

**Einfluss der Phosphaternährung  
auf die Exsudation organischer Säuren  
von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Esther Hoberg**

aus Hamburg

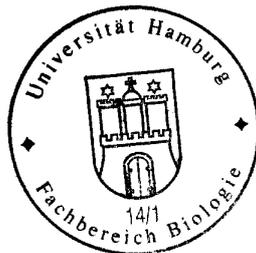
Hamburg 2002

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. Lieberei

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Frau Priv.-Doz. Dr. P. Marschner

Tag der Disputation: 01. März 2002

Hamburg, den 15. Februar 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei möchte ich für die Themenstellung, seine wertvollen Anregungen und die finanzielle Unterstützung durch eines seiner Projekte danken.

Frau Dr. Petra Marschner gilt mein besonderer Dank für die finanzielle Unterstützung der ersten zwei Jahre, ihre intensive Betreuung, ihre unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung der Verdünnungsreihen und bei der schnellen und dabei kritischen Durchsicht der Texte.

Bei Martina Schacht möchte ich mich für die Bestellungen und die Unterstützung im Kampf mit der Technik und den Programmen bedanken.

Herrn Dr. Putzka danke ich für die spontane Bereitwilligkeit fehlende HPLC-Gerätschaften aus der Abteilung der landwirtschaftlichen Chemie zur Verfügung zu stellen.

Den Herren Detlef Böhm und Thomas Tumforde möchte ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in das Gebiet der HPLC und bei der komplikationslosen Reparatur diverser Laborgeräte danken.

Den Belegschaften der Denzkellen 24 (Marseiller Straße) und 13 (Klein Flottbek) möchte ich für ihre Freundschaft, die aufmunternden Diskussionen, die ständige Bereitschaft zur Hilfe bei der Anwendung der verschiedensten Programme und ihre Nachsicht bezüglich meiner Penibilität im Labor danken.

Lydia Asana, Karen Baumann, Angelika Rumberger, und Annie Schacht danke ich für ihre jeweils kurzzeitige Unterstützung im Labor.

Den Mitgliedern meiner ehemaligen Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Michael Böttger möchte ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Freundschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Petra Gienow, die mich unermüdlich durch ihre Freundschaft unterstützte und stets nach Neuigkeiten von der HPLC-Front fragte.

Meinem Mann und meiner Familie danke ich für die Rückendeckung in dieser Zeit und ihre Liebe.

Diese Arbeit wurde über zwei Jahre aus dem DFG-Projekt „Interaktionen zwischen höheren Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen in Hinblick auf die Phosphaternährung“ finanziert. Weitere Mittel stammten aus dem Drittmittelprojekt „Rekultivierung degradiertes, brachliegender Monokulturflächen zu ausgewogenen Mischkulturflächen unter besonderer Berücksichtigung bodenbiologischer Faktoren“ des SHIFT-Programmes (Studies on Human Impact on Forest and Floodplains in the Tropics) vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).



<b>Inhaltsverzeichnis</b>		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellungen</b>	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	3
2.1	Phosphorformen im Boden	3
2.2	Bedeutung des Phosphors in der Pflanzenphysiologie	4
2.3	Rolle der Exsudation bei der Nährstoffmobilisierung	5
2.4	Einfluss der Rhizosphärenmikroflora auf die Phosphatmobilisierung von Pflanzen	6
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	8
3.1	Pflanzenmaterial	8
3.1.1	Pflanzenarten	8
3.1.2	Tomatensorten ( <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.)	8
3.2	Zusammensetzung der Pflanzsubstrate	9
3.2.1	Pflanzsubstrate für Gewächshausversuche	9
3.2.2.	Substrat für das sterile Kultursystem	9
3.3	Bestimmung des pH-Wertes	9
3.4	Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen	10
3.4.1	Inkubationsbedingungen des Kultursystems	10
3.4.2	Sterilisation und Keimansatz von Tomatensaatgut für das Kultursystem	10
3.4.3	Probenahme der exsudathaltigen Lösungen	10
3.5	Bestimmung des Phosphatgehaltes	12
3.5.1	Phosphat in wässrigen Lösungen, Bestimmung nach MURPHY & RILEY (1962)	12
3.5.2	Bestimmung von Phosphat aus getrockneten Pflanzenmaterialien	13
3.5.3	Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates nach RIEHM (1945), verändert	13

3.6	Qualitative und quantitative Bestimmung von niedermolekularen organischen Säuren	15
3.6.1	Gefriertrocknung von Abstauchlösungen und Lösungen aus dem Kultursystem	15
3.6.2	Aufreinigung der lyophilisierten Proben	15
3.6.3	Bestimmung der organischen Säuren aus Abstauchlösungen und Lösungen des Kultursystems mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	16
3.7	Schwer lösliches Phosphat, Phosphat sorbiert an Goethit	17
3.7.1	Herstellung von Goethit nach SCHWERTMANN & CORNELL (1991)	17
3.7.2	Sorption von Phosphat an Goethit nach DYE (1995)	17
3.8	Mikroorganismen	18
3.8.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	18
3.8.2	<i>Gordonia</i> sp.	18
3.8.3	Stammhaltung	19
3.8.3.1	Nährmedium zur Sterilitätskontrolle und Ermittlung der cfu	19
3.8.3.2	Kultur- und Anzuchtmedium von <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	20
3.8.3.3	Kultur- und Anzuchtmedium von <i>Gordonia</i> sp.	21
3.8.4	Bestimmung der alkalischen Phosphomonoesterase-Aktivität mit Methylumbelliferylphosphat	22
3.9	Versuchsdurchführung	24
3.9.1	Versuche im Gewächshaus	24
3.9.1.1	Wachstumsbedingungen der sieben Arten	24
3.9.1.2	Wachstumsbedingungen der acht Tomatensorten	25
3.9.1.3	Wachstumsbedingungen der Tomatensorte 'Freude'	25
3.9.2	Flüssigkultur zur Untersuchung der Phosphatmobilisierungsleistung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 und <i>Gordonia</i> sp.	25
3.9.3	Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem	26
3.9.3.1	Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile	26
3.9.3.2	Sorption organischer Säuren an Sand und Goethit	26
3.9.3.3	Organische Säuren im Sand	27

3.9.4	Reaktion der Organismen auf schwer lösliches Phosphat unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem	27
3.9.4.1	Versuchsaufbau für die Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘	27
3.9.4.2	Versuchsaufbau der monaxenischen Kultur von <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	27
3.9.4.3	Versuchsaufbau der monaxenischen Kultur von <i>Gordonia</i> sp.	28
3.9.5	Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und Rhizosphärenmikroorganismen bei schwer löslichem Phosphat	28
3.9.5.1	Versuchsaufbau für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 bei schwer löslichem Phosphat	28
3.9.5.2	Versuchsaufbau für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Gordonia</i> sp. bei schwer löslichem Phosphat	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1	Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel	30
4.1.1	Auswahl einer Pflanzenart, die bei Phosphatmangel erhöhte Mengen an organischen Säuren ausscheidet	31
4.1.1.1	Gewächshausversuch mit sieben verschiedenen Arten	31
4.1.1.2	Gewächshausversuch mit acht verschiedenen Sorten von <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	34
4.1.1.3	Gewächshausversuch zur Varianz der Trockenmassebildung der Kirschtomate 'Freude'	39
	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1	40
4.1.2	Vergleich zweier Rhizosphärenmikroorganismenisolate bei Wachstum unter Phosphatmangel	41
4.1.2.1	Konzentrationsabhängige Sorption von Phosphat an Goethit	41
4.1.2.2	Bakterienpopulation	42
4.1.2.3	pH-Werte der Medien	43
4.1.2.4	Phosphorgehalte der Medien	44
4.1.2.5	Aktivität der alkalischen Phosphatase	45
4.1.2.6	Exsudation organischer Säuren	46
	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.2	50
	Schlussfolgerungen über die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel	51

4.2	Entwicklung eines Systems zur sterilen Pflanzenanzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen	52
4.2.1	Aufbau des Systems zur monaxenischen Kultur von Tomatenkeimlingen	53
4.2.1.1	Aufbau der Röhren	54
4.2.1.2	Probenahme	57
4.2.2	Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem	58
4.2.2.1	Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile	58
4.2.2.2	Sorption organischer Säuren an Sand und Goethit	59
4.2.2.3	Organische Säuren im Sand	62
	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.2	64
	Schlussfolgerungen zu der Entwicklung eines Systems zur sterilen Pflanzenanzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen	65
4.3	Wirkung von schwer löslichem Phosphat auf die Tomatensorte ‚Freude‘ und zwei verschiedene Mikroorganismenisolate in monaxenischer und dualer Kultur	66
4.3.1	Reaktion der Organismen auf das Angebot schwer löslichen Phosphats unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem	67
4.3.1.1	Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ bei Angebot schwer löslichen Phosphats unter monaxenischen Bedingungen	67
4.3.1.1.1	pH-Wert der Lösungen	68
4.3.1.1.2	Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen	69
4.3.1.1.3	Organische Säuren in den Lösungen	69
4.3.1.2	Monaxenische Kultur von <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 im Kultursystem bei Angebot schwer löslichen Phosphats	72
4.3.1.2.1	pH-Wert der Lösungen	72
4.3.1.2.2	Phosphorgehalte der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen	72
4.3.1.2.3	Aktivität der alkalischen Phosphatase	73
4.3.1.2.4	Exsudation organischer Säuren	73
4.3.1.3	Monaxenische Kultur von <i>Gordonia</i> sp. im Kultursystem bei Angebot schwer löslichen Phosphats	75

4.3.1.3.1	pH-Wert der Lösungen	75
4.3.1.3.2	Phosphorgehalte der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen	76
4.3.1.3.3	Aktivität der alkalischen Phosphatase	77
.		
4.3.1.3.4	Exsudation organischer Säuren	78
	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.1	79
4.3.2	Die Tomatensorte ‚Freude‘ und Rhizosphärenmikroorganismen in Dualkultur bei Angebot schwer löslichen Phosphats	80
4.3.2.1	Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 bei Angebot schwer löslichen Phosphats	81
4.3.2.1.1	pH-Werte der Lösungen	82
4.3.2.1.2	Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen	82
4.3.2.1.3	Aktivität der alkalischen Phosphatase	84
4.3.2.1.4	Exsudation organischer Säuren	85
4.3.2.2	Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Gordonia</i> sp. bei Angebot schwer löslichen Phosphats	88
4.3.2.2.1	pH-Werte der Lösungen	88
4.3.2.2.2	Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen	89
4.3.2.2.3	Aktivität der alkalischen Phosphatase	90
4.3.2.2.4	Exsudation organischer Säuren	90
	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2	94
	Schlussfolgerungen aus den monaxenischen und dualen Kulturen der Organismen in dem Versuchssystem	95
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	96
5.1	Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel	99
5.1.1	Auswahl der Versuchspflanzenart	99
5.1.2	Vergleich zweier Mikroorganismenisolate	105
5.2	System zur sterilen Anzucht	108
5.2.1	Kriterien für den Aufbau des Kultursystems	108
5.2.2	Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem	111

5.3	Wirkung von schwer löslichem Phosphat auf die Tomatensorte ‚Freude‘ und zwei verschiedene Mikroorganismenisolate in monaxenischer und dualer Kultur	113
5.3.1	Monaxenische Kulturen	114
5.3.1.1	Die Tomatensorte ‚Freude‘ in monaxenischer Kultur	114
5.3.1.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 in monaxenischer Kultur	116
5.3.1.3	<i>Gordonia</i> sp. in monaxenischer Kultur	118
5.3.2	Dualkultur	119
5.3.2.1	Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	119
5.3.2.2	Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und <i>Gordonia</i> sp.	122
5.4	Ausblick	125
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	127
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	130
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	139
	<b>Wissenschaftlicher Werdegang</b>	141

# 1 Einleitung und Fragestellungen

Das Makronährelement Phosphor limitiert nach Stickstoff am häufigsten das Wachstum der Pflanzen (MARSCHNER, 1995, SCHACHTMAN et al., 1998). Die Aufnahme und Integration in den Metabolismus erfolgt in Form des Anions der Phosphorsäure, als Phosphat. Phosphat liegt im Boden in den unterschiedlichsten schwer löslichen anorganischen und organischen Formen vor (GERKE, 1995). Durch Sorption und eine geringe Mobilität übertrifft der Gehalt gelösten und damit leicht verfügbaren Phosphats in der Bodenlösung selten  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  und beträgt dort kaum mehr als ein Hundertstel des Phosphatbedarfs der Pflanzen während einer Vegetationsperiode (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Von Phosphatmangel wird in dem Fall gesprochen, in dem die Versorgung mit dem Nährstoff unzureichend ist und das Element zum begrenzenden Faktor des Wachstums wird. Pflanzen und Mikroorganismen haben daher verschiedene Mechanismen entwickelt, um ihre Phosphaternährung trotz der geringen direkten Verfügbarkeit dieses Nährstoffes aus der Rhizosphäre zu gewährleisten.

Nach LYNCH (1997) verstärken Pflanzen unter Phosphatmangel ihr Wurzelwachstum, erhöhen die Phosphataufnahmerate der Wurzeln, mobilisieren und verlagern Phosphat aus älteren Blättern und schöpfen den vakuolären Vorrat der Zellen an Phosphat aus. Auch ist eine Ansäuerung der Rhizosphäre durch eine verstärkte Sekretion von Protonen festgestellt worden (AMANN & AMBERGER, 1989, PETERSEN & BÖTTGER, 1991). Die Ansäuerung führt unter anderem zu einer erhöhten Löslichkeit von Calciumphosphat. Ein weiterer Mechanismus ist die Exsudation niedermolekularer organischer Säuren in den Boden. Diese säuern das Substrat ebenfalls an und chelatisieren Metalionen in der Rhizosphäre, wodurch Phosphat und einige Mikronährelemente mobilisiert werden (SCHACHTMAN et al., 1998). Unter Phosphatmangelbedingungen kann es zu einer verstärkten Exsudation organischer Säuren kommen (JONES, 1998). Bei einigen Pflanzenarten werden durch eine vielfache Verzweigung, mit Wurzelhaaren besetzter Feinwurzeln, morphologisch veränderte Wurzelzonen, gebildet (DINKELAKER et al., 1994). Diese Wurzelzonen werden Proteoid- oder Clusterwurzeln genannt und können bei Phosphatmangel große Mengen organischer Säuren in den Boden exsudieren (NEUMANN & RÖMHELD, 2000). Alle genannten Mechanismen dienen der Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit in der Rhizosphäre.

Wasserlösliche Wurzelexsudate, die zur Analyse des Gehaltes und der Zusammensetzung organischer Säuren dienen, können durch Eintauchen des Wurzelsystems in belüftete Lösungen für einen definierten Zeitraum gewonnen werden (GRANSEE & WITTENMAYER, 2000). Auf diese Weise ist eine nur durch wenige artifizielle Bedingungen veränderte Wurzeleistung qualitativ und quantitativ erfassbar. Auch durch eine Perkolations des Substrates (NEUMANN & RÖMHELD, 2000) ist eine Probenahme möglich. Ebenfalls werden Wurzeln zur Probenahme aus dem Substrat freipräpariert oder hydroponische Kulturen mit Sammellösung eingesetzt, (AL-NIEMI et al., 1998, GERKE et al., 2000, LIPTON et al., 1987b). Da in den aufgeführten Untersuchungen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Prozesse in der Rhizosphäre durch die Probenahmebedingungen eingeschränkt ist, sollte in Anlehnung an naturnahe Bedingungen, der Boden oder das Substrat unbedingt berücksichtigt und eine zerstörungsarme Probenahmemethode angewendet werden (GRANSEE &

WITTENMAYER, 2000, SCHACHTMAN et al., 1998). Grundsätzlich entstehen durch eine Beschädigung der Wurzeln während der Probenahme und einer damit verbundenen Freisetzung von Zellinhalten, leicht Artefakte, die zu einer Verfälschung der Zusammensetzung der Rhizosphärenbodenlösung führen.

Die Wechselwirkungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen sind sehr komplex und reichen von engen Symbiosen über funktionelle Beziehungen wurzelassoziierter freilebender Mikroorganismen bis zu Parasitismus durch Wurzelschaderreger (DEUBEL, 1996). Durch Nährstoffmobilisierung und Produktion von Phytohormonen können Rhizosphärenmikroorganismen einen großen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen haben (GISI et al., 1990). Da es bei der Mobilisierung schwer löslichen Phosphats zu Wechselwirkungen zwischen den Pflanzen, den Rhizosphärenmikroorganismen und dem Boden kommen kann, sind die Mikroorganismen des wurzelnahen Bodens unbedingt in die Untersuchungen einzubeziehen. Alle drei Komponenten haben einen Einfluss auf die Dynamik der Nährstoffaufnahme (DEUBEL, 1996). SCHACHTMAN et al. (1998) regten deswegen für zukünftige Untersuchungen der Phosphataufnahme von Pflanzen an, dass die Wachstums- und Probenahmebedingungen denen im Boden, wo die Phosphatkonzentration niedrig ist und die Mikroorganismen sowohl Aufnahme als auch Mobilisierung beeinflussen, entsprechen müssen.

Einen genaueren Aufschluss können nur die Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sowie die Aufklärung der Wirkungsmechanismen zur Mobilisierung schwer löslichen Phosphates am möglichst ungestörten System geben. Das sollte parallel zu einer Ermittlung der Reaktionen der Organismen auf Phosphatmangel, getrennt voneinander, bezüglich der Exsudation organischer Säuren geschehen. Um die für die Phosphataufnahme relevanten Faktoren aufdecken zu können, sollte ein System entwickelt werden, in dem die Prozesse in der Rhizosphäre zunächst unter sterilen Bedingungen untersucht werden können.

Folgende Fragestellungen ergaben sich für die Arbeit:

- Welche Exsudation organischer Säuren ist bei Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen unter Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit festzustellen?
- Wie muss ein Pflanzenkultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen aufgebaut sein und in welchem Maß werden Phosphat und organische Säuren im System sorbiert?
- Welche Reaktionen hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren löst schwer lösliches Phosphat bei der Tomatensorte ‚Freude‘ und zwei verschiedenen Mikroorganismenisolaten in monaxenischer bzw. in Dualkultur aus?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Phosphorformen im Boden

Phosphor liegt im Boden als anorganisches Phosphat in Form von Calcium-, Eisen- und Aluminiumphosphaten, sowie in wechselnden Anteilen von 20 bis 80 % als organische Phosphatverbindungen vor (SCHACHTMAN, 1998). Ein Teil des Bodenphosphats tritt adsorbiert auf, ein weiterer, sehr geringer Teil, befindet sich in Lösung.

Die anorganischen Phosphate im Boden bestehen vor allem aus schwer löslichen Reaktionsprodukten des Orthophosphats. Bei hohen pH-Werten im Boden und einer hohen Calciumaktivität können Calciumphosphate die Löslichkeit im Boden kontrollieren, bei niedrigen pH-Werten überwiegen Eisen- und Aluminiumphosphate (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Die anorganischen Phosphate im Boden gelten als nicht oder nur schwer in die wässrige Phase überführbar und somit als schwer pflanzenverfügbar.

Die organischen Phosphatverbindungen setzen sich aus Phytaten, Phosphat organischer Biomasse - und damit uncharakterisierter hochmolekularer Substanz - sowie an Humin- und Fulvosäuren komplex gebundenen Phosphaten zusammen (GERKE, 1993, GERKE, 1995, RICHARDSON, 2001). Durch eine Ausscheidung von speziellen Enzymen, wie z.B. Phytasen und Phosphatasen, kann das Phosphat aus organischen Phosphatverbindungen zum Teil durch Pflanzen und Mikroorganismen freigesetzt werden.

Adsorbiertes Phosphat kommt an Tonminerale und organische Substanz, sofern diese komplex gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Al}^{3+}$  enthält, sorbiert vor (GERKE, 1995). Im sauren pH-Bereich wird Phosphat spezifisch im Austausch gegen  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{OH}^-$  an Eisen- und Aluminiumoxide und -hydroxide gebunden. Da  $\text{H}_2\text{O}$  die leichter austretende Gruppe ist und der Anteil dieser Gruppe bei Oberflächen mit variabler Ladung mit abnehmendem pH-Wert zunimmt, steigt der Anteil des adsorbierten Phosphats mit sinkendem pH-Wert an (GERKE, 1995). Der Lösungsvorgang beruht dagegen vor allem auf dem Austausch von Phosphat gegen  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und organische Anionen sowie auf Verdrängung durch  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle (SCHACHTSCHABEL et al., 1989).

Als pflanzenverfügbar gilt das gesamte diffusionsfähige anorganische Phosphat. Je nach der Phosphatversorgung der Böden kann auch das schwer lösliche Phosphat einen mehr oder weniger hohen Anteil des von den Pflanzen aufgenommenen Phosphats bilden. In mitteleuropäischen Böden erfolgt die Phosphataufnahme im wesentlichen aus dem Pool des an Eisen und Aluminium gebundenen Phosphats (GERKE, 1995). Der Phosphatgehalt in der Bodenlösung deckt den Phosphorbedarf der Pflanzen jedoch in der Regel nicht (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Nach FINDENEGG (1994) muss der größte Teil des Phosphats, der durch Pflanzenwurzeln aus dem Boden aufgenommen wird, aus der festen Bodenphase mobilisiert werden. Dabei bestimmt der pH-Wert die Löslichkeit des Phosphats in der Bodenlösung (BAR-YOSEF, 1991), aber auch die Kationenaustauschkapazität des Bodens und der Wurzeln (GRIERSON, 1992). Eine hohe Belegung mit mehrwertigen Kationen im Boden führt zu einer stärkeren positiven Ladung der Phosphatadsorbenten und damit zu einer elektrostatisch bedingten höheren Phosphatadsorption (GERKE, 1995). Weitere

Einflüsse üben die Adsorption von Phosphat an Calcium sowie die komplexierenden Eigenschaften organischer Anionen von Aluminium und Eisen aus (GRIERSON, 1992).

In den meisten bisher durchgeführten Versuchen wurde Phosphat in Form von schwer löslichem Calciumphosphat angeboten (HOFFLAND, 1992). Phosphat kommt in dieser Form jedoch nur in wenigen Bodentypen Mitteleuropas vor. Aus diesem Grund soll in der vorgelegten Arbeit eine schwer lösliche Form des Phosphats Verwendung finden, die der natürlichen Situation eher entspricht. Phosphat liegt in den Böden Mitteleuropas häufig an das Eisenoxid/hydroxid Goethit sorbiert vor. Goethit lässt sich durch eine Fällungsreaktion aus Kalilauge und Fe(III)nitrat herstellen (SCHWERTMANN & CORNELL, 1991) und nach DYE (1995) mit Phosphat beladen. Dieses mit Phosphat beladene Goethit, wurde daher in den durchgeführten Versuchen eingesetzt.

## **2.2 Bedeutung des Phosphors in der Pflanzenphysiologie**

Phosphor wird zu den Makronährstoffen gezählt und ist ein wichtiger Bestandteil von Nucleinsäuren, Phospholipiden, Energieäquivalenten und Phosphokinasen (RICHTER, 1996). Eine ausreichende Versorgung der Pflanzen mit Phosphor ist daher essentiell für ausreichendes Wachstum (MARSCHNER, 1995). Die natürlichen Phosphorsenken in der Pflanze sind die meristematischen und sich streckenden Gewebe, während ausgewachsene und alte Gewebe als Quelle dienen (BIELESKI, 1973). Generell bewirkt Phosphormangel bei Pflanzen eine Erhöhung der Assimilatetranslokation in die Wurzeln (CIERESZKO et al., 1998) und führt zu einer erhöhten Wurzel Ausscheidung (ZHANG et al., 1997). Da der Phosphorbedarf der Pflanzen im Jugendstadium besonders hoch ist, verlagern jüngere Pflanzen einen höheren Anteil des assimilierten Kohlenstoffs in den Wurzelraum als ältere Pflanzen (RÖMER & SCHILLING, 1986).

Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen nehmen Phosphor in Form von Phosphat aus dem Boden auf. Pflanzen können die Bodenlösung dabei bis auf etwa  $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  Phosphat erschöpfen (JUNGK & CLAASEN, 1986, IN: DEUBEL, 1996). Nimmt eine Pflanze gelöstes Phosphat auf, so sinkt die Phosphatkonzentration rund um die Wurzeln ab und es kommt zu einer Verarmungszone. In dieser Verarmungszone geht schwer lösliches bzw. adsorbiertes Phosphat in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenkonzentration in Lösung (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Aufgrund der starken Sorption von Phosphat an die anorganischen und organischen Bestandteile des Bodens und der damit verbundenen geringen Beweglichkeit, ist trotz einer möglichen großen Bevorratung die Phosphatverfügbarkeit für Pflanzen stark eingeschränkt.

Pflanzen nutzen deswegen verschiedene Mechanismen, um Phosphat in der Rhizosphäre zu mobilisieren (SCHACHTMAN et al., 1998). Zu den Mechanismen zählen morphologisch und anatomisch sichtbare Reaktionen, wie ein erhöhtes Wurzelwachstum und eine Ausbildung vermehrter und/oder längerer Wurzelhaare. Ein stark verzweigtes und sich schnell entwickelndes Wurzelsystem gewährleistet einen besseren Zugang zu Bodennährstoffen mit geringer Mobilität (AMANN & AMBERGER, 1989). Je nach dem in welcher Form das

Phosphat im Boden vorliegt, kann eine Änderung des pH-Wertes in der Rhizosphäre zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Phosphat für die Pflanzen führen (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Um an unterschiedliche Formen schwer löslichen Phosphats zu gelangen, können verschiedene Pflanzenarten, bzw. Ökotypen, differierende Quantitäten und Qualitäten niedermolekularer organischer Säuren ausscheiden (STRÖM et al., 1994, ZHANG et al., 1997). Die Effizienz, mit der organische Säuren Phosphat von Eisenoxiden und Tonmineralen im Boden desorbieren, oder die Sorption neu hinzugefügten Phosphats verhindern, nimmt in der Reihenfolge von Tri-, zu Di- und Monocarbonsäuren ab (JONES & DARRAH, 1994).

Eine weitere Form der Mobilisierung ist die Freisetzung von Phosphat aus organischen Phosphatquellen z.B. durch Phytasen und externe Phosphomonoesterasen (Phosphatasen). Mit der Hilfe dieser Enzyme wird anorganisches Phosphat aus organischen Phosphatverbindungen der Bodenmatrix hydrolytisch abgespalten (GRIERSON & COMERFORD, 2000). Pflanzenwurzeln scheiden saure, Mikroorganismen saure und alkalische Phosphatasen aus. Ist der Phosphatgehalt der Bodenlösung niedrig, wird die Synthese neuer und die Aktivität bereits gebildeter Phosphatasen gesteigert (AMANN & AMBERGER, 1989, HUANG et al., 1998). Über den Weg der Aktivitätsmessung der Phosphatasen ist deswegen festzustellen, ob ein Organismus unter Phosphatmangel leidet oder nicht.

### **2.3 Rolle der Exsudation bei der Nährstoffmobilisierung**

Eine Reihe verschiedener organischer Stoffe wird von Pflanzenwurzeln in den Boden abgegeben, darunter Zucker, Aminosäuren, organische Säuren und Phenole (AZAIZEH et al., 1995, STRÖHM et al., 1994). Der Kontakt der Pflanzenwurzeln mit der Bodenmatrix sowie die Anwesenheit von Mikroorganismen stimulieren indessen die Exsudation organischer Verbindungen in den Wurzelraum (MERBACH et al. 1991, IN: DEUBEL, 1996). Die Zusammensetzung dieser Wurzelexsudate ist von verschiedenen Faktoren abhängig, so z.B. von der Pflanzenart, dem Pflanzenalter, diversen Bodenparametern und abiotischen Faktoren (LIPTON et al., 1987, ROVIRA, 1959). Insbesondere Säuren und Chelatbildner beeinflussen die Phosphatlöslichkeit.

Die Phosphatlösung im Boden wird durch organische Säuren um ein Vielfaches erhöht (GERKE et al., 1994). Dabei kommen zumindest zwei Mechanismen, durch die Phosphat freigesetzt wird, zum Tragen. So wird zum einen die Desorption von Phosphat durch die Komplexbildung di- und trivalenter Kationen gefördert. Zum anderen kommt es zum direkten Ligandenaustausch des Phosphats von Bindungsplätzen an Eisenoxiden und Tonmineralen (JONES, 1998). Generell steigt die Bindung von Anionen, die spezifisch über Ligandenaustausch an Eisen- und Aluminiumoxide gebunden werden, mit abnehmendem pH-Wert an (GERKE, 1995). Citrat und Malat scheinen die wesentlichen organischen Säureanionen zu sein, die von Wurzeln bei Phosphatmangel ausgeschieden werden (JONES & DARRAH, 1994). DYE (1995) folgerte, dass Pflanzen, deren Wurzelexsudate einen hohen Citratanteil beinhalten, mehr gebundenes Phosphat nutzbar machen können, als Pflanzen mit einem niedrigen Citratanteil in den Wurzelexsudaten. Gleiches gilt für die Rhizosphä-

rennmikroorganismen. Auf die Prozesse in der Rhizosphäre hat es keinen Einfluss, von welchem Organismus, Pflanze oder Mikroorganismus, das Citrat ausgeschieden wurde. Organische Säuren bewirken neben der Mobilisierung von Phosphat zudem eine schnelle Mobilisierung von Eisen aus Goethit und Ferrihydrit (JONES et al., 1996).

## **2.4 Einfluss der Rhizosphärenmikroflora auf die Phosphatmobilisierung von Pflanzen**

Der Aspekt der Phosphatmobilisierung durch die Bodenmikroflora kann wegen der großen Zahl und der hohen Aktivität mikrobieller Zellen sowie des Kohlenstoffumsatzes in der Rhizosphäre nicht unberücksichtigt bleiben (JONES, 1998). Bodenmikroorganismen sind an einer Reihe von Prozessen involviert, die einen Einfluss auf die Phosphattransformation und damit die Phosphatverfügbarkeit für die Pflanzenwurzeln ausüben. Sie können Phosphat aus den anorganischen und organischen Anteilen des Gesamtphosphats solubilisieren, mineralisieren und effektiv die Oberfläche der Wurzeln erhöhen. Außerdem beinhaltet die mikrobielle Biomasse einen großen Pool an immobilisiertem Phosphat, das potentiell für die Pflanzen verfügbar ist (RICHARDSON, 2001).

Rhizosphärenmikroorganismen können sowohl positive als auch negative Effekte auf die Phosphaternährung von Pflanzen ausüben. So geben auch Mikroorganismen phosphatmobilisierende Substanzen wie z.B. organische Säuren ab (DEUBEL, 1996). Das auf diese Weise freigesetzte Phosphat könnte von den Pflanzen aufgenommen werden, so dass synergistische Effekte möglich sind. DEUBEL & GRANSEE (1995) zeigten, dass der *Pseudomonas fluorescens* Stamm PsIA 12 unter *in vitro* Bedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle signifikant mehr Phosphat aus Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) mobilisieren konnte als mit anderen Zuckern.

Zu den für die Pflanzen bezüglich der Phosphatmobilisierung negativen Effekten der Mikroorganismen zählt deren Nutzung der Wurzelexsudate als Nahrungsquelle (AZAIZEH et al., 1995, JONES & DARRAH, 1994, SØRENSEN et al., 2001). Werden von den Pflanzen ausgeschiedene organische Säuren mikrobiell abgebaut, so kommt es zu einer Verringerung der Phosphatmobilisierung. Andererseits kann dieses zu einer verstärkten Exsudation der Wurzeln führen, um trotz allem eine ausreichende Versorgung der Pflanze mit Phosphat zu erzielen. Einen weiteren negativen Aspekt stellt die Konkurrenz von Pflanzen und Mikroorganismen um das mobilisierte Phosphat dar. Für beide Gruppen zählt Phosphat zu den Makronährstoffen. Nach MCLAUGHLIN & ALSTON (1987) sind die mikrobielle Biomasse und die Pflanzen gleichsam effektiv in der Aufnahme von Phosphat aus ausgebrachten Düngemitteln, weshalb die mikrobielle Biomasse eine Hauptkomponente und eine vorantreibende Kraft in Bezug auf den Phosphatkreislauf im Boden verkörpert.

Die symbiontische Beziehung zwischen Pflanzenwurzeln und Mykorrhizapilzen wird seit langem als einer der wichtigen Mechanismen angesehen, durch den die Pflanzen Bodenphosphat beziehen können (RICHARDSON, 2001). Dagegen ist die Rolle der wurzellosoziierten freilebenden Bakterien bezüglich der Phosphatmobilisierung für die Pflanzen bisher nur wenig erforscht. Die phosphatmobilisierenden Mikroorganismen können bis zu 40 %

der kultivierbaren Population der Bodenmikroorganismen ausmachen, wobei ein signifikanter Anteil von ihnen aus dem Rhizosphärenboden isoliert werden kann (RICHARDSON, 2001). Man geht davon aus, dass die Phosphatmobilisierung durch die Mikroorganismen das Pflanzenwachstum im Boden entscheidend fördert. Die Produktion und Ausscheidung organischer Säuren durch Mikroorganismen wird generell als der Hauptfaktor angenommen.

Viele Mikroorganismen, die im Labor Phosphat in Medien solubilisieren konnten, zeigten dagegen im Boden limitierte Fähigkeiten. Obwohl einige Mikroorganismen dazu fähig sind ausreichend Bodenphosphat für die eigenen Bedürfnisse zu lösen, könnten sie außerstande sein, genügend zusätzliches Phosphat zu mobilisieren, um den Bedarf der Pflanzen ebenfalls zu decken (RICHARDSON, 2001). Die Konkurrenz von Pflanzen und Mikroorganismen um den selben Nährstoff im Boden sowie der Kohlenstoffumsatz der Mikroorganismen aus den Exsudaten der Pflanzen steht der Verwendung gleicher Mechanismen der Pflanzen und Mikroorganismen zur Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit gegenüber. Aus diesem Zwiespalt erklärt sich das besondere Interesse am Einfluss der Phosphaternährung auf die Exsudation organischer Säuren von Rhizosphärenmikroorganismen und der daraus resultierende Effekt auf die Phosphatverfügbarkeit für die Pflanzen.

### 3 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle aufgeführten Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

#### 3.1 Pflanzenmaterial

##### 3.1.1 Pflanzenarten

Die aufgeführten sieben Arten wurden im Gewächshaus (Abschnitt 4.1.1.1) kultiviert:

*Beta vulgaris* L., *Brassica napus* L., Sorte 'Wotan', *Lycopersicum esculentum* Mill., Sorte 'Freude', *Medicago sativa* L., *Raphanus sativus* L., Sorte 'Rex', *Trifolium pratense* L., und *Zea mays* L., Sorte 'Garant'.

##### 3.1.2 Tomatensorten (*Lycopersicum esculentum* Mill.)

Von der Firma Sperling & Co (Lüneburg) wurde Saatgut acht verschiedener Tomatensorten (*Lycopersicum esculentum* Mill.) bezogen und in einem Sortenvergleich (Abschnitt 4.1.1.2) im Gewächshaus eingesetzt. Die Namen und, soweit bekannt die Wuchs- oder Fruchtformen, der acht Sorten werden im folgenden aufgeführt:

'Freude' (Kirschtomate), 'Goldene Königin' (Stabtomate), 'Hellfrucht' (Stabtomate), 'Judy', 'Judy-Resisto', 'Marmande' (Fleischtomate), 'Roma' (Safttomate) und 'San Marzano' (Eiertomate).

Für alle weiteren Versuche zur Varianz der Trockenmasseakkumulation und zur Exsudation organischer Säuren im Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen wurde die Tomatensorte 'Freude' verwendet.

## **3.2 Zusammensetzung der Pflanzsubstrate**

### **3.2.1 Pflanzsubstrate für Gewächshausversuche**

Für die Versuche im Gewächshaus wurde eine Mischung aus einem Drittel Grobsand (Korngröße 0,63 bis 2,0 cm, Paul Pundt & Co, Hamburg) und zwei Dritteln Mittelsand (Korngröße, 0,2 bis 0,63 cm Paul Pundt & Co, Hamburg) verwendet. Der Sand wurde mit deionisiertem Wasser mehrfach gewaschen, bei 65°C im Trockenschrank getrocknet und mit Nährsalzen der folgenden Konzentrationen versetzt.

Makronährelemente ( $\text{mg kg}^{-1}$ ):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1208;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  1114;  $\text{MgSO}_4$  654; Fe-EDTA 2;

Mikronährelemente ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ):  $\text{MnCl}_2$  156;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  585;  $\text{ZnSO}_4$  12;  $\text{CuSO}_4$  5;  
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  1.

Die Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 6,5 eingestellt. Die Nährlösung wurde dem Sand zugegeben (12 Gewichtsprozent) und gründlich eingemischt.

### **3.2.2 Substrat für das sterile Kultursystem**

Bei den in den Kulturröhren durchgeführten Versuchen traten bei gleichem Nährstoffgehalt des Sandes wie in den Versuchen unter Gewächshausbedingungen Toxizitätserscheinungen an den Pflanzen auf. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in den Röhren die Nährsalze nicht durch einen Gießvorgang ausgewaschen wurden. Die Konzentration der Salze wurde deswegen auf ein Viertel der in Abschnitt 3.2.1 angegebenen Menge reduziert. Die dem Substrat beigefügte Nährlösung wurde auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt, wodurch sich im Substrat nach dem Autoklavieren ein pH-Wert von 6,0 ergab. Als schwer verfügbare Phosphatquelle diente das an das Eisenoxid/hydroxid Goethit sorbierte Phosphat, welches dem Substrat zugefügt wurde (Abschnitt 3.7). Goethit ist in mitteleuropäischen Böden durchschnittlich zu 0,07 Gewichtsprozent vorhanden (SCHACHTSCHA-BEL et al., 1989). Es wurden 0,7 g Goethit pro kg Substrat verwendet.

## **3.3 Bestimmung des pH-Wertes**

Die pH-Werte der angesetzten Lösungen und Proben wurden mit einem pH-Meter der Firma Schott (pH-Meter CG 825, Schott Geräte, Hofheim a. Taunus) bestimmt.

### **3.4 Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen**

#### **3.4.1 Inkubationsbedingungen des Kultursystems**

Der genaue Aufbau des Kultursystems ist in Abschnitt 4.2.1.1 eingehend beschrieben. Die Röhren standen in der Klimakammer (Abschnitt 4.2.2.1) aufrecht und wurden seitlich und von oben beleuchtet, wobei die Beleuchtungsstärke in Pflanzenhöhe außerhalb der Röhren  $450 \mu\text{E} (\text{m}^2\text{s})^{-1}$  betrug. Verwendet wurden HQI-T 400 W/D Daylight-Lampen der Firma Osram (München), bzw. Arc 400 W/D Arcstream Kolorarc-Lampen der Firma GE Lighting (Abingdon Oxfordshire, Great Britain).

Im Klimaschrank (Pflanzenwachstumschamber 1604 +, Rumed, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) erfolgten alle weiteren Versuche, ebenfalls bei einer Beleuchtungsstärke von  $450 \mu\text{E} (\text{m}^2\text{s})^{-1}$ . Die Kultivierung fand bei einem Tag-/Nachtwechsel von 16/8 h und einem entsprechendem Temperaturwechsel von  $26^\circ/20^\circ\text{C}$  statt.

#### **3.4.2 Sterilisation und Keimansatz von Tomatensaatgut für das Kultursystem**

Die sterile Keimung der Samen erfolgte in autoklavierten Glasröhren (30 cm lang, 3 cm Durchmesser, Schmidt & Co, Braunschweig), die eine Filterpapierrolle (Typ 2048, Schleicher & Schuell, Dassel) enthielten. Zur äußeren Sterilisation des Tomatensaatgutes wurde eine 5 %ige Natriumhypochlorid-Lösung angesetzt, in der die Samen in einem autoklavierten Gefäß drei Minuten inkubiert wurden. Das Saatgut wurde anschließend in der reinen Werkbank viermal mit autoklaviertem deionisiertem Wasser gespült. Zwischen den Spülängen verblieben die Samen für mindestens fünf Minuten im deionisierten Wasser.

Die oberflächensterilisierten und angequollenen Tomatensamen wurden in der reinen Werkbank zwischen zwei Filterpapierlagen ausgelegt (4-6 Samen pro Röhre). Die Glasröhren wurden nach oben hin mit einem Silikonstopfen und am seitlichen oberen Ende mit einem sterilen Luftfilter verschlossen. Sie enthielten eine gesättigte Calciumsulfat-Lösung, die das Filterpapier benetzte. Die Keimröhren wurden für 10 bis 14 Tage zur Anzucht in die Klimakammer bzw. den Klimaschrank bei  $26^\circ\text{C}$  und einem Tag-/Nachtwechsel von 16/8 Stunden gestellt.

