

Bericht zur Pilotstudie

**Biodiversität von Mikroorganismen im Waldboden:
Kleine Pilotstudie für eine Begleituntersuchung zur BZE II**

Heike Liesebach und Elke Ewald
vTI - Institut für Forstgenetik, Waldsieversdorf

Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

1. HINTERGRUND UND FORSCHUNGSBEDARF	5
2. KULTURUNABHÄNGIGE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON MIKROORGANISMEN-GEMEINSCHAFTEN	6
3. WESENTLICHE SCHRITTE DER T-RFLP-TECHNIK	7
3.1 Extraktion der Gesamt-DNA aus Bodenproben	7
3.2 Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte mit PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern	8
3.3 Restriktionsverdau der PCR-Produkte	8
3.4 Trennung der DNA-Fragmente mit einem DNA-Kapillarsequenzier	8
3.5 Auswertung der Fragmentmuster	8
3.6 Weitere Verwendung der Ergebnisse von T-RFLP-Analysen	9
4. ZIEL DER PILOTSTUDIE	10
5. DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER PILOTSTUDIE	11
5.1 Entnahme von Bodenproben, Vorbehandlung und Lagerung	11
5.2 Referenzproben (Reinkulturen von Pilzen und Bakterien)	11
5.3 Extraktion der DNA aus Bodenproben mit Extraktionskits oder mit anderen zu testenden Methoden	12
5.4 Prüfen der DNA-Qualität und -Quantität mit Agarosegel-Elektrophorese und mit photometrischer Bestimmung	12
5.5 Durchführung der PCR mit ausgewählten Primerpaaren	16
5.6 Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen	19
5.7 Fragmentanalyse mit einem Kapillar-DNA-Sequenzier (CEQ 8000 der Fa. Beckman Coulter)	19
5.7.1 T-RFLPs von Reinkulturen bei Pilzen und Bakterien	19
5.7.2 T-RFLPs von Bodenproben	22
5.8 Datenauswertung und Vergleiche zwischen Proben	30
6. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	37
LITERATUR	40

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
16S rDNA	Kleine Untereinheit der ribosomalen DNA
bp	Basenpaare (Länge von DNA-Fragmenten)
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Desoxy-ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
HaeIII	Restriktionsenzym (Erkennungssequenz GG/CC)
HinfI	Restriktionsenzym (Erkennungssequenz G/ANTC)
ITS	Internal Transcribed Spacer (nichtcodierende DNA-Sequenz zwischen ribosomalen Genen)
LW	Bodenprobe aus Laubwald
NW	Bodenprobe aus Nadelwald
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PVPP	Poyvinyl-Polypyrrolidon (bindet sekundäre Pflanzenstoffe)
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
TaqI	Restriktionsenzym (Erkennungssequenz T/CGA)
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

1. Hintergrund und Forschungsbedarf

Die gegenwärtig durchgeführte zweite bundesweite Bodenzustandserhebung im Wald (BZE II) ist ein Teil des forstlichen Umweltmonitorings und soll u. a. einen Beitrag zum besseren Verständnis ökosystemarer Zusammenhänge leisten. Das langfristige Bestehen von Waldökosystemen hängt neben vielen anderen Faktoren ganz erheblich von einem funktionierenden Stoffkreislauf ab. Forschungsarbeiten zur Biodiversität im Wald haben sich bisher eher auf Untersuchungen zu oberirdisch lebenden Pflanzen- und Tierarten orientiert. Im Waldboden siedeln jedoch neben mehrzelligen Tieren und Pflanzen, der sog. Mikroflora und der Mikro- bis Makrofauna, auch zahlreiche Mikroorganismen. Die Vielfalt ihrer Stoffwechselaktivitäten ist für den Stoffkreislauf in Waldökosystemen essentiell. Bei der Untersuchung des Artenreichtums im Boden und der vielfältigen Wechselbeziehungen der Arten zueinander sind Fragen der Biodiversität von Bodenmikroorganismen in Waldböden bisher zu wenig berücksichtigt worden.

Abiotische Faktoren wie Standorteigenschaften, aber auch Schadstoffeinträge in den Wald, die Klimaänderung oder verschiedene Formen der Waldbewirtschaftung wirken sich in noch unbekanntem Maß auf die Biodiversität der Bodenmikroorganismen aus.

Veränderte, auch beschleunigte oder verlangsamte Stoffwechselprozesse können dabei erhebliche Folgen für das Funktionieren des Stoffkreislaufs in Waldökosystemen haben, die Rolle der Bodenorganismen im CO₂-Haushalt eingeschlossen.

Im Sinne einer vorsorgenden Waldpolitik bzw. einer nachhaltigen Sicherung der Waldfunktionen sollte deshalb die Biodiversität der Mikroorganismen im Waldboden dringend untersucht werden. Über die mikrobielle Zusammensetzung in landwirtschaftlichen Böden in Abhängigkeit von Fruchtarten, Bodenbearbeitung und Düngung gibt es bereits viele Erkenntnisse (u. a. Lukow et al. 2000; Sun et al. 2004; Ulrich & Becker 2006). Bei der Untersuchung der Mikroorganismenarten im Waldboden und der vielfältigen Wechselbeziehungen dieser Arten zueinander steht die Forschung noch am Anfang (z. B. Bäckman et al. 2003).

In der zurzeit laufenden BZE II werden in einem flächendeckenden Raster chemische und physikalische Parameter des Waldbodens sowie die jeweilige Baumartenzusammensetzung und andere forstliche Kenngrößen erfasst. Es bietet sich daher an, in diesem Zusammenhang

Begleituntersuchungen zur BZE II anzustreben, die die Biodiversität der Mikroorganismen im Waldboden zum Inhalt haben. Als eine Voraussetzung für ein größeres Forschungsprojekt sollen in dieser kleinen Pilotstudie erste methodische Fragen zur Untersuchung von Mikroorganismen-Gemeinschaften mit molekularen Methoden geklärt werden.

2. Kulturunabhängige Methoden zur Charakterisierung von Mikroorganismen-Gemeinschaften

Mikrobiologische Untersuchungen werden traditionell so durchgeführt, dass die Organismen zunächst auf Nährböden kultiviert werden müssen. Ihre taxonomische Einordnung erfolgt anhand mikroskopisch sichtbarer phänotypischer Merkmale und mit biochemischen Tests (z. B. Gram-Färbung, Messung von Enzymaktivitäten). Diese traditionelle Methode wird heute als „kulturabhängige Methode“ bezeichnet, man bekommt mit ihr Informationen über die sog. „cultivation-dependent diversity“. Sie ist sehr zeitaufwendig und kaum für Massenanalysen einsetzbar.

Im Gegensatz dazu gibt es neuere „kulturunabhängigen Methoden“, die molekulare Techniken einsetzen. Die Vermehrung der DNA der Mikroorganismen erfolgt nicht mehr durch Zellteilung auf einem Nährboden, sondern es werden bestimmte ausgewählte Abschnitte ihrer DNA im Reagenzglas vermehrt und stehen dann zur weiteren Untersuchung zur Verfügung. Die neuen Methoden konnten sich in den letzten zwei Jahrzehnten auf der Basis der traditionellen Methoden entwickeln, weil in großem Umfang DNA-Abschnitte von taxonomisch bereits identifizierten Mikroorganismen sequenziert wurden. Sehr viele dieser DNA-Sequenzen sind in international geführten Datenbanken als Referenzen zugänglich. Mit kulturunabhängigen Methoden ist grundsätzlich ein großer Probendurchsatz möglich, ohne dass Taxonomie-Spezialisten alle Proben untersuchen müssen.

Mit Hilfe der kulturunabhängigen Methoden hat sich herausgestellt, dass sich nur ein Teil der Mikroorganismen auf Nährböden kultivieren lässt. Ein großer Teil des Artenspektrums, Schätzungen gehen von mind. 90 – 99 % aus, ist nicht kultivierbar. Zahlreiche neue DNA-Sequenzen sind gefunden worden, die zu keiner bisher bekannten Art passen, und die mit DNA-Sequenz-Vergleichen taxonomisch nur grob klassifiziert werden konnten. Die „cultivation-independent community diversity“ ist viel größer als die, die mit traditionellen Methoden gefunden werden kann. Auch wenn nur ein Teil der Arten taxonomisch identifizierbar sind, bietet sie den Vorteil, dass Mikroorganismen-Gemeinschaften als Ganzes

und ohne den modifizierenden Selektionsdruck, den Nährmedien ausüben, charakterisiert und verglichen werden können.

Die kulturunabhängigen Methoden beruhen darauf, dass die gesamte DNA als Gemisch der in der Probe vorhandenen Arten isoliert und untersucht wird. Damit kann ein Fingerabdruck (Fingerprint) bzw. Mikroorganismenprofil für die jeweilige Mikroorganismen-Gemeinschaft erstellt werden.

Das Ergebnis der Analyse von Bodenproben mit kulturunabhängigen Methoden sind Mustertypen von Mikroorganismen-Gemeinschaften, die nicht mit botanischen oder zoologischen Artenlisten vergleichbar sind. Ein Teil der Mikroorganismen kann anhand weiterer DNA-Untersuchungen (Sequenzierung) taxonomisch klassifiziert werden.

Von drei Methoden, die zur Erstellung von Fingerprints von dafür geeigneten DNA-Abschnitte von Mikroorganismen-Gemeinschaften aus sog. Umweltproben eingesetzt werden können, soll hier nur auf die T-RFLP-Technik (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, Liu et al. 1997) wegen ihrer Vorteile bei der Reproduzierbarkeit und der hohen Auflösung eingegangen werden. Die beiden anderen Methoden SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism, u. a. in Bäckman et al. 2003; Schmalenberger & Tebbe 2003) und DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, u. a. in Rosado et al. 1998; Bäckman et al. 2003) erbringen grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse, sind jedoch schwieriger standardisierbar und weniger für große Probendurchsätze geeignet (zum Methodenvergleich siehe auch Tiedje et al. 1999).

3. Wesentliche Schritte der T-RFLP-Technik

3.1 Extraktion der Gesamt-DNA aus Bodenproben

Die Extraktion der gesamten DNA aus Bodenproben führt zu einem Gemisch der DNAs aus den vorhandenen lebenden oder teilweise toten Organismen. Der Huminsäureanteil in Waldböden kann jedoch wesentlich höher sein als in anderen Bodenarten und stellt damit ein besonderes methodisches Problem für die notwendige Reinheit der DNA dar.

3.2 Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte mit PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern

Bestimmte DNA-Abschnitte wie z. B. die 16S rDNA bei Bakterien und Archaeen oder die ITS-Sequenzen bei Pilzen sind zu Charakterisierung dieser taxonomischen Gruppen gut geeignet. Durch die Auswahl der Primerpaare für die Vervielfältigung dieser Abschnitte durch die PCR wird festgelegt, für welche taxonomische Gruppe ein Fingerprint oder ein genetisches Profil erstellt werden soll. Jeweils einer der Primer muss mit einer Fluoreszenzmarkierung für den späteren Nachweis der DNA-Fragmente versehen sein. Die PCR-Produkte stellen Gemische der verschiedenen in der Probe enthaltenen DNAs dar.

3.3 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Da die Primer für die PCR in konservativen DNA-Sequenzbereichen liegen, damit entsprechend große taxonomische Gruppen erfasst werden können, sind die PCR-Produkte annähernd gleich lang. Um eine für die Erstellung eines Fingerprints notwendige Auflösung zu erzielen, werden Restriktionsenzyme eingesetzt. Diese schneiden die PCR-Produkte je nach artspezifischer Lage der Erkennungssequenzen in variablen Teilen der DNA-Sequenz in unterschiedlich lange DNA-Fragmente (Abb. 1).

3.4 Trennung der DNA-Fragmente mit einem DNA-Kapillarsequencer

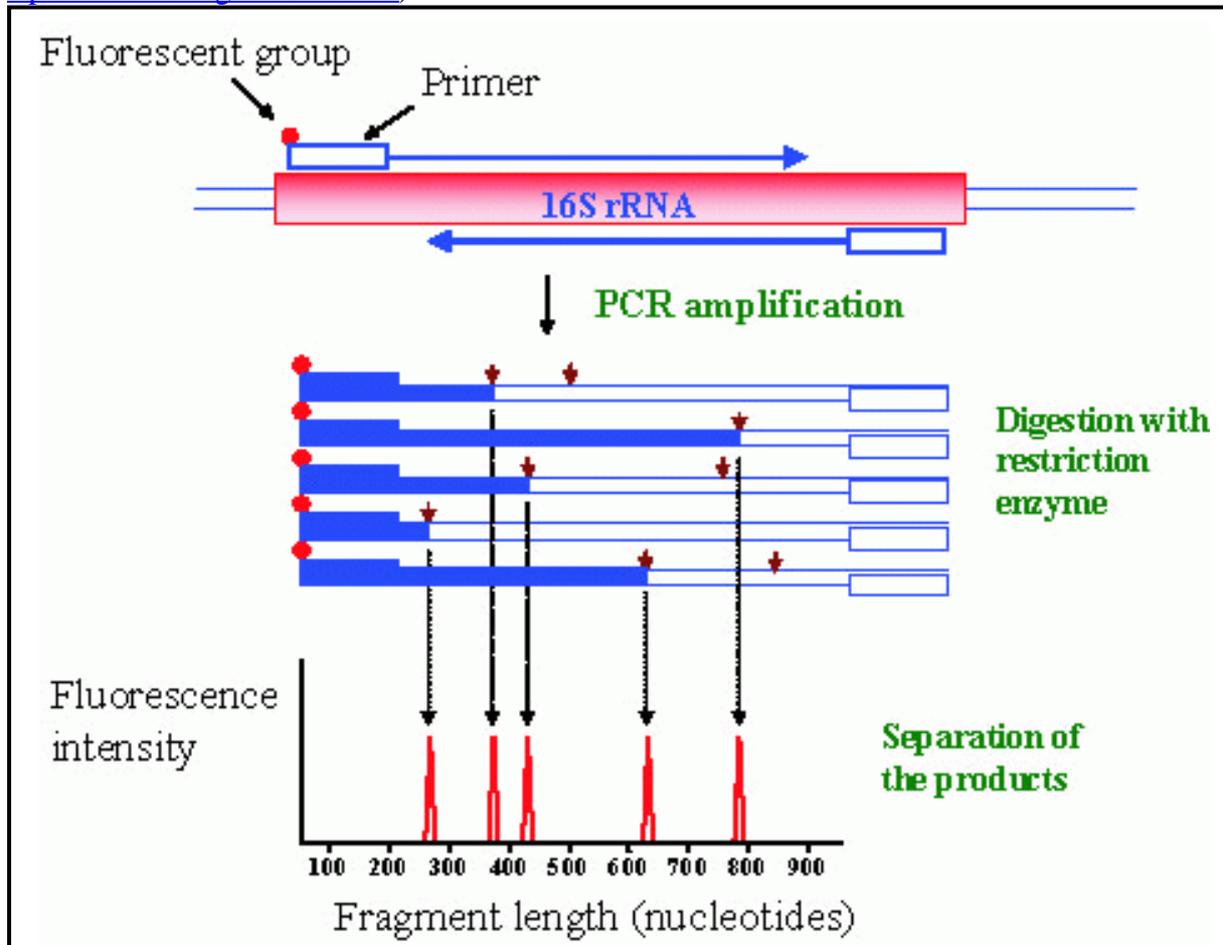
Das nach dem Restriktionsverdau der PCR-Produkte erhaltene Fragmentgemisch wird mit einem hochauflösenden DNA-Kapillarsequencer getrennt. Nur die fluoreszenzmarkierten Fragmente werden detektiert, wobei die Peakhöhe und die Fläche unter dem Peak des jeweiligen Fragments den relativen Anteil am gesamten PCR-Produkt widerspiegeln (halbquantitatives Verfahren).

3.5 Auswertung der Fragmentmuster

Der Vergleich der Fragmentprofile der einzelnen Bodenproben erfolgt über Ähnlichkeitsanalysen. Der Bray-Curtis-Koeffizient, der sowohl die Fragmentlängen als auch

die Höhe bzw. Fläche der Peaks einbezieht, ist ein geeignetes Maß für die nachfolgende Anwendung verschiedener multivariater Verfahren.

