

**Andreas HEISSENBERGER  
Gabriele UNGER  
Alfred WOTTAWA  
Josef SCHMIDT**

## **Reports**

**R-160**

**MÖGLICHKEITEN ZUM  
MONITORING DES EINFLUSSES  
TRANSGENER PFLANZEN AUF  
BODENMIKROORGANISMEN**

**Projektleiter**

Helmut Gaugitsch (Umweltbundesamt)

**Autor(en)**

Andreas Heissenberger (Umweltbundesamt)

Gabriele Unger, Alfred Wottawa und Josef Schmidt

(alle: Geschäftsfeld Agrarforschung und Biotechnologie, Bereich  
Lebenswissenschaften, Forschungszentrum Seibersdorf)

**Impressum**

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt GmbH, Spittelauer Lände 5, A-1090 Wien

Druck: Riegeltechnik, 1080 Wien

© Umweltbundesamt GmbH, Wien 1999  
Alle Rechte vorbehalten (all rights reserved)  
ISBN 3-85457-506-8

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	5
<b>SUMMARY</b> .....	6
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	7
1.1 Zielsetzung für das Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora .....	7
1.2 Theoretische Überlegungen zum Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora .....	7
<b>2 NATÜRLICHE DIVERSITÄT UND VARIABILITÄT DER AKTIVITÄTEN VON BODENMIKROORGANISMEN</b> .....	10
2.1 Abhängigkeit der Bodenmikroflora von biotischen und abiotischen Faktoren .....	10
2.2 Einfluß von Chemikalien auf Bodenmikroorganismen .....	11
2.3 Diversität der Bodenmikroflora .....	11
2.4 Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen .....	12
2.5 Rolle einzelner Bakterienarten .....	13
<b>3 BISHERIGE ERFAHRUNGEN MIT DEM MONITORING TRANSGENER ORGANISMEN</b> .....	14
3.1 Zielsetzungen beim Monitoring transgener Pflanzen .....	14
3.2 Monitoring von Mikroorganismengemeinschaften in der Phyllosphäre transgener Pflanzen .....	15
3.3 Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora .....	16
3.3.1 Mykorrhiza und Rhizobien .....	16
3.3.2 Saprophytische Mikroorganismen .....	17
3.4 Monitoring von Auswirkungen transgener Mikroorganismen .....	18
3.5 Anfragen bei Industrieunternehmen .....	19
<b>4 ANSÄTZE FÜR DAS MONITORING TRANSGENER PFLANZEN</b> .....	20
4.1 Nachweis von horizontalem Gentransfer durch Transformation .....	21
4.2 Nachweis von Veränderungen der Diversität von Bodenmikroorganismen .....	22
4.2.1 Bestimmung der Biomasse .....	22
4.2.1.1 Bakterienkeimzahlbestimmungen .....	22
4.2.1.2 Quantifizierung von Zellbestandteilen von Bodenmikroorganismen .....	22
4.2.1.3 Indirekte Bestimmung der Biomasse der Bodenmikroorganismen .....	23

---

4.2.2	Bestimmung von spezifischen Mustern .....	23
4.2.2.1	DNA-Fingerprintmethoden .....	23
4.2.2.2	Analyse von direkt aus dem Boden isolierter bakterieller 16S rRNA-Gene bzw. pilzlicher 18S rRNA-Gene .....	24
4.2.2.3	Analyse direkt aus dem Boden isolierter bakterieller 16S rRNA.....	25
4.2.2.4	Analyse direkt aus dem Boden isolierter Fettsäuren .....	25
<b>4.3</b>	<b>Nachweis von Veränderungen der Stoffwechselaktivität von Bodenmikroorganismen.....</b>	<b>26</b>
4.3.1	Bestimmung der gesamtmikrobiellen Aktivität.....	26
4.3.2	Bestimmung des Energiezustandes von Mikroorganismen.....	28
4.3.3	Bestimmung der Aktivität von Bodenenzymen .....	28
4.3.4	Erstellung eines "community"-Profils mit Hilfe von BIOLOG-Mikrotiterplatten.....	29
<b>4.4</b>	<b>Nachweis von Veränderungen in Zahl oder Verhalten von Indikatororganismen.....</b>	<b>30</b>
4.4.1	Gentechnisch veränderte Mikroorganismen .....	31
4.4.2	Natürlich vorkommende Bodenmikroorganismen .....	32
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>35</b>
	<b>ANHANG 1/Literaturrecherche .....</b>	<b>41</b>
	<b>ANHANG 2/Methodenübersicht .....</b>	<b>42</b>
	<b>ANHANG 3/Projekt Datenbank der EU .....</b>	<b>46</b>
	<b>ANHANG 4/Institutionen für die Entwicklung und Durchführung von Monitoringuntersuchungen.....</b>	<b>49</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Beurteilung von Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen wurden Boden-Ökosysteme bisher nur in Ausnahmefällen berücksichtigt. Die meisten der durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich dabei auf Bodenarthropoden und andere wirbellose Tiere, wie Regenwürmer. Aber auch Mikroorganismen spielen in diesen Systemen eine wichtige Rolle, da sie durch den Abbau organischer Substanzen Nährstoffe für höhere Organismen verfügbar machen. So werden durch Remineralisation von hochmolekularen Substanzen Stickstoff- und Phosphorverbindungen freigesetzt und damit die Bodenfruchtbarkeit erhöht. Mikroorganismen stellen das basalste Glied in jedem Ökosystem dar. Aufgrund der hohen Diversität von Mikroorganismen und der Komplexität ihrer Stoffwechseleleistungen ist eine umfassende Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften aber sehr aufwendig.

Die bisherigen Untersuchungen beschäftigten sich meistens mit dem Einfluß verschiedener Chemikalien, wie Pestizide oder Düngemittel, auf Stoffwechselaktivitäten und die Diversität von Bakterienpopulationen in unterschiedlichen Bodentypen. Meist wurden dabei kultivierungsabhängige Methoden verwendet. Da aber nur 1-10% der Bakterien kultivierbar sind, ist die Aussagekraft dieser Arbeiten stark eingeschränkt. Diversitätsuntersuchungen mit molekularbiologischen Methoden erfassen zwar die gesamte Bakterien- oder Pilzgemeinschaft, doch sind die Ergebnisse der Untersuchungen oft nicht vergleichbar, da unterschiedliche Methoden verwendet werden, und Bakteriengemeinschaften stark mit dem Bodentyp variieren.

In einigen Arbeiten wurden auch mögliche Wechselwirkungen von gentechnisch veränderten Organismen (Pflanzen und Bakterien) mit Bodenmikroorganismen, vor allem in Laborexperimenten, anhand sogenannter Mikrokosmen, untersucht. Die meisten dieser Untersuchungen beschäftigen sich mit der Möglichkeit des horizontalen Gentransfers von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bodenbakterien. Die Ergebnisse von Untersuchungen zu Verschiebungen in der Diversität oder in den Abbauleistungen von Bodenmikroorganismen sind oft widersprüchlich, da Variationen der Umweltbedingungen (Bodentypen) den möglichen Einfluss von gentechnisch veränderten Organismen überdecken.

In dieser Studie wird ein Überblick über Methoden gegeben, die für ein Monitoring der Auswirkungen des Einsatzes gentechnisch veränderter Pflanzen auf Bodenmikroorganismen eingesetzt werden können. Neben (bio-)chemischen oder mikrobiologischen Methoden, mit denen Parameter wie Keimzahl, Biomasse, physiologischer Zustand oder Stoffwechselaktivitäten erfaßt werden können, werden auch die in den letzten Jahren entwickelten molekularen Techniken zur Untersuchung der Diversität von Mikroorganismengemeinschaften im Boden behandelt. Dabei werden neben einer kurzen Beschreibung auch die Vor- und Nachteile dieser Methoden angeführt.

Durch diese Darstellung soll eine Selektion von Methoden ermöglicht werden, die zur Untersuchung der jeweils relevanten Fragestellungen herangezogen werden können. Für jedes Monitoring von Bodenmikroorganismen, ob kurz- oder langfristig, ist eine klare Festlegung auf bestimmte Parameter und Versuchsbedingungen unbedingt erforderlich. Ein zu breiter Versuchsansatz würde zu Kapazitäts- und Finanzierungsproblemen bei der Umsetzung führen. Alle Untersuchungen sollten immer als direkte Vergleichsuntersuchung des beeinflussten und eines Kontroll-Systems, z. B. herkömmliche landwirtschaftliche Praxis, durchgeführt werden. Natürliche Schwankungen sind sehr groß, Daten aus früheren Untersuchungen können daher nicht übernommen werden.

## SUMMARY

In the risk assessment of genetically modified plants soil ecosystems are rarely considered. Most of the performed investigations are limited to soil-arthropods and other invertebrates, like earthworms. However, microorganisms also play an important role in these systems, because of their ability to make nutrients available for higher organisms by decomposing organic substances. By remineralization of high-molecular-weight substances nitrogen and phosphate-compounds are released and the soil fertility is increased. Microorganisms are a basic compound of all ecosystems. Because of their high diversity and the complexity of their metabolic activities a comprehensive investigation of microbial communities is very laborious.

Most of the investigations so far dealt with the influence of chemicals, like pesticides or fertilizers, on the metabolic activities and the diversity of bacterial populations in different soil types. Mainly culture-dependent methods were used. The validity of these studies is very limited because only 1-10 % of the bacteria are culturable. Investigations of diversity by modern molecular methods are including the whole bacterial and fungal community, but the results are often not comparable, because of the variety of methods used, and the high variation within microbial communities in different types of soil.

In some studies, mainly in laboratory experiments using so called microcosms, possible interactions of genetically modified organisms (plants and bacteria) with soil microorganisms were investigated. Most of these investigations were performed on the possibility of horizontal gene transfer from genetically modified plants to bacteria. The results of studies on shifts in diversity or of the metabolic activity of soil microorganisms are often inconsistent, because of the variations of the environmental conditions (soil types) which are concealing the possible influence of genetically modified organisms.

In this study an overview about methods which could be used to monitor the influence of genetically modified plants on soil microorganisms is given. In addition to (bio-)chemical and microbiological methods, which can be used to determine parameters like CFU (colony forming units), biomass, physiological state or metabolic activity, also molecular methods which have been developed during the past few years are described. Besides a short description of the methods their advantages and disadvantages are given.

This should facilitate a selection of methods, which could be used for the investigation of certain problems. For every monitoring of soil microorganisms, short- or longterm, a clear determination of the parameters and experimental conditions is absolutely necessary. A too broad experimental design would lead to capacity and financial problems during the realization. All investigations should be carried out as direct comparative studies of the influenced system and a control system, e. g. common agricultural practice. Natural fluctuations are very high, and therefore data of previous studies cannot be used.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Zielsetzung für das Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora

Vor einem großflächigen Anbau neuartiger transgener Pflanzen soll abgeschätzt werden, ob diese bei einer Freisetzung, unter Anwendung der gängigen landwirtschaftlichen Methoden, im Ökosystem Boden negative Veränderungen herbeiführen.

In vorliegender Studie sollten bisher angewandte Methoden zur Sicherheitsforschung und zum Monitoring von gentechnisch veränderten Pflanzen anhand einer Literaturrecherche erhoben, und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit beurteilt werden. Der Schwerpunkt der Suche und der darauf folgenden Auswahl der im Text angeführten Literaturstellen lag auf möglichen Auswirkungen auf Bodenmikroorganismen. Eine Beschreibung der Literaturrecherche ist in Anhang 1 wiedergegeben. Neben Literaturstellen aus der Datenbanksuche wurden auch Methodenhandbücher, bzw. die darin zitierte Primärliteratur zur Erstellung dieser Studie herangezogen.

Ein Monitoring eines möglichen Einflusses transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen soll es ermöglichen, von der Anwendung transgener Pflanzen hervorgerufene Entwicklungen zu überwachen, ohne notwendigerweise einzugreifen, solange keine unerwünschten Folgen auftreten. Es ist daher besonders wichtig, praktikable Methoden für das Monitoring möglicher negativer Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen auf Nicht-Zielorganismen im Boden zu entwickeln, um eine Abschätzung des Risikos von Freisetzungen dieser Pflanzen zu ermöglichen.

Ein Monitoring von möglichen Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens ist in jedem Fall sinnvoll, da das Funktionieren von Ökosystemen weitgehend von mikrobiologischen Prozessen bestimmt wird (KENNEDY & SMITH, 1995). Da Bakteriengemeinschaften rasch auf Umweltveränderungen reagieren, kann die Untersuchung von Änderungen in der mikrobiellen Diversität und von mikrobiellen Stoffwechsellleistungen als sensibler biologischer Marker für das Ökosystem Boden dienen.

## 1.2 Theoretische Überlegungen zum Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl gentechnisch veränderter Pflanzen erzeugt. Die Zahl der unterschiedlichen, neu eingebrachten Gene wird ständig erhöht. Einige dieser neuen Eigenschaften, die mit gentechnischen Verfahren in Pflanzen eingebracht werden können, sind:

- Antibiotikaresistenz (meist nur als Marker für eine gentechnische Veränderung eingesetzt)
- Herbizidresistenz (z. B. durch Expression von Enzymen zum Abbau oder zur Inaktivierung des jeweiligen Herbizids)
- Resistenz gegen Mikroorganismen (durch Expression von, z. B. lytischen Peptiden)
- Insektenresistenz (durch Expression von Proteinen, z. B. Bt-Toxin, Trypsin Inhibitor Protein)
- veränderte Aminosäure- oder Fettsäurezusammensetzung
- Produktion pharmakologisch aktiver Substanzen
- verringerte Enzymaktivität (durch Antisense-Technik, z. B. „Antimatschtomate“)
- veränderte Blütenfarbe (Nelken)
- erhöhte Toleranz gegenüber Stressfaktoren (Dürre, Hitze, Kälte, Salz, Schwermetalle).

Die Übersicht über die unterschiedlichen Eigenschaften läßt erkennen, dass die einzige Gemeinsamkeit gentechnisch veränderter Pflanzen die Zuchtmethode ist. Die Phänotypen transgener Pflanzen ergeben sich aber durch die Expression veränderter Eigenschaften, nicht daraus, mit welchen Methoden Gene ins Erbgut eingefügt wurden (MILLER et al., 1993). Infolge der Verschiedenheit der, bei transgenen Pflanzen veränderten Eigenschaften kann es keine generell anwendbaren Methoden zur Untersuchung von Auswirkungen gentechnisch veränderter Organismen geben. Jede Pflanzenart ist daher auch im Hinblick auf die neu eingebrachte Eigenschaft als gesonderter Fall zu betrachten (case-by-case Ansatz) (CAMPBELL 1991).

In den oben aufgelisteten Fällen könnten die in Tabelle 1 angeführten primären Monitoringziele angenommen werden. Eine Überwachung von Auswirkungen der genannten transgenen Pflanzen auf die Bodenmikroflora wäre nicht in allen Fällen das Hauptziel von Monitoringmaßnahmen bei der Untersuchung solcher Pflanzen.

Tab. 1: Möglichkeiten für primäre Monitoringziele bei transgenen Pflanzen in Bezug auf die gentechnisch herbeigeführte Veränderung.

gentechnisch herbeigeführte Veränderung	mögliches primäres Monitoringziel
Antibiotikaresistenz	Resistenzübertragung auf potentiell human- oder tierpathogene Mikroorganismen
Herbizidresistenz	mögliche Übertragung der Herbizidresistenz auf Wildpflanzen und Unkräuter
Resistenz gegen Mikroorganismen durch Expression mikrobizider Substanzen	toxische Auswirkungen auf Nicht-Zielmikroorganismen im Umfeld (Pflanzenoberfläche, Boden) transgener Pflanzen
Insektenresistenz durch Expression insektizider Substanzen	toxische Auswirkungen auf Nicht-Zielinsekten, insbesondere Nutzinsekten
veränderte Aminosäure- oder Fettsäurezusammensetzung	allergene Reaktionen bei Menschen
Expression pharmakologisch aktiver Substanzen	allergene Reaktionen bei Menschen
veränderte Enzymaktivität	allergene Reaktionen bei Menschen
erhöhte Toleranz gegenüber Stressfaktoren	erhöhte Konkurrenzstärke

Um den Einfluß bestimmter Produkte transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen nachweisen zu können, muß sichergestellt sein, dass beobachtete Veränderungen tatsächlich auf die Genprodukte zurückzuführen sind. Das kann nur erreicht werden, wenn das Verhalten dieser Produkte über Boden-Biotests, am besten unter Verwendung von Mikrokosmen, die annähernd den Feldbedingungen entsprechen, abgeklärt wird. Mikrokosmen können in Anordnung, Größe und Grad ihrer Naturnähe variieren, meist werden sie definiert als '... ein kontrolliertes reproduzierbares Laborsystem, das versucht, einen Teil der realen Welt zu simulieren...' (SEIDLER, 1992). Die oben erwähnten Biotests sollten mit transgenem Pflanzengewebe, primären und sekundären transgenen Pflanzenprodukten und ganzen transgenen Pflanzen durchgeführt werden, wobei sowohl auf toxische Auswirkungen als auch auf jede andere Veränderung im Bereich der Bodenorganismen geachtet werden muß. Um die Relevanz etwaiger Veränderungen bewerten zu können, müssen in jedem Fall Kontrollen in Form der jeweiligen nicht transgenen Elternpflanzen mitgeführt werden (MORRA 1994). Außerdem sollte bei der Planung solcher Experimente auch die veränderte landwirtschaftliche Praxis, wie z. B. der veränderte Herbizideinsatz, berücksichtigt werden.

Auswirkungen transgener Pflanzen auf die Umwelt können

- vorübergehend und ohne ökologische Signifikanz
  - vorübergehend aber ökologisch signifikant
  - permanent und ohne ökologische Signifikanz
  - permanent und ökologisch signifikant
- sein.

Dabei kann die Definition von „ökologisch signifikant“ sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus regulatorischer Sicht variieren und ist daher schwer festzulegen. Eine flexible Auslegung des Begriffs ist notwendig, da er in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen unterschiedliche Bedeutung haben kann (TREVORS et al., 1994).

Mögliche Einflüsse transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen sind nach Labor- und Glashausversuchen auch im Falle kontrollierter kleinräumiger Versuche im Freiland zu überprüfen, da eine direkte Übertragbarkeit von im Labor bzw. Glashaus erhaltenen Ergebnissen auf die Verhältnisse im Freiland nicht möglich ist. Ökologische Probleme sind nur im Kontext biologischer, chemischer und physikalischer Wechselwirkungen erkennbar, wie sie in natürlichen Böden und innerhalb einer natürlichen Konkurrenzsituation auftreten. Auf diese Weise können kontrollierte Freisetzungen transgener Pflanzen daher wertvolle Daten als Entscheidungshilfe für ein weiteres Vorgehen nach dem Stufenprinzip liefern.

In Anlehnung an REGAL (1994) empfiehlt sich daher folgende Vorgehensweise:

- Basierend auf dem Wissen über Ökologie und Verbreitung von Elternpflanzen und verwandten Arten, sowie über die veränderten Eigenschaften: Abschätzung und Auflistung der Art und Weise in der die jeweilige transgene Pflanze bei einer Freisetzung Probleme verursachen könnte.
- In Anlehnung an diese Liste: genaue Bestimmung der speziellen Fragen zur Biologie der jeweiligen Pflanze, und Auswahl der für den jeweiligen Fall relevanten Methoden, mit deren Hilfe die Fragen in Labor- und Feldversuchen abgeklärt werden können. Die dafür benötigten Daten sind von Fall zu Fall verschieden.
- Sammlung der benötigten Daten in Labor-, Glashaus- und Feldversuchen.
- Aufgrund der gesammelten Daten: Beurteilung der Notwendigkeit zur Durchführung weiterer Versuche, Beurteilung der Relevanz möglicher Auswirkungen einer Freisetzung der transgenen Pflanze in großem Maßstab, Festlegung freisetzungsbegleitender Monitoringmaßnahmen.