#### **3.4.3 Probenahme der exsudathaltigen Lösungen**

Zunächst wurde über den Silikonschlauch die noch in der Röhre vorhandene Flüssigkeit abgezogen (ca. 13 ml), in der sich im Versuchsverlauf zwischen den Organismen und dem Sand ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Diese Flüssigkeit wird im folgenden als Gleichgewichtslösung, GL, bezeichnet (Abbildung 1). Dann wurden die Röhren von oben mit sterilem deionisiertem Wasser (20 ml Aqua dest.) versetzt und die Lösung rasch erneut über den Silikonschlauch abgezogen (ca. 17 ml). Durch diesen Vorgang sollte der Sand gespült und bereits vorhandene Exsudate größtenteils entfernen werden, damit die danach

gewonnenen Exsudate auf die folgende Sammelperiode von 60 min bezogen werden konnten. In diese Flüssigkeit hinein erfolgte ein Austausch von schwach sorbierten Exsudaten und Ionen, weswegen die Lösung Austauschlösung, AuL, genannt wird. Nach dieser Spülung wurden erneut 20 ml steriles deionisiertes Wasser über den oberen seitlichen Zugang zugegeben und nach einer Stunde abgezogen. Diese Fraktion wird als eigentliche Exsudatfraktion betrachtet (ca. 17 ml) und als Exsudatprobe, EP, bezeichnet. Der Vorgang der Probenahme und die Bezeichnungen der verschiedenen abgezogenen Lösungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

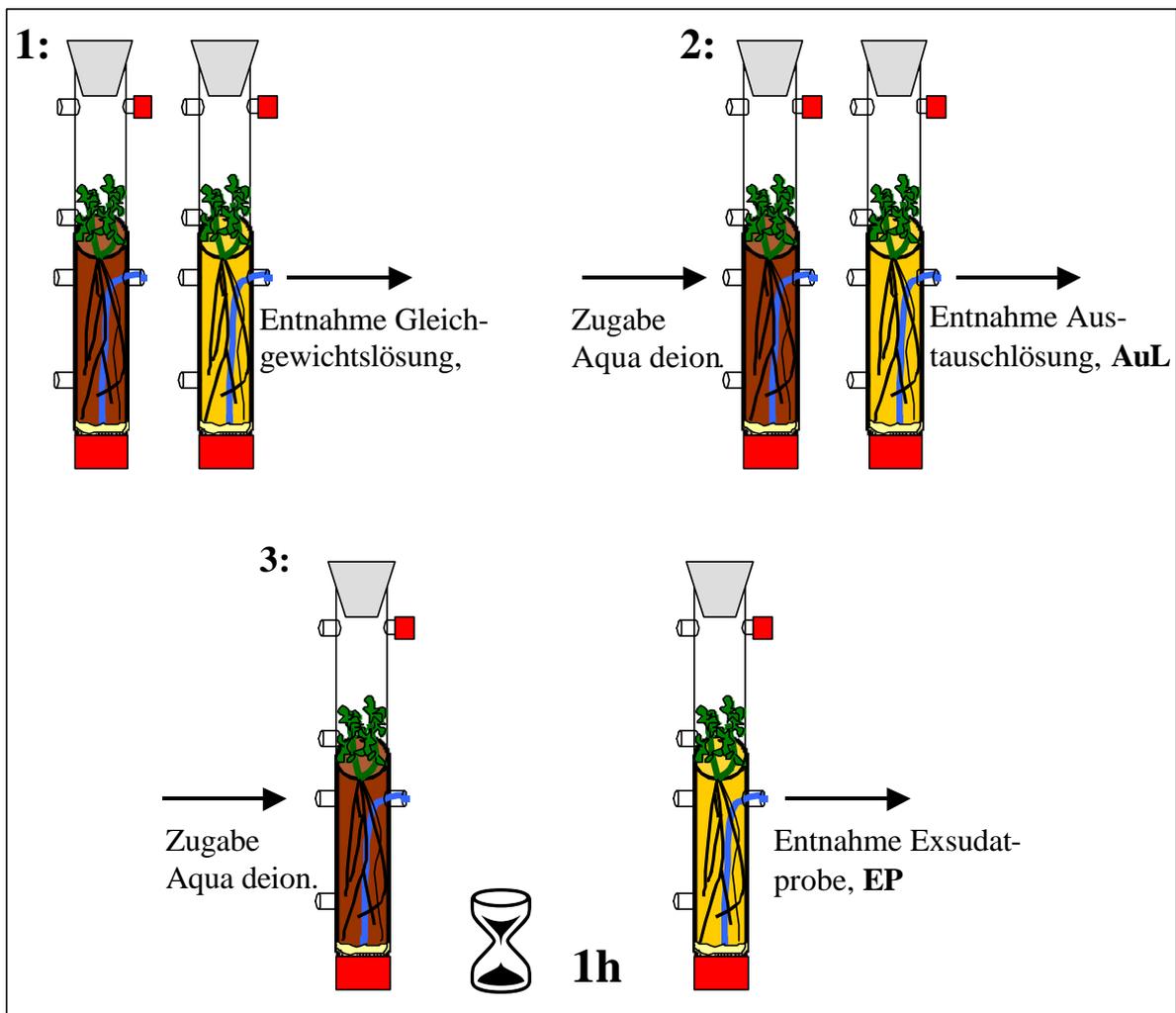


Abbildung 1: Schema der Probenahme von Lösungen aus dem System zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen. 1: Entnahme der Gleichgewichtslösung (GL), 2: Zugabe von Aqua deion. und sofortige Entnahme der Austauschlösung (AuL), 3: erneute Zugabe von Aqua deion., Sammelperiode von einer Stunde (1 h), dann Entnahme der Exsudatprobe (EP).

### 3.5 Bestimmung des Phosphatgehaltes

#### 3.5.1 Phosphat in wässrigen Lösungen, Bestimmung nach MURPHY & RILEY (1962)

Die Methode nach MURPHY UND RILEY (1962) eignet sich für die Bestimmung von wasserlöslichem Phosphat bzw. von Phosphat in wässrigen Lösungen und wurde für die Phosphatgehalte der Lösungen im Kultursystem angewendet. Die Angaben in den Versuchen erfolgen in  $\mu\text{g}$  oder  $\text{ng}$  Phosphor (P) pro Milliliter. Die Methode ermöglicht eine genaue Bestimmung bis zu einer Konzentration von  $14 \text{ ng P ml}^{-1}$ . Das in Tabelle 1 aufgeführte Reagenz musste täglich frisch in deionisiertem Wasser angesetzt werden. Pro 1 ml Probe, bzw. Eichwert, wurde 1 ml Reagenz benötigt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reagenzes nach MURPHY & RILEY (1962). Die Angaben der verwendeten Substanzen beziehen sich auf 100 ml Reagenz.

Inhaltsstoffe	ml/mg pro 100 ml Endvolumen
Schwefelsäure, $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5 N	16 ml
Ammoniumheptamolybdat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ , 4 %ig	5 ml
Ascorbinsäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	180 mg
Kaliumantimontartrat, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KO}_7\text{Sb}$ , 0,275 %ig	1,6 ml

In Deutschland erfolgt die Angabe der Phosphatwerte meist in  $\text{mg P}_2\text{O}_5 (100 \text{ g Boden})^{-1}$ , bzw. in  $\text{mg P l}^{-1}$ . Für die Eichreihe wurden Konzentrationen in dem Bereich von 0 bis  $10 \mu\text{g P}_2\text{O}_5 \text{ ml}^{-1}$  Phosphat gewählt und anschließend die gemessenen Konzentrationen der Proben in  $\text{ng}$  bzw.  $\mu\text{g P ml}^{-1}$  umgerechnet. Dabei entspricht  $1 \mu\text{g P ml}^{-1}$  einer Konzentration von  $2,292 \mu\text{g P}_2\text{O}_5 \text{ ml}^{-1}$ .

Berechnung der Phosphorkonzentration in den Lösungen:  $\text{MG P}_2\text{O}_5 : (2 * \text{MG P})$ .

$\text{MG P}_2\text{O}_5$ :  $141,94 \text{ g l}^{-1}$

$\text{MG P}$ :  $30,97 \text{ g l}^{-1}$

$$141,94 : 61,94 = 2,292$$

Die Eichlösungen ( $0; 0,05; 0,07; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 \mu\text{g P}_2\text{O}_5 \text{ ml}^{-1}$ ) wurden angesetzt und wie die Proben mit je einem Milliliter Reagenz gemischt. Die Lösungen wurden miteinander vermischt und für 20 Minuten stehengelassen, damit sich der Farbkomplex (Molybdatblau) ausbilden konnte. Danach wurden die Proben erneut gemischt und gegen den Blindwert mit dem Photometer (LKB Biochrom Ultrospec Plus 4054 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England) bei  $720 \text{ nm}$  gemessen.

### 3.5.2 Bestimmung von Phosphat aus getrockneten Pflanzenmaterialien

Das bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknete und gewogene Pflanzenmaterial (Spross, Wurzel) wurde zur Bestimmung des Gehaltes an Gesamtphosphat in Keramiktiegeln bei 550°C über Nacht im Muffelofen verascht. Die Proben wurden anschließend mit 4 N Salpetersäure unter dem Abzug für eine Stunde inkubiert (für 10 mg TM ca. 1 ml HNO<sub>3</sub>), über phosphatfreie Faltenfilter (Typ 512 1/2, Schleicher und Schuell, Dassel) in Meßkolben überführt und im Verhältnis 1 : 25 mit Reinstwasser (Milli Q Plus, Millipore, Eschborn) verdünnt. Die Lösungen wurden nach der Methode von MURPHY & RILEY (Abschnitt 3.5.1) auf ihren Phosphatgehalt untersucht.

### 3.5.3 Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates nach RIEHM (1945), verändert

In Deutschland und einigen anderen Ländern Europas wird zur Klärung der Phosphatverfügbarkeit von Böden meist eine auf einem Lactat-Auszug basierende Methode herangezogen. Für die Bestimmung von Phosphat in Böden aller Art mit Carbonatgehalten unter 5 %, in gärtnerischen Feinerden und Substraten, wird eine Bestimmung des Phosphates im Doppellactat-Auszug (DL-Auszug) nach RIEHM (1945) vorgenommen. Dabei wird das Phosphat in einem sauren (pH 3,6), lactathaltigen Auszug in Lösung gebracht. Die Phosphatgehalte, die mit der Doppellactat-(DL)-Methode ermittelt werden, sind nach VETTERLEIN et al. (1999) eng mit der Phosphataufnahme der Pflanzen korreliert, da neben dem Phosphat aus der Bodenlösung auch leicht desorbierbares Phosphat bestimmt wird.

Die im folgenden aufgeführten Reagenzien wurden für die Bestimmung von Phosphor im Doppellactat (DL)-Auszug verwendet.

#### Extraktionslösung

DL-Vorratslösung; 24 g Calciumlactat, (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub> + 5 H<sub>2</sub>O), werden in 160 ml kochendem Reinstwasser gelöst. 8 ml 10 M HCl werden dazugegeben und die Lösung nach dem Erkalten mit Milli Q Plus Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Die DL-Vorratslösung ist im Kühlschrank bei 7°C über mehrere Monate haltbar.

DL-Gebrauchslösung; 25 ml der DL-Vorratslösung werden mit Reinstwasser auf 500 ml verdünnt. Diese Lösung muss täglich frisch angesetzt und auf einen pH-Wert von 3,6 eingestellt werden.

#### Standardlösung für Phosphor

Standardvorratslösung; 48 mg Kaliumdihydrogenphosphat, (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), werden in 25 ml Reinstwasser gelöst. 1 ml der Vorratslösung enthält 100 µg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und wird mit Reinstwasser auf die gewünschten Eichwerte verdünnt. Diese Lösung ist im Kühlschrank bei 7°C über mehrere Monate haltbar.

### Färbereagenzien

Ammoniummolybdatlösung; 5 g Ammoniummolybdat,  $[(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}]$  werden in 80 ml ca. 50 °C warmen Wasser gelöst und nach dem Erkalten mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist mehrere Wochen haltbar.

Reduktionslösung; 0,125 g Ascorbinsäure und 35 mg Zinn(II)-chlorid,  $(\text{SnCl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O})$ , werden in 5 ml 10 M HCl gelöst und mit Reinstwasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung muss täglich frisch bereitet werden.

Für alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurde der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphat im Sand und an den Baubestandteilen der Versuchsröhren (Glasperlen, Filterpapier und Steinwolle) im Doppellactat-Auszug ermittelt. Die Proben wurden mit einer sauren Doppellactat-Lösung über 90 Minuten auf einem Horizontal-Schüttler (Gerhardt, Bonn) bei ca. 80 Rotationen pro Minute extrahiert und ein Molybdatblau-Komplex am Photometer (LKB Biochrom Ultrospec Plus 4054 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England) bei 580 nm gemessen. Auch diese Angaben beziehen sich, wie die Angaben aus Abschnitt 3.5.1, auf  $\mu\text{g}$  oder ng Phosphor (P) pro Milliliter.

Bei herkömmlicher Durchführung der Methode liegt die Nachweisgrenze bei einer Konzentration von  $0,4 \mu\text{g P}_2\text{O}_5 \text{ ml}^{-1}$ , entsprechend  $175 \text{ ng P ml}^{-1}$ , und damit für die hier aufgeführten Versuche zu hoch. Die Methode musste daher für die Bestimmung der niedrigen Phosphatgehalte der aufgeführten Versuche modifiziert werden.

Zum einen wurden statt der im Protokoll angegebenen 5 g lufttrockenen Substrates 10 g Sand und 10 g Glasperlen bzw. ein Gramm Filterpapier und zwei Gramm Watte eingesetzt. Diese Substrate wurden nicht mit 250 ml, sondern lediglich mit 25 ml DL-Gebrauchslösung versetzt und so der DL-Auszug gewonnen. Als großes Problem erwies sich die Kontamination der Reagenzgläser mit geringen Phosphatmengen, die nur unzureichend durch Spülen mit 10 %iger Salzsäure entfernt werden konnten. Um die Hintergrundphosphatkonzentration zu minimieren, wurden statt der Glasgefäße 2 ml Eppendorfgefäße eingesetzt. Dafür mußte der Ansatz der Phosphorbestimmung minimiert werden. Statt die im Protokoll angegebenen 25 ml Probenlösung mit je 1 ml Molybdatreagenz und Reduktionslösung zu versetzen, wurden zu 1 ml Probenlösung 50  $\mu\text{l}$  Molybdatreagenz und 50  $\mu\text{l}$  Reduktionslösung gegeben. Durch diese Modifikationen konnte die Nachweisgrenze von 175 auf  $18 \text{ ng P ml}^{-1}$  gesenkt werden.

### **3.6 Qualitative und quantitative Bestimmung von niedermolekularen organischen Säuren**

#### **3.6.1 Gefriertrocknung von Abstauchlösungen und Lösungen aus dem Kultursystem**

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) der Proben für die HPLC-Analyse der organischen Säuren erfolgte über mehrere Tage mit einer  $\alpha$  I-6-Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode), die an eine Vakuumpumpe (Pfeiffer Duo 004 B, Asslar) angeschlossen war. Ebenfalls gefriergetrocknete Standards zeigten bei dieser Methode eine Wiederfindung nach der Gefriertrocknung von 90 bis 95 % der eingesetzten organischen Säuren.

#### **3.6.2 Aufreinigung der lyophilisierten Proben**

Die über die Lyophilisation aufkonzentrierten Lösungen aus dem Kultursystem und der Flüssigkultur mussten aufbereitet werden, um die sehr hohe Salzkonzentration aus den Lösungen zu entfernen, da die Salze die Detektion von früh eluierenden Säuren in der HPLC unmöglich machten (IMAS et al., 1997a,b). Die Entfernung der Nährsalze in den Exsudaten wurde nach einer Methode von G. NEUMANN, Universität Hohenheim (persönliche Mitteilung) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte über starke Anionen- und Kationenaustauscher (Merck, Darmstadt; bzw. Macherey & Nagel, Düren).

Für die eingeeengten Lösungen aus dem Kultursystem wurden je 0,4 g Kationenaustauschermaterial (LiChrolut Strong cation exchanger (SCX), Merck, Darmstadt bzw. Chromabond SA, Macherey & Nagel, Düren) bzw. 0,8 g Anionenaustauschermaterial (LiChrolut Strong anion exchanger (SAX), Merck bzw. Chromabond SB, Macherey & Nagel) benötigt. Bei den Lösungen, die aus der Flüssigkultur der Mikroorganismen gewonnen wurden (Abschnitt 4.1.2), waren 0,3 g Kationenaustauscher- und 0,6 g Anionenaustauschermaterial ausreichend. Das pulverförmige Material wurde in verschließbare Zentrifugengläschen eingewogen und abwechselnd dreimal mit je einem Milliliter Reinstwasser und Methanol versetzt. Der Inhalt der Zentrifugengläschen wurde jeweils gründlich gevortext und für ca. fünf Minuten bei 4000 Upm (Econo Spin, Sorvall Instruments, Du Pont, Wilmington, DE, USA) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Material doppelt mit Reinstwasser gespült. Diese Behandlung wird als Konditionierung bezeichnet und führt zum Quellen des Austauschermaterials sowie zur Präsentation der geladenen Oberflächen, an denen die Salze aus der Lösung sorbiert werden.

Die lyophilisierten Proben wurden nach der Gefriertrocknung in 2 ml 10 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aufgenommen. Da die Schwefelsäure einen pH-Wert von < 1,0 aufwies, befanden sich die organischen Säuren in der Probe im undissoziierten Zustand und banden im Gegensatz zu den Nährsalzen nicht am Austauschermaterial. Die Proben wurden zunächst für eine Stunde mit dem Kationenaustauscher geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand ebenso mit dem Anionenaustauscher behandelt. Die aufgereinigten Proben wurden über einen HPLC-Membranfilter (13 mm Durchmesser, 0,45 µm Porendurchmesser, Carl Roth, Karlsruhe) in die HPLC-Vials (CS-Chromatographie-Service, Langerwehe) überführt.

### **3.6.3 Bestimmung der organischen Säuren aus Abstauchlösungen und Lösungen des Kultursystems mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

In den folgenden Abschnitten werden nicht die vollen Namen der organischen Säuren genannt, sondern die Namen der entsprechenden Anionen.

Die niedermolekularen organischen Säuren wurden über eine säurespezifische Säule aufgetrennt (HPLC Organic Acid Analysis Column, AMINEX Ion Exclusion HPX-87H, 300 mm \* 7,8 mm I.D., BIO-RAD, München). Vor die analytische Säule war eine micro-Guard Kation H<sup>+</sup> Säule zur Reinigung vorgesetzt (BIO-RAD, München).

Mit der Gradientenpumpe (LKB Pharmacia 2249 LC-Gradientenpumpe, Freiburg) wurde ein isokratischer Trennungsgang gefahren. Als Eluent wurde im Ultraschallbad entgaste 5 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer Flußrate von 0,6 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 38°C (Wasserbad) verwendet. Über einen Autosampler (Merck Hitachi, Darmstadt) erfolgte die Injektion von 20 µl Standard bzw. Probe.

Die Analysebedingungen mussten für Proben, die sowohl Maleinat als auch Citrat bzw. Malonat und Malat enthielten, modifiziert werden, da diese mit der ersten Methode nur unzureichend getrennt werden konnten. Zur Auftrennung dieser Säuren wurde als Lösungsmittel 10 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet und die Flußrate betrug 0,5 ml min<sup>-1</sup> bei einer Säulentemperatur von 45°C. Die organischen Säuren wurden bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert (Variable Wavelength Monitor, Knauer, Berlin). Der Detektor war an einen Integrator (Hewlett Packard HP 3390 A Integrator; Downers Grove, ILL, USA), der die Peakhöhen und Retentionszeiten angibt, angeschlossen. Standards organischer Säuren wurden von Supelco (Taufkirchen) bezogen.

Die Standards wurden zunächst als Einzelstandards, später als Mischstandards eingesetzt. Die organischen Säuren der Proben wurden durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Standards identifiziert. Alle Proben und Standards wurden bei – 20°C gelagert und kurz vor der Analyse aufgetaut. Die auch nach der Aufreinigung noch vorhandenen Salze bildeten einen breiten Peak nach einer Retentionszeit von 7,0 Minuten. Das früh eluierende Oxalat (7,5 min) konnte daher in den Lösungen aus dem Kultursystem nicht bestimmt werden.

### **3.7 Schwer lösliches Phosphat, Phosphat sorbiert an Goethit**

#### **3.7.1 Herstellung von Goethit nach SCHWERTMANN & CORNELL (1991)**

Für die Herstellung des Eisenoxid/hydroxids Goethit wurden 90 ml 5 M KOH unter ständigem Rühren in einem Polyethylengefäß (PE) zu 50 ml 1 M  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  hinzugefügt. Die Lösung wurde sofort mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und in der geschlossenen PE-Flasche bei 70°C für mindestens 60 h inkubiert, wobei die rotbraune Ferrihydrit-Suspension zu gelbbraunem Goethit präzipitierte. Die Verwendung von PE-Gefäßen ist wichtig, da der alkalische pH-Wert (> 12) bei Glasflaschen zu einer Lösung von Silicium aus dem Glas führen kann. Dieses würde in die Kristallstruktur des Goethits eingebunden werden. Ist dagegen die Konzentration der KOH zu niedrig, entsteht eine Mischung aus Goethit und Hämatit, was durch eine orangefarbene Farbe des Präzipitats erkennbar ist.

Die Kalilauge wurde anschließend vorsichtig dekantiert und das Präzipitat bei ca. 4000 Upm (Labofuge GL, Heraeus Christ, Osterode) in 100 ml Glasgefäßen abzentrifugiert. Es folgte eine Dialyse in Visking Dialyseschläuchen (1 7/8, 49 mm Durchmesser, Serva Electrophoresis, Heidelberg) über 24 h, bzw. bis die Lösung einen neutralen pH-Wert aufwies. Die Dialyselösung, deionisiertes Wasser, wurde dabei drei- bis viermal gewechselt. Die Trocknung des Goethits erfolgte bei 40°C im Trockenschrank. Nach der Trocknung wurde das Material gemörsert und konnte mit Phosphat für die Versuche beladen werden.

#### **3.7.2 Sorption von Phosphat an Goethit nach DYE (1995)**

Die Beladung von Goethit mit Phosphat erfolgte unter Anlehnung an die Methode von DYE (1995), wobei zunächst die Sorptionskapazität des Goethits ermittelt werden musste, um die maximale Phosphatsorption gewährleisten zu können. Dazu wurden je 0,1 g Goethit mit 200 ml Lösung unterschiedlicher Konzentrationen ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Kaliumdihydrogenphosphats (0; 0,1; 12,6; 23,3; 46,5; 68,8; 89,8  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) für 24 bzw. 48 Stunden geschüttelt und anschließend filtriert. Die Phosphatbestimmung im Filtrat erfolgte nach MURPHY & RILEY (Abschnitt 3.5.1). Die Phosphatbeladung wurde aus der Differenz zwischen Phosphatgehalt der Lösung vor und nach der Inkubation berechnet. Das mit Phosphat beladene Goethit wurde anschließend bei 40°C getrocknet und gemörsert, bevor es dem Sand zugefügt werden konnte.

### 3.8 Mikroorganismen

Durch den relativ hohen Gehalt an leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen in der Rhizosphäre werden vor allem schnell wachsende und enzymatisch vielseitige Organismen, die „r-Strategen“ gefördert. Die Generationszeit von Rhizosphärenbakterien ist wesentlich kürzer als die der Bakterien im Restboden (nach GISI et al., 1990, IN: DEUBEL, 1996). Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Isolate von Rhizosphärenmikroorganismen verwendet. Zum einen ein ubiquitäres Bakterium, dessen Phosphatsolubilisierungskapazität nicht bekannt ist, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, zum anderen ein erst kürzlich als Phosphatsolubilisierer klassifizierter Actinomycet aus Amazonien, *Gordonia* sp..

#### 3.8.1 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

*P. fluorescens* Pf-5 (JL 403) enthält ein Plasmid, auf dem ein Kanamycinresistenzgen kodiert ist. Pseudomonaden sind Gram-negative Bakterien, mit polar begeißelten Stäbchen. Die Energiegewinnung kann sowohl durch aerobe als auch durch anaerobe Atmung betrieben werden, jedoch nicht durch Gärungsprozesse (SCHLEGEL, 1992). *P. fluorescens* Pf-5 wurde aus der Rhizosphäre von *Gossypium* spp. isoliert (LOPER & LINDOW, 1994).

Bei guter Versorgung mit Sauerstoff kann *P. fluorescens* größere Mengen an Calciumphosphaten lösen, wobei es den pH-Wert bis auf 4,0 absenkt (DEUBEL, 1996). Ein unvollständiger Hexoseabbau und damit eine Bildung von Zuckersäuren ist möglich. Ein Verwandter des hier verwendeten *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* PsIA12, produziert in Abhängigkeit vom metabolisierten Zucker relativ große Mengen von Säuren, in erster Linie Succinat, in geringerem Umfang Lactat, Malat und Citrat. Positive Effekte auf Pflanzen werden hauptsächlich auf eine phytohormonelle Förderung der effektiven Wurzeloberfläche durch Produktion von Cytokinin und Auxin zurückgeführt, aber auch auf Hemmung bodenbürtiger Wurzelschaderreger (DEUBEL, 1996). *P. fluorescens* kommt unter natürlichen Bedingungen vergesellschaftet mit Tomate vor und gilt als guter Wurzelkolonisierer (CHIN-A-WOENG et al., 1997). Ein das Pflanzenwachstum fördernder Effekt von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 ist bei schwer löslichem Phosphat in Form des schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats bisher nicht untersucht worden.

#### 3.8.2 *Gordonia* sp.

Der zweite in dieser Arbeit aufgeführte Rhizosphärenmikroorganismus, *Gordonia* sp., wird zu den Actinomyceten gezählt, einer Gruppe der Gram-positiven Eubakterien. Sie sind vorwiegend im Boden beheimatet und leben aerob (SCHLEGEL, 1992). In künstlicher Kultur bilden die Vertreter der Actinomyceten ein „Mycel“ von mehreren Zentimetern Durchmesser, das oft aus einer einzigen, querwandlosen, oft reich verzweigten, äußerst zarten chitin- und cellulosefreien Zelle mit zahlreichen Nucleoiden besteht (STRASBURGER, 1998). Die Fäden werden z.T. vielzellig und zerfallen leicht in Stäbchen. An der Bildung von Luft- oder Substratmycel auf einfachen Nährböden sowie der Bildung von Sporen und Sporangien lassen sich die Actinomyceten voneinander unterscheiden (SCHLEGEL, 1992).

Der in diesen Versuchen verwendete Actinomycet *Gordonia* sp. wurde von Dr. W. Marino auf einem Versuchsfeld in der Nähe von Manaus, Brasilien aus der Rhizosphäre von *Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum isoliert (MARINO, 2000). In einem Screening-Test von fast 200 Rhizosphärenisolaten, unter Verwendung von Eisen- und Aluminiumphosphaten, erwies sich *Gordonia* sp. als guter Phosphatsolubilisierer. Die Reaktion von *Gordonia* sp. auf schwer lösliches, an Goethit sorbiertes Phosphat wurde bisher nicht untersucht.

Ein von TAKEUCHI & HATANO (1998) beschriebener Verwandter des hier eingesetzten *Gordonia* sp. (*Gordonia rhizosphaera* sp. nov.) zeigte in dortigen Versuchen auf HV-Agar (HAYAKAWA & NONOMURA, 1987) pink- bis orangefarbene, flache Kolonien mit rauher Oberfläche. Ein Luftmycel wurde nicht ausgebildet. Der in den Versuchen eingesetzte *Gordonia* sp. zeigte eine ähnliche Farbgebung und ein ähnliches Wachstum auf den unten beschriebenen Medien (Abschnitt 3.8.3.2).

### **3.8.3 Stammhaltung**

#### **3.8.3.1 Nährmedium zur Sterilitätskontrolle und Ermittlung der cfu**

Zur Überprüfung der Sterilität der Keimlinge wurden diese auf LUFCO-Vollnährmedium (Nutrient Agar) gelegt. Das LUFCO-Vollnährmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) wurde in 0,5-facher Konzentration mit Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) auf 1,5 % versetzt und auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Sofern nach sieben Tagen auf den Keimlingen und in dem Nährmedium kein Bewuchs mit Bakterien oder Pilzen zu erkennen war, galten die Keimlinge aus den Keimröhren als steril angezogene Pflanzen. Eventuell in den Keimlingen vorhandene Endophyten können mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden. Unter den Bedingungen des Phosphatmangels in den Kulturröhren ist jedoch ein Auswachsen z.B. endophytischer Pilze aus den Tomatenpflanzen im Kulturverlauf wahrscheinlich. Da dieses in keinem der Versuche aufgetreten ist, werden die Tomaten im weiteren Verlauf der Arbeit als sterile Pflanzen bezeichnet.

In einer Bakterienpopulation sind nicht alle Zellen lebensfähig. Als lebende Zellen werden solche angesehen, die auf oder in einem Nähragar Kolonien zu bilden vermögen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl einer Bakterienkultur wird ein aliquoter Teil einer verdünnten homogenen Zellsuspension auf Nähragar ausgebracht und die Kolonien nach dem Bebrüten gezählt (SCHLEGEL, 1992). In der Regel wird das Ergebnis als Zellzahl oder Lebendzellzahl angegeben. Da jedoch einige Bakterien Schleimstoffe bilden können, die ein Ausplattieren einer Einzelzellsuspension behindern, erfolgt die Angabe der Bakterienpopulation in dieser Arbeit nicht als Zellzahl, sondern als cfu (engl. = colony forming units) (koloniebildende Einheiten). Insbesondere bei den Gram-positiven Actinomyceten ist wegen des mycelartigen Wachstums, wodurch vielzellige Fäden entstehen können, eine Angabe der Zellzahl äußerst schwierig. Zur standardmäßigen Erfassung der Population im Labor wird deswegen in dieser Arbeit der Begriff cfu vorgezogen.

Von den Lösungen aus dem Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme wurden je dreimal 10 µl der Probenlösungen bzw. deren Verdünnungen (1 : 10) auf LUFCO-Vollnährmedium ausplattiert. Nach zwei bis sieben Tagen Inkubation im Brutschrank (25°C) wurde die cfu der Mikroorganismen ermittelt und die Verdünnungsstufe der Lösungen bei der Berechnung berücksichtigt.

### 3.8.3.2 Kultur- und Anzuchtmedium von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Für die Sterilversuche wurde *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (JL 403) in einem flüssigen, mit dem Antibiotikum Kanamycin (9 mmol l<sup>-1</sup>) nach dem Autoklavieren versetzten King's Medium B (KMB) vorkultiviert. In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung des Mediums aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des King's Medium B, Angaben in g 500 ml<sup>-1</sup>.

Inhaltsstoffe	[g 500 ml <sup>-1</sup> ]
Proteose Peptone No.3 (Difco Laboratories, Detroit, USA)	10
Glycerol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	4
di-Kaliumsulfat, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,75
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,75

Sofern das KMB-Medium in Form von Agarplatten für die Dauerkultur benötigt wurde, wurden 1,5 % g/v Agar (Bacto-Agar, Firma DIFCO, Detroit, MI, USA) hinzugefügt.

Bei der Anzucht von *P. fluorescens* Pf-5 in Flüssigmedium wurde zunächst mit einer Impföse ein Teil der Stammkultur von der Petrischale in einen Kolben mit 50 ml Medium überführt. Der Kolben wurde für zwei Tage auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, Bonn) bei 80 Upm und Raumtemperatur inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 100 µl entnommen und für weitere zwei Tage in 50 ml frischem Medium kultiviert. Ein weiteres Mal wurden 100 µl entnommen und in frisches Medium übergeimpft, dieses Mal jedoch nur für einen Tag in 100 ml, um die Bakterien möglichst in der exponentiellen Wachstumsphase für die Versuche einsetzen zu können.

Aus dem letzten Anzuchtkolben (100 ml, Kultur 24 h) wurden für die Versuche im Kultursystem (Abschnitt 4.3.1, 4.3.2) zehnmal 1,5 ml in sterile Eppendorfgefäße pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde für drei Minuten bei 5000 x g zentrifugiert (Eppifuge, Sigma, Osterode) und der Überstand abgegossen. Die Pellets wurden mit je einem Milliliter physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 %ig) aufgenommen, gevortext und erneut für drei Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden mit je 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und zusammengeführt. Mit der Suspension wurden die Versuchsröhren (0,5 ml Röhre<sup>-1</sup>) beimpft. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde zur Bestimmung der cfu benutzt. Von der Suspension wurden Verdünnungsreihen hergestellt und diese sowohl auf Muromcev-Medium als auch auf

Nutrient Agar (Abschnitte 3.8.3.1 und 3.8.3.3) ausplattiert. Die selben Medien wurden zur Bestimmung der cfu in den Lösungen des Kultursystems nach sieben Tagen Kultur verwendet.

### 3.8.3.3 Kultur- und Anzuchtmedium von *Gordonia* sp.

Der Actinomycet *Gordonia* sp. wurde sowohl auf Nutrient Agar (Abschnitt 3.8.3.1) kultiviert als auch auf Muromcev-Medium. Die Zusammensetzung des Muromcev-Mediums lautet wie folgt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums nach Muromcev, pH-Wert 6,5.

Inhaltsstoffe	[g l <sup>-1</sup> ]
Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10
L-Asparagin, C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	1
di-Kaliumsulfat, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,4
Kalium-di-hydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14

Sofern das Muromcev-Medium in Form von Agarplatten für die Dauerkultur benötigt wurde, wurden 1,5 % g/v Agar (Bacto-Agar, Firma DIFCO, Detroit, MI, USA) hinzugefügt.

Die Anzucht und Vorbereitung von *Gordonia* sp. für den Versuch im Kultursystem (Abschnitt 4.3.1.3) erfolgten in flüssigem Muromcev-Medium entsprechend den Angaben aus Abschnitt 3.8.3.3.

### 3.8.4 Bestimmung der alkalischen Phosphomonoesterase-Aktivität mit Methylumbelliferylphosphat

Die Bestimmung der alkalischen Phosphomonoesterase-Aktivität der Rhizosphärenmikroorganismen erfolgte nach der Methode von P. MARSCHNER (persönliche Mitteilung). Das üblicherweise als Substrat eingesetzte p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) wurde durch Frau Dr. Marschner durch Methylumbelliferyl-Phosphat (MUP) ersetzt, da durch die Änderung des Substrates eine niedrigere Nachweisgrenze erzielt werden konnte.

Ein Teil der Probe wurde mit einem alkalischen (pH 9,0), substrathaltigen Puffer, der Methylumbelliferyl-Phosphat enthielt, versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von vier bis sechs Stunden wurde die Konzentration des freigesetzten Produktes in Mikrotiterplatten mit einem Fluorimeter (Fluoro Count, Packard Instruments, Downers Grove, ILL, USA) gemessen.

Die Zusammensetzung der Stammlösung für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphomonoesterase ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Stammlösung für die Bestimmung der alkalischen Phosphomonoesterase-Aktivität.

Inhaltsstoffe	[g 500 ml 1 M NaOH <sup>-1</sup> ]
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Serva Electrophoresis, Heidelberg)	12,1
Maleinsäure, C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	11,6
Citronensäuremonohydrat, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> *H <sub>2</sub> O	14,0
Borsäure, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,3

Die Salze wurden in 500 ml 1 M NaOH gelöst und die Lösung mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4° C haltbar. Für den Versuch wurde die Stamm-lösung im Verhältnis 1 : 5 mit Reinstwasser (Milli Q Plus, Millipore, Eschborn) verdünnt und auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt. Ein Drittel der Gebrauchslösung wurde für die Suspendierung der Zellen benötigt. Zu den restlichen zwei Dritteln der Gebrauchslösung wurden 20 µg ml<sup>-1</sup> Methylumbelliferyl-phosphat (MUP) als Substrat hinzugefügt.

Von der Zellsuspension wurde je 1 ml der Probe in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei 5000 Upm für 3 min (Eppifuge, Sigma, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 1 ml Phosphatasepuffer aufgenommen und die Probe gevortext, damit sich das Pellet lösen konnte. Die gesamte Probe wurde in ein Reagenzglas überführt, zu dem 2 ml des substrathaltigen (MUP) Phosphatasepuffers pipettiert wurden. Die gründlich durchmischten Proben wurden für 4 h bis ca. 24 h bei einer Temperatur von 25 °C im Dunkeln inkubiert.

Vor der Entnahme eines Aliquots mussten die Proben wiederum gründlich gemischt werden, bevor eine Zentrifugation bei 14000 Upm erfolgte, um Zellen und andere unlösliche Stoffe, wie z.B. Goethit, abtrennen zu können. In einem Vorversuch wurde getestet, ob das abzentrifugierte Goethit Methylumbelliferon (MU) bindet und es zu einer Beeinflussung der photometrischen Messung kommt. Bei der Verwendung von Standards zeigte es sich, dass bis zu einer Konzentration von  $1,5 \mu\text{g MU ml}^{-1}$  der Goethit-Zusatz keinen Einfluss auf die Messung hatte. Bei höheren Konzentrationen (bis  $5,0 \mu\text{g MU ml}^{-1}$ ) kam es zu leichten Beeinträchtigungen der Messung. Die Werte der goethithaltigen Lösungen waren niedriger als die der Standards.

Das freigesetzte Methylumbelliferon im Überstand wurde in dreifacher Wiederholung à  $200 \mu\text{l}$  in Mikrotiterplatten mit dem Fluorimeter (ex 360 nm, em 460 nm) bestimmt. Bei jeder Messung wurden ebenfalls Standards der folgenden Konzentrationen gemessen: 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0;  $10,0 \mu\text{g ml}^{-1}$  Methylumbelliferon. Die Menge des freigesetzten Methylumbelliferons wurde in  $\text{ng MU (log cfu h)}^{-1}$  angegeben.

## 3.9 Versuchsdurchführung

### 3.9.1 Versuche im Gewächshaus

#### 3.9.1.1 Wachstumsbedingungen der sieben Arten

Für den Artenvergleich (Abschnitt 4.1.1.1) erhielten je drei Parallelen der ausreichend mit Phosphor versorgten Varianten (+ P) Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in einer Menge von  $54 \text{ mg kg}^{-1}$  Sand, entsprechend  $12,3 \text{ mg P kg}^{-1}$ . Für die drei Parallelen, die unter Phosphatmangel (0 P) kultiviert wurden, erhielt der Sand kein zusätzliches Phosphat. Das Topfvolumen betrug 300 ml. Je nach Samengröße variierte die Samenanzahl pro Topf, 15 Maiskaryopsen, 20 Zuckerrübensamen, je 30 Raps- und Tomatensamen und 40 Luzerne- und Rotkleesamen wurden pro Topf eingesetzt.

Die Pflanzen wurden in mit Nährstoffen angereichertem Sand (Abschnitt 3.2.1) im Gewächshaus bei einer durchschnittlichen Temperatur von  $18^\circ\text{C}$  nachts und  $25^\circ\text{C}$  tagsüber im Oktober des Jahres 1998 angezogen. Die relative Luftfeuchte lag bei 80 bis 85 %. Eine Zusatzbeleuchtung mit einer Lichtintensität von  $500 \mu\text{E (m}^2 \text{s)}^{-1}$  wurde für 10 Stunden täglich eingesetzt. Das Substrat wurde mit deionisiertem Wasser feucht gehalten.

Der Gehalt des Sandes an pflanzenverfügbarem, DL-löslichem Phosphor wurde zu Beginn und Ende des Versuches mit der Methode nach RIEHM (1945) (Abschnitt 3.5.3) ermittelt. Die Pflanzen wurden angezogen bis die der Phosphatmangelvariante das Dreiblattstadium erreicht hatten. Die Ernte von Luzerne, Mais, Raps, Rotklee und Zuckerrübe erfolgte 17 Tage nach der Aussaat, die von Rettich und Tomate nach 23 Tagen. Dazu wurden die Pflanzen vorsichtig aus dem Sand genommen, die Wurzeln ab gespült und eine Stunde in deionisiertes Wasser getaucht, um die Wurzelexsudate zu sammeln. Diese Form der Probenahme wird als Gewinnung von Abstauchlösungen bezeichnet, die Proben im weiteren mit AbL (Abstauchlösung) abgekürzt.

Bei der Exsudation in deionisiertem Wasser kann es zu einem osmotischen Schock einiger der Wurzelzellen kommen, wodurch diese zum Platzen gebracht werden und ihren Zellinhalt in die Lösung abgeben. Das verfälscht die Exsudatzusammensetzung. Vorherige Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sich die Exsudation in deionisiertem Wasser nicht von der in einer  $\text{CaSO}_4$ -Lösung unterscheidet (NEUMANN, G., persönliche Mitteilungen). Dies ist vermutlich auf die nicht vollständig entfernten Sandreste an den Wurzeln zurückzuführen, die zu einem erhöhten Salzgehalt der Abstauchlösung führen und somit einem osmotischen Schock der Zellen entgegenwirken.

Die Abstauchlösung wurde anschließend sofort tiefgefroren und dann gefriergetrocknet. Die Analyse der Säuren erfolgte mit der HPLC. Nach der Ernte wurden die Frischmassen der Wurzeln und Sprosse pro Topf und die Trockenmasse der Wurzeln (Trockenschrank  $105^\circ\text{C}$ ) bestimmt.

### 3.9.1.2 Wachstumsbedingungen der acht Tomatensorten

Für den Versuch Abschnitt 4.1.1.2 wurden die gleichen Bedingungen im Gewächshaus und das gleiche Substrat wie in Abschnitt 4.1.1.1 verwendet. Der Versuch wurde im März des Jahres 1999 durchgeführt. Je 30 Tomatensamen wurden pro Topf eingesetzt. Die Pflanzen wurden im Dreiblattstadium der 0 P Variante wie in Abschnitt 4.1.1.1 geerntet. Der Erntezeitpunkt der Pflanzen war 34 Tage nach der Aussaat im Dreiblattstadium der Phosphatmangelpflanzen.

### 3.9.1.3 Wachstumsbedingungen der Tomatensorte 'Freude'

Der Versuch zur Varianz der Trockenmasseakkumulation der Tomatensorte 'Freude' wurde im Gewächshaus durchgeführt. Die Substrat-, Wasser- und Lichtversorgung entsprach der der Versuche aus den Abschnitten 4.1.1.1 und 4.1.1.2. Das Saatgut wurde unter sterilen Bedingungen zum Keimen gebracht (Abschnitt 3.4.2). 50 Keimlinge gleicher Größe wurden nach 7 Tagen im Gewächshaus in mit Vollnährlösung angereicherten Sand gesetzt (Abschnitt 3.2.1). Nach 30 Tagen befanden sich die Jungpflanzen im Zwei- bis Vierblattstadium und wurden geerntet.