Abbildung 1: Schema zur T-RFLP-Methode (Quelle: <http://t-rfpred.sourceforge.net/method>)



3.6 Weitere Verwendung der Ergebnisse von T-RFLP-Analysen

Für die nähere Untersuchung des Mikroorganismenspektrums an ausgewählten besonders typischen oder anderweitig interessierenden Proben gibt es u. a. folgende Möglichkeiten:

- Klonieren von PCR-Produkten in Bakterien, evtl. anschließender Einsatz der T-RFLP-Technik, DNA-Sequenzierung vorrangig bei den Klonen, die dominierende Peaks verursachen, um diese Arten durch Vergleiche der Sequenzen mit Datenbanken zu identifizieren
- Einsatz von traditionellen Kulturverfahren zur weiteren Charakterisierung

Auch ohne das Artenspektrum aller Proben im Einzelnen genau zu kennen, können über den Einsatz von Statistik und multivariaten Verfahren Assoziationen von typischen Mikroorganismenprofilen mit anderen Faktoren des entsprechenden Probenentnahmepunktes der BZE II (Bestandes- und Bodenparameter aus der BZE-Datenbank) hergestellt werden. Das Ergebnis könnten typische Mikroorganismen-Gemeinschaften sein, die z. B. für bestimmte Waldgesellschaften repräsentativ sind, oder die unter bestimmten Umweltbedingungen auftreten und Indikatorfunktion für bestimmte Prozesse haben.

4. Ziel der Pilotstudie

In einer Pilotstudie sollen zunächst an einem begrenzten Probenumfang Untersuchungen durchgeführt werden, um methodische Grundsatzfragen zu klären. Dies sind im Einzelnen:

- Test der Eignung von verschieden behandelten Bodenproben: frisch, gefroren, getrocknet
- Reproduzierbare DNA-Extraktion: Test verschiedener kommerzieller Extraktionskits und konventioneller Methoden und Reinigungsverfahren auf ihre Eignung speziell für Waldböden
- Etablierung der T-RFLP-Methode zur Erstellung von Fingerprints für drei große taxonomische Gruppen (Pilze, Bakterien, Archaeen)
- Methodische Kontrollen durch die Einbeziehung von Reinkulturen von Pilzen und Bakterien

5. Durchführung und Ergebnisse der Pilotstudie

5.1 Entnahme von Bodenproben, Vorbehandlung und Lagerung

Für die Pilotstudie wurden zwei Waldböden aus der näheren Umgebung von Waldsieversdorf getestet, um Repräsentanten für Nadelwald- und Laubwaldböden zu erfassen.

Entnahme der Mineralbodenproben am 02.08.2007 (ohne organische Auflage, Schicht 0 – 10 cm)

- Probe NW (Nadelwald): Bestand mit ca. 50-jährigen Kiefern, Bodenvegetation: Farn, Brombeere, Sauerklee
- Probe LW (Laubwald): Bestand Hainbuche, keine Bodenvegetation

Die Proben wurden mit 2 mm Maschenweite gesiebt und frisch verarbeitet oder getrocknet bei 40 Grad oder eingefroren bei -80 Grad.

5.2 Referenzproben (Reinkulturen von Pilzen und Bakterien)

Aus vorhandenen Reinkulturen von Pilzen und Bakterien des Instituts für Forstgenetik (Pilze: I. Zaspel, Bakterien: K. Ulrich) wurde nach Standardmethoden DNA extrahiert (Tab. 1). Für Archaeen standen keine Referenzproben zur Verfügung.

Tabelle 1: Als Referenzproben verwendete Reinkulturen von Pilzen und Bakterien

Taxonomische Gruppe	Art (Stamm)	Abkürzung
Pilze	<i>Ophiostoma querci</i> (Stamm G1)	ID61
Pilze	<i>Ophiostoma querci</i> (Stamm G2)	ID62
Pilze	<i>Aposphaeria sp.</i> (Stamm U Rehhausen)	ID63
Pilze	<i>Phoma macrostoma</i> (Stamm Sch3)	ID65
Pilze	<i>Botryosphaeria quercuum</i> (DSM 3486)	ID78
Bakterien	<i>Paenibacillus sp.</i> (Stamm 22)	Pb
Bakterien	<i>Pseudomonas lutea</i> (Stamm 32, Brauna 06)	Ps

5.3 Extraktion der DNA aus Bodenproben mit Extraktionskits oder mit anderen zu testenden Methoden

Für die DNA-Extraktion aus Bodenproben stehen mehrere kommerzielle Kits von verschiedenen Herstellerfirmen zur Verfügung, die speziell darauf abgestimmt sind, die bei DNA-Analysen störenden Huminsäuren zu entfernen.

Kit 1: PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc.)

Kit 2: SoilMaster™ DNA Extraction Kit (Biozym)

Kit 3: FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)

Außerdem wurden drei weitere Extraktionsmethoden getestet: zwei für Bodenproben (Henckel et al. 1999; Graff 2005), und eine für Eichenblätter bewährte Methode (Dumolin et al. 1995). Anschließend erfolgte teilweise eine Reinigung der DNA-Extrakte mit einem kommerziellen Reinigungskit (PowerClean DNA Clean-Up Kit der Fa. Mo Bio Laboratories Inc.) oder mit selbst hergestellten PVPP-Säulen (nach Henckel 2000).

5.4 Prüfen der DNA-Qualität und -Quantität mit Agarosegel-Elektrophorese und mit photometrischer Bestimmung

In der Versuchsserie 1 wurden die drei kommerziellen Kits zur DNA-Extraktion aus Bodenproben miteinander verglichen. Obwohl die photometrisch bestimmten DNA-Ausbeuten (Tab. 2) auf jeweils 100 mg getrockneten Boden normiert wurden, zeigen sich große Unterschiede sowohl zwischen frischen, gefrorenen und getrockneten Proben als auch zwischen den einzelnen Extraktionskits.

Tabelle 2: DNA-Ausbeute in μg , bezogen auf 100 mg getrockneten Boden (Mittelwerte von je 2 unabhängigen Extraktionen der Serie 1)

Extraktion	Kit1	Kit2	Kit3
NW frisch	2387	10530	1626
LW frisch	2430	19800	1890
NW getrocknet	240	525	1590
LW getrocknet	660	750	1785
NW gefroren	164	3510	1597
LW gefroren	840	2700	3623

Um die DNA-Qualität zu überprüfen, wurden Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt (Abb. 2). Hier wird sichtbar, dass nur mit den Kit 1 und Kit 3 DNA extrahiert wurde. Bei Kit 2 sind kaum DNA-Banden sichtbar. Die hohen photometrisch bestimmten Werte werden offensichtlich von Huminsäuren verursacht, die bei ähnlichen Wellenlängen wie DNA absorbieren und die nicht genügend aus den DNA-Extrakten entfernt wurden (siehe auch Zipper et al. 2003). Die DNA-Konzentration beträgt nach Extraktion mit Kit 1 ca. $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und bei Extraktion mit Kit 3 ca. $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (geschätzt aus der Intensität der Banden anhand des Standards).

Ob die Reinheit der DNA-Extrakte für den vorgesehenen Verwendungszweck ausreichend ist, kann mit der photometrischen Methode oder der Agarosegel-Elektrophorese allein noch nicht festgestellt werden. Entscheidend für die erfolgreiche Entfernung von Hemmstoffen wie Huminsäuren sind PCR-Tests. Nach einer Zwischenauswertung der Serie 1 mit einigen PCR-Tests wurden in einer zweiten Versuchsserie weitere Extraktions- und Reinigungsmethoden getestet und mit der Extraktion mit Kit 1 verglichen (Tab. 3). Die Beurteilung der DNA-Qualität und Quantität erfolgte mit Agarosegel-Elektrophoresen. Die DNA-Ausbeute bei getrockneten Proben war generell sehr gering (Beispiel Abb. 3).

Abbildung 2: Native DNA aus Bodenproben, extrahiert mit drei verschiedenen kommerziellen Kits

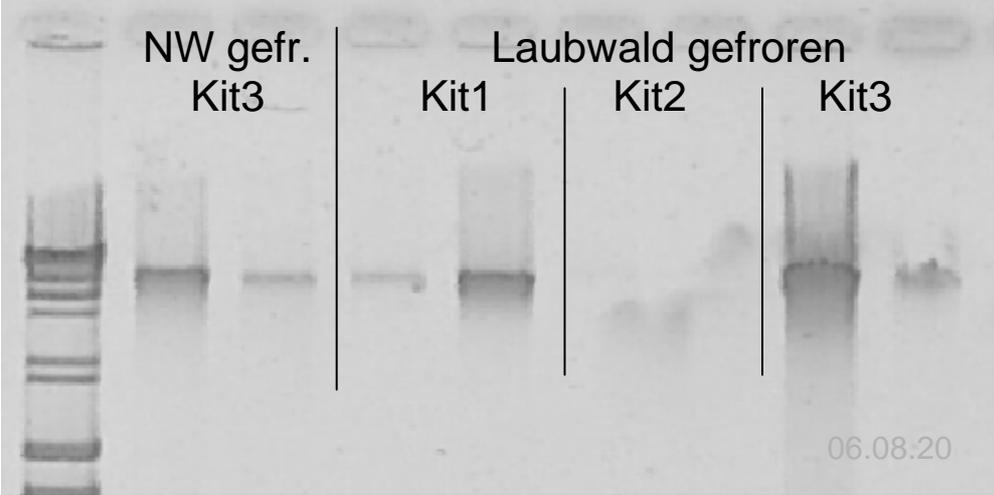
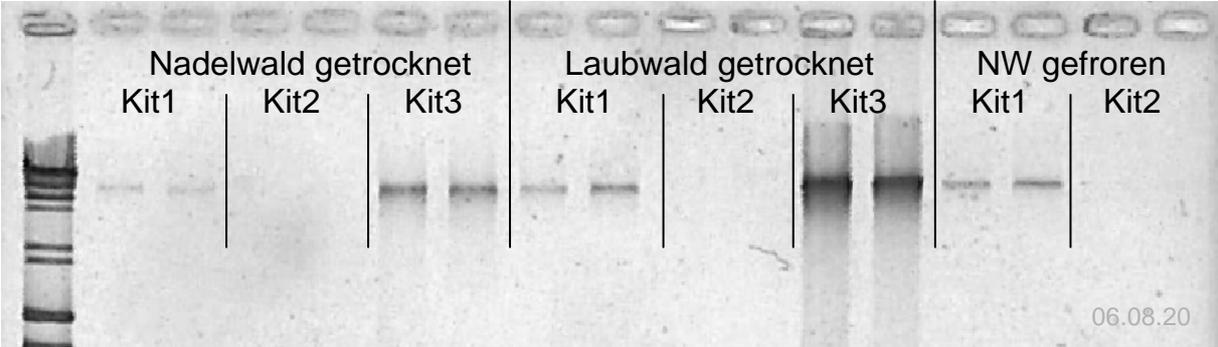
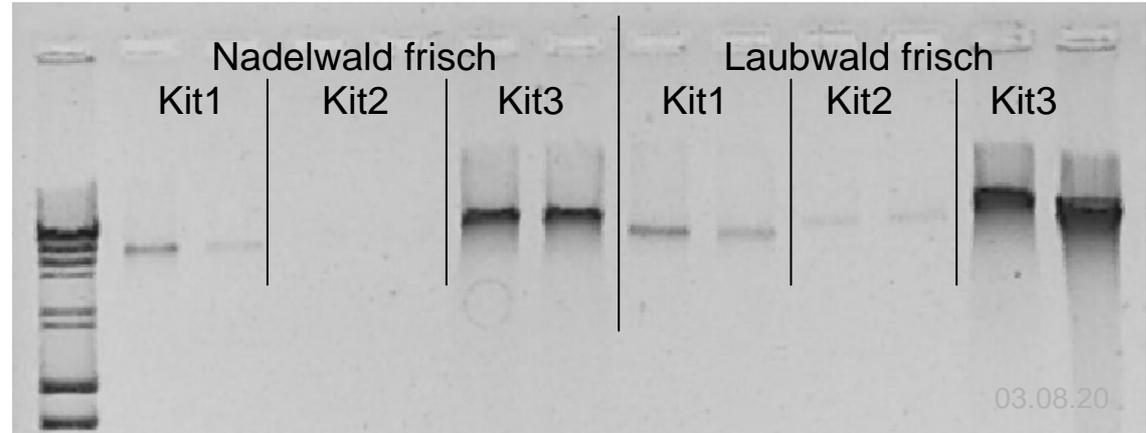
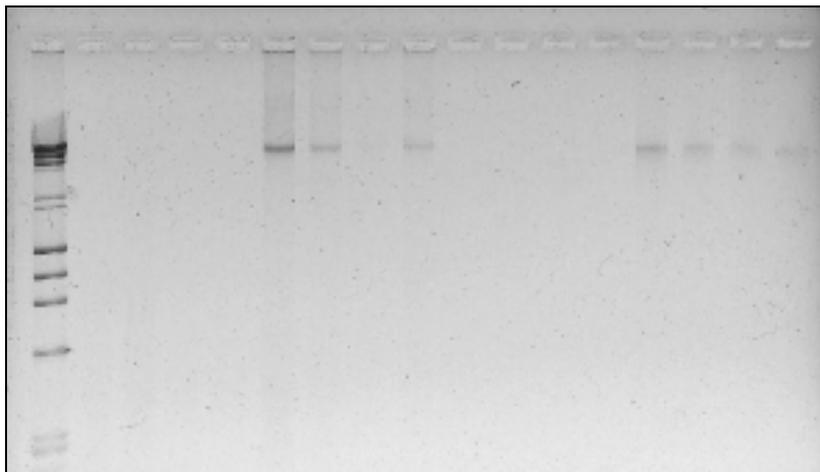


Tabelle 3: Übersicht zu verschiedenen Extraktions- und Reinigungsmethoden bei 88 Proben der Serie 2

Extraktion + Reinigung	Kit 1	Kit 1 + CleanKit	Dumolin	Dumolin + CleanKit	Dumolin + PVPP-Säule	Graff	Graff + CleanKit	Graff + PVPP-Säule	Henckel	Henckel + CleanKit	Henckel + PVPP-Säule
Material											
Laubwald (getrocknet)	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
Laubwald (getrocknet)	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82
Nadelwald (getrocknet)	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
Nadelwald (getrocknet)	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
Laubwald (eingefroren)	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
Laubwald (eingefroren)	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
Nadelwald (eingefroren)	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
Nadelwald (eingefroren)	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88

Abbildung 3: Beispiel für eine Agarosegel-Elektrophorese (Proben Nr. 65 bis 80)



5.5 Durchführung der PCR mit ausgewählten Primerpaaren

Für die drei taxonomischen Gruppen der Pilze, Bakterien und Archaeen wurde je ein Primerpaar ausgewählt, das in anderen Untersuchungen mit T-RFLPs bereits erfolgreich eingesetzt wurde (Tab. 4).

Tabelle 4: Primerpaare für 3 taxonomische Gruppen, * Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende

Taxonomische Gruppe	Amplifizierter Abschnitt	Primer forward	Sequenz 5'-3'	Primer reverse	Sequenz 5'-3'	Referenz
Pilze	ITS1+5.8S+ITS2	ITS1F*	CTTGGTC ATTTAGA GGAAGTA A	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(Dickie et al. 2002)
Bakterien	16S rRNA	8f*	AGAGTTT GATCCTG GCTCAG	926r	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	(Liu et al. 1997; Ulrich & Becker 2006)
Archaeen	16S rRNA	109f*	ACKGCTC AGTAACA CGT	915r	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	(Lueders & Friedrich 2003)

Um das Vorhandensein von PCR-Produkten zu testen, wurden wiederum Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt (Beispiele in Abb. 4 - 9). Beim Einsatz der Primer für Pilze und Bakterien entstanden PCR-Produkte mit den zu erwartenden Fragmentlängen. Bei Pilzen können mehrere Banden im Bereich von ca. 570 - 800 bp, bedingt durch die variable Struktur der DNA in diesem Bereich, entstehen. Bei Bakterien ist eine Fragmentlänge von ca. 900 bp zu erwarten. Bei der PCR mit Primern für Archaeen traten neben den erwarteten PCR-Produkten von ca. 800 bp Länge auch einige unspezifische Banden, besonders bei Pilzen, auf. Die Primer für Archaeen scheinen auch nicht immer genügend spezifisch zu sein, um sich von Bakterien abzugrenzen, da auch bei *Paenibacillus sp.* ein PCR-Produkt auftritt.