Aufgrund der bisherigen Erfahrungen (siehe Kapitel 3) sollte bei einem Monitoring von Auswirkungen transgener Pflanzen auf die Bodenmikroflora unbedingt auf Effekte durch unbeabsichtigte Veränderungen des Pflanzenmaterials (Veränderungen in Nährstoffzusammensetzung, Feuchtigkeitsgehalt, Reifung der jungen Blätter, etc.) infolge der gentechnischen Veränderung geachtet werden.

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand dürfte transgenes Pflanzenmaterial zumindest in einigen Fällen zu einer signifikanten, aber vorübergehenden, Stimulation der mikrobiellen Population führen (DONEGAN et al. 1995). Selbst wenn diese Stimulation allein für die Umwelt nicht von Bedeutung wäre, könnte eine gleichzeitig stattfindende Veränderung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft ökologisch bedeutend sein.

## 2 NATÜRLICHE DIVERSITÄT UND VARIABILITÄT DER AKTIVITÄTEN VON BODENMIKROORGANISMEN

### 2.1 Abhängigkeit der Bodenmikroflora von biotischen und abiotischen Faktoren

Die Diversität und Aktivität von Bodenmikroorganismenpopulationen sind von vielen biotischen und abiotischen Faktoren abhängig. So beeinflussen physikalische Faktoren, wie die Korn- bzw. Porengrößenverteilung, Temperatur und Wassergehalt des Bodens und chemische Faktoren wie pH-Wert oder Salzkonzentration des Porenwassers die Verteilung der Mikroorganismen im Boden stark. Weiters wird das Ökosystem von der Bodenfauna und der Durchwurzelung beeinflusst. Diese Vielzahl von Faktoren bedingt, dass es im Boden eine große Zahl von „Mikrohabitaten“ gibt, die sich auf kleinstem Raum stark unterscheiden und so Lebensräume für verschiedene Mikroorganismenarten bilden. Mikroorganismen werden durch die Bodenfauna (an deren Oberfläche oder im Verdauungstrakt) und durch Wasserströme im Boden verfrachtet (DIGHTON et al. 1997). Diese Verfrachtung erfolgt von wenigen Zentimetern bis zu Kilometern wenn die Mikroorganismen in den Grundwasserstrom gelangen. Ein weiter Transport von Mikroorganismen ist auch durch Windverfrachtung von der Bodenoberfläche möglich. Auch diese „Beweglichkeit“ von Bakterien und Pilzen trägt zur Erhöhung der Variabilität in Bodenökosystemen bei.

Stoffwechselleistungen von Bodenmikroorganismen (Ab-, Um- und Aufbau organischer Substanzen, Mobilisierung und Immobilisierung anorganischer Nährstoffe) werden durch die mikrobielle Diversität bestimmt. Jede Veränderung der Substrat- oder Umweltbedingungen, auch durch landwirtschaftliche Bearbeitung (düngen, pflügen), führt zu einer Verschiebung der Diversität und damit zur Änderung von Stoffwechselleistungen.

So unterscheiden sich Grasland und Ackerboden sowohl in Bezug auf Denitrifikations- und Nitrifikationspotential, als auch hinsichtlich Dehydrogenase- und Phosphataseaktivität stark (KENNEDY & SMITH, 1995). Außerdem wurde mithilfe kultivierungsabhängiger Methoden eine höhere Diversität im Ackerboden festgestellt.

Bei einer Untersuchung verschiedener Bearbeitungsmethoden landwirtschaftlich genutzter Böden mit dem Ziel einer erhöhten Bodenproduktivität wurden unter anderem Veränderungen in der Biomasse, Artenvielfalt und Artenverteilung von Bakterienpopulationen festgestellt (PRESS et al., 1996). So führte z. B. eine Zugabe der Stickstoffquellen Ammoniumnitrat bzw. Geflügelmist zu einem verstärkten Auftreten gram-positive bzw. gram-negative Bakterien. In beiden Fällen kam es zu einer Reduktion von *Bacillus* sp.

Bei dem Versuch einer Abschätzung des Effekts verschiedener Phosphatdünger auf die mikrobielle Biomasse von Grasland wurden u.a. Basalatmung, substratinduzierte Respiration (SIR) und der mikrobielle Biomassekohlenstoff bestimmt (BOLAN et al., 1996). Bei einem achtwöchigen Laborversuch verursachte die Düngung einen vorübergehenden Rückgang von Basalatmung und SIR, hatte aber keine Auswirkungen auf den mikrobiellen Gesamtkohlenstoff. Bei den seit 1985 laufenden Feldversuchen führte die Düngerzugabe zu keinem signifikanten Effekt auf die Basalatmung, hingegen zu einer Erhöhung der SIR und des mikrobiellen Biomassekohlenstoffs.

Ein Nachweis der natürlichen Variabilität von Mikroorganismen im Boden wurde bei einem Experiment im Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf erbracht: aus Töpfen, die mit transgenen Kartoffeln oder Kontrollpflanzen bepflanzt waren oder unbepflanzt blieben, wurde Boden außerhalb des Rhizosphärenbereichs entnommen, extrahiert, und auf Erdextraktagar aufgestrichen. Die gebildeten Einzelkolonien wurden mit Hilfe des BIOLOG-Systems auf ihre biochemische Abbauleistung untersucht. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen unbepflanztem Boden, Boden mit nicht gentechnisch veränderten und Boden mit transgenen Kartoffelpflanzen festgestellt. Die Unterschiede innerhalb der Kategorien war jedoch groß.

Im nahen Wurzelbereich, der Rhizosphäre, sind symbiontische Mikroorganismen, wie Rhizobien, oder Streptomyceten von großer Bedeutung. Durch Wurzelausscheidungen der Pflanze sind die ökologischen Bedingungen in der Rhizosphäre aber auch für nicht-symbiotische Mikroorganismen sehr attraktiv. Keimzahlen und Stoffwechselaktivitäten sind daher in der Rhizosphäre höher als in nicht durchwurzelten Bereichen (SCHINNER et al., 1993).

## 2.2 Einfluß von Chemikalien auf Bodenmikroorganismen

Bei der Beurteilung eines Einflusses von Chemikalien auf die Bodenmikroflora werden häufig Auswirkungen auf die Stickstofffixierung und die Nitrifikation untersucht, da diese besonders empfindlich auf Umwelteinflüsse reagieren. Schon 1979 wurde die nicht-symbiotische Stickstofffixierung in Böden als besonders sensibler Indikator für eine Beeinflussung der Bodenmikroflora durch Mineralöl erkannt (HERSMAN & KLEIN, 1979).

Die kombinierte Messung von autotropher Nitrifikation und mikrobieller Respiration wurde zur Bestimmung der Toxizität von Anthrazenöl und Dicyandiamid für Bodenmikroorganismen herangezogen. Aufgrund der Sensitivität autotropher Nitrifizierer erscheint deren Aktivität geeignet als Indikator für die potentielle Toxizität der getesteten Chemikalien gegenüber Bodenmikroorganismen (REMDE & HUND, 1994).

GLANDORF et al. (1997) fassen in einem Übersichtsartikel die Ergebnisse von Studien zusammen, in denen ungezielte Auswirkungen von Pestiziden auf Mikroorganismen untersucht wurden. Aus diesen ging hervor, dass mikrobielle Aktivitäten, auch nach Zugabe unterschiedlicher Pestizide in Folge, nur vorübergehend beeinflusst werden. Auch natürliche abiotische Faktoren wie Temperaturveränderungen und Wasserverfügbarkeit reduzierten die Zahl und Aktivität von Mikroorganismen um mehr als 50%, wobei sich mikrobielle Populationen üblicherweise innerhalb von 60 Tagen erholen. Infolgedessen wurde eine 60 Tage dauernde Regenerationsphase als ökologisch tolerierbar angesehen. Auch Düngung, Fruchtwechsel, oder andere Bewirtschaftungsmaßnahmen verändern den biologischen Bodenanteil.

In einer Schweizer Untersuchung wurde der Einfluß der Schwermetallbelastung von Böden auf die Diversität und den physiologischen Zustand der Bodenmikroorganismen untersucht (LACZKO et al. 1997). Die mithilfe von Phospholipid-Fettsäure Mustern und ATP-Messungen ermittelten Daten weisen auf einen starken Einfluß der Cadmium-Konzentration im Boden und der Intensität der landwirtschaftlichen Nutzung auf die Diversität hin.

## 2.3 Diversität der Bodenmikroflora

Biologische Diversität ist über die Artenzahl (species richness) und die Verteilung der Individuenzahlen in den Arten (evenness) in einem Ökosystem definiert (BEGON et al. 1990). Die Diversität kann durch verschiedene Indizes (Simpson's oder Shannon's Diversitätsindex), die sowohl die Artenzahl als auch die Häufigkeit der Individuen in den Arten berücksichtigen, charakterisiert werden.

DeLONG (1996) unterscheidet vier, für die mikrobielle Ökologie wichtige, Niveaus der Diversität:

- die trophische Diversität
- die physiologische oder funktionelle Diversität
- die intraspezifische Diversität und
- die phylogenetische Diversität von Arten und höheren taxonomischen Kategorien.

Für alle Untersuchungen dieser natürlichen Diversität ist es wichtig, zuerst die dominierenden Arten (funktionellen Gruppen) zu bestimmen, um sich dann auf deren Untersuchung beschränken zu können. Diese Bestimmung ist aber bis heute in natürlichen Habitaten nur sehr selten durchgeführt worden.

Schätzungen der Anzahl der Bakterienarten pro Gramm Bodentrockengewicht reichen von  $4 \times 10^3$  bis  $10^4$  (TORSVIK et al., 1990; KLUG & TIEDJE, 1994). Davon können nur 1 bis 10% mit kultivierungsabhängigen Methoden isoliert werden (ALEXANDER 1977). Das kann unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass kultivierbare Bakterien rasch in einen nicht-kultivierbaren Zustand übergehen können (ROSZAK et al., 1984; COLWELL et al., 1985; OLIVER et al., 1991). Viele bisher unbeschriebene Bakterienarten können aber einfach deshalb nicht kultiviert werden, weil zur Zeit keine für sie geeigneten Wachstumsbedingungen bekannt sind. Mikroorganismen, deren Isolierung bisher noch nicht gelungen ist, konnten jedoch mithilfe molekularer Analysemethoden bestimmt werden (FRY et al., 1991; LaRIVIERE & SCHMIDT, 1991; KUSKE et al., 1997). Vergleichende Untersuchungen zur Identifizierung von Bakterien in aquatischen Systemen mit kultivierungsabhängigen und molekularbiologischen Methoden (16S-rDNA-Sequenzierung) zeigten große Unterschiede zwischen den Methoden auf, wodurch eine Vergleichbarkeit in keinem Fall gegeben war (DeLONG 1995).

In jüngerer Vergangenheit wurde deshalb von mikrobiellen Ökologen versucht, kultivierungsunabhängige Techniken zu entwickeln, die sowohl Populationsstudien als auch die Identifizierung von Mikroorganismen in natürlichen Proben ermöglichen. Obwohl bereits mehrere Studien zur bodenmikrobiellen Dynamik durchgeführt wurden (LIESACK & STACKEBRANDT, 1992; STACKEBRANDT et al., 1993; HOLBEN & HARRIS, 1995; UEDA et al., 1995; BORNEMAN et al., 1996; FELSKE et al., 1997; HEUER et al., 1997;), muß noch viel Arbeit geleistet werden, um detailliertere Informationen zur Diversität der Mikroorganismen in Böden zu gewinnen. Diesbezügliche Informationen sind besonders wichtig, da das Funktionieren von Ökosystemen weitgehend von bodenmikrobiologischen Vorgängen bestimmt wird. Deshalb sollten Mikroorganismen, gemeinsam mit den Vorgängen, die sie bewirken, untersucht werden um die Relevanz umweltbedingter Stressreaktionen und dadurch bedingte Veränderungen in der biologischen Diversität beurteilen zu können (KENNEDY & SMITH, 1995).

## 2.4 Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen

Bisher wurden verschiedene Böden mit Hilfe der 16S-rDNA-Analyse hinsichtlich der Artenzusammensetzung der Bodenbakterien untersucht (Beispiele in Tab. 2). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind jedoch nicht vergleichbar, da neben den sehr unterschiedlichen Bodentypen auch verschiedene Bodenschichten untersucht wurden. Außerdem wurden für die der 16S-rDNA-Analyse zugrundeliegende Polymerasekettenreaktion (PCR<sup>1</sup>) verschiedene Reaktionsbedingungen (Primer) verwendet.

Wenn man dennoch versucht diese Untersuchungen zusammenzufassen, unterstützen die Erkenntnisse jene aus kultivierungsabhängigen Experimenten, dass nämlich die Zusammensetzung der Bakterienarten in einem Boden je nach geographischer Lage, Klima, Bodenbeschaffenheit, Pflanzendecke, etc. variiert. In einem Fall (BORNEMAN et al., 1996) konnten zum Beispiel keine Vertreter des ansonsten „typischen“ Bodenbakteriums *Pseudomonas* gefunden werden.

---

<sup>1</sup> PCR (Polymerase chain reaction) ist durch die US-PatenteNr.: 4,683,195 und 4,683,202 (Eigentümer: Hoffmann-La-Roche Inc.) geschützt. Die Verwendung des PCR-Verfahrens ist lizenzpflichtig.

Tab. 2: Übersicht über Arbeiten zur Diversität von Bodenmikroorganismen.

Areal/Bodentyp	Zahl der untersuchten Sequenzen	Referenz
Wisconsin (USA) Kleewiese	124	BORNEMANN et al. 1996
Japan temperates Sojabohnenfeld	17	UEDA et al. 1995
Queensland, Australien, subtropischer saurer Waldboden	30	STACKEBRANDT et al. 1993

In aquatischen Systemen wurden mithilfe molekularbiologischer Methoden (16S-rDNA-Sequenzierung und DGGE-Analyse) große Unterschiede zwischen einzelnen Tiefen, Orten und Jahreszeiten gefunden (FUHRMAN et al. 1993, MURRAY et al. 1998). Jedoch konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakteriengruppen eine stark tiefenabhängige Verteilung aufweisen (FIELD et al. 1997). Auch diese Ergebnisse zeigen, dass in scheinbar homogenen Ökosystemen, wie der Wassersäule, offenbar kleinräumige Inhomogenitäten auftreten, die die Diversität von Mikroorganismen stark beeinflussen.

## 2.5 Rolle einzelner Bakterienarten

Bei der Beurteilung der Rolle bestimmter Bakterienarten ergeben sich mehrere Probleme:

- Die Abgrenzung von „Arten“ ist bei Prokaryoten sehr schwierig, obwohl durch 16S-RNA Analyse weitgehend definiert, aufgrund der großen genetischen Flexibilität bei Bakterien jedoch fragwürdig.
- Die Ökologie von Bakterien unter *in situ*-Bedingungen ist weitgehend unbekannt.
- Die meisten Untersuchungen wurden in Reinkulturen durchgeführt.

In der Regel erfolgt die Bewertung des Umweltverhaltens von Bakterien aufgrund der physiologischen Daten aus Reinkulturen. Dabei werden die komplexen Verhältnisse und Wechselwirkungen mit der biotischen und abiotischen Umwelt nicht berücksichtigt. Ein ökologisches System kann jedoch nicht als Summe von Reinkulturen angesehen werden.

Selbst über Bakterien, die, gentechnisch verändert, für Freisetzungen in Betracht gezogen werden, fehlen basale Daten (FÖRSTER 1998). Aus der Literaturstudie von FÖRSTER (1998) über *Bacillus thuringensis*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Rhizobium leguminosarum* und *Sinorhizobium meliloti* geht hervor, dass die Rolle dieser, ansonsten gut untersuchten Bakterien in natürlichen Ökosystemen nahezu unbekannt ist. So liegen keine Daten über deren Häufigkeit (Biomasse) oder deren räumliche Verteilung vor. Auch deren Rolle in Stoffkreisläufen ist mit Ausnahme des Kohlenstoff- und, bei Rhizobien, Stickstoffkreislaufs kaum untersucht. Die vorliegenden Daten zur Biologie oder den Einfluß verschiedener Umwelteinflüsse auf die oben genannten Arten entstammen meist Untersuchungen in Reinkulturen oder Mikrokosmen, und können daher nur bedingt auf natürliche Ökosysteme übertragen werden.

### 3 BISHERIGE ERFAHRUNGEN MIT DEM MONITORING TRANSGENER ORGANISMEN

#### 3.1 Zielsetzungen beim Monitoring transgener Pflanzen

Bei bisherigen Untersuchungen zum Thema transgene Pflanzen spielen mögliche Auswirkungen auf die Bodenmikroflora, mit Ausnahme des horizontalen Gentransfers, nur eine untergeordnete Rolle. Im Folgenden werden beispielhaft einige Arbeiten behandelt, die sich mit Umweltwirkungen bzw. Monitoringprogrammen von gentechnisch veränderten Pflanzen beschäftigen, deren Ziel aber nicht Bodenmikroorganismen sind. Eine detaillierte Analyse dieser Arbeiten war nicht Aufgabe der vorliegenden Studie.

Neben Untersuchungen zum allergenen Potential und zur Toxizität der neu in den Pflanzen exprimierten Proteine werden auch solche zu ökologischen Fragestellungen durchgeführt bzw. gefordert. Im Mittelpunkt dabei stehen die Auskreuzung, das Verwildern und die Wirkung auf Ziel- und Nicht-Zielorganismen (TRAXLER 1998). So wird eine Erfassung von möglichen Kreuzungspartnern vor der Freisetzung, und ein Monitoring mit molekularbiologischen Methoden zum Auftreten von Hybriden bzw. ausgewilderten Nachkommen während und nach der Freisetzung gefordert. Bei insektenresistenten Pflanzen ist ein Resistenzmanagementplan erforderlich. Meist wird das Schaffen sogenannter Refugien oder das Mischen mit nicht-transgenem Saatgut von den Saatgutfirmen vorgeschrieben. Negative Effekte auf höhere Glieder in der Nahrungskette konnten bei Bt-Pflanzen in Laborversuchen beobachtet werden (HILBECK et al. 1998). Eine andere aktuelle Publikation beschreibt die Auswirkungen von in transgenen Pflanzen exprimiertem *Bacillus thuringiensis* Toxin auf zwei nicht-Ziel Arthropoden (YU et al., 1997).

In einer, vom deutschen Umweltbundesamt in Auftrag gegeben, Studie zur Erstellung eines Monitoringkonzepts werden Methodenvorschläge auf einer Fall-zu-Fall Grundlage behandelt (UMWELTBUNDESAMT 1998). Dabei wird in Wirkungen auf Ziel- und Nichtzielökosysteme sowie auf die landwirtschaftliche Praxis unterschieden. Die weitere Unterteilung unterscheidet zwischen Ausbreitung, Wirkung auf die Biodiversität und Wirkung auf evolutive Prozesse. Detailliert werden diese Punkte anhand derzeit relevanter, gentechnisch veränderter Kulturpflanzen, wie Raps, Mais, Rübe, Kartoffel und Pappel behandelt.

In einer schweizer Studie (KÄPPELI & SCHULTE 1998) zur Beurteilung gentechnisch veränderter Organismen werden für transgene Pflanzen folgende Aspekte als besonders wichtig bezeichnet:

- Ausbreitung innerhalb und außerhalb landwirtschaftlicher Flächen
- Auskreuzung mit verwandten Wildarten
- Gentransfer transgener DNA auf Bodenmikroorganismen
- die Entstehung neuer Viren bei virusresistenten Pflanzen
- Wechselwirkung mit Nicht-Zielorganismen

Auch eine aktuelle niederländische Dissertation (METZ 1997) beschäftigt sich mit Pollenverbreitung, Hybridisierungspotential, Neigung zur Verunkrautung, „Überspringen“ der Herbizidtoleranz auf verwandte Unkräuter, Enzymaktivität und Allergiepotehtial des exprimierten Proteins im menschlichen Verdauungstrakt und Expressionsverlust in Tochtergenerationen von transgenen Rapspflanzen.