### 3.9.2 Flüssigkultur zur Untersuchung der Phosphatmobilisierungsleistung von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp.

Für den Versuch Abschnitt 4.1.2 wurden *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. in flüssigem Muromcev-Medium mit  $1,0 \text{ mmol P l}^{-1}$  vorkultiviert. Nach der Vorkultur wurde ein Aliquot der Suspension in neue Kolben, die das eigentliche Versuchsmedium enthielten, überführt. Das Muromcev-Medium für den Versuch enthielt entweder zwei unterschiedliche Varianten wasserlöslichen Phosphats ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , gute Phosphatversorgung  $1,0 \text{ mmol P l}^{-1}$ ; wenig Phosphat  $0,1 \text{ mmol P l}^{-1}$ ), oder schwer lösliches, in Form von an Goethit sorbiertem Phosphat ( $0,7 \text{ g Goethit l}^{-1}$ ,  $= 0,4 \text{ mmol P l}^{-1}$ ).

Die Kolben enthielten je 100 ml der entsprechenden Phosphatstufe und wurden auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, Bonn) bei 80 Upm inkubiert. Pro Mikroorganismenisolat wurden drei Wiederholungen durchgeführt plus zwei Wiederholungen für die sterilen nicht inokulierten Kontrollen. Aus den Kolben wurden vor der Beimpfung je 2 ml entnommen, zur Bestimmung des Ausgangsgehalt wasserlöslichen Phosphates (Abschnitt 3.5.1) sowie 5 ml zur Bestimmung des Ausgangsgehaltes an organischen Säuren (Abschnitt 3.6.3).

Die zwei Mikroorganismenisolate wurden in Muromcev-Flüssigmedium bei ausreichender Phosphatversorgung ( $1,0 \text{ mmol P l}^{-1}$ ) vorkultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Versuchskolben mit den drei unterschiedlichen Phosphatvarianten in dreifacher Wiederholung mit je 900  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension inokuliert. Zur Bestimmung der Ausgangspopulation wurde eine Verdünnungsreihe auf festem Muromcev-Medium mit  $1 \text{ mmol P l}^{-1}$  Phosphat in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-12}$  ausplattiert. Die Kolben wurden über

mehrere Tage auf dem Schüttler mit den Bakterien inkubiert. An den entsprechenden Probenahmetagen (3, 6, 9) wurden je 8 ml der Lösung steril mit einer Pipette entnommen. Davon wurden 2 ml für die Phosphorbestimmung (Abschnitt 3.5.1), 100  $\mu\text{l}$  für die Bestimmung der cfu (Abschnitt 3.8.3.3), 1 ml für die Bestimmung der Phosphataseaktivität (Abschnitt 3.8.4) und 5 ml für die Bestimmung der organischen Säuren (Abschnitt 3.6.3) verwendet.

### **3.9.3 Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem**

#### **3.9.3.1 Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile**

Das Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile Sand, Glasperlen, Filter und Steinwolle wurde mit der Methode nach RIEHM ermittelt (Abschnitt 3.5.3). Die autoklavierten Röhren wurden hierzu mit Lösungen leicht löslichen Phosphats unterschiedlicher Konzentration (2,0 bis 9  $\mu\text{g P ml}^{-1}$ ) unter sterilen Bedingungen versetzt. Die Röhren wurden danach in der Klimakammer mit steriler, an Kohlendioxid verarmter Luft belüftet und die Lösungen über mehrere Tage unter sterilen Bedingungen (Abschnitt 3.4.3) beprobt. Der Phosphorgehalt der Lösungen wurde nach der Methode von MURPHY & RILEY (Abschnitt 3.5.1) bestimmt.

#### **3.9.3.2 Sorption organischer Säuren an Sand und Goethit**

Acht Röhren wurden mit je 200 g goethithaltigem Sand (0,7 g Goethit  $\text{kg}^{-1}$  Sand) befüllt und zweifach autoklaviert. Die Hälfte der Röhren wurde unter sterilen Bedingungen mit vier organischen Säuren in gelöster Form versetzt. Dabei wurden insgesamt 20,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Citrat, 0,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Fumarat, 20,9  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Malat und 24,0  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Succinat pro Röhre eingebracht. Die übrigen vier Versuchsröhren dienten als sterile, unbehandelte Kontrollen. Alle acht Röhren wurden an die Belüftung im Klimaschrank angeschlossen und eine Woche inkubiert.

Nach zwei und fünf Tagen wurde den Röhren je 3 ml steriles deionisiertes Wasser hinzugefügt und nach sieben Tagen die Lösungen aus dem Kultursystem (Abschnitt 3.4.3) gewonnen. Sie wurden auf den pH-Wert, den Phosphorgehalt der wässrigen Lösungen und den Gehalt an organischen Säuren untersucht. Bei den organischen Säuren wurde berechnet, welche Mengen [ $\mu\text{g 200 g Sand}^{-1}$ ] bzw. welche Konzentration der einzelnen organischen Säuren [ $\text{nmol l}^{-1}$ ] den Versuchsröhren zu Versuchsbeginn zugefügt wurde. Anschließend wurde der tatsächliche Gehalt der Lösungen an organischen Säuren bestimmt [ $\mu\text{g 200 g Sand}^{-1}$ , bzw.  $\text{nmol l}^{-1}$ ]. Die Werte der drei abgezogenen Lösungen pro Röhre wurden addiert und die Wiederfindung der eingesetzten Konzentration in Prozent (%) ermittelt.

### 3.9.3.3 Organische Säuren im Sand

In diesem Experiment sollte untersucht werden, welcher Anteil künstlich zugefügter organischer Säuren nach dem Prozeß des Autoklavierens noch messbar sein würde. In diesem Versuch wurde die gleiche Konzentration und Zusammensetzung organischer Säuren vier sterilen Versuchsröhren vor dem Autoklavieren zugefügt wie in Abschnitt 4.2.2.2. Die Röhren wurden lediglich für einen Tag im Klimaschrank inkubiert und anschließend die Lösungen GL, AuL und EP auf die unter Abschnitt 3.9.3.2 aufgeführten Parameter untersucht. Auch in diesem Fall wurde die Wiederfindung der organischen Säuren, wie unter Abschnitt 3.9.3.2 angegeben, berechnet.

### 3.9.4 Reaktion der Organismen auf schwer lösliches Phosphat unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem

#### 3.9.4.1 Versuchsaufbau für die Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘

Es wurden je drei steril angezogene Keimlinge der Sorte 'Freude' 13 Tage nach der Aussaat in fünf Röhren des Kultursystems zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen gesetzt. Die Zusammensetzung des Substrates im Kultursystem ist in Abschnitt 3.2.2 angegeben. 48 Tage nach der Aussaat der Tomaten wurden die Röhren beprobt, wobei das Erscheinungsbild der Pflanzen notiert und die Phosphorgehalte der Röhrenbestandteile Sand, Gaspelern, Filter und Steinwolle ermittelt wurden. Ebenso wurden die Frisch- und Trockenmassen der Pflanzen bestimmt und die Sprosse und Wurzeln auf ihre Phosphorgehalte analysiert. Ferner wurden die pH-Werte der Lösungen überprüft. Für die Analyse wasserlöslichen Phosphats nach MURPHY & RILEY (Abschnitt 3.5.1) wurden 2 ml der abgezogenen Lösungen verwendet sowie 100 µl zur Überprüfung der Sterilität. Schließlich wurden die abgezogenen Lösungen GL, AuL und EP hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der organischen Säuren untersucht.

#### 3.9.4.2 Versuchsaufbau der monaxenischen Kultur von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Der Begriff der monaxenischen Kultur umfasst in dieser Arbeit die Versuche, in denen dem sterilen Substrat in dem Kultursystem ein Mikroorganismenisolat zugefügt wurde. Die Versuche, in denen steril angezogene Pflanzen mit einem der Isolate inokuliert wurden und demnach zwei verschiedene Organismen (Tomatensorte ‚Freude‘ + Mikroorganismenisolat) zusammen kultiviert wurden, werden als Dualkultur bezeichnet.

Für die monaxenische Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 im Kultursystem, wurden acht Röhren mit goethithaltigem Sand (Abschnitt 3.7.2) versehen und die Hälfte mit je 0,5 ml einer Bakteriensuspension von  $10^{10}$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  *P. fluorescens* Pf-5 inokuliert. Bei einem Wassergehalt von circa 25 ml Röhre<sup>-1</sup> (12 Gewichtsprozente) entspricht das einer cfu von  $\log 8,3 \text{ cfu ml}^{-1}$  ( $\log (0,5 \text{ ml} \cdot 10^{10} \text{ Zellen } 25\text{ml}^{-1})$ ).

Um die Mikroorganismen mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde den inokulierten Röhren nach drei und sechs Tagen 3 ml einer 0,1 %igen Glucose-Lösung hinzugefügt. Die sterilen Kontrollröhren wurden ebenso behandelt. Nach insgesamt sieben Versuchstagen erfolgte die Ernte, wobei der pH-Wert und der Phosphatgehalt der Lösungen GL, AuL und EP, die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Mikroorganismen und die Qualität und Quantität der organischen Säuren in den Lösungen bestimmt wurde. Für die Ermittlung der Sterilität, bzw. der cfu in den inokulierten Röhren, wurde ein Aliquot der Lösungen auf kanamycinhaltigem KMB-Medium (Abschnitt 3.8.3.2) und auf Nutrient Agar (Abschnitt 3.8.3.1) ausplattiert.

#### **3.9.4.3 Versuchsaufbau der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp.**

Es wurden fünf Röhren des Kultursystem zur sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen mit *Gordonia* sp. inokuliert. Der Sand wurde mit einer Vollnährlösung (Abschnitt 3.2.2) und mit Phosphat beladenem Goethit als Quelle schwer löslichen Phosphats versetzt. Je 0,5 ml einer nach Abschnitt 3.8.3.3 kultivierten Zellsuspension mit einer cfu von  $1,05 \cdot 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup> dienten der Beimpfung der Röhren. Das entspricht einer cfu von  $\log 5,3$  cfu ml<sup>-1</sup> bei 25 ml Wassergehalt Röhre<sup>-1</sup> (Berechnung, siehe Abschnitt 3.9.4.2). Nach zwei und fünf Tagen wurden die Röhren mit je 1 ml 0,1 %iger Glucose-Lösung als Kohlenstoffquelle für die Mikroorganismen und 3 ml sterilem deionisiertem Wasser als Ausgleich für die Verdunstung versorgt. Die Röhren wurden sieben Tage nach der Inokulation beprobt. Als Kontrollen dienten die sterilen, mit goethithaltigem Sand versehenen Röhren aus Abschnitt 4.2.2.2, die das gleiche Substrat erhalten hatten.

#### **3.9.5 Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und Rhizosphärenmikroorganismen bei schwer löslichem Phosphat**

##### **3.9.5.1 Versuchsaufbau für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 bei schwer löslichem Phosphat**

Für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 wurden Tomatensamen steril zum Keimen gebracht (Abschnitt 3.4.2) und nach 12 Tagen je drei bis fünf Keimlinge gleicher Größe in fünf Röhren des Kultursystems zur sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen überführt. Nach 36 Tagen wurden die Pflanzen zu Beginn des Dreiblattstadiums mit je 0,5 ml Bakteriensuspension von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 inokuliert. Insgesamt wurde eine cfu von  $3,6 \cdot 10^8$  ml<sup>-1</sup> auf dem Lösungsvolumen der Röhre von 25 ml eingesetzt. Das entspricht  $\log 6,9$  cfu ml<sup>-1</sup> in der Röhre ( $\log (0,5 \text{ ml } (3,6 \cdot 10^8 \text{ cfu}) 25 \text{ ml}^{-1})$ ).

Nach sieben Tagen der Dualkultur wurde von den abgezogenen Lösungen (GL und AuL) je ein Aliquot entnommen und auf Monaxenie, bzw. cfu von *P. fluorescens* Pf-5 auf kanamycinhaltigem KMB (Abschnitt 3.8.3.2) und Nutrient Agar (Abschnitt 3.8.3.1) untersucht. Die Exsudatprobe EP wurde nicht daraufhin analysiert. Statt dessen wurden die Pflanzen in der reinen Werkbank steril aus dem Substrat entnommen und mit je 3 ml phy-

siologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 %ig) die Mikroorganismen von den Wurzeln gewaschen. Diese Rhizoplanenlösung (RhL) wurde aufgenommen und ebenfalls auf Monaxenie und cfu untersucht. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde von den Mikroorganismen der Lösungen GL, AuL und RhL analysiert. Weitere Analysen wurden hinsichtlich der Phosphorgehalte der Pflanzen sowie der Phosphorgehalte der Lösungen GL, AuL und EP und der Baubestandteile der Röhren durchgeführt. Die pH-Werte der Lösungen und die Gehalte an organischen Säuren wurden ebenfalls bestimmt.

### **3.9.5.2 Versuchsaufbau für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. bei schwer löslichem Phosphat**

Die Anzucht der Tomaten erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.2 angegeben. Bei Versuchsbeginn befanden sich alle Pflanzen im beginnenden Dreiblattstadium. In den vier Röhren waren zweimal zwei, einmal drei und einmal vier Pflanzen vorhanden. Nach 37 Tagen wurden die Pflanzen mit je 0,5 ml Zellsuspension von *Gordonia* sp. inokuliert. Insgesamt wurde eine cfu von  $1,05 \cdot 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>, entsprechend log 5,3 cfu ml<sup>-1</sup> (Berechnung siehe 3.9.5.1) pro Röhre eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die gleichen Untersuchungen wie in der Dualkultur der Tomate mit *P. fluorescens* Pf-5 durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel

Die Untersuchungen zum Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen erforderten zunächst die Wahl einer geeigneten Pflanzenart, da die publizierten Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind. Das Hauptkriterium für die Auswahl der Pflanzenart war eine gesteigerte Exsudation organischer Säuren von Phosphatmangelpflanzen im Vergleich zu Pflanzen mit ausreichender Phosphatverfügbarkeit und eine für das Wachstum in Versuchsröhren geeignete Wuchsform. Die Versuchspflanze sollte leicht oberflächensterilisierbare Samen haben, damit die weiteren Untersuchungen an jungen Pflanzen unter sterilen Bedingungen stattfinden konnten. Zudem sollten die Samen relativ klein sein, um den Pflanzen nur einen kurzzeitigen Nährstoffspeicher nach der Keimung bieten zu können.

In früheren Untersuchungen wurde die Exsudation von Pflanzen oftmals auf die Trockenmasse der Wurzeln bezogen. Diese geben organischen Säuren in die Rhizosphäre ab. In den Sprossen werden die entsprechenden Assimilate überwiegend synthetisiert und von dort in die Wurzeln transportiert. Aus diesem Grund können sowohl Wurzeln als auch Sprosse als Bezugsgröße für die Exsudation dienen. Welcher der beiden Parameter für die Versuche sinnvoller sein würde, musste überprüft werden.

Im zweiten Abschnitt dieses Teilbereiches sollten die beiden in den Versuchen verwendeten Rhizosphärenmikroorganismenisolate eingehender untersucht werden. Mikroorganismen weisen unterschiedliche Mechanismen auf, die Verfügbarkeit von Phosphat im Boden zu erhöhen. Die Ergebnisse des Einflusses phosphatsolubilisierender Mikroorganismen auf die Phosphataufnahme von Pflanzen sind uneinheitlich. Zunächst soll deswegen das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und der Gram-positive Actinomycet *Gordonia* sp. unter optimalen Bedingungen ohne Pflanzen in einem Flüssigmedium kultiviert werden. Dieser Versuch soll Aufschluss über die grundlegenden im Medium messbaren Veränderungen geben, die allein durch die Mikroorganismen aufgrund von unterschiedlicher Phosphatverfügbarkeit hervorgerufen werden.

#### 4.1.1 Auswahl einer Pflanzenart, die bei Phosphatmangel erhöhte Mengen an organischen Säuren ausscheidet

##### 4.1.1.1 Gewächshausversuch mit sieben verschiedenen Arten

Eine geeignete Pflanzenart wurde ausgewählt, die unter Phosphatmangelbedingungen mit einer erhöhten Abgabe organischer Säuren reagiert. Dafür wurde ein Versuch mit sieben Arten unter unsterilen Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt. Die in dem Versuch verwendeten Arten zeigten in den Untersuchungen anderer Autoren eine erhöhte Abgabe organischer Säuren unter Phosphatmangel: Klee (*Trifolium arvense* L.), Luzerne (*Medicago sativa* L.), Mais (*Zea mays* L.), Raps (*Brassica napus* L.), Rettich (*Raphanus sativus* L.), Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) (BEIßNER & RÖMER, 1995, GERKE, 1995, HOFFLAND, et al. 1992, IMAS, et al. 1997, PETERSEN & BÖTTGER, 1991, ZHANG et al., 1997).

Für den Versuch wurden zwei verschiedene Phosphatdüngungsstufen eingesetzt. Zum einen eine gute Versorgung mit leichtlöslichem Phosphat (+ P), zum anderen eine Phosphatmangelvariante, in der kein Phosphat zum Substrat zugegeben wurde (0 P).

Zum Zeitpunkt der Ernte waren alle Pflanzen der 0 P Variante im Dreiblattstadium, wohingegen die Pflanzen der + P Variante zum Teil schon vier Laubblätter gebildet hatten. Alle sieben Arten wiesen in der 0 P Variante Phosphatmangelsymptome, wie Wachstumsdepression und Anthocyanfärbung des Sprosses und der Blätter auf. Das Wurzel-/Sprossverhältnis wurde aus den Frischmassen der Pflanzen bestimmt (Tabelle 5), da ein zu Gunsten der Wurzelmasse verschobenes Verhältnis der Massen als Anzeichen für einen Phosphatmangel gilt (BIELESKI, 1973). Im Artenvergleich wird deutlich, dass die beiden Leguminosen Luzerne und Rotklee unter Phosphatmangel das höchste Wurzel-/Sprossverhältnis aufweisen. Bei Mais und Tomate ist das Wurzel-/Sprossverhältnis bei 0 P nur leicht erhöht. Raps und Zuckerrübe zeigen in dieser Hinsicht keine Veränderungen. Bei Rettich ist eine Minderung des Wurzel-/Sprossverhältnisses bei Phosphatmangel zu verzeichnen.

Tabelle 5: Wurzel-/Sprossverhältnisse (W/S) der Frischmassen der sieben Arten bei ausreichender Phosphatversorgung (+ P) und bei Phosphatmangel (0 P). Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

W/S	Luzerne		Mais		Raps		Rettich		Rotklee		Tomate		Zuckerrübe	
<b>+ P</b>	1,12	$\pm 0,10$	0,60	$\pm 0,04$	0,92	$\pm 0,04$	0,60	$\pm 0,05$	0,85	$\pm 0,06$	0,63	$\pm 0,03$	0,52	$\pm 0,08$
<b>0 P</b>	1,53	$\pm 0,15$	0,71	$\pm 0,07$	0,86	$\pm 0,07$	0,52	$\pm 0,02$	1,19	$\pm 0,05$	0,66	$\pm 0,04$	0,47	$\pm 0,08$

Während das Erscheinungsbild der Pflanzen in der 0 P Variante auf einen Phosphatmangel aller Arten schließen ließ, war das Wurzel-/Sprossverhältnis nur in zwei von sieben Fällen ausschlaggebend (Luzerne und Rotklee), in zwei weiteren Fällen leicht erhöht (Mais und Tomate).

Die gewonnenen Exsudate sind auf Qualität und Quantität der organischen Säuren untersucht worden. Die Daten wurden auf die Wurzeltrockenmasse und die Exsudationsdauer von einer Stunde bezogen ( $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ). Die folgenden organischen Säuren treten in veränderlichen Anteilen bei den sieben verschiedenen Arten in den Exsudaten auf:

Acetat, Citrat, Fumarat, *Iso*-Butyrat, Malat, Maleinat, Malonat, Oxoglutarat, Succinat und *trans*-Aconitat.

Die höchste Gesamtexsudation organischer Säuren ist bei Rettich in beiden Varianten und bei Tomate in der 0 P Variante mit 46 bis 54  $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  festzustellen. Bei Zuckerrübe, Rotklee und Mais ist die Gesamtexsudation organischer Säuren mit Werten zwischen 10 und 20  $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  am niedrigsten. Nur Luzerne und Tomate reagieren mit einer vermehrten Abgabe organischer Säuren in der 0 P Variante im Vergleich zur + P Variante (Abbildung 2).

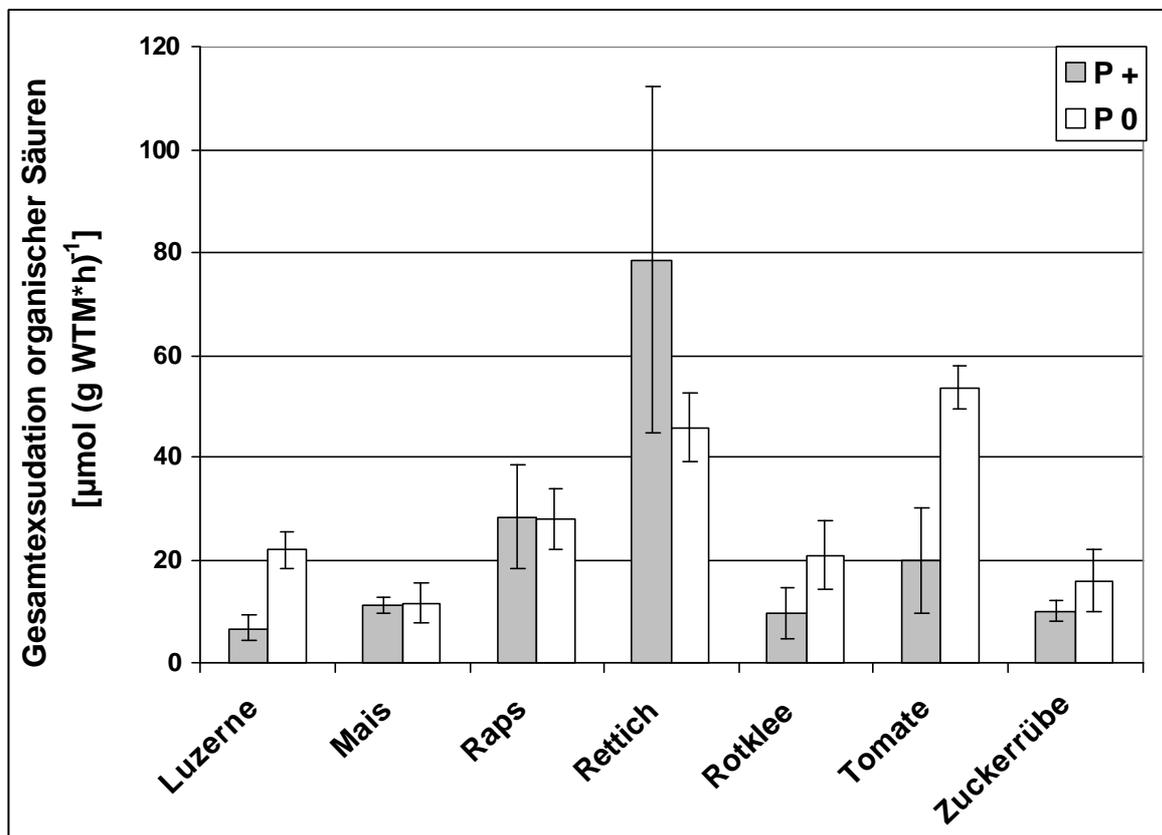


Abbildung 2: Gesamtexsudation organischer Säuren [ $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ] in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit bei verschiedenen Pflanzenarten. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

Von den sieben untersuchten Arten reagieren mit einer eindeutigen Erhöhung der Exsudation organischer Säuren nur Tomate und Luzerne auf Phosphatmangel. Da Luzerne sehr kleine Samen und Keimlinge hat und die Wuchsform der Pflanzen expansiv ist, ist sie als Versuchspflanze für die geplanten Sterilversuche in Röhren ungeeignet. Die Tomate ist dagegen aufgrund der etwas größeren Samen und Keimlinge, die experimentell besser handhabbar sind, und der gestreckten Wuchsform der Pflanzen zweckmäßiger für den Einsatz in Röhren. Die Zusammensetzung der Exsudate von der Tomate sind im folgenden näher beschrieben, da mit dieser Art die nächsten Versuche durchgeführt wurden.

In den Exsudaten von Tomate treten in beiden Phosphatvarianten die organischen Säuren Malat > Succinat > Maleinat > Citrat und Fumarat in abnehmenden Konzentrationen auf (Tabelle 6). In der 0 P Variante steigt im Vergleich zu guter Phosphatversorgung die Konzentration von Malat, Maleinat, und Succinat. Bei Malat kommt es zu einer Verdreifachung von 10,3 auf 33,4  $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ , bei Succinat und Maleinat je zu einer Verdopplung der ausgeschiedenen organischen Säuren (Tabelle 6). Die Abgabe von Citrat und Fumarat ist unabhängig von der Phosphatversorgung der Tomate.

Tabelle 6: Organische Säuren in den Wurzelexsudaten von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [ $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ] in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	Citrat		Fumarat		Maleinat		Malat		Succinat		Summe	
	[ $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ]											
<b>+ P</b>	0,3	$\pm 0,2$	0,2	$\pm 0,1$	1,0	$\pm 0,5$	10,3	$\pm 6,1$	8,6	$\pm 3,8$	20,4	$\pm 10,3$
<b>0 P</b>	0,4	$\pm 0,4$	0,2	$\pm 0,1$	2,6	$\pm 0,1$	33,4	$\pm 3,4$	17,3	$\pm 1,7$	53,9	$\pm 4,2$

Die Ergebnisse aus dem Artenvergleich machen deutlich, dass die Tomate unter den Bedingungen des Phosphatmangels mit einer deutlichen Erhöhung der Exsudation organischer Säuren reagiert hat (Abbildung 2). Dabei wurden in abnehmender Konzentration in den Wurzelexsudaten Malat > Succinat > Maleinat > Citrat und Fumarat bestimmt.

#### 4.1.1.2 Gewächshausversuch mit acht verschiedenen Sorten von *Lycopersicum esculentum* Mill.

Im weiteren galt es zu untersuchen, wie die z.T. sehr widersprüchlichen Angaben zur Säureexsudation einer Art unter Phosphatmangel erklärt werden können. So sollte nach HEDLEY et al. (1982) eine erhöhte Exsudation organischer Säuren von Raps unter Phosphatmangel nicht zu einer Ansäuerung der Rhizosphäre führen. HOFFLAND et al. (1992) zeigten dagegen ebenfalls bei Raps, dass eine Ansäuerung durch die Exsudation von Citrat und Malat hervorgerufen wurde. Auch in dem oben aufgeführten Artenvergleich (Abschnitt 4.1.1.1) konnte bei der verwendeten Rapsorte keine erhöhte Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel festgestellt werden. Diese Widersprüche könnten z.T. an den unterschiedlichen Reaktionen verschiedener Sorten liegen. Aus diesem Grund wurde ein Gewächshausversuch in Bezug auf Sortenunterschiede durchgeführt. Die verwendeten Sorten waren: 'Freude', 'Goldene Königin', 'Hellfrucht', 'Judy', 'Judy-Resisto', 'Marmande', 'Roma' und 'San Marzano'. Die Versuchsdurchführung entsprach der des Artenvergleiches (Abschnitt 4.1.1.1).

In der Variante (+ P) sind zu Versuchsbeginn 22,2 mg P kg<sup>-1</sup> Sand mit der Methode nach RIEHM (1945) analysiert worden, wovon bei Versuchsende noch 14,0 mg P kg<sup>-1</sup> Sand DL-lösliches Phosphor festzustellen sind (Tabelle 7). Demnach ist ein Drittel des Phosphors (8,2 mg P kg<sup>-1</sup>) bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit entweder von den Pflanzen aufgenommen, vom Substrat sorbiert oder ausgewaschen worden. Dagegen liegt in der Variante ohne Phosphatzugabe (0 P) der Ausgangsgehalt im Sand bei 2,0 mg P kg<sup>-1</sup>. Im Versuchsverlauf sinkt diese Konzentration um lediglich 0,6 mg P kg<sup>-1</sup> Sand (Tabelle 7).

Tabelle 7: DL-lösliche Phosphorgehalte [mg P kg<sup>-1</sup> Sand] des Substrates bei Versuchsbeginn und Versuchsende der Varianten + Phosphat und 0 Phosphat sowie die Differenz (Bilanz).

	+ Phosphat	0 Phosphat
	[mg P kg <sup>-1</sup> Sand]	
<b>Ausgangsgehalt</b>	22,2	2,0
<b>Endgehalt</b>	14,0	1,4
<b>Bilanz</b>	- 8,2	- 0,6

Eine Reduktion der Trockenmasseakkumulation wird häufig als ein Merkmal des Phosphatmangels angesehen (BIELESKI, 1973). Die untersuchten Sorten differieren sehr stark in ihrem Wachstum, was in der unterschiedlichen Trockenmasseakkumulation deutlich wird (Tabelle 8). Die mittleren Wurzeltrockenmassen der ausreichend mit Phosphor versorgten Pflanzen zeigen auf Sortenebene trotz einer großen Schwankungsbreite von 140 bis 477 mg Topf<sup>-1</sup> keine signifikanten Unterschiede. Bei den Phosphatmangelpflanzen sind die Wurzeltrockenmassen von 'Marmande' und 'Roma' von je 153 mg Topf<sup>-1</sup> signifikant höher als bei den anderen sechs Sorten (47 bis 113 mg Topf<sup>-1</sup>) (Tabelle 8).

Bei ausreichender Phosphatversorgung ist die Sprosstrockenmasse der Sorten 'Freude', 'Goldene Königin', 'Hellfrucht' und 'San Marzano' deutlich niedriger als bei den anderen Sorten. Die Sprosstrockenmasse der Sorte 'Marmande' ist mit 590 mg Topf<sup>-1</sup> am größten.

Tabelle 8: Wurzel- und Sprosstrockenmasse pro Pflanztopf von acht verschiedenen Tomatensorten in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler. Zahlen in der gleichen Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ).

	Wurzel TM						Spross TM					
	[mg Topf <sup>-1</sup> ]											
	+ Phosphat			0 Phosphat			+ Phosphat			0 Phosphat		
<b>Freude</b>	167	$\pm 83$	a	47,	$\pm 15$	a	273	$\pm 47$	a	83	$\pm 12$	a
<b>Goldene Königin</b>	170	$\pm 31$	a	93	$\pm 7$	a	350	$\pm 40$	a	237	$\pm 12$	bc
<b>Hellfrucht</b>	150	$\pm 73$	a	113	$\pm 33$	a	220	$\pm 46$	a	207	$\pm 32$	bc
<b>Judy</b>	217	$\pm 37$	a	77	$\pm 47$	a	443	$\pm 53$	ab	267	$\pm 12$	c
<b>Judy-Resisto</b>	167	$\pm 28$	a	123	$\pm 18$	a	410	$\pm 47$	ab	210	$\pm 6$	bc
<b>Marmande</b>	477	$\pm 137$	a	153	$\pm 18$	b	590	$\pm 55$	b	270	$\pm 12$	c
<b>Roma</b>	343	$\pm 9$	a	153	$\pm 3$	b	400	$\pm 66$	ab	240	$\pm 16$	ab
<b>San Marzano</b>	140	$\pm 12$	a	73	$\pm 3$	a	240	$\pm 21$	a	157	$\pm 9$	a

Bei Phosphatmangel ist die Sprosstrockenmasse bei allen Sorten außer 'Hellfrucht' niedriger als bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit. Diese Minderung der Sprosstrockenmassebildung ist bei der Sorte 'Freude' besonders ausgeprägt. Sie sinkt auf weniger als ein Drittel der Sprosstrockenmasse der + P Variante.

Neben einer Reduktion der Trockenmasseakkumulation ist bei Phosphatmangel ebenfalls vielfach eine Minderung des Phosphorgehaltes der Pflanzen festzustellen. Der Phosphorgehalt der Wurzeln unterscheidet sich bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit signifikant zwischen den Sorten (Tabelle 9). Einen hohen Phosphorgehalt weisen die Sorten 'Goldene Königin' und 'San Marzano' auf, die 2,2 bzw. 2,6 mg P g<sup>-1</sup> TM erreichten (Tabelle 9). Bei den Sorten 'Freude', 'Marmande' und 'Roma' sind die Phosphorgehalte deutlich niedriger und betragen 1,4 mg P g<sup>-1</sup> TM.

Bei Phosphatmangel variieren die Phosphorgehalte der Wurzeln zwischen den Sorten sehr stark (1,2 bis 2,2 mg P g<sup>-1</sup> WTM). Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Nur bei zwei Sorten ('Goldene Königin', 'Judy') ist der Phosphorgehalt der Wurzeln bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatversorgung deutlich erniedrigt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Phosphorgehalt der Wurzeln und Sprosse [ $\text{mg P g}^{-1} \text{ TM}$ ] von acht verschiedenen Tomatensorten in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler. Zahlen in der gleichen Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ).

	Phosphorgehalt Wurzeln		Phosphorgehalt Sprosse	
	[ $\text{mg P g}^{-1} \text{ TM}$ ]			
	+ Phosphat	0 Phosphat	+ Phosphat	0 Phosphat
<b>Freude</b>	1,40 $\pm$ 0,40 a	1,20 $\pm$ 0,48 a	1,40 $\pm$ 0,14 a	1,20 $\pm$ 0,26 a
<b>Goldene Königin</b>	2,20 $\pm$ 0,04 b	1,60 $\pm$ 0,04 a	1,20 $\pm$ 0,00 a	1,00 $\pm$ 0,08 a
<b>Hellfrucht</b>	1,80 $\pm$ 0,04 b	1,40 $\pm$ 0,34 a	1,60 $\pm$ 0,40 a	1,20 $\pm$ 0,14 a
<b>Judy</b>	2,40 $\pm$ 0,44 bc	1,20 $\pm$ 0,22 a	1,20 $\pm$ 0,18 a	1,20 $\pm$ 0,22 a
<b>Judy-Resisto</b>	1,80 $\pm$ 0,26 b	1,80 $\pm$ 0,48 a	1,00 $\pm$ 0,18 a	1,20 $\pm$ 0,18 a
<b>Marmande</b>	1,40 $\pm$ 0,22 ac	1,40 $\pm$ 0,22 a	1,00 $\pm$ 0,04 a	1,00 $\pm$ 0,26 a
<b>Roma</b>	1,40 $\pm$ 0,30 ac	1,40 $\pm$ 0,22 a	1,00 $\pm$ 0,18 a	0,80 $\pm$ 0,04 a
<b>San Marzano</b>	2,60 $\pm$ 0,08 b	2,20 $\pm$ 0,48 a	1,60 $\pm$ 0,26 a	1,00 $\pm$ 0,14 a

In Bezug auf den Phosphorgehalt der Sprosse (Tabelle 9) sind weder bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit noch bei Phosphatmangel signifikante Unterschiede zwischen den Sorten zu erkennen. Bei den Sorten mit geringem Sprosswachstum, 'Freude', 'Hellfrucht' und 'San Marzano' sind die Phosphorgehalte höher als bei den anderen Sorten und übertreffen  $1,4 \text{ mg P g}^{-1} \text{ TM}$ . Bei Phosphatmangel wird der Phosphorgehalt der Sprosse im Vergleich zur Variante mit ausreichend Phosphat nur bei den Sorten 'Goldene Königin' und 'San Marzano' eindeutig reduziert (Tabelle 9).

Bezüglich der Minderung der Trockenmasseakkumulation und der Verringerung des Phosphorgehaltes wurden keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Während bei Phosphatmangel signifikante Unterschiede auf Sortenebene in der Wurzel- und Sprosstrockenmasseakkumulation vorkamen, konnten keine signifikanten Unterschieden im Phosphorgehalt der Pflanzen nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass der Phosphatmangel einen Einfluss auf die Trockenmasse der Tomatensorten hat, nicht aber auf den Phosphorgehalt.

Die folgenden sechs verschiedenen organischen Säuren sind unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit in den Exsudaten bei sieben der acht Tomatensorten analysiert worden: Citrat, Fumarat, Malat, Maleinat, Oxalat und Succinat. Lediglich bei der Sorte 'Marmande' ist kein Oxalat in den Exsudaten enthalten. Im Gegensatz zu den Exsudaten der anderen Arten (Abschnitt 4.1.1.1) sind die organischen Säuren Acetat, *Iso*-Butyrat, Malonat, Oxoglutarat und *trans*-Aconitat in den Exsudaten von Tomate auch in diesem Sortenvergleich nicht vertreten.

Die Sorten weisen hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren z.T. große Unterschiede auf. Bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit variiert die Gesamtexsudation organischer Säuren zwischen 11 ('Judy') und 19  $\mu\text{mol (g W TM h)}^{-1}$  ('Goldene Königin'). Bei Phosphatmangel unterscheidet sich die Gesamtexsudation organischer Säuren in einem geringfügig höheren Bereich zwischen 10 ('Judy-Resisto') und 23  $\mu\text{mol (g W TM h)}^{-1}$  ('San Marzano'). Nur die Sorten 'Freude', 'Hellfrucht' und 'Judy' reagieren mit einer deutlichen Steigerung der Gesamtexsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit (Abbildung 3). Die Gesamtexsudation organischer Säuren der Sorte 'Freude' fällt in diesem Versuch im Vergleich zu den Daten derselben Sorte in Abschnitt 4.1.1.1 in beiden Varianten circa um die Hälfte geringer aus. Bei den übrigen Sorten können keine Unterschiede bezüglich der Gesamtexsudation organischer Säuren zwischen den beiden Ernährungsstufen festgestellt werden.

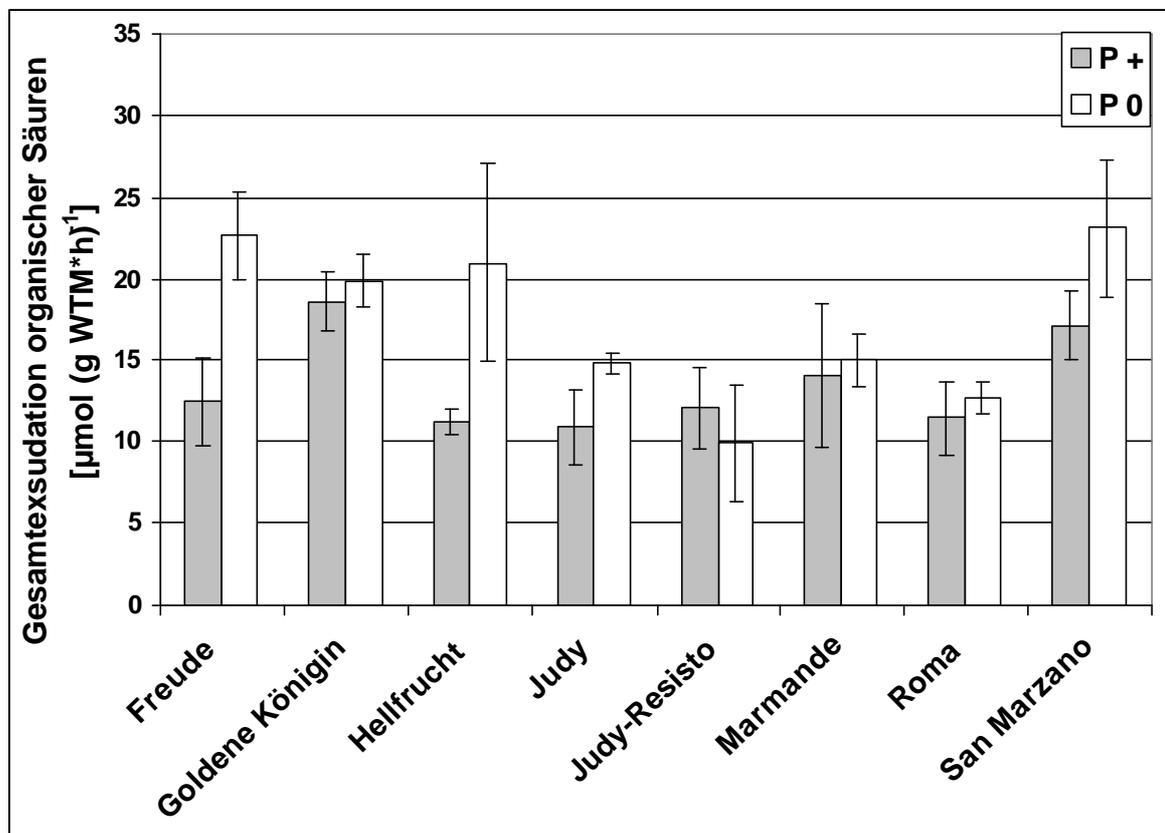


Abbildung 3: Gesamtexsudation organischer Säuren [ $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ] in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit bei verschiedenen Tomatensorten. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

Von den drei Sorten 'Freude', 'Hellfrucht' und 'Judy', die im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit unter Phosphatmangelbedingungen eine erhöhte Exsudation organischer Säuren gezeigt haben, sind die prozentualen Anteile der organischen Säuren an der Gesamtexsudation in Tabelle 10 aufgeführt.

Das Spektrum der organischen Säuren in den Exsudaten ist bei den drei Tomatensorten gleich. In den Exsudaten sind Citrat, Fumarat, Malat, Maleinat, Oxalat und Succinat in veränderlichen Anteilen vorhanden. Den größten Anteil der organischen Säuren an der Gesamtexsudation stellt Succinat mit 38 % ('Judy', + P) bis 49 % ('Freude', + P), gefolgt von Malat mit 23 % ('Freude', 0 P) bis 32 % ('Freude', + P) (Tabelle 10). Citrat nimmt an dritter Stelle einen Anteil von 6 % ('Freude', + P) bis 21 % ('Freude', 0 P) ein. Oxalat, Fumarat und Maleinat wurden in geringeren Mengen ausgeschieden.

