten die *in situ* Bedingungen von Böden und führen auf diesem Wege zu einer veränderten N₂O Freisetzung (Borken *et al.*, 2000; Bertora *et al.*, 2007; Giannopoulos *et al.*, 2010; Nebert *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2012; Lubbers *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Regenwürmer emittieren *in situ* N₂O und können geschätzt für eine jährliche N₂O-Bildung von 10⁸ kg verantwortlich sein (Drake *et al.*, 2006). Ursprung des durch Regenwürmer emittierten N₂O ist der anoxische Regenwurmdarm, der durch die Abwesenheit von Sauerstoff, dem Vorkommen einer Vielzahl an organischen Verbindungen sowie einen hohen Wasser-, Nitrit- und Ammoniumgehalt ideale Bedingungen für Denitrifikanten und andere Nitrat-dissimilierende Bakterien bietet (Karsten & Drake, 1997; Matthies *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2003; Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2006b). Es wird angenommen, dass die an der N₂O-Bildung beteiligten Bakterien aus dem umliegenden Boden im Zuge der Nahrungsaufnahme aufgenommen und durch die sich anschließende Darmpassage stimuliert werden (Ihssen *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2006a). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfasste N₂O-Bildung in Bodensäulen bestätigt die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse und belegt zum einen das Vorhandensein einer etablierten N₂O-bildenden mikrobiellen Gemeinschaft

im landwirtschaftlichen Boden von Scheyern, aber auch den stimulierenden Effekt von *A. caliginosa* auf diese Organismen. Im Gegensatz zum Regenwurm wurde innerhalb der ersten zwei Inkubationstage, also zu dem Zeitpunkt als 2,4-DCP noch in größeren Mengen vorlag, kein signifikanter Einfluss von 2,4-DCP auf die Bildung von N₂O in den Bodensäulen beobachtet (Abbildung 61). Die eingesetzte 2,4-DCP Konzentration von etwa 22 mg pro Kilogramm Trockengewicht Boden führte weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von *A. caliginosa* zu einer nennenswerten Reduktion der N₂O-Bildung (Abbildung 61). Diese Erkenntnis stimmt mit den Beobachtungen der anoxischen Bodenaufschlammungen überein, die ebenfalls keinen Effekt von 2,4-DCP auf eine stattfindende Denitrifikation zeigen konnte (Abbildung 15, Abbildung 16). Den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen steht jedoch die Untersuchung von Pell *et al.* (1998) gegenüber, die eine deutliche Inhibition der Denitrifikation in Gegenwart von 2,4-DCP beschreibt. So wurde eine Abnahme der Denitrifikationsaktivität um 25 % und eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate für Denitrifikanten um fast 50 % bei einer eingesetzten 2,4-DCP Konzentration von 100 mg pro Kilogramm Trockengewicht Boden nachgewiesen. Der Einfluss von Xenobiotika auf N₂O-bildende Prozesse ist sehr vielschichtig und von unterschiedlichen Parametern abhängig. Von großer Relevanz sind dabei der untersuchte Bodentyp, die molekulare Struktur der eingesetzten Verbindung und die gewählte Konzentration sowie die vorliegende Nitratkonzentration (Chang *et al.*, 2001; Pal *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2014). Beispielsweise führten heterozyklische aromatische Herbizide wie Amitrol zu einer erhöhten N₂O-Bildung in landwirtschaftlichen Böden, das zu den Bipyridinen zählende Herbizid Methylviologen (Paraquat) hingegen reduzierte die N₂O-Bildung (Li *et al.*, 2014). Die Zugabe von 2,4-DCP in Ackerboden aus Scheyern führte im Inkubationszeitraum von drei bis 20 Tagen zu einem signifikanten Unterschied in der N₂O-Bildung (Abbildung 61, Abbildung 62), der mit aller Wahrscheinlichkeit nach jedoch nicht direkt auf die eingesetzte 2,4-DCP Konzentration zurückzuführen ist, da in diesem Zeitraum die größte Menge an 2,4-DCP bereits abgebaut oder assimiliert wurde (Abbildung 46). Vielmehr konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Inkubation mit 2,4-DCP zu einer Anreicherung und Wachstumsstimulation 2,4-DCP-abbauender Mikroorganismen führte (Abbildung 38, Abbildung 40) und sich somit das Verhältnis zu den vorkommenden Denitrifikanten änderte.

Pestizide und deren Abbauprodukte nehmen nachweislich Einfluss auf die N₂O-bildenden Prozesse und die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im Boden. Nur wenige Studien haben sich jedoch bislang mit der Auswirkung einer 2,4-DCP Applikation auf die Abundanz denitrifizierender sowie nitrifizierender Mikroorganismen befasst. Aufgrund dessen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultivierbare Denitrifikanten mittels MPN (vgl. 2.5.3.2.) sowie die in der N₂O-Bildung involvierten

strukturellen Gene mittels qPCR (vgl. 2.6.8.) quantifiziert. Feldfrischer Boden vor Inkubation in Bodensäulen wies mit Keimzahlen von $9,5 \times 10^4$ pro Gramm Trockengewicht eine robuste denitrifizierende mikrobielle Gemeinschaft auf (Abbildung 63), die quantitativ vergleichbar mit anderen untersuchten Bodenproben ist (Martin *et al.*, 1988; Chao & Young, 1995; Horn, 2004; Braker *et al.*, 2010). Gangwand- und Kotkrümelproben zeigten unabhängig von einer 2,4-DCP Behandlung im Vergleich zum feldfrischen Boden ähnliche bzw. signifikant niedrigere Keimzahlen denitrifizierender Organismen (Abbildung 63). Diese Beobachtungen sind zur vorliegenden Literatur widersprüchlich, die für beide Drilosphärenkompartimente eine höhere mikrobielle Aktivität und damit verbunden höhere Denitrifikationsraten im Vergleich zum umliegenden Boden beschreiben (Decaëns *et al.*, 1999; Parkin & Berry, 1994; Parkin & Berry, 1999). Zudem konnten Amador & Görres (2007) bis zu 100 x höhere Keimzahlen aerober Bodenmikroorganismen in Kotkrümeln von anözischen Regenwürmern als im umliegenden Boden detektieren. Eine mögliche Erklärung dieser vorliegenden Diskrepanz kann der in der Literatur beschriebene „Alterungseffekt“ liefern. Kotkrümel- und Gangwandproben zeigten aufgrund von Substratlimitationen und Austrocknung eine deutliche Abnahme der mikrobiellen Atmungsrate sowie Biomasse mit zunehmendem Alter (Parle, 1963b; Scheu, 1987; Aira *et al.*, 2005; Parthasarathi, 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden nach Beendigung der Inkubation zeitnah bei -80 °C eingefroren. Inwieweit sich die Inkubation in Bodensäulen auf die Substratverfügbarkeit und somit auf die mikrobielle Gemeinschaft ausgewirkt hat, kann nur vermutet werden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte in der Bildung von selektiv wirkenden Verdauungs- und Oberflächensekreten liegen, die bei Regenwürmern unterschiedlichster Ökotypen nachgewiesen wurden (Byzov *et al.*, 2007; Khomyakov *et al.*, 2007; Oleynik & Byzov, 2008; Wang *et al.*, 2011). Solch Sekrete zeigten antibakterielle und antifungale Wirkungen, die die mikrobielle Diversität nachhaltig beeinflussen. Vor allem die untersuchten Pilze wurden in ihrem Wachstum und der Sporulation gehemmt (Moody *et al.*, 1996). Die von Pilzen durchgeführte Denitrifikation kann in terrestrischen Böden ein entscheidender Prozess für die Bildung von N_2O darstellen. So wurde für Wald-, Wiesen- und Agrarböden eine, im Vergleich zur bakteriellen N_2O -Emission, erhöhte pilzliche N_2O -Bildung nachgewiesen (Castaldi & Smith, 1998; Laughlin *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2013; Rütting *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014). Die Fähigkeit N_2O zu bilden, scheint innerhalb der Pilze weit verbreitet zu sein (Shoun *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 2015). Mittels Reinkulturen von *Fusarium oxysporum* und *Cylindrocarpon tonkinense* wurde zudem das Vorkommen einer Kupfer-haltigen Nitritreduktase (kodiert durch *nirK*) sowie einer Cytochrom P450 NO-Reduktase in Pilzen gezeigt (Shoun *et al.*, 2012). Diese Daten verweisen auf ein nicht zu unterschätzendes pilzliches Denitrifikationspotential, das durch eine selektive Wirkung von Regenwurmsekreten in Gangwänden und / oder Kotkrümeln negativ beeinflusst werden kann. Keimzahlen

denitrifizierender Mikroorganismen im Darminhalt ohne 2,4-DCP Vorbehandlung waren mit $5,9 \times 10^8$ pro Gramm Trockengewicht die höchsten aller untersuchten Proben und damit signifikant höher als im feldfrischem Boden sowie in der 2,4-DCP-vorbehandelten korrespondierenden Darmprobe (Abbildung 63). Der Regenwurmdarm ist ein mobiles anoxisches Mikrohabitat in belüfteten Böden und bietet u.a. aufgrund zahlreicher leicht abbaubarer organischer Verbindungen ein ideales Umfeld für verschiedene anaerobe Bakterien. Die Anzahl kultivierbarer Denitrifikanten im Darm von *Lumbricus rubellus* und *Octolasion lacteum* war bis zu 256 x höher als im umliegenden Boden (Karsten & Drake, 1997). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Ihssen *et al.* (2003), die bis zu 100 x höhere Keimzahlen denitrifizierender Mikroorganismen im Darm von *A. caliginosa* nachweisen konnten. Interessanterweise zeigte sich ausschließlich in den Darmproben ein inhibierender Effekt von 2,4-DCP auf die Anzahl der kultivierbaren Denitrifikanten (Abbildung 63). Möglicherweise diente dabei 2,4-DCP im Rahmen einer Dehalorespiration als Elektronenakzeptor und die dazu befähigten Organismen konnten, bedingt durch eine höhere Energieausbeute (Dolfing & Harrison, 1992; Pavlostathis *et al.*, 2003), die denitrifizierenden Mikroorganismen in ihrem Wachstum einschränken. 2,4-DCP-vorbehandelte Bodenproben wiesen beständig signifikant höhere MPNs kultivierbarer Denitrifikanten auf als die korrespondierenden unbehandelten Proben (Abbildung 64). Denitrifikation und Dechlorierung von Chlorphenolen können parallel ohne inhibitorische Effekte ablaufen. Beide Prozesse werden von unterschiedlichen mikrobiellen Gemeinschaften durchgeführt, wobei die im Laufe der Dechlorierung anfallenden Abbauprodukte als mögliche Kohlenstoffquelle für denitrifizierende Mikroorganismen dienen (Sanford & Tiedje, 1997). Solch zusätzliche Verbindungen führen zu einem Wachstumsvorteil und können somit die erhöhten Zellzahlen in den vorbehandelten Proben erklären.

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen in Drilosphären- und Bodenproben sind konsistent mit den Beobachtungen der anoxischen Bodenaufschlammungen und der N_2O -Bildung in Bodensäulen. Danach kann geschlussfolgert werden, dass die gewählte 2,4-DCP Konzentration im Allgemeinen keine inhibierende Wirkung auf die Anzahl und Aktivität kultivierbarer denitrifizierender Mikroorganismen ausübt. Vielmehr zeigte sich der bereits beschriebene positive Effekt von *A. caliginosa*.

Die Abundanz *narG*-, *nirK*-, *nirS*-, *nosZ*- sowie *amoA*-tragender Mikroorganismen in den analysierten Drilosphären- und Bodenproben wurde ebenfalls nicht signifikant durch das eingesetzte 2,4-DCP beeinflusst (Abbildung 65, Abbildung 66). Vergleichbare Studien über eine quantitative Auswirkung von Pestiziden und anderen Schadstoffen auf die N_2O -bildende mikrobielle Gemeinschaft sind bis dato sehr selten. Erfasste *amoA*-Genkopienzahlen in mit Schwermetallen belasteten Böden waren bis zu 80 % niedriger als im unbelasteten Boden, wobei die Abundanz *nirK*-tragender

Bakterien nicht beeinflusst wurde (Liu *et al.*, 2014). Das Herbizid Simazin inhibierte in einer Studie von Hernández *et al.* (2011) Ammonium-oxidierende Bakterien, wohingegen Ammonium-oxidierende Archaeen unbeeinflusst blieben. Dieses Ergebnis konnte durch Rousidou *et al.* (2013) nach Untersuchungen mit klassischen als auch mit biologischen Pestiziden bestätigt werden. Der Einsatz von Pyren, einem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff, führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der *nirK*-, *nirS*- und *nosZ*-Genkopien in einem landwirtschaftlichen Boden (Guo *et al.*, 2011). Auch natürlich vorkommende Verbindungen sind in der Lage, Einfluss auf die Denitrifikation und die daran beteiligten Organismen zu nehmen. Sekundäre Pflanzenstoffe wie polyphenolische Catechine inhibierten in einer Studie von Bardon *et al.* (2014) die Aktivität der in der Denitrifikation involvierten Enzyme; die Quantifizierung von *nirS* und *nirK* zeigte jedoch keine Veränderung in den Genkopienzahlen. Zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen verweisen die teils inkonsistenten Literaturangaben auf einen vielschichtigen und von verschiedenen Faktoren abhängigen Einfluss von Xenobiotika auf die Abundanz der an einer N₂O-Bildung beteiligten Mikroorganismen. Dabei scheint vor allem die Art und Konzentration der eingesetzten Verbindung von entscheidender Bedeutung zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem ein positiver Effekt von *A. caliginosa* auf die Abundanz *narG*- und *nosZ*-tragender Bakterien nachgewiesen (Abbildung 65, Abbildung 66). *narG*-Genkopienzahlen in Regenwurm-beeinflussten Proben waren bis zu 364-mal, *nosZ*-Genkopienzahlen bis zu 195-mal höher als in den korrespondierenden unbehandelten Proben. Diese Resultate geben Hinweise darauf, dass der bereits dargestellte positive Effekt von Regenwürmern auf denitrifizierende Mikroorganismen selektiv bei einigen Gruppen auftreten kann, wohingegen andere in ihrer Häufigkeit unverändert bleiben. Ammonium-oxidierende Mikroorganismen gelten als Schlüsselorganismen im Prozess der Nitrifikation (Prosser & Nicol, 2008), sind sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Habitaten nachweisbar und werden aufgrund dessen als mögliche Bioindikatoren für die Bewertung von Böden betrachtet (Wessen & Hallin, 2011). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter 2,4-DCP und Regenwürmer zeigten nur geringfügigen Einfluss auf die Abundanz *amoA*-tragender Bakterien und Archaeen (Abbildung 66). Bakterielle *amoA*-Sequenzen konnten im Vergleich zu den archaealen *amoA*-Sequenzen im Allgemeinen jedoch häufiger detektiert werden. Verschiedene Studien der letzten Jahre haben sich mit der quantitativen Bedeutung von Bakterien sowie von Archaeen im Rahmen des Nitrifikationsprozesses auseinandergesetzt – mit ganz unterschiedlichen Ergebnissen. Während Töwe *et al.* (2010) und Jia & Conrad (2009) den entscheidenden Anteil bei den Ammonium-oxidierenden Bakterien (AOB) sahen, kamen Leininger *et al.* (2006), Schauss *et al.* (2009) sowie Gubry-Rangin *et al.* (2010) zu dem Schluss, dass vor allem Ammonium-oxidierende Archaeen (AOA) die Nitrifikation in Böden dominieren. Das Verhältnis von AOB und AOA wird von einem Zusammenspiel vielerlei biotischer

sowie abiotischer Faktoren bestimmt. Relevante Parameter scheinen dabei die Affinität gegenüber Ammoniak, der pH-Wert, der Wassergehalt des Bodens und das mixotrophe Wachstum zu sein (Nicol *et al.*, 2008; Prosser & Nicol, 2012; Di *et al.*, 2014). Weiterhin wird eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Nitrifikation diskutiert (Di *et al.*, 2014). Welcher dieser Faktoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Abundanzen von AOB bzw. AOA im landwirtschaftlichen Boden vor und während der Bodensäuleninkubation maßgeblich beeinflusst hat, kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden.

Im Verlauf der Bachelorarbeit von Marianna Weller (2010) wurde zusätzlich der mögliche Einfluss von 2,4-DCP und / oder *A. caliginosa* auf die Zusammensetzung der mikrobiellen denitrifizierenden Gemeinschaft in der Drilosphäre und Boden anhand einer TRFLP-Analyse des für die N₂O-Reduktase kodierenden Gens *nosZ* untersucht. Statistische Analysen der TRFLP-Profile bakterieller *nosZ* DNA Sequenzen zeigten, dass sich die eingesetzten Proben im Allgemeinen in ihrer Zusammensetzung nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 68 bis Abbildung 70). Feldfrischer Boden sowie Drilosphären- und Bodenproben nach Bodensäuleninkubation wurden unabhängig von einer 2,4-DCP Behandlung von *Bradyrhizobium japonicum*-verwandten TRFs dominiert (Abbildung 68 bis Abbildung 70). Bereits durch den Stablen Isotopenversuch (vgl. 3.4.) sowie durch Genmarkeranalysen (vgl. 3.3.2.) konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Vertreter der *Bradyrhizobiaceae* als aktive Mitglieder der 2,4-DCP-[C]-verwertenden mikrobiellen Gemeinschaft identifiziert werden. *Bradyrhizobium japonicum* ist ein im Boden häufig vorkommender, fakultativer Denitrifizierer, der zu einer kompletten Denitrifikation befähigt ist (Bedmar *et al.*, 2005). Zudem ist *B. japonicum* ebenfalls in der Lage atmosphärische N₂O-Konzentrationen zu nutzen (Sameshima-Saito *et al.*, 2006). In einer vergleichenden Untersuchung von Regenwurmdarmmaterial mit Proben des umliegenden Bodens durch Horn *et al.* (2006a) wurde zum einen das Vorkommen *B. japonicum*-verwandter *nosZ*-Sequenzen belegt, zum anderen gezeigt, dass die detektierten *nosZ*-Sequenzen phylogenetisch ähnlich sind. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Regenwurmdarm-assoziierte Denitrifizierer ursprünglich dem umliegenden Boden entstammen und bieten somit eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen. Die Struktur und Zusammensetzung der denitrifizierenden mikrobiellen Gemeinschaft unterliegt einer Reihe an Einflussgrößen. So unterscheiden sich *narG*-tragende Bakterien inner- und außerhalb der Mais-Rhizospäre in ihrer Zusammensetzung, vermutlich aufgrund der durch die Wurzeln abgesonderten zusätzlichen Kohlenstoffverbindungen oder einer veränderten Sauerstoffverfügbarkeit (Philippot *et al.*, 2002). Phylogenetische Analysen der Nitritreduktase-Gene *nirK* und *nirS* indizieren einen deutlichen Einfluss der Inkubationstemperatur auf die

Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft (Braker *et al.*, 2010). Unterschiedliche Nitrat-, Nitrit- sowie Ammoniumkonzentrationen führten in Studien zu einer veränderten Struktur denitrifizierender *nirS*-tragender Mikroorganismen (Castro-González *et al.*, 2005; Ruiz-Rueda *et al.*, 2007).

Die diskutierten Ergebnisse unterstreichen erneut die Bedeutung von Regenwürmern im Rahmen einer N₂O-Bildung im landwirtschaftlichen Boden und damit einhergehend einen positiven stimulierenden Effekt auf die N₂O-bildende mikrobielle Gemeinschaft. Im Gegensatz dazu, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass *in situ* relevante Konzentrationen von 2,4-DCP weder die Freisetzung von N₂O, noch die daran beteiligten denitrifizierenden Mikroorganismen in ihrer Abundanz und phylogenetischen Struktur signifikant beeinflussen.

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der mikrobielle Abbau der weitverbreiteten chlorphenolischen Verbindung 2,4-DCP sowie dessen Einfluss auf die N₂O-Bildung in einem landwirtschaftlichen Boden in Gegenwart und Abwesenheit des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa* untersucht (Abbildung 73). Ziel war es zum einen, die am Abbau beteiligten Mikroorganismen anhand kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Methoden zu identifizieren, quantifizieren und Aussagen über die phylogenetische Zuordnung zu treffen. Zum anderen sollten die für die Freisetzung von N₂O verantwortlichen Mikroorganismen quantitativ und qualitativ erfasst werden. Dabei wurde der mögliche Einfluss einer Regenwurm- und / oder 2,4-DCP Vorbehandlung näher betrachtet. Mikroorganismen in der Drilosphäre (vor allem Gangwände und Kotkrümel) waren im besonderen Maße befähigt unter oxischen Bedingungen 2,4-DCP zu verwerten (Tabelle 28). Eine 2,4-DCP Vorinkubation erhöhte dabei die Anzahl 2,4-DCP-abbauender Organismen (Abbildung 38, Abbildung 40, Abbildung 73). Eine Vielzahl an bekannten und bislang unbekanntem Mikroorganismen, die in der Lage sind, 2,4-DCP umzusetzen, wurde anhand einer stabilen Isotopenbeobachtung identifiziert (Abbildung 58, Abbildung 59). Eine Abnahme der 2,4-DCP Konzentration unter anoxischen Bedingungen konnte gezeigt werden, diese war im Vergleich zum aeroben Abbau jedoch vernachlässigbar (Abbildung 16). Berechnete Keimzahlen in Gegenwart alternativer Elektronenakzeptoren waren signifikant niedriger als die korrespondierenden Zellzahlen in Gegenwart von Sauerstoff (Tabelle 36, Abbildung 38, Abbildung 40).

Basierend auf diesen Beobachtungen kann die unter 1.4. aufgestellte Hypothese 1 verifiziert werden. Landwirtschaftlicher Boden sowie die Drilosphäre beherbergen aktive, bislang unbekannte Mikroorganismen, die 2,4-DCP in *in situ* relevanten Konzentrationen umsetzen können. Regenwürmer beeinflussten maßgeblich die Freisetzung des Treibhausgases N_2O in Bodensäulen. Das eingesetzte 2,4-DCP hingegen wirkte sich nicht nennenswert auf die erfasste N_2O -Bildung und die Anzahl denitrifizierender sowie nitrifizierender Bakterien aus (Abbildung 63, Abbildung 64), was bedeutet, dass die Hypothese 2 (vgl. 1.4.) abgelehnt werden kann. 2,4-DCP inhibiert in der gewählten Konzentration nicht die N_2O -Bildung und das Wachstum von Denitrifizierern und Nitrifizierern in der Drilosphäre.