Abbildung 4: PCR mit Primern für Pilze

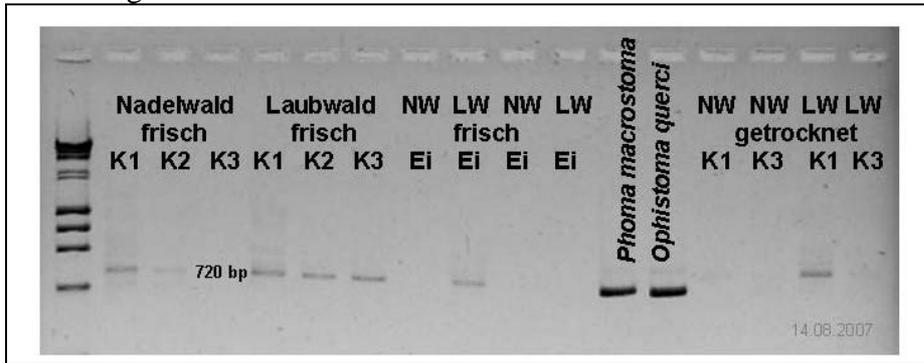


Abbildung 5: PCR mit Primern für Bakterien

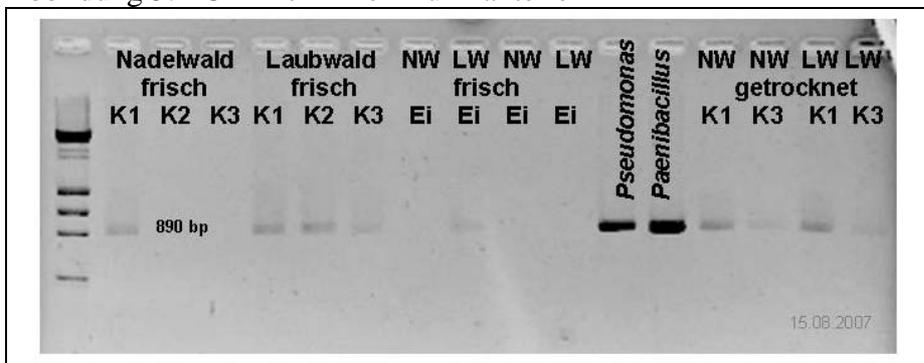


Abbildung 6: PCR mit Primern für Archaeen

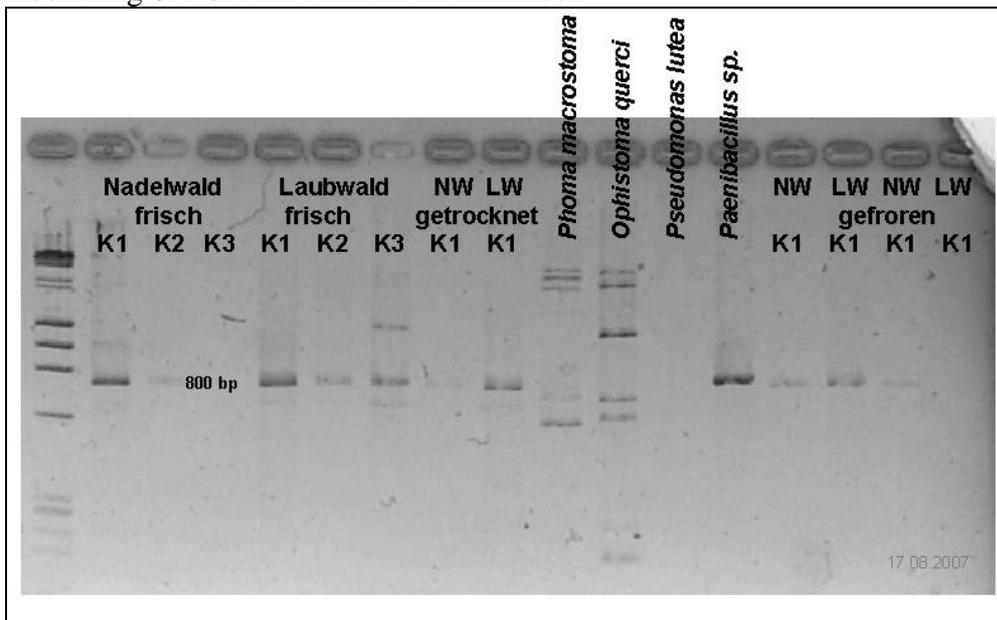


Abbildung 7: PCR mit Primern für Pilze, Proben Nr. 1, 3, 10, 11, 18, 20, 26, 27, 34, 35, 42, 43 (Serie 2)

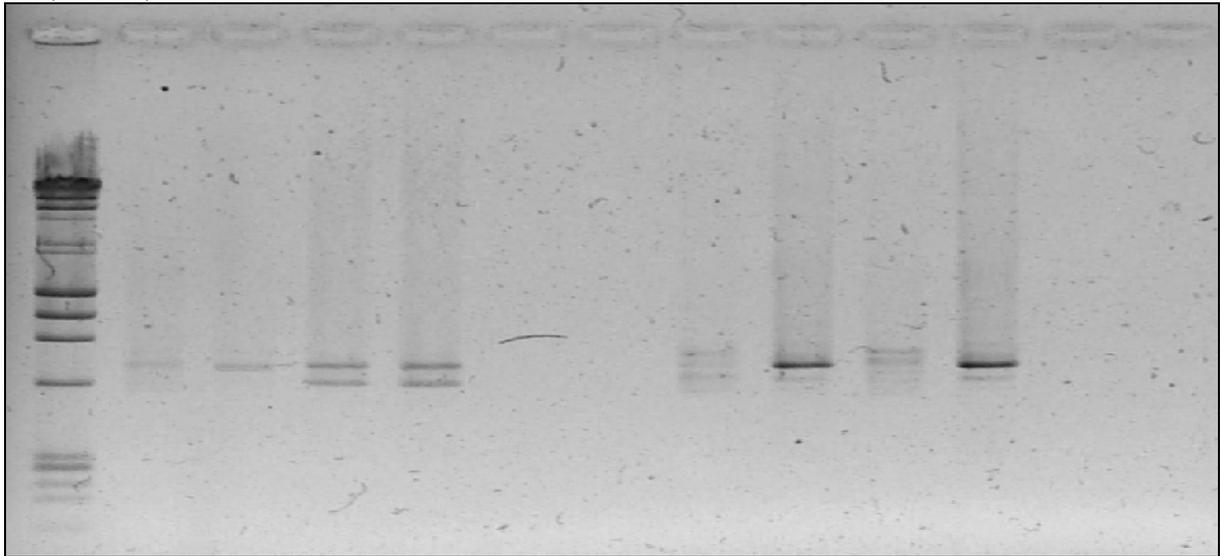


Abbildung 8: PCR mit Primern für Bakterien, Proben Nr. 37-40, 45-48, 53-56, 61-64 (Serie 2)

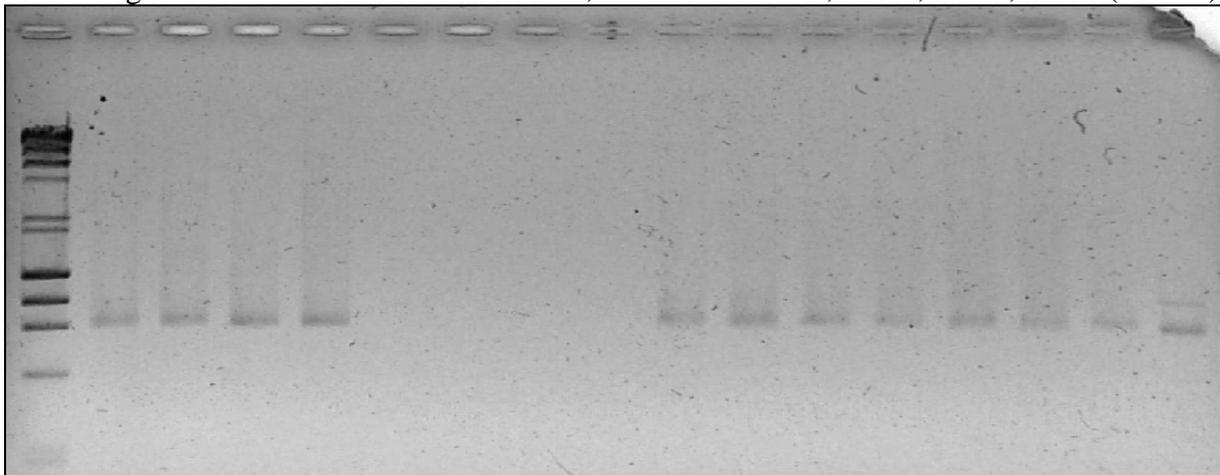


Abbildung 9: PCR mit Primern für Archaeen, Proben Nr. 5-8, 13-16, 21-24, 29-32 (Serie 2)



Von den getesteten Kits genügt nur das Kit 1 (PowerSoil™ DNA Isolation Kit der Fa. Mo Bio Laboratories Inc.) den Anforderungen. Bei den beiden anderen Kits waren die Ergebnisse unregelmäßig.

Eine DNA-Extraktion mit selbst hergestellten Pufferlösungen erfordert immer eine nachfolgende Reinigung, ohne diese wurden in keinem Fall PCR-Produkte erhalten. Die DNA-Ausbeute war bei getrockneten Bodenproben generell sehr gering, eine nachfolgende Analyse war daher wahrscheinlich aus diesem Grund nicht bei allen Proben erfolgreich.

5.6 Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen

Verwendet wurden Restriktionsenzyme mit vier Basen langen Erkennungssequenzen, bei denen sich im Mittel einer DNA-Sequenz aller 256 Basen eine Schnittstelle befindet. Bei den verwendeten PCR-Produkten von ca. 570 - 900 bp sind statistisch mehrere Schnittstellen zu erwarten. Nur das Fragment, das die Fluoreszenzmarkierung des Primers trägt, kann in der Kapillar-Elektrophorese nachgewiesen werden.

Für Pilze und Bakterien wurden die Restriktionsenzyme HinfI und HaeIII verwendet (Liu et al. 1997; Dickie et al. 2002; Ulrich & Becker 2006), für die Archaeen kam TaqI (Lueders & Friedrich 2003) zum Einsatz.

5.7 Fragmentanalyse mit einem Kapillar-DNA-Sequenzer (CEQ 8000 der Fa. Beckman Coulter)

5.7.1 T-RFLPs von Reinkulturen bei Pilzen und Bakterien

Bei artreinen Kulturen von Pilzen und Bakterien darf nach DNA-Extraktion, PCR und Restriktionsverdau nur jeweils ein markiertes DNA-Fragment entstehen. Dies diente der Kontrolle der Methodik an sich und der Überprüfung der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus. Die Länge des nachgewiesenen Fragments muss dabei mit der aufgrund der bekannten DNA-Sequenz erwarteten Länge übereinstimmen.

Das erwartete Ergebnis wurde auch in den meisten Fällen festgestellt. Zum Beispiel entspricht das Fragment von 194 bp Länge (Abb. 10) dem erwarteten Ergebnis nach dem Restriktionsverdau des PCR-Produkts des Pilzes *Ophistoma quercii* mit HaeIII, wie es aus der DNA-Sequenz abgeleitet werden kann (Abb. 11).

Abbildung 10: Peak bei 194 bp von *Ophistoma quercii*

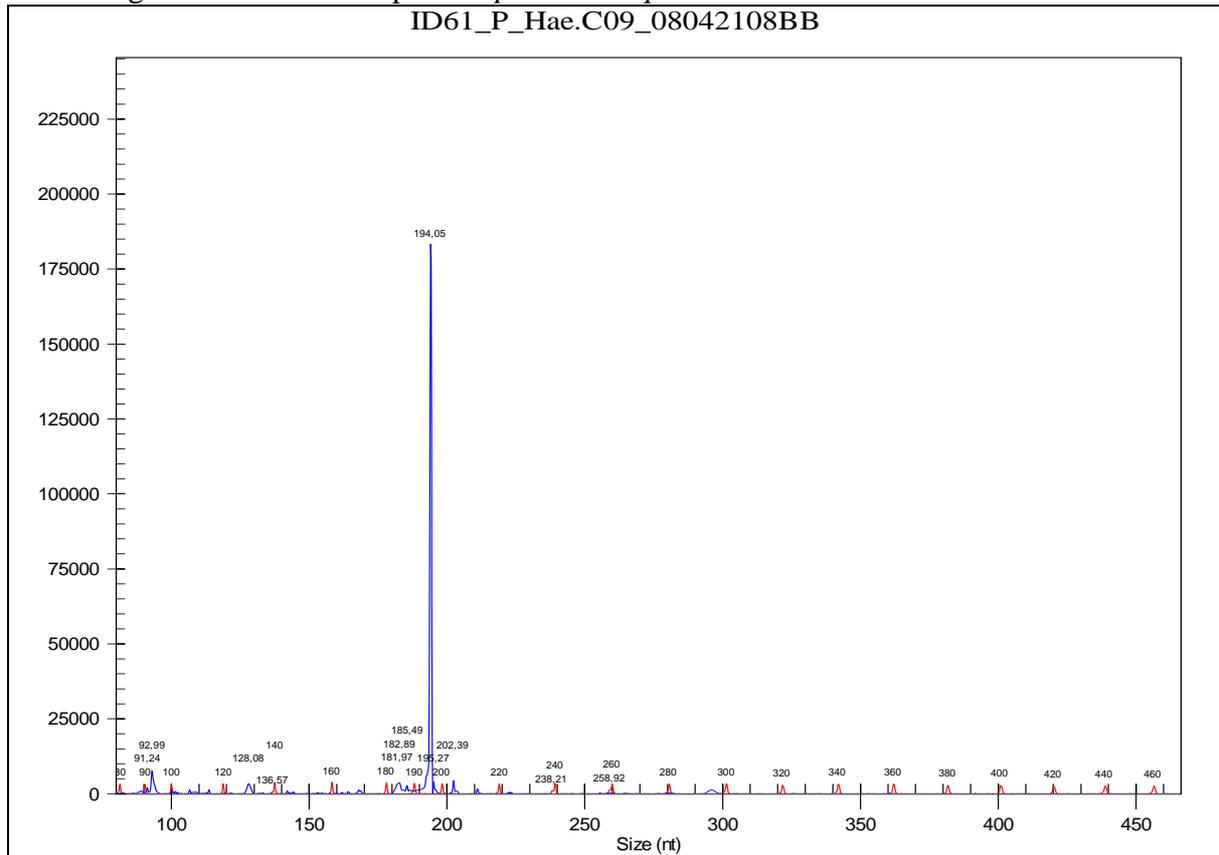


Abbildung 11: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz von *Ophistoma quercii* (kursiv: Primersequenzen, unterstrichen: HaeIII-Schnittstellen, fett: nachgewiesenes Fragment)

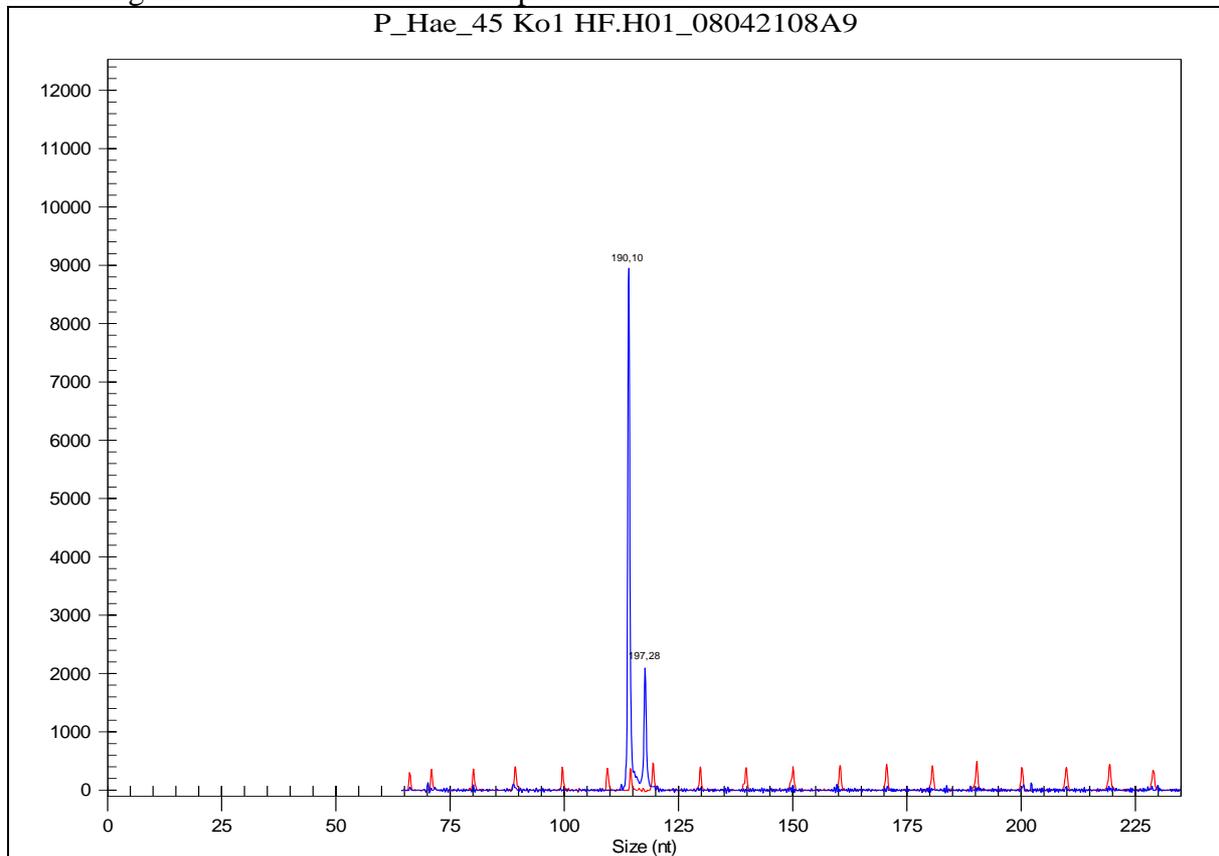
```
>EMBL|AJ293883|AJ293883 Ophistoma quercii
CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAANNAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGG
ATCATTACASAGTTTTTAACTCCCAACCTTGCGAACCGTACCCCGTTCTGTTCTCGTTGCT
TCTGGCGGGAGGGGAGGGGCGCGTCCTTCGGGGCGTGCCCTCTCTCTCCAGGTCCTTCGGG
GCGCCCGCCAGCGGCGGCCGCGAGCCGCCTGAACTTTTTATAAACAGTAACGAACCGTCTG
AGAAACAACAACAAAACAGCCAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCCCCCCT
CAGCATAACCCTTTGGGTGCGCTGGCGTTGGGGCTCCTCCGCCCTCTGTGGCGGCAGGGCCCT
CAAAACCAGTGGCGGGCCCGTCTGGTTGGCTCCGAGCGCAGTACCGAACGCAAGTTCTCTCT
CTCGCTCTGCAGCCCCGGTTCGGTGCAGCCGTCAAACCGCGCAGGAGGCTTCTGCTTGCAG
AACCGCCTCGCAYTTTTTACAAGGKTGACCTCGGATCARGTAGGATTACCCGCTGAACTTAA.
..GCATATCAATAAGCGGAGGA
```