Bei der Sorte 'Freude' steigt im Gegensatz zu den Daten aus Abschnitt 4.1.1.1. der prozentuale Anteil des Citrats bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit. Die Anteile von Malat und Oxalat werden geringer. Dagegen wird bei 'Hellfrucht' und 'Judy' eine Abnahme des Citrats und eine Zunahme von Succinat, bzw. Malat und Succinat bei Phosphatmangel festgestellt.

Tabelle 10: Anteile organischer Säuren in Prozent (%) an der Gesamtexsudation der Tomatensorten 'Freude', 'Hellfrucht' und 'Judy' bei unterschiedlicher Phosphatverfügbarkeit.

	'Freude'		'Hellfrucht'		'Judy'	
	+ P	0 P	+ P	0 P	+ P	0 P
<b>Citrat</b>	6,1	21,2	21,7	15,4	23,2	12,8
<b>Fumarat</b>	2,2	1,7	1,3	1,7	2,5	3,7
<b>Malat</b>	32,2	22,7	29,5	30,9	24,9	30,7
<b>Maleinat</b>	1,4	0,7	0,9	0,6	1,1	1,4
<b>Oxalat</b>	9,2	6,6	5,0	4,0	10,8	6,5
<b>Succinat</b>	48,9	47,1	41,6	47,4	37,5	44,9

Dieser Versuch macht deutlich, dass es z.T. erhebliche Unterschiede sowohl in der Qualität als auch in der Quantität der Exsudation organischer Säuren zwischen den Tomatensorten gibt. Dies gilt sowohl für ausreichende Phosphatverfügbarkeit als auch für die Reaktion auf Phosphatmangel. Die widersprüchlichen Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen lassen sich demnach zumindest teilweise auf die Verwendung verschiedener Sorten zurückführen. Nach den Untersuchungen von GERKE (1995) hat Citrat eine höhere phosphatmobilisierende Wirkung als Oxalat und Malat. Da nur bei den Exsudaten der Sorte 'Freude' unter den Bedingungen des Phosphatmangels sowohl die Gesamtexsudation organischer Säuren als auch der Citratanteil erhöht ist, wird diese Sorte in den folgenden Untersuchungen verwendet.

#### 4.1.1.3 Gewächshausversuch zur Varianz der Trockenmassebildung der Kirschtomate ‚Freude‘

Für einen Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen sollte die Varianz der Trockenmasseakkumulation innerhalb der Varietät möglichst gering sein. Inwieweit sich aus dem Saatgut der Tomatensorte 'Freude' Jungpflanzen gleichen Entwicklungsstadiums und gleicher Trockenmassen entfalten, wurde untersucht.

Nach 30 Tagen befanden sich die Jungpflanzen im Zwei- bis Vierblattstadium. Die Individuen wurden in drei Klassen der Spross- bzw. Wurzel trockenmasse unterteilt (Tabelle 11). Das Verhältnis der Spross- und Wurzel trockenmassen wurde ermittelt und beträgt in Klasse I und II circa 1,0. Dagegen verschiebt sich das Verhältnis der Individuen der Klasse III zu Gunsten der Sprosse auf ein Verhältnis von 0,7 (Tabelle 11).

Tabelle 11: Aufteilung der Spross- und Wurzel trockenmassen [TM (mg)] in drei Klassen von 50 untersuchten Tomatenkeimlingen sowie das Wurzel-/Sprossverhältnis.

<b>Spross TM [mg]</b>	<b>Anzahl der Individuen</b>	<b>Wurzel TM [mg]</b>	<b>Anzahl der Individuen</b>	<b>Wurzel-/Spross- Verhältnis</b>
<b>Klasse I: 10 – 20</b>	36	<b>Klasse I: 10 - 20</b>	37	1,0
<b>Klasse II: 21 – 40</b>	8	<b>Klasse II: 21- 40</b>	8	1,0
<b>Klasse III: 41 – 260</b>	6	<b>Klasse III: 41 - 130</b>	5	0,7

Die meisten Jungpflanzen (72 % der Sprosse) werden in der Klasse I, 10 bis 20 mg, der Klasse mit der geringsten Trockenmasse gefunden. Der Klasse II (21 bis 40 mg) werden 16 % der untersuchten Jungpflanzen zugeordnet. Lediglich 12 % der Individuen sind in der Klasse III, der Klasse mit dem zu Gunsten der Sprossmasse verschobenen Wurzel-/Sprossverhältnis. Trotz der einheitlichen Größe der Keimlinge bei Versuchsbeginn ist nach 30 Tagen Kulturdauer eine große Streuung der Sprosstrockenmasseakkumulation von 10 bis 260 mg Pflanze<sup>-1</sup> festzustellen. Da fast 90 % der Individuen den Klassen I und II zugezählt werden, sind nur einzelne Pflanzen außergewöhnlich groß. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen ist gegeben. Um die Ergebnisse aus dieser Arbeit auch mit denen anderer Autoren direkt vergleichen zu können, wird die Wurzel trockenmasse als Bezugsbasis für die Exsudation organischer Säuren der Sprosstrockenmasse vorgezogen.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1**

Bei Phosphatmangel ist die Exsudation organischer Säuren im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit bei einigen Pflanzenarten erhöht. Von den sieben getesteten Arten kommen infolge der Erhöhung der Gesamtexsudation organischer Säuren unter den Bedingungen des Phosphatmangels lediglich Luzerne (*Medicago sativa* L.) und Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) für die folgenden Versuche in Frage. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit des Saatgutes und der Keimlinge sowie der für die kommenden Versuche geeigneteren Wuchsform wird die Tomate als Versuchspflanze ausgewählt.

Auf Artenebene gibt es Unterschiede in der Qualität und auch in der Quantität der Exsudation organischer Säuren. Dies gilt sowohl für ausreichende Phosphatverfügbarkeit als auch für die Reaktion auf Phosphatmangel. Ähnlich große Unterschiede treten zwischen verschiedenen Tomatensorten auf. Die widersprüchlichen Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen, die bei der Verwendung der gleichen Art auftraten, lassen sich demnach zumindest teilweise auf die Verwendung verschiedener Sorten zurückführen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen ist nur bei den Exsudaten der Tomatensorte 'Freude' unter den Bedingungen des Phosphatmangels sowohl die Gesamtexsudation organischer Säuren als auch die Erhöhung des Citratanteils festzustellen. Diese Sorte wird in den folgenden Untersuchungen verwendet.

Fast 90 % der Individuen der Tomatensorte 'Freude' zeigen eine geringe Varianz in der Trockenmasseakkumulation der Wurzeln und Sprosse. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen ist dadurch gegeben. Als Bezugsgröße für die Exsudation organischer Säuren wird die Wurzeltrockenmasse gewählt.

#### 4.1.2 Vergleich zweier Rhizosphärenmikroorganismenisolate bei Wachstum unter Phosphatmangel

Ziel der Untersuchungen war es, die Wirkung unterschiedlicher Phosphatverfügbarkeit auf den Verlauf des pH-Wertes im Medium, die Abnahme des Phosphorgehaltes in den wässrigen Lösungen, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und vor allem die Exsudation organischer Säuren des Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und des Actinomyceten *Gordonia* sp. unter *in vitro* Bedingungen zu untersuchen. Für den Vergleich wurden drei verschiedene Varianten der Phosphatverfügbarkeit in Muromcev-Flüssigmedium (Abschnitt 3.8.3.3) eingesetzt. Zum einen wurde leicht lösliches Phosphat in zwei verschiedenen Konzentrationen (1,0 und 0,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) gewählt, zum anderen schwer lösliches, an Goethit sorbiertes Phosphat (Abschnitt 3.7.2). Zunächst musste die Konzentration der Phosphatsorptionskapazität von Goethit ermittelt werden.

##### 4.1.2.1 Konzentrationsabhängige Sorption von Phosphat an Goethit

Die Phosphatsorptionskapazität des Eisenoxids/hydroxids Goethit wurde ermittelt, um die maximale Phosphatsorption des Goethits für die Versuche gewährleisten zu können. Die Sorption leichtlöslichen Phosphats an Goethit bei einem pH-Wert von 6,5 steigt im Bereich von 0 bis 400  $\mu\text{mol P g}^{-1}$  Goethit steil an. Bei einer weiteren Erhöhung der Phosphatkonzentration in der Lösung wird nur noch wenig mehr Phosphat sorbiert (Abbildung 4).

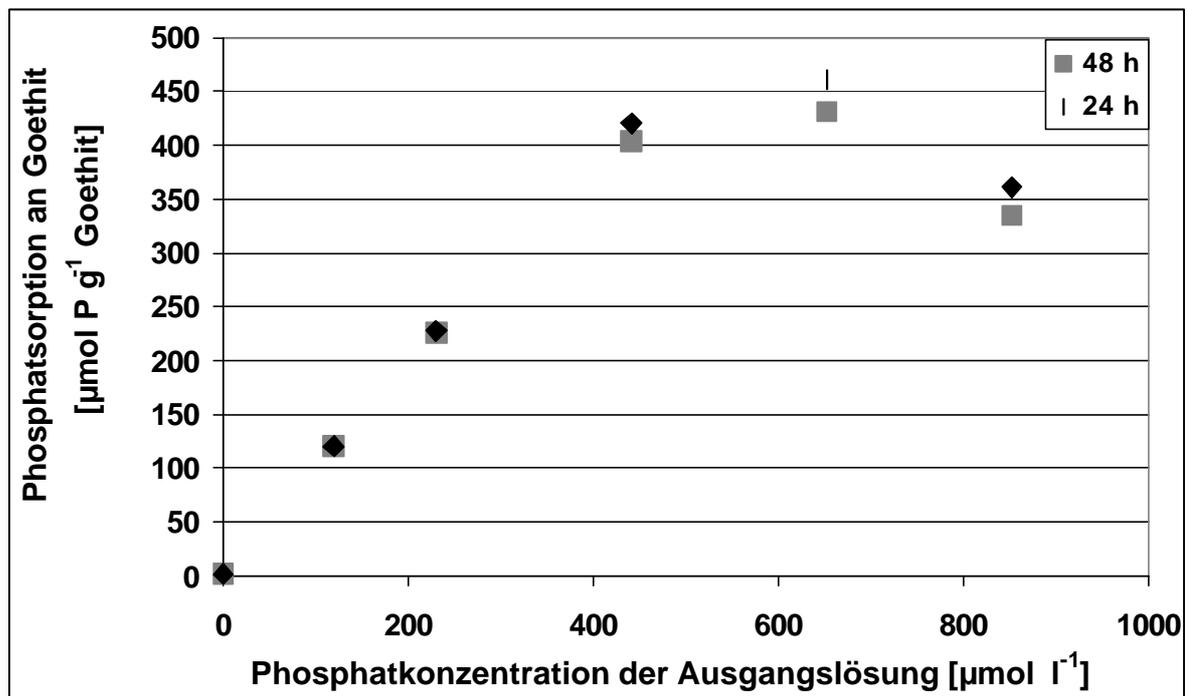


Abbildung 4: Phosphatsorption an Goethit [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] nach 24 h und 48 h bei steigender Phosphatkonzentration [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ].

Die maximale Phosphatsorption bei dem verwendeten pH-Wert von 6,5 beträgt demnach  $460 \mu\text{mol P g}^{-1}$  Goethit. Sie ist nach 24 h genauso hoch, wie nach 48 h. Im folgenden wurde das Goethit mit der entsprechenden Konzentration an leicht löslichem Phosphat für 24 h inkubiert.

#### 4.1.2.2 Bakterienpopulation

Trotz gleicher Bedingungen der Vorkultur beträgt die Startpopulation von *P. fluorescens* Pf-5  $4,5 \cdot 10^8$  Zellen pro 100 ml-Kolben, entsprechend einer cfu von  $\log 6,6 \text{ cfu ml}^{-1}$  (Abbildung 5), während die Ausgangspopulation von *Gordonia* sp. sich auf  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen pro 100 ml-Kolben, entsprechend  $\log 4,1 \text{ cfu ml}^{-1}$  beläuft (Abbildung 5). *P. fluorescens* Pf-5 erreicht schon nach drei Tagen die maximale Populationsdichte von ca.  $\log 8 \text{ cfu ml}^{-1}$  und bleibt danach unverändert. Dagegen wächst *Gordonia* sp. innerhalb von sechs Tagen zu dieser cfu heran. Dieser Wachstumsverlauf ist bei allen drei Phosphatvarianten zu beobachten. Die durch die Inokulumsdichte zu Versuchsbeginn bedingte geringere Populationsdichte in den Kolben von *Gordonia* sp. ist am Tag 6 ausgeglichen. Bei Versuchsende, am Tag 9, können weder zwischen den Behandlungen noch zwischen den Flüssigkulturen der beiden Rhizosphärenmikroorganismenisolate Unterschiede hinsichtlich der cfu festgestellt werden.

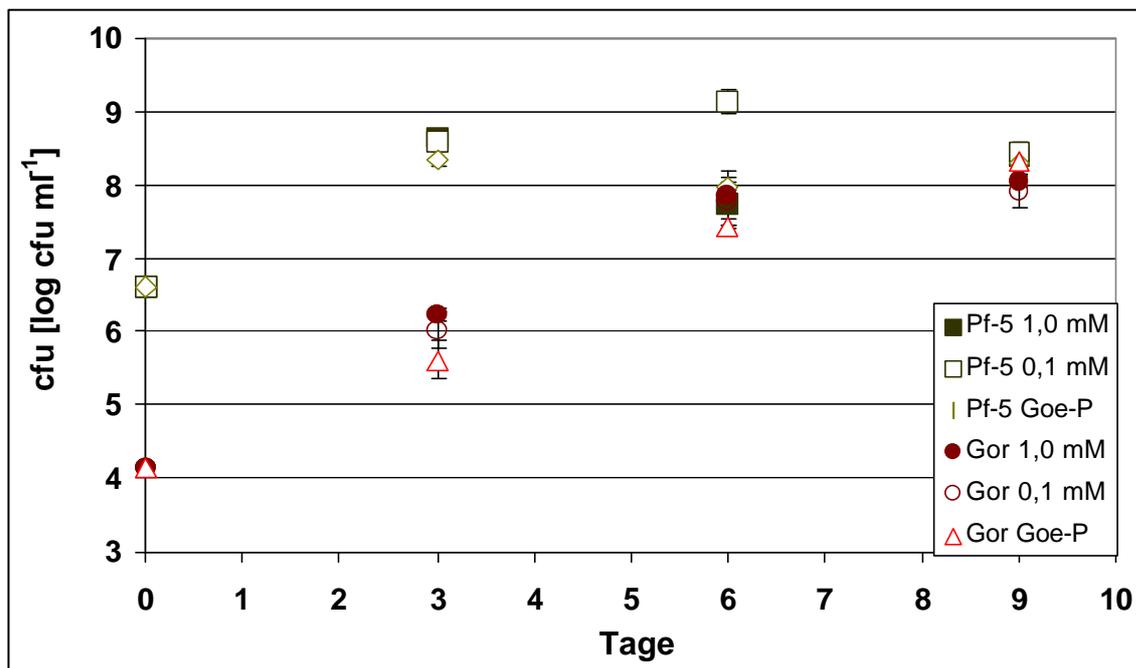


Abbildung 5: Bakterienpopulation [ $\log \text{cfu ml}^{-1}$ ] von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. in Muromcev-Medium im Versuchsverlauf bei Angebot von leicht löslichem Phosphat (1,0 mM und 0,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) und schwer löslichem Phosphat (Phosphat sorbiert an Goethit, Goe-P). Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

In den auf Muromcev-Medium ausplattierten Verdünnungsreihen können keine anderen Mikroorganismen als die Inokulierten entdeckt werden. Die Medien der nicht inokulierten Kontrollkolben sind auch 14 Tage nach dem Ausplattieren der unverdünnten Nährlösung auf Muromcev-Medium ohne nachweisbaren Bewuchs geblieben.

#### 4.1.2.3 pH-Werte der Medien

Durch das Autoklavieren änderte sich der auf pH 6,5 eingestellte pH-Wert der Medien. In der Variante mit ausreichend wasserlöslichem Phosphat (1,0 mM) sinkt der pH-Wert auf 6,2, bei wenig wasserlöslichem Phosphat (0,1 mM) auf 6,0 und in der Variante des an Goethit sorbierten Phosphats auf einen pH-Wert von 5,9. Der unterschiedliche Phosphatgehalt der Lösungen bewirkt eine unterschiedlich starke Pufferkapazität der Nährlösungen. Je mehr Phosphat in der Lösung vorhanden ist, desto geringer fällt die Ansäuerung aus.

Nach neun Versuchstagen wurde der pH-Wert der Lösungen erneut bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgeführt. Bei den Lösungen in den Kontrollkolben kann in den Varianten mit 1,0 mM P und 0,1 mM P keine weitere Änderung des pH-Wertes im Vergleich zum Versuchsbeginn festgestellt werden. Lediglich in den Medien der Kontrollkolben mit schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat ist es innerhalb der 9 Tage Inkubation zu einer Absenkung von pH 5,9 auf pH 5,5 gekommen (Tabelle 12).

Tabelle 12: pH-Werte der Medien nach neun Tagen Inkubation unter sterilen Bedingungen (Kontrolle) oder nach Inokulation mit *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Pf-5) oder *Gordonia* sp. (*Gordonia*) bei den drei Phosphatstufen 1,0 mM P, 0,1 mM P und Phosphat an Goethit sorbiert (Goe-P). Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	Kontrolle		Pf-5		Gordonia	
<b>1,0 mM P</b>	6,18	$\pm 0,01$	3,77	$\pm 0,13$	7,68	$\pm 0,08$
<b>0,1 mM P</b>	6,09	$\pm 0,09$	3,56	$\pm 0,03$	7,75	$\pm 0,09$
<b>Goe-P</b>	5,53	$\pm 0,03$	4,48	$\pm 0,13$	7,02	$\pm 0,39$

*P. fluorescens* Pf-5 verringert den pH-Wert in allen Varianten auf Werte zwischen 3,6 (0,1 mM P) und 4,5 (Goe-P) (Tabelle 12). Die Absenkung des pH-Wertes ist bei der Variante mit Goe-P am geringsten. Im Gegensatz zu *P. fluorescens* Pf-5 führt die neuntägige Kultur von *Gordonia* sp. in allen drei Medien zu einer Alkalisierung. Dabei ist die Alkalisierung bei beiden Varianten leicht löslichen Phosphats stärker als bei Goe-P.

Demnach ist sowohl der Ansäuerungseffekt von *P. fluorescens* Pf-5 als auch der Alkalisierungseffekt von *Gordonia* sp. bei Verwendung von schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat merklich geringer als in den Varianten mit leicht löslichem Phosphat. Das Goethit hat eine puffernde Wirkung auf den pH-Wert des Mediums.

#### 4.1.2.4 Phosphorgehalt der Medien

Der Phosphorgehalt der sterilen Kontrollkolben bleibt über den gesamten Versuchszeitraum in allen drei Varianten nahezu konstant. Auch diese Tatsache läßt darauf schließen, dass es zu keiner Verunreinigung mit Fremdorganismen gekommen ist.

In der Variante mit 1,0 mM leicht löslichem Phosphat in der Lösung sind bei Versuchsbeginn  $32,0 \mu\text{g P ml}^{-1}$  festgestellt worden. *P. fluorescens* Pf-5 senkt die Konzentration innerhalb der ersten drei Tage auf  $7,2 \mu\text{g P ml}^{-1}$ , bis zum neunten Tag auf  $6,2 \mu\text{g P ml}^{-1}$ . Die Phosphorkonzentration der Lösung sinkt in der Kultur von *Gordonia* sp. langsamer. Noch am dritten Tag können  $29,6 \mu\text{g P ml}^{-1}$  in den Lösungen der Kolben nachgewiesen werden. An den Tagen sechs und neun sind noch  $11,4 \mu\text{g P ml}^{-1}$  messbar. *P. fluorescens* Pf-5 verringert daher die Konzentration von leicht löslichem Phosphor in der Lösung schneller als *Gordonia* sp..

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich in den Lösungen mit 0,1 mM Phosphat. Die Ausgangskonzentration von  $3,4 \mu\text{g P ml}^{-1}$  wird durch *P. fluorescens* Pf-5 bereits innerhalb der ersten drei Tage auf  $0,14 \mu\text{g P ml}^{-1}$  bzw. nach neun Tagen auf  $0,08 \mu\text{g P ml}^{-1}$  gesenkt. Der Phosphorgehalt der Lösung wird von *Gordonia* sp. dagegen nur allmählich verringert. Am Tag drei sind  $2,4 \mu\text{g P ml}^{-1}$  vorhanden, am Tag sechs  $0,8 \mu\text{g P ml}^{-1}$  und am Tag neun noch  $0,6 \mu\text{g P ml}^{-1}$ . Im Vergleich zu *P. fluorescens* Pf-5 ist daher bei *Gordonia* sp. bei Versuchsende eine sechsfach höhere Phosphorkonzentration in der Lösung messbar.

In der Variante des schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats war eine Ausgangskonzentration von  $2,0 \mu\text{g P ml}^{-1}$  festzustellen. Bis zum dritten Tag vermag *P. fluorescens* Pf-5 die Konzentration auf  $0,14 \mu\text{g P ml}^{-1}$ , *Gordonia* sp. auf  $0,6 \mu\text{g P ml}^{-1}$  zu senken. In den folgenden Tagen (sechs und neun) fällt die Konzentration in den mit *Gordonia* sp. beimpften Kolben auf unter  $0,04 \mu\text{g P ml}^{-1}$ , während diese bei *P. fluorescens* Pf-5 deutlich höher ( $0,2 \mu\text{g P ml}^{-1}$ ) verbleibt. Daher kann *Gordonia* sp. die Phosphorkonzentration in der Lösung bei Angebot von schwer löslichem, an Goethit sorbierten Phosphats um das Fünffache stärker verringern, als *P. fluorescens* Pf-5.

*P. fluorescens* Pf-5 kann den Phosphorgehalt der wässrigen Lösungen in den Medien, denen leicht lösliches Phosphat zugefügt worden ist, schneller und tiefer absenken als *Gordonia* sp.. Dagegen vermag *Gordonia* sp. in der Variante des schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats, den Gehalt an wasserlöslichem Phosphor stärker zu vermindern als *P. fluorescens* Pf-5.

#### 4.1.2.5 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Da bei niedrigen Bakterienpopulationen eine direkte Messung des Phosphorgehaltes der Mikroorganismen schwierig ist, wurde eine andere, indirekte Methode verwendet, um den Phosphatstatus der Kulturen zu bestimmen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase von Mikroorganismen ist bei Phosphatmangel gesteigert (HUANG et al., 1998). Aus diesem Grund kann eine erhöhte Enzymaktivität als Indikator für einen Phosphatmangel der Zellen dienen.

Die drei verschiedenen Varianten der Phosphatverfügbarkeit führen bei den beiden Rhizosphärenmikroorganismenisolaten über den Versuchszeitraum zu unterschiedlich hoher Phosphataseaktivität (Tabelle 13). Bei *P. fluorescens* Pf-5 steigt die mittlere Aktivität des Enzyms in der 1,0 mM P Variante von 1 auf 4 ng Methylumbelliferon (log cfu h)<sup>-1</sup>, während die Aktivität bei der 0,1 mM P Variante bei 1 bis 2 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup> verbleibt. Bei *Gordonia* sp. nimmt dagegen in den beiden Varianten mit leicht löslichem Phosphat die mittlere Phosphataseaktivität bis zum neunten Tag von 1 auf 9 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup> zu (Tabelle 13).

Tabelle 13: Aktivität der alkalischen Phosphatase [ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>] der beiden Mikroorganismenisolate *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. an den Tagen drei, sechs und neun nach Inokulation bei Kultur in Medium mit drei verschiedenen Phosphatstufen 1,0 mM P, 0,1 mM P und Phosphat an Goethit sorbiert (Goe-P). Mittelwerte von drei Wiederholung ± Standardfehler.

	Tag 3		Tag 6		Tag 9	
	[ng MU (log cfu h) <sup>-1</sup> ]					
<b><i>P. fluorescens</i> Pf-5</b>						
<b>1,0 mM P</b>	1,39	±0,47	2,90	±0,67	4,37	±2,65
<b>0,1 mM P</b>	1,36	±0,52	1,93	±0,66	1,40	±0,39
<b>Goe-P</b>	5,37	±0,61	73,26	±12,94	46,58	±3,17
<b><i>Gordonia</i> sp.</b>						
<b>1,0 mM P</b>	0,73	±0,14	4,80	±0,74	8,20	±2,76
<b>0,1 mM P</b>	1,54	±1,07	6,78	±1,34	8,80	±0,88
<b>Goe-P</b>	0,53	±0,036	62,39	±18,27	68,33	±18,31

Im Gegensatz zu den niedrigen Aktivitäten bei Angebot leicht löslichen Phosphats, ist die mittlere Phosphataseaktivität bei Angebot von schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat ab dem sechsten Tag bis zu einem Faktor von zehn erhöht. Die höchste Aktivität der alkalischen Phosphatase von *P. fluorescens* Pf-5 (Tabelle 13) ist am Tag 6 messbar (73 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>). Zum Versuchsende hin (Tag 9) kommt es zu einer Abnahme der Aktivität (47 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>). Dagegen steigt bei *Gordonia* sp. (Tabelle 13) die mitt-

lere Phosphataseaktivität von Tag 6 ( $62 \text{ ng MU} \cdot \log \text{ cfu}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) zu Tag 9 auf Werte ( $68 \text{ ng MU} \cdot \log \text{ cfu}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), die denen von *P. fluorescens* Pf-5 am Tag 6 entsprechen.

Daraus ist zu schließen, dass die Entwicklung der Mikroorganismen im Verlauf des Versuches die Enzymaktivität direkt beeinflusst. Unabhängig von der Phosphatversorgung (Tabelle 13) ist erst nach sechs Kulturtagen eine Steigerung der Enzymaktivität bei beiden Mikroorganismenisolaten zu erkennen. In der Variante des schwer löslichen Phosphates (Goethit-Phosphat) nimmt die Aktivität der alkalischen Phosphatase von *P. fluorescens* Pf-5 im Versuchsverlauf zum Tag neun hin wieder ab.

In den Kulturen von *Gordonia* sp. nimmt unabhängig vom Phosphorgehalt der Lösungen die Enzymaktivität ab dem sechsten Tag der Sterilkultur zu. Die höchsten Werte werden in allen drei Phosphat Varianten am Tag 9 gemessen (Tabelle 13).

Die Messungen der Aktivität der alkalischen Phosphatase haben ergeben, dass es bei *P. fluorescens* Pf-5 bei Angebot leicht löslichen Phosphats kaum zu einer Erhöhung der Aktivität in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit kommt. Dagegen tritt bei Angebot schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats und Phosphorkonzentrationen von kleiner oder gleich  $0,2 \mu\text{g P ml}^{-1}$  eindeutig eine Erhöhung der Enzymaktivität von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 auf. Das Gleiche gilt für *Gordonia* sp..

#### **4.1.2.6 Exsudation organischer Säuren**

Die Konzentrationen organischer Säuren im Medium sind das Ergebnis aus der von den Rhizosphärenmikroorganismen exsudierten Menge an organischen Säuren, abzüglich der wiederaufgenommenen und sorbierten Menge. Die Gesamtexsudation organischer Säuren von *P. fluorescens* Pf-5 variiert von  $33 \mu\text{mol l}^{-1}$  am Tag 3 der Goethit-Variante bis zu  $96 \mu\text{mol l}^{-1}$  am Tag 6 der  $1,0 \text{ mM P}$  Variante (Tabelle 14). Der Gehalt organischer Säuren in den Kolben von *P. fluorescens* Pf-5 steigt in allen drei Varianten während des Versuchsverlaufs an und ist in der Variante schwer löslichen Phosphats (Goe-P) jeweils etwas niedriger als in den Lösungen mit leicht löslichem Phosphat. Diese geringeren Gehalte sind vermutlich auf die Sorption der organischen Säuren an das Goethit zurückzuführen.

Die Gesamtexsudation organischer Säuren bei *Gordonia* sp. schwankt im Bereich von 0 (Tag 9,  $0,1 \text{ mM P}$  und Goe-P) bis  $11 \mu\text{mol l}^{-1}$  (Tag 3,  $1,0 \text{ mM P}$ ) (Tabelle 14). Bei Versuchsende sind nur noch in den Kolben der höchsten Phosphatstufe ( $1,0 \text{ mM}$ ) organische Säuren zu detektieren.

Tabelle 14: Gesamtkonzentration organischer Säuren von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ] bei drei unterschiedlichen Phosphatvarianten im Versuchsverlauf. Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	Tag 3		Tag 6		Tag 9	
	[ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]					
<b><i>P. fluorescens</i> Pf-5</b>						
<b>1,0 mM P</b>	55,5	$\pm 17,8$	96,1	$\pm 10,8$	84,4	$\pm 15,7$
<b>0,1 mM P</b>	53,5	$\pm 6,8$	75,5	$\pm 7,3$	82,8	$\pm 1,5$
<b>Goe-P</b>	33,4	$\pm 10,6$	65,5	$\pm 2,0$	54,0	$\pm 13,5$
<b><i>Gordonia</i> sp.</b>						
<b>1,0 mM P</b>	10,9	$\pm 4,2$	5,3	$\pm 2,6$	5,9	$\pm 2,0$
<b>0,1 mM P</b>	0,8	$\pm 0,5$	0,4	$\pm 0,3$	0,0	$\pm 0,0$
<b>Goe-P</b>	0,6	$\pm 0,5$	1,0	$\pm 0,5$	0,0	$\pm 0,0$

Die dominierende organische Säure ist bei *P. fluorescens* Pf-5 mit über 90 % in allen drei Varianten das Citrat (Tabelle 15). In veränderlichen Anteilen sind Fumarat, Lactat, Malat und Succinat vertreten. Fumarat tritt nur am letzten Probenahmetag in der 1,0 mM Variante zu 0,03 % der Gesamtsäureexsudation auf. Lactat nimmt in dieser Variante zunächst über 7 % und am Tag 3 der 0,1 mM Variante 4,8 % ein, am Versuchsende ist es nicht mehr messbar. Geringe Mengen von Malat sind am Tag 3 in allen drei Varianten zu finden. Der Anteil des Succinats steigt in allen drei Varianten im Versuchsverlauf bis zum Tag 9 auf 2,2 % (0,1 mM) bis 6,6 % (Goe-P).

Die für die Phosphatdesorption nach GERKE (1996) wichtigste organische Säure Citrat ist in der Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 während des Versuches in den größten Mengen enthalten. Zudem zeichnete sich *P. fluorescens* Pf-5 durch eine hohe Gesamtexsudation organischer Säuren aus. Durch die Kombination von hoher Gesamtexsudation organischer Säuren und hohem Citratanteil sollte *P. fluorescens* Pf-5 eine bedeutende Rolle bei der Phosphatsolubilisierung zukommen.

In den Medien von *Gordonia* sp. sind fünf verschiedene organische Säuren (Citrat, Formiat, Lactat, Malat und Succinat) in veränderlichen Anteilen vorhanden (Tabelle 16). Am Tag 3 überwiegt in der Variante mit ausreichender Phosphatversorgung (1,0 mM P) mit 96 % Formiat. Daneben kann lediglich Lactat (4 %) ermittelt werden. Die Zusammensetzung der organischen Säuren in der 1,0 mM P-Variante ändert sich im Versuchsverlauf, es sind Citrat, Malat und Succinat in unterschiedlichen Mengen gemessen worden. Am Tag 9 (Versuchsende) werden 15 % Citrat, 57 % Lactat und 28 % Succinat ermittelt.

Tabelle 15: Prozentualer Anteil [%] der organischen Säuren an der Gesamtexudation im Medium von *P. fluorescens* Pf-5 in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit und der Zeit (Tag 3, 6, 9) (n.d., nicht detektierbar).

		Prozentualer Anteil [%] organischer Säuren				
		Citrat	Fumarat	Lactat	Malat	Succinat
<b>1,0 mM Phosphat</b>	Tag 3	91,37	n.d.	6,66	1,97	n.d.
	Tag 6	90,67	n.d.	6,72	n.d.	2,62
	Tag 9	94,05	0,03	0,99	n.d.	4,93
<b>0,1 mM Phosphat</b>	Tag 3	95,00	n.d.	4,84	0,16	0
	Tag 6	99,04	n.d.	n.d.	n.d.	0,96
	Tag 9	97,85	n.d.	n.d.	n.d.	2,15
<b>Goethit-Phosphat</b>	Tag 3	93,61	n.d.	n.d.	2,89	3,50
	Tag 6	97,66	n.d.	n.d.	n.d.	2,34
	Tag 9	93,38	n.d.	n.d.	n.d.	6,62

In der 0,1 mM P-Variante sind am Tag 3 alle fünf oben genannten organischen Säuren in den Lösungen von *Gordonia* sp. vorhanden (Tabelle 16). Den überwiegenden Anteil übernimmt auch hier mit 68 % Formiat. Lactat kommt zu 16 % und Succinat noch zu 12 % vor. Am Tag 6 verschieben sich die Anteile zu Gunsten des Lactats (88 %) und des Citrats (12 %). Bei Versuchsende werden in dieser Variante keine organischen Säuren mehr gefunden (Tabelle 16).

Eine andere Entwicklung ist in der Phosphatmangelvariante bei Einsatz schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats festzustellen. In diesem Fall sind am Tag 3 vier organische Säuren in den Lösungen vorhanden, Citrat, Formiat, Lactat und Succinat. Auch hier überwiegt zunächst mit 57 % Formiat. Succinat nimmt einen Anteil von 39 % ein. Am Tag der zweiten Probenahme (Tag 6) verschiebt sich dieses Verhältnis. Der Anteil von Formiat sinkt auf 30 %, der des Succinats auf 32 %. Dafür können 24 % Malat ermittelt werden sowie 8 % Lactat und noch 6 % Citrat.

Tabelle 16: Prozentualer Anteil [%] der organischen Säuren an der Gesamtexudation im Medium von *Gordonia* sp. in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit und der Zeit (Tag 3, 6, 9). (n.d., nicht detektierbar).

		<b>Prozentualer Anteil [%] organischer Säuren</b>				
		<b>Citrat</b>	<b>Formiat</b>	<b>Lactat</b>	<b>Malat</b>	<b>Succinat</b>
<b>1,0 mM Phosphat</b>	Tag 3	n.d.	95,76	4,24	n.d.	n.d.
	Tag 6	12,29	n.d.	54,03	33,68	n.d.
	Tag 9	14,95	n.d.	56,62	n.d.	28,43
<b>0,1 mM Phosphat</b>	Tag 3	3,23	67,50	15,47	1,43	12,37
	Tag 6	11,87	n.d.	88,13	n.d.	n.d.
	Tag 9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Goethit-Phosphat</b>	Tag 3	1,52	57,47	2,09	n.d.	38,92
	Tag 6	5,73	29,84	7,61	24,41	32,41
	Tag 9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Die geringe Gesamtexudation organischer Säuren sowie der geringe Citratanteil lassen darauf schließen, dass *Gordonia* sp. nur wenig Phosphat desorbieren kann. Weder die Gesamtexudation noch die Zusammensetzung der organischen Säuren in den Lösungen waren bei *Gordonia* sp. besonders zur Phosphatdesorption geeignet.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.2**

Für die Versuche zum Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen wurde zunächst die Sorption von Phosphat an Goethit ermittelt. Die maximale Phosphatsorption bei dem in den Versuchen verwendeten pH-Wert von 6,5, beträgt  $460 \mu\text{mol P g}^{-1}$  Goethit. Sie ist nach 24 h genauso hoch, wie nach 48 h.

Die durch die Inokulumdichte zu Versuchsbeginn bedingte geringere Populationsdichte von *Gordonia* sp. im Vergleich zu *P. fluorescens* Pf-5 ist nach sechs Tagen ausgeglichen. Bei Versuchsende, können weder zwischen den Behandlungen noch zwischen den beiden Mikroorganismenisolaten Unterschiede hinsichtlich der cfu festgestellt werden.

Beide Rhizosphärenmikroorganismenisolate verändern den pH-Wert des Mediums. Während *P. fluorescens* Pf-5 das Medium in allen Phosphatvarianten ansäuert, führt die Kultur von *Gordonia* sp. zu einem Anstieg des pH-Wertes. Sowohl der Ansäuerungseffekt von *P. fluorescens* Pf-5 als auch der Alkalisierungseffekt von *Gordonia* sp. sind bei Verwendung von schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat merklich geringer als in den Varianten mit leicht löslichem Phosphat.

*P. fluorescens* Pf-5 verringert bei Angebot von leicht löslichem Phosphat die Konzentration von Phosphor in der Lösung schneller als *Gordonia* sp.. Dagegen kann *Gordonia* sp. die Phosphorkonzentration in der Lösung bei Angebot von schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat um das Fünffache stärker absenken, als *P. fluorescens* Pf-5.

Im Versuchsverlauf beeinflusst die Entwicklung beider Mikroorganismenisolate die Aktivität der alkalischen Phosphatase. Unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit ist nach sechs Kulturtagen eine Steigerung der Enzymaktivität bei *P. fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. zu erkennen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist nur unter Verwendung von Goe-P bei Konzentrationen von kleiner gleich  $0,2 \mu\text{g P ml}^{-1}$  erhöht.

Die beiden verwendeten Mikroorganismenisolate unterscheiden sich in der Flüssigkultur in Bezug auf die Exsudation organischer Säuren. Die Gesamtexsudation organischer Säuren von *P. fluorescens* Pf-5 liegt drei- bis zehnfach höher als die von *Gordonia* sp. In der Variante mit schwer löslichem Phosphat (Goe-P) war sie jeweils etwas niedriger als in den Varianten mit leicht löslichem Phosphat. Demnach sorbiert Goethit organische Säuren.

Die dominierende organische Säure ist bei *P. fluorescens* Pf-5 mit über 90 % Citrat. Eine hohe Phosphatsolubilisierung sollte durch *P. fluorescens* Pf-5 gewährleistet sein. Fumarat, Lactat, Malat und Succinat kommen ebenfalls vor. In den Medien des Actinomyceten *Gordonia* sp. waren Citrat, Formiat, Lactat, Malat und Succinat in veränderlichen Anteilen vorhanden. Zu Beginn überwog der Anteil des Formiats (58 % bis 96 %). Malat und Succinat waren an unterschiedlichen Tagen bis zu 39 % vorhanden.

## Schlussfolgerungen über die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel

Die im ersten Teilbereich dieser Arbeit vorgestellten Versuche dienten der Untersuchung des Einflusses der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel. Zunächst konnte mit Hilfe des Artenvergleichs festgestellt werden, dass die Phosphatverfügbarkeit bei einigen Pflanzenarten die Exsudation organischer Säuren beeinflusst. So führte bei zwei Arten (Luzerne und Tomate) Phosphatmangel zu einer Erhöhung der Exsudation organischer Säuren im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit. Einige Arten (Mais, Raps, Rotklee, Zuckerrübe) blieben davon unbeeinflusst, wohingegen eine Art (Rettich) bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit höhere Konzentrationen organischer Säuren in ihren Exsudaten zeigte als bei Phosphatmangel.

Ähnlich wie im Artenvergleich konnte auch im Sortenvergleich der Tomaten eine große Variabilität in der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit gefunden werden. Folglich sind die im Artenvergleich aufgetretenen Unterschiede nicht auf das Artniveau begrenzt, sondern setzen sich bei der Tomate auf der Sortenebene fort.

Dieses Ergebnis führt zu der Erkenntnis, dass die Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel nicht bei allen Pflanzen zu den grundlegenden Mechanismen der Phosphatsolubilisierung zählt. Statt dessen können die Arten und Sorten in Gruppen eingeteilt werden, in denen einige Pflanzen die Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel vorantreiben, während andere offensichtlich andersartige Wege der Phosphatmobilisierung gehen.

Die Kultur der beiden Mikroorganismenisolate *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. in einem Flüssigmedium bei unterschiedlicher Phosphatverfügbarkeit hat gezeigt, dass große Unterschiede hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren bestehen. Die Abgabe organischer Säuren war bei *P. fluorescens* Pf-5 unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit, während *Gordonia* sp. bei sinkender Phosphatverfügbarkeit die Exsudation minderte. Eine Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel konnte bei den Mikroorganismen nicht festgestellt werden. Statt dessen wurden bei beiden Isolaten Modifikationen des pH-Wertes in allen Varianten und eine Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Variante schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats festgestellt. Demnach wird bei den verwendeten Rhizosphärenmikroorganismen die Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel nicht erhöht. Zur Steigerung der Phosphatverfügbarkeit wurden andere Mechanismen, wie die Modifikation des pH-Wertes und die Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatase eingesetzt.

#### **4.2 Entwicklung eines Systems zur sterilen Pflanzenanzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen**

Wasserlösliche Wurzelexsudate, die der Analyse des Gehaltes und der Zusammensetzung an organischen Säuren dienen sollen, können über verschiedenste Methoden gesammelt werden. So kann das Wurzelsystem aus dem Substrat freipräpariert und für einen definierten Zeitraum in belüftete Lösungen eingetaucht werden (GRANSEE & WITTENMAYER, 2000). In diesem Fall wird auch von Abstauchlösungen gesprochen. Dabei besteht die Gefahr von Wurzelschäden. Die Wurzelhaare können abbrechen, wodurch dann die Sammelösung nicht nur Wurzelexsudate, sondern auch Zellinhaltsstoffe enthält.