Analog dazu beschäftigt(e) sich die Mehrzahl der derzeit laufenden bzw. kürzlich abgeschlossenen EU-Projekte zum Themenbereich Sicherheitsaspekte transgener Pflanzen mit

- Ausbreitung transgener Eigenschaften über Pollen und Auskreuzen in verwandte Wildpflanzenpopulationen, sowie Hybrideigenschaften und Lebensfähigkeit dieser Kreuzungsprodukte; Samenverbreitung; Stabilität bzw. Verlust der transgenen Merkmale in Folgegenerationen; Morphologie und Populationsdynamik der transgenen Pflanzen.
  - Agronomic environmental and genetic assessment of transgenic crop plants (project reference BAP\*0418, abgeschlossen 12.90, durchgeführt von Imperial Chemical Industries, Plant Protection Division, Manchester, UK)
  - Safety assessment of the deliberate release of two model transgenic crop plants, oil-seed rape and sugar beet (project reference BIOT0298, abgeschlossen 03.94, geleitet von Plant Genetic Systems NV, Gent, Belgien)
- Auswirkungen auf Nutzinsekten.
  - Environmental impact of transgenic plants on beneficial insects (project reference BIO4960365, begonnen 10.96, geleitet vom Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-CNRS), Bures-sur-Yvette, Frankreich)

Eine Auswahl relevanter EU-Projekte ist in Anhang 2 dargestellt.

### 3.2 Monitoring von Mikroorganismengemeinschaften in der Phyllosphäre transgener Pflanzen

Untersuchungen, die dem Monitoring von Einflüssen transgener Pflanzen auf die Bodenmikroflora ähnlich sind, betreffen den Nachweis von Veränderungen in der pflanzenassoziierten Mikroflora auf den Blättern (Phylloplan). Exemplarisch sollen hier zwei Arbeiten genannt werden:

Bei Feldversuchen mit transgenen Kartoffelpflanzen, welche das insektenwirksame Endotoxin von *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) exprimierten, wurden Veränderungen in der Gesamtzahl der Bakterien und Pilze, sowie in der Diversität der Pilzpopulation im Verlauf einer Vegetationsperiode mittels Kultivierung auf verschiedenen Nährböden untersucht (DONEGAN et al., 1996). Dazu wurde die Mikroflora auf jeweils drei phänologischen Blattstadien (grün, gelb und braun) von transgenen Kartoffelpflanzen und nicht veränderten Linien, die stattdessen mit einem systemischen Insektizid oder rein mikrobiellem Btt behandelt wurden, verglichen. Es konnten wenige signifikante, aber vorübergehende Unterschiede in der Phylloplan-Mikroflora gefunden werden.

In einem anderen Experiment wurde untersucht ob signifikante Unterschiede zwischen der mikrobiellen Gemeinschaft der Phyllosphäre von transgenen Kartoffelpflanzen, die das T4-Phagenlysozym exprimierten, und der von nicht transgenen Kartoffelpflanzen nachzuweisbar sind (HEUER & SMALLA, 1997b). Von den Blättern transgener Pflanzen wurden signifikant weniger gram-positiven Bakterien isoliert als von nicht transgenen. Der Versuch, mit Hilfe der Bestimmung von Stoffwechselleistungen der gesamten Bakteriengemeinschaft diesen Unterschied zu bestätigen, scheiterte aber. Die vermutliche Ursache dafür liegt darin, dass gram-positive Bakterien nur geringfügig zur Ausprägung des Abbaumusters der verwendeten Kohlenstoff-Quellen beitragen.

### 3.3 Monitoring transgener Pflanzen hinsichtlich der Bodenmikroflora

Derzeit existiert nur eine geringe Anzahl von Studien über Auswirkungen transgener Pflanzen auf die Nicht-Zielbodenmikroflora. Die Forschungen haben sich dabei überwiegend auf mykorrhizobielle Symbiose und Rhizobien konzentriert, nur wenige haben sich mit der saprophytischen Bodenmikroflora beschäftigt (GLANDORF et al., 1997).

Auch in der Projektdatenbank der EU (CORDIS-Datenbank) konnten nur zwei Projekte gefunden werden, die die Auswirkungen transgener Organismen auf Bodenmikroorganismen zum Inhalt haben bzw. hatten und zwar

- Gentransfer zwischen gentechnisch veränderten Mikroorganismen bzw. zwischen transgenen Pflanzen und Mikroorganismen (Analysis of gene transfer between microorganisms and plants; project reference BIOT0282, abgeschlossen 03.94, geleitet vom Institut Pasteur, Paris, Frankreich)
- Interaktionen gentechnisch veränderter Mikroorganismen mit Mikroorganismenarten, die in der Rhizosphäre wichtiger europäischer Agrarpflanzen vorkommen; Auswirkungen antifungaler Proteine, die von transgenen Pflanzen exprimiert werden, auf Mikroorganismengemeinschaften und deren Diversität in der Rhizosphäre (Interactions between microbial inoculants and resident populations in the rhizosphere of agronomically important crops in typical soils; project reference BIO4960027, begonnen 11.96, geleitet vom University College Cork, Cork, Irland)

Bei der Anwendung gentechnisch veränderter, herbizidresistenter Pflanzen ist auch die veränderte landwirtschaftliche Praxis zu berücksichtigen. So wird Glufosinat nicht mehr nur zur Ernteerleichterung (Desiccation) bei Raps und im Voraufbau, sondern während der Vegetationsperiode mehrmals angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass Bodenmikroorganismen durch Glufosinat stark geschädigt werden (SANDERMANN 1992). So wurden nach Isolierung etwa 20% der Pilze und 40% der Bakterien durch Glufosinat-ammonium supprimiert. Obwohl alle Untersuchungen die Effekte auf Stoffwechsellleistungen im Boden, wie Bodenatmung oder Nitrifikation, als vorübergehend beschreiben, können Effekte auf die mikrobielle Diversität nur schwer abgeschätzt werden (AHMAD & MALLOCH, 1995).

#### 3.3.1 Mykorrhiza und Rhizobien

Die Wahrscheinlichkeit, dass transgene Pflanzen die Bodenmikroflora beeinflussen, ist, vor allem in der Zeit des Pflanzenwachstums, aufgrund der räumlichen Nähe im Rhizosphärenbereich besonders groß. Das gilt insbesondere für Mikroorganismen, die Symbiosen mit Pflanzenwurzeln eingehen, also für Mykorrhiza-bildende Pilze und für stickstofffixierende Knöllchenbakterien, sogenannte Rhizobien.

GLANDORF et al. (1997) behandeln in einem Übersichtsartikel drei Studien, die sich mit dem Nachweis möglicher Effekte transgener, antimikrobielle Proteine produzierender, Tabakpflanzen auf Mykorrhiza-Pilze beschäftigten. Verschiedene konstitutiv exprimierte Chitinasen, sowie Klasse III  $\beta$ -1,3-Glucanasen hatten demnach keinen Einfluß auf die Symbiose transgener Pflanzen mit solchen Pilzen. Einzig die Expression einer sauren Tabak  $\beta$ -1,3-Glucanase (Klasse II) führte, im Vergleich zu Kontrollpflanzen, zu deutlichen Veränderungen in den pilzlichen Strukturen und zu einer stark verzögerten Besiedelung der Pflanzenwurzeln durch den Mykorrhiza-Pilz *Glomus mosseae*. Glandorf et al. ziehen daraus den Schluß, dass große Mengen der getesteten antifungalen Proteine in transgenen Tabakpflanzen mykorrhizobielle Symbiosen beeinflussen können. Da im Moment noch keine Literatur über andere Pflanze-Pilz-Systeme, z. B. über Auswirkungen transgener Pflanzen, die *in vitro* antifungal wirkende Ribosomen-inhibierende Proteine oder Thionine exprimieren, verfügbar ist, können derzeit keine allgemeinen Schlüsse gezogen werden.

### 3.3.2 Saprophytische Mikroorganismen

Bei einigen Studien über die Sicherheit transgener Pflanzen wurde die saprophytische Bodenmikroflora in die Untersuchungen miteinbezogen. Versuche, einen Einfluß transgener Tomaten- bzw. Melonenpflanzen auf die Bodenmikroflora über Lebendkeimzahlbestimmungen von Bakterien, Actinomyceten und Pilzen nachzuweisen, ergaben keine statistisch abgesicherten Unterschiede zwischen einer Bepflanzung mit transgenen Pflanzen und einer Bepflanzung mit nicht transgenen Ausgangspflanzen (ASAKAWA et al., 1993; TABEL et al., 1994). Auch transgener Reis mit verminderter Produktion des Speicherproteins Glutelin führte zu keinen signifikanten Veränderungen in den Koloniezahlen von Bakterien und Pilzen (AJISAKA et al., 1994).

Die Tatsache, dass mit Hilfe von Lebendkeimzahlbestimmungen bisher keine signifikanten Unterschiede in den Auswirkungen von transgenen und nicht transgenen Pflanzen auf Bodenmikroorganismen gefunden werden konnten, weist darauf hin, dass die Empfindlichkeit dieser Methode für Monitoringaufgaben zu gering sein dürfte.

Transgene Rapspflanzen, die eine Bohnen-Endochitinase mit schwacher lytischer Aktivität exprimierten, wurden hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf wurzellosoziierte Bakterien und Pilze im allgemeinen, sowie auf *Bacillus* spp., fluoreszierende Pseudomonaden und *Pseudomonas corrugata* Populationen in drei Bodentypen untersucht (DeGRAEVE, 1994). Nach 45 Tagen Wachstum der Pflanzen konnten mit Lebendkeimzahlbestimmungen keine quantitativen Unterschiede in der wurzellosoziierten Mikroflora transgener Pflanzen und Kontrollpflanzen nachgewiesen werden. Genotypische und phänotypische Unterschiede bei *P. corrugata*, die die dominierende kultivierbare Art darstellte, wurden unter Verwendung verschiedener biochemischer und genetischer Methoden untersucht. Unter anderem wurde ein BIOLOG-System (BIOLOG, Hayward, CA, USA) zum Nachweis von Unterschieden in der Verwertung einer Reihe von Kohlenstoffquellen verwendet. Um die Stämme auf genetischer Ebene vergleichen zu können, wurden spezifische DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert und einer RFLP-Analyse unterzogen. Zusätzlich wurden verschiedene Regionen der 16S rDNA der Stämme verglichen. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Stämmen gefunden, die auf transgene Pflanzen oder auf Kontrollpflanzen zurückzuführen waren. Es konnten also keine direkten oder indirekten Auswirkungen transgener Pflanzen auf kultivierbare saprophytische Bodenmikroorganismen beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu konnten vorübergehende signifikante Veränderungen in Gesamtzahl, Artenzusammensetzung und DNA Fingerprintmustern von Bodenmikroorganismen, die mit transgenen Baumwollpflanzen in Kontakt kamen, nachgewiesen werden (DONEGAN et al., 1995). Diese Pflanzen exprimierten das *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Endotoxin, das eine Insektenresistenz bewirkt. Für den Versuchsablauf wurde zerkleinertes Blattmaterial mit verschiedenen Böden vermischt. Die angewandten Methoden umfaßten

- Lebendkeimzahlbestimmungen von Bakterien und Pilzen mit nachfolgender Identifikation der Bakterienarten mittels des BIOLOG GN oder GP Mikrotiterplattensystems
- Bestimmung des Musters der Substratverwertung der Gesamtheit der Bodenbakterien mittels BIOLOG GN Mikrotiterplatten
- Bestimmung von Gesamt-DNA-Gehalt und 16S rDNA Fingerprintmustern von Bodenproben.

Vergleichende Versuche mit Boden, dem das reine Toxin zugefügt wurde und mit unbehandeltem Boden ergaben keine Unterschiede, es zeigten sich aber Unterschiede zwischen der Anwendung von transgenem Pflanzenmaterial und gentechnisch unveränderten Mutterpflanzen. Die beobachteten Effekte waren daher nicht auf die Expression des Toxins zurückzuführen, sondern vermutlich auf unbeabsichtigt veränderte Charakteristika, die durch die gentechnische Veränderung der Pflanze entstanden sind. Weiters wurde festgestellt, dass die Versuchsergebnisse in Abhängigkeit von Ton- und Humusgehalt der verwendeten Böden deutlich differieren.

In einer Studie von DONEGAN et al. (1996) wurden Proben von mit transgenen Kartoffelpflanzen bzw. mit kommerziellen Sorten, die mit systemischen Insektiziden behandelt worden waren, bepflanzten Böden auf das Vorkommen pflanzenpathogener Mikroorganismen überprüft. Bei den Rhizosphärenpopulationen der Pathogene *Pythium* spp., *Fusarium* spp. und *Verticillium dahliae* konnten keine Unterschiede in den Keimzahlen festgestellt werden. Am Rande sei bemerkt, dass die transgenen Kartoffel trotzdem längerlebig waren als die herkömmlichen, mit systemischem Insektizid behandelten.

### 3.4 Monitoring von Auswirkungen transgener Mikroorganismen

Auch von der Freisetzung transgener Mikroorganismen werden unterschiedliche Auswirkungen auf die Umwelt erwartet, wie die im Folgenden beispielhaft angeführten Veröffentlichungen über Versuchsansätze, mit deren Hilfe Effekte transgener Mikroorganismen nachgewiesen werden sollten, zeigen. Eine umfassende Literaturzusammenstellung zu dieser Thematik bzw. Analyse der Ergebnisse war nicht Aufgabe der vorliegenden Studie.

In einer Untersuchung sollte der Einfluß des die Rhizosphäre besiedelnden Bakteriums *Azospirillum lipoferum* auf den Efflux von Nährstoffen aus landwirtschaftlichen Böden mithilfe von Mikrokosmen bestimmt werden (FREDRICKSON et al., 1990). Dieser Efflux hängt von Versickerung und Aufnahme der Nährstoffe durch Pflanzen ab. Das Bodeneluat aus bepflanzten Mikrokosmen, die mit transgenen Bakterien beimpft wurden, wurde auf den Gehalt an Sulfat, Phosphat, Ammonium, Nitrit, Nitrat, gelöstem organischen und anorganischen Kohlenstoff untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich dabei nur zwischen verschiedenen Böden, nicht aber infolge einer Inokulation mit transgenen wurzelkolonisierenden Bakterien.

WANG et al. (1991) untersuchten die Auswirkungen rekombinanter *Streptomyces* species mit erhöhter Ligninabbaufähigkeit auf die Kohlenstoffmineralisation in einem Bodenökosystem. Die rekombinanten Bakterien bewirkten, an der CO<sub>2</sub>-Produktion gemessen, gegenüber Wildtyp-Stämmen eine vorübergehend signifikant erhöhte Kohlenstoff-Mineralisierungsrate, die durch synergistische Effekte mit der natürlichen Bodenmikroflora erklärt wurde.

Die beiden oben angeführten Studien werden, gemeinsam mit weiteren, von SEIDLER (1992) in einem Übersichtsartikel behandelt. In diesem findet sich eine tabellarische Zusammenstellung, von 27 nicht-molekularbiologischen Methoden die zur Untersuchung von ökologischen Auswirkungen gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GVM) oder sogenannter "microbial pest control agents" (MPCA) herangezogen wurden. Ausgewählte Methoden werden erklärt und die Ergebnisse kurz erläutert, wobei von besonderem Interesse ist, dass beobachtete Effekte meist von kurzer Dauer waren, und nur manche innerhalb des jeweiligen Beobachtungszeitraumes irreversibel blieben. Weiters beinhaltet der Artikel eine Übersicht über GVMs, die auf Auswirkungen auf das Ökosystem überprüft worden waren.

1991 gelang der Nachweis horizontalen Gentransfers von transgenen Donor- auf nicht transgene Rezipientenzellen durch Konjugation in nicht sterilem Boden (KINKLE & SCHMIDT, 1991).

DOYLE et al. (1995) fassen den Erkenntnisstand zu Auswirkungen gentechnisch veränderter Mikroorganismen auf Mikroorganismenpopulationen und Prozesse in natürlichen Habitaten zusammen. In dem ausführlichen Artikel werden unter anderem Auswirkungen von GVM auf Mikroorganismenpopulationen und die Überlebensdauer von GVM in Wasser, Klärschlamm und Boden behandelt und Daten zum Gentransfer solcher Mikroorganismen im Boden zusammengefaßt.

1996 ergab eine Studie KOZDROJ, dass es im Boden zu keiner Verdrängung natürlich vorkommender Wildtyp-*Pseudomonas* durch transgene *Pseudomonas* derselben Art kommt, wobei der Nachweis über Zellzahlbestimmungen geführt wurde. Die transgenen Bakterien zeigten darüberhinaus verminderte biologische Fitness.

Weiters wurde gezeigt (LEI et al., 1996), dass gentechnisch veränderte *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* einen erhöhten Stickstoffgehalt und erhöhte Biomassebildung von Reispflanzen bewirken.

### 3.5 Anfragen bei Industrieunternehmen

Es wurde davon ausgegangen, dass an öffentlichen Forschungseinrichtungen erzielte Ergebnisse publiziert und im Rahmen der Literaturrecherche erfaßt wurden.

Darüberhinaus wurden mehrere Saatgut erzeugende Firmen per Fax kontaktiert und um Auskunft darüber gebeten, ob im Rahmen der Sicherheitsforschung zu den von ihnen produzierten, transgenen Pflanzen auch mögliche Auswirkungen auf Bodenmikroorganismen untersucht worden sind. Im Speziellen wurde nach Untersuchungen zum horizontalen Gentransfer und nach einer Überwachung von Keimzahlen und Diversität der Bodenmikroorganismen gefragt. Die Firmen Novartis, Plant Genetic Systems und Van der Have haben unsere Anfrage wie folgt beantwortet:

Die Anfrage an Herrn Dr. Caviezel (Novartis Seeds, Wien) wurde an Frau Dr. Ahl-Goy (Novartis Seeds, Basel) weitergeleitet. In einem ausführlichen Antwortschreiben erörtert sie wie folgt: "Novartis Seeds hat die Frage eines potentiellen horizontalen Gentransfers [...] mit dem 'Modellbakterium' *Escherichia coli* experimentell bearbeitet. [...] Aus unseren Versuchen läßt sich der Schluß ziehen, dass die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von transgenem Mais auf Mikroorganismen äußerst gering ist und so nahe bei Null liegt, wie irgend wissenschaftlich nachgewiesen werden kann. Unabhängige Experten, die von der EU-Kommission um ihre Meinung zu diesem Aspekt gebeten wurden, kamen zu einer ähnlichen Schlußfolgerung, ebenso wie eine Gruppe von Wissenschaftern, die an einem Meeting zum Thema '*Antibiotic Resistance via the Food Chain: Fiction or Reality?*' teilnahmen, das von der *Foundation for Nutritional Advancement* organisiert worden war. [...] Ich möchte Sie auf jeden Fall darauf aufmerksam machen, dass zwei der drei Gene, die in unseren Bt-Mais eingefügt worden sind (das *Bt* Gen und das *pat* Gen), ursprünglich aus Bodenmikroorganismen stammen, und dass das dritte Gen, das *bla* Gen, ein ubiquitäres Gen ist. Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Bodenmikroorganismus eines dieser drei Gene von einem anderen Mikroorganismus erhält um einige Größenordnungen höher als die Wahrscheinlichkeit, es von einer transgenen Pflanze zu erhalten. Zusätzlich ist eine Expression von *Bt* und *pat* Genen, sollten sie auf Mikroorganismen übertragen werden, nicht zu erwarten, da diese an eukaryotische Promotoren gebunden sind. [...] Darüberhinaus haben wir errechnet, dass eine Sprüh-Applikation von mikrobiellen Bt-Präparaten zu weit größeren Mengen von 'zusätzlichem' Bt Protein im Boden führt, als der Anbau unseres Bt-Maises, auch wenn man den Eintrag des Pflanzenmaterials nach der Ernte berücksichtigt."

Für Plant Genetic Systems (Belgien) antwortete Frau Dr. Huybrechts. PGS hätte beispielsweise mit transgenen Rapspflanzen sowohl Untersuchungen zum horizontalen Gentransfer auf Bodenmikroorganismen durchgeführt, als auch die bakteriellen Rhizosphärenpopulationen von transgenen und nicht transgenen Pflanzen im Verlauf der Freisetzungsperiode qualitativ und quantitativ analysiert. Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden nicht mitgeteilt.