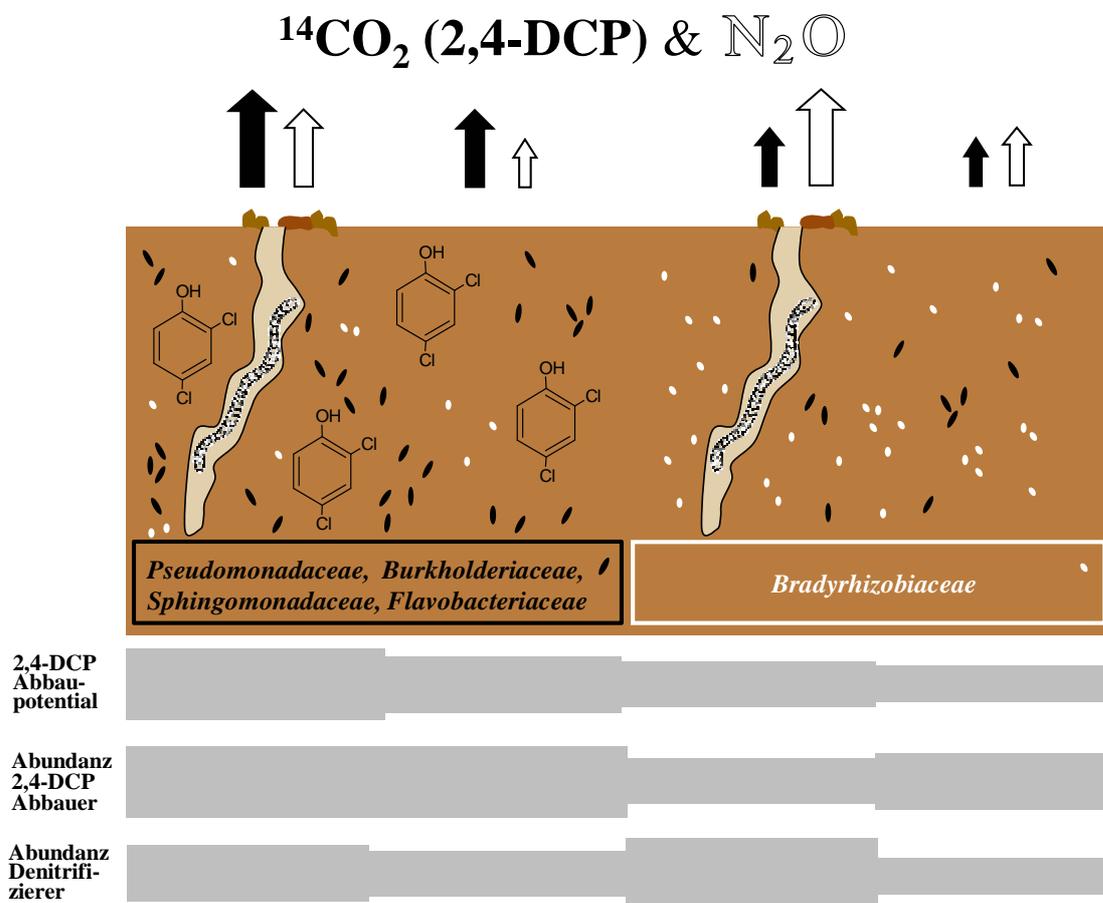


Abbildung 73: Zusammenfassende Darstellung des mikrobiellen 2,4-DCP Abbau- und N_2O -Bildungspotentials in Regenwurm-beeinflussten und Regenwurm-unbeeinflussten Bodenmaterial. Das 2,4-DCP Abbau- (schwarz) sowie das N_2O -Bildungspotential (weiß) wurde in Bodensäulen mit feldfrischem Ackerboden in Gegenwart und Abwesenheit des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa* und 2,4-DCP untersucht. Drilosphären- und Bodenmaterial aus den Bodensäulen wurde für weiterführende Mikrokosmenversuche und molekularbiologischen Analysen eingesetzt. Ergebnisse des $[^{14}C]$ -2,4-DCP Mineralisierungsansatzes mit Material aus den jeweiligen Bodensäulen sind mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Schwarz umrahmte Taxa stellen die durch den CAP-SIP identifizierte dominanten 2,4-DCP Verwerter dar. Weiß umrahmte Taxon indiziert die nach Analyse des strukturellen Gens *nosZ* dominierende Familie. Legende: ●, 2,4-DCP Abbauer, ○, (De)nitrifizierer.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass mikrobielle Gemeinschaften in oxischen Böden und der Drilosphäre des endogäischen Regenwurms *A. caliginosa* das Potential besitzen, *in situ* relevante 2,4-DCP Konzentrationen umzusetzen. Die gewonnenen Erkenntnisse haben neue Fragen aufgeworfen, die durch weitere Untersuchungen beantwortet werden könnten. Die Bildung von Regenwurmgangwänden unterliegt dem Regenwurmökotyp. Während epigäische Regenwürmer nur selten Gangsysteme ausbilden, kommt es in Gegenwart von endogäischen und anözischen Regenwürmern zur Entstehung von horizontalen und vertikalen, teils permanenten Gangsystemen. Der Umfang solcher Gangsysteme kann auch den Abbau von Xenobiotika im Boden beeinflussen. Der Einfluss des Regenwurmökotypes auf den Abbau und die Mineralisierung von Schadstoffen in Böden ist bislang jedoch nicht bekannt. Vergleichende Bodensäuleninkubationen mit unterschiedlichen Wurmökotypen könnten diese Lücke schließen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von Bakterien mit 2,4-DCP isoliert. Anschließende ^{14}C -Mineralisierungsversuche zeigten aber kein Abbaupotential. Wahrscheinlich führte die Abwesenheit eines selektiven Druckes (z.B. 2,4-DCP) im Laufe der Inkubation auf Festmedien zu diesen negativen Ergebnissen. Weiterführende Anreicherungen in kontinuierlicher Gegenwart von 2,4-DCP wären hilfreich, um potentiell 2,4-DC-abbauende Mikroorganismen zu kultivieren. Auch wenn ein Abbau von 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen nur sehr langsam stattgefunden hat, ist dieser dennoch im landwirtschaftlichen Boden möglich. Der Einsatz eines stabilen Isotopenversuches bietet die Möglichkeit, zusätzlich anaerobe 2,4-DCP-[C] Verwerter zu identifizieren. Die Beteiligung eukaryotischer Mikroorganismen am Abbau von 2,4-DCP könnte ebenfalls durch [^{13}C]-markiertes 2,4-DCP aufgeklärt werden. Abbauwege vieler Xenobiotika, beteiligte strukturelle Gene und in der Drilosphäre am Abbau beteiligte Mikroorganismen sind bislang wenig bis gar nicht untersucht. Die in dieser Arbeit etablierten Techniken und Methoden könnten für weiterführende Untersuchungen mit anderen Herbiziden wie z.B. Bentazon herangezogen werden. So können Lücken geschlossen und bisherige Kenntnisse vertieft werden.

5. Zusammenfassung

2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) stellt eine kommerziell bedeutende Verbindung dar, die zur Herstellung unterschiedlichster Herbizide sowie direkt als Holzschutzmittel eingesetzt wird bzw. wurde. Aufgrund der hohen Toxizität, der Persistenz in Böden und aquatischen Systemen sowie der Tendenz zur Bioakkumulation wird 2,4-DCP zu den prioritären Schadstoffen gezählt. Das in die Umwelt gelangte 2,4-DCP unterliegt im Rahmen von Stoffkreisläufen verschiedenen Abbau- und Transformationsprozessen, die in der Regel von Mikroorganismen durchgeführt werden. Regenwürmer repräsentieren hinsichtlich ihrer Biomasse in den meisten Böden die dominierende Bodentierpopulation. Der Boden, der direkt dem Einfluss von Regenwürmern unterliegt, wird als Drilosphäre bezeichnet und umfasst neben der Körperoberfläche und dem Darm auch die ausgeschiedenen Kotkrümel sowie die angelegten Gangsysteme. Durch ihre Grabtätigkeit nehmen sie starken Einfluss auf physikalische und chemische Bodenparameter sowie auf die mikrobielle Gemeinschaft im Boden und können somit das Schicksal von Xenobiotika in Böden beeinflussen. Zudem sind Regenwürmer in der Lage *in situ* N₂O zu emittieren. Das Treibhausgas N₂O weist ein 300-mal höheres Klimaerwärmungspotential als CO₂ auf und nimmt damit eine wichtige Rolle im Prozess der Klimaerwärmung ein. Schadstoffe, in Form von Pestiziden und deren Abbauprodukte, beeinflussen N₂O-bildende Prozesse wie Denitrifikation und Nitrifikation in Böden. Inwieweit Regenwürmer den Abbau von 2,4-DCP und damit verbunden die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft in landwirtschaftlichem Boden beeinflussen und welchen Effekt 2,4-DCP auf N₂O-bildende Prozesse ausübt, ist bislang weitestgehend unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher in der Drilosphäre und dem umliegenden Boden (a) den mikrobiellen Prozess des 2,4-DCP Abbaus mit den involvierten mikrobiellen Populationen zu verknüpfen und (b) den möglichen Einfluss von 2,4-DCP auf die N₂O-Bildung zu klären.

Feldfrischer Ackerboden wurde unter oxischen und anoxischen Bedingungen in Gegenwart unterschiedlicher terminaler Elektronenakzeptoren (Nitrat, Eisen, Sulfat) in Mikrokosmen inkubiert. Die Abnahme von 2,4-DCP erfolgte in allen Ansätzen ohne Verzögerungen, anoxische Inkubationen zeigten im Vergleich zur oxischen Inkubation jedoch einen stark verlangsamten und weniger effizienten Abbau. Erfasste Keimzahlen (MPNs) anaerober 2,4-DCP Verwerter in feldfrischem Boden lagen im Bereich von 0 bis $9,2 \times 10^2$ pro Gramm Boden, waren signifikant niedriger als die korrespondierender aerober Abbauer ($2,4 \times 10^3$ bis $1,4 \times 10^4$) und bestätigen somit die erzielten Ergebnisse aus den Mikrokosmeninkubationen. Der von Natur aus belüftete Ackerboden besitzt folglich ein hohes 2,4-DCP Abbaupotential unter oxischen Bedingungen.

Bodensäulenversuche mit feldfrischem Ackerboden aus Scheyern zeigten eine kontinuierliche Abnahme *in situ* relevanter 2,4-DCP Konzentrationen (20 mg pro Kilogramm) in Gegenwart und Abwesenheit des endogäischen Regenwurms *Aporrectodea caliginosa*. Bodensäulen mit Regenwürmern wiesen dabei eine zügigere 2,4-DCP Abnahme auf als Bodensäulen ohne Regenwürmer. Das aus den Bodensäuleninkubationen gewonnene Drilosphären- und Bodenmaterial wurden für weiterführende aerobe ^{12}C - und ^{14}C -Mikrokosmenversuche eingesetzt. Proben aus Regenwurm-vorbehandelten Bodensäulen zeigten ein deutlich höheres 2,4-DCP Abbau- und Mineralisierungspotential als die korrespondierenden unbehandelten Proben. Des Weiteren konnte kein signifikanter Einfluss einer 2,4-DCP Vorbehandlung auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung nachgewiesen werden. Da Regenwürmer im Boden eingetragene Xenobiotika in ihrem Gewebe akkumulieren können, wurden aerobe Mikrokosmen mit Regenwurmgewebe und [^{14}C]-2,4-DCP eingesetzt, um einen möglichen Abbau in diesem abschätzen zu können. Lediglich 4 % des eingesetzten 2,4-DCP konnte als CO_2 wieder gefunden werden, etwa 7 % wurden im Gewebe akkumuliert. Die aus 2,4-DCP-supplementierten Bodensäulen gewonnenen Gangwand- und Kotkrümelproben wiesen bis zu $1,9 \times 10^7$ MPNs pro Gramm Material auf und somit signifikant höhere MPNs als (a) der feldfrische Boden vor Inkubationsbeginn, (b) 2,4-DCP-unbehandelte Drilosphären- und Bodenproben sowie (c) Proben des Darminhaltes, was auf einen stimulierenden Effekt von 2,4-DCP auf das Wachstum 2,4-DCP-verwertender Mikroorganismen verweist. Die Abundanz der am Abbau von 2,4-DCP beteiligten strukturellen Gene *tfdB* (kodiert eine 2,4-DCP Hydroxylase), *tfdC* (kodiert die 3,5-Dichlorcatechol-1,2-Dioxygenase) und *pheA* (kodiert eine Phenolhydroxylase) wurde positiv durch die Gegenwart von Regenwürmern sowie von 2,4-DCP beeinflusst. Gangwände und Kotkrümel aus 2,4-DCP-supplementierten Bodensäulen wiesen dabei die höchste Anzahl an den untersuchten strukturellen Genen auf. Die in Bodensäulen am Abbau von 2,4-DCP beteiligten Bakterien wurden anhand von *tfdB* und *pheA* phylogenetisch gruppiert. Die detektierte Diversität dieser Genmarker wurde weder von 2,4-DCP noch von *A. caliginosa* signifikant verändert. Im Vergleich dazu führte eine Inkubation mit 2,4-DCP zu einer Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung. Die Analyse von *tfdB*-Teilsequenzen mittels Pyrosequenzierung und klassischen Genbibliotheken identifizierte dieselben dominanten Taxa (u.a. *Mycobacteriaceae*) und erzielte für die untersuchten Proben annähernd ähnliche Ergebnisse. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten CAP-SIP-Ansatzes wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen prokaryotischen Taxa identifiziert, die *in situ* relevante 2,4-DCP- ^{13}C Konzentrationen im Verlauf der Bodensäulen- und Mikrokosmeninkubation unter oxidischen Bedingungen assimilierten. Darunter die als 2,4-DCP Abbauer bekannten *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Bacillaceae* und *Flavobacteriaceae*. Zusätzlich zu dieser versierten 2,4-DCP-abbauenden Gemeinschaft konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals Vertreter der

Polyangiaceae, *Geobacteraceae*, *Peptococcaceae* sowie *Holophagaceae* als aktive 2,4-DCP-[C] Verwerter identifiziert werden.

Der Einfluss von *in situ* relevanten 2,4-DCP Konzentrationen auf die N₂O-Bildung wurde anhand von Bodensäulen und Mikrokosmen mit feldfrischem Boden untersucht und bewertet. Dabei konnte innerhalb der ersten zwei Inkubationstage kein nennenswerter inhibierender Effekt des eingesetzten 2,4-DCPs nachgewiesen werden. Erst nach drei Tagen zeigte sich eine durch 2,4-DCP bedingte Abnahme der N₂O-Emission. Während Keimzahlen denitrifizierender Mikroorganismen in 2,4-DCP-vorbehandelten Bodenproben aus Bodensäuleninkubationen in der Regel signifikant höher als in den korrespondierenden 2,4-DCP-unbehandelten Proben waren, konnten signifikant höhere MPNs denitrifizierender Mikroorganismen im Darminhalt ohne 2,4-DCP Vorbehandlung detektiert werden. Ein Einfluss von 2,4-DCP auf die MPNs in Gangwänden und Kotkrümeln wurde hingegen nicht nachgewiesen. Zudem zeigte sich kein Einfluss einer 2,4-DCP Vorbehandlung auf die Abundanz struktureller Gene von (de)nitrifizierenden und Ammonium-oxidierenden Bakterien und Archaeen. Im Allgemeinen wurden in der Drilosphäre und im Boden mehr bakterielle *amoA* Gene (kodieren für eine Ammonium-Monooxygenase) als archaeale *amoA* Gene detektiert, was darauf hinweist, dass Ammonium-oxidierende Bakterien eine wichtige Rolle in der Ammonium-oxidierenden mikrobiellen Gemeinschaft im Ackerboden aus Scheyern einnehmen. Eine durchgeführte TRFLP-Analyse des für die periplasmatische N₂O-Reduktase kodierenden Gens *nosZ* konnte ebenfalls keinen Effekt von 2,4-DCP auf die phylogenetische Zusammensetzung *nosZ*-tragender Bakterien nachweisen. Verglichen dazu waren die N₂O-Bildungsraten, die Keimzahlen von Denitrifikanten und die Abundanzen relevanter struktureller Gene in Proben aus Regenwurm-supplementierten Bodensäulen signifikant höher als in Regenwurm-unbehandelten Proben, was folglich auf eine besondere Bedeutung von Regenwürmern für die Bildung des Treibhausgases N₂O hinweist.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten kultivierungsabhängigen sowie kultivierungsunabhängigen Methoden legen die Schlussfolgerung nahe, dass (a) *in situ* relevante 2,4-DCP Konzentrationen in belüfteten Ackerboden durch eine Reihe an unterschiedlichen, bekannten aber auch bislang unbekanntem, Mikroorganismen zügig umgesetzt werden können, (b) die Abundanz sowie die Diversität dieser 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen bislang unterschätzt wurde, (c) Regenwürmer in ihrer Funktion als „Ökosystem-Ingenieure“ den 2,4-DCP Abbau beschleunigen, indem sie das Wachstum von 2,4-DCP Abbauern stimulieren und (d) die N₂O-Bildung stärker durch die Anwesenheit des Regenwurmes *A. caliginosa* als durch 2,4-DCP beeinflusst wird.

6. Summary

2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) is a precursor for the chemical synthesis and also a metabolite of different herbicides, and was widely used as a wood preservative. 2,4-DCP is classified as priority pollutant because of its toxicity, its tendency to persist in terrestrial and aquatic habitats, and its tendency to bioaccumulate in tissues. Degradation occurs in soil mainly by aerobic and anaerobic microbial processes. Earthworms represent the dominant macrofauna in many soils and contribute significantly to the cycling and physical restructuring of matter in soils, which is beneficial for nutrient availability and microbial growth. The drilosphere is composed of the different parts of a soil-based habitat that is colonized by earthworms (i.e., body surface, gut content, burrow walls, and cast). Microbial activities in soil can be augmented in the drilosphere. Thus, earthworms might influence microbial degradation of xenobiotics in soils. Earthworms emit the greenhouse gas nitrous oxide (N₂O), a major ozone-depleting substance in the atmosphere with a 300-fold higher global warming potential than CO₂ (on a per molecule basis). Xenobiotics like pesticides and their degradation products might affect N₂O-forming processes (i.e., denitrification and nitrification) in soils. So far, it is still unclear to which extent earthworms influence 2,4-DCP-degrading microbes of agricultural soil. Likewise, the effect of 2,4-DCP on N₂O-forming processes is poorly resolved. Thus, the main objectives of this thesis were to (a) determine if the drilosphere augments the microbial degradation of 2,4-DCP, (b) resolve community members associated with 2,4-DCP degradation, and (c) assess the potential effects of 2,4-DCP on the microbial production of N₂O.

Field fresh soil was used to study the degradation of 2,4-DCP in microcosms under oxic and anoxic conditions in the presence of various alternative electron acceptors (i.e., nitrate, iron, sulfate). 2,4-DCP concentrations decreased over time in all treatments. 2,4-DCP removal under anoxic conditions was slower and less efficient than that under aerated conditions. Field fresh agricultural soil from Scheyern with *in situ* relevant 2,4-DCP concentrations (20 mg per kilogram) was incubated in soil columns in the presence and absence of the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa*. 2,4-DCP was totally consumed in all treatments; however, earthworms accelerated the disappearance of 2,4-DCP in soil columns. Drilosphere and bulk soil material obtained from soil column incubations was used for subsequent ¹²C- and ¹⁴C-microcosm experiments. Degradation of 2,4-DCP was higher in oxic microcosms of soil that was pre-incubated with earthworms and drilosphere material than in soil without earthworms. Earthworms accumulate xenobiotics in their tissue. To assess an earthworm-associated 2,4-DCP degradation, microcosms with earthworm tissue and [¹⁴C]-2,4-DCP were set up. Approximately 4 % of the 2,4-DCP-derived carbon was recovered as CO₂, and

approximately 7 % 2,4-DCP-derived carbon accumulated in earthworm tissue. Most probable numbers (MPNs) of anaerobic 2,4-DCP degraders in field fresh soil were in the range of 0 to 9.2×10^2 per gram dry weight soil and thus significantly lower than the corresponding aerobic MPNs (i.e., 2.4×10^3 to 1.4×10^4). MPNs of aerobic 2,4-DCP degraders in burrow walls and cast obtained from soil columns pre-treated with 2,4-DCP approximated up to 1.9×10^7 per gram dry weight soil and therefore significantly higher than MPNs in (a) field fresh soil, (b) 2,4-DCP untreated drilosphere and bulk soil, and (c) gut content. These collective data indicated that earthworms and 2,4-DCP stimulated the growth of 2,4-DCP degraders in agricultural soil. *tfdB* (encodes a 2,4-DCP hydroxylase), *tfdC* (encodes a 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase), and *pheA* (encodes a phenol hydroxylase) are structural genes associated with 2,4-DCP degradation and were significantly more abundant in soil pre-exposed to earthworms and 2,4-DCP than in soil without earthworms and 2,4-DCP. Gene copy numbers were highest in burrow walls and cast material pre-treated with 2,4-DCP. Earthworms as well as 2,4-DCP did not alter the diversity of detected *tfdB*- and *pheA*-affiliated sequences. Pyrosequencing and clone libraries of *tfdB* identified the same dominant taxa (e.g., *Mycobacteriaceae*) and revealed nearly the same results. Comparative Amplicon Pyrosequencing based Stable Isotope Probing (CAP-SIP) identified prokaryotic taxa that assimilated *in situ* relevant 2,4-DCP- ^{13}C concentrations during oxic soil column and microcosm incubations. In addition to the well-known 2,4-DCP degraders of the families *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Bacillaceae*, and *Flavobacteriaceae* members of *Polyangiaceae*, *Geobacteraceae*, *Peptococcaceae*, and *Holophagaceae* were also identified as hitherto unknown 2,4-DCP-[C] utilizers.

The effect of *in situ* relevant 2,4-DCP concentrations on N_2O emission of field fresh agricultural soil was assessed with soil column and microcosm experiments. N_2O formation was not affected by the application of 2,4-DCP within the first two days. After two days of incubation, 2,4-DCP treated soil emitted significantly less N_2O than soil not treated with 2,4-DCP. MPNs of denitrifiers in bulk soil pre-treated with 2,4-DCP were in general significantly higher than in bulk soil not treated with 2,4-DCP. In contrast, MPNs of denitrifiers in burrow wall and cast material were not affected by 2,4-DCP. Structural genes associated with denitrification and nitrification (i.e., *narG*, *nirK*, *nirS*, *nosZ*, and *amoA*) tended to be more abundant in earthworm treated soil than in soil without earthworms, and were not significantly affected by 2,4-DCP. Bacterial *amoA* genes (encoding an ammonia monooxygenase) were in general more abundant in drilosphere and bulk soil material than *amoA* genes of Archaea, indicating that ammonia-oxidizing bacteria may be important nitrifiers in agricultural soil of Scheyern. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of *nosZ* (encodes a N_2O -reductase) revealed a dominance of *Bradyrhizobium japonicum* affiliated TRFs

in drilosphere and bulk soil material irrespective of 2,4-DCP treatment. In comparison to 2,4-DCP, earthworms significantly affected the production (i.e., accumulation) of N₂O in soil columns. MPNs of denitrifiers and the abundance of structural genes associated with denitrification and nitrification were likewise higher in earthworm treated soil than in untreated soil samples. Thus, the collected data illustrate that the endogeic earthworm *A. caliginosa* may contribute to the formation of the greenhouse gas N₂O.

Soil column and microcosm experiments, culture-dependent and culture-independent quantification of 2,4-DCP degraders, denitrifiers, and nitrifiers as well as molecular analysis of structural genes and active 2,4-DCP-consuming bacteria suggest that (a) *in situ* relevant concentrations of 2,4-DCP can be mineralized and assimilated by various known and hitherto unknown microorganisms in aerated agricultural soil, (b) the abundance and diversity of 2,4-DCP degraders is thus far underestimated, (c) earthworms as “ecosystem engineers” accelerate 2,4-DCP degradation by stimulating the growth of 2,4-DCP degraders, and (d) earthworms rather than 2,4-DCP influence the production of N₂O.