Um Wurzelschäden zu vermeiden, werden zur Ermittlung der Wurzelexsudation auch hydroponische Kulturen eingesetzt (LIPTON et al., 1987). Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die Wurzeln der Pflanzen morphologisch und physiologisch von denen, die im Boden gewachsen sind, unterscheiden. In der Regel haben sie keine oder weniger Wurzelhaare, die Wurzeln zeigen unterschiedliche Verzweigungsmuster, sind keiner mechanischen Belastung ausgesetzt und erleiden keinen Wasserstress. Zudem bleiben die Cortezellen oftmals erhalten (JONES, 1998). Dagegen werden bei einer Wurzelentwicklung im Boden Wurzelhaare ausgebildet. Die mechanische Belastung der Wurzeln führt zum Verlust vieler Cortezellen, so dass die darunter liegende Endodermis in Teilen die Wurzeloberfläche bildet (LYNCH, 1990). Daher sind die Ergebnisse aus hydroponischen Versuchen nur begrenzt auf die Verhältnisse im Boden übertragbar.

Für eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Prozesse in der Rhizosphäre sollten in Anlehnung an naturnahe Bedingungen, die Pflanzen in einem festen Substrat wachsen und eine störungsarme Probenahmemethode verwendet werden (GRANSEE & WITTENMAYER, 2000, SCHACHTMANN et al., 1998). Die Perkulationsmethode entspricht diesen Anforderungen besser (NEUMANN & RÖMHELD, 2000). Die Pflanzen wachsen in einem festen Substrat. Durch eine Zugabe von Wasser und einem nachfolgenden Abziehen der Lösung ist die Gewinnung wasserlöslicher Rhizosphärensubstanzen möglich. Diese Form der Probenahme wird zur Vermeidung der oben aufgeführten Artefakte für die folgenden Versuche gewählt.

Neben dem Aspekt der Probenahme ist weiterhin zu beachten, dass unter unsterilen Bedingungen Mikroorganismen die Messung der pflanzlichen Exsudationsleistung beeinflussen (JONES, 1998), da sie die Exsudate als leicht verfügbare Kohlenstoffquellen metabolisieren können. Aus diesem Grund ist eine Anzucht der Versuchspflanzen und eine Gewinnung der in den Exsudaten vorkommenden organischen Säuren zunächst unter monaxenischen Umständen eine Voraussetzung zur Messung der pflanzlichen Exsudation.

Schließlich soll versucht werden die Sorptionsfähigkeit des Systems bezüglich Phosphat und organischer Säuren abzuklären, um eventuell eine Bilanzierung durch organische Säuren mobilisierten Phosphats durchführen zu können.

#### 4.2.1 Aufbau des Systems zur monaxenischen Kultur von Tomatenkeimlingen

Das Pflanzenwachstum musste für die hier aufgeführten Versuche über einen längeren Zeitraum unter sterilen Bedingungen erfolgen, damit die Messung der Exsudation organischer Säuren nicht durch mikrobiellen Abbau beeinflusst wird. Bevor die eigentlichen Versuche stattfinden konnten, mussten die Samen der Versuchspflanze unter sterilen Bedingungen zum Keimen gebracht werden. Diese Anzucht in den Keimröhren diente auch dazu, dass die Keimlinge die Phosphorvorräte aus dem Samen ausschöpfen und sich so im Versuchsverlauf ein Phosphormangel bei den Pflanzen einstellen konnte. Durch das in Abschnitt 4.2.1.2 beschriebene Kultursystem ist ein Wachstum der Versuchspflanzen für bis zu acht Wochen unter sterilen Bedingungen möglich. Die weiteren folgenden Eigenschaften sollte das Kultursystem gewährleisten:

- Eine sterile Kultur der Pflanzen über einen Zeitraum von mehreren Wochen.
- Eine gute Durchwurzelbarkeit des Substrates für ein uneingeschränktes Wurzelwachstum.
- Ein geringes Volumen, so dass bei ausgeprägtem Wurzelwachstum das gesamte Substrat als wurzelnahes Substrat betrachtet werden kann.
- Eine Belüftung zur Vermeidung anoxischer Zustände.
- Eine verletzungssarme Gewinnung der Lösungen.

Als Substrat für die Versuche im Kultursystem wurde Quarzsand gewählt. Nach SIMONS et al. (1996) liefert Quarzsand der Korngröße 0,1 bis 0,3 mm eine gute Durchwurzelbarkeit für Tomatenwurzeln und damit die besten Wachstumsbedingungen für diese Art. Werden kleinere Partikel verwendet, ist das Wurzelwachstum aufgrund der geringen Porengröße eingeschränkt, sind die Partikel zu groß, so trocknet das Substrat zu schnell aus. In einem Vorversuch ergab eine Mischung aus einem Drittel Grobsand (Durchmesser 0,63 bis 2,0 mm) und zwei Dritteln Mittelsand (Durchmesser 0,2 bis 0,63 mm) ein optimales Verhältnis im Substrat für die Wurzelentwicklung der hier verwendeten Tomatensorte 'Freude'. Das Beimischen von Grobsand sorgte für eine Lockerung des Substrates. Neben einer ausreichenden Verzweigung und Wurzelhaarbildung war eine Perkolation des Substrates zur Probenahme möglich.

Für das Kultursystem wurden Röhren mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Länge von 22 cm gewählt. Zum einen gewährleistet der verwendete Durchmesser der Röhren, dass sich die Sprosse der jungen Pflanzen in der Entwicklung nicht gegenseitig bedrängen. Zum anderen wird dadurch das Substrat in einem geringen Volumen untergebracht und ein Längenwachstum der Wurzeln ermöglicht. Aufgrund des starken Wurzelwachstum kann der gesamte Inhalt als wurzelnaher Boden bzw. wurzelnahes Substrat betrachtet werden. Der Ausdruck Rhizosphärenboden oder –substrat wird dagegen vermieden, da der Begriff der Rhizosphäre von HILTNER (1904) geprägt wurde und „die enge Zone bakterieller Aktivität um eine Wurzel“ beschreibt. Diese Definition wurde von DARRAH (1993) zwar erweitert, indem „der von den Wurzeln beeinflusste Bereich des Bodens“ angesprochen wurde, welcher einige Millimeter betragen kann und im Fall des Nährstoff- und Wasserentzugs

auf mehrere Zentimeter auszudehnen ist. Dennoch wird das Substrat aus den Kulturröhren als wurzelnahe Substrat bezeichnet, um Mißverständnissen vorzubeugen.

Eine Belüftung des Kultursystems war notwendig, um anoxische Zustände im Bereich der Wurzeln zu vermeiden, da sich Sauerstoffmangel nicht nur auf das Wurzelwachstum, sondern auch auf die Wurzelexsudation auswirkt (RICARD et al., 1994 IN: JONES, 1998). Die beiden eingesetzten Mikroorganismenisolate zählen zu den Aerobiern und sollten deswegen ebenfalls nicht anoxischen Bedingungen ausgesetzt werden. Das Substrat wurde aus diesem Grund von unten mit kohlendioxidverarmerter Luft durchströmt. Der Sprossbereich im Kultursystem wurde mit steriler Raumluft belüftet.

Die Röhren des Kultursystems wurden in einer Klimakammer oder einem Klimaschrank unter definierten Bedingungen (Abschnitt 3.4.1) inkubiert.

#### **4.2.1.1 Aufbau der Röhren**

Unter Ableitung des Versuchsaufbaus von LIPTON et al. (1987) und SIMONS et al. (1996) entstand folgendes System (Abbildung 6) bestehend aus zwei aufeinandergesetzten Glasröhren. Die untere Röhre dient als Wurzelraum, die obere als Sprossraum. Das mit ca. 200 g Sand gefüllte untere Glasrohr (Länge 22 cm, Ø 4 cm, Schmidt & Co, Braunschweig) wird nach unten mit einem Schraubverschluss mit Silikondichtung verschlossen. Vor dem Befüllen wird der Sand der Röhren mit einer Nährlösung und den entsprechenden Phosphatdüngungsstufen bzw. mit an Goethit sorbiertem Phosphat versetzt. Für die Be- und Entlüftung sorgen zwei an der Seite aufgesetzte sterile Luftfilter (Roth, Karlsruhe, nicht eingezeichnet). Durch den unteren Luftfilter wird Luft gepumpt, die durch 3 M Kalilauge geleitet und so an Kohlendioxid verarmt wurde. Durch den oberen Luftfilter kann Luft entweichen. Die regelmäßige Zugabe von Wasser alle zwei bis drei Tage, erfolgt in der reinen Werkbank über den oberen Zugang.

Auf der entgegengesetzten Seite der Röhre liegt ein weiterer Zugang mit Luftfilter. Von diesem führt ein dünner Silikonschlauch in das Innere der Glasröhre bis auf den Boden des Gefäßes. Damit der Sand den Schlauch nicht verstopfen kann, liegt das Ende des Schlauches in einer Schicht von 30 g Glasperlen (Ø 4 mm, Merck, Darmstadt). Diese wird mit einer Lage Steinwolle (2 g Teka-Watte, Lorch, Waldenbach) vom Sand getrennt. Über diesen Schlauch kann Flüssigkeit sowohl zugeführt als auch abgezogen werden. An den Seiten der Röhre, auf der Höhe der Luftfilter, sowie oben als Manschette, verlaufen Streifen von Filterpapier (Typ 2048, Schleicher & Schuell, Dassel), um ein Austrocknen der oberen Sandschichten zu verhindern (nicht in Abbildung 6 eingezeichnet). Die gefüllten Röhren werden zweimal autoklaviert. Für den Sprossraum werden identische Röhren ohne Füllung und mit Silikonstopfen ebenfalls autoklaviert. Sie werden nach dem Einsetzen der Pflanzen mit der Öffnung nach unten auf die mit Sand gefüllten Röhren gesetzt.

Nach sieben bis zehn Tagen werden die Keimlinge in der sterilen Werkbank vorsichtig von dem Filterpapier der Keimröhren befreit und drei bis vier Pflanzen pro Röhre direkt in den Sand am oberen Ende der Versuchsröhren gesetzt. Die Sterilität der Keimröhren wird an einigen Keimlingen, die auf einem Vollnährmedium ausgelegt werden, überprüft. Anschließend wird eine zweite leere Röhre über den Spross gestülpt und mit Parafilm mit der unteren Röhre verbunden. Die bepflanzten Versuchsröhren werden in die Klimakammer bzw. den Klimaschrank überführt.

Sowohl der Wurzel- als auch der Sprossbereich werden über ein Pumpensystem mit Luft versorgt, die über Sterilfilter geleitet wird. Dem Sprossbereich wird mit Raumluft, kohlendioxidhaltige Luft zugeführt. Dabei muss anfangs die Luftzufuhr zum Sprossbereich sorgfältig reguliert werden, um ein Austrocknen der Keimlinge zu verhindern. Der Wurzelbereich wird mit Luft versorgt, die durch 3 M Kalilauge geleitet und so an Kohlendioxid verarmt wurde. Im Verlauf der Versuche kommt es zu einer starken Durchwurzelung des Substrates, so dass der Inhalt der unteren Röhre als wurzelnahes Substrat angesehen werden kann. Im Dreiblattstadium der Pflanzen, werden die Lösungen aus dem Substrat gesammelt und anschließend die Pflanzen geerntet. Das Dreiblattstadium der Pflanzen ist ca. sieben Wochen nach dem Keimansatz in den Röhren erreicht.

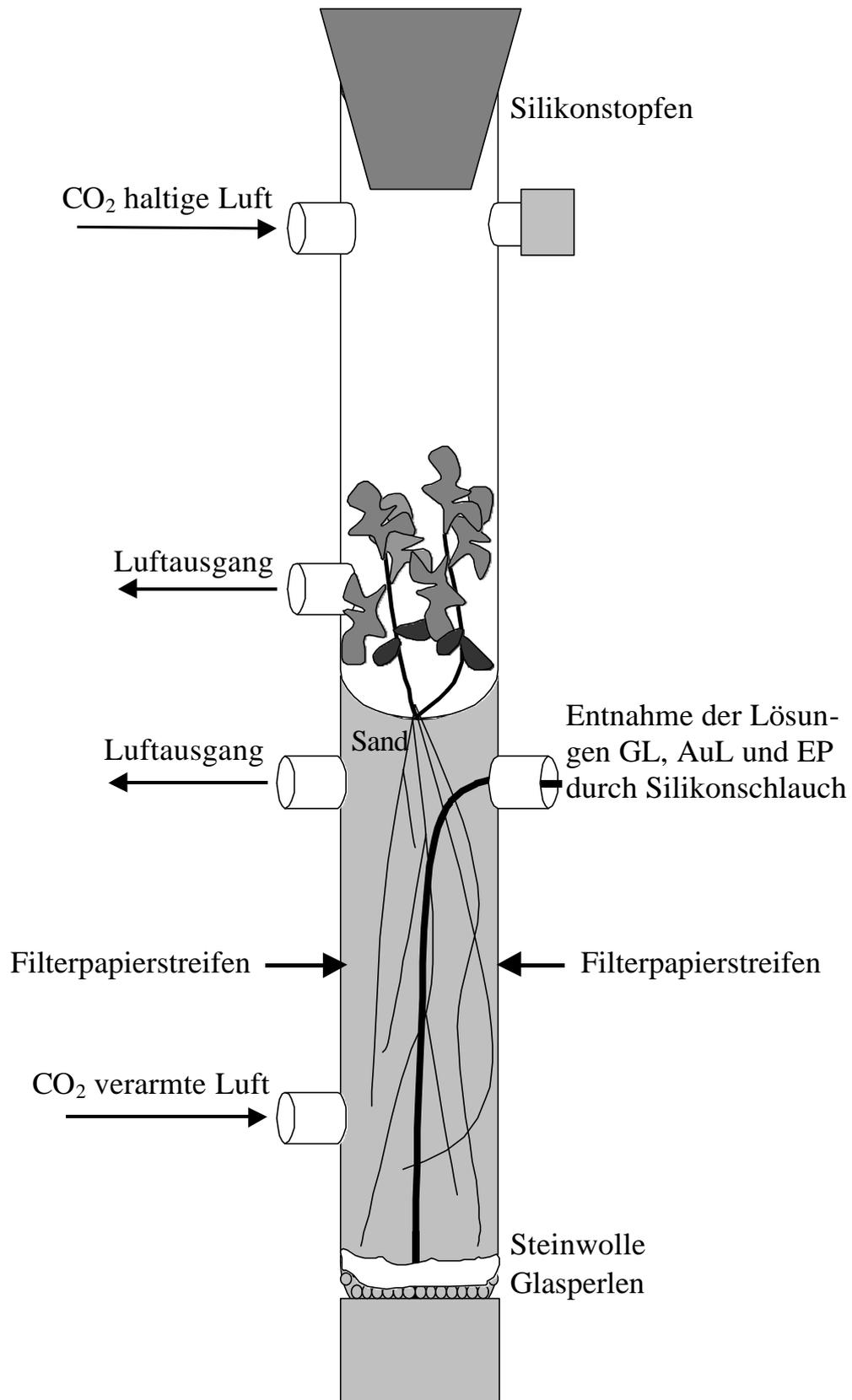


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Kultursystems zur sterilen und störungsarmen Probenahme unter streng definierten Bedingungen. (Genaue Beschreibung siehe Text).

#### 4.2.1.2 Probenahme

Zunächst werden die exsudathaltigen Lösungen aus dem Kultursystem (Abschnitt 3.4.3) in der reinen Werkbank gewonnen. Die Zugabe von deionisiertem Wasser zur Perkolation des Substrates erfolgt seitlich und am oberen Ende der Röhre. Hier passiert das Wasser zuerst einen Filterpapierstreifen und einen Teil des nährsalzhaltigen Substrates bevor es in Kontakt mit den Wurzeln gelangt. Deswegen führt der Einsatz von deionisiertem Wasser zur Spülung des Substrates und Sammlung der Exsudate in diesem Kultursystem nicht zu einem erhöhten Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  und anderen Ionen des Apoplasten. Ein Aufbrechen der Zellmembranen wird durch die Art der Probenahme weitestgehend verhindert.

Bei den Versuchen mit Pflanzen werden diese vorsichtig aus dem Sand gezogen und die Wurzeln mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (3 ml) abgespült. Diese Lösung wird als Rhizoplanenlösung, RhL, bezeichnet. Alle Lösungen werden mit sterilen Spritzen gewonnen und in sterile Schraubdeckelgefäße überführt. Für die Überprüfung der Sterilität bzw. zur Bestimmung der cfu der Mikroorganismen, wird aus einem Aliquot der abgezogenen Lösungen (GL, AuL, EP), bzw. in den Versuchen mit Rhizosphärenmikroorganismen aus einem Teil der Rhizoplanenlösung (RhL), eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Verdünnungen werden auf Vollnährmedien (Abschnitt 3.8.3.1) ausplattiert.

Während alle bisher erwähnten Arbeiten an der reinen Werkbank durchgeführt werden, erfolgen die weiteren Arbeiten unter unsterilen Bedingungen. Der Sand wird aus den Röhren geschüttelt, um auch die Feinwurzeln zu erfassen. Die Pflanzen werden in Spross und Wurzeln unterteilt und deren Frisch- und Trockenmassen bestimmt. Der Sand, die Glasperlen, die Steinwolle und die Filterstreifen werden in Szintillationsgefäßen zunächst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, später nach RIEHM (Abschnitt 3.5.3) auf pflanzenverfügbares, DL-lösliches Phosphat untersucht.

## 4.2.2 Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem

Sowohl Phosphat als auch organische Säuren werden leicht und schnell an die verschiedensten Oberflächen gebunden, da sie um die selben Adsorptionsplätze der Bodenfestphase konkurrieren (GERKE, 1995). Durch die Verminderung der freien Phosphatsorptionsplätze durch die organischen Säuren wird die Phosphatlöslichkeit erhöht. Zusätzlich führt die Bindung der organischen Säuren zu einer Anlösung der phosphatsorbierenden Eisen- und Aluminiumgruppen, so dass die Phosphatlöslichkeit weiter erhöht wird (GERKE, 1995). Die in dem hier verwendeten Kultursystem genutzten Bestandteile müssen deswegen auf das Bindungsvermögen von Phosphat und organischen Säuren untersucht werden. Eine vorhergehende Prüfung der Sorptionskapazitäten von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem ermöglicht eine genauere Charakterisierung der pflanzlichen und mikrobiellen Effekte bei Phosphatmangel.

### 4.2.2.1 Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile

Ein Aliquot der Lösungen wurde zur Überprüfung der Sterilität auf Nutrient Agar (Abschnitt 3.8.3.1) ausplattiert. Es wurden keine Mikroorganismen in den Lösungen festgestellt. Die in den Röhren verwendeten Materialien Sand, Glasperlen, Filterpapier und Steinwolle wurden auf den Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor mit der DL-Methode (Abschnitt 3.5.3) untersucht, der Phosphorgehalt der abgezogenen, wässrigen Lösungen nach der Methode von MURPHY & RILEY (Abschnitt 3.5.1). Der Silikonschlauch und die Versuchsröhre selbst wurden nicht berücksichtigt.

Die Addition der Phosphorgehalte der Lösungen (Phosphor in wässrigen Lösungen) und der vier Röhrenbestandteile (pflanzenverfügbares, DL-lösliches Phosphor) führte nicht zu einer vollständigen Wiederfindung des eingebrachten Phosphors. Etwa ein Drittel war auf diese Weise nicht zu ermitteln. Dieses Phosphat muss in eine nicht wasser- oder DL-lösliche Form übergegangen sein.

Die Phosphorkonzentration in den Lösungen nimmt unabhängig von der Ausgangskonzentration von 2,2 bis 8,8  $\mu\text{g P ml}^{-1}$  nach 3 bis 4 Tagen auf Werte um 0,4  $\mu\text{g P ml}^{-1}$  ab. Von dem pflanzenverfügbaren, DL-löslichen Phosphor sind über 90 % am Sand sorbiert (Tabelle 17). Die übrigen Bestandteile der Röhren sorbieren nur geringe Phosphormengen (Tabelle 17). Diese Verteilung ist ebenfalls unabhängig von der eingesetzten Phosphorkonzentration.

Tabelle 17: Verteilung des pflanzenverfügbaren, DL-löslichen Phosphors in Prozent (%) auf die vier untersuchten Röhrenbestandteile Sand, Glasperlen, Filterpapier und Steinwolle nach Zugabe leicht löslichen Phosphates ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Prozent (%) des pflanzenverfügbaren, DL-löslichen Phosphors			
Sand	Glasperlen	Filter	Steinwolle
93,9	5,0	0,5	0,6

Diese Untersuchung zeigt, dass eine hohe Sorptionskapazität für Phosphat an die Baubestandteile der Röhren, insbesondere den Sand, in dem Kultursystem besteht. Da sich nach einer Woche Inkubation im sterilen System die Wiederfindung auf zwei Drittel des eingebrachten Phosphates beschränkte, ist davon auszugehen, dass ebenfalls nur etwa zwei Drittel des eingebrachten Phosphates pflanzenverfügbar sind.

#### 4.2.2.2 Sorption organischer Säuren an Sand und Goethit

JONES & BRASSINGTON (1998) stellten fest, dass organische Säuren, die in die Bodenlösung gelangen, innerhalb von 10 Minuten zu über 80 % an die verschiedenen Bestandteile der Bodenmatrix sorbiert werden. Aufgrund dieser schnellen und weitgehend unspezifischen Sorption ist demnach die Effektivität der organischen Säuren zur Nährstoffmobilisierung aus der Rhizosphäre begrenzt. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Sorption organischer Säuren und somit auch die Phosphatdesorption sowohl von der Art der eingesetzten organischen Säure als auch der Konzentration derselben abhängig ist (GERKE, 1995). So ist z.B. die Phosphatmobilisierung nach GERKE (1995) in Versuchen bei sorbierten Citratmengen unterhalb einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol (g Boden)}^{-1}$  sehr gering.

Zur Messung der Sorption organischer Säuren in dem hier verwendeten Kultursystem wurde eine Mischung aus verschiedenen organischen Säuren, die in den vorherigen Versuchen in den Exsudaten und Medien in ähnlicher Konzentration gemessen wurden, zusammengestellt. Sie wurden in das Sand und Goethit enthaltende Kultursystem eingebracht, um die Sorption an das Substrat des Kultursystems zu überprüfen.

Ein Aliquot der abgezogenen Lösungen wurde zur Überprüfung der Sterilität auf Vollnährmedium (Abschnitt 3.8.3.1) ausplattiert und über zwei Wochen im Brutschrank inkubiert. Die Lösungen blieben steril, ein mikrobieller Abbau organischer Säuren während der Inkubationszeit kann damit ausgeschlossen werden.

In den abgezogenen Lösungen der unbehandelten Kontrollröhren treten pH-Werte von 5,0 bis 5,2 auf (Tabelle 18).

Tabelle 18: pH-Werte der abgezogenen Lösungen (Gleichgewichtslösung, GL, Austauschlösung, AuL und Exsudatprobe, EP) von unbehandelten Kontrollen und Versuchsröhren, denen organische Säuren (+ org. Säuren) zugefügt wurden. Mittelwerte von vier Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	GL		AuL		EP	
<b>Kontrolle</b>	5,00	$\pm 0,04$	5,07	$\pm 0,01$	5,22	$\pm 0,00$
<b>+ org. Säuren</b>	4,66	$\pm 0,05$	4,67	$\pm 0,08$	4,87	$\pm 0,04$

Bei den Röhren, denen nach dem Autoklavieren organische Säuren dem Substrat zugefügt wurden, kommt es zu einer Ansäuerung aller drei abgezogenen Lösungen. Die pH-Werte

der Lösungen wurden mit 4,7 bis 4,9 bestimmt, was eine Differenz von 0,3 bis 0,4 pH-Einheiten im Vergleich zu den Lösungen der Kontrollen ergibt (Tabelle 18).

Als weiterer Parameter wird die Phosphorkonzentration der Lösungen (Abschnitt 3.5.1) bestimmt. Während die drei Lösungen GL, AuL und EP der Kontrollröhren nach der Inkubation unter sterilen Bedingungen Konzentrationen zwischen 18 und 22 ng P ml<sup>-1</sup> enthalten, sind bei Zugabe von organischen Säuren zwischen 64 ng P ml<sup>-1</sup> (EP) und 146 ng P ml<sup>-1</sup> (GL, AuL) festzustellen. Das entspricht der drei- bis siebenfachen Konzentration der Lösungen aus den unbehandelten Kontrollen. Es ist demnach davon auszugehen, dass das Phosphat durch die organischen Säuren von den Sorptionsstellen verdrängt wurde bzw. durch die Ansäuerung gelöst wurde.

In den Lösungen der sterilen Kontrollen, denen keine organischen Säuren zugefügt worden waren, konnten geringe Mengen organischer Säuren analysiert werden. Da der Versuch unter sterilen Bedingungen abgelaufen ist, muss davon ausgegangen werden, dass diese organischen Säuren bereits vor Versuchsbeginn mit dem Sand in das Kultursystem eingebracht worden sind. Die in den Lösungen gemessenen Gehalte (µg 200 g<sup>-1</sup> Sand) bzw. Konzentrationen organischer Säuren (nmol l<sup>-1</sup>) der unbehandelten Kontrollen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Ebenfalls in dieser Tabelle genannt sind die absoluten Werte der den Versuchsröhren zugefügten organischen Säuren (µg 200 g<sup>-1</sup> Sand; nmol l<sup>-1</sup>), sowie die Gehalte und Konzentrationen in den Lösungen nach der Inkubation. Die tatsächliche Wiederfindung der einzelnen organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen (GL, AuL, EP) ist in Prozent (%) aufgeführt.

Tabelle 19: In den Lösungen GL, AuL und EP der Versuchsröhren analysierter Gehalt [µg 200 g<sup>-1</sup> Sand] und die Konzentration [nmol l<sup>-1</sup>] der organischen Säuren mit und ohne Zugabe organischer Säuren pro Röhre vor und nach der Inkubation sowie der prozentuale Anteil der Wiederfindung [%] in den Lösungen nach einer Woche Inkubation.

Organische Säure	Ohne Zugabe nach Inkubation		Zugabe		Mit Zugabe nach Inkubation		Wiederfindung [%]
	[µg]	[nmol l <sup>-1</sup> ]	[µg]	[nmol l <sup>-1</sup> ]	[µg]	[nmol l <sup>-1</sup> ]	
<b>Citrat</b>	26	124	4240	20000	41	200	1,0
<b>Fumarat</b>	0,01	0,09	24	200	1	8	4,0
<b>Malat</b>	13	96	2800	21000	32	231	1,1
<b>Succinat</b>	13	130	2400	24000	252	2520	10,5

Die in die Versuchsröhren eingebrachten organischen Säuren werden stark an den Sand und das Goethit gebunden (Tabelle 19). Dabei fällt die Sorption der verschiedenen Säuren unterschiedlich stark aus. Lediglich 1 % des zugefügten Citrats und Malats ist nach einer Woche noch gelöst bzw. wasserlöslich. Ein Anteil von 4 % des Fumarats und 11 % des Succinats sind analysierbar.

Außerdem ist festzustellen, dass eine weitere organische Säure, die nicht hinzugefügt worden und auch nicht in Tabelle 19 aufgeführt ist, sowohl in den Lösungen der sterilen Kontrollen als auch in den Lösungen der Versuchsröhren vorkommt. Dabei handelt es sich um Formiat. Formiat wurde in beiden Fällen mit  $900 \text{ nmol l}^{-1}$  bestimmt. Das Formiat muss folglich in dem Ausgangsmaterial Sand vorhanden gewesen sein und ist in den Versuch mit eingebracht worden.

Die beiden organischen Säuren Citrat und Malat, die nach JONES (1998) vermehrt bei Phosphatmangel von Pflanzen ausgeschieden werden, sind in besonders hohem Maße (99 %) an das Substrat gebunden. Weniger stark sorbiert wurden anteilmäßig Fumarat und Succinat.

Die Gehalte der Lösungen an organischen Säuren der unbehandelten Kontrollen machen deutlich, dass organische Säuren zu einem gewissen Anteil mit dem Substrat in den Versuch eingebracht worden sind. Es handelt sich dabei um geringe Mengen wasserlöslicher organischer Säuren im nanomolaren Bereich. Die künstlich in das Substrat eingebrachten organischen Säuren sind in der zugefügten Konzentration unterschiedlich effektiv an die unspezifischen Sorptionsplätze im Substrat gebunden worden. Die beiden Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat wurden dabei in geringeren Mengen gebunden als die Tricarbonsäure Citrat und auch als Malat, ebenfalls eine Dicarbonsäure.

### 4.2.2.3 Organische Säuren im Sand

Die gleiche Menge und Zusammensetzung organischer Säuren wie im vorherigen Abschnitt ist vor dem Autoklavieren vier sterilen Röhren zugefügt worden, um zu untersuchen, inwiefern die organischen Säuren den Prozess des Autoklavierens überdauern können. Die Röhren wurden für einen Tag in der Klimakammer inkubiert und die Proben am folgenden Tag genommen. Als Kontrolle dienten die sterilen Röhren aus Abschnitt 4.2.2.2, die das gleiche Substrat erhalten haben.

Auch in diesem Versuch sind die Lösungen zur Überprüfung der Sterilität auf Vollnährmedium ausplattiert und über zwei Wochen im Brutschrank inkubiert worden. Die Lösungen sind steril geblieben, ein mikrobieller Abbau organischer Säuren während der Inkubationszeit kann ausgeschlossen werden.

Die pH-Werte der Lösungen bei Zugabe der organischen Säuren vor dem Autoklavieren sind mit Werten von 4,5 bis 4,9 wie in Abschnitt 4.2.2.2 um 0,3 bis 0,5 pH-Einheiten niedriger als die der unbehandelten Kontrollen. Die Gehalte an Phosphor in den abgezogenen wässrigen Lösungen betragen in den Röhren, denen organische Säuren zugefügt wurden, 60 ng P ml<sup>-1</sup> (GL) bis 140 ng P ml<sup>-1</sup> (AuL, EP) und sind im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (18 bis 22 ng P ml<sup>-1</sup>) auch in diesem Fall um das Drei- bis Siebenfache erhöht. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.2.2 ist festzustellen, dass unabhängig davon, ob organische Säuren vor oder nach dem Autoklavieren dem Substrat zugefügt worden sind, es zu einer Erhöhung der Phosphorgehalte der abgezogenen wässrigen Lösungen gekommen ist.

Aus dem Versuch wird deutlich, dass die verschiedenen organischen Säuren nach dem Prozess des Autoklavierens im Substrat in unterschiedlichen Anteilen wiederzufinden sind (Tabelle 20). Der Prozess des Autoklavierens hat bei drei der vier eingesetzten organischen Säuren kaum einen Einfluss auf den Gehalt wasserlöslicher organischer Säuren im Substrat.

Tabelle 20: Gehalte der Röhren an zugegebenen organischen Säuren [nmol l<sup>-1</sup>] in den abgezogenen Lösungen vor und nach der Inkubation, sowie der prozentuale Anteil der Wiederfindung [%].

Organische Säure	Zugabe	Nach Inkubation	Wiederfindung
	[nmol l <sup>-1</sup> ]		[%]
<b>Citrat</b>	20000	140	0,7
<b>Fumarat</b>	200	0,4	0,2
<b>Malat</b>	21000	273	1,3
<b>Succinat</b>	24000	1920	8,0

Während auch hier wie bei der Inkubation des Substrates mit organischen Säuren nach dem Autoklavieren Citrat und Malat zu ca. 1 % der zugesetzten Menge wiederzufinden sind, sind bei Succinat noch 8 % statt 11 % wie im Versuch Abschnitt 4.2.2.2 analysierbar (Tabelle 20). Der Anteil des nach dem Autoklavieren wiedergefunden Fumarats beträgt lediglich 0,2 % der eingebrachten Konzentration und ist damit sehr viel niedriger als in dem Inkubationsversuch von Abschnitt 4.2.2.2. Unabhängig davon, ob die Inkubation einen Tag oder eine Woche dauerte und ob die organischen Säuren vor oder nach dem Autoklavieren zugefügt worden sind, ist es zu einer schnellen Sorption organischer Säuren an das Substrat gekommen.

Auch in diesem Versuch wurde in den abgezogenen Lösungen der Röhren Formiat in einer Konzentration von  $900 \text{ nmol l}^{-1}$  gefunden.

Die beiden Versuche Abschnitt 4.2.2.2 und 4.2.2.3 verdeutlichen, dass in dem goethithaltigen Substrat eine säurespezifisch unterschiedlich hohe Sorptionskapazität für organische Säuren besteht. Dieses gilt sowohl für eine längere Inkubation unter sterilen Bedingungen als auch für den Prozeß des Autoklavierens. Wie die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollröhren zeigten, werden wasserlösliche organische Säuren mit dem Substrat in die Versuche in nanomolaren Konzentrationen eingebracht. Zumindest eine dieser eingebrachten organischen Säuren, Formiat, läßt sich als konstanter Faktor in eine mögliche Bilanzierung einbeziehen. Trotzdem ist eine Berechnung der durch die Exsudation der eingebrachten Organismen zusätzlich in das Substrat gelangter organischer Säuren anhand der Resultate aus den Lösungen des Kultursystems nur bedingt möglich, da weitere unspezifische Sorptionsplätze im verwendeten Substrat vorhanden sind.

## **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.2**

Die Versuchsröhren bieten ein sicheres System zur monaxenischen Kultur von Pflanzen über einen Zeitraum von bis zu acht Wochen in festem Substrat. Eine störungsarme Probenahme der von den Organismen abgegebenen wasserlöslichen Substanzen ist möglich.

In dem Kultursystem besteht eine hohe Sorptionskapazität von Phosphat an die Bausteine der Röhren. Nur etwa zwei Drittel des eingebrachten Phosphates sind pflanzenverfügbar.

Eine Zugabe von organischen Säuren zum Substrat führt zu einer Ansäuerung der Gleichgewichtslösung (GL), der Austauschlösung (AuL) und der Exsudatprobe (EP). Zudem befindet sich die drei- bis siebenfache Konzentration an Phosphor im Vergleich zur unbehandelten sterilen Kontrolle in den Lösungen. Es ist demnach davon auszugehen, dass das Phosphat durch die organischen Säuren von den Sorptionsstellen verdrängt bzw. durch die Ansäuerung gelöst wird.

Die beiden organischen Säuren Citrat und Malat, die nach JONES (1998) vermehrt bei Phosphatmangel von Pflanzen ausgeschieden werden, werden in besonders hohem Maße an das Substrat gebunden. Weniger stark sorbiert werden anteilmäßig Fumarat und Succinat. Eine weitere organische Säure, die nicht hinzugefügt worden ist, kommt sowohl in den Lösungen der unbehandelten sterilen Kontrollen als auch in den Lösungen der mit organischen Säuren inkubierten Versuchsröhren vor. Es handelt sich dabei um Formiat. Diese Ergebnisse sind unabhängig davon, ob die organischen Säuren vor dem Autoklavieren dem Substrat zugefügt worden sind oder aber nach dem Autoklavieren im Substrat inkubiert wurden.

Trotz der guten Voraussetzungen im System für eine sterile Anzucht und Probenahme ist eine vollständige Bilanzierung von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem aufgrund der hohen Sorptionsfähigkeit des Sandes und des Goethits nur schwer möglich.

### **Schlussfolgerungen zu der Entwicklung eines Systems zur sterilen Pflanzenanzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen**

Die für diese Arbeit entwickelte Apparatur erfüllt die Aufgaben der sterilen Pflanzenanzucht sowie der sterilen und störungsarmen Probenahme wasserlöslicher Substanzen unter definierten Bedingungen. Damit sind die angestrebten Ziele mit diesem Kultursystem zur monaxenischen Kultur von Tomatenkeimlingen weitestgehend erreicht.

Im einzelnen ist sowohl eine sterile Kultur der Pflanzen über einen Zeitraum von mehreren Wochen möglich, als auch eine gute Durchwurzelbarkeit des Substrates für ein uneingeschränktes Wurzelwachstum gewährleistet. Die Röhren haben ein geringes Volumen, so dass bei ausgeprägtem Wurzelwachstum das gesamte Substrat als wurzelnahe Substrat betrachtet werden kann. Eine Belüftung dient der Vermeidung anoxischer Zustände im System. Schließlich ist aufgrund des Röhrenaufbaus eine verletzungsarme Gewinnung der Lösungen aus dem Wurzelbereich gegeben.

Durch die spezifischen Bedingungen in der Klimakammer bzw. dem Klimaschrank sind lichtbedingte Schwankungen in der Wurzelexsudation in diesem System auszuschließen. Hierbei handelt es sich um einen Vorteil des Kultursystems im Vergleich zu Kulturen im Gewächshaus, da diese den jahreszeitlichen Schwankungen ausgesetzt sind. Ein Einfluss auf die Exsudation wasserlöslicher Substanzen von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen durch Veränderungen abiotischer Faktoren ist damit ausgeschlossen.

Bei den in diesem Abschnitt im Kultursystem untersuchten Parametern Phosphat und organische Säuren ist aufgrund der hohen Sorptionsfähigkeit des Sandes und des darin enthaltenen Goethits eine Bilanzierung nicht möglich. Die eingesetzten organischen Säuren führen im Vergleich zu den unbehandelten sterilen Kontrollen zwar zu einer Mobilisierung von Phosphat, eine direkte Berechnung des Verhältnisses sorbierter organischer Säuren zu freigesetztem Phosphat ist jedoch nicht möglich. Dies liegt darin begründet, dass die organischen Säuren in unterschiedlichen Anteilen an das System sorbiert werden und nicht abzusehen ist, welche organische Säure wieviel Phosphat freisetzt.

#### **4.3 Wirkung von schwer löslichem Phosphat auf die Tomatensorte ‚Freude‘ und zwei verschiedene Mikroorganismenisolate in monaxenischer und dualer Kultur**

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren wurde die Tomatensorte ‚Freude‘ als geeignete Versuchspflanze ausgewählt. Unter Gewächshausbedingungen war die Exsudation organischer Säuren bei der Tomatensorte ‚Freude‘ bei Phosphatmangel eindeutig erhöht. Sie ist als Versuchspflanze für die folgenden Versuche geeignet. Es stellte sich zunächst die Frage, wie die Pflanzen in dem eigens dafür entwickelten Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen auf schwer lösliches Phosphat reagieren würden. Eine monaxenische Kultur der Sorte ‚Freude‘ sollte darüber Aufschluss geben.

Auch die beiden Rhizosphärenmikroorganismenisolate *P. fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. sollten jeweils unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem kultiviert werden. Die unter *in vitro* Bedingungen gewonnenen Ergebnisse aus der Flüssigkultur gaben Hinweise auf die möglichen Reaktionen der Mikroorganismen unter optimalen Wachstumsbedingungen in festem Substrat. Im Kultursystem, in dem bis auf Phosphat ausreichend Makro- und Mikronährelemente vorhanden sind, wurde Glucose als Kohlenstoffquelle angeboten. Diese Glucosezugabe sollte ein Wachstum der Mikroorganismen in den Röhren ermöglichen. Die hohen Nährstoffkonzentrationen, wie sie in der Flüssigkultur verwendet worden sind, sollten jedoch vermieden werden.

Die monaxenischen Kulturen der Organismen sollten später eine Bilanzierung der von den einzelnen Organismen abgegebenen organischen Säuren ermöglichen. Nach GERKE (1995) fassen Untersuchungen im nicht sterilen System Boden/Pflanze häufig nur den Summeneffekt von Wurzelausscheidungen und mikrobieller Aktivität zusammen. Deswegen wurden zunächst die Reaktionen der einzelnen Organismen auf das Angebot schwer löslichen Phosphats ermittelt, um zu untersuchen, ob eine Addition der Einzelfaktoren zur entsprechenden Summe führen würde.

In der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit jeweils einem der beiden Mikroorganismenisolate im Kultursystem sollte untersucht werden, ob sich die Reaktionen der einzelnen Organismengruppen auf schwer lösliches Phosphat addieren oder es zu Ergänzungen kommen würde.

### **4.3.1 Reaktion der Organismen auf das Angebot schwer löslichen Phosphats unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem**

#### **4.3.1.1 Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ bei Angebot schwer löslichen Phosphats unter monaxenischen Bedingungen**

Die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ sollte bei Angebot schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats unter monaxenischen Bedingungen überprüft werden. Dazu wurden die Tomatenkeimlinge bis zur Ernte über sieben Wochen im Kultursystem zur sterilen und störungsarmen Probenahme kultiviert.

Je ein Aliquot der abgezogenen Lösungen wurde auf Vollnährmedium ausplattiert, um die Sterilität zu überprüfen. Auch nach zwei Wochen Inkubation kann kein Bewuchs auf dem Vollnährmedium mit Mikroorganismen festgestellt werden, der Inhalt der Röhren aus dem Versuch ist steril geblieben.

Bei Versuchsbeginn waren in die fünf Röhren je drei Keimlinge eingesetzt worden. Davon haben zweimal eine, zweimal zwei und einmal alle Pflanzen überlebt. Die Pflanzen sind im Dreiblattstadium, haben jedoch die Keimblätter und zum Teil auch schon das erste Laubblatt abgeworfen. Die Blätter sind rötlich-lila gefärbt, der Wuchs der Jungpflanzen insgesamt gedrunken. Das Substrat ist stark durchwurzelt. Feine, reich verzweigte Wurzeln mit Wurzelhaaren sind bis zum Grund der Röhren in 22 cm Tiefe zu erkennen. Das Erscheinungsbild läßt aufgrund der aufgezählten Symptome auf einen Phosphatmangel schließen (LYNCH, 1995).