Soweit Herr Dr. Saat (VanderHave, Niederlande) bekannt ist, sucht seine Firma nicht nach horizontalem Gentransfer. Er hat außerdem die Bitte um Auskunft Anfang 1998 an die niederländische Behörde weitergeleitet. Bis zum Ende der Bearbeitung dieser Studie ist keine weitere Nachricht eingetroffen.

## 4 ANSÄTZE FÜR DAS MONITORING TRANSGENER PFLANZEN

Wie bereits erläutert, muß bei dem Nachweis von Effekten, die von transgenen Pflanzen hervorgerufen werden, in erster Linie beachtet werden, wie durch die gentechnische Veränderung phänotypische Änderungen der Pflanze herbeigeführt werden. Wenn nur ein oder wenige Gene in das Pflanzengenom eingefügt werden, ist es möglich, die Effekte dieser neuen Gene relativ genau zu bestimmen, indem direkte Vergleiche zwischen dem transgenen Genotyp und der entsprechenden nicht transgenen Ausgangspflanze angestellt werden (DALE & McPARTLAN, 1992).

Die möglichen Ansätze für ein Monitoring von Bodenmikroorganismen sollen im Folgenden erläutert werden.

Es kann untersucht werden:

- ob horizontaler Gentransfer stattfindet; z. B. ob bei Einsatz eines Antibiotikaresistenz-Markergens im Boden vermehrt Bakterien mit erhöhter Antibiotikaresistenz auftreten
- ob die transgene Pflanze im Vergleich zu einer herkömmlichen Nutzpflanze derselben Art zu Veränderungen in der Gesamtzahl und zu Verschiebungen in der Diversität der Bodenmikroorganismen führt
- ob die transgene Pflanze im Vergleich zu einer herkömmlichen Nutzpflanze derselben Art Veränderungen der Stoffwechselaktivitäten von Bodenmikroorganismen bewirkt
- ob die transgene Pflanze im Vergleich zu einer herkömmlichen Nutzpflanze derselben Art eine Veränderungen von in den Boden eingebrachten Indikatororganismen oder im Boden vorkommenden Leitorganismen bewirkt.

Einige dieser Ansätze werden auch in dem EU-Projekt "Interactions between microbial inoculants and resident populations in the rhizosphere of agronomically important crops in typical soils" (project reference BIO4960027, begonnen 11.96, geleitet vom University College Cork, Cork, Irland) verfolgt.

Im Rahmen dieses Projektes sollen folgende Methoden zur Kontrolle von Veränderungen in Bodenmikroorganismen-Populationen angewandt werden:

- Überwachung dominanter Bakterien- und Pilzgruppen durch Kultivierung auf Selektivmedien (Mykorrhiza-Pilze, pathogene Pilze wie *Pythium*, Bakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter* und *Bacillus*)
- Biomassebestimmungen mittels Fumigations/Respirationstechniken, Bestimmung der ATP-Konzentration im Boden, Quantifizierung biochemischer Marker (z. B. Chitin zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse)
- Bestimmung der Häufigkeit des Gentransfers rekombinanter DNA von gentechnisch veränderten Stämmen auf natürlich vorkommende Mikroorganismen
- Bestimmung von Enzymaktivitäten (Cellulase, Chitinase,  $\beta$ -Galactosidase, Glucanase, Phosphatase, Urease) in Boden-Mikrokosmen
- molekulare Identifizierung von Bodenmikroorganismen: auf Artebene mittels PCR von 16S rDNA und nachfolgender Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse; auf Stamm-Ebene mittels Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analyse

Dabei werden hauptsächlich die Auswirkungen des Einbringens von Wild-Typ Stämmen oder gentechnisch veränderten mikrobiellen Inokula, von denen eine positive Beeinflussung der Agrarerträge erhofft wird, auf biologische Schlüsselkomponenten in der Rhizosphäre untersucht.

Solche Mikroorganismen werden als

- Biodünger: Mikroorganismen, die die Bodenfruchtbarkeit verbessern und zum Pflanzenwachstum beitragen
- Phytostimulatoren: Mikroorganismen, die Substanzen wie Vitamine oder Pflanzenhormone produzieren und dadurch zur Pflanzengesundheit bzw. zu höheren Ernteerträgen beitragen
- Biopestizide: Mikroorganismen, die antagonistisch gegen phytopathogene Mikroorganismen wirken

bezeichnet, und könnten im Sinne einer nachhaltigen Landwirtschaft einmal verstärkt anstelle von Mineraldüngern und chemischen Pestiziden eingesetzt werden.

Obwohl dieses Projekt gentechnisch veränderte Mikroorganismen und deren Auswirkungen zum Inhalt hat, können viele der dabei verwendeten und entwickelten Methoden auch für Monitoringprogramme zur Untersuchung von Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen verwendet werden.

#### 4.1 Nachweis von horizontalem Gentransfer durch Transformation

Bisherige Untersuchungen zum Nachweis einer Übertragung von Fremd-DNA aus transgenen Pflanzen auf Bodenmikroorganismen kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass eine solche zwar möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich ist.

In Mikrokosmosexperimenten wurde Mycel des Pilzes *Aspergillus niger* in sterilem Boden mit sterilem transgenem Pflanzenmaterial inokuliert (HOFFMANN et al., 1994). Es konnte nur eine einzige transgene Kolonie von *A. niger* nachgewiesen werden, in der die gentechnisch eingefügte Eigenschaft stabil exprimiert wurde. Über Effizienz, Auftreten in natürlichen Habitaten und Mechanismen eines solchen horizontalen Gentransfers konnten bei dem beschriebenen Versuchsansatz keine Erkenntnisse gewonnen werden.

Im Forschungszentrum Seibersdorf durchgeführte Experimente ergaben, dass die Wahrscheinlichkeit für die Übertragung eines Gens aus transgenen Pflanzen auf das "Modellbakterium" *Agrobacterium tumefaciens*, ein in der Natur häufiges Bodenbakterium, das fähig ist, DNA durch Transformation zu übertragen, unter natürlichen Bedingungen extrem gering ist. Dabei wurde in Kartoffel ein Gen eingebaut, das eine Resistenz gegen Chloramphenicol hervorruft. Bei erfolgreicher Übertragung dieses Gens auf *Agrobacterium* wären solcherart transformierte, resistente Bakterien leicht selektionierbar (BERENYI et al., 1995). Unter optimierten Laborbedingungen (d. h. Einsatz von linearisierter DNA, frei im Boden vorliegend) gelang der Nachweis von horizontalem Gentransfer (Häufigkeit: 1 Übertragung/kg eingesetzte DNA), unter naturnahen Bedingungen (Kokultivierung von transgenen Kartoffelpflanzen und *Agrobacterium*) jedoch nicht.

Auch bei dem Versuch, horizontalen Gentransfer aus transgenen Kartoffeln auf *Erwinia chrysanthemi*, ein eng mit Kartoffel assoziiertes pathogenes Bakterium, nachzuweisen, war eine DNA-Übertragung nur unter Laborbedingungen (Elektroporation, Verwendung von Plasmid-DNA) nachweisbar (SCHLÜTER et al., 1995), wobei die Transferfrequenz bei  $6,3 \times 10^{-2}$  lag. Die sukzessive Annäherung der Versuchsbedingungen an naturnahe Verhältnisse führte zu einer kalkulierten maximalen Transferrate von  $7,5 \times 10^{-14}$  unter natürlichen Bedingungen.

Die Transformation von natürlich kompetenten Bakterien (*Acinetobacter* sp.) durch DNA gentechnisch veränderter Pflanzen wurde von GEBHARD & SMALLA (1998) beschrieben. Dabei wurde die Übertragung von Gen-Bruchstücken unter der Voraussetzung des Vorhandenseins homologer Sequenzen nachgewiesen. Die Transferraten für die Übertragung von DNA aus homogenisiertem Pflanzenmaterial werden mit  $1,5 \times 10^{-10}$  angegeben, von isolierter DNA mit  $10^{-7}$ - $10^{-8}$ .

Die Beobachtung, dass eine Annäherung der Versuchsbedingungen an natürliche Verhältnisse mit einer sinkenden Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von horizontalem Gentransfer korreliert, wird auch von Mikrokosmosexperimenten mit gentechnisch veränderten Bakterien bestätigt (SCHÄFER 1996). Dabei wurden unter gleichen Bedingungen in nicht sterilen Böden stets sehr viel niedrigere Transferfrequenzen durch Konjugation gefunden als in sterilen. Bislang konnte in unsterilem Boden zwar die Transformation eines Bakteriums mit chromosomaler DNA nachgewiesen werden, nicht aber ein Transfer genetischer Information von intakten Donorzellen auf einen Rezipienten durch natürliche Transformation.

Der Nachweis horizontalen Gentransfers kann mittels kultivierungsabhängiger Methoden, wie z. B. über das Auftreten von Resistenzen oder mittels kultivierungsunabhängiger Methoden über den Nachweis der Fremd-DNA im Bakteriengenom mittels PCR-Analyse oder Hybridisierung mit einer Gensonde erfolgen.

## **4.2 Nachweis von Veränderungen der Diversität von Bodenmikroorganismen**

### **4.2.1 Bestimmung der Biomasse**

#### **4.2.1.1 Bakterienkeimzahlbestimmungen**

Hier sind zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze zu unterscheiden:

- Lebendkeimzahlbestimmung auf festen und in flüssigen Nährmedien, d. h. indirekt, kultivierungsabhängig
- Mikroskopische Keimzahlbestimmungen, d. h. direkte Bestimmung der Mikroorganismenzahl

Keimzahlbestimmungen mittels kultivierungsabhängiger Methoden, bei denen sich aus den in der Probe enthaltenen Keimen zunächst Kolonien entwickeln müssen (Plattengußverfahren, MPN-Verdünnungsverfahren), erfassen wegen des häufigen Auftretens von Zellaggregaten, wegen der unterschiedlich starken Adsorption der Organismen an Bodenpartikel und aufgrund des Unvermögens vieler Bodenorganismen, auf den verwendeten Kulturmedien zu wachsen, nur einen kleinen, unbekanntem Anteil der tatsächlichen mikrobiellen Biomasse (SCHINNER et al. 1993). Außerdem ist nicht sichergestellt, dass sämtliche Kolonien aus Einzelzellen hervorgegangen sind.

Mit direkten mikroskopischen Keimzahlbestimmungen ist es nicht möglich zwischen toter und lebender, aber nicht vermehrungsfähiger, und lebender Biomasse zu unterscheiden. Dafür werden aber auch all jene Organismen erfaßt, die sich durch kultivierungsabhängige Verfahren nicht bestimmen lassen, da für die Quantifizierung von vielen Gruppen wie stickstofffixierenden Bakterien, Nitrifikanten, Cellulose-abbauenden und anaeroben Bakterien jeweils selektive Nährmedien erforderlich sind. Dadurch liegt die ermittelte Gesamtbakterienzahl um eine oder mehrere Zehnerpotenzen höher, als die mit kultivierungsabhängigen Verfahren gefundene Lebendkeimzahl.

#### **4.2.1.2 Quantifizierung von Zellbestandteilen von Bodenmikroorganismen**

Zellbestandteile die zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse herangezogen werden, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Sie sollten nur in der lebenden Zelle vorkommen, d. h. nach dem Absterben der Zelle rasch abgebaut werden und, je nach Anwendung, für eine bestimmte Organismengruppe spezifisch sein. Außerdem sollte die Konzentration des zu bestimmenden Stoffs in der Zelle möglichst konstant sein, um die Umrechnung auf Biomasseeinheiten zu ermöglichen. Diese Umrechnung erfolgt anhand einer Eichung mit direkten Nachweismethoden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt meist durch Gas- oder

Flüssigkeitschromatographie (GC oder HPLC) oder photometrisch. Das Hauptproblem bei diesen Methoden stellt die quantitative Extraktion des jeweiligen Stoffs aus den Bodenproben dar.

Ergosterol wird zur Bestimmung der pilzlichen, Muraminsäure und Diaminopimelinsäure zur Bestimmung der bakteriellen Biomasse verwendet. Nucleinsäuren, ATP und Phospholipide kommen in allen lebenden Zellen vor und werden deshalb zur Bestimmung der Gesamtbio-masse herangezogen.

#### **4.2.1.3 Indirekte Bestimmung der Biomasse der Bodenmikroorganismen**

Eine Möglichkeit stellen die sogenannten Fumigations-Methoden, bei denen alle Organismen durch begasen mit Chloroform abgetötet werden, dar. Bei Fumigation-Inkubations-Methoden wird nach dem Abtöten wieder ein Teil der Bodenprobe zugesetzt und der Abbau der toten Mikroorganismen durch das Inokulum über Bodenatmungsmessung bestimmt. Da dabei das gebildete Kohlendioxid gemessen wird ist diese Methode nur für carbonatfreie Böden mit einem pH-Wert über 4,5 geeignet. Die Bestimmung des Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphorgehalts der abgetöteten Bodenprobe bildet die Grundlage von Fumigation-Extraktions-Methoden. Die Umrechnung auf Biomasse erfolgt mithilfe empirischer Faktoren. Als substratinduzierte Respiration (SIR) wird, die Messung des Anstiegs der Bodenrespiration nach der Zugabe von Glucose über mindestens acht Stunden bezeichnet. Wenn diese Methode mithilfe der Fumigations-Inkubations-Methode kalibriert wird, ist auch hier eine Umrechnung auf Biomasseeinheiten möglich.

Die Vorteile dieser Methoden sind eine gute Reproduzierbarkeit und der relativ geringe Zeitaufwand. Eine Differenzierung zwischen ruhendem und aktivem Anteil der mikrobiellen Biomasse, sowie zwischen bakterieller und pilzlicher Biomasse im Boden ist zumeist unmöglich (SCHINNER et al. 1993).

#### **4.2.2 Bestimmung von spezifischen Mustern**

Bereits 1977 wurde in mikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen, dass nur 1-10% der Bodenmikroorganismen mit kultivierungsabhängigen Methoden erfaßt werden (ALEXANDER 1977). Außerdem konnte gezeigt werden, dass 80-99% mit Hilfe herkömmlicher Identifikationsmethoden, wie Beschreibung der Morphologie, Gram-Färbung, Bestimmung von Enzymaktivitäten oder der Verwertung unterschiedlicher Substrate als einziger Kohlenstoff- bzw. Energiequelle, nicht identifiziert werden können. Deshalb wurde versucht, kultivierungsunabhängige Techniken für Populationsstudien und die Identifizierung von Mikroorganismen zu entwickeln.

##### **4.2.2.1 DNA-Fingerprintmethoden**

Grundlage der DNA-Fingerprintmethoden ist die Amplifikation von DNA-Abschnitten mithilfe der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) und die Auftrennung von Reaktionsprodukten nach deren Größe mittels Gelelektrophorese. Durch die Elektrophorese werden Bandenmuster erzeugt, die es ermöglichen, Veränderungen in der Bodenmikroorganismengemeinschaft zu erkennen. Einen Schwachpunkt dieser Methoden stellt die hohe Diversität dieser Gemeinschaften dar, die zu einer sehr hohen Komplexität der Bandenmuster führt, und daher das Erkennen geringfügiger Änderungen erschwert.

Den ersten Schritt aller DNA-Analysen stellt die Extraktion bakterieller DNA aus den zu untersuchenden Bodenproben dar. Zur Vorgangsweise bei der Extraktion sei auf die entsprechende Literatur (z. B. AKKERMANS et al., 1996; TREVORS & van ELSAS 1995) verwiesen.

- **Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP) Analyse**  
DNA (oft PCR-Produkte) wird mit Restriktionsenzymen geschnitten und die entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt. Restriktionsenzyme schneiden den DNA-Doppelstrang an bestimmten, von kurzen Stücken in der Sequenz abhängigen Stellen. Aufgrund einer computersimulierten RFLP-Analyse von 16S rDNA empfehlen MOYER et al. (1996) die Verwendung der Restriktionsenzyme *HhaI*, *RsaI* und *BstUI* für RFLP-Screening Untersuchungen, in denen 16S rRNA Gene als Maß für mikrobielle Diversität *in situ* herangezogen werden.
- **Amplifikationsfragment Längenpolymorphismus (AFLP) Analyse**  
Auf einen Restriktionsverdau folgt eine PCR-Amplifikation der Fragmente mit selektiven Primern (JANSSEN et al., 1997). Die Restriktionsfragmente werden dabei mit kurzen Adaptersequenzen versehen. Durch die Wahl der PCR-Primer, die zu den Adaptersequenzen plus 1-3 Nukleotiden des Restriktionsfragments passen, kann die Komplexität des Bandenmusters variiert werden. Die Auftrennung erfolgt dann auf Sequenzgelen bzw. automatischen Sequenziergeräten. Diese Methode liefert reproduzierbare Ergebnisse, ist aber technisch aufwendig.
- **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analyse**  
Bei dieser Methode wird eine PCR geringer Stringenz mit zufällig gewählten, kurzen Primern durchgeführt. Unter diesen Bedingungen können sich die Primer auch an nur partiell homologe Stellen der Template-DNA anlagern. Dadurch wird eine große Zahl unterschiedlicher DNA-Fragmente amplifiziert. Die Fragmente werden danach in einer Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. RAPD-Analysen sind aber schlecht reproduzierbar und daher nur bei Anwendung innerhalb eines Versuchs aussagekräftig.
- **Denaturierende und Temperatur Gradientengelelektrophorese (DGGE/TGGE)**  
DNA-Fragmente gleicher Länge, aber unterschiedlicher Nukleotidsequenz können mit diesen speziellen Elektrophoreseverfahren aufgetrennt werden (MUYZER et al. 1993; NÜBEL et al. 1996; HEUER & SMALLA, 1997a). Meist werden diese Verfahren zur Auftrennung von Reaktionsprodukten aus oben beschriebenen Methoden verwendet, da mit ihnen eine sehr hohe Auflösung der Bandenmuster möglich ist, die als Fingerprintmuster interpretiert, für die Diversität der mikrobiellen Population in der jeweiligen Bodenprobe charakteristisch sind.
- **Terminale Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP) Analyse**  
Durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers bei der PCR zur Amplifikation der 16S rDNA werden auch alle Reaktionsprodukte fluoreszenzmarkiert. Nach dem anschließenden Restriktionsverdau werden die so markierten Restriktionsfragmente mit einem automatischen Sequencer analysiert (LIU et al., 1997).

#### 4.2.2.2 Analyse von direkt aus dem Boden isolierter bakterieller 16S rRNA-Gene bzw. pilzlicher 18S rRNA-Gene

Heute spielt die Sequenz der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA, das 16S rRNA Gen, eine wichtige Rolle bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften. Die ribosomale DNA ist ein sehr geeigneter phylogenetischer Marker, da sie funktionskonstant und in allen Bakterien vorhanden ist, und sowohl stark konservierte als auch variable Abschnitte enthält (WOESE, 1987; SCHLEIFER & LUDWIG, 1989). Deshalb wurden die Sequenzen der 16S rRNA Gene zu einem unverzichtbaren Parameter in der bakteriellen Taxonomie. Dabei wird DNA direkt aus dem Boden isoliert und variable Regionen der bakteriellen 16S (bzw. pilzlichen 18S) rDNA werden mit Primern, die homolog zu konservierten Regionen dieser DNA sind, mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch aufgetrennt, die resultierenden DNA-Fragmente (entsprechend den Banden) kloniert und teilweise sequenziert. Zuletzt werden die so erhaltenen Sequenzen auf Übereinstimmungen mit Sequenzen bekannter Spe-

cies, die in Datenbanken (MAIDAK et al., 1994), gespeichert sind, untersucht. So wird versucht, aufgrund der Sequenz des 16SrRNA- bzw. des 18SrRNA-Gens eine taxonomische Zuordnung der Bakterien bzw. Pilze in der jeweiligen Bodenprobe vorzunehmen. Bei bisher durchgeführten derartigen Studien unterschieden sich die Resultate bezüglich der Artenzusammensetzung der Bodenbakterien stark (LIESACK & STACKEBRANDT, 1992; STACKEBRANDT et al., 1993; UEDA et al., 1995; BORNEMAN et al., 1996; SESSITSCH et al., 1997b).