In seltenen Ausnahmen kann es dagegen vorkommen, dass sich zwei Schnittstellen eines Restriktionsenzym in sehr enger Nachbarschaft befinden. Dann kann das Enzym offensichtlich auf Grund der sterischen Hinderung nicht an beiden Erkennungssequenzen gleichzeitig schneiden, sondern nur an einer der beiden Stellen.

Beim Pilz *Phoma macrostoma* kommen zwei Schnittstellen von HaeIII in unmittelbarer Nachbarschaft im Abstand von sieben Basen vor (Abb. 13). Das führte zu zwei Fragmenten mit Längen von 190 und 197 bp Länge (Abb. 12). Bei anderen parallel untersuchten Proben gab es keinen Hinweis auf einen unvollständigen Restriktionsverdau.

Solche Ausnahmen führen dazu, dass nicht immer ausgeschlossen werden kann, dass von einer Art zwei Peaks verursacht werden, obwohl theoretisch davon ausgegangen wird, dass bei T-RFLP-Analysen je Art (bei ausreichendem Anteil an der Gesamtprobe) ein Peak vorkommt. Ähnliche Beobachtungen mit mehrfachen Peaks von T-RFLP-Mustern bei eng benachbarten Restriktionsschnittstellen wurden auch von Avis et al. (2000) gemacht.

Abbildung 12: Peaks bei 190 und 197 bp von *Phoma macrostoma*



Für die weitere Beurteilung der beiden in Frage kommenden Methoden können später Kriterien wie die Stabilität der DNA bei längerer Lagerung verglichen werden.

Abbildung 14: Wiederholte PCR mit anschließendem Restriktionsverdau bei Probe 30 (Laubwald eingefroren, Extraktion nach Dumolin + CleanKit, Analysen vom 10.03.2008, 09.05.2008 und 13.05.2008)

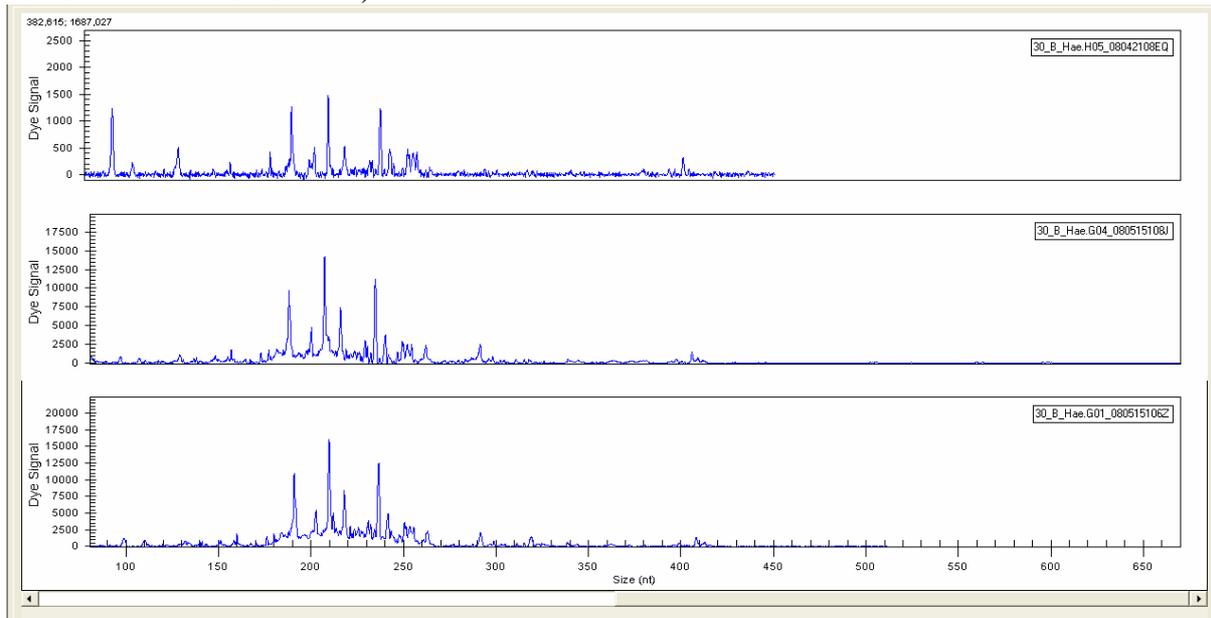


Abbildung 15: T-RFLPs der Pilze, Bodenproben eingefroren, Extraktion mit Kit 1, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 5 und 6), Nadelwald (Nr. 7 und 8 aus Serie 2)

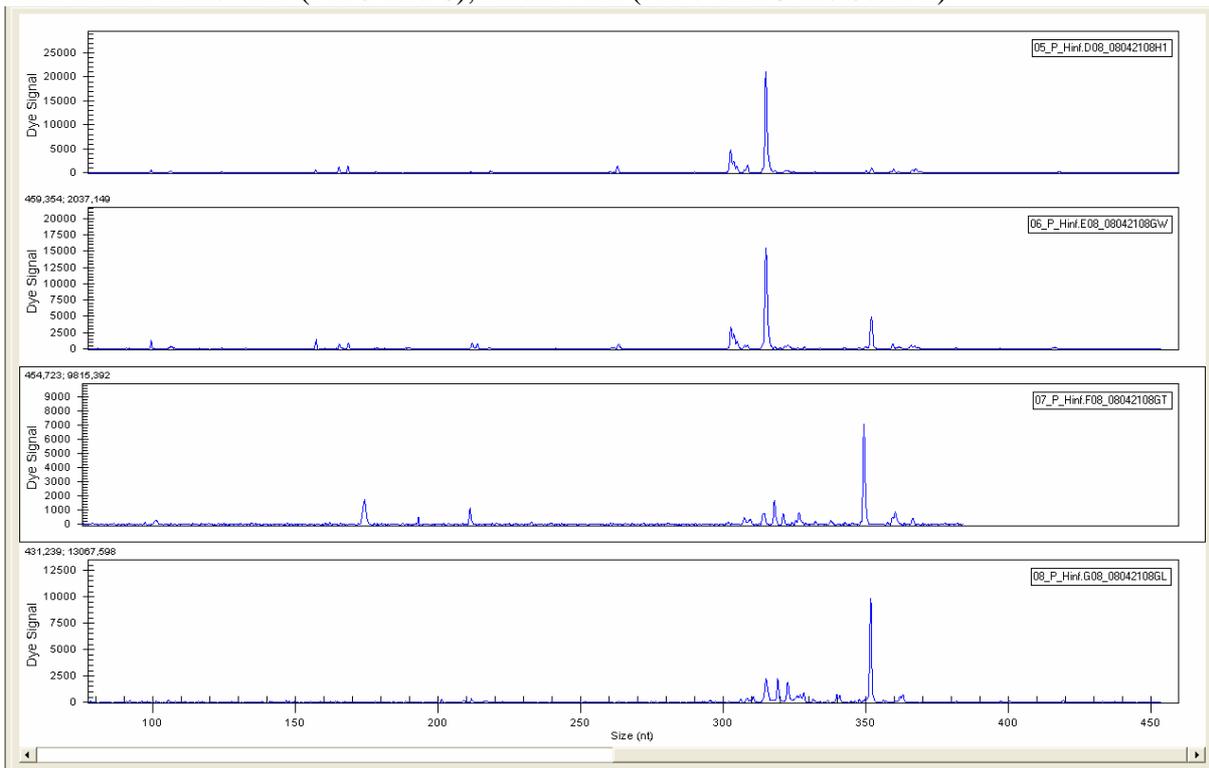


Abbildung 16: T-RFLPs der Pilze, Bodenproben eingefroren, Extraktion nach Dumolin + CleanKit, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 29 und 30), Nadelwald (Nr. 31 und 32 aus Serie 2)

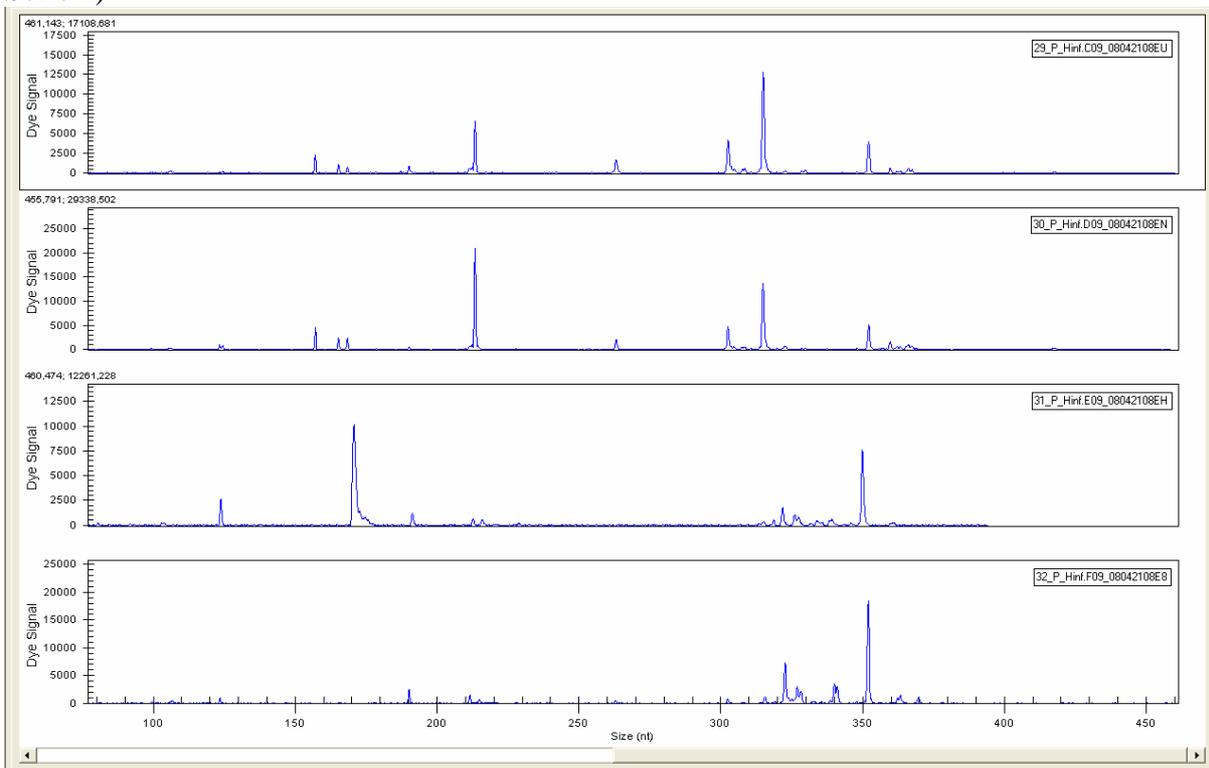


Abbildung 17: T-RFLPs der Bakterien, Bodenproben eingefroren, Extraktion mit Kit 1, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 5 und 6), Nadelwald (Nr. 7 und 8 aus Serie 2)

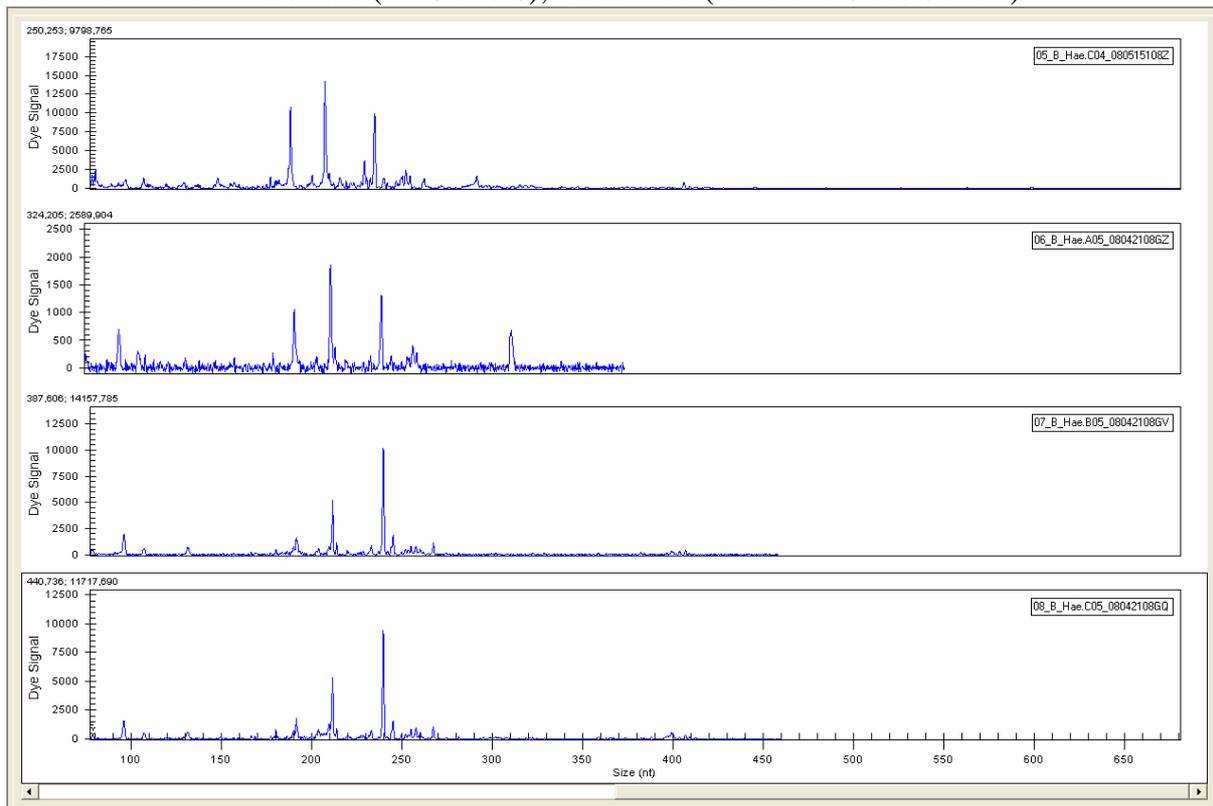


Abbildung 18: T-RFLPs der Bakterien, Bodenproben eingefroren, Extraktion nach Dumolin + CleanKit, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 29 und 30), Nadelwald (Nr. 31 und 32 aus Serie 2)