7. Literaturverzeichnis

- Ahlborg, U.G. und Thunberg, T.M.** (1980): Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit Rev Toxicol.* **7**: 1-35
- Aira, M., Monroy, F. und Domínguez, J.** (2005): Ageing effects on nitrogen dynamics and enzyme activities in casts of *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Pedobiologia.* **49**: 467-473
- Alef, K.** (1991): *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie.* Ecomed Verlagsgesellschaft Landsberg/Lahn, Deutschland
- Alef, K. und Nannipieri, P.** (1995): *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* Academic Press Inc. San Diego, USA. 576 pp.
- Alexander, M.** (1965): Biodegradation: Problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Adv Appl Microbiol.* **7**: 35-80
- Alfreider, A., Vogt, C. und Babel, W.** (2003): Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene-contaminated subsurface samples. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 1372-1376
- Al-Thani, R.F., Abd-El-Haleem, D.A.M. und Al-Shammri, M.** (2007): Isolation, biochemical and molecular characterization of 2-chlorophenol-degrading *Bacillus* isolates. *Afr J Biotechnol.* **6**: 2675-2681
- Amador, J.A. und Görres, J.H.** (2007): Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. *Soil Biol Biochem.* **39**: 2070-2077
- Amann, R.I., Ludwig, W. und Schleifer, K.H.** (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**: 143-169
- An, D.-S., Kim, S.-G., Ten, L.N. und Cho, C.-H.** (2009): *Pedobacter daechungensis* sp. nov., from freshwater lake sediment in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 69-72
- Ando, K., Kato, A. und Suzuki, S.** (1970): Isolation of 2,4-dichlorophenol from a soil fungus and its biological significance. *Biochem Biophys Res Commun.* **39**: 1104-1107
- Andriuzzi, W.S., Bolger, T. und Schmidt, O.** (2013): The drilosphere concept: fine-scale incorporation of surface residue-derived N and C around natural *Lumbricus terrestris* burrows. *Soil Biol Biochem.* **64**: 136-138
- Apajalathi, J.H.A. und Salkinoja-Salonen, M.S.** (1986): Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **25**: 62-67

- Arora, P.K.** (2012): Decolourization of 4-chloro-2-nitrophenol by a soil bacterium, *Bacillus subtilis* RKJ 700. PLOS ONE. **7**: e52012
- Arora, P.K., Srivastava, A. und Singh, V.P.** (2014): Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in *Burkholderia* sp. RKJ 800. Environ Sci Pollut Res. **21**: 2298-2304
- Back, G. und Türkay, M.** (2001): Ein Maß für die Ausgewogenheit der Arten (Äquität). In: Janich, Gutmann, Prieß: Biodiversität. Springer, Berlin
- Bælum, J., Nicolaisen, M.H., Holben, W.E., Strobel, B.W., Sørensen, J. und Jacobsen, C.S.** (2008): Direct analysis of *tfdA* gene expression by indigenous bacteria in phenoxy acid amended agricultural soil. ISME J. **2**: 677-687
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M.H. und van Spanning, R.J.M.** (1998): Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. Microbiol Mol Biol Rev. **62**: 1046-1078
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H. und Nies, L.** (2003): Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. Appl Environ Microbiol. **69**: 3350-3358
- Bange, H.W.** (2000): Global change: it's not a gas. Nature. **408**: 301-302
- Bao, P., Hu, Z.-Y., Wang, X.-J., Chen, J., Ba, Y.-X., Hua, J., Zhu, C.-Y., Zhong, M. und Wu, C.-Y.** (2012): Dechlorination of *p,p'*-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. Environ Pollut. **162**: 303-310
- Bardon, C., Piola, F., Bellvert, F., Haichar Zahar, F., Comte, G., Meiffren, G., Pommier, T., Puijalón, S., Tsafack, N. und Poly, F.** (2014): Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. New Phyt. **204**: 620-630
- Barkay, T. und Pritchard, H.** (1988): Adaption of aquatic microbial communities to pollutant stress. Microbiol Sci. **5**: 165-169
- Barley, K.P.** (1959): The influence of earthworms on soil fertility II. Consumption of soil and OM by the earthworm *Allolobophora caliginosa* (Savigny). Aust J Agr Re. **10**: 179-185
- Barns, S.M., Takala, S.L. und Kuske, C.R.** (1999): Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. Appl Environ Microbiol. **65**: 1731-1737
- Barois, I. und Lavelle, P.** (1986): Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). Soil Biol Biochem. **18**: 539-541

- Barra Caracciolo, A., Fajardo, C., Grenni, P., Saccà, M.L., Amalfitano, S., Ciccoli, R., Martin, M. und Gibello, A.** (2010): The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS Microbiol Ecol.* **71**: 127-136
- Barruiso, E., Benoit, P. und Dubus, I.G.** (2008): Formation of pesticide nonextractable (bound) residues in soil: magnitude, controlling factors and reversibility. *Environ Sci Technol.* **42**: 1845-1854
- Basile, L.A. und Erjiman, L.** (2010): Maintenance of phenol hydroxylase genotypes at high diversity in bioreactors exposed to step increase in phenol loading. *FEMS Microbiol Ecol.* **73**: 336-348
- Bast, E.** (1999): *Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken.* 1. Auflage. Spektrum Verlag Heidelberg, Deutschland
- Bateman, E.J. und Baggs, E.M.** (2005): Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biol Fertil Soil.* **41**: 379-388
- Bathe, S., Lebhuhn, M., Ellwart, J.W., Wuertz, S. und Hausner, M.** (2004): High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community. *FEMS Microbiol Lett.* **235**: 215-219
- Beadle, C.A. und Smith, A.R.W.** (1982): The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur J Biochem.* **123**: 323-3332
- Beaumont, H.J.E., Hommes, N.G., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J., Arciero, D.M., Hooper, A.B., Westerhoff, H.V. und van Spanning, R.J.M.** (2002): Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. *J Bacteriol.* **184**: 2557-2560
- Bedmar, E.J., Robles, E.F. und Delgado, M.J.** (2005): The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans.* **33**: 141-144
- Bell, L.C., Richardson, D.J. und Ferguson, S.J.** (1990): Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Lett.* **265**: 85-87
- Beman, J.M., Sachdeva, R. und Fuhrman, J.A.** (2010): Population ecology of nitrifying *Archaea* and *Bacteria* in the southern California bight. *Environ Microbiol.* **12**: 1282-1292
- Benoit, P. und Barriuso, E.** (1997): Fate of 14C-ring-labeled 2,4-D, 2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol during straw composting. *Biol Fertil Soils.* **25**: 53-59

- Bernard, L., Chapius-Lardy, L., Razafimbelo, T., Razafindrakoto, M., Pablo, A.-L., Legname, E., Poulain, J., Bröls, T., O'Donohue, M., Brauman, A., Chotte, J.-L. und Blanchart, E.** (2012): Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME J.* **6**: 213-222
- Bernardet, J.-F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K. und Vandamme, P.** (1996): Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol.* **46**: 128-148
- Bertora, C., van Vliet, P.C.J., Hummelink, E.W.J. und van Groenigen, J.W.** (2007): Do earthworms increase N₂O emissions in ploughed grassland? *Soil Biol Biochem.* **39**: 632-640
- Bhandari, G.S., Randhawa, N.S. und Maskina, M.S.** (1967): The polysaccharide content of earthworm casts. *Curr Sci.* **36**: 519-520
- Bhat, M.A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C.S. und Nakazawa, T.** (1994): Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 307-312
- Binet, F., Kersanté, A., Munier-Lamy, C., Le Bayon, R.-C., Belgy, M.-J. und Shipitalo, M.J.** (2006) : Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol Biochem.* **38**: 1255-1263
- Blachnik, R.** (1998): D'Ans Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker. 4th ed. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Deutschland
- Blakemore, R.J.** (2003): A provisional list of valid names of Lumbricoidea (Oligochaeta) after Eaton 1983. In: Moreno, A.G. und Borges, S. (eds.). *Advances in earthworm taxonomy*. Editorial Complutense, Madrid, Spanien. pp 75-120
- Bleakley, B.H. und Tiedje, J.M.** (1982): Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Appl Environ Microbiol.* **44**: 1342-1348
- Bolan, N.S. und Baskaran, S.** (1996): Characteristics of earthworm casts affecting herbicide sorption and movement. *Biol Fertil Soils.* **22**: 367-372
- Bollag, J.-M. und Kurek, E.J.** (1980): Nitrite and nitrous oxide accumulation during denitrification in the presence of pesticide derivatives. *Appl Environ Microbiol.* **39**: 845-849
- Bollag, J.-M. und Tung, G.** (1972): Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biol Biochem.* **4**: 271-276
- Borken, W., Gründel, S. und Beese, F.** (2000): Potential contribution of *Lumbricus terrestris* L. to carbon dioxide, methane and nitrous oxide fluxes from a forest soil. *Biol Fertil Soils.* **32**: 142-148

- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., De Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J. und Cappenberg, T.E.** (1998): Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature*. **392**: 801-805
- Botterweck, J., Schmidt, B., Schwarzbauer, J., Kalathoor, R. und Schäffer, A.** (2014): Enhanced non-extractable residue formation of ^{14}C -metaxyl catalyzed by an immobilized laccase. *Biol Fertl Soils*. **50** : 1015-1024
- Boucard, T.K., Bardgett, R.D., Jones, K.C. und Semple, K.T.** (2005) : Influence of plants on the chemical extractability and biodegradability of 2,4-dichlorophenol. *Environ Pollut*. **133**: 53-62
- Bouché, M.B.** (1975): Action de la faune sur les états de la matière organique dans les écosystèmes. In: Kilbertus G., Reisinger, O., Mourey, A., Cancela da Fonseca, J.A. (eds). *Humification et Biodegradation*. Pierron: Sarreguemines. pp 157-168
- Bouché, M.B.** (1977) : Strategies lombriciennes. In : Lohm, U. und Persson, T. (eds.). *Soil organisms as components of ecosystems*. Ecological Bulletins, Stockholm, Schweden. pp 122-132
- Braker G. und Tiedje J.M.** (2003): Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environl Microbiol*. **69**: 3476-3483
- Braker, G., Schwarz, J. und Conrad, R.** (2010): Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. *FEMS Microbiol Ecol*. **73**: 134-148
- Braker, G., Zhou, J., Wu., L., Devol, A.H. und Tiedje, J.M.** (2000): Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol*. **66**: 2096-2104
- Bray, J.R. und Curtis, J.T.** (1957): An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. **27**: 325-349
- Breitenstein, A., Saano, A., Salkinoja-Salonen, M., Andreesen, J.R. und Lechner, U.** (2001): Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A. *Arch Microbiol*. **175**: 133-142
- Bremner, J.M.** (1997): Sources of nitrous oxide in soils. *Nutr Cycl Agro*. **49**: 7-16
- Brito-Vega, H. und Espinosa-Victoria, D.** (2009): Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms (*Oligochaeta*). *J Biol Sci*. **9**: 192-199
- Brown, G.G.** (1995): How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil*. **170**: 209-231

- Brown, G.G., Barois, I. und Lavelle, P.** (2000) : Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol.* **36**: 177-198
- Brown, G.G. und Doube, B.M.** (2004): Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. In: Edwards, C.A. (ed.). *Earthworm ecology*. 2. Auflage. CRC Press, Boca Raton, USA. pp 213-239
- Brown, G.G., Edwards, C.A. und Brussaard, L.** (2004): How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In: Edwards, C.A. (ed.). *Earthworm ecology*. 2. Auflage. CRC Press, Boca Raton, USA. pp 13-50
- Bryant, S.E. und Schultz, T.W.** (1994): Toxicological assessment of biotransformation products of pentachlorophenol: Tetrahymena population growth impairment. *Arch Environ Contam Toxicol.* **26**: 299-303
- Burke Hurt, S.S., Smith, J.M. und Hayes, A.W.** (1983): Nitrofen: a review and perspective. *Toxicology.* **29**: 1-37
- Burth, I., Benckiser, G. und Ottow, J.C.G.** (1982): N₂O-Freisetzung aus Nitrit (Denitrifikation) durch ubiquitäre Pilze unter aeroben Bedingungen. *Naturwissenschaften.* **69**: 598-599
- Butenschoen, O., Ji, R., Schäffer, A. und Scheu, S.** (2009): The fate of catechol in soil as affected by earthworms and clay. *Soil Biol Biochem.* **41**: 330-339
- Byzov, B.A., Khomyakov, N.V., Kharin, S.A. und Kurakov, A.V.** (2007): Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *Eur J Soil Biol.* **43**: S149
- Byzov, B.A., Nechitaylo, T.Y., Bumazhkin, B.K., Kurakov, A.V., Golyshin, P.N. und Zvyagintsev, D.G.** (2009): Cultural microorganisms from the earthworm digestive tract. *Microbiology.* **78**: 360-368
- Caliz, J., Vila, X., Martí, E., Sierra, J., Cruañas, R., Garau, M.A. und Montserrat, G.** (2011): Impact of chlorophenols on microbiota of an unpolluted acidic soil: microbial resistance and biodegradation. *FEMS Microbiol Ecol.* **78**: 150-164
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. et al.** (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods.* **7**: 335-336
- Castaldi, S. und Smith, K.A.** (1998): Effect of cycloheximide on N₂O and NO₃⁻ production in a forest and an agricultural soil. *Biol Fertil Soils.* **27**: 27-34
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., Barras, F. und Heulin, T.** (2006): The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ Microbiol.* **8**: 514-525

- Chang, Y.-J., Anwar Hussain, A.K.M., Stephen, J.R., Mullen, M.D., White, D.C. und Peacock, A.** (2001): Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environ Toxicol Chem.* **20**: 2462-2468
- Chang, C.-H. und James, S.** (2011): A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiologia.* **54**: S3-S9
- Chao, A.** (1984): Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist.* **11**: 265-270
- Chao, C.-C. und Young, C.-C.** (1995): The denitrification characteristic of upland soils in Taiwan. *J Agri Ass.* **0**: 70-89
- Chaudhry, G.R. und Huang, G.H.** (1988): Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J Bacteriol.* **170**: 3897-3902
- Chen, G., Guan, S., Zeng, G., Li, X., Chen, A., Shang, C., Zhou, Y., Li, H. und He, J.** (2013): Cadmium removal and 2,4-dichlorophenol degradation by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* loaded with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**: 3149-3157
- Chen, C., Whalen, J.K. und Guo, X.** (2014): Earthworms reduce soil nitrous oxide emissions during drying and rewetting cycles. *Soil Biol Biochem.* **68**: 117-124
- Chen, W., Zhang, C.K., Cheng, Y., Zhang, S. und Zhao, H.** (2013): A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. *PloS ONE.* **8**: e70837
- Choi, P.S., Naal, Z., Moore, C., Casado-Rivera, E., Abruña, H.D., Helmann, J.D. und Shapleigh, J.P.** (2006): Assessing the impact of denitrifier-produced nitric oxide on other bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 2200-2205
- Clarke, K.R.** (1993): Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austr J Ecol.* **18**: 117-143
- Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C.V. und Lovley, D.R.** (1999): *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe (III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int J Syst Bacteriol.* **49**: 1615-1622
- Coenye, T.** (2014): The family *Burkholderiaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F. (eds.), *The prokaryotes*, 4th ed Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Springer-Verlag, New York. pp 759-776
- Conrad, R.** (1996): Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂; CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol Rev.* **60**: 609-640
- Correia, F.V. und Moreira, J.C.** (2010): Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bull Environ Contam Toxicol.* **85**: 264-268

- Cruaud, P., Vigneron, A., Lucchetti-Miganeh, C., Ciron, P.E., Godfroy, A. und Cambon-Bonavita, M.-A.** (2014): Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* **80**: 4626-4639
- Cupples, A.M. und Sims, G.K.** (2007): Identification of *in situ* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil microorganisms using DNA-stable isotope probing. *Soil Biol Biochem.* **39**: 232-238
- Curry, J.P. und Schmidt, O.** (2007): The feeding ecology of earthworms – a review. *Pedobiologia.* **50**: 463-477
- Daane, L.L., Molina, J.A.E., Berry, E.C. und Sadowsky, M.J.** (1996): Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 515-521
- Daane, L.L., Molina, J.A.E. und Sadowsky, M.J.** (1997): Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 679-686
- Dallinger, A. und Horn, M.A.** (2014): Agricultural soil and drilosphere as reservoirs of new and unusual assimilators of 2,4-dichlorophenol carbon. *Environ Microbiol.* **16**: 84-100
- Daniel, S.L. und Drake, H.L.** (1993): Oxalate- and glyoxalate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 3062-3069
- Darwin, C.R.** (1881): The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Murray, London, UK.
- Decaëns, T., Rangel, A.F., Asakawa, N. und Thomas, R.J.** (1999): Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm cast in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biol Fertil Soils.* **30**: 20-28
- Degelmann, D.M., Kolb, S., Dumont, M., Murrell, J.C. und Drake, H.L.** (2009): *Enterobacteriaceae* facilitate the anaerobic degradation of glucose by a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **68**: 312-319
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E. und Altermatt, F.** (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol Conserv.* **183**: 53-63
- De Man, J.C.** (1975): Probability of most probable numbers. *Eur J Appl Microbiol.* **1**: 67-78
- Depkat-Jakob, P.S., Brown, G.G., Tsai, S.M., Horn, M.A. und Drake, H.L.** (2013): Emission of nitrous oxide and dinitrogen by diverse earthworm families from Brazil and resolution of associated denitrifying and nitrate-dissimilating taxa. *FEMS Microbiol Ecol.* **83**: 375-391

- Depkat-Jakob, P.S., Hilgarth, M., Horn, M.A. und Drake, H.L.** (2010): Effect of earthworm feeding guilds on ingested dissimilatory nitrate reducers and denitrifiers in the alimentary canal of the earthworm. *Appl Environ Microbiol.* **76**: 6205-6214
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. und Andersen G.L.** (2006): Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 5069-72
- Devliegher, W. und Verstraete, W.** (1997): Microorganisms and soil physico-chemical conditions in the drilosphere of *Lumbricus terrestris*. *Soil Biol Biochem.* **29**: 1721-1729
- Di, H.J., Cameron, K.C., Podolyan, A. und Robinson, A.** (2014): Effect of soil moisture status and a nitrification inhibitor, dicyandiamide, on ammonia oxidizer and denitrifier growth and nitrous oxide emissions in a grassland soil. *Soil Biol Biochem.* **73**: 59-68
- DiGiovanni, G.D., Neilson, J.W., Pepper, I.L. und Sinclair, N.A.** (1996): Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2521-2526
- Ditterich, F., Poll, C., Pagel, H., Babin, D., Smalla, K., Horn, M.A., Streck, T. und Kandeler, E.** (2013): Succession of bacterial and fungal 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders at the soil-litter interface. *FEMS Microbiol Ecol.* **86**: 85-100
- Ditzelmüller, G., Loidl, M. und Streichsbier, F.** (1989): Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol.* **31**: 93-96
- Dolfing, J. und Harrison, B.K.** (1992): Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in aerobic environments. *Environ Sci Technol.* **26**: 2213-2218
- Don, A., Steinberg, B., Schöning, I., Pritsch, K., Joschko, M., Gleixner, G. und Schulze, E.-D.** (2008): Organic carbon sequestration in earthworm burrows. *Soil Biol Biochem.* **40**: 1803-1812
- Don, R.H. und Pemberton, J.M.** (1981): Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* **145**: 681-686
- Dos Santos Martins, V.A.P., Heim, S., Moore, E.R.B., Strätz, M. und Timmis, K.N.** (2004): Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* **6**: 1264-1286
- Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2006): Earthworms as a transient heaven for terrestrial denitrifying microbes: a review. *Eng Life Sci.* **6**: 261-265

- Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2007): As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annu Rev Microbiol.* **61**: 169-189
- Drake, H.L., Schramm, A. und Horn, M.A.** (2006): Earthworm gut microbial biomes: their importance to soil microorganisms, denitrification, and the terrestrial production of the greenhouse gas N₂O. In: König, H. und Varma, A. (eds.), *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Springer-Verlag, New York. pp 65-87
- Drotleff, J., Fluthwedel, A., Pohle, H. und Spilok, K.** (1992): *Handbuch Chlorchemie II- Ausgewählte Produktlinien*. Umweltbundesamt Berlin, Texte 42/92
- Duffner, F.M. und Müller, R.** (1998): A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol Lett.* **161**: 37-45
- Duldhardt, I., Nijenhuis, I., Schauer, F. und Heipieper, H.J.** (2007): Anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Desulfococcus multivorans*, *Geobacter sulfurreducens* are more sensitive towards organic solvents than aerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**: 705-711
- Dumont, M.G. und Murrell, J.C.** (2005): Stable isotope probing-linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol.* **3**: 499-504
- Dumont, M.G., Pommerenke, B., Casper, P. und Conrad, R.** (2011): DNA-, RNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediments. *Environ Microbiol.* **13**: 1153-1167
- Dundee, L. und Hopkins, D.W.** (2001): Different sensitivities to oxygen of nitrous oxide production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosolobus multififormis*. *Soil Biol Biochem.* **33**: 1563-1565
- Ebert, D.** (1992): Differences in uptake of bound residues of bentazon, a herbicide, by two different earthworm species, *Eisenia foetida* (Sav.) and *Lumbricus rubellus* (Hoffm.). *Soil Biol Biochem.* **24**: 1715-1718
- Edgcomb, V., Orsi, W., Bunge, J., Jeon, S., Christen, R., Leslin, C., Holder, M., Taylor, G.T., Suarez, P., Varela, R. und Epstein, S.** (2011): Protistan microbial observatory in the Cariaco basin, caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness. *ISME J.* **5**: 1344-1355
- Edwards, C.A.** (2004): *Earthworm ecology*. 2. Auflage. CRC Press, Boca Raton, USA
- Edwards, C.A. und Bohlen, P.J.** (1996): *Biology and ecology of earthworms*. 3. Auflage. Chapman & Hall, London, UK.
- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Owens, L.B. und Dick, W.A.** (1993): Factors affecting preferential flow of water and atrazine through earthworm burrows under continuous no- till corn. *J Environ Qual.* **22**: 453-457

- Egert, M. und Friedrich, M.W.** (2003): Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 2555-2562
- Egert, M., Marhan, S., Wagner, B., Scheu, S. und Friedrich, M.W.** (2004): Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and cast of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol Ecol.* **48**: 187-197
- Eichorst, S.A., Breznak, J.A. und Schmidt, T.M.** (2007): Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 2708-2717
- Elliott, P.W., Knight, D. und Anderson, J.M.** (1990): Denitrification in earthworm casts and soil from pastures under different fertilizer and drainage regimes. *Soil Biol Biochem.* **22**: 601-605
- Escher, B.I., Snozzi, M. und Schwarzenbach, R.P.** (1996): Uptake, speciation and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. *Environ Sci Technol.* **30**: 3071-3079
- Euzéby, J.P.** (2010): List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Zugriff am 31.07.2013 unter <http://www.bacterio.net/>.
- Evans, W.C., Smith, B.S.W., Fernley, H.N. und Davies, J.I.** (1971): Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem J.* **122**: 543-551
- Ewers, J., Freier- Schröder, D. und Knackmuss, H.-J.** (1990): Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Arch Microbiol.* **154**: 410-413
- Ezaki, T.** (2009): Family IV. *Peptococcaceae*. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. und Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 nd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 969-1007
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B.T. und Tomlin, A.D.** (2000): Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biol Biochem.* **32**: 23-33
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B.T., Tomlin, A.D. und Bryan, R.B.** (2001): Sorption of atrazine and metachlor by burrow linings developed in soils with different crop residues at the surface. *J Environ Sci Health.* **B36**: 389-396
- Fahr, K., Wetzstein, H.-G., Grey, R. und Schlosser, D.** (1999): Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microb Lett.* **175**: 127-132
- Field, J.A. und Sierra-Alvarez, R.** (2008): Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev Environ Sci Biotechnol.* **7**: 211-241

- Finkel'shtein, Z.I., Baskunov, B.P., Golovlev, E.L., Moiseeva, O.V., Vervoort, J., Rietjens, I. und Golovleva, L.A.** (2000): Dependence of the conversion of chlorophenols by Rhodococci on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology*. **69**: 49-57
- Fischer, K., Hahn, D., Honerlage, W. und Zeyer, J.** (1997): Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biol Biochem*. **29**: 1149-1152
- Flanagan D.A., Gregory L.G., Carter J.P., Karakas-Sen A., Richardson D.J. und Spiro S.** (1999): Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol Lett*. **177**: 263-270
- Fleming, B.I.** (1995): Organochlorines in perspective. *Tappi J*. **78**: 93-98
- Foesel, B.U., Nägele, V., Naether, A., Wüst, P.K., Weinert, J., Bonkowski, M., Lohaus, G., Polle, A., Alt, F., Oelmann, Y., Fischer, M., Friedrich, M.W. und Overmann, J.** (2014): Determinants of *Acidobacteria* activity inferred from the relative abundances of 16S rRNA transcripts in german grassland and forest soils. *Environ Microbiol*. **16**: 658-675
- Foesel, B.U., Rohde, M. und Overmann, J.** (2013): *Blastocatella fastidiosa* gen. nov., sp. nov., isolated from semiarid savanna soil-the first described species of *Acidobacteria* subdivision 4. *Syst Appl Microbiol*. **36**: 82-89
- Fontaine, B., Nuzzo, A., Spaccini, R. und Piccolo, A.** (2013): Degradation of 2,4-dichlorophenol and coupling into humic matter by oxidative biomimetic catalysis with iron-porphyrin. *J Geochem Explor*. **129**: 28-33
- Fournier, J.C.** (1980): Enumeration of the soil micro-organisms able to degrade 2,4-D by metabolism or co-metabolism. *Chemosphere*. **9**: 169-174
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Benman, J.M., Santoro, A.E. und Oakley, B.B.** (2005) : Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**: 14683-14688
- Frankki, S., Persson, Y., Öberg, L., Skjällberg, U. und Tysklind, M.** (2007): Mobility of chloroaromatic compounds in soil: case studies of swedish chlorophenol-contaminated sawmill sites. *AMBIO*. **36**: 452-457
- Friedrich, M.W.** (2006): Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr Opin Biotechnol*. **17**: 59-66
- Fries, M.R., Forney, L.J. und Tiedje, J.M.** (1997): Phenol- and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Appl Environ Microbiol*. **63**: 1523-1530
- Fuchs, G.** (2007): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Deutschland