In Abschnitt 4.1.1.3 konnten unter Gewächshausbedingungen bei fast 90 % der Individuen ähnliche Größen und Trockenmassen festgestellt werden. Die Wurzel- und Sprosstrockenmassen lagen dort im Dreiblattstadium in einem Bereich von 10 bis 40 mg Individuum<sup>-1</sup>. Das Wurzel-/Sprossverhältnis betrug 1,0. Es galt zunächst zu klären, ob die monaxenische Kultur im Kultursystem das Wachstum der Pflanzen verändern würde. Da in den Röhren unterschiedlich viele Keimlinge die Versuchszeit überlebt haben, war weiterhin von Interesse, ob z.B. Einzelpflanzen eine höhere Trockenmasse pro Röhre im Vergleich zu mehreren Pflanzen pro Röhre aufweisen.

Die Trockenmasse der Sprosse und Wurzeln (TM) pro Röhre im Dreiblattstadium der Pflanzen ist im Kultursystem im Vergleich zu den Daten aus dem Gewächshausexperiment eindeutig reduziert. Während unter den Bedingungen des Gewächshauses pro Individuum 10 bis 40 mg STM erreicht wurden, beschränken sich die Trockenmassen unter monaxenischen Bedingungen auf 4 bis 7 mg Individuum<sup>-1</sup> (Tabelle 21). Die Sprosstrockenmasse (STM) pro Röhre ist in geringem Maße abhängig von der Anzahl der Jungpflanzen und beträgt im Mittel 4,7 mg STM Pflanze<sup>-1</sup>. Während eine Jungpflanze 4 mg STM hat, akkumulieren zwei Pflanzen 8 bis 11 mg STM und drei Pflanzen 15 mg STM.

Tabelle 21: Anzahl und Trockenmassen der Sprosse und Wurzeln [ $\text{mg Röhre}^{-1}$ ] und [ $\text{mg Pflanze}^{-1}$ ] sowie Wurzel-/Sprossverhältnis der Röhren 1 bis 5.

	<b>Röhre 1</b>	<b>Röhre 2</b>	<b>Röhre 3</b>	<b>Röhre 4</b>	<b>Röhre 5</b>
<b>Anzahl der Pflanzen</b>	2,0	2,0	3,0	1,0	1,0
<b>Spross TM</b> <b>[<math>\text{mg Röhre}^{-1}</math>]</b>	11,0	8,0	15,0	4,0	4,0
<b>[<math>\text{mg Pflanze}^{-1}</math>]</b>	5,5	4,0	5,0	4,0	4,0
<b>Wurzel TM</b> <b>[<math>\text{mg Röhre}^{-1}</math>]</b>	13,0	9,0	12,0	4,0	4,0
<b>[<math>\text{mg Pflanze}^{-1}</math>]</b>	6,5	4,5	4,0	4,0	4,0
<b>W/S-Verhältnis</b>	1,2	1,1	0,8	1,0	1,0

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei den Wurzeltrockenmassen. Hier ist zu beachten, dass bei der Probenahme die besonders feinen Wurzeln der Wurzelsysteme im Substrat verblieben sein können und damit eine zu geringe Trockenmasse ermittelt worden ist. Bestimmt werden Wurzeltrockenmassen zwischen 4 und 13  $\text{mg Röhre}^{-1}$ , entsprechend 4 bis 6,5  $\text{mg Wurzel}$  trockenmasse pro Pflanze. Daraus läßt sich ein Wurzel-/Sprossverhältnis von 0,8 bis 1,2 ableiten (Tabelle 21). Neben den Symptomen des gedrungenen Wuchses und der rötlichen Blätter ist auch das zu Gunsten der Wurzeln erhöhte Wurzel-/Sprossverhältnis ein Anzeichen für Phosphatmangel.

Die Wurzel- und Sprosstrockenmassen pro Individuum fallen bei gleichem Entwicklungsstadium in den Röhren des Kultursystems im Vergleich zu den Gewächshausversuchen deutlich geringer aus. Das Wurzel-/Sprossverhältnis bleibt davon unbeeinflusst. Außerdem ist anzumerken, dass einzelne Pflanzen, die den gleichen Raum wie mehrere Pflanzen zur Verfügung haben, sich in den Röhren nicht stärker entwickeln.

#### 4.3.1.1.1 pH-Wert der Lösungen

Die Nährlösung, die dem Substrat vor Versuchsbeginn zugegeben wurde, war auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. In einem Vorversuch zeigte sich, dass sich dann in dem Substrat ein  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  von 6,0 einstellt. Das sterile deionisierte Wasser, das den Röhren zum Spülen und als Exsudationslösung zugefügt worden ist, hatte einen pH-Wert von 5,2.

Die erste abgezogene Lösung, GL, weist einen mittleren pH-Wert von 5,3 auf und liegt damit um 0,3 Einheiten oberhalb des pH-Wertes der Gleichgewichtslösung, der sterilen Kontrollen ohne Pflanzen (Abschnitt 4.2.2.2). Im Vergleich zum Versuchsanfang ist der pH-Wert demzufolge um 0,7 pH-Einheiten gesenkt worden. Nach Zugabe von 20 ml deionisiertem Wasser liegt der pH-Wert der Lösung AuL bei 5,1. Die erneute Zugabe von

20 ml deionisiertem Wasser und die Inkubationszeit von einer Stunde haben einen Anstieg des pH-Wertes der Lösung EP auf 5,4 zur Folge. Demnach stellt sich innerhalb einer Stunde der ursprünglich in der Gleichgewichtslösung (GL) gemessene pH-Wert im Kultursystem ein.

#### **4.3.1.1.2 Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen**

Die Phosphorgehalte der Sprosse variieren in einem Bereich von 1,8 bis 3,4 mg P g STM<sup>-1</sup> mit einem mittleren Gehalt von 2,6 mg P g STM<sup>-1</sup>. Der mittlere Phosphorgehalt der Wurzeln beträgt 1,6 mg P g WTM<sup>-1</sup>, wobei die Werte zwischen 1,2 und 2,2 mg P g WTM<sup>-1</sup> schwanken.

Die vier Baubestandteile der Röhren (Sand, Glasperlen, Steinwolle und Filterpapier) werden bei Versuchsende auf ihren Phosphorgehalt untersucht. Der größte Anteil des pflanzenverfügbaren DL-löslichen Phosphors ist an den Sand sorbiert. Werden die Phosphorgehalte der Baubestandteile summiert, so variieren sie in den fünf Parallelen im Bereich von 0,14 bis 0,20 mg P Röhre<sup>-1</sup>. Das entspricht einem Anteil von 2,0 bis 2,6 % des bei Versuchsbeginn bestimmbar DL-löslichen Phosphors (7,4 mg P 200 g<sup>-1</sup> Sand).

Den fünf Röhren sind durchschnittlich insgesamt 53 ml Lösung entnommen worden. Der Phosphorgehalt in den abgezogenen wässrigen Lösungen (Abschnitt 3.5.1) wird mit 32,8 ng P ml<sup>-1</sup>, entsprechend 174 µg P Röhre<sup>-1</sup>, ermittelt. In den unbehandelten Kontrollen waren dagegen 19,0 ng P ml<sup>-1</sup> Phosphor in den Lösungen enthalten (Abschnitt 4.2.2.2). In Anwesenheit der Pflanzen kommt es zu einer leichten Erhöhung der Phosphorkonzentration.

#### **4.3.1.1.3 Organische Säuren in den Lösungen**

In den Lösungen der unbehandelten Kontrollen ohne Pflanzen konnten fünf verschiedene organische Säuren analysiert werden. In diesem Versuch werden in den drei Lösungen lediglich zwei verschiedene organische Säuren gefunden: Formiat und Fumarat. Die übrigen drei in den Lösungen der unbehandelten Kontrollen ohne Pflanzen analysierten organischen Säuren Citrat, Malat und Succinat sind nicht nachzuweisen (Tabelle 22).

Unabhängig davon, ob Pflanzen in dem Substrat gewachsen sind oder nicht, können in den drei abgezogenen Lösungen in beiden Varianten insgesamt 900 nmol l<sup>-1</sup> Formiat je Röhre gemessen werden (Tabelle 22). Der Gehalt an dieser organischen Säure in den Lösungen verändert sich nicht durch die Gegenwart der Tomatenpflanzen. Es ist deswegen davon auszugehen, dass das Formiat mit dem Substrat in den Versuch eingeführt wurde. Es wurde auch nicht von den Tomatenpflanzen aufgenommen.

Tabelle 22: Vergleich der Gehalte an organischen Säuren [ $\text{nmol l}^{-1}$ ] in den Lösungen (GL + AuL + EP) bei monaxenischer Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ ( $\Sigma$  Pflanzen) mit dem Gehalt der sterilen Kontrollen ohne Pflanzen ( $\Sigma$  Kontrolle). Mittelwerte von fünf (+ Pflanzen) bzw. vier (ohne Pflanzen) Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler. (n.d. = nicht in detektierbaren Mengen vorhanden).

Organische Säure	$\Sigma$ Pflanzen		$\Sigma$ Kontrolle	
	[ $\text{nmol l}^{-1}$ ]			
<b>Citrat</b>	n.d.		124	$\pm 8$
<b>Formiat</b>	900	$\pm 105$	900	$\pm 270$
<b>Fumarat</b>	0,27	$\pm 0,027$	0,09	$\pm 0,009$
<b>Malat</b>	n.d.		96	$\pm 45$
<b>Succinat</b>	n.d.		130	$\pm 130$

Der Gehalt an Fumarat ist in der Variante mit Pflanzen im Vergleich zu den Röhren ohne Pflanzen dagegen um das Dreifache erhöht (Tabelle 22). Diese organische Säure ist demnach von den Wurzeln ausgeschieden worden. Die übrigen drei organischen Säuren Citrat, Malat und Succinat sind im Vergleich zu den Lösungen aus den sterilen Kontrollen nicht mehr nachweisbar. Sie werden entweder von den Wurzeln aufgenommen, oder an diese oder das Substrat sorbiert worden sein.

Zum direkten Vergleich der Exsudation der Pflanzenwurzeln dieses Versuches mit den Ergebnissen der Tomatensorte ‚Freude‘ im Gewächshaus unter nicht sterilen Bedingungen müssen die Werte der Lösung EP aus dem Kultursystem herangezogen werden, die sich auf die Exsudationsdauer von einer Stunde beziehen. Unter nicht sterilen Bedingungen sind sechs verschiedene organische Säuren in den Exsudaten gefunden worden (Citrat, Fumarat, Malat, Maleinat, Oxalat und Succinat). Unter monaxenischen Bedingungen ist während einer Stunde Inkubation nur in der Exsudatprobe in einer der fünf Röhren Formiat und Fumarat analysiert worden. Sofern andere organische Säuren von diesen Pflanzen in das Substrat abgegeben worden sind, liegt deren Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. Der Gehalt an organischen Säuren in der Exsudatprobe der übrigen vier Röhren lag ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze.

Dadurch ergibt sich lediglich bei einer der organischen Säuren eine direkte Vergleichsmöglichkeit der Exsudationsrate. Während im Gewächshaus unter Phosphatmangel durchschnittlich  $0,39 \pm 0,14 \mu\text{mol Fumarat (g WTM h)}^{-1}$  bestimmt wurden, sind unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem in der Exsudatprobe ein Drittel dessen in nur einer Röhre nachgewiesen worden ( $0,13 \mu\text{mol Fumarat (g WTM h)}^{-1}$ ). Da das Formiat aus dem Sand stammt und nicht durch die Tomatensorte ‚Freude‘ eingebracht worden ist, kann allein die Exsudation von Fumarat zur Bemessung der Gesamtexsudation herangezogen werden. Folglich beschränkt sich die Gesamtexsudation der Tomatenpflanzen in dieser einen Röhre auf  $0,13 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ .

Demzufolge sind bei monaxenischem Wachstum der Tomatensorte ‚Freude‘ sowohl quantitativ als auch qualitativ weniger organische Säuren in den Lösungen nachzuweisen als in denen der sterilen Kontrollen ohne Pflanzen und auch deutlich weniger als in den Abstauchlösungen des Gewächshausversuches.

#### **4.3.1.2 Monaxenische Kultur von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 im Kultursystem bei Angebot schwer löslichen Phosphats**

Es galt zu untersuchen, ob Bakterien in monaxenischer Sandkultur in den Versuchsröhren anders auf schwer lösliches Phosphat reagieren, als in Flüssigkultur. Vier der Versuchsröhren des Kultursystems wurden mit *P. fluorescens* Pf-5 und ohne Pflanzen für 7 Tage inkubiert. Vier weitere Kulturröhren dienten als sterile Kontrollen. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose beiden Varianten zugesetzt.

Bei den Lösungen der unbehandelten Kontrollen ist auch 14 Tage nach dem Ausplattieren kein Bewuchs festzustellen, die Kontrollen gelten als steril. Von den ursprünglich mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten  $\log 8,3 \text{ cfu ml}^{-1}$  sind nach acht Tagen Inkubation noch  $\log 6,3 \text{ cfu ml}^{-1}$  in der Exsudatprobe, bis  $\log 7,1 \text{ cfu ml}^{-1}$  in der Austauschlösung vorhanden. Demnach hat die cfu nicht wie in der Schüttelkultur zugenommen, sondern in den Röhren im Versuchsverlauf abgenommen. Andere Mikroorganismen als den eingebrachten *P. fluorescens* Pf-5 können in den Lösungen GL, AuL und EP nicht ermittelt werden, der Versuch ist daher als monaxenisch zu bezeichnen.

##### **4.3.1.2.1 pH-Wert der Lösungen**

Die pH-Werte der abgezogenen Lösungen der unbehandelten Kontrollen unterscheiden sich nicht von denen der inokulierten Röhren. Die pH-Werte der Lösungen liegen in beiden Fällen zwischen 4,9 (AuL) und 5,3 (GL und EP). Ein Einfluss von *P. fluorescens* Pf-5 auf den pH-Wert der abgezogenen Lösung kann demnach im Gegensatz zu den Daten der Flüssigkultur nicht festgestellt werden, es kommt zu keiner nachhaltigen Ansäuerung. Dies mag in der niedrigeren cfu in den Röhren im Vergleich zur Schüttelkultur begründet sein.

##### **4.3.1.2.2 Phosphorgehalt der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen**

Der Phosphorgehalt des mit Goethit angereicherten Sandes wurde vor Versuchsbeginn mit  $8,48 \text{ mg P } 200 \text{ g}^{-1}$  Sand ermittelt. Bei Versuchsende wird der DL-lösliche Phosphor mit  $0,26 \text{ bis } 0,28 \text{ } \mu\text{g P Röhre}^{-1}$  bestimmt, entsprechend 3,1 % des eingesetzten Phosphors. Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Phosphorgehalt der Baubestandteile der Röhren zwischen den sterilen Kontrollröhren und den mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten Röhren.

Der Phosphorgehalt aller abgezogenen Lösungen sowohl in den inokulierten Röhren als auch in den nicht inokulierten Kontrollen schwankt zwischen  $34 \text{ und } 46 \text{ ng P ml}^{-1}$ . Durch die Gegenwart von *P. fluorescens* Pf-5 wird daher weder die DL-lösliche Phosphorkonzentration des Substrates noch die Phosphorkonzentration der wässrigen Lösungen verändert.

#### 4.3.1.2.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Während die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Lösungen GL und AuL zwischen 0,27 und 0,38 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup> liegt, kann in der Exsudatprobe nur noch ein Sechstel davon gemessen werden (0,06 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>). Insgesamt ist im Vergleich zur Flüssigkultur nur eine sehr geringe Aktivität der alkalischen Phosphatase festzustellen.

#### 4.3.1.2.4 Exsudation organischer Säuren

In den Lösungen GL, AuL und EP können sowohl in den sterilen Kontrollen als auch in den monaxenischen mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten Röhren drei verschiedene organische Säuren analysiert werden. Es handelt sich um Citrat, Formiat und Malat. Die Gehalte an Fumarat und Succinat lagen in diesem Versuch sowohl in den sterilen Kontrollen als auch in den inokulierten Röhren unterhalb der Nachweisgrenze. In der mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten Variante sind die Gehalte organischer Säuren in den abgezogenen Lösungen niedriger als in den sterilen Kontrollen. In Abbildung 7 sind die Werte der organischen Säuren in nmol l<sup>-1</sup> der abgezogenen Lösungen GL und EP beider Varianten gegenübergestellt.

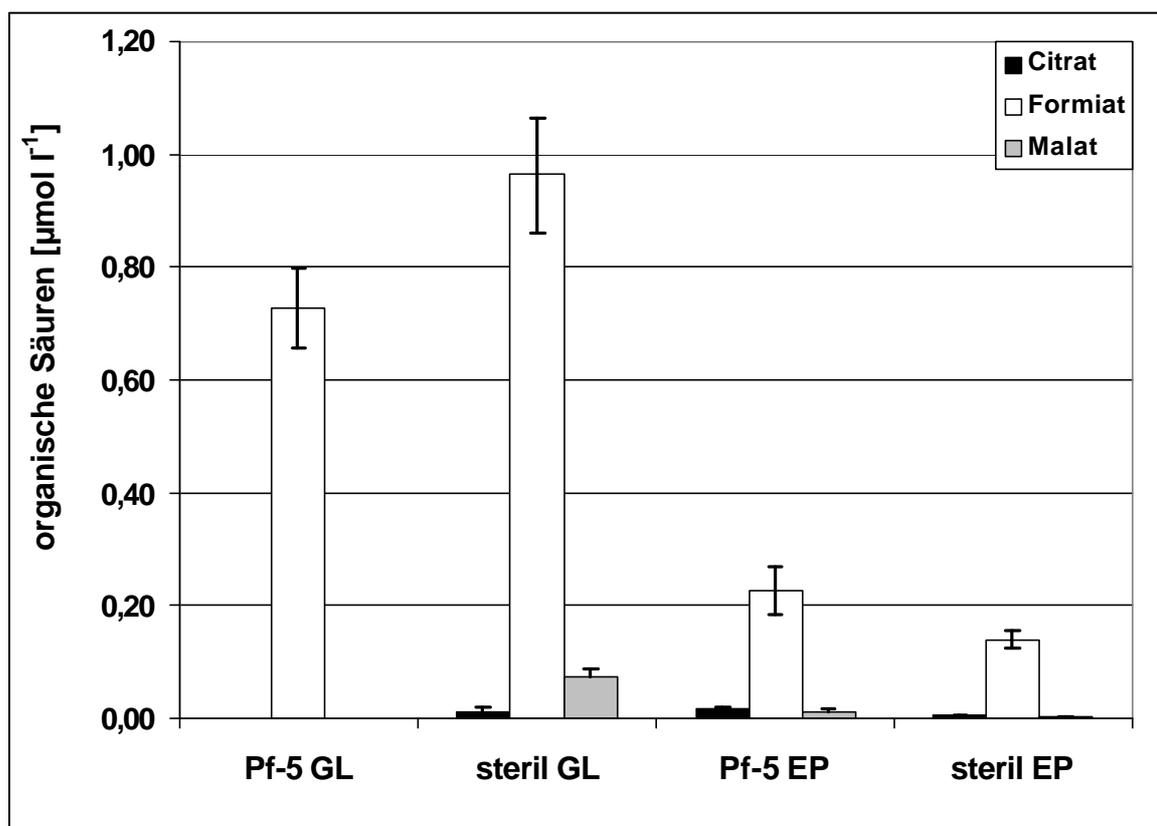


Abbildung 7: Gehalte der organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen GL und EP [µmol l<sup>-1</sup>] in den mit *Pseudomonas fluorescens* (Pf-5) inokulierten Röhren und den unbehandelten Kontrollen (steril). Mittelwerte von vier Wiederholungen ± Standardfehler.

Während die sterilen Kontrollen in der Lösung GL geringe Mengen an Citrat und Malat aufweisen, liegt der Gehalt dieser beiden organischen Säuren in der Variante mit *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 unterhalb der Nachweisgrenze. Lediglich Formiat ist festzustellen. Diese organische Säure stammt aus dem Sand. Citrat und Malat wurden demnach in Anwesenheit von *P. fluorescens* Pf-5 metabolisiert oder sorbiert.

In der Lösung EP sind alle drei organischen Säuren sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in der Variante mit *P. fluorescens* Pf-5 in gleichen Konzentrationen zu finden. Sie werden vermutlich durch die Zugabe des deionisierten Wassers vom Substrat gelöst (GERKE, 1995). Im Vergleich zur abgezogenen Lösung GL wird der Formiatgehalt in der Lösung EP aus den mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten Röhren auf ein Drittel, bei der Kontrolle auf unter ein Sechstel der Ausgangskonzentration reduziert.

Im Gegensatz zur Flüssigkultur, in der *P. fluorescens* Pf-5 große Mengen Citrat ausgeschieden hat und dieses auch in der Variante mit dem starken Sorbens Goethit detektierbar war, konnte dieses Ergebnis in den mit goethithaltigem Sand gefüllten Röhren des Kultursystems nicht wiederholt werden. Die Phosphorkonzentration der abgezogenen Lösung der inokulierten Röhren war im Vergleich zu den Kontrollen kaum erhöht. Das mag zum einen an einer zu geringen Konzentration organischer Säure gelegen haben, zum anderen könnte freigesetztes Phosphat von den Zellen aufgenommen worden sein.

Die geringe Säureproduktion kann an der geringeren Zelldichte von *P. fluorescens* Pf-5 in diesem Versuch im Vergleich zur Flüssigkultur gelegen haben. Während in der Flüssigkultur cfu von  $\log 8 \text{ cfu ml}^{-1}$  auftraten, konnten im Kultursystem zur sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen nach acht Tagen lediglich  $\log 6 \text{ cfu ml}^{-1}$  festgestellt werden. Demnach scheint eine hohe Zelldichte von *P. fluorescens* Pf-5 und eine große Substratmenge notwendig zu sein, um große Mengen an organischen Säuren produzieren zu können.

#### 4.3.1.3 Monaxenische Kultur von *Gordonia* sp. im Kultursystem bei Angebot schwer löslichen Phosphats

Die Versuchsröhren wurden mit dem Actinomyceten *Gordonia* sp. inokuliert, um zu untersuchen, wie *Gordonia* sp. in festem Substrat auf schwer lösliches Phosphat reagiert. Als Kohlenstoffquelle wurde eine 0,1 %ige Glucose-Lösung zugegeben. Nach sieben Tagen wurden die Versuchsröhren beprobt. Sollte *Gordonia* sp. in dem festen Substrat so reagieren wie in der Flüssigkultur, wäre ein erhöhter pH-Wert der abgezogenen Lösungen im Vergleich zu dem der unbehandelten Kontrollen zu erwarten. Außerdem sollten die Lösungen nur geringe Mengen an organischen Säuren enthalten.

Der Sterilitätstest ergibt, dass auch 14 Tage nach dem Ausplattieren keine anderen Kolonien als die von *Gordonia* sp. auf dem Vollnährmedium gewachsen sind. Demnach ist die Kultur monaxenisch geblieben. Die Versuchsröhren sind mit einer cfu von  $\log 5,3 \text{ cfu ml}^{-1}$  beimpft worden. In der abgezogenen Gleichgewichtslösung (GL) sind in keiner der fünf Röhren lebensfähige *Gordonia* sp. Zellen entdeckt worden. Die Zelldichte in den Lösungen AuL und EP variiert zwischen den fünf Röhren im Bereich von  $\log 3,0 \text{ cfu ml}^{-1}$  bis  $\log 5,5 \text{ cfu ml}^{-1}$ . In der am stärksten besiedelten Röhre ist die ursprüngliche Inokulationsdichte erhalten geblieben, während in den anderen Röhren die Zelldichte abgenommen hat. Die cfu der Lösungen AuL und EP innerhalb einer Röhre unterscheiden sich nur wenig (max.  $\log 0,9 \text{ cfu}$ ), was auf eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen in den Röhren hinweist.

##### 4.3.1.3.1 pH-Wert der Lösungen

Im Vergleich zu den sterilen Kontrollen ist der pH-Wert der abgezogenen Lösungen der mit *Gordonia* sp. inokulierten Röhren erhöht (Tabelle 23). Durchschnittlich liegen die pH-Werte der abgezogenen Lösungen der mit *Gordonia* sp. inokulierten Röhren zwischen 5,7 und 6,0 (Tabelle 23) und damit um 0,6 (Lösung AuL) bis 0,9 (Lösung GL) pH-Einheiten höher als in den sterilen Kontrollen (Abschnitt 4.2.2.2).

Tabelle 23: pH-Werte in den Lösungen GL, AuL, & EP von monaxenischen Röhren (*Gordonia* sp.) und sterilen Kontrollen. Mittelwerte von vier Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	<i>Gordonia</i> sp.		Kontrolle	
	pH-Wert			
<b>Lösung GL</b>	5,92	$\pm 0,38$	5,00	$\pm 0,04$
<b>Lösung AuL</b>	5,67	$\pm 0,26$	5,07	$\pm 0,01$
<b>Lösung EP</b>	6,01	$\pm 0,25$	5,22	$\pm 0,00$

Mit dieser leichten Erhöhung des pH-Wertes in den Lösungen im Vergleich zu den Kontrollen bestätigen sich die Daten aus der Flüssigkultur von *Gordonia* sp. Der Actinomycet *Gordonia* sp. hat demnach eine Erhöhung des pH-Wertes in den Lösungen der Flüssigkultur und in denen aus dem Kultursystem bewirkt.

#### 4.3.1.3.2 Phosphorgehalte der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen

Bei Versuchsbeginn ist der DL-lösliche Phosphorgehalt des mit Goethit gemischten Sandes mit  $7,30 \text{ mg P } 200 \text{ g}^{-1}$  Sand bestimmt worden. Die Baubestandteile der Röhren, Sand, Glasperlen, Filterpapier und Steinwolle, werden ebenfalls bei Versuchsende auf den Gehalt an DL-löslichem Phosphor untersucht. Durchschnittlich 85 % des an die Versuchsausrüstung gebundenen Phosphors sind an den Sand sorbiert, 6 % an die Glasperlen. Weitere 5 % sind an das Filterpapier (Vergleich Abschnitt 4.2.2.1: 0,5 %) und 4 % an die Steinwolle (Vergleich Abschnitt 4.2.2.1: 0,6 %) gebunden. Diese im Vergleich zu Abschnitt 4.2.2.1 niedrigeren prozentualen Phosphorgehalte des Sandes und die erhöhten Phosphorgehalte des Filterpapiers und der Steinwolle sind auf die Verlagerung des Goethits aus dem Sand in den Bereich des Filterpapiers und der Steinwolle zurückzuführen. Durch die Anwesenheit der Mikroorganismen und einer damit verbundenen Produktion von biologischen Komponenten, wie z.B. Schleimstoffen, kann es in den Versuchsröhren zu einer Verlagerung des Goethits gekommen sein. Neben der Produktion von Schleimstoffen ist eine weitere Erklärung der Verlagerung durch die Erhöhung des pH-Wertes durch *Gordonia* sp. gegeben. Trotzdem Goethit zu den sehr schwer löslichen Eisenoxiden gezählt wird, steigt die Löslichkeit mit zunehmendem pH-Wert an (BAR-YOSEF, 1991, SCHACHTSCHABEL et al., 1989).

Der DL-lösliche Phosphorgesamtgehalt bei Versuchsende variiert zwischen  $0,14$  und  $0,20 \text{ mg P Röhre}^{-1}$ , was einer Wiederfindung von 2,2 % des eingesetzten Phosphors ( $7,30 \text{ mg P } (200 \text{ g Sand})^{-1}$ ) entspricht. Der mittlere Gehalt beträgt  $0,16 \text{ mg P Röhre}^{-1}$  (Standardfehler  $\pm 0,0008$ ).

Der mittlere Phosphorgehalt der abgezogenen wässrigen Lösungen beträgt zwischen  $40$  (Lösung AuL und EP) und  $66 \text{ ng P ml}^{-1}$ . Demzufolge liegt der Phosphorgehalt in einem ähnlichen Bereich wie am Tag 9 in der goethithaltigen Lösung des Abschnitts 4.1.2 in Flüssigkultur ( $40 \text{ ng P ml}^{-1}$ ). Die Konzentrationen sind um das Zwei- bis Dreifache höher als in den unbehandelten sterilen Kontrollen ( $16$  bis  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$ , Abschnitt 4.2.2.2) und sind diesen in Abbildung 8 gegenübergestellt.

Die Anwesenheit von *Gordonia* sp. in monaxenischer Kultur führt daher im Vergleich zu den Kontrollen zu einer erhöhten Löslichkeit von Phosphat in den Lösungen GL, AuL und EP bzw. zu ähnlichen Konzentrationen wie in der Schüttelkultur unter Verwendung des an Goethit sorbierten, schwer löslichen Phosphats.

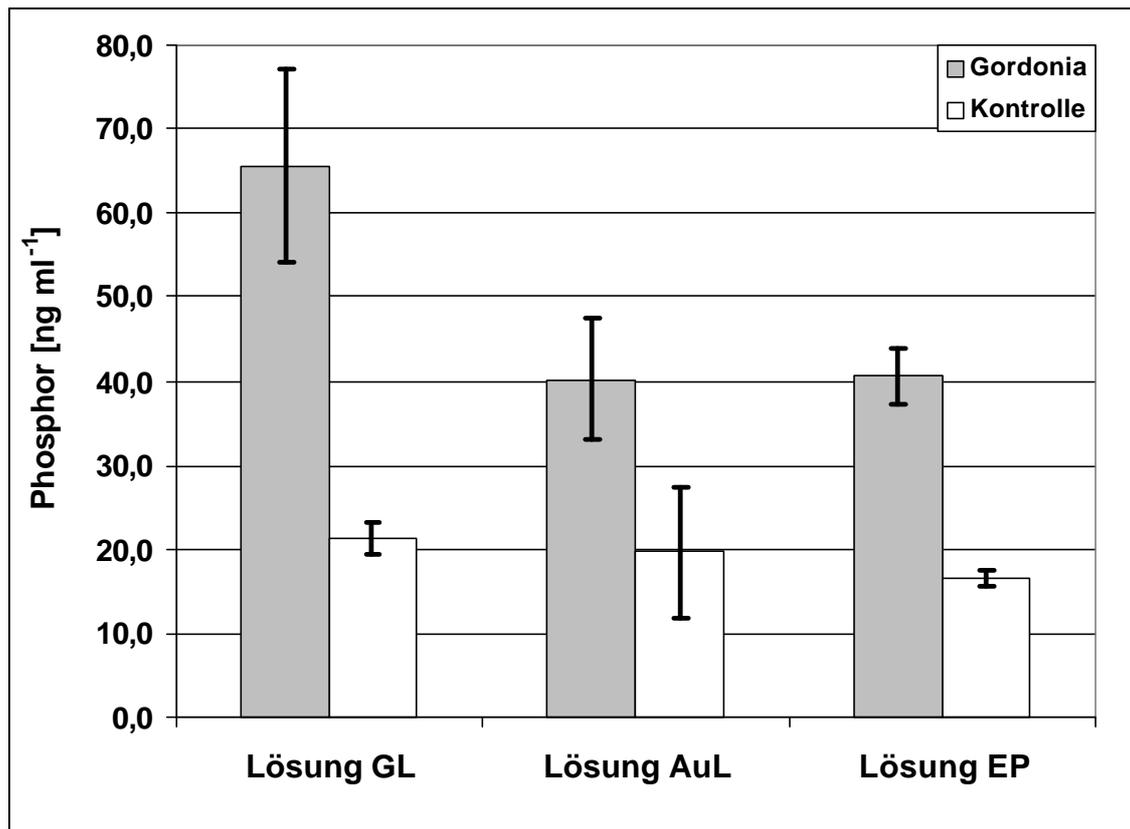


Abbildung 8: Phosphorgehalt der Lösungen GL, AuL und EP [ng P ml<sup>-1</sup>] der mit *Gordonia* sp. inokulierten Röhren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mittelwerte von vier Wiederholungen ± Standardfehler.

#### 4.3.1.3.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Eine Aktivität der alkalischen Phosphatase von *Gordonia* sp. ist nur in den abgezogenen Lösungen bei drei von fünf Röhren messbar. Dabei kommt es zu Schwankungen von 0,01 bis 0,42 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>. Obwohl die Phosphorgehalte der Lösungen (40 ng P ml<sup>-1</sup>) denen in der Flüssigkultur ähneln, können im Fall der monaxenischen Kultur in den Röhren keine erhöhten Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase von *Gordonia* sp. festgestellt werden. Während in der Flüssigkultur am Tag 6, bei vergleichbaren Phosphorgehalten der Lösungen, bis zu 62 ng MU (log cfu\*h)<sup>-1</sup> umgesetzt worden sind, beträgt die Aktivität der alkalischen Phosphatase von *Gordonia* sp. in der monaxenischen Kultur nicht einmal ein Hundertstel davon. Das mag mit der geringeren cfu von log 3,0 bis log 5,5 cfu ml<sup>-1</sup> in dem sandigen Substrat des Kultursystems im Vergleich zu log 8 cfu ml<sup>-1</sup> in der Flüssigkultur zusammenhängen.

#### 4.3.1.3.4 Exsudation organischer Säuren

In der Flüssigkultur von *Gordonia* sp. konnten in veränderlichen Anteilen fünf verschiedene organische Säuren in den Lösungen mit schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat analysiert werden: Citrat, Formiat, Lactat, Malat und Succinat. In den Lösungen GL, AuL und EP dieses Versuches sind lediglich drei verschiedene organische Säuren nachweisbar. Hier handelt es sich in der Gleichgewichtslösung (GL) um Citrat und Formiat, in der Austauschlösung (AuL) um Formiat und Fumarat. Fumarat tritt in den Lösungen der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp. im festen Substrat neu als organische Säure auf. Dagegen sind Lactat, Malat und Succinat, die in der Flüssigkultur einen erheblichen Teil ausgemacht haben, nicht zu finden. In der Exsudatprobe (EP) können keine organischen Säuren nachgewiesen werden. Die Summen der einzelnen organischen Säuren aus den abgezogenen Lösungen (GL + AuL + EP) sind in Tabelle 24 im Vergleich zu denen der sterilen Kontrollröhren aus Abschnitt 4.2.2.2 aufgeführt.

Tabelle 24: Summen der organischen Säuren in den Lösungen (GL + AuL + EP) [nmol l<sup>-1</sup>] bei monaxenischer Kultur von *Gordonia* sp. [*Gordonia* sp.] und in den unbehandelten Kontrollen [Kontrolle] (Versuch 4.2.2.2). Mittelwerte von vier Wiederholungen ± Standardfehler. (n.d. = nicht detektierbar).

Organische Säure	S der organischen Säuren in den Lösungen [nmol l <sup>-1</sup> ]			
	<i>Gordonia</i> sp.		Kontrolle	
<b>Citrat</b>	4	±4	124	±8
<b>Formiat</b>	308	±33	900	±270
<b>Fumarat</b>	0,5	± 0,16	0,09	±0,009
<b>Malat</b>	n.d.		96	±45
<b>Succinat</b>	n.d.		130	±130

Die Citratkonzentration in den Lösungen beträgt in den mit *Gordonia* sp. inokulierten Röhren nur 3 % der unbehandelten Kontrollröhren, ist jedoch im Gegensatz zu Malat und Succinat noch messbar. Ebenso wird in den Lösungen Formiat gemessen. Hier kommt es durch die Anwesenheit von *Gordonia* sp. zu einer Reduktion der Konzentration um Zweidrittel des Gehaltes im Vergleich zu den Lösungen der unbehandelten Kontrollen. Die Reduktion der Gehalte an Citrat, Malat und Succinat läßt vermuten, dass diese organischen Säuren von *Gordonia* sp. aufgenommen und metabolisiert oder aber an das Substrat sorbiert wurden. Die dritte messbare organische Säure, Fumarat, ist in Anwesenheit von *Gordonia* sp. dagegen sechsfach erhöht vorhanden, obwohl diese organische Säure in der Flüssigkultur von *Gordonia* sp. nicht aufgetreten ist. Die Kulturbedingungen im Versuchssystem mit dem festen Substrat haben demzufolge einen Einfluss auf die Qualität der unterschiedlichen organischen Säuren. Fumarat scheint im Gegensatz zu den anderen vier organischen Säuren und im Unterschied zur Flüssigkultur von *Gordonia* sp. in das feste Substrat abgegeben worden zu sein.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.1**

Die Tomatenpflanzen der Sorte ‚Freude‘, die im Kultursystem zur sterilen und störungsarmen Probenahme kultiviert werden, zeigen im Vergleich zu denen aus dem Gewächshaus bei gleicher Entwicklungsstufe eine reduzierte Akkumulation der Spross- und Wurzeltrockenmassen. Im Kultursystem ist der Phosphorgehalt der Sprosse im Vergleich zu dem der Wurzeln leicht erhöht. Die Tomaten können die Phosphorkonzentration in den abgezogenen, wässrigen Lösungen des Kultursystems auf  $32 \text{ ng P ml}^{-1}$  im Vergleich zu  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$  bei den unbehandelten Kontrollen anheben.

Bei monaxenischem Wachstum der Tomatensorte ‚Freude‘ sind sowohl quantitativ als auch qualitativ weniger organische Säuren in den Lösungen nachzuweisen als in denen der sterilen Kontrollen und auch weniger als in den Abstauchlösungen, die von den im Gewächshaus kultivierten Pflanzen gewonnen wurden.

Ein Einfluss von *P. fluorescens* Pf-5 auf den pH-Wert der Lösungen GL, AuL und EP in monaxenischer Kultur kann im Gegensatz zur Flüssigkultur nicht festgestellt werden. Es kommt im Kultursystem zu keiner nachhaltigen Ansäuerung. Der Phosphorgehalt in den wässrigen Lösungen der inokulierten Röhren beträgt  $46 \text{ ng P ml}^{-1}$ . Er ist um die Hälfte höher als in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘.

Die Exsudation organischer Säuren von *P. fluorescens* Pf-5 beschränkt sich in monaxenischer Kultur auf geringe Mengen von Citrat und Malat.

Die Kultur des Actinomyceten *Gordonia* sp. führt zu einem Anstieg des pH-Wertes der Lösungen sowohl in der Flüssigkultur als auch in der monaxenischen Kultur in festem Substrat. Der Phosphorgehalt der wässrigen Lösungen ist im Vergleich mit den beiden anderen monaxenischen Kulturen der Sorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 im Kultursystem am höchsten und beträgt zwischen  $40$  und  $66 \text{ ng P ml}^{-1}$ .

Die Exsudation organischer Säuren in der monaxenischen Kultur des Kultursystems von *Gordonia* sp. ist gering. Nur Fumarat wird in messbaren Konzentrationen abgegeben.

#### **4.3.2 Die Tomatensorte ‚Freude‘ und Rhizosphärenmikroorganismen in Dualkultur bei Angebot schwer löslichen Phosphats**

Die Reaktionen von sowohl der Tomatensorte ‚Freude‘ als auch von den beiden Mikroorganismenisolaten auf schwer lösliches Phosphat sind unter monaxenischen Bedingungen untersucht worden. Im folgenden sollte die Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit je einem der beiden Mikroorganismenisolate getestet werden.

In anderen Untersuchungen wird erwähnt, dass ein festes Substrat (BARBER UND GUNN 1974) oder die Inokulation mit Mikroorganismen die Exsudation organischer Verbindungen von Pflanzen in den Wurzelraum stimulieren (MERBACH et al. 1991; MEHARG & KILLHAM, 1995). Aus den Versuchen zur Wirkung schwer löslichen Phosphats auf die Tomatensorte ‚Freude‘ und die beiden Mikroorganismenisolate in monaxenischer Kultur (Abschnitt 4.3.1) geht hervor, dass durch festes Substrat allein keine Erhöhung der Exsudation organischer Säuren eintritt. Statt dessen ist der Gesamtgehalt wasserlöslicher organischer Säuren im Kultursystem bei der monaxenischen Kultur der Sorte ‚Freude‘ im Vergleich zu den nicht sterilen Versuchen derselben Sorte im Gewächshaus und auch zur Flüssigkultur der Mikroorganismen stark vermindert.

Es gilt daher zu überprüfen, ob bei Angebot schwer löslichen Phosphats im Kultursystem die Vergesellschaftung der Pflanze mit einem der beiden Mikroorganismenisolate zu einer erhöhten Exsudation organischer Säuren führt.

#### 4.3.2.1 Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 bei Angebot schwer löslichen Phosphats

Von den drei bis fünf Keimlingen pro Röhre haben dreimal drei, einmal eine und einmal fünf Pflanzen überlebt. Die Pflanzen weisen einen gedrungenen Wuchs mit zwei bis drei Zentimetern Sprosshöhe auf. Die Laubblätter sind rötlich überlaufen, die Keimblätter bei allen Pflanzen abgefallen. Ein ausgeprägtes Wurzelwachstum mit vielen Verzweigungen ist bis auf den Grund der Glasröhre zu erkennen. Unabhängig von der Anzahl der Jungpflanzen pro Röhre, variieren die Trockenmassen der Wurzeln und Sprosse wie in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1) jeweils zwischen 3 und 5 mg Pflanze<sup>-1</sup>. Dementsprechend ist ein Wurzel-/Sprossverhältnis von 1,0 festzustellen. Der gedrungene Wuchs, das starke Wurzelwachstum und die Anthocyanfärbung der Blätter lassen auf einen starken Phosphatmangel der Pflanzen schließen (LYNCH, 1995).

Nach sieben Tagen der Dualkultur der Pflanzen und *P. fluorescens* Pf-5 wurden die Röhren beprobt. Bei den Lösungen aus den mit *P. fluorescens* Pf-5 inokulierten Röhren ist die Zahl der Kolonien auf Vollnährmedium (Abschnitt 3.8.3.1) und auf kanamycinhaltigem KMB-Medium (Abschnitt 3.8.3.2) gleich. Damit kann ausgeschlossen werden, dass andere als die inokulierten Mikroorganismen in die Versuchsröhren eingedrungen sind.