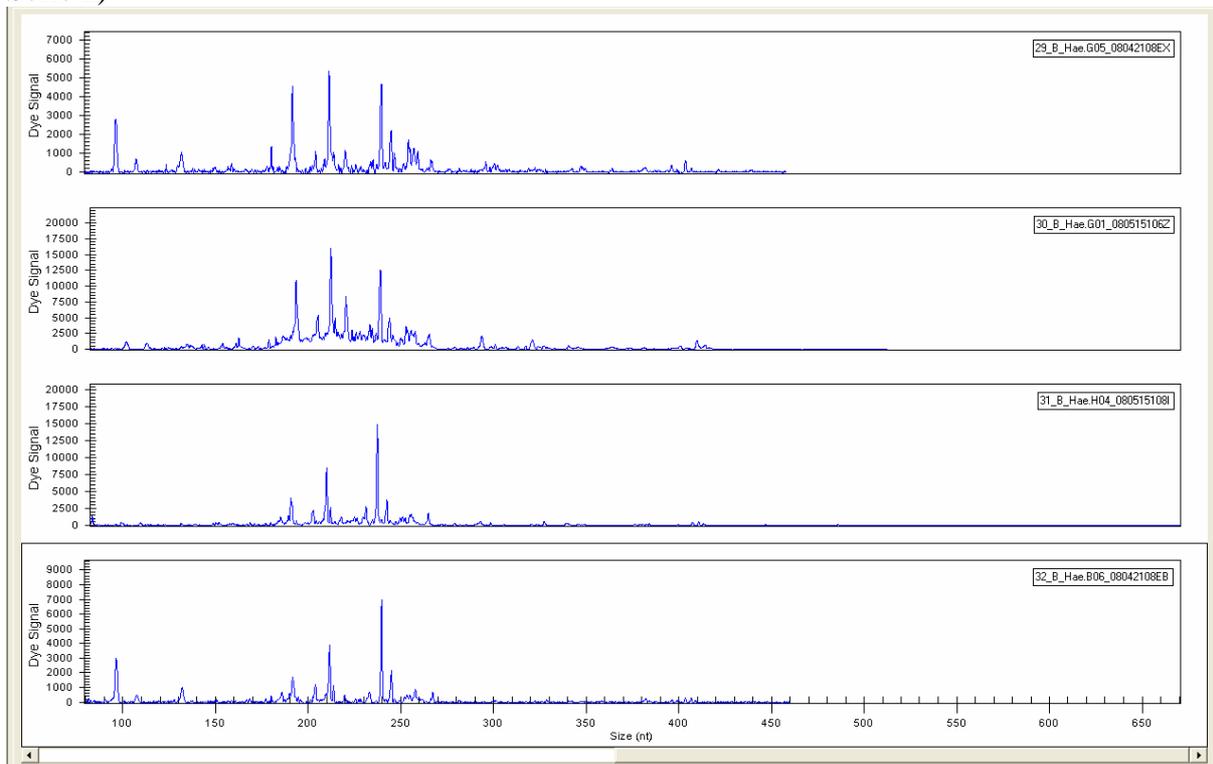


Abbildung 19: T-RFLPs der Archaeen, Bodenproben eingefroren, Extraktion nach Dumolin + PVPP, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 37 und 38), Nadelwald (Nr. 39 und 40 aus Serie 2)

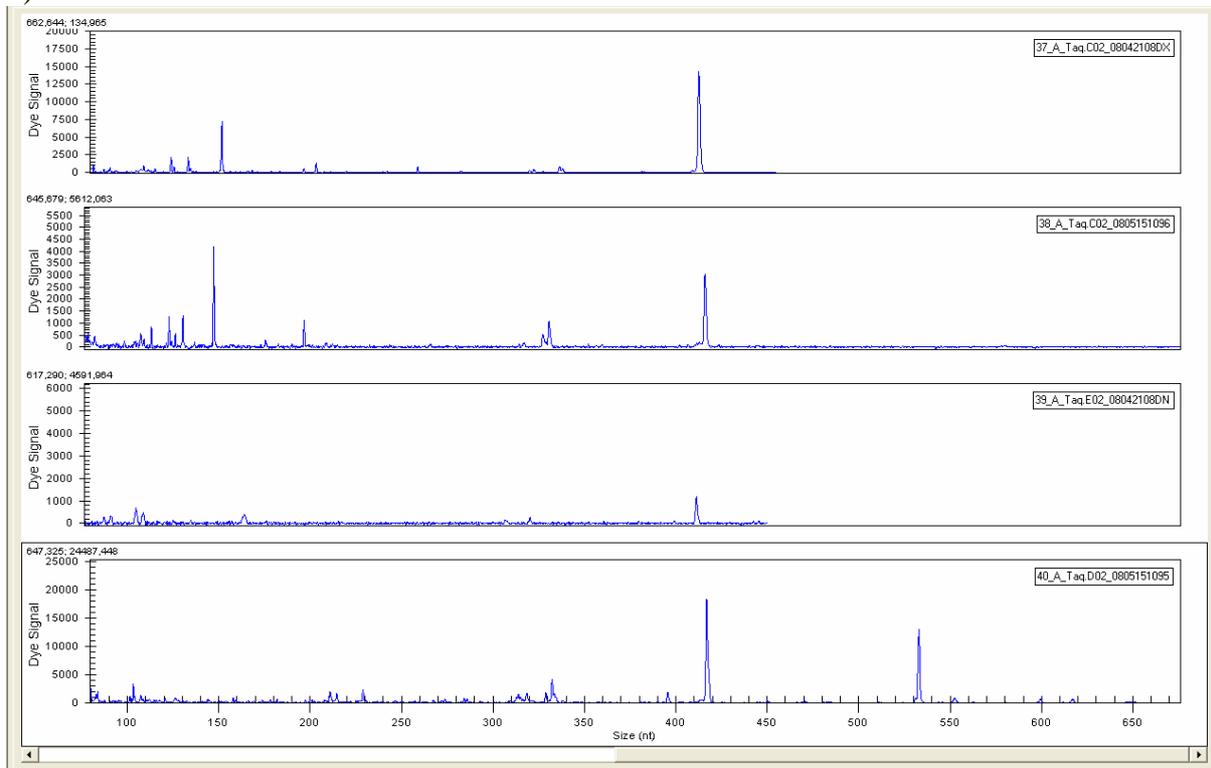


Abbildung 20: T-RFLPs der Archaeen, Bodenproben eingefroren, Extraktion nach Henckel + CleanKit, von oben nach unten: Laubwald (Nr. 77 und 78), Nadelwald (Nr. 79 und 80 aus Serie 2)

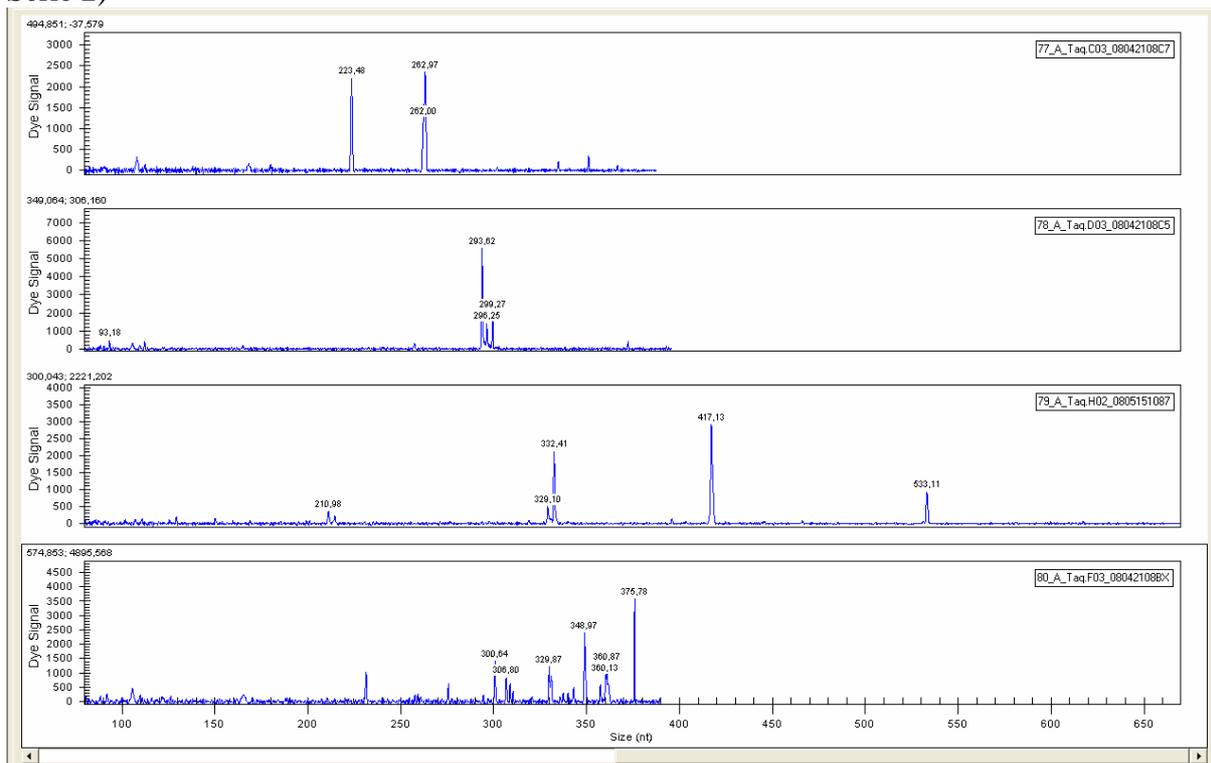


Abbildung 21: T-RFLPs der Pilze, Bodenprobe Laubwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Henckel + CleanKit, = DNA-Extrakte 6, 29, 37 und 78 aus Serie 2)

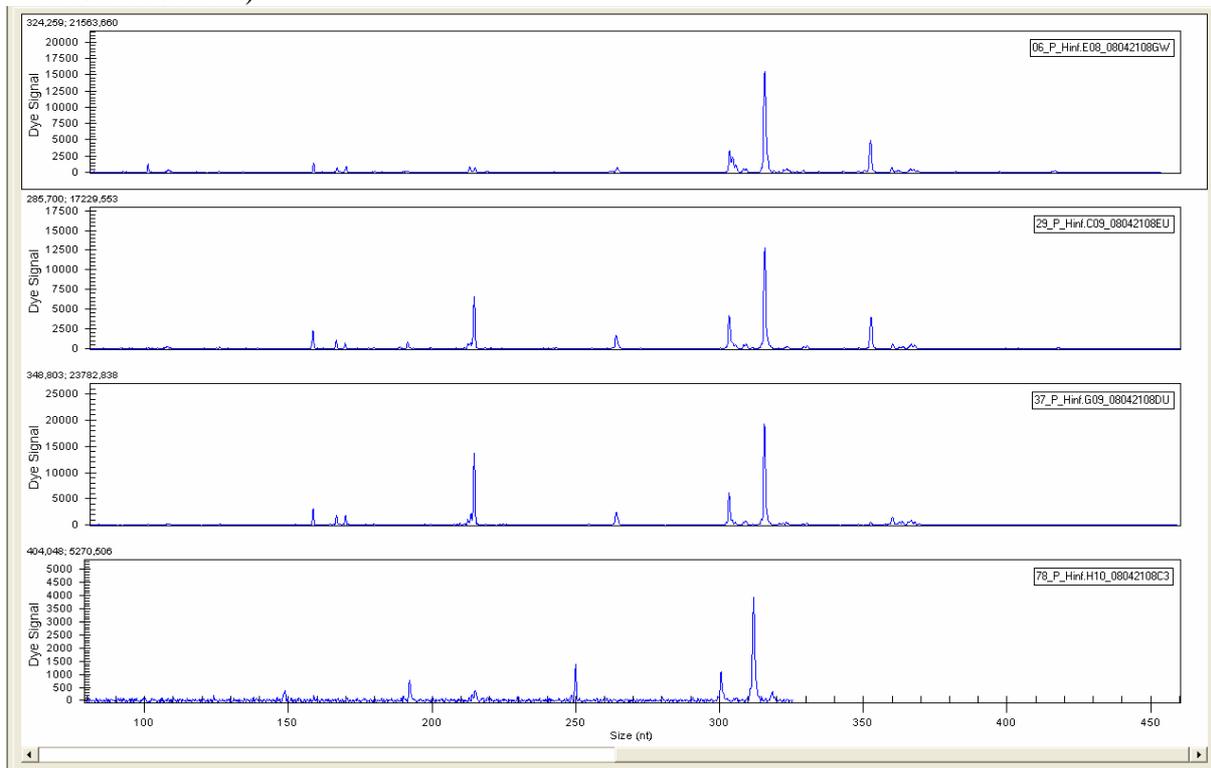


Abbildung 22: T-RFLPs der Pilze, Bodenprobe Nadelwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Henckel + CleanKit, = DNA-Extrakte 7, 32, 39 und 80 aus Serie 2)

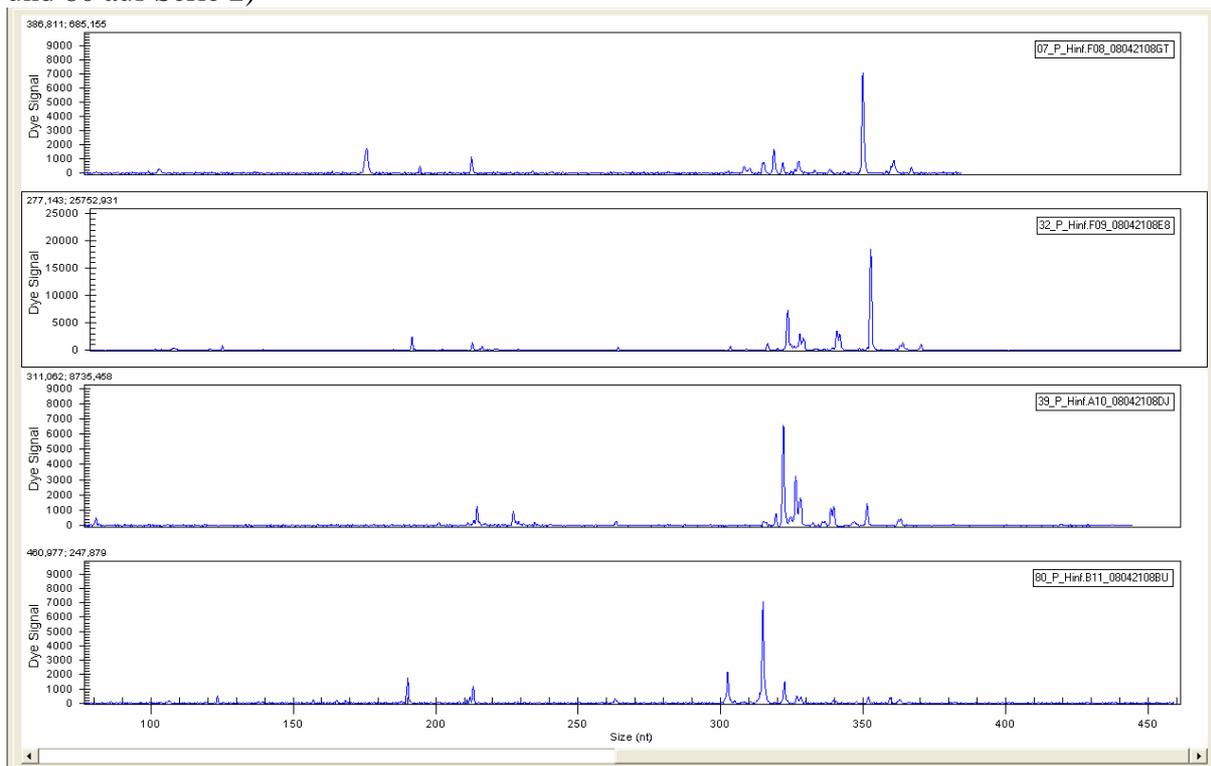


Abbildung 23: T-RFLPs der Bakterien, Bodenprobe Laubwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Graff + CleanKit, = DNA-Extrakte 5, 29, 38 und 54 aus Serie 2)