- Fuka Mrkonjic, M., Engel, M., Gattinger, A., Bausenwein, U., Sommer, M., Munch, J.C. und Schloter, M.** (2008): Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. *Soil Biol Biochem.* **40**: 1646-1653
- Fukuda, M.** (1993): Diversity of chloroaromatic oxygenases. *Curr Opin Biotechn.* **4**: 339-343
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Yanagi, K., Yokota, A. und Harayama, S.** (2008): *Acanthopleuribacter pedis* gen nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a chiton, and description of *Acanthopleuribacteraceae* fam. nov., *Acanthopleuribacteriales* ord. nov., *Holophagaceae* fam. nov., *Holophagales* ord. nov. and *Holophagae* classis nov. in the phylum 'Acidobacteria'. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**: 2597-2601
- Futamata, H., Harayama, S. und Watanabe, K.** (2001): Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 4671-4677
- Gadkari, D.** (1984): Influence of herbicides Goltix and Sencor on nitrification. *Zentralblatt für Mikrobiologie.* **139**: 623-631
- Gagic, D., Maclean, P.H., Li, D., Attwood, G.T. und Moon, C.D.** (2015): Improving the genetic representation of rare taxa within complex microbial communities using DNA normalization methods. *Mol Ecol Res.* **15**: 464-476
- Gallizia, I., McClean, S. und Banat, I.M.** (2003): Bacterial biodegradation of phenol and 2,4-dichlorophenol. *J Chem Technol Biotechnol.* **78**: 959-963
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P. und Sutton, M.A.** (2008): Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science.* **320**: 889-892
- Gange, A.C.** (1993): Translocation of mycorrhizal fungi by earthworms during early succession. *Soil Biol Biochem.* **25**: 1021-1026
- Gao, J., Liu, L., Liu, X., Zhou, H., Huang, S. und Wang, Z.** (2008): Levels and spatial distribution of chlorophenols – 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China. *Chemosphere.* **71**: 1181-1187
- Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K.T., Pearce, T.G. und Jones, K.C.** (2001): Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ Sci Technol.* **35**: 501-507
- Gevrenova, R., Badjakov, I., Nikolova, M. und Doichinova, I.** (2013): Phenolic derivatives in raspberry (*Rubus* L.) germplasm collection in Bulgaria. *Biochem Syst Ecol.* **50**: 419-427
- Giannopoulos, G., Pulleman und van Groenigen, J.W.** (2010): Interactions between residue placement and earthworm ecological strategy affect aggregate turnover and N₂O dynamics in agricultural soil. *Soil Biol Biochem.* **42**: 618-625

- Gilles, A., Megléc, E., Pech, N., Ferreira, S., Malausa, T. und Martin, J.F.** (2011): Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Gen.* **12**: 245
- Gleave, A.P., Taylor, R.K., Morris, B.A.M. und Greenwood, D.R.** (1995): Cloning and sequencing of a gene encoding the 69-kDa extracellular chitinase of *Janthinobacterium lividum*. *FEMS Microbiol Lett.* **131**: 279-288
- Gmelin, L.** (1936): *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. Stickstoff.* 8. Auflage, Verlag Chemie GmbH, Berlin
- Gmelin, L.** (1958): *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. Sauerstoff.* 8. Auflage, Verlag Chemie GmbH, Berlin
- Gomes, C.M., Guiffrè, A., Forte, E., Vicente, J.B., Saraiva, L.M., Brunori, M. und Teixeira, M.** (2002): A novel type of nitric-oxide reductase *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J Biol Chem.* **277**: 25273-25276
- Gonod, L., Chadoeuf, J. und Chenu, C.** (2006): Spatial distribution of microbial 2,4-dichlorophenoxy acetic acid mineralization from field to microhabitat scales. *Soil Sci Soc Am J.* **70**: 64-71
- Goodfellow, M. und Maldonado, L.A.** (2006): The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds.), *The prokaryotes*, 3rd ed Archaea, Firmicutes, Actinomycetes. Springer-Verlag, New York. pp 843-888
- Gordon, N.S., Valenzuela, A., Adams, S.M., Ramsey, P.W., Pollock, J.L., Holben, W.E. und Gannon, J.E.** (2009): *Pedobacter nyackensis* sp. nov., *Pedobacter alluvionis* sp. nov. and *Pedobacter borealis* sp. nov., isolated from Montana floodplain sediment and forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 1720-1726
- Gorres, J.H., Savin, M.C. und Amador, J.A.** (1997): Dynamics of carbon and nitrogen mineralization, microbial biomass, and nematode abundance within and outside the burrow walls of anecic earthworms (*Lumbricus terrestris*). *Soil Sci.* **162**: 666-671
- Goswami, M., Shiravaman, N. und Singh, R.P.** (2002): Kinetics of chlorophenol degradation by benzoate-induced culture of *Rhodococcus erythropolis* M1. *World J Microbiol Biotechnol.* **18**: 779-783
- Gove, A.D., Sadler, R., Matsuki, M., Archibald, R., Pearse, S. und Garkaklis, M.** (2013): Control charts for improved decisions in environmental management: a case study of catchment water supply in south-west Western Australia. *Ecol Man Rest.* **14**: 127-134
- Gözdereliler, E., Boon, N., Aamand, J., De Roy, K., Granitsiotis, M.S., Albrechtsen, H.-J. und Sørensen, S.R.** (2013): Comparing metabolic functionalities, community structures, and dynamics of herbicide-degrading communities cultivated with different substrate concentrations. *Appl Environ Microbiol.* **79**: 367-375

- Graff, O.** (1983): Unserer Regenwürmer. Lexikon für Freunde der Bodenbiologie. 2. unveränderte Auflage. Verlag M. & H. Schaper, Hannover, Deutschland
- Greer, C.W., Hawari, J. und Samson, R.** (1990): Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. Arch Microbiol. **154**: 317-322
- Gribble, G.W.** (2005): Umweltgifte vom Gabentisch der Natur. Spektrum der Wissenschaft. Juni **2005**: 38-45
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. und Bailey, M.J.** (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. Appl Environ Microbiol. **66**: 5488-5491
- Grimont, F. und Grimont, P.A.D.** (2006) : The genus *Enterobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds.), The prokaryotes, 3rd ed Volume VI. Springer-Verlag, New York. pp 197-214
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W. und Prosser, J.I.** (2010): Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. FEMS Microbiol Ecol. **74**: 566-574
- Guglielmetti, S., Basilio, R., Taverniti, V., Arioli, S., Piagnani, C. und Bernacchi, A.** (2013): *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. World J Microbiol Biotechnol. **29**: 2025-2032
- Guo, G.-X., Deng, H., Qiao, M., Mu, Y.-J. und Zhu, Y.-G.** (2011): Effect of pyrene on denitrification activity and abundance and composition of denitrifying community in an agricultural soil. Environ Pollut. **159**: 1886-1895
- Gutierrez, T., Rhodes, G., Mishamandani, S., Berry, D., Whitman, W.B., Nichols, P.D., Semple, K.T. und Aitken, M.D.** (2014) : Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon- degrading bacterium. Appl Environ Microbiol. **80**: 618-628
- Guzik, U., Greń, I., Wojcieszynska, D. und Łabużek, S.** (2009): Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. Braz J Microbiol. **40**: 285-291
- Hägglom, M.M.** (1992): Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbiol Rev. **103**: 29-72
- Hägglom, M.M., Janke, D. und Salkinoja-Salonen, M.S.** (1989): Transformation of chlorinated phenolic compounds in the genus *Rhodococcus*. Microbiol Ecol. **18**: 147-159

- Häggbloom, M.M., Knight, V.K. und Kerkhof, L.J.** (2000): Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environ Pollut.* **107**: 199-207
- Haimi, J., Salminen, J., Huhta, V., Knuutinen, J. und Palm, H.** (1992): Bioaccumulation of organochlorine compounds in earthworms. *Soil Biol Biochem.* **24**: 1699-1703
- Hallgren, P., Westbom, R., Nilsson, T., Sporring, S. und Björklund, E.** (2006): Measuring bioavailability of polychlorinated biphenyls in soil to earthworms using selective supercritical fluid extraction. *Chemosphere.* **63**: 1532-1538
- Hallin, S. und Lindgren, P-E.** (1999): PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 1652-1657
- Hammer, Ø., Harper D.A.T. und Ryan P.D.** (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* **4**: 1-9
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580
- Hanson, P.E., Yoder, J.A., Pizzuli, J.L. und Snaders, C.I.** (2002): Identification of 2,4-dichlorophenol in females of the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), and its possible role as a component of the attractant sex pheromone. *J Med Entomol.* **39**: 945-947
- Harborne, J.B.** (1980): Plant phenolics. *In*: Bell, E.A. und Charlwood, B.V. (eds.), Secondary plant products. *Encyclopedia of plant physiology.* 8. Springer-Verlag, Berlin. pp 329-402
- Harker, A.R., Olsen, R.H. und Seidler, R.J.** (1989): Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (*tfd*) pathway of plasmid pJP4: mapping and characterization of the *tfd* regulatory gene, *tfdR*. *J Bacteriol.* **171**: 314-320
- Harrigan, W.F. und Mc Cance, M.E.** (1966): *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Press. London
- Hartenstein, F., Hartenstein, E. und Hartenstein, R.** (1981): Gut load and transit time in the earthworm *Eisenia foetida*. *Pedobiologia.* **22**: 5-20
- Hartmans, S., De Bont, J.A.M. und Stackebrandt, E.** (2006): The genus *Mycobacterium*-nonmedical. *In*: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds.), *The prokaryotes*, 3rd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 889-918
- Harwood, C.S. und Parales, R.E.** (1996): The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol.* **50**: 553-590
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spiek, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H. und Wagner, M.** (2008): A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**: 2134-2139

- Hawkins, A.C. und Harwood, C.S.** (2002): Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 968-972
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J. und Saunders, J.R.** (1993): The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol.* **139**: 1147-1153
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. und Williams, P.M.** (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986-994
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. und Heinaru, A.** (2000): Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microb Ecol.* **31**: 195-205
- Helweg, A.** (1987): Degradation and adsorption of ¹⁴C-MCPA in soil-influence of concentration, temperature, and soil moisture. Content on degradation. *Weed Res.* **27**: 287-296
- Henson-Ramsey, H., Schneider, A. und Stoskopf, M.K.** (2011): A comparison of multiple esterases as biomarkers of organophosphate exposure and effect in two earthworm species. *Bull Environ Contam Toxicol.* **86**: 373-378
- Heran, H.** (1956): Ein Beitrag zur Verdauungsphysiologie von *Lumbricus terrestris* L. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie.* **39**: 44-62
- Hermens, J.L.M., de Bruijn, J.H.M. und Brooke, D.N.** (2013): The octanol-water partition coefficient: strengths and limitations. *Environ Toxicol Chem.* **32**: 732-733
- Hernández, M., Jia, Z., Conrad, R. und Seeger, M.** (2011): Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **78**: 511-519
- Herrera, Y., Okoh, A.I., Alvarez, L., Robledo, N. und Trejo-Hernández, M.R.** (2008): Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**: 55-60
- Heylen, K., Gervers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. und De Vos, P.** (2006): The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ Microbiol.* **8**: 2012-2021
- Hickman, Z.A. und Reid, B.J.** (2008): Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environ Int.* **34**: 1072-1081
- Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K. und Miyamoto, K.** (2003): Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J Biosci Bioeng.* **95**: 200-203

- Hoekstra, E.J., De Weerd, H., De Leer, E.W.B. und Brinkman, U.A.T.** (1999): Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest. *Environ Sci Technol.* **33**: 2543-2549
- Hoffmann, D., Kleinsteuber, S., Müller, R.H. und Babel, W.** (2003): A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. *Microbiology.* **149**: 2545-2556
- Hofmann, C.A.** (2011): Der Effekt von 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) auf Denitrifizierer und Nitrifizierer in der Drilosphäre. Bachelorarbeit. Universität Bayreuth
- Hofrichter, M., Bublitz, F. und Fritsche, W.** (1994): Unspecific degradation of halogenated phenols by the soil fungus *Penicillium frequentans* Bi 7/2. *J Basic Microbiol.* **34**: 163-172
- Holben, W.E., Schroeter, B.M., Calabrese, V.G.M., Olsen, R.H., Kukor, J.K., Biederbeck, V.O., Smith, A.E. und Tiedje, J.M.** (1992): Gene probe analysis of soil microbial populations selected by amendment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl Environ Microbiol.* **58**: 3941-3948
- Holden, P.A. und Firestone, M.K.** (1997): Soil microorganisms in soil cleanup: how can we improve our understanding? *J Environ Qual.* **26**: 32-40
- Holliger, C., Wohlfarth, G. und Diekert, G.** (1999): Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **22**: 383-398
- Holtan-Hartwig, L., Bechmann, M., Hoyas, T.R. Linjordet, R. und Bakken, L.R.** (2002): Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N₂O dynamics. *Soil Biol Biochem.* **34**: 1181-1190
- Holzem, R.M., Stapleton, H.M. und Gunsch, C.K.** (2014): Determining the ecological impacts of organic contaminants in biosolids using a high-throughput colorimetric denitrification assay: a case study with antimicrobial agents. *Environ Sci Technol.* **48**: 1646-1655
- Hong, S.W., Park, J.M., Kim, S.-J. und Chung, K.S.** (2012): *Bacillus eiseniae* sp. nov., a swarming, moderately halotolerant bacterium isolated from the intestinal tract of an earthworm (*Eisenia fetida* L.). *Int J Syst Evol Microbiol.* **62**: 2077-2083
- Hooper, A.B. und Terry, K.R.** (1979): Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim Biophys Acta.* **571**: 12-20
- Horn, M.A.** (2004): Mikrobiologie der N₂O-Bildung im Darm von Regenwürmern (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation. Universität Bayreuth

- Horn, M.A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G. und Drake, H.L.** (2005): *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Int J Syst Evol Microbiol. **55**: 1255-1265
- Horn, M.A., Drake, H.L. und Schramm, A.** (2006a): Nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. Appl Environ Microbiol. **72**: 1019-1026
- Horn, M.A., Mertel, R., Gehre, M., Kästner, M. und Drake, H.L.** (2006b): In vivo emission of dinitrogen by earthworms via denitrifying bacteria in the gut. Appl Environ Microbiol. **72**: 1013-1018
- Horn, M.A., Schramm, A. und Drake, H.L.** (2003): The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. Appl Environ Microbiol. **69**: 1662-1669
- Huhta, V.** (1979): Effects of liming and deciduous litter on earthworm (Lumbricidae) populations of a spruce forest, with an inoculation experiment on *Allolobophora caliginosa*. Pedobiologia. **19**: 340-345
- Huong, N.L., Itoh, K., Miyamoto, M., Suyama, K. und Yamamoto, H.** (2007a): Chlorophenol hydroxylase activity encoded by TfdB from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading *Bradyrhizobium* sp. strain RD5-C2. Biosci Biotechnol Biochem. **71**: 1691-1696
- Huong, N.L., Itoh, K. und Suyama, K.** (2007b): Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soils. Microbes Environ. **22**: 243-256
- Hurlbert, S. H.** (1971): The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. Ecology. **52**: 577-586
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G. und Sogin, M.L.** (2010): Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. Environ Microbiol. **12**: 1889-1898
- Hutalle-Schmelzer, K.M.L., Zwirnmann, E., Krüger, A. und Grossart, H.-P.** (2010): Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. FEMS Microbiol Ecol. **72**: 58-73
- IARC** (1991): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Volume 53. Lyon, Frankreich
- Igbinosa, E.O., Odjadjare, E.E., Chigor, V.N., Igbinosa, I.H., Emoghene, A.O., Ekhaise, F.O., Igiehon, N.O. und Idemudia, O.G.** (2013): Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective. Sci World J. **2013**: 1-11

- Ihssen, J., Horn, M.A., Matthies, A., Göbner, A., Schramm, A. und Drake, H.L.** (2003): N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 1655-1661
- IPCC** (1996): Zusammenfassungen für politische Entscheidungsträger und Synthesebericht-Zweiter umfassender IPCC-Bericht. Bern: ProClim-Forum für Klima und Global Change, Schweizerische Akademie für Naturwissenschaften.
- IPCC** (2007): Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Kapitel 2.2., Cambridge University Press, Cambridge
- Itoh, K., Kanda, R., Sumita, Y., Kim, H., Kamagata, Y., Suyama, K., Yamamoto, H., Hausinger, R.P. und Tiedje, J.M.** (2002): *tfdA*-like genes in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid- degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* cluster in α -*Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 3449-3454
- Itoh, K., Tashiro, Y., Uobe, K., Kamagata, Y., Suyama, K. und Yamamoto, H.** (2004): Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdA α* and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 2110-2118
- Jansch, S., Steffens, L., Höfer, H., Horak, F., Roß-Nickoll, M., Russell, D., Toschki, A. und Römcke, J.** (2013): State of knowledge of earthworm communities in german soils as a basis for biological soil quality assessment. *Soil Organisms.* **83**: 215-233
- Jeon, C.O., Park, W., Ghiorse, W.C. und Madsen, E.L.** (2004): *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalen-contaminated sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 93-97
- Jeong, S., Zhao, C.F., Andrews, A.E., Dlugokencky, E.J., Sweeney, C., Bianco, L., Wilczak, J.M. und Fischer, M.L.** (2012): Seasonal variations in N₂O emissions from central California. *Geophys Res Lett.* **39**: L16805
- Jia, Z. und Conrad, R.** (2009): Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ Microbiol.* **11**: 1658-1671
- Jian, Z., Huang, S. und Zhang, Y.** (2013): Photocatalyzed degradation of 2,4-dichlorophenol using nanosized Na₂Ti₆O₁₃ / TiO₂ heterostructure particles. *Int J Photoenergy.* **2013**: 1-7
- Jiang, J., Sun, Q., Chen, L. und Zou, J.** (2014): Effects of the herbicides butachlor and bensulfuron-methyl on N₂O emissions from a dry-seeded rice field. *Nutr Cycl Agroecosyst.* **100**: 345-356
- Jobst, H.** (1995): Chlorphenole und Nonylphenole in Klärschlämmen. Teil I: Vorkommen in Klärschlämmen westdeutscher Kläranlagen aus den Jahren 1987 – 1989. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* **23**: 20-25

- Johansen, J.E., Binnerup, S.J., Kroer, N. und Møbak, L.** (2005): *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**: 2285-2291
- Jolly, J.M.** (1993): Scanning electron microscopy of the gut microflora of two earthworms: *Lumbricus terrestris* and *Octolasion cyaneum*. *Microb Ecol.* **26**: 235-245
- Jones, D. und Keddie, R.M.** (2006): The genus *Arthrobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds.), *The prokaryotes*, 3rd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 945-960
- Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. und Fierer, N.** (2009): A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **3**: 442-453
- Judas, M.** (1992): Gut content analysis of earthworms (*Lumbricidae*) in a beechwood. *Soil Biol Biochem.* **24**: 1413-1417
- Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lepine, F. und Bisailon, J.G.** (1995) : Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can J Microbiol.* **41**: 862-868
- Ka, J.O. und Tiedje, J.M.** (1994): Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J Bacteriol.* **176**: 5284-5289
- Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C. und Koukkou, A.I.** (2009): *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 275-279
- Kamagata, Y., Fulthorpe, R.R., Tamura, K., Takami, H., Forney, L.J. und Tiedje, J.M.** (1997): Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 2266-2272
- Kampfer, P. und Kroppenstedt, R.M.** (2004): *Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 749-751
- Kaphammer, B. und Olsen, R.H.** (1990): Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor- activator gene of *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J Bacteriol.* **172**: 5856-5862
- Kargi, F. und Eker, S.** (2004): Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture. *Enzym Microbial Technol.* **35**: 424-428
- Karn, S.K.** (2014): Pentachlorophenol remediation by *Enterobacter* sp. SG1 isolated from industrial dump site. *Pak J Biol Sci.* **17**: 388-394

- Karsten, G.R. und Drake, H.L.** (1995): Comparative assessment of the aerobic and anaerobic microfloras of earthworm guts and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1039-1044
- Karsten, G.R. und Drake, H.L.** (1997): Denitrifying bacteria in the earthworm gastrointestinal tract and in vivo emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1878-1882
- Kaspar H.F. und Tiedje J.M.** (1981): Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen - nitrous oxide production and effect of acetylene. *Appl Environ Microbiol.* **41**: 705-709
- Kaspar H.F., Tiedje J.M. und Firestone R.B.** (1981): Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in digested sludge. *Can J Microbiol.* **27**: 878-885
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M. und Mahro, B.** (1994): Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol.* **41**: 267-273
- Keither, L.H. und Telliard, W.A.** (1979): Priority pollutants. A perspective view. *Environ Sci Technol.* **13**: 416-423
- Kersanté, A., Martin-Laurent, F., Soulas, G. und Binet, F.** (2006) : Interactions of earthworms with atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **57**: 192-205
- Khianggam, S., Akaracharachanya, A., Lee, J.-S., Lee, K.C., Kim, K.-W. und Tanasupawat, S.** (2014): *Flavobacterium arsenitoxidans* sp. nov., an arsenite-oxidizing bacterium from Thai soil. *Anton Leeuw.* **106**: 1239-1246
- Khomyakov, N.V., Kharin, S.A., Nechitailo, T.Y., Golyshin, P.N., Kurakov, A.V., Byzov, B.A. und Zvyagintsev, D.G.** (2007): Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. *Microbiology.* **76**: 45-54
- Kilpi, S., Backström, V. und Korhola, M.** (1980): Degradation of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzoic acid and salicylic acid by *Pseudomonas* sp. HV3. *FEMS Microbiol Lett.* **8**: 177-182
- Kim, S. und Dale, B.E.** (2008): Effect of nitrogen fertilizer application on greenhouse gas emissions and economics of corn production. *Environ Sci Technol.* **42**: 6028-6033
- Kim, E.-J., Jeon, J.-R., Kim, Y.-M., Murugesan, K. und Chang, Y.-S.** (2010): Mineralization and transformation of monofluorophenols by *Pseudonocardia benzenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**: 1569-1577

- Kim, T., Kim, M.-S., Jung, M.-K., Joe, M.-J., Ahn, J.-H., Oh, K.-H., Lee, M., Kim, M. und Ka, J.-O.** (2005): Analysis of plasmid pJP4 horizontal transfer and its impact on bacterial community structure in natural soil. *J Microbiol Biotechnol.* **15**: 376-383
- Kim, K.K., Lee, K.C., Oh, H.-M., Kim, M.J., Eom, M.K. und Lee, J.-S.** (2008): *Arthrobacter defluvii* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacteria isolated from sewage. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**: 1916-1921
- Kim, I.C. und Oriel, P.J.** (1995): Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1252-1256
- Kirchner, U., Westphal, A.H., Müller, R. und van Berkel, W.J.H.** (2003): Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J Biol Chem.* **278**: 47545-47553
- Kitunen, V., Valo, R. und Salkinoja-Salonen, M.** (1985): Analysis of chlorinated phenols, phenoxyphenols and dibenzofurans around wood preserving facilities. *Int J Environ Anal Chem.* **20**: 13-28
- Knapp, B.A., Podmirseg, S.M., Seeber, J., Meyer, E. und Insam, H.** (2009): Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. *Soil Biol Biochem.* **41**: 2299-2307
- Knowles, R.** (1982): Denitrification. *Microbiol Rev.* **46**: 43-70
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F. und Shoun, H.** (1996): Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem.* **271**: 16263-16267
- Koch, R.** (1995): Umweltchemikalien. 3. Auflage. Wiley VCH, Weinheim, Deutschland.
- Koh, S.-C., McCullar, M.V. und Focht, D.D.** (1997): Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal *meta*-fission pathway. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 2054-2057
- Kohler, H.P.E.** (1999): *Sphingomonas herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **23**: 336-340
- Kohlweyer, U., Thiemer, B., Schröder, T. und Andreesen, J.R.** (2000): Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. *FEMS Microbiol Lett.* **186**: 301-306
- Kohring, G.-W., Rogers, J.E. und Wiegel, J.** (1989a): Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at different temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 348-353
- Kohring, G.-W., Zhang, X. und Wiegel, J.** (1989b): Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 2735-2737

- Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R.H. und Brune, A.** (2012): High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Appl Environ Microbiol.* **78**: 4691-4701
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. und Stahl, D.A.** (2005): Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature.* **437**: 543-546
- Kool, D.M., Dolfing, J., Wrage, N. und Van Groenigen, J.W.** (2011): Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biol Biochem.* **43**: 174-178
- Kot-Wasik, A., Kartanowicz, R., Dąbrowska, D. und Namieśnik, J.** (2004): Determination of chlorophenols and phenoxyacid herbicides in the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Bull Environ Contam Toxicol.* **73**: 511-518
- Koutny, M. und Zaoralkova, L.** (2005): Miniaturized kinetic growth inhibition assay with denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans*. *Chemosphere.* **60**: 49-54
- Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N.N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K.J., Viehöver, P., Pühler, A. und Schlüter, A.** (2009): Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Bacteriol.* **142**: 38-49
- Kuiper, I., De Deyn, G.B., Thakur, M.P. und van Groenigen, J.W.** (2013): Soil invertebrate fauna affect N₂O emissions from soil. *Glob Change Biol.* **19**: 2814-2825
- Kunapuli, U., Jahn, M.K., Lueders, T., Geyer, R., Heipieper, H.J. und Meckenstock, R.U.** (2010): *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**: 686-695
- Kweon, O., Kim, S.-J., Kim, D.-W., Kim, J.M., Kim, H.-L., Ahn, Y., Sutherland, J.B. und Cerniglia, C.E.** (2014): Pleiotropic and epistatic behaviour of a ring-hydroxylating oxygenase system in the polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J Bacteriol.* **196**: 3503-3515
- Laemmli, C.M., Leveau, J.H.J., Zehnder, A.J.B. und van der Meer, J.R.** (2000): Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J Bacteriol.* **182**: 4165-4172
- Lane, D.** (1991): 16S/23S rRNA sequencing: nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester, UK.