In den abgezogenen Lösungen GL und AuL können cfu von log 7,2 bis 7,3 cfu ml<sup>-1</sup> ermittelt werden, während direkt von den Wurzeln der Tomatenpflanzen aus der Rhizoplanenlösung RhL noch log 4,9 cfu ml<sup>-1</sup> isoliert werden (Tabelle 25). Trotz der etwas niedrigeren Inokulationsdichte in der Dualkultur (log 7,9 cfu (200 g Sand)<sup>-1</sup> im Vergleich zur monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 (log 8,3 cfu (200 g Sand)<sup>-1</sup> (Abschnitt 4.3.1.2)) ist die cfu in den Lösungen GL und AuL der Dualkultur ähnlich hoch, bzw. etwas höher, als die cfu in den Lösungen GL und AuL der monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *P. fluorescens* Pf-5 in der Dualkultur mit der Tomatensorte ‚Freude‘ besseren Kulturbedingungen ausgesetzt war als in der monaxenischen Kultur, da verhältnismäßig mehr cfu in der Dualkultur überlebt haben. Die niedrigere cfu in der Lösung RhL aus der Dualkultur im Gegensatz zur monaxenischen Kultur (EP) ist auf die veränderten Probenahmebedingungen zurückzuführen, da hier Rhizoplanenlösung RhL und nicht die Exsudatprobe EP auf Mikroorganismen untersucht wurde.

Tabelle 25: cfu [log cfu ml<sup>-1</sup>] von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in den Lösungen GL, AuL und RhL in der Dualkultur mit Tomatenpflanzen und GL, AuL und EP in monaxenischer Kultur (Abschnitt 4.3.1.2) im Vergleich. Mittelwerte von vier Wiederholungen ± Standardfehler.

	Dualkultur		Monaxenische Kultur Pf-5	
	[log cfu ml <sup>-1</sup> ]			
<b>Lösung GL</b>	7,26	± 0,14	6,78	± 0,22
<b>Lösung AuL</b>	7,22	± 0,11	7,14	± 0,12
<b>Lösung RhL/EP</b>	4,89	± 0,31	6,28	± 0,06

#### 4.3.2.1.1 pH-Werte der Lösungen

Das sterile deionisierte Wasser, welches bei der Beprobung der Röhren in diesem Versuch eingesetzt worden ist, hatte einen pH-Wert von 7,7. Der durchschnittliche pH-Wert der Gleichgewichtslösung GL beträgt 5,6, der von der Austauschlösung AuL 5,4. Nach erneuter Zugabe von 20 ml und einer Stunde Inkubation wird der pH-Wert der Exsudatprobe EP mit 5,6, entsprechend dem der Lösung GL, bestimmt.

Die pH-Werte der Lösungen aus der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und die der monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5, zeigen ähnliche Tendenzen wie die pH-Werte der abgezogenen Lösungen aus der Dualkultur (Tabelle 26). Die pH-Werte der Lösungen GL und EP eines Versuches weichen jeweils nur wenig von einander ab. Bei der Lösung AuL ist im Vergleich zur Lösung GL jeweils eine leichte Ansäuerung von 0,2 bis 0,3 Einheiten festzustellen.

Tabelle 26: pH-Werte in den abgezogenen Lösungen GL, AuL und EP bei zwei unterschiedlichen monaxenischen Kulturen (Tomate monaxenisch) (Pf-5 monaxenisch) und in Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5. Mittelwerte von vier Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	Lösung GL		Lösung AuL		Lösung EP	
<b>Tomate monaxenisch</b>	5,25	$\pm 0,04$	5,11	$\pm 0,02$	5,41	$\pm 0,02$
<b>Pf-5 monaxenisch</b>	5,23	$\pm 0,16$	4,89	$\pm 0,05$	5,14	$\pm 0,09$
<b>Tomate + Pf-5</b>	5,56	$\pm 0,09$	5,26	$\pm 0,07$	5,62	$\pm 0,07$

Auffallend ist, dass sowohl die monaxenische Kultur der Sorte ‚Freude‘ als auch die monaxenische Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 niedrigere pH-Werte der Lösungen GL und EP zur Folge haben, als die Dualkultur der beiden Organismen. Demnach ist in der Dualkultur ein stärkerer Anstieg des pH-Wertes der Lösungen (pH 5,6) im Vergleich zu den sterilen Kontrollen (pH 5,0, Abschnitt 4.2.2.2) festzustellen als bei der Kultivierung der einzelnen Organismen. Dies mag in einer Verschiebung des Ionengleichgewichts in dem Substrat durch die Dualkultur oder aber eine Änderung der Lösung von Hydrogencarbonat begründet sein.

#### 4.3.2.1.2 Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen

Bereits das Erscheinungsbild der Pflanzen in der Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 läßt auf einen Phosphormangel schließen. Die Phosphorgehalte der Tomattenpflanzen bestätigen dies. Ein mittlerer Gehalt von  $1,38 \text{ mg P g}^{-1} \text{ STM}$  wird in den Sprossen analysiert, wobei die Werte zwischen  $1,20$  und  $1,54 \text{ mg P g}^{-1} \text{ STM}$  schwanken. Der Phosphorgehalt der Wurzeln liegt etwas höher. In den Wurzeln werden durchschnittlich  $1,84 \text{ mg P g}^{-1} \text{ WTM}$  bestimmt ( $1,12$  bis  $2,96 \text{ mg P g}^{-1} \text{ WTM}$ ). Damit liegt der Phosphorgehalt der Tomatenwur-

zeln in Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 um ein Viertel höher als der Phosphorgehalt der Sprosse.

Ein Vergleich der Phosphorgehalte der Sprosse und Wurzeln mit denen aus der monaxenischen Kultur der Sorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1: 2,6 mg P g STM, 1,6 mg P g WTM) ergibt ein umgekehrtes Verhältnis. Die Tomatenpflanzen wiesen in der monaxenischen Kultur ein Drittel weniger Phosphor in den Wurzeln als in der Dualkultur auf. Dies verdeutlicht, dass in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 eher mehr Phosphor in den Wurzeln vorhanden ist als in den Sprossen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Aufnahme von Phosphor in die Wurzeln nach der Inokulation mit *P. fluorescens* Pf-5 zurückzuführen, wobei die Phosphorverlagerung von den Wurzeln in den Spross noch nicht erfolgte.

Der Ausgangsgehalt des Sandes an DL-löslichem Phosphor in den Röhren wird für diesen Versuch mit  $6,38 \text{ mg P (200 g Sand)}^{-1}$  ermittelt. Bei Versuchsende sind davon noch  $0,16 \text{ mg P (200 g Sand)}^{-1}$  nachweisbar, was 2,5 % des bei Versuchsbeginn pflanzenverfügbaren Phosphors entspricht. Die Anteile spalten sich in folgender Weise auf: 88,5 % am Sand, 3,4 % am Glas, 4,2 % am Filterpapier, 3,9 % an der Steinwolle.

Der durchschnittliche Phosphorgehalt der abgezogenen Lösungen beträgt in den Lösungen GL und AuL je  $18 \text{ ng P ml}^{-1}$  und in der Exsudatprobe EP  $26 \text{ ng P ml}^{-1}$ . Das entspricht einer mittleren Konzentration des Phosphors von  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$  (Abbildung 9).

Zum Vergleich werden die Phosphorgehalte der abgezogenen Lösungen aus den Abschnitten 4.3.1.1 und 4.3.1.2 hinzugezogen und die Werte in Abbildung 9 einander gegenübergestellt. Während bei den Tomatenpflanzen in monaxenischer Kultur der Phosphorgehalt in allen drei abgezogenen, wässrigen Lösungen  $32 \text{ ng P ml}^{-1}$  beträgt, liegt er bei monaxenischer Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 bei  $44 \text{ ng P ml}^{-1}$ . In Dualkultur ist eine Konzentration von  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$  messbar. Das heißt, dass in der Dualkultur der Phosphorgehalt in den Lösungen um ein Drittel niedriger ist als in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und sogar um die Hälfte niedriger als in der monaxenischen Kultur des Bakteriums.

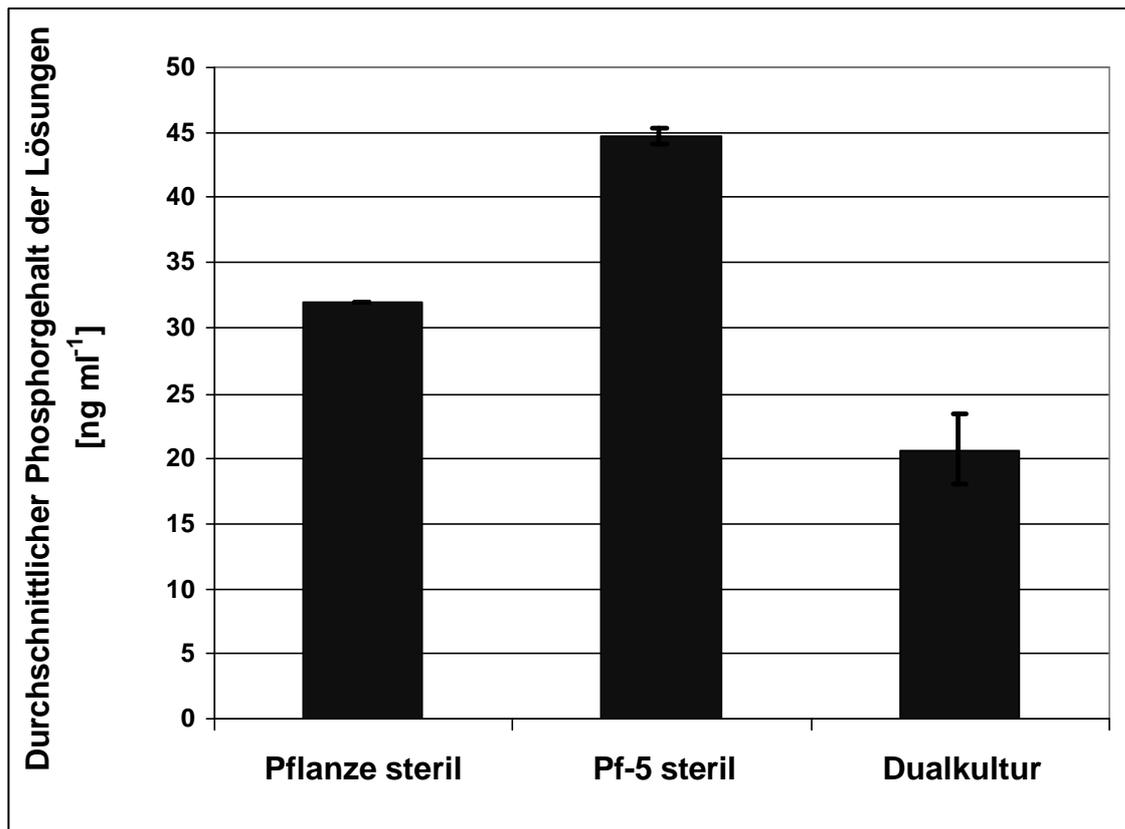


Abbildung 9: Durchschnittliche Phosphorgehalte der Lösungen [ng P ml<sup>-1</sup>] bei monaxenischer Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ (Tomate), *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Pf-5) und in der Dualkultur der beiden Organismen (Dualkultur). Mittelwerte von vier Wiederholungen ± Standardfehler.

#### 4.3.2.1.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase von *P. fluorescens* Pf-5 ist in der Lösung GL mit 1,72 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup> am höchsten. Diese Lösung beinhaltet die Mikroorganismen, die sich im Bereich der Wurzelspitzen im unteren Abschnitt der Röhren zur Zeit der Probenahme befanden. Hier scheint ein Phosphormangel für die Mikroorganismen bestanden zu haben. In der Lösung AuL wird noch etwa ein Zehntel der Aktivität im Vergleich zu der aus Lösung GL gemessen (0,18 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>). Hier handelt es sich um die Mikroorganismen, die aus dem Substrat mit der Austauschlösung (AuL) entfernt werden konnten. Sie hatten demnach einen geringeren Phosphormangel als die Bakterien aus dem Bereich der Wurzelspitzen. In der Rhizoplanenlösung (RhL), ist lediglich ein Fünfzehntel der Aktivität aus Lösung GL zu messen (0,11 ng MU (log cfu h)<sup>-1</sup>). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Mikroorganismen, die direkt auf den Wurzeln lebten einem geringeren Phosphormangel ausgesetzt waren, als die übrigen Mikroorganismen.

In diesem Versuch ist in den Lösungen GL und RhL die Aktivität der alkalischen Phosphatase höher als in der monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 (Abschnitt 4.3.1.2). Dagegen ist die Aktivität in der Lösung AuL bei dualer Kultur niedriger. Die Mittelwerte

der alkalischen Phosphatase aus den beiden Versuchen und die korrespondierenden Standardfehler sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: Aktivität der alkalischen Phosphatase [ $\text{ng MU (log cfu h)}^{-1}$ ] von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in den Lösungen GL, AuL und RhL bei dualer Kultur mit der Tomatensorte ‚Freude‘ und in den Lösungen GL, AuL und EP unter monaxenischen Bedingungen. Mittelwerte von vier Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

	Dualkultur		monaxenische Kultur	
	[ $\text{ng MU (log cfu h)}^{-1}$ ]			
<b>Lösung GL</b>	1,72	$\pm 0,36$	0,27	$\pm 0,16$
<b>Lösung AuL</b>	0,18	$\pm 0,04$	0,38	$\pm 0,13$
<b>Lösung RhL/EP</b>	0,11	$\pm 0,04$	0,06	$\pm 0,04$

Bei dem niedrigeren Phosphorgehalt der Lösungen und in der Gegenwart der Wurzelspitzen der Pflanzen kommt es demnach zu einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase. Diese erhöhte Enzymaktivität bestätigt zum einen den Phosphormangel von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 im Bereich der Wurzelspitzen der Dualkultur und zum anderen eine wahrscheinlich höhere Substratmenge im Bereich der Wurzelspitzen als im Bereich der Sprossbasis.

#### 4.3.2.1.4 Exsudation organischer Säuren

In der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1) wurden lediglich zwei verschiedene organische Säuren in den abgezogenen Lösungen festgestellt, Formiat und Fumarat. Sowohl bei Formiat als auch bei Fumarat ist durch den Vergleich mit unbehandelten Kontrollen davon auszugehen, dass diese Säuren zum überwiegenden Teil aus dem Sand stammten. Die ebenfalls in den unbehandelten Kontrollen aufgetretenen organischen Säuren Citrat, Malat und Succinat waren dagegen in Anwesenheit der Tomatensorte ‚Freude‘ nicht messbar und könnten daher von den Pflanzen metabolisiert oder an die Tomatenwurzeln oder das Substrat sorbiert worden sein. In der monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 (Versuch 4.3.1.2) wurden geringe Mengen von Citrat, Malat und Formiat gefunden. Es stellt sich die Frage, ob es in der Dualkultur zu Veränderungen der Konzentrationen an organischen Säuren im Vergleich zu den monaxenischen Kulturen kommen würde. Die Daten der Summen organischer Säuren aus den Lösungen GL, AuL und EP der sterilen unbehandelten Kontrollen, der beiden monaxenischen sowie der Dualkultur sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Summen der einzelnen organischen Säuren (nmol l<sup>-1</sup>) aus den Lösungen (GL + AuL + EP) der unbehandelten Kontrollen (Kontrolle), der unterschiedlichen monaxenischen Kulturen (Tomate monax., *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 monax.) und der Dualkultur (Tomate + Pf-5) sowie der Gesamtgehalt je Kultur ( $\Sigma$ ). (n.d. = nicht detektierbar).

Behandlung	Organische Säuren (nmol l <sup>-1</sup> ) in den Lösungen (GL + AuL + EP)					
	Citrat	Formiat	Fumarat	Malat	Succinat	S
<b>Kontrolle</b>	124	900	0,09	96	130	1250
<b>Tomate monax.</b>	n.d.	900	0,27	n.d.	n.d.	900
<b>Pf-5 monax.</b>	16	952	n.d.	9	n.d.	977
<b>Tomate + Pf-5</b>	12	184	0,40	29	625	850

Die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 hat einen deutlichen Einfluss auf die Quantität und Qualität der organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen. Der Gesamtgehalt an organischen Säuren in den Lösungen der Dualkultur übertrifft den Gehalt der monaxenischen Kulturen um ein Viertel (Tabelle 28). Er ist dennoch niedriger als der Gesamtgehalt der Lösungen in den unbehandelten Kontrollen. Die Erhöhung des Gesamtgehaltes an wasserlöslichen organischen Säuren in den Lösungen hat in der Dualkultur keine Absenkung des pH-Wertes zur Folge. Statt dessen sind die pH-Werte der Lösungen höher als in den Lösungen der monaxenischen Kulturen. Hier wird deutlich, dass mit einer erhöhten Exsudation organischer Säuren nicht zwangsläufig eine Absenkung des pH-Wertes einhergeht.

Bei zwei der fünf analysierten organischen Säuren kommt es zu starken Veränderungen im Vergleich zu den vorherigen Messungen. So kann Succinat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in fünffach höherer Konzentration analysiert werden (Tabelle 28). Bei getrennter Kultur der beiden Organismen trat Succinat nicht in detektierbaren Konzentrationen auf. Die Formiatkonzentration wird im Vergleich zu den bisherigen Versuchen auf ein Fünftel gesenkt. In der Dualkultur erschlossen sich Möglichkeiten der Sorption oder aber Metabolisierung dieser organischen Säure durch die beiden Organismen, die in der monaxenischen Kultur nicht gegeben waren. Citrat wird in geringerer Menge als in der Kontrolle und auch in der monaxenischen Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 gemessen, doch im Gegensatz zur monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘, ist Citrat messbar (Tabelle 28). Die Malatkonzentration in den abgezogenen Lösungen ist geringer als in den unbehandelten Kontrollen, jedoch höher als in der monaxenischen Kultur der Pflanzen oder *P. fluorescens* Pf-5. Auch die Fumaratkonzentration war im Vergleich zu den bisherigen Versuchen erhöht und übertraf die Konzentration in den sterilen Kontrollen um den Faktor Fünf.

Der Vergleich der Ergebnisse der getrennten Kulturen der beiden Organismen mit denen der Dualkultur zeigt, dass es bei Vorhandensein beider Organismen zu komplexen Wech-

selwirkungen in Hinblick auf die Exsudation organischer Säuren und deren Metabolisierung kommt.

Neben dem Gesamtgehalt an wasserlöslichen organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen ( $\text{nmol l}^{-1}$ ) ist die durchschnittliche Gesamtexsudation organischer Säuren der Exsudatprobe EP, angegeben in  $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ , von Interesse. Sie beläuft sich in diesem Versuch auf  $6,2 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  ( $\pm 3,2$ ) und setzt sich ausschließlich aus Citrat ( $0,3 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ) und Succinat zusammen ( $5,9 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ). Dabei überwiegt der Anteil des Succinats an der Gesamtexsudation mit 96 %. Hieraus ergibt sich ein großer Unterschied zu den Daten aus der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1). Da Formiat nicht von den Pflanzen sondern mit dem Substrat in die Versuche eingebracht wurde, beschränkte sich die Gesamtexsudation auf die Freisetzung von Fumarat.

Die Gesamtexsudation organischer Säuren von  $6,2 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  in der Exsudatprobe EP der Dualkultur ist im Vergleich mit den Daten aus dem unsterilen Gewächshausversuch mit  $22,6 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  (Abschnitt 4.1.1.2) relativ gering. Sie beträgt lediglich etwa ein Viertel der unter nicht sterilen Bedingungen gemessenen Gesamtexsudation. Dafür ist sie im Vergleich zur Gesamtexsudation der Tomatensorte ‚Freude‘ unter monaxenischen Bedingungen (Abschnitt 4.3.1.1), wo lediglich  $0,13 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  erreicht wurden, um ein Vielfaches erhöht.

#### **4.3.2.2 Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. bei Angebot schwer löslichen Phosphats**

Es galt zu überprüfen, ob es bei Anwesenheit von *Gordonia* sp. im Kultursystem mit der Tomatensorte ‚Freude‘ zu Veränderungen der Exsudation organischer Säuren kommen würde.

Nach sieben Tagen Inkubation der Tomatenpflanzen mit *Gordonia* sp. werden die Röhren beprobt. Bei allen Pflanzen sind morphologische Kennzeichen eines Phosphatmangels zu erkennen. Die Kotyledonen sind im Kulturverlauf abgefallen, die Laubblätter dunkelgrün, bzw. rötlich-lila gefärbt. Die Sprosshöhe beträgt 2 bis 3 cm. Das Wurzelsystem ist stark verzweigt, die feinen Wurzeln reichen bis zum unteren Ende der Röhren in die Schicht der Glasperlen hinein. Die mittlere Trockenmasse der Sprosse beträgt  $5 \text{ mg Pflanze}^{-1}$ , die der Wurzeln ebenfalls. Ein Wurzel-/Sprossverhältnis von 1,0 ist wie in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1) gegeben und stellt neben den morphologischen Veränderungen ein weiteres Anzeichen für einen Phosphatmangel der Pflanzen dar.

Die cfu von *Gordonia* sp. in den Lösungen variieren zwischen den vier Parallelen in der Gleichgewichtslösung GL stark. In einer der vier Röhren kann keine cfu in der Lösung GL ermittelt werden, in den drei übrigen Röhren waren zwischen  $\log 2,5 \text{ cfu ml}^{-1}$  und  $\log 5,1 \text{ cfu ml}^{-1}$  vertreten. Die Lebensbedingungen für *Gordonia* sp. in diesem Abschnitt der Röhren scheinen zwischen den Röhren sehr unterschiedlich gewesen zu sein, so dass in der einen Röhre keine cfu in der Lösung GL messbar waren. In der Austauschlösung AuL sind cfu zwischen  $\log 4,3 \text{ cfu ml}^{-1}$  und  $\log 5,5 \text{ cfu ml}^{-1}$  (MW  $\log 5,1 \text{ cfu ml}^{-1}$ ) vorhanden. In der Rhizoplanenlösung RhL, treten kaum Unterschiede in der Mikroorganismenpopulation auf ( $\log 4,2$  bis  $4,9 \text{ cfu ml}^{-1}$ ). Die Tomatenwurzeln scheinen gleichmäßig in allen vier Parallelen mit *Gordonia* sp. besiedelt zu sein.

In der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp (Abschnitt 4.3.1.3) wurden keine cfu in der Gleichgewichtslösung GL bestimmt. Unter Verwendung des selben Inokulums und damit der gleichen cfu bei Versuchsbeginn werden in der Dualkultur mit der Sorte ‚Freude‘ dagegen in drei von vier Röhren bis zu  $\log 5,1 \text{ cfu ml}^{-1}$  von *Gordonia* sp. gefunden. Auch die cfu in den Lösungen AuL und RhL/EP sind in Gegenwart der Tomatensorte ‚Freude‘ um 0,1 bis 0,4 Einheiten höher als in der monaxenischen Kultur. Demnach hat die Dualkultur mit den Tomatenpflanzen einen positiven Einfluß auf die Biologie von *Gordonia* sp..

##### **4.3.2.2.1 pH-Werte der Lösungen**

In der Lösung GL wird ein pH-Wert von 5,5 gemessen, in der Lösung AuL ein pH-Wert von 5,3 festgestellt. Nach einer Stunde Inkubation mit deionisiertem Wasser wird in der Exsudatprobe EP ein pH-Wert von 5,5 gemessen.

Die pH-Werte der Lösungen GL, AuL und EP in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. liegen in ähnlicher Höhe wie die der Lösungen aus der Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 (Lösung GL und EP pH 5,6, Lösung AuL pH 5,4). Im Vergleich zur monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp. (Abschnitt 4.3.1.3) ist der pH-Wert der Lösungen niedriger. Dort sind pH-Werte zwischen 5,7 (Lösung AuL) und 6,0 (Lösung EP) festgestellt worden. In der Dualkultur der Mikroorganismen mit den Tomatenpflanzen wirkt sich die Eigenschaft von *Gordonia* sp. den pH-Wert der Lösungen zu erhöhen weniger aus, als in der monaxenischen Kultur des Actinomyceten.

#### 4.3.2.2.2 Phosphorgehalte der Pflanzen, der Baubestandteile der Röhren und der Lösungen

Der mittlere Phosphorgehalt der Sprosse wird mit  $2,0 \text{ mg P g}^{-1}$  STM bestimmt, der Phosphorgehalt der Wurzeln mit  $1,8 \text{ mg P g}^{-1}$  WTM. Wie bei dem Wurzel-/Sprossverhältnis der Trockenmassen ist auch hier ein Verhältnis der Phosphorgehalte von circa 1,0 festzustellen. Die Tomatenpflanzen in monaxenischer Kultur (Abschnitt 4.3.1.1) wiesen im Vergleich zu diesem Versuch einen etwas höheren mittleren Phosphorgehalt in den Sprossen ( $2,6 \text{ mg P g STM}$ ) und einen etwas niedrigeren in den Wurzeln auf ( $1,6 \text{ mg P g WTM}$ ). In der monaxenischen Kultur betrug das Wurzel-/Sprossverhältnis der Phosphorgehalte demnach 0,6. Die mittleren Phosphorgehalte der Sprosse in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 sind dagegen mit  $1,4 \text{ mg P g}^{-1}$  STM niedriger. Bei den Wurzeln wird die gleiche Konzentration von  $1,8 \text{ mg P g}^{-1}$  WTM wie in der Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. erreicht.

Demnach ist es eine Woche nach der Inokulation der Pflanzen mit den Mikroorganismen sowohl durch *P. fluorescens* Pf-5 als auch durch *Gordonia* sp. zu einer Erhöhung des Phosphorgehaltes der Wurzeln im Vergleich zur monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ sowie zu höheren Phosphorgehalten im Vergleich zu den jeweiligen Sprossen gekommen.

Bei Versuchsbeginn wird der Phosphorgehalt des mit Goethit gemischten Sandes mit  $7,30 \text{ mg P } 200 \text{ g}^{-1}$  Sand bestimmt. Die Gehalte an pflanzenverfügbarem, DL-löslichem Phosphor des Sandes, der Glasperlen, der Steinwolle und des Filterpapiers werden bei Versuchsende analysiert ( $0,16 \text{ mg P Röhre}^{-1}$ ). Das entspricht einer Wiederfindung von 2,1 %.

Die Phosphorgehalte der abgezogenen, wässrigen Lösungen variieren zwischen 18 bzw.  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$  in Lösung GL und AuL und  $28 \text{ ng P ml}^{-1}$  in Lösung EP. Sie sind damit niedriger als die der abgezogenen Lösungen der Tomatensorte ‚Freude‘ in monaxenischer Kultur (Abschnitt 4.3.1.1), wo  $32 \text{ ng P ml}^{-1}$  erreicht wurden. Der mittlere Phosphorgehalt der Lösungen in der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp (Abschnitt 4.3.1.3), liegt dagegen höher ( $40$  bis  $66 \text{ ng P ml}^{-1}$ ). Bei Anwesenheit beider Organismen ist damit der Phosphorgehalt der Lösungen nur halb so hoch, wie bei *Gordonia* sp. in Einzelkultur und geringfügig niedriger als in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘.

Obwohl nicht mehr pflanzenverfügbares, DL-lösliches Phosphor gemessen wurde und auch der Phosphorgehalt in den abgezogenen, wässrigen Lösungen nicht höher war als in den monaxenischen Kulturen, sind doch bei beiden Organismen in der Dualkultur Anzeichen für eine erhöhte Phosphatverfügbarkeit gegeben. Sowohl die höheren cfu der Mikroorganismen in den Lösungen, als auch die höheren Phosphorgehalte der Wurzeln lassen darauf schließen.

#### 4.3.2.2.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Eine Aktivität der alkalischen Phosphatase von *Gordonia* sp. kann nur in der Lösung AuL festgestellt werden. Diese wird mit  $0,05 \text{ ng MU (log cfu h)}^{-1}$  bestimmt. In der Dualkultur mit den Tomatenpflanzen wird die Enzymaktivität von *Gordonia* sp. daher trotz des niedrigen Phosphorgehaltes der Lösungen nicht erhöht.

#### 4.3.2.2.4 Exsudation organischer Säuren

In den Lösungen sowohl der monaxenischen Kulturen der Tomatensorte ‚Freude‘ (Abschnitt 4.3.1.1) als auch in den monaxenischen Kulturen von *Gordonia* sp. (Abschnitt 4.3.1.3) sind nur geringe Mengen an organischen Säuren gefunden worden. Sowohl die Anzahl, als auch die absolute Menge der organischen Säuren, waren niedriger als in den sterilen Kontrollen autoklavierten Sandes. Es stellte sich die Frage, ob es in der Dualkultur der Tomatenpflanzen mit *Gordonia* sp. zu einem ähnlichen Ergebnis kommen würde.

In Tabelle 29 sind aus den Einzelexperimenten der sterilen unbehandelten Kontrollen, der monaxenischen Kulturen und der Dualkultur die Summen der einzelnen organischen Säuren der drei Lösungen (GL, AuL, EP) zusammengefasst.

Tabelle 29: Summen der einzelnen organischen Säuren ( $\text{nmol l}^{-1}$ ) aus den Lösungen (GL + AuL + EP) von unbehandelten Kontrollen (Kontrollen) und monaxenischen Kulturen der Tomatensorte ‚Freude‘ (Tomate monax.) und von *Gordonia* sp. (*Gord. sp.* monax.) und der Dualkultur (Tom+*Gord. sp.*) sowie die Summe aller organischen Säuren ( $\Sigma$ ).

Behandlung	Organische Säuren [ $\text{nmol l}^{-1}$ ] in den Lösungen (GL + AuL + EP)					
	Citrat	Formiat	Fumarat	Malat	Succinat	S
<b>Kontrollen</b>	124	900	0,09	96	130	1250
<b>Tomate monax.</b>	n.d.	900	0,27	n.d.	n.d.	900
<b><i>Gord. sp.</i> monax.</b>	4	308	0,5	n.d.	n.d.	313
<b>Tom.+<i>Gord. sp.</i></b>	52	533	1	37	1124	1747

Einige der organischen Säuren werden vermutlich sowohl von den Tomatenpflanzen als auch von *Gordonia* sp. in monaxenischer Kultur sorbiert und oder metabolisiert, denn die Gehalte der monaxenischen Kulturen sind geringer als die in den Lösungen der sterilen unbehandelten Kontrollen ohne Pflanzen und Mikroorganismen. Werden jedoch die Pflanzen mit *Gordonia* sp. zusammen kultiviert, so steigt die Gesamtmenge organischer Säuren im Substrat, in diesem Fall um ein Drittel im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die bisher höchste Konzentration organischer Säuren im Kultursystem wurde in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. mit  $1747 \text{ nmol l}^{-1}$  erreicht.

Neben dem Gesamtgehalt an organischen Säuren in den Lösungen ändert sich in der Dualkultur auch die Zusammensetzung der Lösungen (Tabelle 29). Während in den monaxenischen Kulturen der Sorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. kein Succinat messbar war, treten in der Dualkultur große Mengen von Succinat ( $1124 \text{ nmol l}^{-1}$ ) auf. Dieser Wert ist zehnmal höher als der Wert aus den unbehandelten Kontrollen. Weiterhin fällt auf, dass auch Malat in den Lösungen der getrennten Kulturen nicht zu finden ist, wohl aber in der Dualkultur und in den unbehandelten Kontrollen. Mehr als ein Drittel der in den Lösungen der unbehandelten Kontrollen gemessenen Malatkonzentration wurde in der Dualkultur analysiert. Die Konzentration des Fumarats, welches in allen anderen Versuchen kaum mehr als in Spuren zu finden ist, erreicht in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. die höchste in diesen Versuchen gemessene Fumaratkonzentration ( $1 \text{ nmol l}^{-1}$ ). Bei den beiden organischen Säuren Citrat und Formiat werden etwa um die Hälfte geringere Werte als in den unbehandelten Kontrollen, doch weit höhere als in den getrennten Kulturen der Tomatenpflanzen oder *Gordonia* sp. ermittelt.

In der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. ist es zu starken Veränderungen in der Exsudation organischer Säuren der Organismen bei Angebot von schwer löslichem, an Goethit sorbierten Phosphats gekommen. Das wird insbesondere dann deutlich, wenn ausschließlich die Werte der Exsudatprobe EP in Form der Exsudationsrate betrachtet werden [ $\mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$ ] (Abbildung 10). Als Gesamtexsudation organischer Säuren sind in der Dualkultur  $21,97 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  gemessen worden. Das entspricht der gleichen Exsudationsrate wie in den nicht sterilen Gewächshausversuchen der Tomatensorte ‚Freude‘ unter Phosphatmangel, wo  $22,6 \mu\text{mol (g WTM h)}^{-1}$  erreicht wurden (Abschnitt 4.1.1.2).

Die Exsudationsdaten aus dem Sortenversuch im Gewächshaus bei ausreichender Versorgung mit Phosphat (Abschnitt 4.1.1.2) zeigen, dass in der Vergesellschaftung mit Mikroorganismen unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit eine relativ hohe Exsudation organischer Säuren besteht (Abbildung 10). Diese Exsudation kann bei Phosphatmangel der Tomatensorte ‚Freude‘ verdoppelt werden. Werden die Pflanzen unter monaxenischen Bedingungen einem Phosphatmangel ausgesetzt, so kann kaum eine Exsudation organischer Säuren festgestellt werden (Abbildung 10). Die Exsudationsrate geht gegen Null. Ist die Tomatensorte ‚Freude‘ jedoch bei Phosphatmangel mit Rhizosphärenmikroorganismen vergesellschaftet, so ist im Falle der Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 eine leichte Erhöhung der Exsudation festzustellen. Im Falle der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit dem

Actinomyceten *Gordonia* sp. werden dagegen Exsudationsraten wie in dem nicht sterilen Gewächshausexperiment bei Phosphatmangel erzielt (Abschnitt 4.1.1.2).

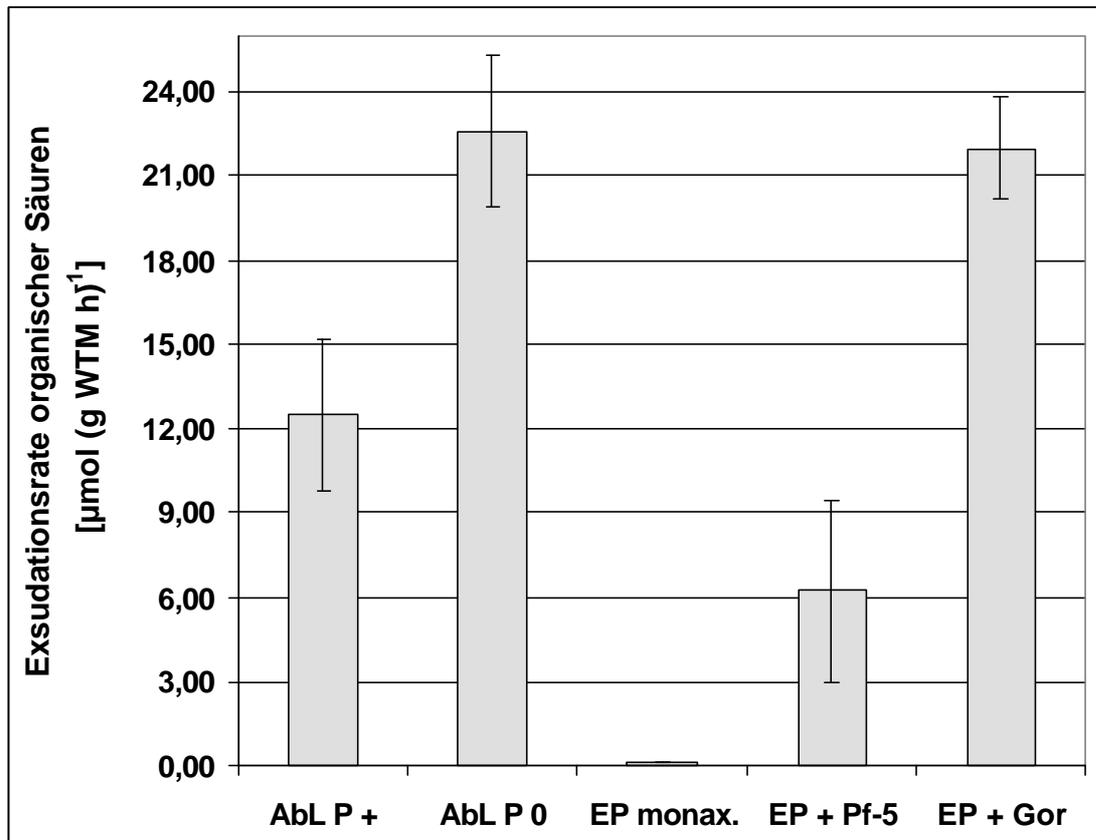


Abbildung 10: Exsudationsraten organischer Säuren [ $\mu\text{mol (g WTM h}^{-1}\text{)}$ ] der Tomatensorte ‚Freude‘ in den Abstauchlösungen (AbL) aus der Gewächshauskultur mit (AbL P +) und ohne Phosphat (AbL P 0) im Vergleich zu den Exsudatproben des Kultursystems in monaxenischer Kultur (EP monax.) und in Dualkultur mit *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (EP + Pf-5) und *Gordonia* sp. (EP + Gor). Mittelwerte von drei bis fünf Wiederholungen  $\pm$  Standardfehler.

In der Exsudatprobe EP der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit dem Actinomyceten *Gordonia* sp. werden drei organische Säuren gefunden: Citrat ( $1,0 \mu\text{mol (g WTM h}^{-1}\text{)}$ ), Formiat ( $1,4 \mu\text{mol (g WTM h}^{-1}\text{)}$ ), Succinat ( $19,6 \mu\text{mol (g WTM h}^{-1}\text{)}$ ). Da das Formiat mit dem Substrat in den Versuch eingebracht worden ist (vergl. Abschnitt 4.2.2.2), beschränkt sich die Exsudationsleistung wie auch in der Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 auf Citrat und Succinat. Der Anteil des Succinats beläuft sich auf 95 %, der des Citrats auf 5 %.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht möglich auf die Quelle der organischen Säuren in der Dualkultur zu schließen. Mögliche Gründe für die gemessenen Veränderungen sind:

1. Eine durch die Anwesenheit der Rhizosphärenmikroorganismen veränderte Wurzelexsudation.
2. Eine durch die Anwesenheit der Rhizosphärenmikroorganismen veränderte Resorption der organischen Säuren durch die Pflanzen.
3. Eine durch die Anwesenheit der Pflanzenwurzeln veränderte Exsudation der Rhizosphärenmikroorganismen.
4. Eine durch die Anwesenheit der Pflanzenwurzeln veränderte Metabolisierung der organischen Säuren durch die Rhizosphärenmikroorganismen.

Die niedrigen Gehalte organischer Säuren in den Lösungen der monaxenischen Kulturen können wiederum verschiedene Gründe haben. So ist es möglich, dass die folgenden Faktoren dazu geführt haben:

1. Eine geringere Abgabe organischer Säuren der Organismen in monaxenischer Kultur.
2. Ein stärkerer Abbau organischer Säuren durch die Mikroorganismen.
3. Eine stärkere Resorption der organischen Säuren durch die Tomatensorte ‚Freude‘.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2**

Die cfu beider Mikroorganismenisolate im Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme sind in der Dualkultur mit der Tomatensorte ‚Freude‘ im Vergleich zur monaxenischen Kultur leicht erhöht.

Die pH-Werte der abgezogenen Lösungen sind in der Dualkultur der Pflanzen mit *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 höher als in den monaxenischen Kulturen der beiden Organismen. In der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. sind sie höher als bei der Sorte ‚Freude‘ allein, jedoch niedriger als bei *Gordonia* sp. allein. In diesem Fall kommt es nicht zu einem Anstieg des pH-Wertes in den Lösungen durch *Gordonia* sp..

In beiden Dualkulturen der Tomatensorte ‚Freude‘ mit den Rhizosphärenmikroorganismen wird eine mittlere Phosphorkonzentration der wässrigen Lösungen von  $20 \text{ ng P ml}^{-1}$  in den Lösungen des Kultursystems analysiert. Demnach vermögen die Organismen in Dualkultur den Phosphorgehalt der Lösungen tiefer zu senken als in monaxenischer Kultur.

Die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ und den beiden Mikroorganismenisolaten bei Angebot schwer löslichen Phosphats ist in Dualkultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur erhöht. Den größten Anteil an der Exsudation nimmt mit circa 95 % in beiden Fällen das Succinat ein. Die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 hat nur zu einer geringen Steigerung der Exsudationsrate geführt. Dagegen werden durch die Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. Exsudationsraten organischer Säuren in ähnlicher Höhe wie bei Phosphatmangel der Tomatensorte ‚Freude‘ im unsterilen Versuch erreicht.

## **Schlussfolgerungen aus den monaxenischen und dualen Kulturen der Organismen in dem Versuchssystem**

Die monaxenische Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ sollte darüber Aufschluss geben, welche Reaktionen die Pflanzen in dem eigens dafür entwickelten Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter streng definierten Bedingungen bei schwer löslichem Phosphat hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren zeigen. Es wurde festgestellt, dass bei monaxenischem Wachstum der Sorte ‚Freude‘ sowohl quantitativ als auch qualitativ weniger organische Säuren in den Lösungen nachzuweisen sind als in denen der sterilen unbehandelten Kontrollen. Die Exsudationsraten organischer Säuren, die in den Abstauchlösungen der im Gewächshaus kultivierten Pflanzen erzielt wurden, konnten in der monaxenischen Kultur bei weitem nicht erreicht werden. Daraus ist zu schließen, dass die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ noch von anderen, einflussreicheren Faktoren als der Phosphatverfügbarkeit bestimmt wird.