Die oben angeführte Vorgangsweise ist zielgerichtet, aber sehr aufwendig, weshalb alternative Methoden entwickelt wurden, um Sequenzpolymorphismen in amplifizierten 16S rRNA Genen aus natürlichen Proben zu analysieren. So hat sich die RFLP Analyse von 16S rRNA Genen, die mit Hilfe der PCR amplifiziert wurden, als wertvolle Hilfe zur Unterscheidung von Arten erwiesen (LAGUERRE et al., 1994; SESSITSCH et al., 1997a).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Anwendung von Gradientengelelektrophorese-Verfahren (TGGE oder DGGE) dar. Die dabei erhaltenen Bandenmuster repräsentieren die Artenzusammensetzung der gesamten Bakteriengemeinschaft und beinhalten aktive und ruhende, lebende und tote, kultivierbare und nicht kultivierbare, beschriebene und bisher noch unbeschriebene Bakterien. Die Intensitäten der einzelnen Banden entsprechen den jeweiligen Zellzahlen. Auf eine Identifikation der einzelnen Arten wird verzichtet. Deshalb können unter Verwendung von DGGE oder TGGE komplexe mikrobielle Populationen in Böden relativ schnell untersucht und verglichen werden (MUYZER et al., 1993).

#### **4.2.2.3 Analyse direkt aus dem Boden isolierter bakterieller 16S rRNA**

Die Anzahl von Bakterien korreliert nicht notwendigerweise mit der bakteriellen Aktivität. Die metabolische Aktivität ist aber ein entscheidender Parameter in Böden und sollte daher sorgfältig untersucht werden. Da in aktiven Zellen ribosomale RNA-Gene stark exprimiert werden, ist die Bestimmung von 16S-rRNA eine Möglichkeit zur Aktivitätsmessung. Vor kurzem haben FELSKE et al. (1997) gezeigt, dass Informationen über Aktivitäten einzelner Bakterienarten aus natürlichen Bodenpopulationen erlangt werden können, wenn eine reverse Transkriptase (RT)-PCR von 16S-rRNA Genen durchgeführt wird, bei der direkt aus dem Boden isolierte RNA als „template“ dient. Eine DGGE- oder TGGE- Analyse führt zu Bandenmustern, die die aktiven Bakterienarten repräsentieren, während die Intensitäten der Banden das Ausmaß der jeweiligen Aktivität darstellen. Durch Vergleich von 16S rRNA- mit 16S-rDNA-Fingerprintmustern können Aussagen über den unterschiedlichen Anteil von bestimmten Bakteriengruppen an der Zusammensetzung und der Aktivität der Bodenmikroflora gemacht werden.

Nach einer modifizierten Methode werden zuerst bakterielle Ribosomen aus dem Boden isoliert, aus denen danach die RNA für die RT-PCR gewonnen wird. Dabei wird die im Vergleich zur direkten RNA-Extraktion deutlich geringere Ausbeute durch hohe Reinheit der RNA, die weitere Reinigungsschritte überflüssig macht, ausgeglichen (FELSKE et al., 1996).

#### **4.2.2.4 Analyse direkt aus dem Boden isolierter Fettsäuren**

Zur kultivierungsunabhängigen Analyse von mikrobiellen Populationen aus verschiedenen Habitaten wurden aus den Phospholipidkomponenten zellulärer mikrobieller Membranen Fettsäureprofile der Mikroorganismengemeinschaften erstellt. Solche Fettsäureprofile müssen aber vorsichtig interpretiert werden, da das Wissen über die qualitative und quantitative Verteilung von Fettsäuren in Mikroorganismen in natürlichen Habitaten begrenzt ist (HEUER & SMALLA, 1997a). Außerdem variieren diese Profile wahrscheinlich mit den Wachstumsbedingungen und dem physiologischen Zustand der Mikroorganismen.

Die Lipide werden durch Verseifung und anschließende Methylierung in ihre Fettsäure-Methyl-Ester übergeführt. Diese werden gaschromatographisch analysiert. Für die Identifizierung von Reinkulturen können die entstandenen Muster mit bestehenden Datenbanken verglichen werden.

### 4.3 Nachweis von Veränderungen der Stoffwechselaktivität von Bodenmikroorganismen

Bei der Suche nach Möglichkeiten zur Evaluierung (öko-)toxikologischer Effekte von Chemikalien auf Struktur und Funktion von Ökosystemen wurde als möglicher Ansatz die Anwendung funktioneller Parameter, sogenannter Biomarker, genannt. Biomarker werden dabei als molekularbiologische oder biochemische Reaktionen von Organismen oder Populationen auf Stress definiert (STEINBERG et al., 1994).

Bodenenzymatische Untersuchungen und die Messung von Stoffwechselfparametern eignen sich besonders gut für die Beurteilung des Einflusses von Wirkstoffen auf den Boden, weil physiologische Methoden gut reproduzierbar sind und daher gute Voraussetzungen für Vergleichsuntersuchungen bieten. Ein direkter Rückschluß von im Labor gemessener Stoffwechselaktivität auf die Situation in ungestörten Böden ist dabei aber nicht zulässig, da nur wenige physiologische Methoden den unter natürlichen Bedingungen relativ hohen Anteil an ruhender Biomasse berücksichtigen. Ungeachtet dessen lassen die Ergebnisse derartiger Untersuchungen Rückschlüsse auf die Intensität und Art des Wirkstoffeinflusses auf die Stoffwechselaktivität im Boden zu. Für das Erkennen dieser Wirkungen ist allerdings der Einsatz eines umfassenden Methodenspektrums empfehlenswert, da meist nur ein Teil der Stoffwechselwege durch einen Wirkstoff beeinflusst wird (SCHINNER et al. 1993). Abgesehen davon variiert die Aktivität von Enzymen stark mit den Bodenbedingungen, weshalb es schwierig ist, den Nachweis dieser Aktivitäten zu standardisieren (JEPSON et al., 1994).

#### 4.3.1 Bestimmung der gesamtmikrobiellen Aktivität

Unter dem Begriff „mikrobielle Aktivität“ sind sämtliche Stoffumsetzungen durch Mikroorganismen, bzw. solche die durch diese katalysiert werden, d. h. intra- und extrazelluläre Umsetzungen, zu verstehen. Hier sollen einige Parameter näher besprochen werden, die zur Bestimmung dieser Aktivitäten dienen. Nicht alle im Labor gemessenen Daten lassen Aussagen über natürliche Verhältnisse zu, da diese Messungen oftmals unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden. Ein Vergleich verschiedener Böden und das Erfassen von Veränderungen durch Umweltfaktoren ist aber möglich. Daher kann auch die Erhebung solcher „Basisdaten“ ein wichtiger Beitrag zum Monitoring des Einflusses gentechnisch veränderter Pflanzen sein.

- *Bodenatmung*

Eine der ältesten Methoden zur Aktivitätsmessung stellt die Messung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung bzw. der Sauerstoffaufnahme, und damit der Atmung, dar. Dabei wird zwischen der Basalatmung (ohne Zusatz von organischen Substanzen) und der substratinduzierten Atmung (Zusatz von Glucose oder Aminosäuren) unterschieden. Bei der ersten Methode wird die tatsächliche Aktivität, bei der zweiten die potentielle Aktivität gemessen. Bei der Messung werden Bodenproben wenige Stunden bis mehrere Tage inkubiert und das dabei freigesetzte CO<sub>2</sub> bzw. der verbrauchte Sauerstoff gemessen. Die Messung erfolgt dabei mittels Elektrorespirometer, mittels Infrarot, oder volumetrisch (ALEF 1991).

- *Wärmefreisetzung (heat output)*

Metabolische Prozesse sind immer mit einer Aufnahme oder Abgabe von Wärme, d.h. mit einer Änderung der Enthalpie verbunden. Mithilfe von Mikrokalorimetern können auch geringste Wärmeabgaben gemessen werden (ALEF & KLEINER 1989). Ein Problem dieser Methode stellt die Möglichkeit einer Überlagerung der mikrobiellen Aktivität durch abiotische Prozesse dar, da unter anderem auch durch Lösung von Glucose oder CO<sub>2</sub> in Wasser Wärme freigesetzt wird. Wie bei der Bodenatmung besteht auch bei dieser Methode die Möglichkeit die tatsächliche, oder durch Zugabe von Substraten, die potentielle Aktivität zu messen.

- *Adenosintriphosphat (ATP)-Bestimmung*

ATP kommt in allen Zellen vor und ist ein universeller Überträger chemisch gebundener Energie. Es wird nach dem Absterben der Zelle rasch abgebaut, und ist daher ein geeignetes Maß der mikrobiellen Aktivität und der Biomasse im Boden. Bestimmt wird ATP nach der Extraktion (eine Methodenübersicht findet sich in ALEF 1991) entweder über HPLC oder das Luciferin/Luciferase System.

- *Dehydrogenase-Aktivität*

Dehydrogenasen sind wichtige Enzyme der Atmungskette und dienen der Elektronenübertragung. Sie sind nur in intakten Zellen aktiv. Wurzelreste und anderes Pflanzenmaterial müssen vor der Messung entfernt werden, da diese die Messung beeinflussen. Die Bestimmung erfolgt photometrisch nach Farbstoffbildung durch Reduzierung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (THALMANN 1968) oder 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5phenyltetrazoliumchlorid (INT) (TREVORS 1984).

- *Stickstoffmineralisation*

Bei der Stickstoffmineralisation handelt es sich um zwei verschiedene Reaktionen: die Freisetzung von Ammonium aus niedermolekularen organischen Substanzen (Ammonifikation) und die Oxidation von Ammonium zu Nitrit und Nitrat (Nitrifikation). Beide Prozesse sind Stoffwechselfvorgänge, die an die lebende Zelle gebunden sind. Diese Reaktionen beeinflussen die Stickstoffverfügbarkeit im Boden, da Ammonium aufgrund der Bindung an Bodenpartikel wesentlich stabiler ist als Nitrit und Nitrat, die sehr leicht ausgewaschen werden. Zur Bestimmung werden Bodenproben unter kontrollierten Bedingungen inkubiert, und das gebildete Ammonium bzw. Nitrit oder Nitrat photometrisch bestimmt (ALEF 1991). Zusätzliche Information über die Dynamik mikrobieller Prozesse in Böden kann die Messung der Arginin-Ammonifikation liefern. Dabei wird der Bodenprobe Arginin zugesetzt, und das gebildete Ammonium gemessen. Da Aminosäuren sehr rasch desaminiert werden, sind nur kurze Inkubationszeiten (3 Stunden) notwendig. Oft wird als Kenngröße das Verhältnis zur Bodenatmung verwendet (ALEF et al. 1988).

- *[<sup>3</sup>H]-Thymidin-Aufnahme*

Zur Bestimmung der Wachstumsrate von heterotrophen Mikroorganismen kann die Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin herangezogen werden. Die komplexe Biochemie der Inkorporationsmechanismen und die noch weitgehend unklaren Interaktionen mit anderen Stoffen, die kompetitive Eigenschaften haben, lassen viele Fragen über die Aussagekraft der Ergebnisse offen (PAUL & CLARK 1996).

- *Dimethylsulfoxid-Reduktion*

Dimethylsulfid (DMS) spielt eine wichtige Rolle im Schwefelkreislauf und wird hauptsächlich durch Phytoplankton im Ozean gebildet. Die flüchtige Substanz wird in der Atmosphäre zu Dimethylsulfoxid (DMSO) photooxidiert. DMSO löst sich in Wasser und wird mit dem Niederschlag in terrestrische und aquatische Ökosysteme transportiert. Im Boden wird DMSO durch Mikroorganismen zu DMS reduziert. Da 95% aller Mikroorganismen DMSO reduzieren können, wurde diese Reaktion als Parameter zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in Böden und Komposten vorgeschlagen (ALEF & KLEINER 1989). Die Bestimmung erfolgt durch Inkubation von Bodenproben mit DMSO und gaschromatographische Messung des gebildeten DMS aus der Gasphase.

- *Eisen (III) - Reduktion*

Als Maß für die Aktivität fakultativ oder obligat anaerober Bakterien wird die Reduktion von unlöslichen Fe<sup>3+</sup>-Verbindungen zu löslichen Fe<sup>2+</sup>-Verbindungen herangezogen. Eisen (III) dient als Elektronenakzeptor in der „anaeroben Atmung“. Das gelöste Eisen (II) wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie (WELP & BRÜMMER 1985) bestimmt.

In einer Laboruntersuchung wurden zur Bestimmung der mikrobiellen Gesamtaktivität in einem landwirtschaftlich genutzten Boden sechs Methoden bezüglich ihrer Brauchbarkeit, eine Veränderung der Bodenmikroflora nach Pestizideinsatz anzuzeigen, verglichen (HUND et al., 1990). Dabei zeigte sich, dass jede der angewandten Methoden nur einen Teil der mikrobiellen Stoffwechselleistungen erfaßte. Durch Messung der potentiellen Wärmeleistung nach Glucosezugabe wurde die Aktivität nahezu der gesamten Mikroflora im aktiven Zustand, durch Messung der aktuellen Wärmeleistung nur die im Augenblick aktiven Mikroorganismen erfaßt. Über Bestimmung der ATP-Konzentration konnte zusätzlich zumindest ein Teil der ruhenden Population registriert werden. Die Arginin-Ammonifikation reagiert, durch die für den Abbau benötigten Enzyme, sehr sensitiv auf Pestizideinsatz. Außerdem wurde durch Hydrolyse von Fluoresceindiacetat vorwiegend die Aktivität von Pilzen und durch Eisen(III)-Reduktion dagegen vorwiegend die Aktivität anaerober Bakterien bestimmt. Die verschiedenen Parameter korrelierten in relativ unbelasteten Böden mit annähernd neutralem pH-Wert gut.

#### 4.3.2 Bestimmung des Energiezustandes von Mikroorganismen

Die Adenin-Nukleotide AMP (Adenosin-5'-Monophosphat), ADP (Adenosin-5'-Diphosphat) und ATP (Adenosin-5'-Triphosphat) sind universelle Lager- und Transportformen chemischer Energie in biologischen Prozessen. Aus dem Verhältnis von ATP, ADP und AMP läßt sich der Energiezustand (Adenylate Energy Charge (AEC)) berechnen (Atkinson 1977). Der (dimensionslose) Wert 1 wird erreicht, wenn alle Adenylate als ATP, 0 wenn alle Adenylate als AMP vorliegen. Ein Anstieg des AEC weist auf eine erhöhte Aktivität von Sytheseenzymen hin, ein Absinken auf erhöhte katabolische Aktivität. Der AEC ist daher ein Ausdruck des physiologischen Zustands einer Population und ein empfindlicher Parameter für die Reaktion von Bodenmikroorganismen auf veränderte Umweltbedingungen, läßt aber keine Aussagen über die Biomasse zu. Die Bestimmung erfolgt nach Extraktion mit dem Luciferin/Luciferase-System oder über HPLC (ALEF 1991).

#### 4.3.3 Bestimmung der Aktivität von Bodenenzymen

Unter dem Begriff „Bodenenzyme“ werden zellfreie Enzyme zusammengefaßt, die mikrobiologischen aber auch pflanzlichen oder tierischen Ursprung haben können. Eine Unterscheidung der frei im Boden vorliegenden Enzyme nach der Herkunft ist aber kaum möglich. Die verschiedenen Enzyme, wie Hydrolasen, Oxidoreduktasen oder Transferasen, die am Abbau organischer Substanzen im Boden beteiligt sind, kommen entweder frei in der Bodenlösung oder immobilisiert an Bodenpartikeln vor (BURNS 1978). Die Bestimmung der Aktivität von Bodenenzymen stellt heute eine wichtige Methode zur Bestimmung der Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren dar. Die Probleme von Enzymmessungen liegen einerseits in der Heterogenität von Bodenproben, andererseits in der hohen Komplexität von Abbauprozessen. Bei allen Untersuchungen ist daher ein Mitführen verschiedener Kontrollen und ein Vergleich mit anderen Parametern, wie Bodenatmung, notwendig, um mögliche Messartefakte auszuschließen. Die Messung erfolgt zumeist unter optimalen Bedingungen, d. h. am pH- und Temperaturoptimum des zu messenden Enzyms. Dadurch wird ein Vergleich unterschiedlicher Standorte ermöglicht. Aussagen über den tatsächlichen Stoffumsatz im Boden sind aber nicht möglich.

- *Proteasen*

Der überwiegende Teil des organisch gebundenen Stickstoffs im Boden liegt in Form von Proteinen vor. Durch Proteasen werden diese in Poly- und Oligopeptide sowie Aminosäuren gespalten und die Spaltprodukte von den Zellen aufgenommen und weiter abgebaut (desaminiert), bzw. zur Proteinsynthese verwendet. Proteasen sind zumeist an Tonpartikel adsorbiert und so stabilisiert. Die Bestimmung erfolgt durch Inkubation mit oder ohne Zusatz von Proteinen (z. B. Casein) und die Messung der Reaktionsprodukte (Aminosäuren) (ALEF 1991).

- *Urease*

Ureasen katalysieren die Spaltung von Harnstoff zu CO<sub>2</sub> und Ammoniak. Fast alle Bakterien, aber auch Pilze und Pflanzen besitzen Ureasen. Die Aktivität dieses Enzyms wurde intensiv studiert, da Harnstoff oft als Düngemittel verwendet wird. In der Landwirtschaft wurden verschiedene Urease-Hemmer eingesetzt, um den schnellen Abbau von Harnstoff zu verhindern. Zahlreiche Methoden wurden entwickelt. Sie beruhen auf einer Inkubation und Messung eines der Reaktionsprodukte (KANDELER & GERBER 1988).

- *Phosphatasen*

Phosphatasen sind Enzyme mit relativ breiter Spezifität, und katalysieren die Phosphatabspaltung aus organischen Phosphateestern, wie Nucleinsäuren und Glycerinphosphat. Unterschieden werden, je nach ihrem pH-Optimum saure, neutrale und alkalische Phosphatasen. Saure und neutrale Phosphatasen haben pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprung. Alkalische Phosphatasen werden nur von tierischem Gewebe und Mikroorganismen gebildet, nicht jedoch von Pflanzen. Die Bestimmung erfolgt meist durch die Inkubation von Bodenproben mit künstlichen Substraten und die Messung der Reaktionsprodukte (ALEF 1991).

- *Cellulase*

Celluloseabbau stellt einen der wichtigsten Mineralisationsprozesse im Boden dar, da Pflanzenrückstände zu 40-70% aus Cellulose bestehen. Cellulose wird hauptsächlich durch Pilze abgebaut. Der Abbau erfolgt über mehrere Schritte durch verschiedene Exo- und Endoenzyme zu Cellobiose bzw. zu Glucose. Die Freisetzung reduzierter Zucker wird auch zur Bestimmung der Aktivität verwendet (ALEF 1991).

- *Xylanasen*

Xylan ist das mengenmäßig zweitwichtigste Kohlenstoffpolymer der Natur. Xylane dienen als Stützpolymere und Reservestoffe. Sie sind leichter verwertbar als Cellulose und werden von einer großen Zahl von Pilzen und Bakterien extrazellulär durch Xylanasen abgebaut. Bei Ackerböden ist die Cellulaseaktivität im Gegensatz zu Grünland- und Waldböden meist schwach ausgeprägt, weshalb der Bestimmung der Xylanaseaktivität zum Nachweis enzymatischer Aktivität der Vorzug gegeben wird (SCHINNER et al. 1993).

- *Katalase*

Die Bestimmung der Katalaseaktivität war eine der ersten bodenenzymatischen Untersuchungen, die durchgeführt wurden. Katalase wird von Mikroorganismen, Tieren aber auch zu einem großen Teil von Pflanzen gebildet und ist im Boden sehr stabil. Die Katalase dient zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid, das bei verschiedenen Abbaureaktionen in der Zelle gebildet wird (ALEF 1991). Die Bestimmung erfolgt durch Bestimmung des freigesetzten Sauerstoffs nach Zugabe von Wasserstoffperoxid.

Die hier behandelten Enzyme stellen nur einen kleinen Ausschnitt aus der Vielfalt der Bodenenzyme dar. Außer diesen sind viele andere, wie  $\beta$ -Glucosidase, Saccharase, Amidase, und Sulfatase am Abbau der organischen Substanz im Boden beteiligt (ALEF 1991, SCHINNER et al. 1993, SINSABAUGH et al. 1991), und können als Parameter für ein Monitoring herangezogen werden.