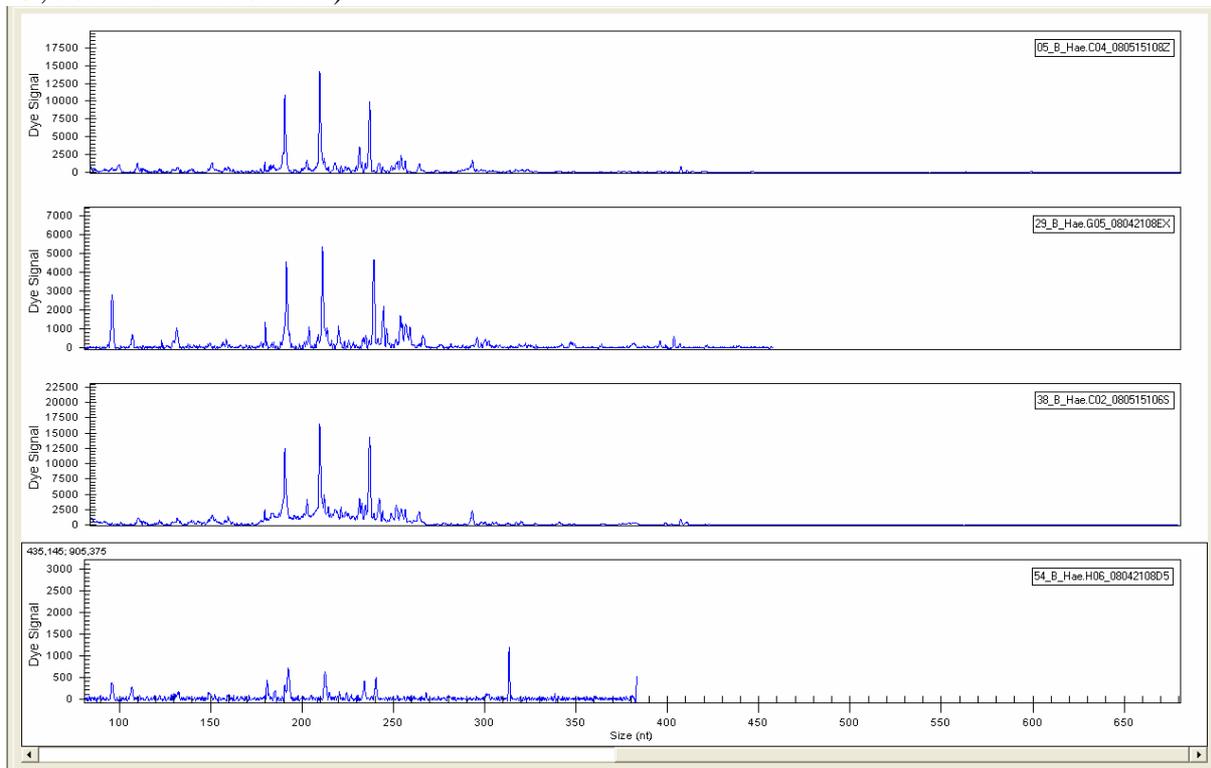


Abbildung 24: T-RFLPs der Bakterien, Bodenprobe Nadelwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Graff + CleanKit, = DNA-Extrakte 7, 32, 40 und 55 aus Serie 2)

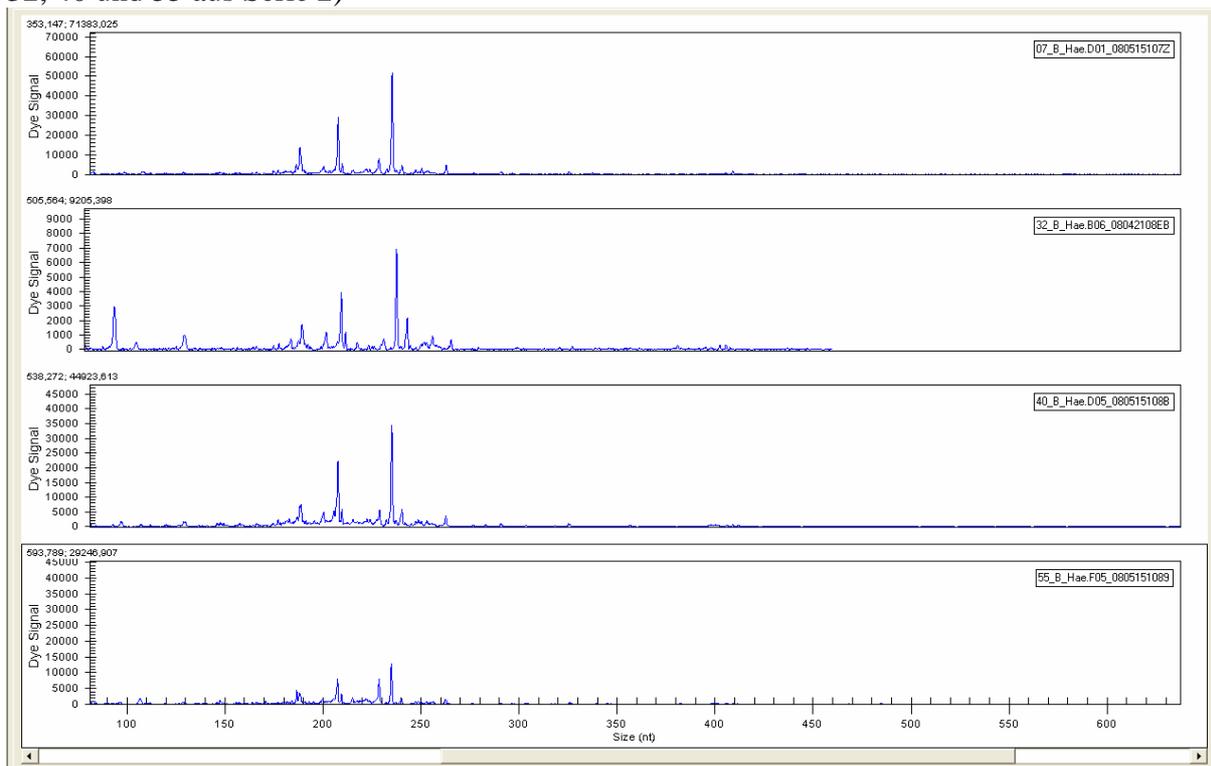


Abbildung 25: T-RFLPs der Archaeen, Bodenprobe Laubwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Henckel + CleanKit, = DNA-Extrakte 5, 30, 38 und 77 aus Serie 2)

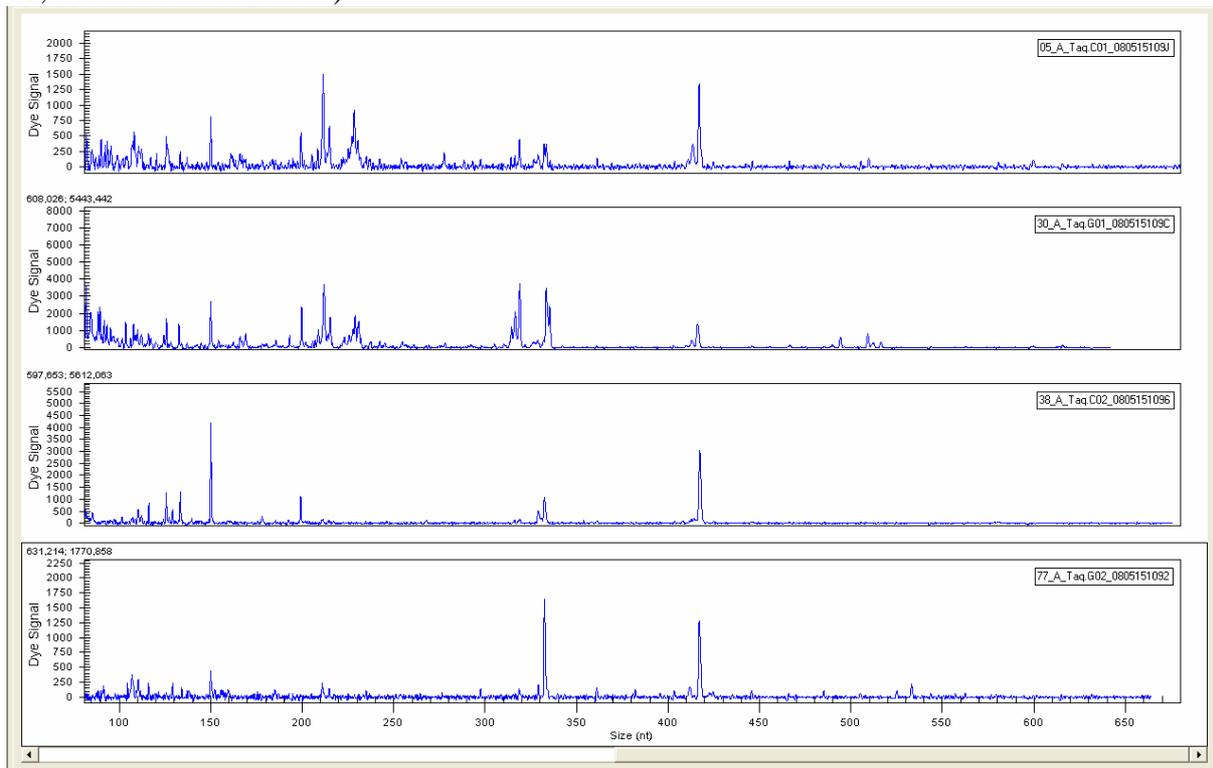
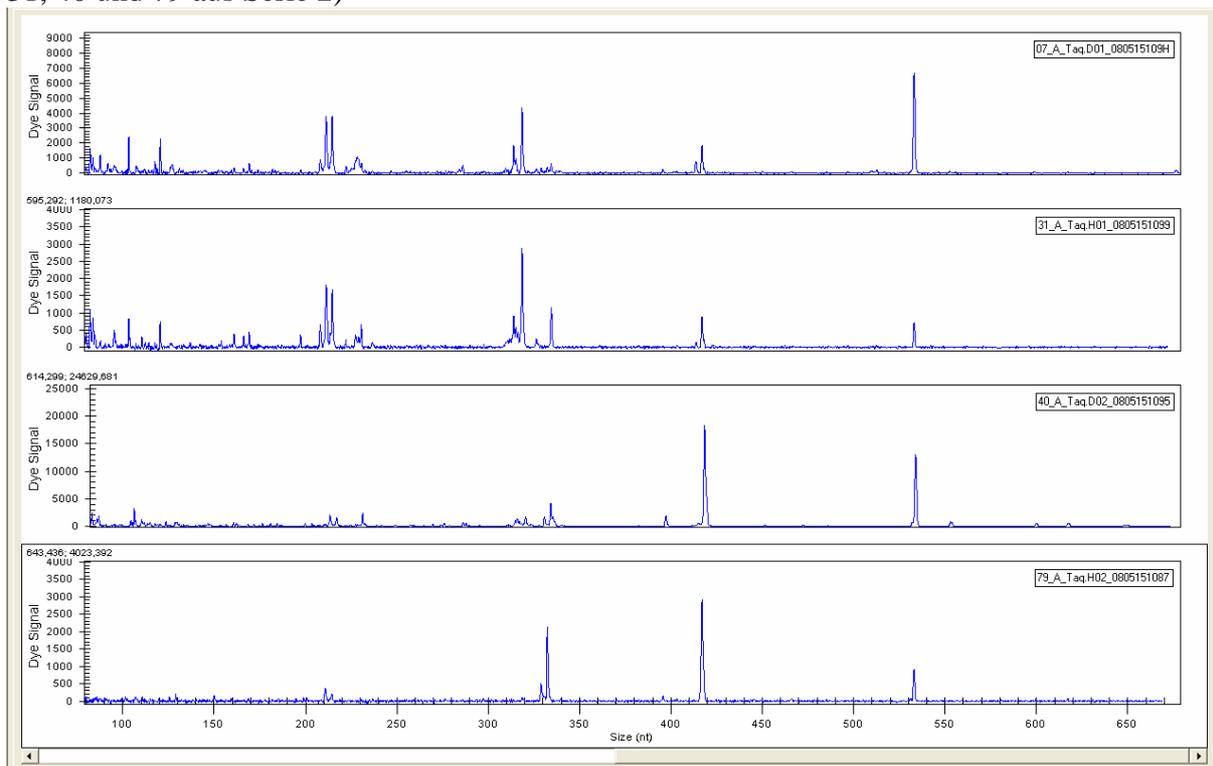


Abbildung 26: T-RFLPs der Archaeen, Bodenprobe Nadelwald eingefroren (von oben nach unten: Kit1, Dumolin + CleanKit, Dumolin + PVPP, Henckel + CleanKit, = DNA-Extrakte 7, 31, 40 und 79 aus Serie 2)



5.8 Datenauswertung und Vergleiche zwischen Proben

Die Software des Kapillarsequenzers (CEQ 8000 Genetic Analysis System) ermittelt die Fragmentlängen der einzelnen Peaks im Vergleich zum Standard für jede Probe (Beispiele in Abbildung 27 und 28). Die zugehörige Fragmentliste (Abb. 29) kann für alle Proben als eine Datei aus dem Softwareprogramm des CEQ 8000 exportiert werden und steht dann für weitere Auswertungen zur Verfügung.

Abbildung 27: T-RFLP-Muster der Bakterien aus Laubwald (Probe 5)

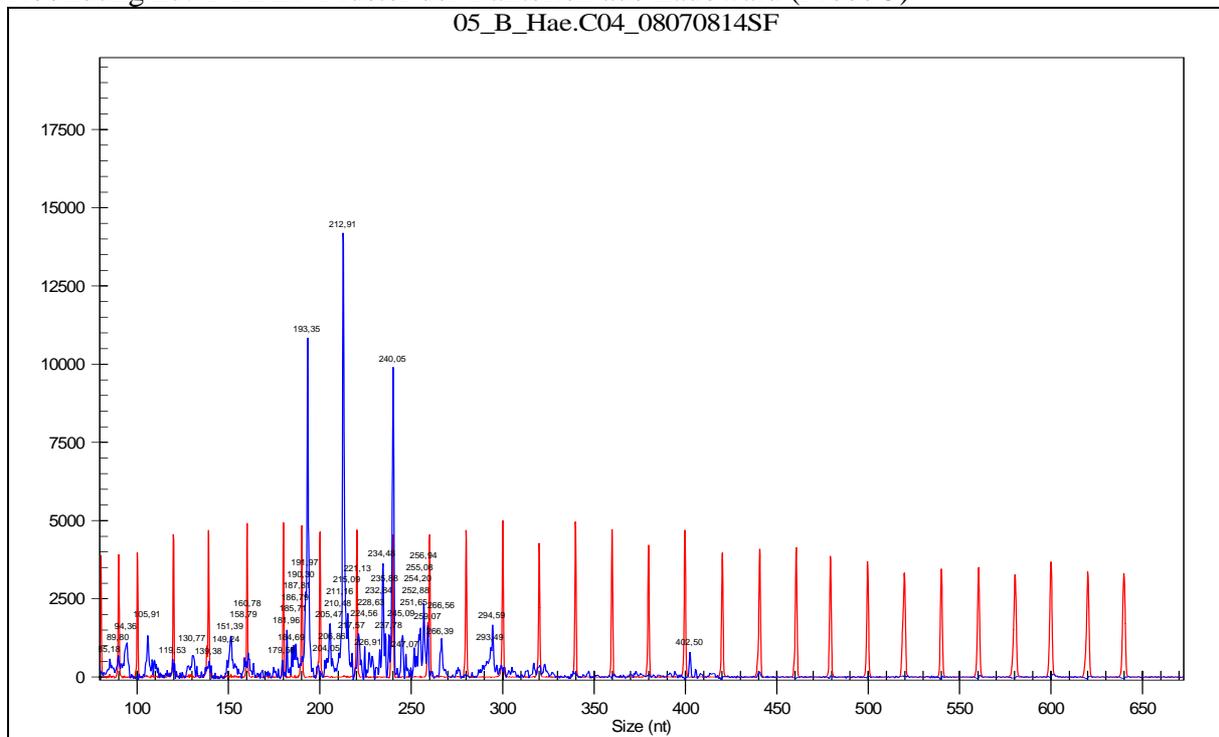


Abbildung 28: T-RFLP-Muster der Bakterien aus Nadelwald (Probe 31)