- Lang, G.-H., Ogawa, N., Tanaka, Y., Fujii, T., Fulthorpe, R.R., Fukuda, M. und Miyashita, K.** (2005): Two kinds of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from 2,4-dichlorophenoxyacetate-degrading *Sphingomonas* sp. strain TFD44. *Biochem Biophys Res Commun.* **332**: 941-948
- Langmaack, M., Schrader, S., Rapp- Bernhardt, U. und Kotzke, K.** (2002): Soil structure rehabilitation of arable soil degraded by compaction. *Gerderma.* **105**: 141-152
- Latha, S. und Mahadeva, A.** (1997): Role of rhizobia in the degradation of aromatic substances. *World J Microbiol Biotechnol.* **13**: 601-607
- Lattaud, C., Locati, S., Mora, P., Rouland, C. und Lavelle, P.** (1998): The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Appl Soil Ecol.* **9**: 189-195
- Laughlin, R.J., Rütting, T., Müller, C., Watson, C.J., Stevens, R.J.** (2009): Effect of acetate on soil respiration, N₂O emissions and gross N transformations related to fungi and bacteria in a grassland soil. *Appl Soil Ecol.* **42**: 25-30
- Lawton, T.J., Bowen, K.E., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J. und Rosenzweig, A.C.** (2013): Characterization of a nitrite reductase involved in nitrifier denitrification. *J Biol Chem.* **288**: 25575-25583
- Layton, A.C., Karanth, P.N., Lajoie, C.A., Meyers, A.J., Gregory, I.R., Stapleton, R.D., Taylor, D.E. und Sayler, G.S.** (2000): Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1167-1174
- Lechner, U.** (2007): Der mikrobielle Abbau von Chloraromaten als Bestandteil des globalen Chlorzyklus. Habilitationsschrift. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Ledger, T., Pieper, D.H. und González, B.** (2006): Chlorophenol hydroxylases encoded by plasmid pJP4 differentially contribute to chlorophenoxyacetic acid degradation. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 2783-2792
- Lee, K.E.** (1985): Earthworms. Academic Press, Sydney.
- Lee, H.-G., Kim, S.G., Im, W.-T., Oh, H.-M. und Lee, S.-T.** (2009): *Pedobacter composti* sp. nov., isolated from compost. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 345-349
- Lee, S.-B., Strand, S.E., Stensel, H.D. und Herwig, R.P.** (2004): *Pseudonocardia chloroethenivorans* sp. nov., a chloroethene-degrading actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 131-139
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J.I., Schuster, S.C. und Schleper, C.** (2006): Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature.* **442**: 806-809
- Lewin, B.** (1998): Molekularbiologie der Gene. Spektrum Verlag Heidelberg, Deutschland

- Li, L., Wang, M., Hatano, R. und Hashidoko, Y.** (2014): Effects of methyl viologen dichloride and other chemicals on nitrous oxide (N₂O) emission and repression by pseudomonad denitrifiers isolated from corn farmland soil in Hokkaido, Japan. *J Pestic Sci.* **39**: 115-120
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, J.-U. und Stackebrandt, E.** (1994): *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch Microbiol.* **162**: 85-90
- Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N.-L. und Stackebrandt, E.** (1997): Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: J. D. Van Elsas, J. T. Trevors and E. M. H. Wellington (eds.). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York. p. 375-439
- Lillis, L., Clipson, N. und Doyle, E.** (2010): Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiol Ecol.* **73**: 363-369
- de Liphay, J.R., Aamand, J. und Barkay, T.** (2002): Expression of *tfdA* genes in aquatic microbial communities during acclimation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol Ecol.* **40**: 205-214
- de Liphay, J.R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L.H., Albrechtsen, H.-J., Bjerg, P.L. und Aamand, J.** (2003): In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 461-467
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. und Forney, L.J.** (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4516-4522
- Liu, Y.-J., Zaprasis, A., Liu, S.-J., Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2011a): The earthworm *Aporrectodea caliginosa* stimulates abundance and activity of phenoxyalkanoic acid herbicide degraders. *ISME J.* **5**: 473-485
- Liu, Y.-J., Liu, S.-J., Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2011b): *Alphaproteobacteria* dominate active 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide degraders in agricultural soil and drilosphere. *Environ Microbiol.* **13**: 991-1009
- Liu, Y.-J., Liu, S.-J., Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2013): Consumers of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid from agricultural soil and drilosphere harbour *cadA*, *r/sdpA*, and *tfdA*-like gene encoded oxygenases. *FEMS Microbiol Ecol.* **86**: 114-129
- Liu, Y., Liu, Y., Ding, Y., Zheng, J., Zhou, T., Pan, G., Crowley, D., Li, L., Zheng, J., Zhang, X., Yu, X. und Wang, J.** (2014): Abundance, composition and activity of ammonia oxidizer and denitrifier communities in metal polluted rice paddies from south China. *PLOS ONE.* **9**: e102000

- Liu, Z., Yang, C. und Qiao, C.** (2007): Biodegradation of p-nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp.. FEMS Microbiol Lett. **277** : 150-156
- Logan, N.A. und De Vos, P.** (2009) : Genus I. Bacillus. In : De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. und Whitman, W.B. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 21-130
- Long, A., Heitman, J., Tobias, C., Philips, R. und Song, B.** (2013): Co-occurring anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils. Appl Environ Microbiol. **79**: 168-176
- Loos, M.A., Schlosser, I.F. und Mapham, W.R.** (1979): Phenoxy herbicide degradation in soils: quantitative studies of 2,4-D- and MCPA-degrading microbial populations. Soil Biol Biochem. **11**: 377-385
- Lord, K.A., Briggs, G.G., Neale, M.C. und Manlove, R.** (1980): Uptake of pesticides from water and soil by earthworms. Pestic Sci. **11**: 401-408
- Lory, S.** (2014): The family *Mycobacteriaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. und Thompson, F. (eds.), The prokaryotes, 4th ed *Actinobacteria*. Springer-Verlag, New York. pp 571-575
- Louie, T.M. und Mohn, W.W.** (1999): Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J Bacteriol. **181**: 40-46
- Lubbers, I.M., López Gonzáles, E., Hummelink, E.W.J. und van Groenigen, J.W.** (2013): Earthworms can increase nitrous oxide emissions from managed grassland: a field study. Agricul Ecosys Environ. **174**: 40-48
- Lunt, H.A. und Jacobson, H.G.M.** (1944): The chemical composition of earthworm cast. Soil Sci. **58**: 367-376
- Lüders, T., Manefield, M. und Friedrich, M.W.** (2004): Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. Environ Microbiol. **6**: 73-78
- Ma, W.C., Immerzeel, J. und Bodt, J.** (1995): Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and fluoranthene. Ecotox Environ Saf. **32**: 226-232
- Madsen, T. und Licht, D.** (1992): Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. Appl Environ Microbiol. **58**: 2874-2878
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., Heraud, C., Breuil, M.-C., Bizouard, F., Toyoda, S., Yoshida, N., Steinberg, C. und Philippot, L.** (2015): N₂O production, a widespread trait in fungi. Sci Rep. **5**: 9697
- Mahendra, S. und Alvarez-Cohen, L.** (2005): *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane. Int J Syst Evol Microbiol. **55**: 593-598

- Makdessi, K. und Lechner, U.** (1997): Purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase isolated from a bacterium of the α -2 subgroup of the *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett.* **157**: 95-101
- Makeschin, F.** (1997): Earthworms (Lumbricidae: Oligochaeta): important promoters of soil development and soil fertility. In: G. Benckiser (ed.), *Fauna in soil ecosystems*. Marcel Dekker Inc., New York. pp 173-223
- Makkar, N.S. und Casida, L.E.** (1987): *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol.* **37**: 323-326
- Malfait, M., Goddon, B. und Peninickx, M.J.** (1984): Growth and cellulose production of *Micromonospora chalcae* and *Pseudonocardia thermophila*. *Ann Microbiol.* **135B**: 79-90
- Manefield, M., Whiteley, A.S. und Bailey, M.J.** (2004): What can stable isotope probing do for bioremediation? *Int Biodet Biodegrad.* **54**: 163-166
- Mansell, G.P., Syers, J.K. und Gregg, P.E.H.** (1981): Plant availability of phosphorus in dead herbage ingested by surface-casting earthworms. *Soil Biol Biochem.* **13**: 163-167
- Maraun, M., Alpehi, J., Bonkowski, M., Buryn, R., Migge, S., Peter, M., Schaefer, M. und Scheu, S.** (1999): Middens of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae): microhabitats for micro- and mesofauna in forest soil. *Pedobiologia.* **43**: 276-287
- Margulies, M., Egholm, M., Altmann, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bembem, L.A., Berka, J. et al.** (2005): Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature.* **15**: 376-380
- Martani, E. und Seto, M.** (1991): Effects of mineral nutrients on the degradation of 2,4-dichlorophenol at low concentrations by microbial community and bacterial isolates. *Pesticide Sci.* **16**: 1-7
- Martin, N.A.** (1982): The interaction between organic matter in soil and the burrowing activity of three species of earthworms (*Oligochaetae: Lumbricidae*). *Pedobiologia.* **24**: 185-190
- Martin, K., Parsons, L.L., Murray, R.E. und Smith, M.S.** (1988): Dynamics of soil denitrifier populations: relationships between enzyme activity, most-probable-number counts, and actual N gas loss. *Appl Environ Microbiol.* **54**: 2711-2716
- Martínez-Gutiérrez, E., González-Márquez, H., Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., Cuervo-López, F. de M. und Gómez, J.** (2012): Effect of phenol and acetate addition on 2-chlorophenol consumption by a denitrifying sludge. *Environ Technol.* **33**: 1375-1382

- Masai, E., Yamada, A., Healy, J.M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M. und Yano, K.** (1995): Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 2079-2085
- Matafonova, G.G., Shirapova, G.S., Zimmer, C., Kohring, G.-W., Giffhorn, F., Batoev, V.B. und Tsyrenov, V.J.** (2007): *Bacillus cereus* is a microbial decomposer of 2,4-dichlorophenol. *Biol Bullet.* **34**: 442-445
- Matsui, T., Yoshida, T., Yoshimura, T. und Nagasawa, T.** (2006): Regioselective carboxylation of 1,3-dihydroxybenzene by 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Pandoraea* sp. 12B-2. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**: 95-102
- Matthies, C., Griesshammer, A., Schmittroth, M. und Drake, H.L.** (1999): Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms obtained from garden and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3599-3604
- Mäe, A.A., Marits, R.O., Ausmees, N.R., Kõiv, V.M. und Heinaru, A.L.** (1993): Characterization of a new 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011- physical map and localization of catabolic genes. *J Gen Microbiol.* **139**: 3165-3170
- Männistö, M.K., Tirola, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., Kulomaa, M.S. und Puhakka, J.A.** (1999): Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater. *Arch Microbiol.* **171**: 189-197
- McCarty, G.W.** (1999): Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol Fertil Soil.* **29**: 1-9
- McDonald, R., Schreier, H.J. und Watts, J.E.M.** (2012): Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *PLOS.* **7**: e48018
- McLoughlin, E., Rhodes, A.H., Owen, S.M. und Semple, K.T.** (2009): Biogenic volatile organic compounds as a potential stimulator for organic contaminant degradation by soil microorganisms. *Environ Pollut.* **157**: 86-94
- Merini, L.J., Cuadrado, V., Flocco, C.G. und Giulietti, A.M.** (2007): Dissipation of 2,4-D in soils of the humid pampa region, Argentina: a microcosm study. *Chemosphere.* **68**: 259-265
- Messing, J.** (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**: 20-78
- Michotey, V., Méjean, V. und Bonin, P.** (2000): Comparison of methods for quantification of cytochrome cd₁-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1564-1571

- Millar, N., Robertson, G.P., Grace, P.R., Gehl, R.J. und Hoben, J.P.** (2010): Nitrogen fertilizer management for nitrous oxide (N₂O) mitigation in intensive corn (maize) production: an emissions reduction protocol for US midwest agriculture. *Mitig Adapt Strategies Glob Change*. **15**: 185-204
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B. und Kästner, M.** (2011): SOM genesis: microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry*. **22**: 139-143
- Miyazaki, A., Amano, T., Saito, H. und Nakano, Y.** (2002): Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms. *Chemosphere*. **47**: 65-69
- Mohn, W.W. und Tiedje, J.M.** (1992): Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev*. **56**: 482-507
- Molnár, O., Wuczowski, M. und Prillinger, H.** (2008): Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. *Mycol Progress*. **7**: 111-123
- Monard, C., Martin-Laurent, F., Devers-Lamrani, M., Lima, O., Vandenkoornhuysse, P. und Binet, F.** (2010): atz gene expressions during atrazine degradation in the soil drilosphere. *Mol Ecol*. **19**: 749-759
- Monard, C., Vandenkoornhuysse, P., Le Blot, B. und Binet, F.** (2011): Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME J*. **5**: 1048-1056
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R. und Cerniglia, C.E.** (2001): Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*. **67**: 1476-1483
- Moody, S.A., Pearce, T.G. und Dighton, J.** (1996): Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Biol Biochem*. **28**: 533-537
- Mosleh, Y.Y., Ismail, S.M.M., Ahmed, M.T. und Ahmed, Y.M.** (2003): Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environ Toxicol*. **18**: 338-346
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C.M., Schäfer, H. und Wawer, C.** (1998): Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *p* 1-27. In: A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas and F.J. de Bruin (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mühlhardt, C.** (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6. Auflage, Spektrum Verlag Heidelberg, Deutschland
- Müller, T.A., Byrde, S.M., Werlen, C., van der Meer, J.R. und Kohler, H.-P.E.** (2004): Genetic analysis of phenoxyalkanoic acid degradation in *Sphingomonas herbicidovorans*. *Appl Environ Microbiol*. **70**: 6066-6075

- Müller, R.H. und Babel, W.** (2001): Pseudo-recalcitrance of chlorophenoxyalkanoate herbicides – correlation to the availability of α -ketoglutarate. *Acta Biotechnol.* **21**: 227-242
- Müller, R.H., Jorks, S., Kleinsteuber, S. und Babel, W.** (1998): Degradation of various chlorophenols under alkaline conditions by gram-negative bacteria closely related to *Ochrobactrum anthropi*. *J Basic Microbiol.* **38**: 269-281
- Nakagawa, A., Osawa, S., Hirata, T., Yamagishi, Y., Hosoda, J. und Horikoshi, T.** (2006): 2,4-dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp.. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**: 525-527
- Nebel, M.E., Holzhauser, M., Hüttenberger, L., Reitzig, R., Sperber, M., Wild, S. und Stoeck, T.** (2011): JAguc-a software package for environmental diversity analyses. <http://www.wagak.informatik.uni-kl.de/research/publications/>
- Nebert, L.D., Bloem, J., Lubbers, I.M. und van Groenigen, J.W.** (2011): Association of earthworm-denitrifier interactions with increased emission of nitrous oxide from soil mesocosms amended with crop residue. *Appl Environ Microbiol.* **77**: 4097-4104
- Nechitaylo, T.Y., Yakimov, M.M., Godinho, M., Timmis, K.N., Belogolova, E., Byzov, B.A., Kurakov, A.V., Jones, D.L. und Golyshin, P.N.** (2010): Effect of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* on bacterial diversity in soil. *Microb Ecol.* **59**: 574-587
- Nei, M. und Kumar, S.** (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Neilson, J.W., Josephson, K.L., Pepper, I.L., Arnold, R.B., DiGiovanni, G.D. und Sinclair, N.A.** (1994): Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 4053-4058
- Nelson, J.L., Fung, J.M., Cadillo-Quiroz, H., Cheng, X. und Zinder, S.H.** (2011): A role for *Dehalobacter* spp. in the reductive dehalogenation of dichlorobenzenes and monochlorobenzene. *Environ Sci Technol.* **45**: 6806-6813
- Neufeld, J.D., Dumont, M.G., Vohra, J. und Murrell, J.C.** (2007): Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbiol Ecol.* **53**: 435-442
- Neujahr, H.Y. und Gaal, A.** (1973): Phenol Hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem.* **35**: 386-400
- Neumann, D., Heuer, A., Hemkemeyer, M., Martens, R. und Tebbe, C.C.** (2014): Importance of soil organic matter for the diversity of microorganisms involved in the degradation of organic pollutants. *ISME J.* **8**: 1289-1300
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C. und Prosser, J.I.** (2008): The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol.* **10**: 2966-2978

- Nowak, K.M., Girardi, C., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A. und Kästner, M.** (2013): Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil. *Sci Total Environ.* **445-446**: 377-384
- Nowak, K.M., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A. und Kästner, M.** (2011): Formation and fate of bound residues from microbial biomass during 2,4-D degradation in soil. *Environ Sci Technol.* **45**: 999-1006
- Nozaki, M., Miura, C., Tozawa, Y. und Miura, T.** (2009): The contribution of endogenous cellulase to the cellulose digestion in the gut of earthworm (*Pheretima hilgendorfi*: Megascolecidae). *Soil Biol Biochem.* **41**: 762-769
- Nurk, A., Kasak, L. und Kivisaar, M.** (1991): Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene.* **102**: 13-18
- Obi-Osius, N., Fertmann, R. und Schümann, M.** (2005): PCP und andere Chlorphenole im Urin der Bevölkerung in Deutschland – Belastungsquellen und – pfade. Bundesumweltamt, Umwelt-Survey 1998, Band IX.
- Oleynik, A.S. und Byzov, B.A.** (2008): Response of bacteria to earthworms surface excreta. *Microbiology.* **77**: 765-773
- Ou, L.-T.** (1984): 2,4-D degradation and 2,4-D degrading microorganisms in soils. *Soil Sci.* **137**: 100-107
- Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J.R., Tsai, C.S., Park, W., Jeon, C. und Madsen, E.L.** (2003): Respiration of ¹³C-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ¹³C-labeled soil DNA. *Appl Environ Microbol.* **69**: 1614-1622
- Paisio, C.E., Talano, M.A., González, P.S., Pajuelo-Domínguez, E. und Agostina, E.** (2013): Characterization of a phenol-degrading bacterium isolated from an industrial effluent and its potential application for bioremediation. *Environ Technol.* **34**: 485-493
- Pal, R., Das, P., Chakrabarti, K., Chakraborty, A. und Chowdhury, A.** (2006): Butachlor degradation in tropical soils: effect of application rate, biotic-abiotic interactions and soil conditions. *J Environ Sci Health B.* **41**: 1103-1113
- Palleroni, N.J.** (1992): Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 3071-3085
- Palmer, K., Biasi, C. und Horn, M.A.** (2012): Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra. *ISME J.* **6**: 1058-1077
- Palmer, K., Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2009): Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 5170-5174

- Palmer, K. und Horn, M.A.** (2012): Actinobacterial nitrate reducers and proteobacterial denitrifiers are abundant in N₂O-metabolizing peat. *Appl Environ Microbiol.* **78**: 5584-5596
- Pandey, G. und Jain, R.K.** (2002): Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 5789-5795
- Papen, H., von Berg, R., Hinkel, I., Thoene, B. und Rennenberg, H.** (1989): Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* : NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O and NO production in exponentially growing cultures. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 2068-2072
- Park, H.-D. und Ka, J.-O.** (2003a): Genetic and phenotypic diversity of dichloroprop-degrading bacteria isolated from soils. *J Microbiol.* **41**: 7-15
- Park, H.-D. und Ka, J.-O.** (2003b): Isolation and characterization of 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid degrading bacteria from agricultural soils. *J Microbiol Biotechnol.* **13**: 243-250
- Parkin, T.B. und Berry, E.C.** (1994): Nitrogen transformations associated with earthworm casts. *Soil Biol Biochem.* **26**: 1233-1238
- Parkin, T.B. und Berry, E.C.** (1999): Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biol Biochem.* **31**: 1765-1771
- Parle, J.N.** (1963a): Microorganisms in the intestine of earthworms. *J Gen Microbiol.* **31**: 1-13
- Parle, J.N.** (1963b): A microbiological study of earthworm cast. *J Gen Microbiol.* **31**: 13-22
- Parthasarathi, K.** (2006): Aging of pressmud vermicasts of *Lampito mauritii* (Kinberg) and *Eudrilus eugeniae* (Kinberg)-reduction in microbial population and activity. *J Environ Biol.* **27**: 221-223
- Paul, B.K., Lubbers, I.M. und van Groenigen, J.W.** (2012): Residue incorporation depth is a controlling factor of earthworm-induced nitrous oxide emissions. *Glob Change Biol.* **18**: 1141-1151
- Pavlostathis, S.G., Prytula, M.T. und Yeh, D.H.** (2003): Potential and limitations of microbial reductive dechlorination for bioremediation applications. *Wat Air Soil Pollut.* **3**: 117-129
- Pell, M., Stenberg, B. und Torstensson, L.** (1998): Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *AMBIO.* **27**: 24-28
- Pemberton, J.M. und Fisher, P.R.** (1977): 2,4-D plasmids and persistence. *Nature.* **268**: 732-733

- Pendall, E., Schwendenmann, L., Rahn, T., Miller, J.B., Tans, P.P. und White, J.W.C.** (2010): Land use and season affect fluxes of CO₂, CH₄, CO, N₂O, H-2 and isotopic source signatures in Panama: evidence from nocturnal boundary layer profiles. *Glob Change Biol.* **16**: 2721-2736
- Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M.A., Giménez, J. und Esplugas, S.** (2004): Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl Cat B Environ.* **47**: 219-256
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Câmara, J.S. und Rocha, S.M.** (2012): Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MS: novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chem.* **135**: 94-104
- Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D.H. und González, B.** (2008) : Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP 134. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 736-794
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A. und Nurk, A.** (1997): Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheAB*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4899-4906
- Petersen, H. und Luxton, M.** (1982): A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos.* **39**: 287-388
- Petri R. und Imhoff J.F.** (2000): The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of *narH* gene sequences and comparison of *narH* and 16S rDNA based phylogeny. *System Appl Microbiol.* **23**: 47-57
- Petroutsos, D., Katapodis, P., Samiotaki, M., Panayotou, G. und Kekos, D.** (2008): Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry.* **69**: 707-714
- Philippot, L.** (2005): Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Transact.* **33**: 200-204
- Philippot, L. und Hojberg, O.** (1999): Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1446**: 1-23
- Philippot, L., Piutti, S., Martin-Laurent, F., Hallet, S. und Germon, J.C.** (2002): Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 6121-6128
- Pieper, D.H., Engesser, K.-H. und Knackmuss, H.-J.** (1989): Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch Microbiol.* **151**: 365-371

- Pieper, D.H., Reineke, W., Engesser, K.-H. und Knackmuss, H.-J.** (1988): Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. Arch Microbiol. **150**: 95-102
- Pignatello, J.J., Martinson, M.M., Steiert, J.G., Carlson, R.E. und Crawford, R.L.** (1983): Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial freshwater streams. Appl Environ Microbiol. **46**: 1024-1031
- Pilloni, G., von Netzer, F., Engel, M. und Lueders, T.** (2011) Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. FEMS Microbiol Ecol. **78**: 165-175
- Pires, C., Carvalho, M.F., De Marco, P., Magan, N. und Castro, P.M.L.** (2010): *Chryseobacterium palustre* sp. nov. and *Chryseobacterium humi* sp. nov., isolated from industrially contaminated sediments. Int J Syst Evol Microbiol. **60**: 402-407
- Poht, M. und Focht, D.D.** (1985): ¹⁵N kinetics analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. Appl Environ Microbiol. **49**: 1134-1141
- Portaels, F., de Muynck, A. und Sylla, M.P.** (1988): Selective isolation of mycobacteria from soil : a statistical analysis approach. J Gen Microbiol. **134**: 849-855
- Portmann, R.W., Daniel, J.S. und Ravishankara, A.R.** (2012): Stratospheric ozone depletion due to nitrous oxide: influences of other gases. Phil Trans R Soc B. **367**: 1256-1264
- Precht, M., Kraft, R. und Bachmaier, M.** (2005): Angewandte Statistik 1. 7th ed. Oldenbourg Verlag, München, Deutschland
- Prosser, J.I. und Nicol, G.W.** (2008): Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. Environ Microbiol. **10**: 2931-2941
- Prosser, J.I. und Nicol, G.W.** (2012): Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. Trends Microbiol. **20**: 523-531
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W.G., Peplies, J. et al** (2007): SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res. **35**: 7188-7196.
- Qiu, X., Qu, Z., Jiang, F., Ren, L., Chang, X., Kan, W., Fang, C. und Peng, F.** (2014): *Pedobacter huanghensis* sp. nov. and *Pedobacter glacialis* sp. nov., isolated from arctic glacier foreland. Int J Syst Evol Microbiol. **64**: 2431-246
- Quince, C., Lanzen, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F. und Sloan, W.T.** (2009): Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. Nat Methods. **6**: 639-641

- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J. und Turnbaugh, P.J.** (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinform.* **12**: 38-55
- Qureshi, A., Mohan, M., Kanade, G.S., Kapley, A. und Purohit, H.J.** (2009): *In situ* bioremediation of organochlorine-pesticide-contaminated microcosm soil and evaluation by gene probe. *Pest Manag Sci.* **65**: 798-804
- Radjendirane, V., Bhat, M.A. und Vaidyanathan, C.S.** (1991): Affinity purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from *Pseudomonas cepacia*. *Arch Biochem Biophys.* **288**: 169-176
- Rappé, M.S. und Giovannoni, S.J.** (2003): The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* **57**: 369-394
- Reichenbach, H. und Dworkin, M.** (1992): The myxobacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed Volume IV. Springer-Verlag, New York. pp 3416-3487
- Reineke, W.** (2001): Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. p 1-161. In: B. Beek (ed), *The handbook of environmental chemistry, biodegradation and persistence*. Springer-Verlag, Berlin
- Rhodes, A.H., Owen, S.M. und Semple, K.T.** (2007): Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in the presence of volatile organic compounds in soils under different vegetation types. *FEMS Microbiol Lett.* **269**: 323-330
- Rice, J.F., Menn, F.M., Hav, A.G., Sanseverino, J. und Salver, G.S.** (2005): Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil. *Biodegradation.* **16**: 501-512
- Rich, J.J., Heichen, R.S., Bottomley, P.J., Cromack, K. und Myrold, D.D.** (2003): Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 5974-5982
- Richardson, D.J., van Spanning, R.J.M. und Ferguson, S.J.** (2007): The prokaryotic nitrate reductases. In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande. pp 21-35
- Rinaldo, S. und Cutruzzolá, F.** (2007): Nitrite reductases in denitrification. In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande.
- Rinke, R., Costa, A.S., Fonseca, F.P.P., Almeida, L.C., Delalibera Júnior, I. und Henrique-Silva, F.** (2011): Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). *Gen Mol Res.* **10**: 2679-2691
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K. und Haahtela, K.** (2000): Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ Pollut.* **107**: 179-185

- Ronaghi, M.** (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. **11**: 3-11
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. und Liesack, W.** (1997): The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4704-4712
- Rousidou, C., Papadopoulou, E.S., Kortsinidou, M., Giannakou, I.O., Singh, B.K., Menkissoglu-Spiroudi, U. und Karpouzas, D.G.** (2013): Bio-pestizides: harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biol Biochem.* **67**: 98-105
- Rousseaux, S., Soulas, G. und Hartmann, A.** (2002): Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. *FEMS Microbiol Ecol.* **41**: 69-75
- Royston, J.P.** (1995): A remark on AS R94: a remark on algorithm AS 181: the W test for normality. *Appl Statist.* **44**: 547-551
- Römbke, J., Jänsch, S. und Didden, W.** (2005): The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotox Environ Saf.* **62**: 249-265
- Rütting, T., Huygens, D., Boeckx, Staelens, J. und Klemedtsson, L.** (2013): Increased fungal dominance in N₂O emission hotspots along a natural pH gradient in organic forest soil. *Biol Fertil Soils.* **49**: 715-721
- Sadeghi, A.M. und Isensee, A.R.** (1994): Spatial distribution of atrazine residues in soil and shallow groundwater: effect of tillage and rainfall timing. *Agri Ecosys Environ.* **48**: 67-76
- Sadowsky, M.J. und Graham, P.H.** (2006): Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds.), *The prokaryotes*, 3rd ed Volume II. Springer-Verlag, New York. pp 818-841
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487-491
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**: 406-425
- Sakadevana, K., Zhengb, H. und Bavora, H.J.** (1999): Impact of heavy metals on denitrification in surface wetland sediments receiving wastewater. *Water Sci Technol.* **40**: 349-355
- Sakai, Y., Ogawa, N., Fujii, T., Sugahara, K., Miyashita, K. und Hasebe, A.** (2007): 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading genes from bacteria isolated from soil in Japan: spread of *Burkholderia cepacia* RASC-type degrading genes harbored on large plasmids. *Microbes Environ.* **22**: 145-156

- Salunkhe, V.P., Sawant, I.S., Banerjee, K., Rajguru, Y.R., Wadkar, P.N., Oulkar, D.P., Naik, D.G. und Sawant, S.D.** (2013): Biodegradation of profenofos by *Bacillus subtilis* isolated from grapevines (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem.* **61**: 7195-7202
- Sambrook, J. und Russell, D.** (2001): *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K., Hirayama, J., Itakura, M., Mitsui, H., Eda, S. und Minamisawa, K.** (2006): Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 2526-2532
- Sanchez-Hernandez, J.C., Mazzia, C., Capowiez, Y. und Rault, M.** (2009): Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: potential (eco) toxicological implications. *Comp Biochem Phys. Part C.* **150**: 503-511
- Sanchez-Hernandez, J.C. und Wheelock, C.E.** (2009): Tissue distribution, isoenzyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environ Pollut.* **157**: 264-272
- Sanford, R.A., Cole, J.R. und Tiedje, J.M.** (2002): Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 893-900
- Sanford, R.A. und Tiedje, J.M.** (1997): Chlorophenol dechlorination and subsequent degradation in denitrifying microcosms fed low concentrations of nitrate. *Biodegradation.* **7**: 425-434
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* **74**: 5463-5467
- Santoferrara, L., Grattepanche, J.-D., Katz, L.A. und McManus, G.B.** (2014): Pyrosequencing for assessing diversity of eukaryotic microbes: analysis of data on marine planktonic ciliates and comparison with traditional methods. *Environ Microbiol.* **16**: 2752-2763
- Särkinen, T., Staats, M., Richardson, J.E., Cowan, R.S. und Bakker, F.T.** (2012): How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *Plos ONE.* DOI: 10.1371
- Satsuma, K., Masuda, M. und Sato, K.** (2013): A role of *Bradyrhizobium elkanii* and closely related strains in the degradation of methoxychlor in soil and surface water environments. *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**: 2222-2227
- Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.-H. und Schwertmann, U.** (1992): *Lehrbuch der Bodenkunde*. 14. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B.-M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J.C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M. und Schleper, C.** (2009): Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environ Microbiol.* **11**: 446-456
- Särkinen, T., Staats, M., Richardson, J.E., Cowan, R.S. und Bakker, F.T.** (2012): How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *Plos ONE*. DOI: 10.1371
- Schellenberger, S.** (2012): Impact of oxygen and pesticides on microbial cellulose degradation in aerated agricultural soils: a microscaled analysis of processes and prokaryotic populations. Dissertation Universität Bayreuth
- Schellenberger, S., Kolb, S. und Drake, H.L.** (2010): Metabolic responses of novel cellulolytic and saccharolytic agricultural soil bacteria to oxygen. *Environ Microbiol.* **12**: 845-861
- Scheu, S.** (1987): Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (*Lumbricidae*). *Biol Fertil Soils.* **5**: 230-234
- Schlegel, H.G.** (1992): Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Deutschland
- Schleinitz, K.M., Schmeling, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Harms, H., Kleinsteuber, S., Vogt, C. und Fuchs, G.** (2009): Phenol degradation in the strictly anaerobic iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens* GS-15. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 3912-3919
- Schloss, P.D. und Handelsman, J.** (2005): Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 1501-1506
- Schlömann, M.** (1994): Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. *Biodegradation.* **5**: 301-321
- Schlömann, M. und Reineke, W.** (2007): Umweltmikrobiologie. 1. Auflage. Springer Verlag, München
- Schmidt, O., Wüst, P.K., Hellmuth, S., Borst, K., Horn, M.A. und Drake, H.L.** (2011): Novel [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenase gene transcripts indicative of active facultative aerobes and obligate anaerobes in earthworm gut contents. *Appl Environ Microbiol.* **77**: 5842-5850
- Schnerr, H., Niessen, L. und Vogel, R.F.** (2001): Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR® Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int J Food Microbiol.* **71**: 53-61
- Schönholzer, F., Hahn, D. und Zeyer, J.** (1999): Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* **28**: 235-248

- Schramm, A.** (2003): In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiol J.* **20**: 313-333
- Schulz, K., Hunger, S., Brown, G.G., Tsai, S.M., Cerri, C.C., Conrad, R. und Drake, H.L.** (2015): Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil. *ISME J.* **9**: 1778-1792
- Schütte, U.M.E., Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D. und Forney, L.J.** (2008): Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* **80**: 365-380
- Schwien, U., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J. und Reineke, W.** (1988): Degradation of chlorosubstituted aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain B13: fate of 3,5-dichlorocatechol. *Arch Microbiol.* **150**: 78-84
- Scragg, A.H., Spiller, L. und Morrison, J.** (2003): The effect of 2,4-dichlorophenol on the microalga *Chlorella* VT-1. *Enzym Microbial Technol.* **32**: 616-622
- Scullion, J. und Ramshaw, G.A.** (1988): Factors affecting surface casting behaviour in several species of earthworm. *Biol Fertil Soils.* **7**: 39-45
- Sears, H.J., Little, P.J., Richardson, D.J., Berks, B.C., Spiro, C. und Ferguson, S.J.** (1997): Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration. *Arch Microbiol.* **167**: 61-66
- Senesi, N.** (1992): Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci Total Environ.* **123-124**: 63-76
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T., Penn, C.W. und Pallen, M.J.** (2012) : High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons : effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature. *PloS ONE.* **7**: e38094
- Shailubhai, K., Sahasrabudhe, S.R., Vora, K.A. und Modi, V.V.** (1983): Degradation of chlorinated derivatives of phenoxyacetic acid and benzoic acid by *Aspergillus niger*. *FEMS Microb Lett.* **18**: 279-282
- Shan, J., Wang, Y., Gu, J., Zhou, W., Ji, R. und Yan, X.** (2014): Effects of biochar and the geophagous earthworm *Metaphire guillelmi* on fate of ¹⁴C-catechol in an agricultural soil. *Chemosphere.* **107**: 109-114
- Shan, J., Xu, J., Zhou, W., Ji, L., Ciu, Y., Guo, H. und Ji, R.** (2011): Enhancement of chlorophenol sorption on soil by geophagous earthworms. *Chemosphere.* **82**: 156-162
- Shannon, C.E.** (1948): A mathematical theory of communication. *Bell System Techn J.* **27**: 379-423, 623-656
- Shapleigh, J.P.** (2006): The denitrifying prokaryotes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (eds.): *The Prokaryotes*. 3. Auflage, Springer, New York, USA. pp 769-792

- Sharpee, K.W., Duxbury, J.M. und Alexander, M.** (1973): 2,4-dichlorophenoxyacetate metabolism by *Arthrobacter* sp.: accumulation of a chlorobutenolide. *Appl Microbiol.* **26**: 445-447
- Shaw, L.J. und Burns, R.G.** (1998): Biodegradation of 2,4-D in a noncontaminated grassland soil profile. *J Environ Qual.* **27**: 1464-1471
- Shi, Y.-L., Lu, X.-Z. und Yu, W.-G.** (2008): A new β - agarase from marine bacterium *Janthinobacterium* sp. SY12. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**: 2659-2664
- Shiu, W.-Y., Ma, K.-C., Varhaníčková, D. und Mackay, D.** (1994): Chlorophenols and alkylphenols: a review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment. *Chemosphere.* **29**: 1155-1224
- Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S.W. und Wakagi, T.** (2012): Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Phil Trans R Soc B.* **367**: 1186-1194
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H. und Sugiyama, J.** (1992): Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett.* **94**: 277-282
- Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. und Friedrich, B.** (1993): Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol.* **175**: 5867-5876
- Simon, J.** (2002): Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 285-309
- Singer-Bohne, B., Hofeneder, M. und Koch, H.P.** (1993): The yeast test: an supplementary method for the testing of acute toxicity of drugsubstances and environmental chemicals. *Bioforum.* **16**: 246-248
- Singh, B.N.** (1947): Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *J Gen Microbiol.* **1**: 1-10
- Singh, S., Chandra, R., Patel, D.K. und Rai, V.** (2007): Isolation and characterization of novel *Serratia marcescens* (AY927692) for pentachlorophenol degradation from pulp and paper mill waste. *World J Microbiol Biotechnol.* **23**: 1747-1754
- Singh, Y.P., Dhall, P., Mathur, R.N., Jain, R.K., Thakur, V., Kumar, V., Kumar, R. und Kumar, A.** (2011): Bioremediation of pulp and paper mill effluent by tannic acid degrading *Enterobacter* sp.. *Wat Air Soil Pollut.* **218**: 693-701
- Singh, D., Sharma, K.K., Jacob, S. und Gakhar, S.K.** (2014): Molecular docking of laccase protein from *Bacillus safensis* DSKK5 isolated from earthworm gut: a novel method to study dye decolorization potential. *Wat Air Soil Pollut.* **225**: 2175
- Singleton, D.R., Furlong M.A., Rathbun, S.L. und Whitman W.B.** (2001): Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 4374-4376

- Sinha, R.K., Bharambe, G. und Ryan, D.** (2008): Converting wasteland into wonderland by earthworms-a low-cost nature's technology for soil remediation: a case study of vermiremediation of PAHs contaminated soil. *Environmentalist*. **28**: 466-475
- Smith M.S.** (1983): Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. *Appl Environ Microbiol*. **45**: 1545-1547
- Smith, K.A., Mosier, A.R., Crutzen, P.J. und Winiwarter, W.** (2012): The role of N₂O derived from crop-based biofuels, and from agriculture in general, in earth's climate. *Phil Trans R Soc B*. **367**: 1169-1174
- Sogorb, M.A. und Vilanova, E.** (2002): Enzymes involved in the detoxification of organo-phosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett*. **128**: 215-228
- Sørensen J.** (1978): Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in a coastal marine sediment. *Appl Environ Microbiol*. **35**: 301-305
- Spain, J.C., Pritchard, P.H. und Bourquin, A.W.** (1980): Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl Environ Microbiol*. **40**: 726-734
- Speratti, A.B., Whalen, J.K. und Rochette, P.** (2007): Earthworm influence on carbon dioxide and nitrous oxide fluxes from an unfertilized corn agroecosystem. *Biol Fertil Soils*. **44**: 405-409
- Stacheter, A., Noll, M., Lee, C.K., Selzer, M., Glowik, B., Ebertsch, L., Mertel, R., Schulz, D., Lampert, N., Drake, H.L. und Kolb, S.** (2012): Methanol oxidation by temperate soils and environmental determinants of associated methylotrophs. *ISME J*. **7**: 1051-1064
- Stackebrandt, E. und Ebers, J.** (2006): Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*. **33**: 152-155
- Stanier, R.Y.** (1940): Studies on the Cytophagas. *J Bacteriol*. **40**: 619-636
- Stein, L.Y.** (2011): Surveying N₂O-producing pathways in bacteria. *Methods Enzymol*. **486**: 131-156
- Storch, V. und Welsch, U.** (2004): *Systematische Zoologie*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Straube, G.** (1987): Phenol hydroxylase from *Rhodococcus* sp. P1. *J Basic Microbiol*. **27**: 229-232
- Stromberger, M.E., Keith, A.M. und Schmidt, O.** (2012): Distinct microbial and faunal communities and translocated carbon in *Lumbricus terrestris* drilospheres. *Soil Biol Biochem*. **46**: 155-162

- Stroo, H.F., Klein, T.M. und Alexander, M.** (1986): Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus. *Appl Environ Microbiol.* **52**: 1107-1111
- Strycharz, S.M., Gannon, S.M., Boles, A.R., Franks, A.E., Nevin, K.P. und Lovley, D.R.** (2010): Reductive dechlorination of 2-chlorophenol by *Anaeromyxobacter dehalogenans* with an electrode serving as the electron donor. *Environ Microbiol.* **2**: 289-294
- Sudesh, B.M. und Cole, J.A.** (2007): The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria. In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds.): *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande. pp 93-106
- Sun, W.M., Xie, S.G., Luo, C.L. und Cupples, A.M.** (2010): Direct link between toluene degradation in contaminated- site microcosms and a *Polaromonas* strain. *Appl Environ Microbiol.* **76**: 956-959
- Suwa, Y., Wright, A.D., Fukimori, F., Nummy, K.A., Hausinger, R.P., Holben, W.E. und Forney, L.J.** (1996): Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2464-2469
- Suzuki, S. und Hiraishi, A.** (2007): *Novosphingobium naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium isolated from polychlorinated-dioxin-contaminated environments. *J Gen Appl Microbiol.* **53**: 221-228
- Tabatabai, M.A.** (1982): Sulfur. In: Page, A.L., Freney, J.R., Miller, R.H. (eds.): *Methods of soil analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties*. ASA-CSSA-SSSA, Madison: 501-538
- Takaya, N., Kuwazaki, S., Adachi, Y., Suzuki, S., Kikuchi, T., Nakamura, H., Shiro, Y. und Shoun, H.** (2003): Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*. *J Biochem.* **133**: 461-465
- Takeuchi, R., Suwa, Y., Yamagishi, T. und Yonezawa, Y.** (2000): Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere.* **41**: 1457-1462
- Tamura, H., Goto, K., Yotsuyan, T. und Nagayama, M.** (1974): Spectrophotometric determination of iron (II) with 1,10-Phenanthroline in presence of large amount of iron (III). *Talanta.* **21**: 314-318
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. und Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* **28**: 2731-2739.
- Taylor, A.R. und Taylor, A.F.S.** (2014): Assessing daily egestion rates in earthworms: using fungal spores as a natural soil marker to estimate gut transit time. *Biol Fertil Soils.* **50**: 179-183

- Thakuria, D., Schmidt, O., Finan, D., Egan, D. und Doohan, F.M.** (2010): Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *ISME J.* **4**: 357-366
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A. und Hallin, S.** (2004): Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* **49**: 401-417
- Tiedje, J.M.** (1988): Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder, A.J.B. (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and sons, New York, USA. pp 179-243
- Tirola, M.A., Männistö, M.K., Puhakka, J.A. und Kulomaa, M.S.** (2002): Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 173-180
- Tissut, M., Taillander, G., Ravanel, P. und Benoit-Guyod, J.-L.** (1987): Effects of chlorophenols on isolated class A chloroplasts and thylakoids: a QSAR study. *Ecotox Environ Saf.* **13**: 32-42
- Tiunov, A.V. und Dobrovolskaya, T.G.** (2002): Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia.* **46**: 595-605
- Tiunov, A.V. und Scheu, S.** (1999): Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (*Lumbricidae*). *Soil Biol Biochem.* **31**: 2039-2048
- Tobajas, M., Monsalvo, V.M., Mohedano, A.F. und Rodriguez, J.J.** (2012): Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*. *J Environ Manag.* **95**: S116-S121
- Tomati, U., Grappelli, A. und Galli, E.** (1988): The hormone-like effect of earthworm casts on plant growth. *Biol Fertil Soils.* **5**: 288-294
- Tortella, G.R., Rubilar, O., Gianfreda, L., Valenzuela, E. und Diez, M.C.** (2008): Enzymatic characterization of chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**: 2805-2818
- Totsche, K.U., Rennert, T., Gerzabek, M.H., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., Spiteller, M. und Vogel, H.J.** (2010): Biogeochemical interphases in soil: the interdisciplinary challenge for soil science. *J Plant Nutr Soil Sci.* **173**: 88-99
- Töwe, S., Albert, A., Kleinedam, K., Brankatschk, R., Düming, A., Welzl, G., Munch, J.C., Zeyer, J. und Schloter, M.** (2010): Abundance of microbes involved in nitrogen transformation in the rhizosphere of *Leucanthemopsis alpina* (L.) Heywood grown in soils from different sites of the Damma glacier forefield. *Microb Ecol.* **60**: 762-770

- Toyota, K. und Kimura, M.** (2000): Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. *Biol Fertil Soils*. **31**: 187-190
- Tracey, M.V.** (1951): Cellulase and chitinase of earthworms. *Nature*. **167**: 776-777
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., Sánchez, M.A., Stuardo, M. und González, B.** (2004): Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP 134 (pJP4) reveals mechanisms of adaption to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol*. **6**: 655-668
- Tret'yakova, E.B., Dobrovol'skaya, T.G., Byzov, B.A. und Zvyagintsev, D.G.** (1996): Bacterial communities associated with soil invertebrates. *Microbiology*. **65**: 91-97
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.-P., Schleper, C.** (2005): Novel genes for nitrite reductase and amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*. **7**: 1985-1995
- Trifonova, R., Postma, J., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J., Ketelaars, J.J.M.H. und van Elsas, J.-D.** (2008): Removal of phytotoxic compounds from torrefied grass fibres by plant-beneficial microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol*. **66**: 158-166
- Trigo, D. und Lavelle, P.** (1995): Soil changes during gut transit through *Octolasion lacteum* Oerley (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*). *Acta Zool Fennica*. **196**: 129-131
- Trillas, M., Peral, J. und Domènech, X.** (1996): Photocatalyzed degradation of phenol, 2,4-dichlorophenol, phenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid over supported TiO₂ in a flow system. *J Chem Tech Biotechnol*. **67**: 237-242
- Tsutsuki K. und Kuwatsuka S.** (1979): Chemical studies on soil humic acids. VII. pH dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids. *Soil Sci Plant Nutr*. **25**: 373-384
- Tyler, J.E. und Finn, R.K.** (1974): Growth rate of a Pseudomonad on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. *Appl Microbiol*. **28**: 181-184
- Urbášek, F. und Pižl, V.** (1991): Activity of digestive enzymes in the gut of 5 earthworm species (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). *Rev Écol Biol Sol*. **28**: 461-468
- Utkin, I., Woese, C. und Wiegel, J.** (1994): Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int J Syst Bacteriol*. **44**: 612-619
- Vallaey, T., Fulthorpe, R.R., Wright, A.M. und Soulas, G.** (1996): The metabolic pathway of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation involves different families of *tfdA* and *tfdB* genes according to PCR-RFLP analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. **20**: 163-172

- Valli, K. und Gold, M.H.** (1991): Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol.* **173**: 345-352
- Valo, R., Kitunen, V., Salkinoja-Salonen, M. und Räsänen, S.** (1984): Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two Finnish sawmills. *Chemosphere.* **13**: 835-844
- Van de Pas, B.A., Jansen, S., Dijkema, C., Schraa, G., De Vos, W.M. und Stams, A.J.M.** (2001): Energy yield of respiration on chloroaromatic compounds in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 3958-3963
- Van de Pas, B.A., Smidt, H., Hagen, W.R., Van der Oost, J. Schraa, G., Stams, A.J. und de Vos, W.M.** (1999): Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J Biol Chem.* **274**: 20287-20292
- Van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S. und Zehnder, A.J.B.** (1992): Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev.* **56**: 677-694
- Vandamme, P. und Coenye, T.** (2004): Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 2285-2289
- Vandermeeren, P., Herrmann, S., Cichocka, D., Busschaert, P., Lievens, B., Richnow, H.-H. und Springael, D.** (2014): Diversity of dechlorination pathways and organohalide respiring bacteria in chlorobenzene dechlorinating enrichment cultures originating from river sludge. *Biodegradation.* **25**: 757-776
- Van Gansen, P.** (1963): Structure and function of the digestive canal of the earthworm *Eisenia foetida* Savigny. *Ann Soc R Zool Belg.* **93**: 1-120
- Vangestel, C.A.M. und Ma, W.C.** (1993): Development of QSARS in soil ecotoxicology-earthworm toxicity and soil sorption of chlorophenols, chlorobenzenes and chloroanilines. *Water Air Soil Pollut.* **69**: 265-276
- Vasanthakumar, A., Handelsman, J., Schloss, P.D., Bauer, L.S. und Raffa, K.F.** (2008): Gut microbiota of an invasive subcortical beetle, *Agrilus planipennis* Faimaire, across various life stages. *Environ Entomol.* **37**: 1344-1353
- Vedler, E., Kõiv, V. und Heinaru, A.** (2000): Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. *Gene.* **255**: 281-288
- Vela, S., Häggblom, M.M. und Young, L.Y.** (2002): Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. *Soil Sci.* **167**: 802-810
- Velghe, N. und Claeys, A.** (1985): Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral water with resorcinol. *Analyst.* **110**: 313-314