#### 4.3.4 Erstellung eines "community"-Profils mit Hilfe von BIOLOG-Mikrotiterplatten

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der mikrobiellen Gesamtaktivität in Böden bietet sich durch die Verwendung des kommerziell erhältlichen "BIOLOG"-Mikrotiterplattensystems (BIOLOG, Hayward, CA, USA). Wenn die Gesamtheit der Mikroorganismen in einem Boden als physiologische Einheit betrachtet wird, kann die biochemische Abbauleistung als Muster des Abbaus verschiedener Kohlenstoffquellen (95 im Falle von BIOLOG) bestimmt werden. Die Verwertung einer Kohlenstoffquelle wird durch die irreversible Reduktion des farblosen

Redox-Farbstoffs Tetrazoliumviolett zu einem purpurnen Formazan durch respiratorische Aktivität colorimetrisch bestimmt. Eine Beeinflussung bestimmter physiologischer Bakteriengruppen des jeweiligen Bodens, z. B. durch transgene Pflanzen, sollte eine Veränderung des Musters der verwerteten Substrate bewirken. Auch durch große Änderungen in der Bakteriengemeinschaft muß es aber nicht notwendigerweise zu einer Veränderung in den Abbau-mustern kommen, da in diesen Gemeinschaften große Funktionsredundanz herrscht. Das heißt, es besteht nicht notwendigerweise ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Species und deren Aktivität im Boden. Das BIOLOG-System wurde als rasche Methode zur Charakterisierung und Klassifizierung heterotropher mikrobieller Gemeinschaften im Boden beschrieben, die den Vergleich dieser Gemeinschaften über große örtliche und zeitliche Distanzen ermöglicht (GARLAND & MILLS, 1991).

Über die Substratverwertung von Bodenmikroorganismengemeinschaften konnte nachgewiesen werden, dass gentechnisch veränderte und nicht veränderte Corynebakterien die selben vorübergehenden Auswirkungen auf die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen hatten (VAHJEN et al., 1995). Diese Auswirkungen unterschieden sich signifikant von jenen, ebenfalls vorübergehenden, die durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des von den transgenen Bakterien hergestellten reinen Peptides, in diesem Fall Aprotinin (hemmt eine Säugetier-Protease), hervorgerufen wurden.

Böden, die mit Blattgewebe von transgenen Baumwollpflanzen, die das *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*-Endotoxin exprimierten, versetzt worden waren, konnten anhand vorübergehender signifikanter Veränderungen in der Substratverwertung der Gesamtheit der Bodenmikroorganismen eindeutig von Böden, in die nicht-transgenes Pflanzenmaterial eingebracht worden war, unterschieden werden (DONEGAN et al., 1995).

HEUER & SMALLA (1997b) konnten mit dem BIOLOG-System aufgrund signifikant unterschiedlicher Abbaumuster von Phyllosphären-Bakteriengemeinschaften einerseits zwei Kartoffel-Varietäten, andererseits auch Blätter des oberen bzw. unteren Teils einer Kartoffelpflanze voneinander unterscheiden.

Kürzlich konnten mit Hilfe des BIOLOG-Systems signifikante Unterschiede zwischen drei landwirtschaftlichen Böden aus demselben Gebiet, die sich hinsichtlich der zuvor angebauten Feldfrüchte und der Bewirtschaftung unterschieden, nachgewiesen werden (Glimm et al., 1997).

#### **4.4 Nachweis von Veränderungen in Zahl oder Verhalten von Indikatororganismen**

Da Mikroorganismengemeinschaften im Boden sehr komplex zusammengesetzt sind und es daher unmöglich ist, alle im Boden vorhandenen Arten zu überwachen, ist es sinnvoll einzelne, für das Ökosystem typische, Bakterien oder Pilze beispielhaft zu überwachen. Solche Organismen sollten entweder besonders häufig sein, oder durch ihre Stoffwechselaktivitäten eine zentrale Rolle in der biologischen Aktivität des Bodens spielen. Die Zielorganismen eines solchen Monitorings können sowohl bodenbürtig sein als auch für Überwachungszwecke extra in den Boden eingebracht werden.

Kultivierbare Mikroorganismen können nach Anzucht auf Selektivnährböden durch Analyse der Kolonien über phänotypische Merkmale (z. B. gram-Färbung, BIOLOG-System) oder über genotypische Merkmale (RFLP-Analyse der 16S rRNA-Gene oder des intergenerischen Spacers, RAPD des gesamten Genoms) auf Stamm- oder Artebene charakterisiert werden (SELENSKA-POBELL et al., 1996; SESSITSCH et al., 1997a). Mit diesen Methoden ist es möglich, das Vorhandensein bzw. die Entwicklung von Bakterienarten oder -gruppen zu verfolgen.

Mit Hilfe immunochemischer Identifizierung und Quantifizierung ist es möglich, Vorhandensein und Zellzahl von ausgewählten Bodenbakterien zu bestimmen (SCHLOTTER et al., 1993). Dazu werden monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper produziert, die an Oberflächenproteine bestimmter Bakterien binden. Nach der Bindung des Antikörpers wird das Resultat im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Eine neuere molekulare Technik ist die *in situ* Hybridisierung von Bakterienzellen mit fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden. Die Verwendung von Sonden für 16S-rRNA-Sequenzen ermöglicht aufgrund der oben erwähnten Struktur der 16S-rRNA die Unterscheidung auf unterschiedlichen systematischen Ebenen (AMMAN 1995). Je nach Wahl der Sondensequenz kann die Detektion von Stammebene (konservierte Regionen) bis zur Subspezies-Ebene (hoch variable Regionen) variieren. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluorophore können mehrere Hybridisierungen gleichzeitig durchgeführt werden.

Eine Möglichkeit, bestimmte Mikroorganismen ohne vorherige Kultivierung spezifisch in Bodenproben nachzuweisen, und auch deren Anzahl zu bestimmen, bietet die Durchflußzytometrie. Dabei werden die Bakterien aus dem Boden extrahiert. Die morphologischen Eigenschaften (Größe, Form und Brechungsindex) der Bakterienzellen ergeben ein charakteristisches "light scattering profile". Dieses ist aber für eine genauere Bestimmung nicht spezifisch genug, da die morphologischen Unterschiede von Bakterien zu gering sind. Durch eine Hybridisierung der Bakterien-DNA mit fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden, die spezifisch für das 16S rRNA Gen des untersuchten Bakterienstammes sind, können einzelne Stämme detektiert werden. Durch Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften der Zellwand über die Messung des Influx von Ethidium Bromid können die untersuchten Bakterienzellen von anderen Bakterien und Bodenpartikeln unterschieden werden (THOMAS et al., 1997). Bisher wurden im Zusammenhang mit transgenen Pflanzen keine derartigen Untersuchungen durchgeführt.

Die Verwendung von Mikrokosmen kann einen wichtigen Beitrag zur Methodenentwicklung leisten. Um Aussagen über das potentielle Verhalten gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in der Umwelt machen zu können, müssen dabei die experimentellen Bedingungen die Situation in natürlichen Habitaten so weit wie möglich simulieren (SCHMIDT et al., 1990).

#### 4.4.1 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen

Bereits 1992 wurde vorgeschlagen, dass eigens für Monitoringzwecke konstruierte gentechnisch veränderte Mikroorganismen geeignet sein könnten, Auswirkungen auf ökologische Prozesse und auf Nicht-Zielorganismen zu bewerten (SEIDLER, 1992). Voraussetzung für eine Verwendung gentechnisch markierter Mikroorganismen in ökologischen Studien ist, dass sich die markierten Stämme hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften sonst nicht von den Wild-Typ Stämmen unterscheiden (SESSITSCH, 1997). Jedoch muß bedacht werden, dass bei der Verwendung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen als Indikatororganismen ein eigener Freisetzungsantrag nach dem Gentechnikgesetz (Bundesgesetzblatt 510/1994) erforderlich ist. Aus ökologischer Sicht stellen dabei die Möglichkeit der Genübertragung zwischen Bakterien und die Nicht-Rückholbarkeit von freigesetzten Mikroorganismen die größten Probleme dar.

Markergene dienen zur leichten Erkenn- bzw. Selektionierbarkeit von Mikroorganismen, werden aber auch bei der Entwicklung von gentechnisch veränderten Pflanzen verwendet. Zu den selektionierbaren Markern gehören z. B. Antibiotika- oder Schwermetallresistenzgene. Zu den Markern, die die Erkennbarkeit der markierten Mikroorganismen ermöglichen, gehören z. B. Biolumineszenzgene, metabolische Marker (*gusA*, *lacZ*) oder green fluorescent protein (GFP) – Gene. Während bei ersteren das Wachstum auf, für andere Mikroorganismen schädlich wirkenden Nährböden ermöglicht wird, sind bei zweiteren die markierten Mikroorganismen durch Luminiszenz, Fluoreszenz oder Farbreaktionen leicht erkennbar (KRUSE & JANSSON 1997).

*Pseudomonas* sp., die zur biologischen Reinigung verseuchter Böden verwendet werden sollen, wurde mit den Genen für Lactoseverwertung und Biolumineszenz ausgestattet (GREER et al., 1993). Diese gentechnische Veränderung ermöglicht die gezielte Überwachung dieser Bakterien aufgrund der eindeutigen Unterscheidung von der natürlichen Bodenmikroflora. Die Sensitivitätsgrenze lag bei 10 lebensfähigen Zellen pro Gramm Boden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass gus A - markierte Rhizobienstämme für ökologische Studien gut geeignet sind, da sie gegenüber ihren Elternstämmen weder quantitative Veränderungen in der Knöllchenbildung an Leguminosenwurzeln und in ihrer positiven Auswirkung auf das Pflanzenwachstum, noch verändertes Konkurrenzverhalten bei der Besiedelung von Leguminosenwurzeln zeigten (SESSITSCH, 1997). Solche Rhizobienstämme könnten dazu dienen, Auswirkungen transgener Leguminosen auf symbiotische Stickstoff-fixierende Knöllchenbakterien nachzuweisen.

Zur Kontrolle des Verhaltens gentechnisch veränderter Bakterien im Boden wurden Mikrokosmen konstruiert (HENSCHKE & SCHMIDT, 1989), die variable Mengen von Probenmaterial enthalten, das dem natürlichen Habitat des Testorganismus entnommen wurde. Im Fall zu erwartender symbiontischer oder pathogener Wechselwirkungen mit Pflanzen können diese auch bepflanzt werden. Im Mikrokosmos läßt sich unter kontrollierten Bedingungen in sterilen oder unsterilen Proben der Einfluß biotischer und abiotischer Faktoren auf die Überlebensfähigkeit des GVO, seine Propagation und Interaktion mit eingebrachten oder endogenen Mikroorganismen untersuchen (SCHÄFER, 1996).

#### 4.4.2 Natürlich vorkommende Bodenmikroorganismen

*Nitrosomonas* spp. sind im Boden für den ersten Schritt der Nitrifikation verantwortlich, und gegenüber Veränderungen in ihrer Umwelt höchst sensibel. Diese Organismen werden als Schlüsselorganismen für den Nachweis von Veränderungen im Ökosystem Boden verwendet. Obwohl es schwierig ist, die Anzahl dieser Bakterien im Boden festzustellen, sind die von ihnen vermittelten Prozesse (Oxidation von Ammonium zu Nitrit) sehr einfach zu messen (ANGLE, 1994).

In Mikrokosmosexperimenten konnte die Verdrängung von *Rhizobium leguminosarum* und Nitrifizierern aus der Rhizosphäre von Weizen und Mais durch Beimpfung mit *Azospirillum lipoferum*, sowie die Verdrängung aerober heterotropher Bakterien aus dem Rhizoplan von Weizen durch *Pseudomonas* sp. nachgewiesen werden (BOLTON et al., 1991).

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnte durch Kombination von "light scattering profile", Hybridisierung mit fluoreszeinformierten Oligonukleotiden und der Permeabilitätsbestimmung von Zellmembranen ein *Sphingomonas* sp. Stamm nach Zugabe zu Bodenproben bis zu einem Detektionslimit von  $3 \times 10^4$  Zellen/g Boden Trockengewicht nachgewiesen werden (THOMAS et al., 1997).

Analog zu diesen Mikrokosmosexperimenten könnten Versuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen in sterilem oder nicht-sterilem Boden, wobei dieser mit ausgewählten Leitmikroorganismen (in Anlehnung an das EU-Projekt „Interactions between microbial inoculants and resident populations in the rhizosphere of agronomically important crops in typical soils“; project reference BIO4960027, geleitet vom University College Cork, Cork, Irland, z. B. Mykorrhiza-Pilze, pathogene Pilze wie *Pythium*, Bakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter* und *Bacillus*) versehen wird, geeignet sein, Aufschluß über Auswirkungen transgener Pflanzen zu geben.

## 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bodenmikroorganismen sind für das Funktionieren jedes Ökosystems essentiell. Alle höheren Organismen sind auf die Existenz von Mikroorganismen angewiesen. Der Grund für ihre große Bedeutung liegt in ihrer metabolischen Vielseitigkeit und Flexibilität. Durch Mineralisationsprozesse werden Nährstoffe für Pflanzen zur Verfügung gestellt. Die Produktivität von Pflanzen wird aber auch durch andere Funktionen von Mikroorganismen, wie Schutz vor Fraßfeinden, abiotischem Stress oder Infektionen erhöht (ANDREWS & HIRANO 1992). Durch die Dekomposition von, für Tiere schwer abbaubaren Stoffen, wie Cellulose oder Chitin, leisten sie einen wichtigen Beitrag zum Kohlenstoffkreislauf. Viele Bodenorganismen, z. B. Collembolen oder Regenwürmer, nehmen bevorzugt von Bakterien besiedeltes Pflanzenmaterial auf, da dieses besser verwertbar ist.

Angesichts dieser großen Bedeutung von Bodenmikroorganismen ist es erstaunlich, dass die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften in Zusammenhang mit der Anwendung gentechnisch veränderter Pflanzen bisher einen geringen Stellenwert hat. Der Grund dafür dürfte einerseits der Mangel an adäquaten Methoden, andererseits das Fehlen von „Schutzzielen“ sein. Im Gegensatz zu Pflanzen oder Tieren, für die z. B. „rote Listen“ erstellt werden, existieren ähnliche Aufstellungen für Mikroorganismen nicht. Auch werden schützenswerte Ökosysteme großräumig definiert und dabei das Funktionieren von Bodenmikroorganismen-Gemeinschaften nicht berücksichtigt. Die durch die Anwendung von gentechnisch veränderten Pflanzen geänderte landwirtschaftliche Praxis könnte hier aber tiefgreifende Veränderungen bewirken. So sind bei herbizidresistenten Pflanzen der Einsatz des Komplementärherbizids und veränderte Anwendungszeitpunkte zu berücksichtigen. Bei insektenresistenten Pflanzen kann es durch die Einwirkung von Toxinen während der gesamten Vegetationsperiode, d. h. über einen wesentlichen längeren Zeitraum als bei herkömmlicher Anwendung, zu Veränderungen im Bodenökosystem kommen. Besonderes Augenmerk sollte auf gentechnisch veränderte Pflanzen gelegt werden, die aufgrund der neuen Eigenschaft resistent gegen Pilze oder Bakterien sind. Durch die neu exprimierten Wirkstoffe (antibiotisch wirkende Peptide, Enzyme) könnte es zu einem Rückgang von „nützlichen“ Mikroorganismen, z. B. von Symbionten, kommen. Das könnte auch negative Auswirkungen auf die Bodenfruchtbarkeit haben.

Mikroorganismen im Boden werden von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst. Diese Einflüsse können auf kleinstem Raum variieren und schaffen so eine Vielzahl von Mikrohabitaten. Dadurch wird eine hohe Diversität von Mikroorganismenpopulationen im Boden ermöglicht und eine Angabe einer für alle Bodenökosysteme gültige Grundzusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ist nicht möglich. Das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Bakterienarten im untersuchten System kann ohne Kenntnis der Ausgangssituation keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Bodenmikroorganismen geben. Außerdem muß durch die hohe Funktionsredundanz von mikrobiellen Gemeinschaften der Ausfall einer Bakterienart nicht notwendigerweise zu einem Verlust an Stoffwechselfunktionen oder Biomasse im System führen. Durch die Untersuchung einzelner Parameter (z. B. Diversität, Biomasse) kann daher keine Aussage über das Funktionieren des Ökosystems getroffen werden. Die Untersuchung aller in Frage kommenden Parameter würde aber den zeitlichen und finanziellen Rahmen jedes Monitoringprogramms sprengen.

Aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge im Boden kann auch keine allgemein gültige Auswahl von Standardmethoden getroffen werden. Für ein durchführbares Monitoringprogramm ist eine möglichst genaue Hypothese über mögliche Auswirkungen transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen notwendig, um von Fall zu Fall die geeigneten Monitoringparameter auswählen zu können. Dabei können die Methoden je nach Fragestellung sehr unterschiedlich sein. Bei Diversitätsuntersuchungen (ökologische Interessen) werden dabei in erster Linie molekularbiologische Methoden, bei Untersuchungen der Nährstoffdynamik (landwirtschaftliche Interessen) werden Enzymaktivitätsmessungen und Nährstoffanalytik angewendet werden. Viele mikrobiologische Methoden sind im Freiland nicht, oder nur beschränkt anwendbar

und sollten vor deren Anwendung für Monitoringaufgaben in Mikrokosmosexperimenten kalibriert und angepaßt werden. Eine Übersicht der im Text beschriebenen Methoden und einer Gegenüberstellung ihrer Vor- und Nachteile findet sich in Anhang 2. Weiters findet sich in Anhang 4 eine Liste von ExpertInnen, die sich mit unterschiedlichen klassischen mikrobiologischen oder mit moderneren molekularbiologischen Methoden beschäftigen. Eine Kombination dieser Methoden, d. h. auch eine Zusammenarbeit von Fachleuten mit unterschiedlichem Spezialgebiet, ist für die Planung und Durchführung eines umfassenden Monitorings notwendig.