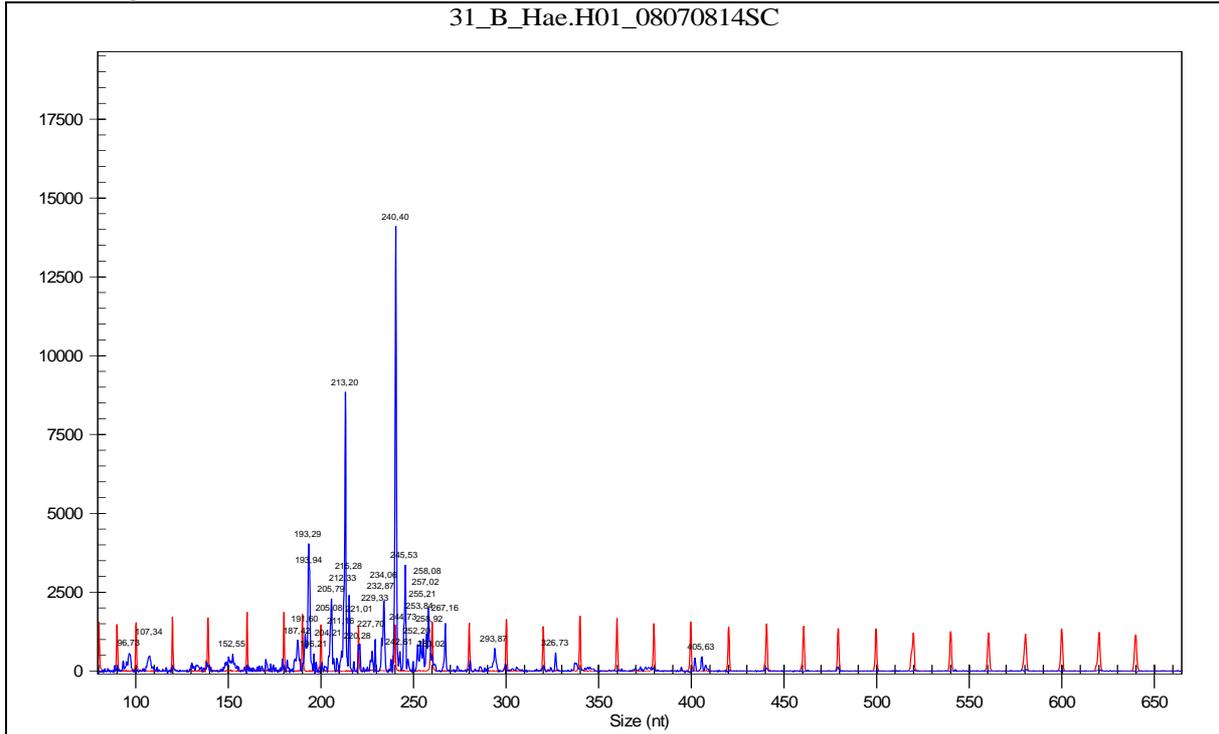


Abbildung 29: Fragmentliste der Probe 5 (T-RFLPs der Bakterien)

Fragments:											
	RII	dye	est frag size (nt)	pk height (rfu)	pk area (rfuxmm)	rel frag amount	num pks in clstr	pk clstr ht order	clstr area (rfuxmm)	pk width (mm)	pk eff
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	56,25	4350	5889	0,142	1	1	5889,21	2,21	295,259
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	57,92	4404	5883	0,141	1	1	5882,721	2,19	299,092
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	60,51	1078	1536	0,037	1	1	1535,643	2,37	255,892
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	62,57	1207	1995	0,048	1	1	1994,681	2,76	188,375
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	65,59	4875	4092	0,098	1	1	4091,532	1,35	792,059
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	67,35	1130	1585	0,038	1	1	1585,191	2,35	260,350
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	72,18	2046	3736	0,090	2	1	5424,497	2,96	164,659
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	74,71	943	1675	0,040	2	2	0	2,93	167,237
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	77,46	881	1562	0,038	1	1	1561,788	2,91	169,589
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	96,59	1157	1677	0,040	1	1	1676,783	2,31	269,677
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	105,75	274	321	0,008	3	3	0	1,85	419,647
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	106,89	1052	1210	0,029	3	1	2279,745	1,85	422,489
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	107,94	666	748	0,018	3	2	0	1,84	425,092
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	191,25	410	251	0,006	4	4	0	1,16	1.067,489
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	192,19	532	337	0,008	4	3	0	1,16	1.072,832
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	193,31	2504	1772	0,043	4	1	2904,326	1,16	1.079,159
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	194,25	826	546	0,013	4	2	0	1,15	1.084,531
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	213,09	3574	3027	0,073	1	1	3027,072	1,38	756,254
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	215,30	552	303	0,007	1	1	303,2021	0,94	1.643,054
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	221,09	431	291	0,007	1	1	290,815	1,20	992,237
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	233,80	228	106	0,003	2	2	0	0,99	1.478,064
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	234,63	522	275	0,007	2	1	381,4117	0,98	1.484,273
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	239,75	1166	792	0,019	2	2	0	1,07	1.247,259
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	240,52	2058	1383	0,033	2	1	2173,179	1,07	1.252,034
	05_B_Hae.C01_08070816UI	D4	244,76	235	147	0,004	1	1	147,1657	1,27	896,510

Generell soll in einem ersten Schritt ein sog. Alignment durchgeführt werden. Dies bedeutet die richtige Zuordnung der DNA-Fragmente einzelner Proben zueinander und ist notwendig, weil durch kleine Abweichungen bei der Trennung der Fragmente im Kapillarsequencer und

durch die alleinige Anwendung der Regeln des mathematischen Rundens eigentlich gleiche Fragmente unterschiedlichen Fragmentlängen zugeordnet werden können (Beispiel in Tab. 5). Das Alignment kann mit Hilfe der Software GelCompar II (<http://www.applied-maths.com/gelcompar/gelcompar.htm>) durchgeführt werden, die aber zurzeit nicht zur Verfügung steht. Auf ein sehr zeitaufwendiges manuelles Alignment wurde im Rahmen der Pilotstudie verzichtet und die dadurch bedingten Fehler im nachfolgenden Beispiel der Auswertung in Kauf genommen.

Tabelle 5: Beispiel für Fehlerkorrektur mit manuellem Alignment (Fragmentlängen in bp)

Interne Probenbezeichnung	Fragmentlänge nach Software des Sequenzers	Gerundete Fragmentlänge	Fragmentlänge nach Alignment
30_B_Hae.H05_08070816UE	204,89	205	205
31_B_Hae.H01_08070816UD	205,08	205	205
30_B_Hae.G01_08070816UG	205,31	205	205
05_B_Hae.H04_08070816UH	205,40	205	205
08_B_Hae.C05_08070816UG	205,40	205	205
31_B_Hae.H04_08070816UD	205,45	205	205
05_B_Hae.C04_08070816UH	205,47	205	205
07_B_Hae.B05_08070816UH	205,48	205	205
30_B_Hae.G04_08070816UF	205,49	205	205
30_B_Hae.H05_08070816UE	205,54	206	205
32_B_Hae.B06_08070816UD	205,55	206	205
07_B_Hae.D04_08070816UG	205,60	206	205
29_B_Hae.G05_08070816UG	205,65	206	205
31_B_Hae.H01_08070816UD	205,79	206	205
07_B_Hae.D01_08070816UH	205,83	206	205

Nach dem Datenexport erfolgte die weitere Bearbeitung der Daten und die statistische Auswertung mit dem SAS-Statistik-Paket (SAS Institute Inc. 2003).

Zunächst wurden die Fragmentlängen auf ganze Zahlen gerundet und zu schwache Signale mit einer relativen Fläche von $< 1\%$ aller Peaks der jeweiligen Probe entfernt. Außerdem wurden Peaks < 80 bp ausgeschlossen. Danach wurden die relativen Flächen unter den verbleibenden Peaks neu berechnet.

Als Distanzmaß wurde der Bray-Curtis-Koeffizient (Abb. 30) verwendet, der im Gegensatz zu Distanzmaßen für binäre Daten nicht nur das Vorhandensein der verschiedenen Fragmente,

sondern auch deren Intensität (als relative Fläche) berücksichtigt. Die Statistik-Software SAS berechnet die City-Block-Distanz, die dem Doppelten der Bray-Curtis-Distanz entspricht, wenn normierte Daten vorliegen.

Abbildung 30: Bray-Curtis-Koeffizient als Ähnlichkeitsmaß (Rees et al. 2004)

$$S_{BC} = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^n (y_{ij} + y_{ik})} \right\}$$

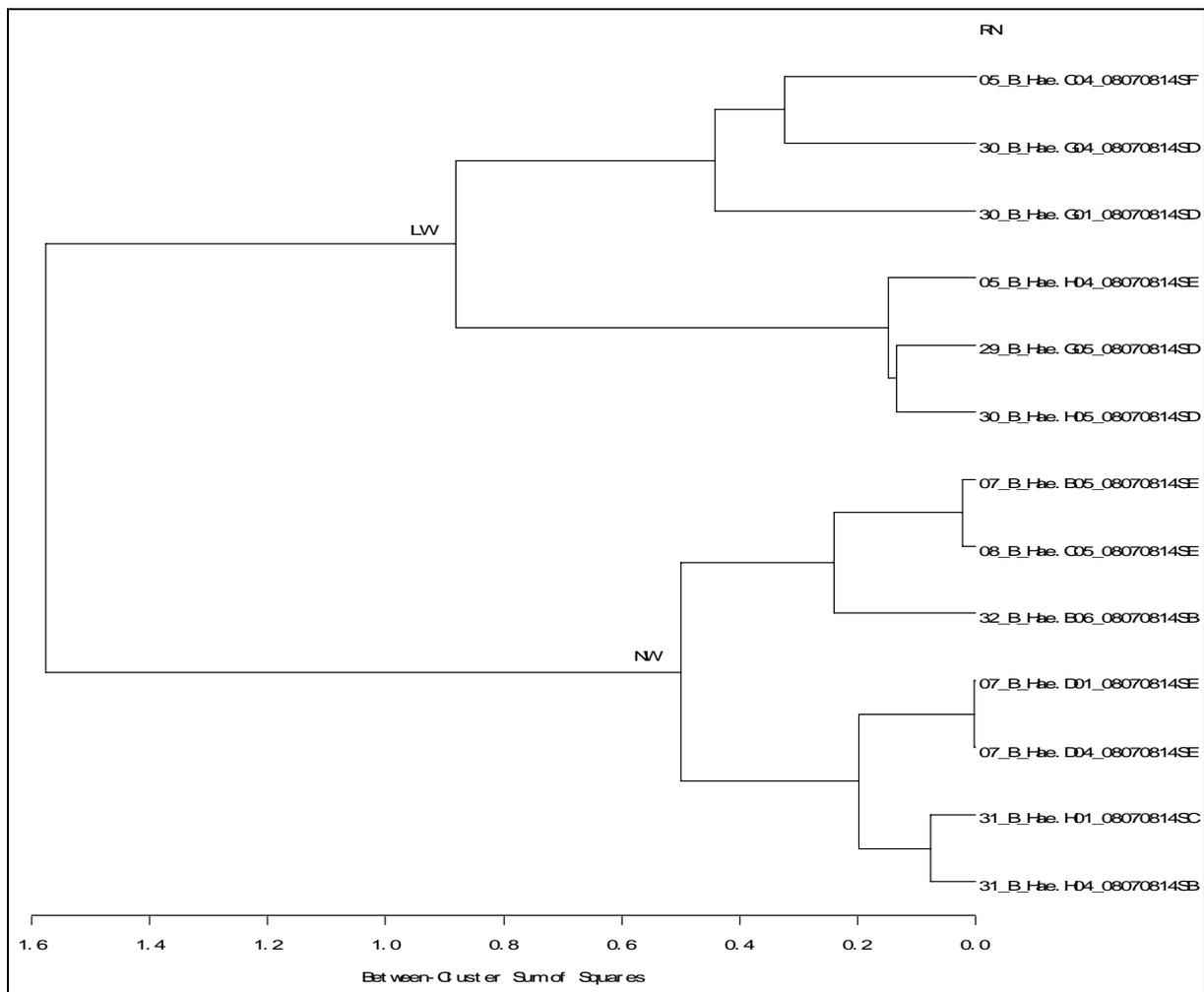
Abbildung 31: Paarweise Abstände zwischen T-RFLP-Muster der Bakterien von 13 Proben

		The SAS System						11:49 Tuesday, July 8, 2008 196	
Obs	RN	_05_B_Hae_C04_ 08070814SF	_05_B_Hae_H04_ 08070814SE	_07_B_Hae_B05_ 08070814SE	_07_B_Hae_D01_ 08070814SE	_07_B_Hae_D04_ 08070814SE	_08_B_Hae_C05_ 08070814SE		
1	05_B_Hae.C04_08070814SF	0.00000		
2	05_B_Hae.H04_08070814SE	0.75799	0.00000		
3	07_B_Hae.B05_08070814SE	0.93835	0.80765	0.00000	.	.	.		
4	07_B_Hae.D01_08070814SE	0.74913	1.10776	0.57511	0.00000	.	.		
5	07_B_Hae.D04_08070814SE	0.74013	1.11414	0.58153	0.06407	0.00000	.		
6	08_B_Hae.C05_08070814SE	0.96103	0.86140	0.21047	0.61984	0.62600	0.00000		
7	29_B_Hae.G05_08070814SD	0.81905	0.53073	0.69650	1.02219	1.03460	0.78043		
8	30_B_Hae.G01_08070814SD	0.96703	1.21988	1.14297	1.11254	1.15729	1.16210		
9	30_B_Hae.G04_08070814SD	0.80446	0.98043	1.00089	0.92667	0.97422	1.01198		
10	30_B_Hae.H05_08070814SD	1.00539	0.54430	0.88607	1.10902	1.11523	0.96116		
11	31_B_Hae.H01_08070814SC	0.87713	1.11868	0.61433	0.49492	0.47774	0.65536		
12	31_B_Hae.H04_08070814SB	0.81436	1.12881	0.53041	0.48927	0.47958	0.55969		
13	32_B_Hae.B06_08070814SB	1.02569	0.91345	0.55985	0.80720	0.80434	0.65290		
Obs	_29_B_Hae_G05_ 08070814SD	_30_B_Hae_G01_ 08070814SD	_30_B_Hae_G04_ 08070814SD	_30_B_Hae_H05_ 08070814SD	_31_B_Hae_H01_ 08070814SC	_31_B_Hae_H04_ 08070814SB	_32_B_Hae_B06_ 08070814SB		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7	0.00000		
8	1.03505	0.00000		
9	0.88744	0.84457	0.00000		
10	0.51617	1.06201	0.85790	0.00000	.	.	.		
11	0.99270	1.07768	0.98243	1.00388	0.00000	.	.		
12	0.95981	0.95515	0.82917	1.05727	0.38880	0.00000	.		
13	0.56901	1.13399	1.04404	0.81817	0.78678	0.77928	0		

Die daraus resultierende Distanzdatei (Abb. 31) kann für verschiedene multivariate Verfahren eingesetzt werden, wie z. B. die Clusteranalyse oder das nichtmetrische multidimensionale Scaling MDS (Rees et al. 2004). Am Beispiel der T-RFLP-Muster der Bakterien von Proben, die mit dem Kit 1 oder der Methode nach Dumolin und Reinigung mit dem CleanKit hergestellt wurden, erweist sich trotz des fehlenden Alignments die Ähnlichkeit der Proben

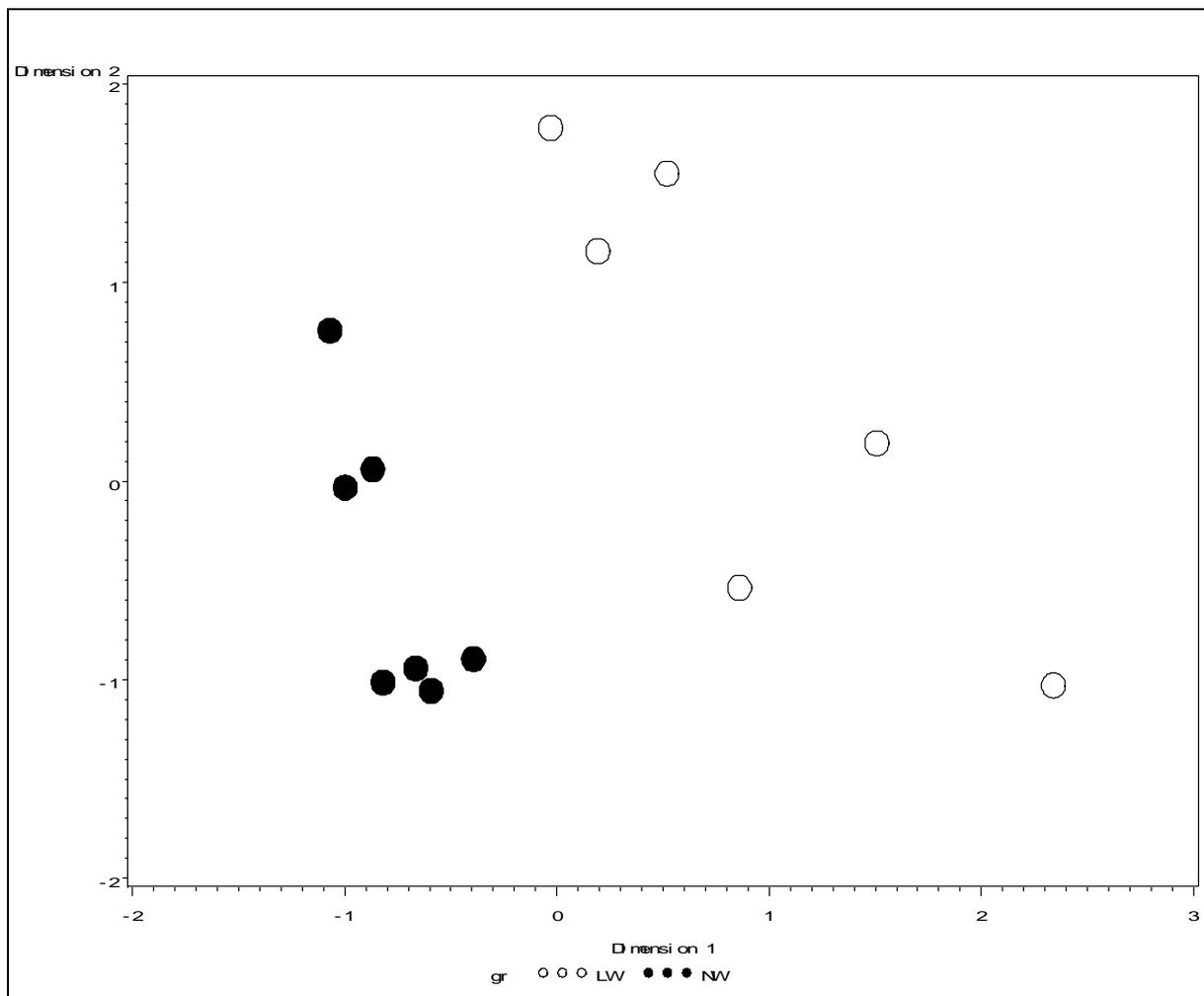
Nr. 5, 6, 29 und 30 aus dem Laubwald bzw. die Ähnlichkeit der Proben Nr. 7, 8, 31 und 32 aus dem Nadelwald. Obwohl dieselben drei dominierenden DNA-Fragmente von 193 bp, 213 bp und 240 bp sowohl bei Laub- als auch bei Nadelwaldproben auftreten (Abb. 27 und 28), führen die Unterschiede im Mengenverhältnis dieser Fragmente zueinander und die weiteren Unterschiede bei weniger ausgeprägten Peaks zur deutlichen Trennung. Das Ergebnis der Clusteranalyse nach WARD zeigt Abbildung 32.