- Vollmer, M.D., Stadler-Fritzsche, K. und Schlömann, M.** (1993): Conversion of 2-chloromaleylacetate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Arch Microbiol. **159**: 182-188
- Vroumsia, T., Steinman, R., Seigle-Murandi, F. und Benoit-Guyod, J.-L.** (2005): Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). Chemosphere. **60**: 1471-1480
- Wagner, D.D., Hug, L.A., Hatt, J.K., Spitzmiller, M.R., Padilla-Crespo, E., Ritalahti, K.M., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T. und Löffler, F.E.** (2012): Genomic determinants of organohalide-respiration in *Geobacter lovleyi*, an unusual member of the *Geobacteraceae*. BMC Genomics. **13**: 200
- Wan, R., Yang, Y., Sun, W., Wang, Z. und Xie, S.** (2014): Simazine biodegradation and community structures of ammonia-oxidizing microorganisms in bioaugmented soil: impact of ammonia and nitrate nitrogen sources. Environ Sci Pollut Res. **21**: 3175-3181
- Wang, C.C, Lee, C.M. und Kuan, C.H.** (2000): Removal of 2,4-dichlorophenol by suspended and immobilized *Bacillus insolitus*. Chemosphere. **41**: 447-452
- Wang, C., Sun, Z., Zheng, D. und Liu, X.** (2011): Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of *Eisenia fetida*. Pedobiologia. **54S**: S57-S62
- Wang, H. und Wang, J.** (2008): Electrochemical degradation of 2,4-dichlorophenol on a palladium modified gas-diffusion electrode. Electrochim Acta. **53**: 6402-6409
- Wang, L.-Y., Ke, W.-J., Sun, X.-S., Liu, J.-F., Gu, J.-D. und Mu, B.-Z.** (2014): Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. Appl Microbiol Biotechnol. **98**: 4209-4221
- Wang, X., Xing, L., Qiu, T. und Han, M.** (2013b): Simultaneous removal of nitrate and pentachlorophenol from simulated groundwater using a biodenitrification reactor packed with corncob. Environ Sci Pollut Res. **20**: 2236-2243
- Wang, Y., Chen, X., Liu, J., He, F. und Wang, R.** (2013a): Immobilization of laccase by Cu²⁺ chelate affinity interaction on surface-modified magnetic silica particles and its use for the removal of 2,4-dichlorophenol. Environ Sci Pollut Res. **20**: 6222-6231
- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Xie, G., Haft, D.H. et al.** (2009): Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insights into the lifestyles of these microorganisms in soils. Appl Environ Microbiol. **75**: 2046-2056
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T. et al.** (2007): Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature. **450**: 560-565

- Warner, K.A., Gilmour, C.C. und Capone, D.G.** (2002): Reductive dechlorination of 2,4-dichlorophenol and related microbial processes under limiting and non-limiting sulfate concentration in anaerobic mid-Chesapeake Bay sediments. *FEMS Microbiol Ecol.* **40**: 159-165
- Watanabe, K., Hino, S., Onodera, K., Kajie, S.-I. und Takahashi, N.** (1996): Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *J Ferment Bioeng.* **81**: 560-563
- Watsuji, T., Takaya, N., Nakamura, A. und Shoun, H.** (2003): Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 1115-1120
- Webb, M.D., Ewbank, G., Perkins, J. und McCarthy, A.J.** (2001): Metabolism of pentachlorophenol by *Saccharomonospora viridis* strains isolated from mushroom compost. *Soil Biol Biochem.* **33**: 1903-1914
- Wegman, R.C.C. und Hofstee, A.W.M.** (1979): Chlorophenols in surface waters of the Netherlands (1976 – 1977). *Water Research.* **13**: 651-657
- Wei, W., Isobe, K., Shiratori, Y., Nishizawa, T., Ohte, N., Otsuka, S. und Senoo, K.** (2014): N₂O emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications of organic fertilizer. *Soil Biol Biochem.* **69**: 157-167
- Weller, M.M.S.** (2010): Der Einfluss von 2,4-Dichlorphenol auf Denitrifizierer in der Drilosphäre. Bachelorarbeit. Universität Bayreuth
- Wessen, E. und Hallin, S.** (2011): Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers-possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic.* **11**: 1696-1698
- Westerberg, K., Elväng, A.M., Stackebrandt, E. und Jansson, J.K.** (2000): *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**: 2083-2092
- Westgard, J.O., Barry, B.L., Hunt, M.R. und Groth, T.** (1981): A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem.* **27**: 493-501
- White, D.C., Sutton, S.D. und Ringelberg, D.B.** (1996): The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol.* **7**: 301-306
- Wiegel, J.** (2009): Family I. *Clostridiaceae*. In : De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. und Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 nd ed Volume III. Springer-Verlag, New York. pp 736-864
- Witthuhn, B., Klauth, P., Pernyeszi, T., Vereecken, H. und Klumpp, E.** (2006): Organoclays for aquifer bioremediation: adsorption of chlorobenzene on organoclays and its degradation by *Rhodococcus* B528. *Wat Air Soil Pollut.* **6**: 317-329

- Wood, P.M.** (1986): Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser, J.I. (Ed.), Nitrification. Special publications of the Society for General Microbiology. **20**: 39-62
- Wrage, N., Velthof, G.L., Van Beusichem, M.L. und Oenema, O.** (2001): Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem.* **33**: 1723-1732
- Wright, E.S., Yilmaz, S. und Noguera, D.R.** (2012): DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol.* **78**: 717-725
- Wu, C.-Y., Zhuang, L., Zhou, S.-G., Li, F.-B. und Li, X.-M.** (2010): Fe(III)-enhanced anaerobic transformation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by an iron-reducing bacterium *Comamonas koreensis* CY01. *FEMS Microbiol Ecol.* **71**: 106-113
- Wüst, P.K., Horn, M.A. und Drake, H.L.** (2009a): *In situ* hydrogen and nitrous oxide as indicators of concomitant fermentation and denitrification in the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 1852-1859
- Wüst, P.K., Horn, M.A. und Drake, H.L.** (2011): *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in earthworm gut content. *ISME J.* **5**: 92-106
- Wüst, P.K., Horn, M.A., Henderson, G., Janssen, P.H., Rehm, B.H.A. und Drake, H.L.** (2009b): Gut-associated denitrification and *in vivo* emission of nitrous oxide by the earthworm families *Megascolecidae* and *Lumbricidae* in New Zealand. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 3430-3436
- Xie, S., Sun, W., Luo, C. und Cupples, A.M.** (2011): Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation.* **22**: 71-81
- Yang, S., Wu, R.S.S. und Kong, R.Y.C.** (2002): Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquat Toxicol.* **59**: 191-200
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Glöckner, F.O. und Rosselló-Móra, R.** (2010). Update of the all-species living tree project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *System Appl Microbiol.* **33**: 291-299
- Yeomans, J.C. und Bremner, J.M.** (1985): Denitrification in soil: effect of herbicides. *Soil Biol Biochem.* **17**: 447-452
- Yoccoz, N.G.** (2012): The future of environmental DNA in ecology. *Mol Ecol.* **21**: 2031-2038
- Yoshinari, T. und Knowles, R.** (1976): Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* **69**: 705-710

- Zabaloy, M.C., Garland, J.L. und Gomez, M.A.** (2010): Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil. *Appl Soil Ecol.* **46**: 240-246
- Zaprasis, A., Liu, Y.-J., Liu, S.J., Drake, H.L. und Horn, M.A.** (2010): Abundance of novel and diverse *tfdA*-like genes, encoding putative phenoxyalkanoic acid herbicide-degrading dioxygenases, in soil. *Appl Environ Microbiol.* **76**: 119-128
- Zausig, J. und Horn, R.** (1992): Soil-water relations and aeration status of single soil aggregates taken from a gleyic vertisol. *J Plant Nutr Soil Sci.* **155**: 237-245
- Zausig, J., Stepniewski, W. und Horn, R.** (1993): Oxygen concentration and redox potential gradients in unsaturated model soil aggregates. *Soil Sci Soc Am J.* **57**: 908-916
- Zettler, B.** (1996): *In situ* Sanierung eines mit Chloraromaten verunreinigten Grundwasserleiters – Mikrobiologische und toxikologische Untersuchungen und Bilanzierung der Schadstoffströme. Dissertation. Technische Universität Berlin
- Zhang, H. und Schrader, S.** (1993): Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biol Fertil Soils.* **15**: 229-234
- Zhang, T., Tremblay, P.-L., Chaurasia, A.K., Smith, J.A., Bain, T.S. und Lovely, D.R.** (2014): Identification of genes specifically required for the anaerobic metabolism of benzene in *Geobacter metallireducens*. *Front Microbiol.* **5**: 1-6
- Zhang, X., Gao, P., Chao, Q., Wang, L., Senior, E. und Zhao, L.** (2004): Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol- degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiol Lett.* **237**: 369-375
- Zhang, X., und Wiegel, J.** (1990). Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 1119-1127
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., und Miller, W.** (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* **7**: 203-214
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M. und Tay, S.L.** (2002): *Bacillus naphthovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**: 574-554
- Ziagova, M. und Liakopoulou- Kyriakides, M.** (2007): Kinetics of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-*m*-cresol degradation by *Pseudomonas* sp. cultures in the presence of glucose. *Chemosphere.* **68**: 921-927
- Zorn, M.I., Van Gestl, C.A.M. und Eijsackers, H.** (2005): The effect of two endogeic earthworm species on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Soil Biol Biochem.* **37**: 917-925

- Zumft, W.G.** (1992): The denitrifying prokaryotes. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes*. 2. Auflage. Springer-Verlag, New York, USA. pp 554-582
- Zumft, W.G.** (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**: 533-616

8. Anhang

8.1. Abbildungen

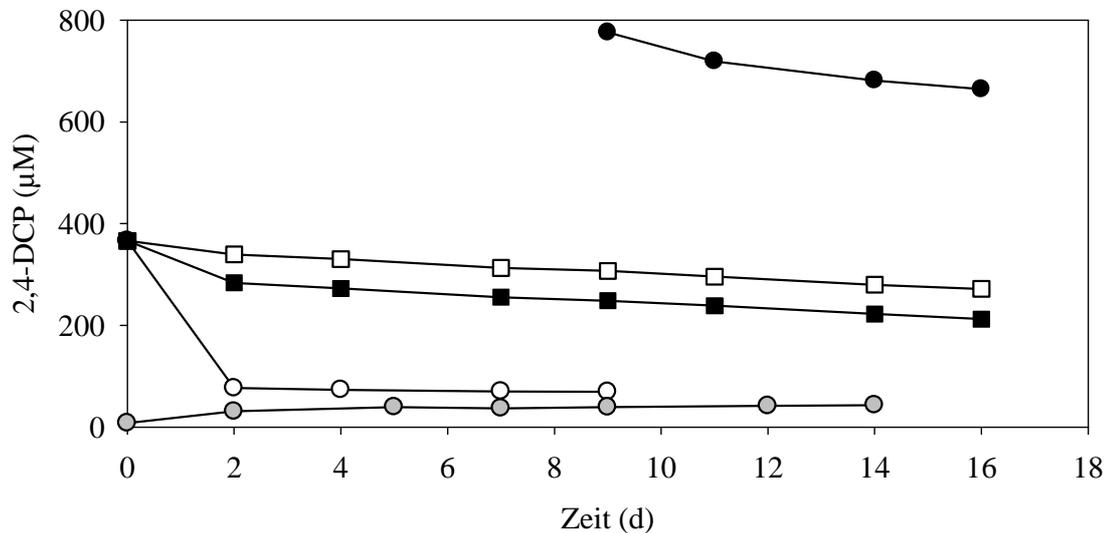


Abbildung-AH 1: 2,4-DCP Abnahme nach Inkubation in unterschiedlichen Gefäßen verschiedener Materialien. Symbole: weißes Quadrat, Glas mit Parafilm verschlossen; schwarzes Quadrat, Glas mit Aluminiumfolie verschlossen; weißer Kreis, 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich); schwarzer Kreis, 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen mit 2,4-DCP vorinkubiert; graues Quadrat, Desorptionskontrolle – 2,4-DCP vorbehandeltes PP-Zentrifugenröhrchen mit MSM₁₀ befüllt. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C im Dunkeln. Sorption (%): Glas/Parafilm, 26; Glas/Aluminium, 42; PP-Röhrchen neu, 81; PP-Röhrchen vorbehandelt, 14.

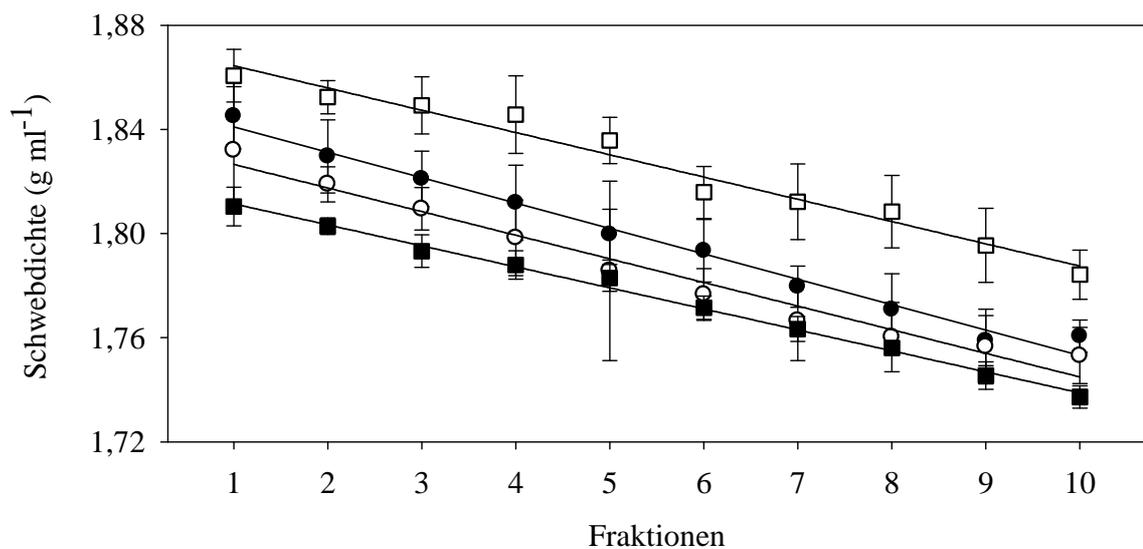


Abbildung-AH 2: Schwebdichte der fraktionierten Gradientenlösungen ohne RNA nach den Ultrazentrifugationsläufen 1 bis 4. Die Bestimmung erfolgte bei 25 °C. Symbole: schwarzer Kreis, Lauf 1 ($R^2 = 0,98$); weißes Quadrat, Lauf 2 ($R^2 = 0,97$); weißer Kreis, Lauf 3 ($R^2 = 0,97$); schwarzes Quadrat, Lauf 4 ($R^2 = 0,99$).

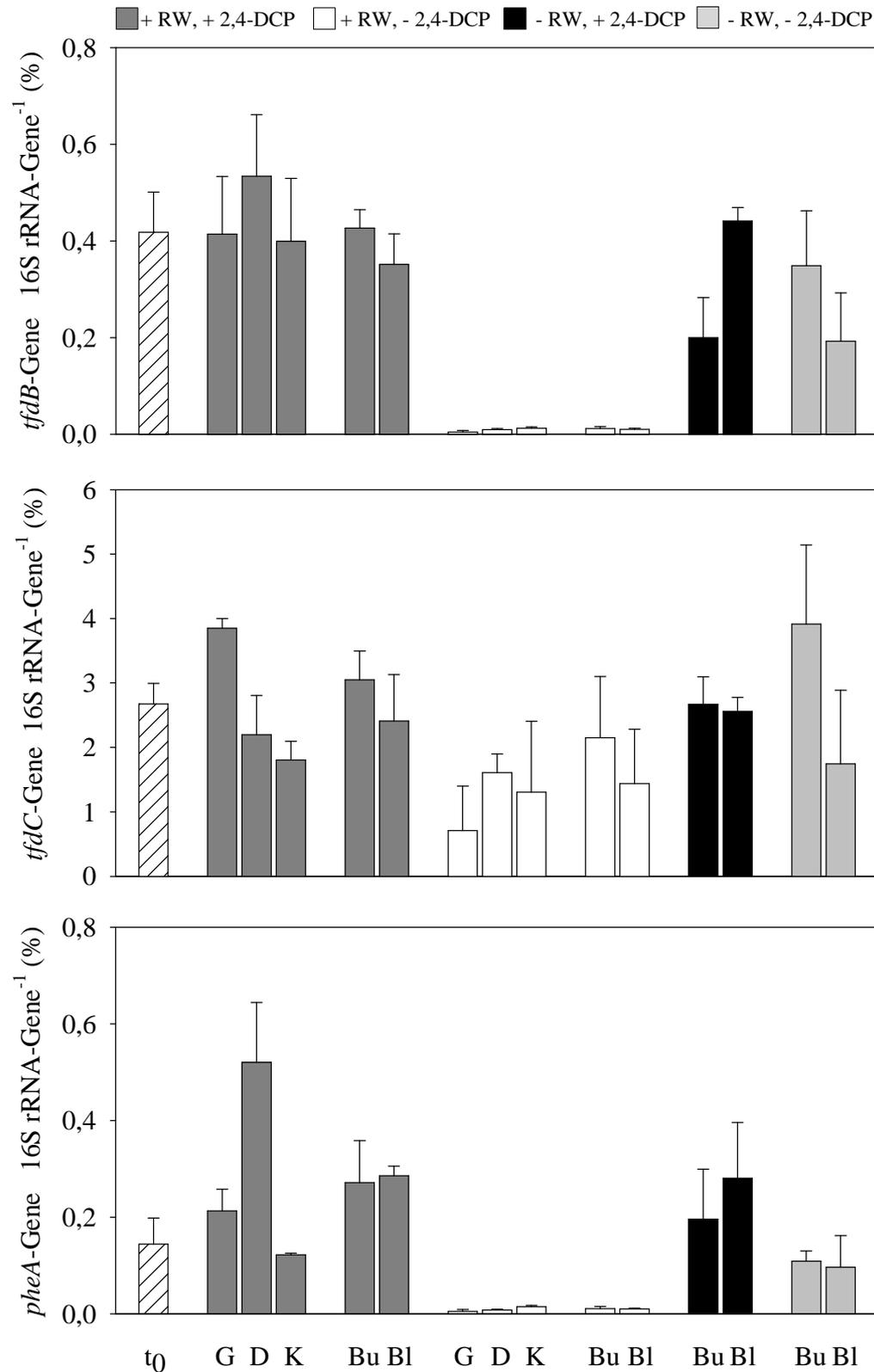


Abbildung-AH 3: *tfdB*-, *tfdC*- und *pheA*-Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in Prozent bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t₀) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial nach 33-tägiger Bodensäuleninkubation. Dargestellte Verhältnisse sind Mittelwerte aus zwei qPCR-Messungen; Fehlerbalken geben den höchsten erfassten Wert an. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; D, Darminhalt; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

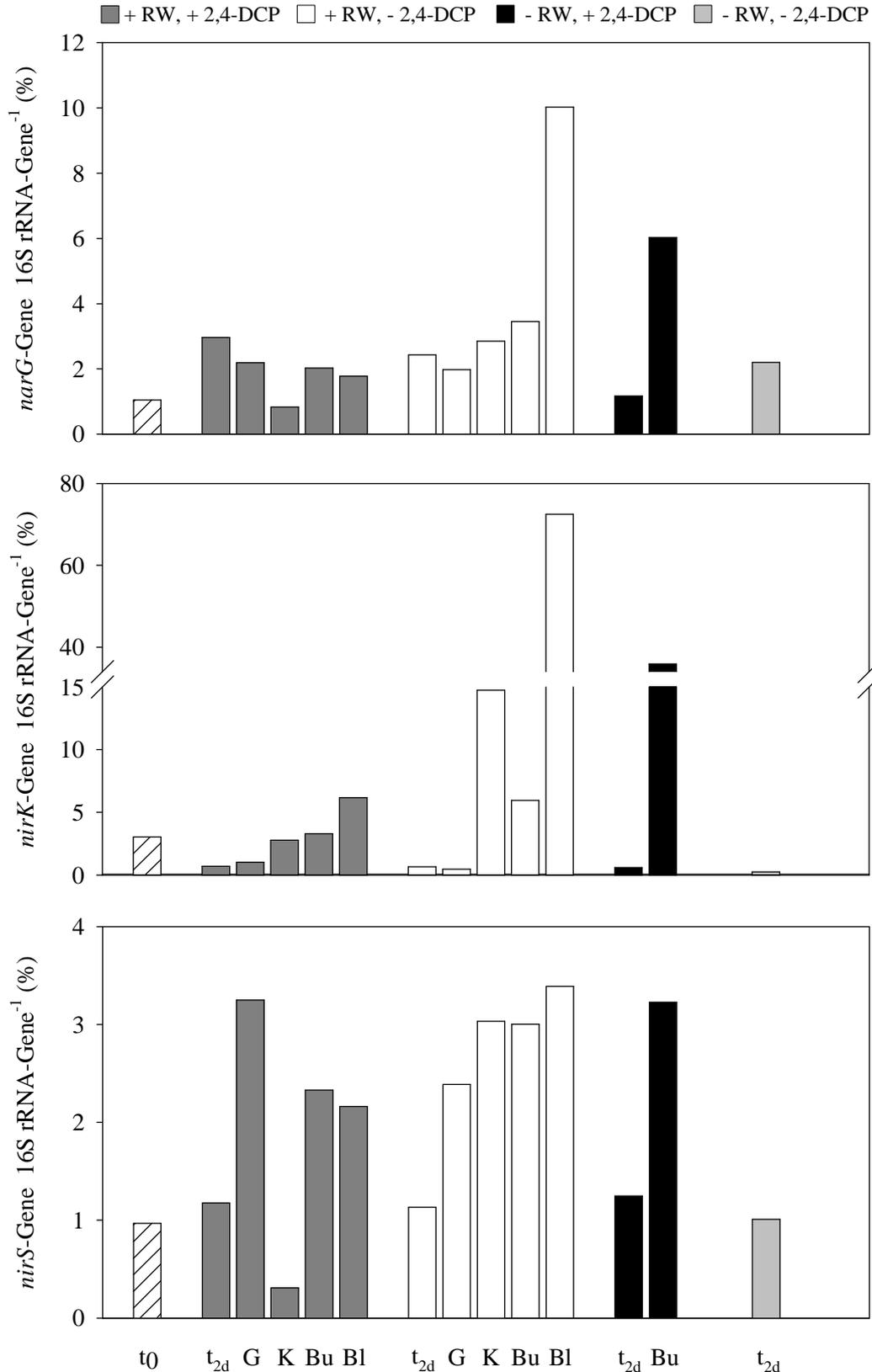


Abbildung-AH 4: *narG*-, *nirK*- und *nirS*-Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in % bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t_0) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial. Aufgrund von Detektionsproblemen der 16S rRNA-Gene in den Proben Bl -RW/+2,4-DCP sowie Bu und Bl -RW/-2,4-DCP wurden keine Genverhältnisse bestimmt. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; D, Darminhalt; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

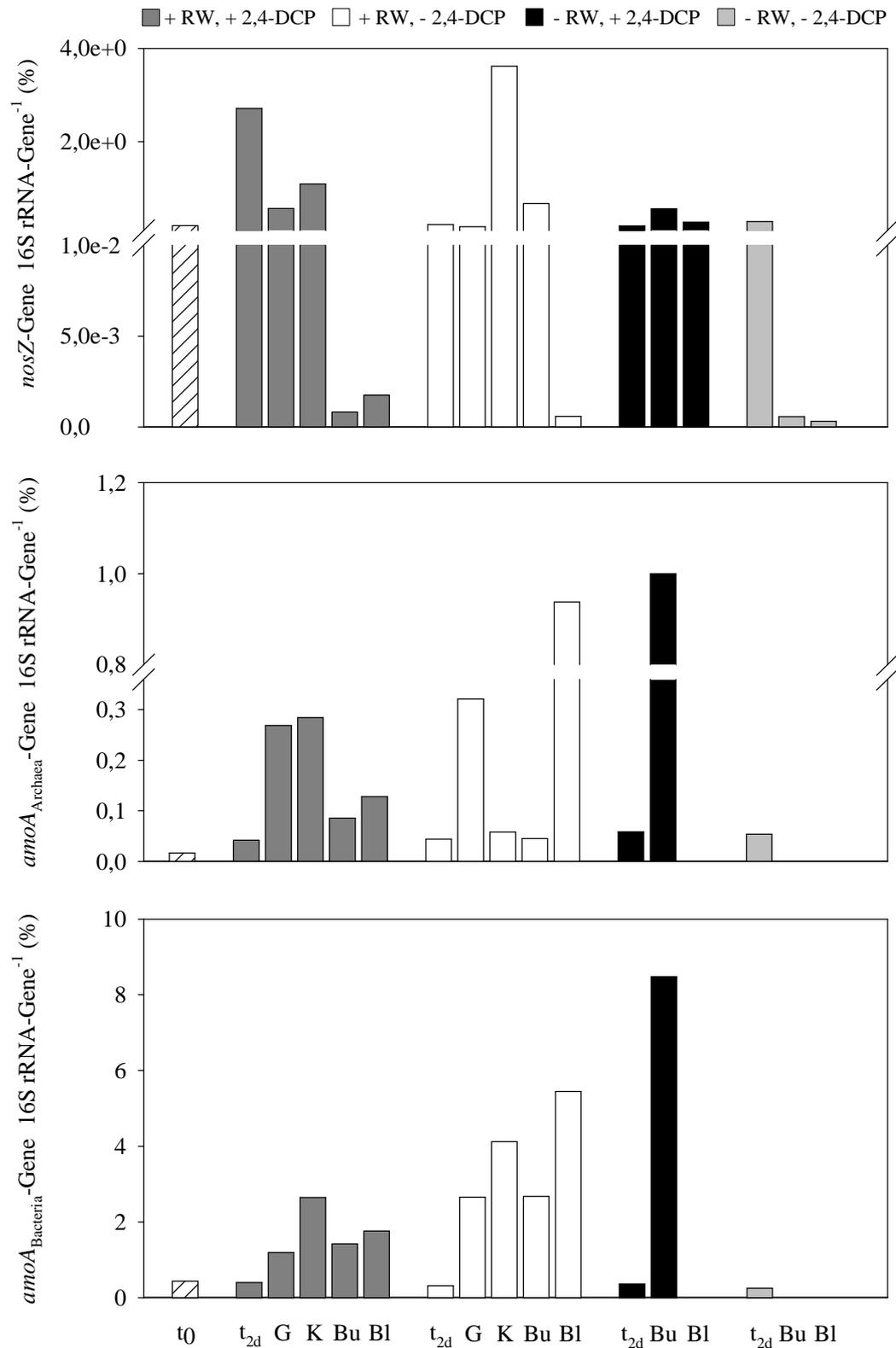


Abbildung-AH 5: *nosZ*-, *amoA*_{Archaea}- und *amoA*_{Bacteria}-Genkopienzahlen pro 16S rRNA-Gene in % bezogen auf ng eingesetzter DNA in feldfrischem Boden (t₀) sowie in vorinkubiertem Drilosphären- und Bodenmaterial. Aufgrund von Detektionsproblemen der 16S rRNA-Gene in den Proben Bl -RW/+2,4-DCP sowie Bu und Bl -RW/-2,4-DCP wurden keine Genverhältnisse bestimmt. Abkürzungen: RW, Regenwurm; G, Gangwände; D, Darminhalt; K, Kotkrümel; Bu, obere Schicht (0-5 cm) des Bodens; Bl, untere Schicht (5-10 cm) des Bodens.