Aufgrund der Komplexität von Ökosystemen ist es oft schwierig, erkannte Veränderungen auf einen bestimmten Einflussfaktor zurückzuführen. Dies trifft ganz besonders auf mikrobielle Systeme zu, da diese sehr rasch auf jede Änderung der Umweltbedingungen reagieren. Das führt zu einer starken Fluktuation des Hintergrunds. Da außerdem meist Daten über die Verhältnisse zu Beginn einer Freisetzung (Basislinie) fehlen, sollten immer Vergleichsuntersuchungen mit unbeeinflussten Ökosystemen, bzw. mit Vergleichsflächen, die mit herkömmlichen Methoden bewirtschaftet werden, durchgeführt werden. Aufgrund der großen Unterschiede verschiedener Standorte sollten diese Vergleichsflächen in unmittelbarer Nähe der Versuchsfläche sein, und vor Versuchsbeginn über einen längeren Zeitraum gleich bewirtschaftet worden sein. Je konstanter die Versuchsbedingungen gehalten werden können, umso leichter wird es sein, die Ursache von gemessenen Veränderungen zu erkennen, und Aussagen darüber zu treffen, ob diese auf die Anwendung transgener Pflanzen zurückzuführen sind.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- AHMAD, I. & MALLOCH, D. (1995): Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin. *Agric. Ecosystems Environ.* 54: 165-174.
- AJISAKA, H.; MARUTA, Y. & KUMASHIRO, T. (1994): Evaluation of transgenic rice carrying an anti-sense glutelin gene in an isolated field. In: Jones, D. D. (ed.): *The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, California, USA.*
- AKKERMANS, A. D. L.; van ELSAS, J. D. & de BRUIJN, F. J. (1996): *Molecular Microbial Ecology Manual.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- ALEF, K. (1991): *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Aktivitäten – Biomasse – Differenzierung.* ecomed, Landsberg/Lech.
- ALEF, K. & KLEINER, D. (1989): Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxid reduction. *Biol. Fertil. Soils* 8: 349-355.
- ALEF, K.; BECK, T. H.; ZELLES, L. & KLEINER, D. (1988): A comparison of methods to estimate microbial biomass and N-mineralisation in agricultural and grassland soils. *Soil. Biol. Biochem.* 20: 561-565.
- ALEXANDER, M. (1977): *Introduction to soil microbiology.* p 472. John Wiley & Sons, New York.
- AMMAN, R. I. (1995): In situ identification of Micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: AKKERMANS, A. D. L.; van ELSAS, J. D. & de BRUIJN, F. J. (eds.): *Molecular Microbial Ecology Manual.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- ANDREWS J. H. & Hirano S. S. (eds.) (1992): *Microbial ecology of leaves.* Springer, London.
- ANGLE; J. S. (1994): Release of transgenic plants – biodiversity and population-level considerations. *Molecular Ecology* 3(1): 45-50.
- ASAKAWA, Y.; FUKUMOTO, F.; HAMAYA, E.; HASEBE, A.; ICHIKAWA, H.; MATSUDA, I.; MATSUMURA, T.; MOTOYOSHI, F.; NOGUCHI, K.; OHASHI, Y.; OKADA, M.; SATO, M.; SHIYOMI, M.; UGAKI, M.; UKAI, Y. & YOKOYAMA, K. (1993): Evaluation of the impact of the release of transgenic tomato plants with TMV resistance on the environment. *Japan Agricultural Research Quarterly* 27(2): 126-136.
- ATKINSON, D. E. (1977): *Cellular energy charge metabolism and its regulation.* Academic press, New York.
- BEGON, M.; HARPER, J. L. & TOWNSEND, C. R. (1990): *Ecology: individuals, populations, and communities.* Blackwell Scientific Publications, Boston.
- BERENYI, M.; TOPALOGLOU, A. & BURG, K. (1995): Untersuchungen über Möglichkeiten horizontalen Gentransfers von transgenen Kartoffelpflanzen in Agrobakterien. OEFZS-A-3399.
- BOLAN, N. S.; CURRIE, L. D. & BASKARAN, S. (1996): Assessment of the influence of phosphate fertilizers on the microbial activity of pasture soils. *Biology and Fertility of Soils* 21(4): 284-292.
- BOLTON, H.; FREDRICKSON, J. K.; THOMAS, J. M., LI, S. W.; WORKMAN, D. J.; BENTJEN, S. A. & SMITH, J. L. (1991): Field calibration of soil-core microcosms: ecosystem structural and functional comparisons. *Microb Ecol* 21: 175-189.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS, J. & TRIPLETT, E. W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microb.* 62(6): 1935-1943.
- BURNS, R. G. (1978): *Soil enzymes.* Academic Press, New York.
- CAMPBELL, A. (1991): Microbes: the laboratory and the field. In: DAVIS, B. D. (ed.): *The Genetic Revolution: Scientific Prospects and Public Perceptions,* pp. 28-44. John Hopkins University Press, Baltimore.

- COLWELL, R. R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D. J.; ROSZAK, D. R.; HUQ, S. A. & PALMER, L. M. (1985): Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for the release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* 3: 817-820.
- DALE, P. J. & McPARTLAN, H. C. (1992): Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 585-591.
- DeGRAEVE, S. (1994): Les peuplements et populations de bacteries associés aux racines de colza transformé par l'introduction d'un gene de chitinase. PhD Thesis, Université Henry Poincare, Nancy, France.
- DeLONG, E. F. (1996): Diversity of naturally occurring prokaryotes. In: COLWELL, R. R.; SIMIDU, U. & OHWADA, K. (eds.): *Microbial diversity in Time and Space*. Plenum Press, New York.
- DIGHTON, J.; JONES, H. E.; ROBINSON, C. H. & BECKETT, J. (1997): The role of abiotic factors, cultivation practices and soil fauna in the dispersal of genetic modified microorganisms in soils. *Appl. Soil Ecol.* 5(2): 109-131.
- DONEGAN, K. K.; PALM, C. J.; FIELAND, V. J.; PORTEOUS, L. A.; GANIO, L. M.; SCHALLER, D. L.; BUCAO, L. Q. & SEIDLER, R. J. (1995): Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl. Soil Ecology* 2: 111-124.
- DONEGAN, K. K.; SCHALLER, D. L.; STONE, J. K.; GANIO, L. M.; REED, G.; HAMM, P. B. & SEIDLER, R. J. (1996): Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. *Transgenic Research* 5: 25-35.
- DOYLE, J. D.; STOTZKY, G.; McCLUNG, G. & HENDRICKS, C. W. (1995): Effects of genetically engineered microorganisms on microbial populations and processes in natural habitats. *Adv. Appl. Microbiol.* 40: 237-87.
- FELSKE, A.; ENGELEN, B.; NÜBEL, U. & BACKHAUS, H. (1996): Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11): 4162-4167.
- FELSKE, A.; RHEIMS, H.; WOLTERINK, A.; STACKEBRANDT, E. & AKKERMANS, A. D. L. (1997): Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* 143.
- FIELD, K. G.; GORDON, D.; WRIGHT, T.; RAPPE, M.; URBACK, E.; VERGIN, K. & GIOVANNONI, S. J. (1997): Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1): 63-70.
- FÖRSTER, B. (1998): Studie zur Ökologie ausgewählter Mikroorganismen. UBA-Texte 64/98. Umweltbundesamt Berlin.
- FREDRICKSON, J. K.; BOLTON, H. J. R.; BENTJEN, S. A.; McFADEEN, K. M.; LI, S. W. & van VORIS, P. (1990): Evaluation of intact soil-core microcosms for determining potential impacts on nutrient dynamics by genetically engineered microorganisms. *Environ Toxicol Chem* 9 (5): 551-558.
- FUHRMAN, J. A.; McCALLUM, K. & DAVIES, A. A. (1993): Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5): 1294-1302.
- FRY, N. K.; ROWBOTHAM, T. J.; SAUNDERS, N. A. & EMBLEY, T. M. (1991): Direct amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.* 83: 165-168.
- GARLAND, J. L. & MILLS, A. L. (1991): Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microb.* 57(8): 2351-2359.
- GEBHARD, F. & SMALLA, K. (1998): Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (4): 1550-1554.

- GLANDORF, D. C. M.; BAKKER, P. A. H. & van LOON, L. C. (1997): Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta Bot. Neerl.* 46: 85-104.
- GLIMM, E.; HEUER, H.; ENGELEN, B.; SMALLA, K. & BACKHAUS, H. (1997): Statistical comparisons of community catabolic profiles. *J. Microb. Meth.* 30: 71-80.
- GREER, C.; MASSON, L.; COMEAU, Y., BROUSSEAU, R. & SAMSON, R. (1993): Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant-degrading bacteria. *Water Poll. Res. J. Can.* 28(2): 275-287.
- HENSCHKE, R. B. & SCHMIDT, F. R. J. (1989): Survival, distribution and gene transfer of bacteria in a compact soil microcosm system. *Biol Fertil Soils* 8: 19-24.
- HERSMAN, L. E. & KLEIN, D. A. (1979): Retorted oil shale effects on soil microbiological characteristics. *J. Environ. Qual.* 8(4): 520-524.
- HEUER, H. & SMALLA, K. (1997a): Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities, p. 353-373. In: van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T. & WELLINGTON E. M. H. (eds.): *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- HEUER, H. & SMALLA, K. (1997b): Evaluation of community-level catabolic profiling using Biolog GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J Microb Meth* 30: 49-61.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. & WELLINGTON, E. M. H. (1997): Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microb.* 63(8): 3233-3241.
- HILBECK, A.; BAUMGARTNER, M.; FRIED, P. M. & BIGLER, F. (1998): Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27(2): 480-487.
- HOFFMANN, T.; GOLZ, C.; & SCHIEDER, O. (1994): Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Curr. Genet.* 27: 70-76.
- HOLBEN, W. E. & HARRIS, D. (1995): DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Molecular Ecology* 4: 627-631.
- HUND, K.; FABIG, W. & ZELLES, L. (1990): Comparison of methods for the determination of total soil microbial activity. *Agribiol. Res.* 43(2): 131-138.
- JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K. & DIJKSHOORN, L. (1997): Discrimination of acinetobacter genomic species by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4): 1179-1187.
- JEPSON, P. C.; CROFT, B. A. & PRATT, G. E. (1994): Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Molecular Ecology* 3(1): 81-89.
- KANDELER, E. & GERBER, H. (1988): Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil Soils* 6: 68-72.
- KÄPPELI, O. & SCHULTE, E. (1998): *Bio- und Gentechnologie II. Technikbeurteilung offener Systeme*. vdf Hochschulverlag an der ETH Zürich.
- KENNEDY, A. C. & SMITH, K. L. (1995): Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170: 75-86.
- KINKLE, B. K. & SCHMIDT, E. L. (1991): Transfer of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in nonsterile soil - as model of genetically engineered microorganism gene transfer following release to the environment; Sym plasmid transfer from *Sinorhizobium fredii* to *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(11): 3264-3269.
- KLUG, M. J. & TIEDJE, J. M. (1994): Response of microbial communities to changing environmental conditions: chemical and physiological approaches, p 371-378. In: GUERRERO, R. & PEDROSA-LIO C. (eds.): *Trends in microbial ecology*. Spanish Society for Microbiology, Barcelona, Spain.

- KOZDROJ, J. (1996): Competition between different mutants of *Pseudomonas fluorescens* introduced into soil. J. Environ. Sci. Health Part A. Environ. Sci. Eng. Toxic Haz. Substance Control 31 (5): 1111-1125.
- KRUSE, H. & JANNSON, J. (1997): The use of antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms. Norwegian Pollution Control Authority.
- KUSKE, C. K. BARNES, S. M. & BUSCH, J. D. (1997): Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3614-3621.
- LACZKO, E.; RUDAZ, A. & ARAGNO, M. (1997): Diversity of anthropogenically influenced or disturbed soil microbial communities. In: INSAM, H. & RANGGER, A. (eds.): Microbial communities: Functional versus structural approach, Springer, Berlin.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F. & AMARGER, N. (1994): Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60: 56-63.
- LaRIVIERE, J. W. M. & SCHMIDT, K. (1991): Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing eubacteria, p 3934-3947. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. & SCHLEIFER, K. H. (eds.): The Prokaryotes, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
- LEI, C.; HUANXIAN, J.; LINJUAN, N.; MEIZHEN, Z. & YONGQIANG, W. (1996): Effect of the genetic engineered diazotroph on nitrogen nutrition of rice. J. Shanghai Agric. College 14 (2): 106-110.
- LIESACK, W. & STACKEBRANDT, E. (1992): Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. 174: 5072-5078.
- LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H. & FORNEY, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63 (11): 4516-4522.
- MAIDAK, B. L.; LARSEN, N.; McCAUGHY, M. J., OVERBECK, R.; OLSEN, G. J.; FOGEL, K.; BLANDY, J. & WOESE, C. R. (1994): The ribosomal database project. Nucleic Acids Res. 22: 3485-3487.
- METZ, P. L. J. (1997): To be or not to be biosafe – An evaluation of transgenic phosphinothricin-tolerant oilseed rape (*Brassica napus* L.). PhD-Thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- MILLER, H. I.; HUTTNER, S. L. & BEACHY, R. (1993): Risk assessment experiments for "genetically modified" plants. Bio/Technology 11: 1323-1324.
- MORRA, M. J. (1994): Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. Molecular Ecology 3 (1): 53-55.
- MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C. & KARL, D. M. (1996): A computer-stimulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. Appl. Environ. Microbiol. 62 (7): 2501-2507.
- MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; MASSANA, R.; TAYLOR, L. T.; BLAKIS, A.; WU, K. & DeLONG, E. F. (1998): Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. Appl. Environ. Microbiol. 64(7): 2585-2595.
- MUYZER, G.; de WAAL, E. C. & UITERLINDEN, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W. & BACKHAUS, H. (1996): Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol. 178: 5636-5643.
- OLIVER, J. D.; NILSSON, L. & KJELLEBERG, S. (1991): Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation rate. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2640-2644.
- PAUL, E. A. & CLARK, F. E. (1996): Soil microbiology and biochemistry. Academic Press Inc., San Diego.

- PRESS, C. M.; MAHAFFEE, W. F.; EDWARDS, J. H. & KLOEPPER, J. W. (1996): Organic by-product effects on soil chemical properties and microbial communities. *Compost Sci. Util.* 4(2): 70-80.
- REGAL, P. J. (1994): Scientific principles for ecologically based risk assessment of transgenic organisms. *Molecular Ecology* 3: 5-13.
- REMDE, A. & HUND, K. (1994): Response of soil autotrophic nitrification and soil respiration to chemical pollution in long-term experiments. *Chemosphere* 29(2): 391-404.
- ROSZAK, D. B.; GRIMES, D. J. & COLWELL, R. R. (1984): Viable but not recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30: 334-338.
- SANDERMANN, H. (1992): Nutzpflanzen mit künstlicher Herbizidresistenz: Verbessert sich die Rückstandssituation? Biochemische Aspekte (Gutachten erstellt im Auftrag der Abteilung „Normbildung und Umwelt“, Forschungsschwerpunkt Technik-Arbeit-Umwelt, des Wissenschaftszentrums Berlin für Sozialforschung (WBZ). Verfahren zur Technikfolgenabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz.
- SCHÄFER, A. (1996): Horizontaler Gentransfer - Mechanismen und biologische Sicherheit. *Biospektrum* 6: 23-29.
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R. (1993): Bodenbiologische Arbeitsmethoden. Springer Verlag, Berlin.
- SCHLEIFER, K. H. & LUDWIG, W. (1989): Phylogenetic relationships of bacteria. In: FERNHOLM, B.; BREMER, K. & JÖRNVALL H. (eds.), *The hierarchy of life*. p. 103-117 Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- SCHLOTTER, M.; BODE, W. & HARTMANN, A. (1993): Identifizierung und Quantifizierung von Bodenbakterien mit monoklonalen Antikörpern. p. 44-50. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R. (eds.): *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer Verlag, Berlin.
- SCHLÜTER, K., FÜTTERER, J. & POTRYKUS, I. (1995): "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. *Bio/Technology* 13: 1094-1098.
- SCHMIDT, F. R. J.; ROSIEN, J. & BROKAMP, A. (1990): The role of soil bacteria in risk assessment analysis. *Bact. Genet. Natur. Environ.*: 207-215.
- SEIDLER, R. J. (1992): Evaluation of methods for detecting ecological effects from genetically engineered microorganisms and microbial pest control agents in terrestrial systems. *Biotechnology Advances* 10 (2): 149-178.
- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G. & SQUARTINI, A. (1996): Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP analysis of PCR-amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 517-528.
- SESSITSCH, A.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A. D. L. & de VOS, W. M. (1997a): Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Mol. Ecol.* 6: 601-608.
- SESSITSCH, A.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A. D. L. & de VOS, W. M. (1997b): Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 1097-1101.
- SESSITSCH, A. (1997): Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. *Soil Biol. Biochem.* 29:1099-1110.
- SINSABAUGH, R. L.; ANTIBUS, R. K. & LINKINS, A. E. (1991): An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agric. Ecosystems Environ.* 34: 43-54.
- STACKEBRANDT, E., LIESACK, W. & GOEBEL, B. M. (1993): Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7: 232-236.
- STEINBERG, C. E. W.; GEYER, H. J. & KETRUP, A. A. F. (1994): Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere* 28(2): 357-374.

- TABEL, Y.; OOSAWA, K.; NISHIMURA, S.; WATANABE, S.; TSUCHIYA, K.; YOSHIOKA, K.; FUJISAWA, I. & NAKAJIMA, K. (1994): Environmental risk evaluation of the transgenic melon with coat protein gene of cucumber mosaic virus in a closed and semi-closed greenhouse (II). *Breeding Science* 44 (2): 207-211.
- THALMANN, A. (1968): Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21: 249-258.
- THOMAS, J. C.; DESROSIERS, M.; ST-PIERRE, Y.; LIRETTE, P.; BISAILLON, J. G. BEAUDET, R. & VILLEMUR, R. (1997): Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. *Cytometry* 27: 224-232.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. & DAAE, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 56(3): 782-787.
- TRAXLER, A. (Hrsg.) (1998): Ökologische Risikoabschätzung von gentechnisch veränderten Pflanzen: Auskreuzung und Bewertung agronomisch relevanter Resistenzen. Tagungsband zum Symposium vom 19.05.1998, Wien, Bundeskanzleramt Sektion VI.
- TREVORS, J. T. (1984): Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* 16: 673-674.
- TREVORS, J. T.; KUIKMAN, P. & WATSON, B. (1994): Transgenic plants and biogeochemical cycles. *Molecular Ecology* 3: 57-64.
- TREVORS, J. T. & van ELSAS, J. D. (1995): *Nucleic acids in the environment*. Springer-Verlag, Berlin.
- UEDA, T.; SUGA, Y. & MATSUGUCHI, T. (1995): Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Eur. J. Soil Sci.* 46: 415-421.
- UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.) (1998): *Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP)*. UBA-Texte 77/98, Berlin.
- VAHJEN, W.; MUNCH, J. C. & TEBBE, C. C. (1995): Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effects of soil supplemented with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community level. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 317-328.
- WANG, Z.; CRAWFORD, D. L.; MAGNUSON, T. S.; BLEAKLEY, B. H. & HERTEL, G. (1991): Effects of bacterial lignin peroxidase on organic carbon mineralization in soil using recombinant *Streptomyces* strains. *Can J Microbiol* 37(4): 287-294.
- WELP, G. & BRÜMMER, G. (1985): Der Fe (III)-Reduktionstest – ein einfaches verfahren zur Abschätzung der Wirkung von Umweltchemikalien auf die mikrobielle Aktivität in Böden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 148: 10-23.
- WOESE, C. R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271
- YU, L.; BERRY, R. E. & CROFT, B. A. (1997): Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). *Journal of Economic Entomology* 90(1): 113-118.

## ANHANG 1/Literaturrecherche

In folgenden Datenbanken wurde eine computerunterstützte Literaturrecherche durchgeführt:

- **BIOSIS PREVIEW(S)** 1969-1997/Jul W2, (c) 1997 BIOSIS
- **AGRICOLA** 70-1997/Jul, (c) format only 1997 Knight-Ridder Info
- **CAB Abstracts** 1972-1997/Jun, (c) 1997 CAB International
- **Derwent Biotechnology Abs** 1982-1997/Jul B1, (c) 1997 Derwent Publ Ltd
- **AGRIS** 1974-1997/Jun, Dist by NAL, Intl Copr. All rights reserved
- **Current Contents Search(R)** 1990-1997/Jul W4, (c) 1997 Inst for Sci Info
- **Enviroline(R)** 1975-1997/Jun, (c) 1997 Congressional Information Service

Folgende Trefferanzahl wurde mit den angeführten Stichworten erzielt:

Set	Items	Description
S1	1062022	SOIL? ?
S2	1017275	MICROORGANISM? ? OR MICRO()ORGANISM? ? OR BACTERI?? ? OR MICROBIOLOG???? ?
S3	1017334	S2 OR MICRO()BIOLOG???? ?
S4	75665	1*3
S5	1309	GENETICAL?? ?(S)ENGINEER?? ?(S)PLANT? ?
S6	23406	S5 OR TRANSGEN?? ?(3N)PLANT? ?
S7	462	4*6
S8	313	RD (unique items)
S9	5274789	CHANGE? ? OR EFFECT? ?
S10	63	8*9
S11	997003	ASSESSMENT? ? OR EVALUATION? ?
S12	36	8*11
S13	84	10+12

Es erfolgte eine Einschränkung auf 84 Literaturzitate. Die Abstracts aller dieser Artikel wurden durchgesehen und die relevant erscheinenden Literaturstellen im Volltext erarbeitet und, wo sinnvoll, in die vorliegende Studie eingebaut.

Weiters wurde im Online-Katalog des Österreichischen Bibliotheksverbunds unter der Internet-Adresse <http://bvzr.bibvb.ac.at:4505/ALEPH> nach Handbüchern, Kongressbänden und anderen zusammenfassenden Büchern gesucht. Diese Bücher und die darin zitierte Primärliteratur wurde teilweise für diese Studie verwendet.