Abbildung 32: Clusteranalyse der T-RFLP-Muster bei Bakterien von 13 Proben



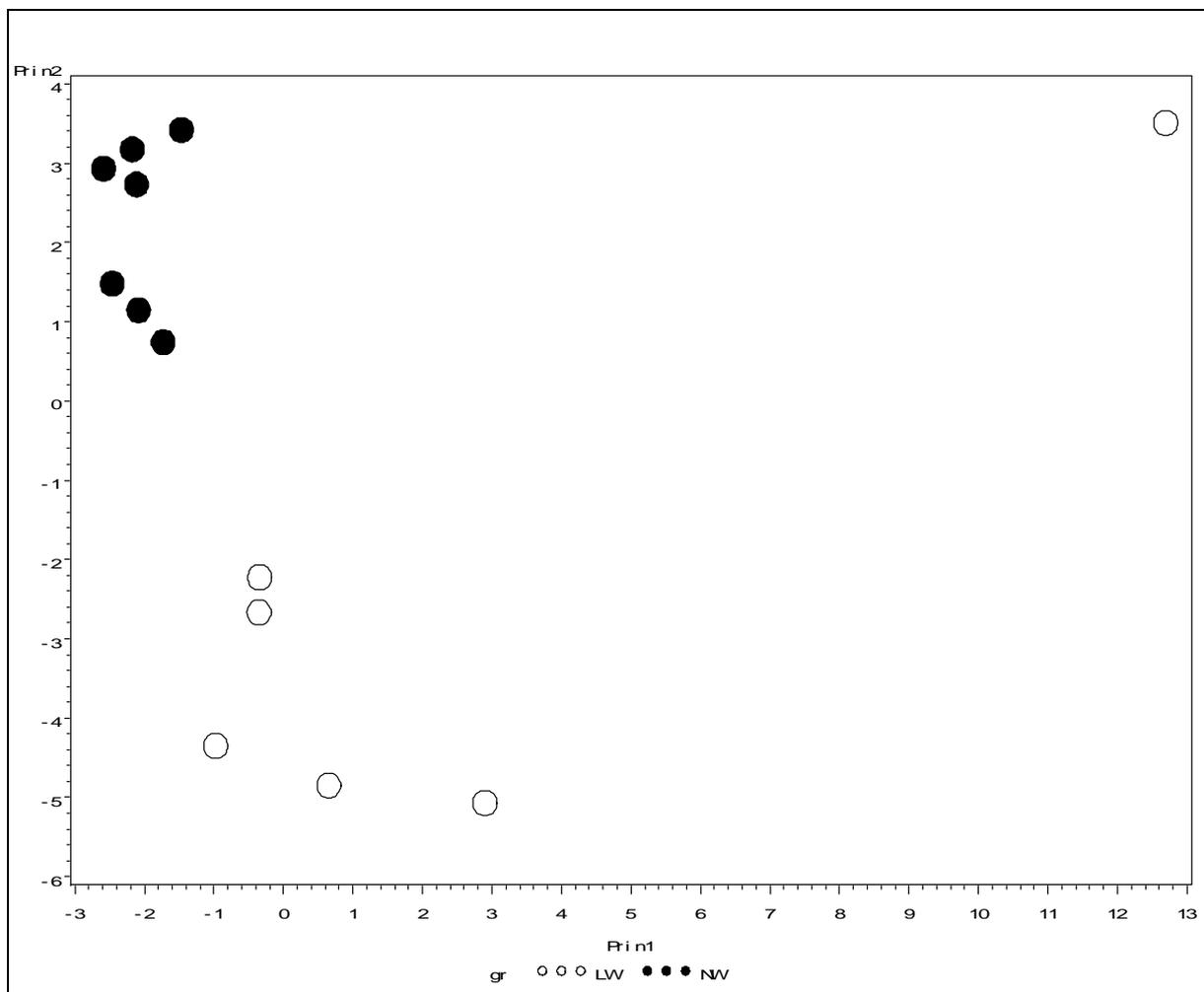
Die graphische Darstellung des multidimensionalen Scalings (Abb. 33) trennt ebenfalls deutlich die Proben aus dem Laubwald von denen aus dem Nadelwald. Das MDS-Verfahren erlaubt eine gewisse Signifikanzschätzung durch den sog. Stressparameter. Dieser beträgt hier 0,11 und liegt damit im Bereich einer ausreichenden Anpassungsgüte (Rees et al. 2004).

Abbildung 33: Multidimensionales Scaling der T-RFLP-Muster bei Bakterien von 13 Proben



Ein anderes multivariates Verfahren, die Hauptkomponentenanalyse, basiert direkt auf den ermittelten relativen Flächen je Fragment, ohne dass Distanzen berechnet werden müssen (Abb. 34). Eine der drei Wiederholungen der Probe 30 (30_B_Hae.G01_08070814SD) befindet sich in der Graphik weit abseits der anderen aus der Laubwaldprobe gewonnenen Proben.

Abbildung 34: Hauptkomponentenanalyse der T-RFLP-Muster bei Bakterien von 13 Proben (prin1: 25 %, prin2: 17 % der Gesamtvarianz)



6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Zu den in Abschnitt 4 formulierten Zielen der Pilotstudie kann Folgendes zusammengefasst werden:

- Eignung von verschiedenen behandelten Bodenproben: frisch, gefroren, getrocknet
Getrocknete Bodenproben eignen sich weniger aufgrund der sehr geringen DNA-Ausbeute im Vergleich zu frischen und gefrorenen Proben. Wegen der verschiedenen Orte der Probenentnahme in zukünftigen Untersuchungen und des Transports sollten die Proben eingefroren werden.

- Reproduzierbare DNA-Extraktion: Test verschiedener kommerzieller Extraktionskits und konventioneller Methoden und Reinigungsverfahren auf ihre Eignung speziell für Waldböden

Von mehreren getesteten Methoden erwiesen sich zwei als etwa gleich gut zur DNA-Extraktion geeignet:

1. PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc.) nach Vorschrift des Herstellers
2. Methode nach Dumolin et al. (1995) und anschließende Reinigung mit dem PowerClean DNA Clean-Up Kit (Mo Bio Laboratories Inc.).

- Etablierung der T-RFLP-Methode zur Erstellung von Fingerprints für drei große taxonomische Gruppen (Pilze, Bakterien, Archaeen)

Die T-RFLP-Methode wurde für die gewonnenen DNA-Extrakte aus zwei Bodenproben erfolgreich und reproduzierbar angewendet. Die Datenauswertung einschließlich der Anwendung multivariater Verfahren wurde an einem Beispiel durchgeführt.

- Methodische Kontrollen durch die Einbeziehung von Reinkulturen von Pilzen und Bakterien

In fast allen Fällen wurden die aufgrund der bekannten DNA-Sequenz der untersuchten Mikroorganismen-Stämme erwarteten T-RFLP-Muster mit jeweils einem Peak erzielt. Falls in seltenen Ausnahmen zwei Restriktionsschnittstellen sehr eng benachbart vorkommen, kann das Auftreten von zwei Peaks bei einer Art nicht ausgeschlossen werden. Diese Situation

wäre jedoch identisch bei allen Proben, die diese Art enthalten, und würde die Beurteilung der Ähnlichkeiten kaum beeinträchtigen.

Laboruntersuchungen zur Erstellung von Mikroorganismen-Profilen aus Waldbodenproben auf genetischer Basis mit der T-RFLP-Methode sind am vTI - Institut für Forstgenetik, Waldsiedersdorf technisch durchführbar und etabliert.

Bevor mit einheitlicher Methodik ein größerer Stichprobenumfang untersucht werden kann, bleiben noch einige Fragen zu klären.

Bodenchemischen und bodenphysikalische Parameter sind über längere Zeiträume relativ stabil. Deshalb ist ein bestimmter Probenentnahmezeitpunkt für BZE-Proben nicht erforderlich. Im Gegensatz dazu können bei der Mikroorganismen-Zusammensetzung eher jahreszeitliche Schwankungen vermutet werden. Ein möglichst repräsentativer Zeitraum für die Probenentnahme muss für vergleichbare Ergebnisse ermittelt werden.

Die in der Pilotstudie verwendeten, exemplarisch ausgewählten Primerpaare für Pilze, Bakterien und Archaeen können durch andere Primer für speziellere taxonomische Gruppen ergänzt oder ersetzt werden (Blackwood et al. 2005). Außerdem können durch die Auswahl von Primern nicht nur bestimmte taxonomische Gruppen, sondern auch verschiedene Stoffwechselaktivitäten gezielt untersucht werden, wie z. B. methanotrophe Bakterien (Henckel et al. 1999; Luis et al. 2005).

Für zukünftige Untersuchungen muss eine professionelle Software zum Alignment der DNA-Fragmente angeschafft werden.

Die vTI - Institute für Forstgenetik, für Waldökologie und Waldinventuren und für Biodiversität können im Rahmen von geförderten Forschungsprojekten das Thema „Biodiversität in Waldböden“ gemeinsam aufgreifen.

Die Untersuchungen können über ein breites Spektrum an typischen Waldböden durchgeführt werden, die gezielt nach den ersten BZEII-Ergebnissen (8 x 8 km-Raster) ausgewählt werden. Es können auch solche BZE-Punkte bevorzugt berücksichtigt werden, die zum EU-Demonstrationsvorhaben „BioSoil“ auf einer Teilstichprobe (16 x 16 km) des BZE-Rasters gehören. Außerdem kommen Level II-Flächen in Frage, besonders wenn sie auch nach den BZE-Standards untersucht worden sind. Die Verknüpfung der Ergebnisse der Biodiversitätsuntersuchungen der Bodenmikroorganismen mit den bei der BZE II erfassten

Parametern werden in einer integrierenden Auswertung umfangreiche neue Erkenntnisse bringen.

Das Ziel besteht in der Gewinnung von grundlegenden Erkenntnissen über die mikrobielle Biodiversität in Waldböden, wobei eine enge Anlehnung an die BZE II mit all ihren umfangreichen Datenerhebungen Synergieeffekte erwarten lässt. Dazu gehört die gezielte Auswahl der Proben entsprechend der Eingruppierungen und Abstufungen von Böden aus den BZE II-Ergebnissen und das Auffinden von dominanten Mikroorganismengruppen, evtl. auch Indikatorarten für bestimmte Waldbodentypen. Die Charakterisierung von Mikroorganismen-Gemeinschaften mit genetischen Profilen ist die Voraussetzung für nachfolgende Vergleiche und Gruppierungen. Um Aussagen über dominierende taxonomische Gruppen machen zu können, müssen ausgewählte DNA-Fragmente sequenziert werden. Für spezielle Fragen können kulturabhängige Methoden einbezogen werden.

Neben Schlussfolgerungen für die Waldbewirtschaftung selbst werden Beiträge für wald- und umweltpolitische Fragestellungen erwartet. Dazu gehört beispielsweise die EU-Bodenschutzstrategie von 2002, in der ausgeführt ist „Zum Schutz der biologischen Vielfalt des Bodens könnte die Kommission erwägen, die Anhänge der Habitat-Richtlinie auszuweiten, [...] wird in den Bewirtschaftungsplänen für ausgewiesene Natura-2000-Gebiete dem Boden höhere Bedeutung zugewiesen. Hier werden erhebliche Forschungstätigkeiten erforderlich sein, um die Aspekte der biologischen Vielfalt des Bodens vollständiger zu erfassen und festzulegen, welche Flächen eine Einstufung als Natura-2000-Gebiete verdienen.“ Die Biodiversität von Bodenmikroorganismen kann ebenfalls im Zusammenhang mit dem Kohlenstoffkreislauf gesehen werden, der für das Treibhausgasinventar und die Berichtspflichten gemäß Klimarahmenkonvention von Bedeutung ist.

Neben der Anwendung der Methode genetischer Profile in der Begleitforschung zur BZE II kommen auch weitere Einsatzmöglichkeiten in Frage, die Waldböden betreffen, z. B. die Auswirkungen verschiedener Waldbau- und Verjüngungsverfahren oder Holzerntetechniken (Bodenverdichtung durch Befahren) auf die Bodenmikroorganismen-Diversität.

Literatur

- Avis, P.G., Dickie, I.A., Mueller, G.M. (2000): A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology* 0, ???-???
- Bäckman, J.S.K., Hermansson, A., Tebbe, C.C., Lindgren, P.-E. (2003): Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1337-1347
- Blackwood, C.B., Oaks, A., Buyer, J.S. (2005): Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6193-6198
- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T. (2002): Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* 156, 527-535
- Dumolin, S., Demesure, B., Petit, R.J. (1995): Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 91, 1253-1256
- Graff, A. (2005): Molekularbiologische Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen in gefluteten und ungefluteten Pappelmikrokosmen. Thesis: Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, 186 pp.
- Henckel, T.H. (2000): Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaften im Reisfeld- und Waldboden. Thesis: Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 156 pp.
- Henckel, T.H., Friedrich, M.W., Conrad, R. (1999): Molecular Analyses of the Methane-Oxidizing Microbial Community in Rice Field Soil by Targeting the Genes of the 16S rRNA, Particulate Methane Monooxygenase, and Methanol Dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1980-1990
- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Chen, H., Forney, L.J. (1997): Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4516-4522
- Lueders, T., Friedrich, M.W. (2003): Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and mcrA Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 320-326
- Luis, P., Kellner, H., Martin, F., Buscot, F. (2005): A molecular method to evaluate basidiomycete laccase gene expression in forest soils. *Geoderma* 128, 18-27

- Lukow, T., Dunfield, P.F., Liesack, W. (2000): Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 32, 241-247
- Rees, G.N., Baldwin, D.S., Watson, G.O., Perryman, S., Nielsen, D.L. (2004): Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 339-347
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., Van Elsas, J.D. (1998): Genetic Diversity of nifH Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2770-2779
- SAS Institute Inc. (2003): SAS for Windows 9.1 TS Level 1M2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C.C. (2003): Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology* 12, 251-262
- Sun, H.Y., Deng, S.P., Raun, W.R. (2004): Bacterial Community Structure and Diversity in a Century-Old Manure-Treated Agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5868-5874
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J. (1999): Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109-122
- Ulrich, A., Becker, R. (2006): Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. *FEMS Microbiology Ecology* 56, 430-443
- Zipper, H., Buta, C., Lammle, K., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. (2003): Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research* 31, e39-