8.2. Tabellen

Tabelle-AH 1: Verwendete Fraktionen und dazugehörige Barcodes für die 16S rRNA SIP Pyrosequenzierung. Abkürzungen: t0, feldfrischer Boden; 12C, Inkubation mit [¹²C]-2,4-DCP; 13C, Inkubation mit [¹³C]-2,4-DCP; BoSä, Bodensäulen; MK, Mikrokosmen; +/+, + Regenwurm + 2,4-DCP; -/+, - Regenwurm + 2,4-DCP; -/-, Kontrolle ohne Regenwurm und 2,4-DCP.

Probe	Behandlung	Fraktion	Barcode
t ₀	¹² C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC
	¹³ C	4	ACGCTC
		5	ACGTAC
		6	ACTATC
Gangwände BoSä	¹² C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC
	¹³ C	4	ACGCTC
		5	ACGTAC
		6	ACTATC
Darminhalt BoSä	¹² C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC
	¹³ C	4	ACGCTC
		5	ACGTAC
		6	ACTATC
Kotkrümel BoSä	¹² C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC
	¹³ C	4	ACGCTC
		5	ACGTAC
		6	ACTATC
Boden 0-5 cm +/+ BoSä	¹² C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC
	¹³ C	4	ACGCTC
		5	ACGTAC
		6	ACTATC
Boden 5-10 cm +/+ BoSä	¹² C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	¹³ C	4	ACACAC
		5	ACAGTC
		6	ACGAGC

Probe	Behandlung	Fraktion	Barcode
Boden 0-5 cm +/- BoSä	^{12}C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
		5	ACGCTC
		6	ACGTAC
		7	ACTATC
		8	ACTCGC
		9	AGAGAC
		10	AGCGTC
		Boden 5-10 cm +/- BoSä	^{13}C
3	ACAGTC		
4	ACGAGC		
5	ACGCTC		
6	ACGTAC		
7	ACTATC		
8	ACTCGC		
9	AGAGAC		
10	AGCGTC		
Gangwände MK	^{12}C		
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	^{13}C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Darminhalt MK	^{12}C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	^{13}C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Kotkrümel MK	^{12}C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	^{13}C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC

Probe	Behandlung	Fraktion	Barcode
Boden 0-5 cm +/- MK	¹² C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	¹³ C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Boden 5-10 cm +/- MK	¹² C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	¹³ C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Boden 0-5 cm -/+ MK	¹² C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	¹³ C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Boden 5-10 cm -/+ MK	¹² C	2	ACGCTC
		3	ACGTAC
		4	ACTATC
	¹³ C	2	ACACAC
		3	ACAGTC
		4	ACGAGC
Boden 0-5 cm -/- BoSä			AGCGTC
Boden 5-10 cm -/- BoSä			ACTCGC

Tabelle-AH 2: Verwendete Barcodes für die Pyrosequenzierung amplifizierter *tfdB*-Sequenzen. Abkürzungen: t₀, feldfrischer Boden; +/+, + Regenwurm + 2,4-DCP; +/-, + Regenwurm – 2,4-DCP; -/+, - Regenwurm + 2,4-DCP; -/-, Kontrolle ohne Regenwurm und 2,4-DCP.

Probe	Barcode
t ₀	ACACAC
Gangwände +/+, +/-	ACGCTC
Darminhalt +/+, +/-	ACGAGC
Kotkrümel +/+, +/-	ACAGTC
Boden 0-5 cm +/+, +/-	ACGTAC
Boden 5-10 cm +/+, +/-	ACTATC
Boden 0-5 cm -/+	ACTCGC
Boden 5-10 cm -/+	AGAGAC
Boden 0-5 cm -/-	AGCGTC
Boden 5-10 cm -/-	AGCTAC

Tabelle-AH 3: Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes I (vgl. 2.5.2.).

Isolat	Herkunft	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-300	Gang- wände	620	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (FR848411)	99
AR-301		700	<i>Xanthomonas citri</i> (JN039034)	100
AR-303		680	<i>Pseudomonas</i> sp. (FN547413)	100
AR-305		680	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ486207)	100
AR-306		700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FM886837)	100
AR-307		680	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ486207)	100
AR-308		700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FM886837)	100
AR-309		700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FM886837)	100
AR-310		680	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ486207)	100
AR-311		700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FM886837)	100
AR-312	Darm- inhalt	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ486207)	100
AR-313		700	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (HM113684)	99
AR-314		700	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (HM113684)	100
AR-315		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-316		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-317		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-318		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-319		700	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (HM113684)	99
AR-320		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-321		700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-324		500	<i>Serratia plymuthica</i> (JN192403)	100
AR-326		660	<i>Achromobacter pichaudii</i> (HQ831383)	100
AR-328		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	100
AR-329		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	100
AR-331		660	<i>Microbacterium</i> sp. (AB563790)	100
AR-332		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-333		660	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> (JF496533)	99
AR-334		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-335		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-336		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-337	Kot- krümel	660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-338		670	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506064)	100
AR-340		660	<i>Caulobacter</i> sp. (DQ664232)	99
AR-341		660	<i>Delftia acidovorans</i> (HM755667)	100
AR-343		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506064)	100
AR-344		660	<i>Microbacterium</i> sp. (HQ896280)	100
AR-347		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	99
AR-348		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-349		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-350		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-351		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99
AR-353		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ208666)	99

Isolat	Herkunft	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-355		660	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (FR848411)	100
AR-356		660	<i>Pseudomonas putida</i> (JF701675)	100
AR-361		660	<i>Paenibacillus</i> sp. (HM352396)	100
AR-367		660	<i>Bacillus</i> sp. (FJ601637)	99
AR-368		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (FN547413)	99
AR-369	Boden	660	<i>Enterobacter</i> sp. (JF431253)	100
AR-370	0-5 cm	660	<i>Pseudomonas</i> sp. (FN547413)	100
AR-371		660	<i>Enterobacter</i> sp. (JF431253)	100
AR-372		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU595382)	99
AR-373		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	100
AR-374		660	<i>Pseudomonas</i> sp. (FN547413)	100
AR-376		660	<i>Enterobacter</i> sp. (JF431253)	99
AR-362		660	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (FR848411)	100
AR-365		660	<i>Xanthomonas citri</i> (JN039034)	99
AR-378	Boden	660	<i>Pedobacter</i> sp. (EU057835)	99
AR-379	5-10 cm	660	<i>Pedobacter</i> sp. (EU057835)	99
AR-380		660	<i>Pedobacter</i> sp. (AF408950)	99
AR-382		660	<i>Pedobacter</i> sp. (EU057835)	99

*, Ähnlichkeit basierend auf Nucleotid-BLAST (blastn)

Tabelle-AH 4: Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes II.

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-1b	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-2b	700	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-4a	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-4b2	600	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-4c	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-5b	700	<i>Achromobacter spanius</i> (FM162561)	99
AR-6b	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN674082)	99
AR-7a	600	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-7c	700	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (EU729738)	100
AR-8	700	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF033513)	99
AR-9	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-10	600	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	100
AR-11a	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-11b	590	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-12	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-13	690	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-14a	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-14b	470	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-15	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-16	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-17	570	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-18b2	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-19b	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-20b1	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-20b2	700	<i>Leifsonia lichenia</i> (AB278552)	100
AR-21b	610	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-22	700	<i>Leifsonia lichenia</i> (AB278552)	100
AR-23a	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-23b	590	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ898911)	100
AR-25	520	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-26	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-27	500	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-28	500	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-29	540	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-30	500	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-31	590	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-32	580	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-33	660	<i>Leifsonia lichenia</i> (AB278552)	100
AR-34	570	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-37	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN578489)	100

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-39a	500	<i>Pseudomonas</i> sp. (HM582871)	99
AR-39b	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-40b	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-41a	520	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-41b	530	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-42	580	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-43a	540	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-43b	480	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-44	590	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-45	600	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-46	580	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-47a	580	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-47b	580	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-49a	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-51a	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (FM998724)	99
AR-53a	680	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-53b	680	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-54	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-55a	600	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-55b	580	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB685619)	100
AR-56	590	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-57	680	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	99
AR-58	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (FM998724)	99
AR-59	630	<i>Rhodococcus</i> sp. (FM998724)	99
AR-60	680	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	100
AR-61	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-62	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-63	670	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	100
AR-65a	640	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB685619)	100
AR-68a	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-68b	560	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF521654)	100
AR-69	630	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-70	630	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	99
AR-71a	670	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-71b	600	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-72	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB685619)	100
AR-73	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-74	690	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-75a	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-75b	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-76	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	99
AR-77	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-78a	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-78b	630	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ898911)	100
AR-79	500	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ898911)	100
AR-80a	690	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	99
AR-80b	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	100
AR-81b	690	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-82b	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-83b	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-84	590	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-85a	630	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-85b	630	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-86a	670	<i>Rhodococcus</i> sp. (FM998724)	99
AR-86b	670	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (AM748708)	99
AR-87a	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-87b	690	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (HQ259684)	99
AR-87.1	690	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (HQ259684)	99
AR-87.2	630	<i>Ochrobactrum</i> sp. (AM231060)	100
AR-88a	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB685619)	100
AR-88b1	630	<i>Leifsonia naganensis</i> (NR043662)	100
AR-89a	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	100
AR-90	500	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ898911)	100
AR-91	630	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ898911)	100
AR-92	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU084125)	99
AR-93b	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-94a	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-94b1	670	<i>Chitinophaga</i> sp. (JN590375)	99
AR-94b2	500	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-95a	630	<i>Chitinophaga</i> sp. (JN590375)	99
AR-95b	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN800327)	100
AR-96a	680	<i>Chitinophaga ginsengisegetis</i> (NR041486)	99
AR-96b	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-100a	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JQ014515)	100
AR-100b	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-101	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (FN293310)	100
AR-103a1	540	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-103a2	540	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-103b	700	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-104	700	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-105	440	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-106	500	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-107	530	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-109	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN613476)	100
AR-110a	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN613476)	100
AR-111b2	680	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-112a	670	<i>Chitinophaga</i> sp. (JN590375)	99
AR-113a	660	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN613476)	100
AR-113b	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN613476)	100
AR-114	600	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN613476)	100
AR-116	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-117	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF521654)	100
AR-118	640	<i>Rhodococcus</i> sp. (JF742932)	99
AR-119b	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ225180)	100
AR-120	630	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-121	570	<i>Cupriavidus</i> sp. (JN128831)	100
AR-122	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-123.1	670	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ225180)	100
AR-123.2	670	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-124	500	<i>Bacillus simplex</i> (JQ030917)	99
AR-125a	700	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-125b	570	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-125.1	500	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN616366)	100
AR-130a	600	<i>Arthrobacter</i> sp. (EU442260)	100
AR-130b	560	<i>Arthrobacter humicola</i> (AB648944)	100
AR-131a	530	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-132a	600	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ449632)	100
AR-132b	600	<i>Achromobacter</i> sp. (JF262930)	100
AR-133b	500	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB685619)	100
AR-136a	600	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-136b	680	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JF327445)	100
AR-137	540	<i>Cupriavidus</i> sp. (JN128831)	100
AR-139a	600	<i>Bacillus</i> sp. (JN897278)	100
AR-139b1	600	<i>Bacillus</i> sp. (JQ028131)	99
AR-139b2	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-140	670	<i>Bacillus</i> sp. (JQ030908)	100
AR-141a	600	<i>Bacillus</i> sp. (JF803853)	100
AR-141b	500	<i>Pandoraea</i> sp. (JN128829)	100
AR-142	640	<i>Bacillus</i> sp. (HM567141)	100
AR-144	570	<i>Bacillus</i> sp. (HE603897)	100

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-145a	520	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-145b2	600	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-147	500	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (AY604848)	99
AR-148a1	600	<i>Leifsonia lichenia</i> (AB278552)	100
AR-148a2	600	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN644309)	99
AR-148a3	530	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU826618)	99
AR-152	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (EU887718)	99
AR-153a1	600	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-153b	700	<i>Rhodococcus</i> sp. (JN644309)	100
AR-154a	550	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	100
AR-154b1	670	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-155b	600	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ225200)	100
AR-156b2	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN578491)	100
AR-158b	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU826618)	99
AR-159b	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN695702)	99
AR-161	630	<i>Bacillus</i> sp. (JN897278)	100
AR-163b	600	<i>Arthrobacter</i> sp. (FJ897781)	99
AR-164a	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU826618)	99
AR-164b	680	<i>Leifsonia lichenia</i> (AB278552)	100
AR-166	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU826618)	99
AR-167b	630	<i>Leifsonia naganoensis</i> (NR043662)	100
AR-168b	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-169b	680	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ071900)	100
AR-170a	550	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	99
AR-171	560	<i>Leifsonia</i> sp. (FR750300)	99
AR-172	600	<i>Leifsonia xyli</i> (GU332619)	99
AR-174b1	520	<i>Plantibacter flavus</i> (JF798361)	99
AR-174b2	630	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU784939)	100
AR-175b	600	<i>Pseudomonas</i> sp. (GU595382)	100
AR-176	670	<i>Bacillus</i> sp. (JN897278)	100
AR-177	700	<i>Burkholderia</i> sp. (HQ730958)	99
AR-178a	670	<i>Luteibacter rhizovicinus</i> (AB627008)	100
AR-178b	600	<i>Luteibacter rhizovicinus</i> (AB627008)	100

* , Ähnlichkeit basierend auf Nucleotid-BLAST (blastn)

Tabelle-AH 5: Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter oxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes III .

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-180	540	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-182	700	<i>Pseudomonas geniculata</i> (HQ857772)	99
AR-183	590	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	100
AR-184	540	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	100
AR-186	440	<i>Janthinobacterium lividum</i> (JF327475)	99
AR-188	660	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	100
AR-189	400	<i>Serratia</i> sp. (AM992012)	100
AR-191	670	<i>Pseudomonas geniculata</i> (HQ857772)	100
AR-193	500	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ224639)	100
AR-195	590	<i>Pandoraea norimbergensis</i> (HQ713574)	100
AR-197	400	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ224639)	100
AR-198	590	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	99
AR-199	570	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-200	590	<i>Janthinobacterium lividum</i> (HQ824941)	100
AR-201	500	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-204	480	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-205	590	<i>Pandoraea norimbergensis</i> (HQ713574)	100
AR-206	590	<i>Bacillus cereus</i> (JN411370)	100
AR-215	420	<i>Serratia plymuthica</i> (JF327440)	100
AR-219	400	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	100
AR-223	400	<i>Serratia</i> sp. (HQ650130)	100
AR-226	480	<i>Serratia</i> sp. (AM992013)	99
AR-230	450	<i>Serratia</i> sp. (HE603875)	100
AR-231	700	<i>Bacillus</i> sp. (HM567146)	100

* , Ähnlichkeit basierend auf Nucleotid-BLAST (blastn)

Tabelle-AH 6: Phylogenetische Zuordnung isolierter Bakterien nach Anreicherung mit 2,4-DCP unter anoxischen Bedingungen im Rahmen des Anreicherungsansatzes IV.

Isolat	Länge (bp)	Nächst kultivierter Organismus (Zugangsnummer)	Ä (%)*
AR-2-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-5-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-7-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-13-an	500	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-14-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-16-an	700	<i>Clostridium manganotii</i> (FR733662)	100
AR-18-an	700	<i>Clostridium manganotii</i> (FR733662)	100
AR-19-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-20-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-22-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-23-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-24-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-26-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-27-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-28-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (JN836928)	100
AR-29-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FR675976)	100
AR-30-an	700	<i>Raoultella terrigena</i> (NR037085)	99
AR-35-an	700	<i>Raoultella</i> sp. (GU935770)	100
AR-36-an	500	<i>Raoultella</i> sp. (GU827552)	99
AR-37-an	700	<i>Pseudomonas</i> sp. (FR682936)	100
AR-38-an	700	<i>Raoultella</i> sp. (GU935770)	100
AR-39-an	700	<i>Raoultella</i> sp. (JN712166)	99
AR-40-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99
AR-43-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99
AR-44-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99
AR-45-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99
AR-46-an	700	<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium JJC (EU523664)	99
AR-47-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99
AR-48-an	700	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JN650546)	99

*, Ähnlichkeit basierend auf Nucleotid-BLAST (blastn)

9. Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt und in einer Publikation veröffentlicht. Zwei weitere Manuskripte sind in Vorbereitung.

Vortrag

Vortrag über Ergebnisse dieser Arbeit:

Ramm, A., Liu, Y., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2010): Microbial metabolism of 2,4-DCP, MCPA and Bentazon in the drilosphere. Jahrestagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Jena.

Posterbeiträge

Poster über Ergebnisse dieser Arbeit:

Ramm, A., Liu, Y., Zaprasis, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2009): Earthworms enhance the microbial removal of 2,4-DCP and MCPA in soil. Jahrestagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Jena.

Ramm, A., Liu, Y., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2010): Microbial metabolism of 2,4-DCP and MCPA in the drilosphere. Jahrestagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Jena.

Ramm, A., Liu, Y., Zaprasis, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2010): Earthworms enhance the microbial removal of phenolic compounds in soil. Jahrestagung der VAAM, Biospektrum. Abstract BTP23

Ramm, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2011): Hitherto unknown, active microorganisms are involved in 2,4-dichlorophenol degradation in drilosphere and agricultural soil. Jahrestagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Jena.

Ramm, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2011): Earthworms stimulate the microbial degradation of 2,4-dichlorophenol in soil. *Ecology of Soil Microorganisms*. Prag, Tschechische Republik. p 155.

Ramm, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2011): Stimulation of microbial 2,4-dichlorophenol degradation in soil by the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa*. 4th Congress of European Microbiologists (FEMS). Genf, Schweiz. Poster 488 (auf Datenträger).

Ramm, A., Drake, H.L. und Horn, M.A. (2011): The earthworm *Aporrectodea caliginosa* augments the microbial degradation of 2,4-dichlorophenol in agricultural soil. Jahrestagung der VAAM, Biospektrum. Abstract EMP077

Dallinger, A. und Horn, M.A. (2014): Diversity of 2,4-dichlorophenol degraders in agricultural soil and drilosphere. Abschlusstagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Leipzig.

Dallinger, A., Weller, M.M.S., Hofmann, C.A. und Horn, M.A. (2014): Earthworms rather than 2,4-dichlorophenol impact on denitrifier and nitrifier communities in agricultural soil. Abschlusstagung SPP1315 *Biogeochemical Interfaces in Soil*, Leipzig.

Artikel in Zeitschriften

Dallinger, A. und Horn, M.A. (2014): Agricultural soil and drilosphere as reservoirs of new and unusual assimilators of 2,4-dichlorophenol carbon. *Environ Microbiol.* **16**: 84-100

Zwei weitere Veröffentlichungen zu Ergebnissen der vorliegenden Arbeit befinden sich in Vorbereitung:

Dallinger, A. und Horn, M.A. (2015): 2,4-dichlorophenol and earthworms impact expression of *tfdC* and *pheA* as well as microbial community structure in soil. *Appl Environ Microbiol.* In preparation.

Dallinger, A. und Horn, M.A. (2015): Endogeic earthworms rather than 2,4-dichlorophenol impact on denitrifier and nitrifier communities in agricultural soil. In preparation.

10. Dankeschön!

Vielen Dank allen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei

...PD Dr. Marcus A. Horn für die Überlassung dieses interessanten und manchmal herausfordernden Themas sowie die hervorragende Betreuung. Danke für das stets offene Ohr, die kreativen Ideen und Diskussionen und die Geduld vor allem am Ende dieser Arbeit.

...Prof. Harold L. Drake für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren und im Zuge dessen ein breites Spektrum verschiedenster Methoden kennenzulernen und anwenden zu können sowie für die zahlreichen Anregungen während der Laborseminare.

...allen (ehemaligen) ÖMIKs, die mich herzlich in Bayreuth aufgenommen und stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Ein besonderes Dankeschön geht an Anita Gößner für die intensive Betreuung und Einarbeitung im Isotopenlabor. Meinen Bachelorstudenten Marianna Weller und Christian Hofmann danke ich für die vielen qPCR-Messungen, die zum Großteil in diese Arbeit einfließen.

...der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schloter (Helmholtz Zentrum München) sowie Jean Charles Munch für die Bereitstellung der Bodenproben. Guido Wiesenberger und Ilse Thaufelder (Agrar-Ökosystemforschung, Universität Bayreuth) für die Hilfe bei der Bodenverbrennung sowie Rolf Daniel und Andrea Thürmer (Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Universität Göttingen) für die Unterstützung bei der Sequenzbearbeitung der Pyrosequenzierungsdaten.

...der DFG sowie der Frauenförderung der Universität Bayreuth für die finanzielle Förderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

...meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung.

...meinem Mann Stephan für die bedingungslose Unterstützung und Hilfe während der gesamten Jahre, für die Geduld, die offenen Ohren bei allen Problemen und für das Trocknen zahlreicher Frustrationstränen. Danke für alles!

...meiner kleinen Pauline für den Beweis, dass ein Lächeln allen Ärger vertreiben kann.

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Weiterhin versichere ich, dass ich bei keiner anderen Universität ein Promotionsgesuch eingereicht oder eine Dissertation begonnen habe.

Anja Dallinger

Bayreuth, den 13.08.2015