## ANHANG 2/Methodenübersicht

In folgender Übersicht werden die im Text beschriebenen Methoden kurz mit ihren Vor- bzw. Nachteilen zusammengefasst. Die Durchführung und die entsprechenden Literaturstellen sind in Abschnitt 4 zu finden.

<b>Parameter:</b> Horizontaler Gentransfer	
<b>Methode:</b> Nachweis der Aufnahme von artfremden Genen aus transgenen Pflanzen in das Genom von Bodenbakterien mittels PCR-Technologie	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
hohe Sensitivität der Methode	Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit hohe Probenzahl notwendig, bisher nur unter artifiziellen Bedingungen nachgewiesen

<b>Parameter:</b> Biomasse	
<b>Methode:</b> direkte mikroskopische Zellzahlbestimmungen, Zählung von Einzelzellen	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
geringer Zeitaufwand, kostengünstig, einfache Durchführbarkeit, kultivierungsunabhängig	keine Unterscheidung zwischen lebenden, lebenden, aber nicht vermehrungsfähigen, und toten Zellen möglich

<b>Parameter:</b> Biomasse	
<b>Methode:</b> Lebendkeimzahlbestimmungen, Zählung von koloniebildenden Einheiten	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
kostengünstig, einfache Durchführbarkeit	kultivierungsabhängig; berücksichtigt nicht die nicht kultivierbaren Mikroorganismen, geringe Reproduzierbarkeit, geringe Sensitivität

<b>Parameter:</b> Biomasse	
<b>Methode:</b> Quantitative Bestimmung von Zellbestandteilen (ATP, Chitin, Nucleinsäuren, Lipiden)	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, relativ geringer Zeitaufwand	oft geringe Spezifität, apparativ oft sehr aufwendig (GC, HPLC), quantitative Extraktion notwendig

<b>Parameter:</b> Biomasse	
<b>Methode:</b> Indirekte Bestimmung der Biomasse, substratinduzierte Respiration, Fumigations-methoden	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
kostengünstig, geringer Arbeitsaufwand, gute Reproduzierbarkeit	keine Unterscheidung zwischen ruhendem und aktivem Anteil der Mikroflora, bzw. zwischen Bakterien und Pilzen möglich, geringe Sensitivität

<b>Parameter:</b> spezifische Muster	
<b>Methode:</b> DNA-Fingerprintmethoden (AFLP, RAPD, RFLP, DGGE/TGGE)	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
meist gute Reproduzierbarkeit, bei PCR-Techniken hohe Sensitivität, hohe Spezifität	keine Unterscheidung zwischen ruhendem und aktivem Anteil der Mikroflora, hoher apparativer Aufwand,

<b>Parameter:</b> spezifische Muster	
<b>Methode:</b> molekularbiologische 16S rDNA- bzw. 18S rDNA- Analyse	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
meist gute Reproduzierbarkeit, sehr hohe Sensitivität, Aussagen über quantitative Verhältnisse innerhalb der Arten möglich, kultivierungsunabhängig	keine Aussage über Aktivität, Erfahrung notwendig, hoher apparativer Aufwand, hoher Zeitaufwand

<b>Parameter:</b> spezifische Muster	
<b>Methode:</b> molekularbiologische 16S rRNA-Analyse	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
meist gute Reproduzierbarkeit, sehr hohe Sensitivität, Aussagen über Aktivität möglich, mit 16S rDNA-Analyse kombinierbar; kultivierungsunabhängig	keine Aussage über quantitative Verhältnisse innerhalb der Arten, Erfahrung notwendig, hoher apparativer Aufwand, schwierige Extraktion, hoher Zeitaufwand

<b>Parameter:</b> spezifische Muster	
<b>Methode:</b> Analyse direkt aus dem Boden isolierter Fettsäuren mittels Gaschromatographie	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, hohe Sensitivität, teilweise automatisierbar	Wissensstand noch relativ gering, Erfahrung notwendig, hoher apparativer Aufwand (GC)

<b>Parameter:</b> gesamtmikrobielle Aktivität	
<b>Methode:</b> Bestimmung der Bodenatmung bzw. der Wärmefreisetzung	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, einfache Durchführung	oft lange Inkubationsdauer, in Abhängigkeit vom Bodentyp, oft starker Hintergrund, teilweise apparativ aufwendig (Kalorimeter, Respirometer)

<b>Parameter:</b> gesamtmikrobielle Aktivität	
<b>Methode:</b> Bestimmung der Freisetzung von Reaktionsprodukten (Nitrat, Ammonium, Eisen(II), DMS)	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, meist nur kurze Inkubationszeiten, manche Parameter sind für bestimmte Gruppen spezifisch	teilweise apparativ aufwendig (GC, Atomabsorptionsspektrometer)

<b>Parameter:</b> gesamtmikrobielle Aktivität	
<b>Methode:</b> Aufnahme radioaktiv markierter Substrate ( $[^3\text{H}]$ -Thymidin, $[^3\text{H}]$ -Leucin)	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, sehr sensitiv, geringer Zeitaufwand	oft starker Hintergrund, Aufnahme-mechanismen noch ungeklärt, Isotopenlabor notwendig, hohe Entsorgungskosten

<b>Parameter:</b> Energiezustand von Mikroorganismen	
<b>Methode:</b> Bestimmung von Adenin-Nukleotiden (ATP, ADP, AMP)	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, relativ geringer Zeitaufwand, Aussagen über den physiologischen Zustand der Bodenmikroorganismen möglich	geringe Spezifität, quantitative Extraktion notwendig

<b>Parameter:</b> Aktivität von Bodenzymen	
<b>Methode:</b> Bestimmung der Enzymaktivität durch Messung der freigesetzten Reaktionsprodukte	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
gute Reproduzierbarkeit, Vergleich zwischen Standorten möglich, leichte Durchführbarkeit	keine Aussage über tatsächliche Verhältnisse, oft starken Schwankungen unterworfen

<b>Parameter:</b> Abbauleistung der Bodenmikroorganismen	
<b>Methode:</b> BIOLOG-System, Abbau von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen	
<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
relativ geringer Zeitaufwand, leichte Durchführbarkeit	kultivierungsabhängig, berücksichtigt nicht die ruhende Biomasse, zur Quantifizierung ELISA-reader notwendig

## ANHANG 3/Projekt Datenbank der EU

Eine Internetrecherche in der Datenbank der laufenden und abgeschlossenen EU-Projekte (<http://apollo.cordis.lu/cordis-cgi/>) in den Fachgebieten Agriculture, Biotechnology, Environmental Protection, Life Sciences, Medicine and Health, Safety and Scientific Research ergab insgesamt ca. 200 Projekte (zum Teil mehrfach angeführt). Die meisten dieser Projekte waren dem Fachbereich Medizin zuzuordnen.

Hier soll ein Überblick über einige, für die Erstellung eines Monitoringkonzepts relevante, Projekte gegeben werden. Neben den hier angeführten, gibt es eine Vielzahl von Projekten, die ähnliche Themen zum Inhalt haben. Eine vollständige Aufzählung würde aber den Rahmen vorliegender Studie sprengen.

<b>Agronomic environmental and genetic assessment of transgenic crop plants</b>		
<b>RCN:</b> 135533	<b>Projekt reference:</b> BAP*0418	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.12.1990
<b>Prime contractor:</b>	Imperial Chemical Industries Ltd. Plant Protection Division J. Dunwell Manchester, UK	
<b>Inhalt:</b>	Stabilität der gentechnischen Veränderung, Morphologische Untersuchungen, Auskreuzungstests mit Mantelsaaten	

<b>Safety assessment of the deliberate release of two model transgenic crop plants, oilseed rape and sugar beet</b>		
<b>RCN:</b> 4446	<b>Projekt reference:</b> BIOT0298	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.3.1994
<b>Prime contractor:</b>	Plant Genetic Systems NV P. Rüdelsheim Gent, Belgien	
<b>Inhalt:</b>	Pollenverbreitung und Auskreuzung, Samenverbreitung, populationsdynamisches Verhalten der GVP, Hybridbildung und Lebensfähigkeit der Hybride, Stabilität der GVP über mehrere Generationen, Untersuchungen unter landwirtschaftlichen Bedingungen, Computermodelle zur Ermittlung des Ausbreitungsrisikos	

<b>Environmental impact of transgenic plants on beneficial insects</b>		
<b>RCN:</b> 37582	<b>Projekt reference:</b> BAP*0418	<b>Status:</b> begonnen 01.10.1996
<b>Prime contractor:</b>	Institut National de la Recherche Agronomique Minh-Ha Pham-Delegue Bures-sur-Yvette, Frankreich	
<b>Inhalt:</b>	Effekte von verschiedenen gentechnischen Veränderungen (Produktion von Chitinase, Protease-Inhibitoren, Lectinen) auf verschiedene Nutzinsekten. Multidisziplinärer Ansatz: Biochemie, Neurophysiologie, Ethologie, Computersimulationen ...	

<b>Analysis of gene transfer between microorganisms and plants</b>		
<b>RCN:</b> 4509	<b>Projekt reference:</b> BIOT0282	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.03.1994
<b>Prime contractor:</b>	Institut Pasteur J. Davies Paris, Frankreich	
<b>Inhalt:</b>	Effekt von Umweltbedingungen auf konjugativen Gentransfer, Gentransfer zwischen Bakterien und Bakterien und Pflanzen, DNA-Boden Interaktionen	

<b>Interactions between microbial inoculants and resident populations in the rhizosphere of agronomically important crops in typical soils</b>		
<b>RCN:</b> 34272	<b>Projekt reference:</b> BIO4960027	<b>Status:</b> begonnen 01.11.1996
<b>Prime contractor:</b>	University College Cork, Department of Microbiology Fergal O'Gara Cork, Irland	
<b>Inhalt:</b>	Wirkung verschiedener gentechnisch veränderter Mikroorganismen (Bio-pestizide, Biodünger) auf das Bodenökosystem, Bioindikatoren (Nematoden) Bodenstoffwechsel, Biomasse, Diversität, Auswirkung antifungaler Proteine aus Pflanzen auf Bodenmikroorganismen	

<b>Acquisition of genes from indigenous bacteria by inoculant strains at long-term release sites</b>		
<b>RCN:</b> 5295	<b>Projekt reference:</b> BIO2920370	<b>Status:</b> abgeschlossen 30.04.1996
<b>Prime contractor:</b>	Institute of Arable Crops Research Penny Hirsch York, UK	
<b>Inhalt:</b>	Mechanismen des Gentransfers zwischen Bakterien, Rhizobien, PCR-Systeme zur Detektion von Rhizobien, Übertragungsraten durch verschiedene Mechanismen	

<b>Risk evaluation for genetically manipulated soil microbial inoculants</b>		
<b>RCN:</b> 13544	<b>Projekt reference:</b> BAP*0413	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.12.1990
<b>Prime contractor:</b>	University College Cork, Department of Microbiology Fergal O'Gara Cork, Irland	
<b>Inhalt:</b>	Entwicklung von Markergenen und Bakterienstämmen, Monitoringsysteme zum Gentransfer und zum Überleben des Inokulums	

<b>Molecular Basis of signalling in <i>Rhizobium meliloti</i>-<i>Medicago</i> interactions and genetic improvement of nodulation ability</b>		
<b>RCN:</b> 2800	<b>Projekt reference:</b> BIOT0159	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.05.1994
<b>Prime contractor:</b>	Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences Végétales A. Kondorosi Gif-sur-Yvette, Frankreich	
<b>Inhalt:</b>	Wechselwirkung zwischen Bakterien und Pflanzen bei der Knöllchenbildung, Erzeugung transgener Pflanzen (Tabak) mit „Symbiosegenen“, Züchtung effizienterer Rhizobien-Varietäten	

<b>Novel antifungal proteins: application in crop protection</b>		
<b>RCN:</b> 208	<b>Projekt reference:</b> AGRE0005	<b>Status:</b> abgeschlossen 31.12.1994
<b>Prime contractor:</b>	Katholieke Universiteit Leuven Van der Leyden Leuven, Belgien	
<b>Inhalt:</b>	Isolation antifungaler Proteine, Expression dieser Proteine in transgenen Pflanzen, Toxizitätstests für Insekten, Bakterien und Pilze	

<b>Marker/reporter genes in microbial ecology</b>		
<b>RCN:</b> 39722	<b>Projekt reference:</b> BIO4960434	<b>Status:</b> begonnen 01.11.1996
<b>Prime contractor:</b>	Stockholms Universitet Janet Jansson Stockholm, Schweden	
<b>Inhalt:</b>	Entwicklung von Markergenen für das Monitoring von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, Standardisierung von Methoden in der EU	

## ANHANG 4/Institutionen für die Entwicklung und Durchführung von Monitoringuntersuchungen

In den folgenden Tabellen sind AnsprechpartnerInnen aufgelistet, die für die Konzepterstellung für ein Monitoring von Bodenmikroorganismen oder dessen Durchführung in Frage kommen. Da jede dieser Personen auf seinem/ihrer Spezialgebiet arbeitet, sind für ein umfassendes Monitoring(konzept) möglicherweise mehrere Fachleute heranzuziehen. Für genauere Informationen über die Arbeitsgebiete der einzelnen ExpertInnen, ist es ratsam diverse Datenbanken (Medline, Biological Abstracts) nach rezenten Publikationen zu durchsuchen. Die hier angegebenen Listen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen es ermöglichen, erste Kontakte zu knüpfen.

### ÖSTERREICH:

Name	Adresse	Telefon/Fax/e-mail
Univ. Doz. Dr. Heribert Insam	Universität Innsbruck Institut für Mikrobiologie Technikerstrasse 25 A-6020 Innsbruck	Tel.: 0512-507-6009 Fax: 0512-507-2929 heribert.insam@uibk.ac.at
Univ.Prof. Dr Franz Schinner	Universität Innsbruck Institut für Mikrobiologie Technikerstrasse 25 A-6020 Innsbruck	Tel.: 0512-507-6004 Fax: 0512-507-2929 franz.schinner@uibk.ac.at
Univ.-Prof. Dr. Werner Lubitz	Universität Wien Institut für Mikrobiologie Dr. Bohr-Gasse 9 A-1030 Wien	Tel.: 01-4277-54606 Fax: 01-4277-9546 werner.lubitz@univie.ac.at
Univ. Prof. Dr. Peter Christian Kubicek	Technische Universität Wien Institut für biochemische Technologie und Mikrobiologie Getreidemarkt 7-9 A-1060 Wien	Tel.: +43-1-58801-17250 Fax:+43-1-5874835 peter.christian.kubicek@tuwien.ac.at
Univ. Prof. Dr. Winfried E. H. Blum	Universität für Bodenkultur Wien Institut für Bodenforschung Gregor Mendel-Strasse 33 A-1180 Wien	Tel.: 01-47654-3100 Fax: 01-31060-27 wblum@edv1.boku.ac.at
Univ. Prof. Dr. Hermann Katinger	Universität für Bodenkultur Wien Institut für Angewandte Mikrobiologie Muthgasse 18 A-1190 Wien	Tel.: 01-36006-6202 Fax: 01-36976-15 office@iam.boku.ac.at
DI Josef Schmidt	Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf Bereich Lebenswissenschaften A-2444 Seibersdorf	Tel.: 02254-780-3519 Fax: 02254-780-3653 josef.schmidt@arcs.ac.at
Dr. Helmut Gaugitsch	Umweltbundesamt GmbH Abt. Allg. Ökologie/Naturschutz Spittelauer Lände 5 A-1090 Wien	Tel: 01-31 304-3710 Fax: 01-31 304-5400 gaugitsch@ubavie.gv.at

**ANDERE LÄNDER:**

<b>Name</b>	<b>Adresse</b>	<b>Telefon/Fax/e-mail</b>
Dr. Kornelia Smalla	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Messeweg 11-12 D-38104 Braunschweig, Deutschland	Tel.: +49-531-299 3814 Fax: +49-531-299 3006 k.smalla@bba.de
Prof. Dr. Alfred Pühler	Universität Bielefeld Lehrstuhl für Genetik Universitätsstrasse 25 Postfach 100131 33501 Bielefeld, Deutschland	Tel.: +49-521-1065607 Fax: +49-521-1065626 puehler@genetik.uni- bielefeld.de
Prof. Dr. Jean Charles Munch	GSF München Institut für Bodenökologie Ingolstädter Landstraße 1 D-85764 Neuherberg, Deutschland	Tel.: +49-89-3187 4065 Fax: +49-89-3187 3322
Prof. Dr. K. N. Timmis	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, GBF Dept. Of Environmental Microbiology Mascheroder Weg 1 D-38124 Braunschweig, Deutschland	Tel.: +49-531-6181 400 Fax: +49-531-6181 411 kti@gbf.de
Prof. Dr. Wilfried Wackernagel	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg FB 7, Genetik Ammerländer Heerstr. 114-118 D-26129 Oldenburg, Deutschland	Tel.: +49-441-798 3298 Fax: +49-441-798 3000 genetics@biologie.uni- oldenburg.de
Dr. Genevieve Défago	ETH-Zürich Institute of Plant Sciences 8092 Zürich, Schweiz	Tel.: +41-1-6323869 Fax: +41-1-6321108 defago@ipw.agrl.ethz.ch
Prof. Dr. Dieter Haas	Université de Lausanne Laboratoire de Biologie Microbienne 1015 Lausanne, Schweiz	Tel.: +41-21-6925631 Fax: +41-21-6925635 dieter.haas@lbn.unil.ch
Prof. Dr. Marco Nuti	Università degli Studi di Padova Dipartimento di Biotechnologie Agrarie Via Gradenigo 6 35131 Padova, Italien	Tel.: +39-49-8071442 Fax: +39-49-8070517 biotmpn@ipdunidx.unipd.it
Dr. Paola Bonfante	Università di Torino Dipartimento di Biologia Vegetale Viale P.A. Mattioli 25 10125 Torino, Italien	Tel.: +39-11-65029727 Fax: +39-11-655839 bonfante@ccrs1.imgc.to.cnr.it
Prof. Dr. Jos Vanderleyden	Katholieke Universiteit Leuven F.A. Janssens Lab. for Genetics Willem de Croylaan 42 3001 Heverlee, Belgien	Tel.: +32-16-322403 Fax: +32-16-322990 janssens@agr.kuleuven.ac.be
Prof. Egbertus Johan Lugtenberg	Leiden University Institute of Molecular Plant Sciences Clusius Laboratory Wassenaarseweg 64 NL-2333 AL Leiden, Niederlande	Tel.: +31-71-5275063 Fax: +31-71-5275088 lugtenberg@rulsfb. leidenuniv.nl

Name	Adresse	Telefon/Fax/e-mail
Dr. Jan Dirk van Elsas	Research Institute for Plant Protection, IPO-DLO Binnenhaven 5 PO Box 9060 NL-6700 GW Wageningen, Niederlande	Tel.: +31-317-4760000 Fax: +31-317-410113 j.d.vanelzas@ipo.dlo.nl
Prof. Dr. Janet Jansson	Stocholms Universitet Dept. of Biochemistry 10-12 Svante Arrhenius Vej S-10691 Stockholm, Schweden	Tel.: +46-8-162469 Fax: +46-8-153679 janet@biochemi.su.se
Dr. J. Davies	Institut Pasteur Unité de Génie Microbiologique 25 Rue du Docteur Roux F-75724 Paris, Frankreich	Tel.: +33-45688828 Fax: +33-4568843 davies@pasteur.fr
Dr. Penny Hirsch	Institute of Arable Crops Research Rothamsted Experimental Station AL5 2JQ Harpenden, United Kingdom	Tel.: +44-15827-63133 Fax.: +44-15827-60981
Dr. J. Peter. W. Young	University of York Department of Biology Heslington PO Box 373 YO1 5DD York, United Kingdom	Tel.: +44-1904-432914 Fax: +44-1904-432860 jpy1@unix.york.ac.uk
Prof. Fergal O’Gara	University College Cork Department of Microbiology 30 Western Road Cork, Ireland	Tel.: +353-21-272097 Fax: +353-21-275934 f.ogara@ucc.ie
Dr. R. Seidler	National Research Council Research Associate US EPA National Health and Environmental Effects Research Laboratory-Western Ecology Division 200 SW 35th Street Corvallis, OR 97333, USA	