Auch die beiden Mikroorganismenisolate *P. fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. wurden unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem kultiviert. Im Gegensatz zu den Flüssigkulturen der beiden Mikroorganismenisolate, traten in den monaxenischen Kulturen im Versuchssystem bei *P. fluorescens* Pf-5 keine und bei *Gordonia* sp. nur geringe Modifikationen des pH-Wertes in den Lösungen auf. Hieraus wird deutlich, dass der nährstoffhaltige Sand im Versuchssystem trotz des Phosphatmangels eine höhere Pufferwirkung hat, als die Flüssigkultur.

Neben der verminderten Modifikation des pH-Wertes konnte bei beiden Mikroorganismenisolaten ebenfalls eine deutlich verringerte Exsudation organischer Säuren im Versuchssystem im Vergleich zur Flüssigkultur ermittelt werden. Dies mag zum einen auf die starke Sorptionsfähigkeit des goethithaltigen Sandes im Kultursystem zurückzuführen sein, zum anderen durch die höhere Populationsdichte der Mikroorganismen in der Flüssigkultur begründet werden. Eine Kombination der beiden Faktoren ist wahrscheinlich. Grundsätzlich können große Unterschiede zwischen den Mikroorganismenkulturen festgestellt werden.

In der Dualkultur ist die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ und der beiden Mikroorganismenisolate bei Angebot schwer löslichen Phosphats im Vergleich zur monaxenischen Kultur erhöht. Hier wird durch die Vergesellschaftung der Organismen zumindest einer der beiden zu einer verstärkten Exsudation organischer Säuren angeregt. Welcher der beiden Organismen die Abgabe der organischen Säuren forciert betreibt, lässt sich aus den Experimenten nicht sagen.

Die zu Beginn der Untersuchungen monaxenischer Kulturen im Kultursystem angestrebte Bilanzierung der von den einzelnen Organismen abgegebenen organischen Säuren war nicht möglich. Statt dessen konnte festgestellt werden, dass die Vergesellschaftung von Pflanzen und Mikroorganismen zu einer Erhöhung der Exsudation organischer Säuren führt und damit mittelbar auch zu einer Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen untersucht. Phosphat gehört zu den Makronährstoffen und ist im Boden häufig nur schwer verfügbar. Dadurch wird Phosphat zu einem der wichtigsten das Wachstum der Organismen begrenzenden Faktoren.

Die Einschränkung der Phosphatverfügbarkeit basiert auf drei Gründen:

- I. Zum einen besteht die Möglichkeit einer zu niedrigen Phosphatkonzentration im System, so dass der Bedarf der Organismen nicht gedeckt werden kann.
- II. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Phosphats im Boden ist gering. Wird gelöstes Phosphat schneller aufgenommen als durch die Diffusion nachgeliefert werden kann, entsteht in diesem Bereich eine Phosphatverarmungszone.
- III. Die Phosphatfreisetzung aus der Reserve ist langsamer als der Entzug aus der Bodenlösung.

Pflanzen und Mikroorganismen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, einer unzureichenden Versorgung mit Phosphat, einem Phosphatmangel, zu begegnen und die Phosphatverfügbarkeit im Boden zu erhöhen. Dazu zählt die Sekretion von Protonen, die zur Solubilisierung von z.B. Calciumphosphat führt. Die Exsudation von organischen Säuren hat eine Komplexbildung von Eisen und Aluminiumionen zur Folge, so dass ein Ausfällen von Eisen- und Aluminiumphosphaten aus der Bodenlösung vermindert wird. Auch eine Phosphatdesorption von sorbierenden Oberflächen durch Anionenaustausch wird durch organische Säuren vermittelt. Die Ausscheidung von Enzymen, wie z.B. Phosphomonoesterasen, resultiert in der Hydrolyse organisch gebundenen Phosphats. Diese drei Mechanismen wirken zum einen auf die Phosphatfreisetzung (III), zum anderen steigern sie die Phosphatnachlieferung durch Diffusion (II), da der Phosphatgradient auf der Seite der Freisetzung erhöht wird.

Pflanzen können durch interzeptives Wachstum Bodenbereiche ergründen, in denen die Phosphatkonzentration höher ist als in den phosphatverarmten Zonen. Wurzeln und Wurzelhaare werden in diesen Bereichen in größerer Anzahl gebildet, bzw. einem stärkeren Streckungswachstum unterzogen. Eine Symbiose mit Mykorrhizapilzen hat ebenfalls eine Vergrößerung der aufnehmenden Oberfläche zur Folge. Schließlich können Pflanzen das von Mikroorganismen durch andere Systeme, wie z.B. weitere Enzyme, mobilisierte Phosphat nutzen. Auch diese aufgeführten Mechanismen dienen der Steigerung der Phosphatverfügbarkeit, sofern diese durch die Diffusion und die Freisetzung limitiert ist.

Ist die Phosphatkonzentration im System Boden zu gering (I) erhöht keiner der genannten Mechanismen die Phosphatverfügbarkeit. Da die von den Organismen eingesetzten Me-

chanismen zur Phosphatmobilisierung erfolglos bleiben, kommt es zu einem absoluten Phosphatmangel.

Die Organismen und ihre Mechanismen der Phosphatmobilisierung sowie die Art, wie die Mechanismen auf das Bodenphosphat wirken, sind in Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt.

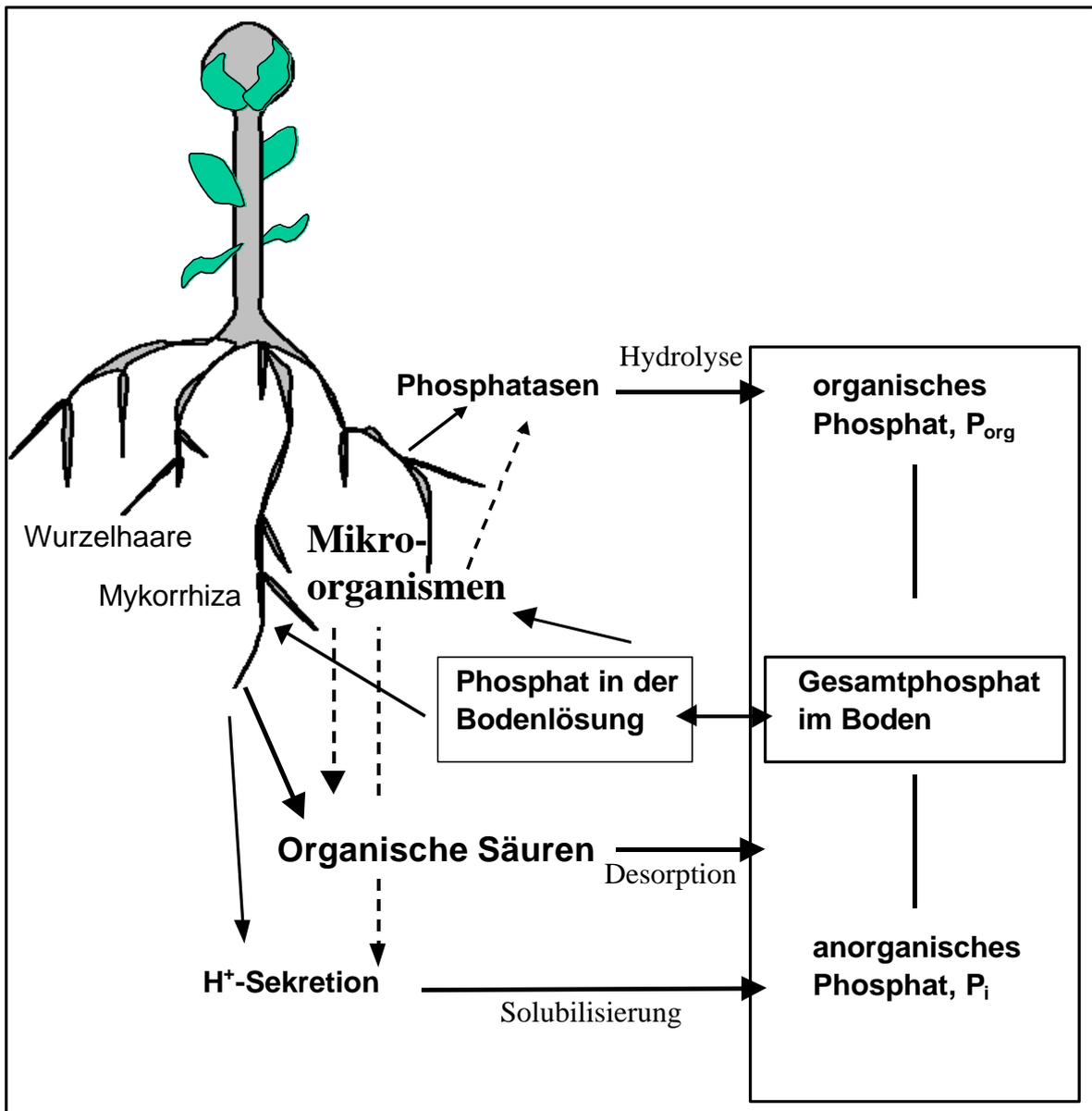


Abbildung 11: Mechanismen von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen zur Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit (nach SCHACHTMAN et al., 1998, verändert).

Nur ein Teil der aufgezählten Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit weitergehend analysiert, und zwar die von den Pflanzen und Mikroorganismen hervorgerufenen Modifikationen des pH-Wertes und die der Exsudation organischer Säuren in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit. Die Versuche wurden mit leicht verfügbarem Phosphat (ausreichende Versorgung mit leicht löslichem Kaliumdihydrogenphosphat), schwer verfügbarem Phosphat (schwer löslichem, an Goethit sorbiertem Phosphat) und ohne verfügbares Phosphat durchgeführt. Sowohl schwer lösliches als auch nicht verfügbares Phosphat hat einen Phosphatmangel der Organismen zur Folge. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Interaktionen zwischen Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel geben.

Die Tomatensorte ‚Freude‘ erwies sich unter den Bedingungen des absoluten Phosphatmangels als geeignete Versuchspflanze, da sie erhöhte Mengen organischer Säuren ausschied. Die beiden verwendeten Mikroorganismenisolate *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. wurden hinsichtlich ihrer Reaktionen auf unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit charakterisiert. Ein System zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme wurde entwickelt. In diesem System wurden die Gehalte organischer Säuren in den Testlösungen bei monaxenischer Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ bzw. der Mikroorganismenisolate mit denen aus der Dualkultur der Tomatenpflanzen mit jeweils einem der Mikroorganismenisolate verglichen.

Die Untersuchungen führten zu den folgenden Aussagen:

- Bei einigen Pflanzenarten beeinflusst die Phosphatverfügbarkeit die Exsudation organischer Säuren. Diese Reaktion ist abhängig von der Sorte.
- Die Mikroorganismenisolate *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. unterscheiden sich in Flüssigkultur in Bezug auf die Exsudation organischer Säuren und die Modifikation des pH-Wertes. Die Reaktionen sind unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit.
- Die Versuchsröhren bieten ein sicheres System zur sterilen Anzucht und Kultur von Pflanzen über einen Zeitraum von bis zu acht Wochen. Eine störungsarme Probenahme der von den Organismen abgegebenen wasserlöslichen Substanzen ist gewährleistet.
- In den monaxenischen Kulturen der Tomatensorte ‚Freude‘ und der beiden Mikroorganismenisolate konnten nur sehr geringe Mengen organischer Säuren ermittelt werden.
- Die Exsudation organischer Säuren ist in dualer Kultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur erhöht.

## 5.1 Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen bei Phosphatmangel

### 5.1.1 Auswahl der Versuchspflanzenart

Für die vorliegende Arbeit musste eine Pflanzenart ausgewählt werden, die unter den Bedingungen des Phosphatmangels verstärkt organische Säuren ausscheidet. Die verstärkte Exsudation organischer Säuren ist eine der möglichen Reaktionen auf Phosphatmangel, die bei vielen Pflanzenarten zu beobachten ist. Hierbei konnte nicht auf bereits publizierte Angaben zurückgegriffen werden, da die Befunde in der Literatur z.T. widersprüchlich sind. Einige Pflanzenarten schieden als Versuchspflanzen aufgrund ihrer Wuchsform bzw. ihrer Samenbeschaffenheit aus.

Manche der in der Literatur aufgeführten, an nährstoffarme Standorte angepasste, Pflanzenarten weisen besonders hohe Ausscheidungsraten organischer Säuren auf, wie z.B. *Banksia* spp. (Mitglied der Familie der Proteaceae) (JONES, 1998). Da es sich um busch- und baumbildende Pflanzen der südlichen Hemisphäre handelt, war *Banksia* spp. für die geplanten Versuche ungeeignet.

Auch *Lupinus albus* L. scheidet bei Phosphatmangel besonders hohe Mengen organischer Säuren aus (NEUMANN et al., 1999). *Lupinus albus* eignete sich aufgrund der Pflanzen- und Samengröße und Samenstruktur nicht für die beabsichtigte sterile Kultur. Der Lupinensamen ist recht groß und stellt einen erheblichen Phosphatspeicher dar. Ein großer Phosphatvorrat im Samen kann die Pflanze während des Jugendstadiums mit ausreichend Phosphat versorgen und sogar den Ernteertrag beeinflussen (RICHTER & ULORO, 2000). Bei *Lupinus albus* führt der große Samenspeicher dazu, dass frühestens vier bis fünf Wochen nach der Keimung eine verstärkte Abgabe organischer Säuren zu verzeichnen ist (NEUMANN et al. 1999). *Lupinus albus* war als Versuchspflanze für die hier aufgeführten Versuche deswegen nicht geeignet, da die auszuwählende Versuchspflanze nach der Keimung möglichst schnell eine verstärkte Exsudation organischer Säuren aufweisen sollte.

Ein Beispiel des Widerspruchs aus der Literatur wird im folgenden näher beschrieben. So berichteten z.B. HEDLEY et al. (1982), dass Raps bei Phosphatmangel den pH-Wert in der Rhizosphäre minderte, eine Erhöhung des Gehaltes an extrahierbaren organischen Säuren im Boden jedoch nicht festzustellen war. HOFFLAND et al. (1992) beschrieb dagegen, dass Raps unter den Bedingungen des Phosphatmangels eine verstärkte Exsudation organischer Säuren aufwies und diese maßgeblich an der Ansäuerung der Rhizosphäre beteiligt waren.

Die in der Literatur genannten Pflanzenarten und ihre dort beschriebene Reaktion auf Phosphatmangel sowie ihre Eignung für die geplanten Versuche im Kultursystem sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Angaben in der Literatur zu den Reaktionen bestimmter Pflanzenarten auf Phosphatmangel und deren Eignung für die Untersuchungen im Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme nach eigenen Untersuchungen.

<b>Pflanzenart</b>	<b>Referenz</b>	<b>Reaktion auf Phosphatmangel</b>	<b>Eignung</b>
<i>Banksia</i> spp.	Jones (1998)	Proteoidwurzelbildung mit Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Beta vulgaris</i> L.	Beißner & Römer (1999)	Aktivitätserhöhung der sauren Phosphatase	Nein
<i>Brassica napus</i> L.	Hedley et al. (1982)	Minderung des pH-Wertes durch H <sup>+</sup> -Sekretion	Nein
<i>Brassica napus</i> L.	Hoffland et al. (1992)	Minderung des pH-Wertes durch Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Lupinus albus</i> L.	Neumann et al. (1999)	Proteoidwurzelbildung mit Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Imas et al. (1997a/b)	Steigerung der Exsudation org. Säuren	Ja
<i>Medicago sativa</i> L.	Gerke (1995)	Steigerung der Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Raphanus sativus</i> L.	Zhang et al. (1997)	Steigerung der Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Trifolium arvense</i> L.	Gerke (1995)	Steigerung der Exsudation org. Säuren	Nein
<i>Zea mays</i> L.	Petersen & Böttger (1991)	Anteil der org. Säuren an der Ansäuerung der Rhizosphäre	Nein

Aufgrund solcher gegensätzlicher Angaben musste zunächst ein Versuch im Gewächshaus mit verschiedenen Pflanzenarten durchgeführt werden. Dafür wurden sieben verschiedene, in Mitteleuropa genutzte Pflanzenarten ausgesucht, die in diversen Veröffentlichungen zu verschiedenen Themen der pflanzlichen Reaktion auf Phosphatmangel und der Exsudation organischer Säuren erwähnt wurden.

Als Versuchspflanzen für den Artenvergleich wurden Luzerne, Mais, Raps, Rettich, Rotklee, Tomate und Zuckerrübe ausgewählt.

Unter den Bedingungen des Phosphatmangels erhöhten nur zwei der sieben untersuchten Arten (Luzerne und Tomate) die Exsudation organischer Säuren. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von GERKE (1995) und IMAS et al. (1997b), die ebenfalls bei diesen beiden Arten eine erhöhte Exsudation organischer Säuren unter Phosphatmangel festgestellt hatten.

Bei Mais, Raps, Rotklee und Zuckerrübe konnten dagegen in dem Artenvergleich keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtexsudation organischer Säuren zwischen ausreichender und mangelhafter Phosphatverfügbarkeit gefunden werden. Zumindest bei Raps und Rotklee steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Aussagen von HOFFLAND (1992), die bei Raps eine eindeutige Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel ermittelt hatte, und von GERKE (1995), der dieses auch bei Rotklee fand.

Zumindest bei den Ergebnissen von HOFFLAND (1992) könnten die Unterschiede zu den hier ermittelten Daten bei der Exsudation organischer Säuren des Rapses unter Phosphatmangel in der Verwendung einer anderen Phosphatquelle begründet liegen. In den Versuchen dort wurde als Phosphatquelle Calciumhydrogenphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ) eingesetzt, so dass die Ausscheidung organischer Säuren durch ihr  $\text{CaHPO}_4$ -Lösungsvermögen die Phosphatverfügbarkeit im Substrat erhöht haben mag und deswegen die verstärkte Exsudation von den Pflanzen aufrecht erhalten wurde. Im Artenvergleich wurde dagegen in der Phosphatmangelvariante kein Phosphat angeboten, so dass eine Phosphatmobilisierung durch die Exsudation organischer Säuren nicht möglich war.

In dem Artenvergleich wurde bei Rettich festgestellt, dass in der Variante ausreichender Phosphatverfügbarkeit die Exsudationsleistung eher höher als bei Phosphatmangel ausfiel. Dieses Ergebnis steht z.T. im Gegensatz zu den Aussagen von ZHANG et al. (1997). Die Autoren beschrieben in ihrem Experiment, dass die Gesamtexsudation organischer Säuren bei den Kontrollpflanzen stets niedriger lag als bei denen, die dem Phosphatmangel ausgesetzt waren. Nach einiger Zeit des Phosphatmangels, als die Pflanzen auch morphologisch einen starken Phosphatmangel aufwiesen, nahm jedoch die Menge wurzelexsudierter organischer Säuren in den Experimenten von ZHANG et al. (1997) ebenfalls signifikant ab. Die Autoren begründeten diesen Effekt damit, dass der Phosphatmangel der Pflanzen zu einer eingeschränkten Produktion und folglich auch Exsudation organischer Säuren geführt hatte. Denkbar ist, dass dieser Effekt auch im Artenvergleich bei Rettich aufgetreten ist. Demnach könnte zumindest bei Rettich, eine verstärkte Exsudation organischer Säuren nur eine vorübergehende Reaktion auf den Phosphatmangel sein. Die Probenahme im Artenvergleich wurde wahrscheinlich zu einem Zeitpunkt vorgenommen, bei dem die Exsudation der unter Phosphatmangel leidenden Pflanzen bereits abgenommen hatte. Dies ist auch bei den anderen Arten nicht auszuschließen.

Das Spektrum der ermittelten organischen Säuren in den Exsudaten der sieben Arten umfasste Acetat, *trans*-Aconitat, *Iso*-Butyrat, Citrat, Fumarat, Malat, Maleinat, Malonat, Oxoglutarat und Succinat. Die Zusammensetzung der Exsudate von Tomate unter den Bedingungen des Phosphatmangels wird im folgenden genauer beschrieben und mit den Daten aus der Literatur verglichen, da diese Art auch für die weiteren Versuche verwendet wurde.

In den Exsudaten der Tomatensorte ‚Freude‘ im Artenvergleich kamen Citrat, Fumarat, Malat, Maleinat und Succinat vor. Die Anteile von Malat und Succinat waren unter den Bedingungen des Phosphatmangels eindeutig erhöht. Der Anteil des Citrats änderte sich dagegen nicht. Monocarbonsäuren, wie Acetat und Formiat, waren nicht vorhanden.

In den Untersuchungen an *L. esculentum* Mill. von IMAS et al. (1997b) hingegen, machten bei Phosphatmangel in abnehmender Reihenfolge Fumarat, Citrat und Succinat den Hauptanteil der organischen Säuren aus, während bei hohen Phosphatgaben in den Exsudaten Succinat und Citrat überwogen. Die Monocarbonsäuren Acetat und Formiat wurden zwar von IMAS et al. (1997b) nachgewiesen, aber nicht in die Berechnungen zur Gesamtexsudation mit einbezogen, da bis dahin nicht berichtet worden war, dass Acetat und Formiat in Tomatengewebe oder Wurzelexsudaten vorkommen und die Autoren annahmen, dass sie als Degradationsprodukt anderer aliphatischer organischer Säuren anzusehen waren.

Grundsätzlich ist im Vergleich zwischen den hier vorgestellten Untersuchungen und denen von IMAS et al. (1997b) übereinstimmend festzustellen, dass die Exsudation organischer Säuren von Tomate bei Phosphatmangel erhöht ist. Die Zusammensetzung der Exsudate und die Anteile der vorkommenden organischen Säuren unterscheiden sich jedoch. Hierbei könnte es sich um Unterschiede handeln, die sortenbedingt auftraten. Der Frage der Sortenvariabilität der erhöhten Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel wurde deswegen in einem weiteren Gewächshausversuch mit acht verschiedenen Tomatensorten nachgegangen.

Die Ergebnisse aus dem Sortenvergleich verdeutlichen die unterschiedlich starken Schwankungen der einzelnen Tomatensorten in der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit. Drei der acht Sorten (,Freude‘, ,Hellfrucht‘ und ,Judy‘) waren durch eine deutliche Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit gekennzeichnet. Bei der Sorte ,San Marzano‘ war eine leichte Erhöhung der Exsudation bei Phosphatmangel festzustellen, während ,Judy-Resisto‘ eher geringere Mengen organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit ausschied. Bei den übrigen drei Sorten waren keine Unterschiede in der Exsudation organischer Säuren in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit zu erkennen. Die Ergebnisse dieses Versuches verdeutlichen, dass nur die Hälfte der eingesetzten Tomatensorten mit einer leichten, bzw. merklichen Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel reagierten.

Sofern keiner der anderen Faktoren limitierend wirkte, wäre demnach der Mechanismus der Erhöhung der Exsudation organischer Säuren nicht als generelle Reaktion der Tomate bei Phosphatmangel zu betrachten und die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren (HEDLEY et al. 1982, HOFFLAND 1992, HOFFLAND et al., 1992), die bei der Verwendung der gleichen Art aufgetreten waren, könnten folglich sortenbedingt sein. Allerdings ist in nahezu keinem der vorhergehenden Versuche eine nachvollziehbare Konstanz in der Beleuchtung der Pflanzen eingehalten bzw. angegeben worden. Bei hoher Lichtintensität und damit stärkerer Primärproduktion besteht durchaus die Möglichkeit, dass eher ein Phosphatmangel und gegebenenfalls auch eine stärkere physiologische Mangelreaktion hätte auftreten können.

Im Sortenvergleich war die Gesamtexsudation organischer Säuren der Sorte ‚Freude‘ anders als im Artenvergleich. Sie war sowohl in der Variante ausreichender Phosphatverfügbarkeit, als auch im Fall des Phosphatmangels niedriger als in dem Artenvergleich. Obwohl beide Versuche im Gewächshaus bei ähnlichen Temperaturen abgelaufen waren und das selbe Substrat verwendet worden war, könnte die Abweichung z.B. durch eine Änderung der Lichtversorgung oder anderer abiotischer Faktoren hervorgerufen worden sein (ROVIRA 1959). Trotz dieser Abweichung war auch im Sortenvergleich die Gesamtexsudation der Sorte ‚Freude‘ bei Phosphatmangel deutlich gesteigert. Auch wenn es zu den erheblichen Unterschieden der Exsudation organischer Säuren der Sorte ‚Freude‘ zwischen den Versuchen des Arten- und des Sortenvergleichs gekommen war, ergab diese Tomatensorte im Vergleich zu den anderen Sorten die stärkste Erhöhung der Exsudation unter den Bedingungen des Phosphatmangels.

Neben dem Aspekt der erhöhten Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel (IMAS et al., 1997b) sind von verschiedenen Autoren an der Tomate weitere Kriterien untersucht worden. Hierzu zählt z.B. die Phosphateffizienz, das heißt der Phosphatgehalt des Bodens, bei dem der maximale Ertrag erzielt werden kann (FÖHSE et al. (1988). Hier treten z.T. kontroverse Ansichten auf. Nach den Untersuchungen von FÖHSE et al. (1988) handelt es sich bei der Tomate im Vergleich zu Raps, Spinat und Weizen um eine Art mit geringer Phosphateffizienz. Dabei korreliert die Phosphateffizienz nach FÖHSE et al. (1988) mit der Aufnahmeeffizienz der Pflanzen, die durch das Wurzel-/Sprossverhältnis und den Influx, die Absorptionsrate pro Wurzel, bestimmt ist. Arten geringer Effizienz, haben danach niedrige Influxraten und niedrige Wurzel-/Sprossverhältnisse bei Phosphatmangel. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen können dagegen ein niedriges Wurzel-/Sprossverhältnis der Tomate unter den Bedingungen des Phosphatmangels nicht bestätigen, statt dessen wurde ein erhöhtes Wurzel-/Sprossverhältnis ermittelt. Die Absorptionsrate pro Wurzel wurde jedoch nicht bestimmt. Demnach kann eine geringe Phosphateffizienz der Tomate, wie sie FÖHSE et al. (1988) beschrieben hat, nicht uneingeschränkt bestätigt werden.

ITOH & BARBER (1983) begründeten, dass aufgrund der hohen Wurzelhaardichte und durchschnittlichen Wurzelhaarlänge von 0,43 mm in phosphatarmen Boden die Tomate eine hohe Phosphataufnahmerate bzw. Phosphateffizienz hat. Wurzelhaardichte und Wurzelhaarlänge haben aufgrund der möglichen Oberflächenvergrößerung einen generell positiven Einfluss auf die Absorptionsrate pro Wurzel. Hier kommt es zu einem Widerspruch der Daten von ITOH & BARBER (1983) und FÖHSE et al. (1988) bezüglich der Phosphateffizienz der Tomate.

Beide Autorengruppen verwendeten phosphatarmen Boden, so dass ein ähnliches Substrat gegeben war. Der Einfluss des Substrates ist damit gering. Die Unterschiede der Daten zwischen den beiden Autorengruppen könnten allerdings durch zwei Modifikationen in den Versuchen bedingt sein. Zum einen ernteten ITOH & BARBER (1983) die Pflanzen circa

20 Tage früher als FÖHSE et al. (1988), also wie auch die Pflanzen aus dieser Arbeit in einem Juvenilstadium. So besteht die Möglichkeit, dass es aufgrund des fortschreitenden Entwicklungsstadiums der Pflanzen zu Änderungen des Wurzel-/Sprossverhältnisses kommt und sich die Unterschiede zwischen den Untersuchungen von FÖHSE et al. (1988) und dieser und anderer Arbeiten erklären lassen. Eine derartige Änderung des Wurzel-/Sprossverhältnisses in Abhängigkeit von der Kulturdauer wurde auch von FORDE & LORENZO (2001) beschrieben. Zum anderen führten ITOH & BARBER (1983) ihre Versuche in einer Klimakammer durch, während FÖHSE et al. (1988) die Tomaten unter Freilandbedingungen kultivierten. Temperatur, Lichtquantität und Lichtqualität haben jedoch einen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen und ihrer begleitenden Mikroflora (ROVIRA, 1959).

An dieser Stelle wird deutlich, dass die die Phosphataufnahme beeinflussende Faktoren, einzeln ungeeignet sind, eine Art zu charakterisieren. Neben dem Kriterium der Phosphat-effizienz und der Wurzelhaardichte und -länge bestimmen diverse andere Faktoren die Phosphataufnahme. Die Zusammensetzung der Exsudate kann nach FORDE & LORENZO (2001) außer vom Genotyp (Art, Sorte) auch von diversen anderen Bedingungen abhängen. So spielt im Bereich der Pflanzenernährung neben der Phosphatverfügbarkeit auch die Stickstoffernährung eine Rolle, wie IMAS et al. (1997a) bei ammonium- und nitraternährten Tomaten bereits gezeigt hatten. Die Exsudation organischer Säuren von Tomaten war bei Angebot von Nitrat als Stickstoffquelle um ein Vielfaches höher als bei Ammonium als Stickstoffquelle.

Ebenso hat der pH-Wert des Bodens bzw. der Kalkgehalt des Bodens einen Einfluss auf die Exsudation (STRÖM et al. 1994) sowie Eisenmangel (OHWAKI & SUGAHARA, 1997) und auch Aluminiumstress (ZHENG et al., 1998). Weitere Einflussgrößen sind das Pflanzenalter (ROVIRA, 1959), die Zeit seit dem Beginn des Phosphatmangels (ZHANG et al., 1997), die Stärke des Phosphatmangels (RATNAYAKE et al., 1978), die Anwesenheit von Mikroorganismen (DEUBEL, 1996) und abiotische Faktoren wie z.B. Licht und Temperatur (ROVIRA, 1959; LYNCH, 1990). Um für die hier vorgestellten Versuche die Zahl der möglichen Einflussfaktoren so gering wie möglich halten zu können, wurden die folgenden Untersuchungen in einem sterilen Kultursystem in einer Klimakammer oder einem Klimaschrank bei gleichbleibenden Temperatur- und Lichtbedingungen durchgeführt.

### 5.1.2 Vergleich zweier Mikroorganismenisolate

Manche Mikroorganismen können das Pflanzenwachstum verbessern (RICHARDSON, 2001), dazu gehören u.a. Pseudomonaden, (DEUBEL, 1996, SØRENSEN et al., 2001) und Vertreter der Gattung *Gordonia* (TAKEUCHI & HATANO, 1998, MARINO, 2000). Als mögliche Mechanismen werden Stickstofffixierung, die Produktion von Phytohormonen, Pathogenabwehr und auch Phosphatsolubilisierung diskutiert (DEUBEL, 1996, DE FREITAS et al., 1997). Die Reaktionen des aus der Rhizosphäre von *Gossypium* sp. von LOPER & LINDOW (1994) isolierten *P. fluorescens* Pf-5 und des von MARINO (2000) aus der Rhizosphäre von *Theobroma grandiflorum* isolierten Phosphatsolubilisierers *Gordonia* sp. auf schwer lösliches Phosphat wurden in dieser Arbeit überprüft.

*P. fluorescens* Pf-5 zeigte in der Flüssigkultur eine unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit hohe Exsudation organischer Säuren mit einem hohen Citratanteil von circa 90 % und eine Absenkung des pH-Wertes von 6,0 in den Bereich 3,5 bis 4,0. Nach DYE (1995) können Pflanzen mit hoher Citratexsudation mehr schwer verfügbares Phosphat nutzbar machen, als Pflanzen mit geringer Citratexsudation. Gleiches gilt vermutlich für Mikroorganismen. Die große Bedeutung von Citrat für die Phosphatsolubilisierung ist darauf zurückzuführen, dass Citrat gelöstes Eisen komplexiert und ein Ausfällen von Eisenphosphaten aus der Bodenlösung gemindert wird. Zudem führt Citrat zur Phosphatdesorption von sorbierenden Oberflächen durch Anionenaustausch. Für jedes organische Anion ist dabei die Wahrscheinlichkeit zur Desorption von Phosphat bei dem pH-Wert am höchsten, der mit dem zweiten pK-Wert der korrespondierenden Säure übereinstimmt (NAGARAJAH et al., 1970). Die pK-Werte von Citrat (25 °C) liegen bei den pH-Werten 3,1, 4,8 und 6,4. Die Senkung des pH-Wertes in den Flüssigkulturen von *P. fluorescens* Pf-5 auf Werte zwischen 4,0 bis 3,5, die bei allen Phosphatvarianten beobachtet wurde, würde daher die Desorption von Phosphat durch Citrat zusätzlich anheben. Außerdem ist bei niedrigen pH-Werten die Festigkeit des Fe-Citrat-Komplexes erhöht (JONES et al., 1996), so dass das chelatisierte Eisen in diesem pH-Bereich in Lösung bleibt und zur Phosphatfällung nicht weiter zur Verfügung steht.

Die im Vergleich zu den Kontrollkolben mit leicht löslichem Phosphat geringeren Konzentration organischer Säuren in den Lösungen der goethithaltigen Kolben können nach GERKE (1995) darauf zurückgeführt werden, dass die Säuren an das Goethit sorbiert werden. Falls die hohe Citratexsudation und die pH-Absenkung durch *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 auch in der Rhizosphäre auftreten sollte, könnte dieser Mikroorganismus die Phosphatlöslichkeit im Substrat und damit unter Umständen auch die Phosphatverfügbarkeit für die Pflanzen erhöhen.

Neben der Exsudation organischer Säuren und der Modifikation des pH-Wertes in den Lösungen wurde die Aktivität der alkalischen Phosphomonoesterase von *P. fluorescens* Pf-5 bestimmt. Das Enzym kann organisch gebundenes Phosphat mobilisieren. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann als Indikator für Phosphatmangel dienen, denn nach HUANG et al. (1998) nimmt die Aktivität der alkalischen Phosphatase linear mit der Ausprägung des Phosphatmangels zu. Die starke Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

von *P. fluorescens* Pf-5 in der Variante des an Goethit sorbierten Phosphats in der Flüssigkultur kann daher als Anzeichen eines Phosphatmangels der Zellen gesehen werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist darauf zu achten, dass dieses Enzym in der Flüssigkultur nicht dem pH-Bereich der höchsten Enzymaktivität (pH 9,0) ausgesetzt war. Statt dessen zeigt dieses Ergebnis viel eher die „Bereitschaft“ der Zellen unter Phosphatmangel organisch gebundenes Phosphat mit Hilfe des Enzyms verfügbar zu machen. Die hohen Aktivitätswerte der alkalischen Phosphatase von *P. fluorescens* Pf-5 in der goethithaltigen Lösung veranschaulichen daher nicht die tatsächlichen Mobilisierungsraten organisch gebundenen Phosphats, sondern den starken Phosphatmangel der Zellen. Demnach war in der goethithaltigen Lösung für *P. fluorescens* Pf-5 ein ausgeprägter Phosphatmangel gegeben. Dies ist ein Hinweis darauf, dass trotz der möglichen verstärkten Mobilisierung des an Goethit sorbierten Phosphats durch die hohen Mengen exsudierten Citrats den Zellen nicht genügend Phosphat zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse der Flüssigkultur können nur bedingt auf die Wirkung von *P. fluorescens* Pf-5 auf das Pflanzenwachstum und die Phosphatsolubilisierung in der Rhizosphäre übertragen werden. Dort liegen neben dem in der Flüssigkultur angebotenen Substrat Glucose noch weitere von der Pflanze freigesetzte Zucker vor, wie auch organische Säuren und Aminosäuren, phenolische Substanzen, Vitamine und Signalstoffe (LUGTENBERG et al., 1999). Die Erweiterung und Veränderung der Zusammensetzung dieser Substanzen hat einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, die Populationsdichte der Mikroorganismen und ihr Phosphatlösungsvermögen. So konnten DEUBEL et al. (2000) bei dem *Pseudomonas fluorescens* Stamm PsIA 12 bei Angebot von Pentosen bzw. einer Zuckergarnitur von Phosphatmangelpflanzen ein geringeres Phosphatlösungsvermögen von Tricalciumphosphat feststellen als unter Verwendung von Glucose. Das Phosphatlösungsvermögen anderer Mikroorganismen (*Pantoea agglomerans* D5/23; *Azospirillum* sp. CC 322) wurde dagegen durch das Angebot der Pentosen erhöht. Weicht die Zuckerzusammensetzung in der Rhizosphäre der Pflanzen von der für den entsprechenden Mikroorganismus passenden Zuckerzusammensetzung für ein hohes Phosphatlösungsvermögen ab, so ist die Phosphatsolubilisierung durch den Mikroorganismus eingeschränkt (DEUBEL et al., 2000). Folglich ist das Phosphatlösungsvermögen eines Mikroorganismus von den verschiedensten Parametern und von der Gattung des Mikroorganismus abhängig.

Der Actinomycet *Gordonia* sp. schied im Vergleich zu *P. fluorescens* Pf-5 in der Flüssigkultur nur geringe Mengen organischer Säuren aus. Die Desorption von Phosphat und Solubilisierung von Eisen durch organische Säuren ist bei *Gordonia* sp. daher vermutlich gering. In allen drei Varianten der Flüssigkultur von *Gordonia* sp stiegen die pH-Werte von 6,0 auf 7,0 bis 7,5. Aufgrund der geringen Stabilität des Eisen-Citrat-Komplexes bei hohen pH-Werten (JONES et al. 1996) wäre die phosphatmobilisierende Wirkung von Citrat in den Kulturen von *Gordonia* sp. limitiert. Nach BAR-YOSEF (1991) kann, unabhängig vom Citratgehalt der Lösung, eine Erhöhung des pH-Wertes in den Bereich des Alkalischen zu einer Lösung des Goethits und somit zu einer Freisetzung des sorbierten und ok-

kludierten Phosphats führen. So wurde in einer Untersuchung von BOWDEN et al. (1980) in einer Goethitsuspension ( $5,6 \text{ l g}^{-1}$ , Ausgangsgehalt  $0,2 \text{ mmol P g}^{-1}$  Oxid) bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 6,0 auf 7,0 die Phosphatkonzentration in der Lösung um ca.  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  erhöht. Die Alkalisierung des Mediums durch *Gordonia* sp. könnte somit eine Mobilisierung von Phosphat mit sich bringen.

Bei Angebot von an Goethit sorbierten Phosphats war in der Flüssigkultur auch hier wie bei *P. fluorescens* Pf-5 die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zu leicht löslichem Phosphat stark erhöht.

Bei beiden Mikroorganismenisolaten war in der Goethit-Variante an der Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase ein starker Phosphatmangel der Zellen zu erkennen. Die Flüssigkulturversuche machten deutlich, dass beide Mikroorganismenisolate ein Potential zur Phosphatmobilisierung haben. Allerdings sind die Mechanismen zur Phosphatmobilisierung z.T. gegensätzlich. Während *P. fluorescens* Pf-5 durch eine Senkung des pH-Wertes und eine starke Exsudation von Citrat die Freisetzung von Phosphat aus Goethit durch Desorption und Eisenkomplexierung erhöhte, führte die Alkalisierung des Mediums durch *Gordonia* sp. zu einer Auflösung des Goethits und somit ebenfalls zu einer Freisetzung von Phosphat.

## 5.2 System zur sterilen Anzucht

Die in den Gewächshausversuchen verwendete Methode zur Gewinnung von Wurzelexsudaten war für die weiteren Versuche zur Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel ungeeignet. Um die Abstauchlösungen gewinnen zu können, mussten die Pflanzen aus den Töpfen genommen und die Wurzeln vom anhaftenden Sand befreit werden, bevor sie in Wasser getaucht werden konnten. Bei dieser Art der Vorgehensweise sind Wurzelverletzungen nicht auszuschließen. Es besteht die Gefahr, dass nicht nur die reine Exsudation gemessen wird, sondern aus verletzten Wurzelzellen austretender Zellinhalt die Ergebnisse verfälscht (SCHACHTMAN et al., 1998). Für die weiteren Versuche war es deshalb unabdingbar, eine verletzungsfreie Gewinnung der Wurzelexsudate vornehmen zu können.

Für die Untersuchungen zum Einfluss schwer verfügbaren Phosphats auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen wurde ein System zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen entwickelt. In den Experimenten wurde am Ende der Kulturzeit die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ und zweier Mikroorganismenisolate bei Angebot schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass das System eine sichere sterile Anzucht von Versuchspflanzen über den Zeitraum von einigen Wochen erlaubt.

### 5.2.1 Kriterien für den Aufbau des Kultursystems

Verschiedene Kriterien mussten für das Kultursystem zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme berücksichtigt werden. Dazu gehörte:

- Eine sterile Anzucht der Pflanzen über einen Zeitraum von mehreren Wochen.
- Eine gute Durchwurzelbarkeit des Substrates für ein uneingeschränktes Wurzelwachstum.
- Ein geringes Volumen, so dass das gesamte Substrat als wurzelnahes Substrat betrachtet werden konnte.
- Eine Belüftung zur Vermeidung anoxischer Zustände.
- Eine für die Pflanzenwurzeln verletzungsfreie Gewinnung der Exsudate aus dem Kultursystem.

Eine sterile Anzucht und Kultur der Pflanzen ist über einen Zeitraum von mehreren Wochen in dem Kultursystem möglich. Der Aufbau des Kultursystems erlaubte eine Beprobung des ungestörten Wurzelsystems. Die Beprobung des gesamten Wurzelsystems kann allerdings zu einer Unterbewertung der Exsudationsleistung der Organismen in monaxenischer Kultur geführt haben. Denn bei der Bestimmung der Exsudation organischer Säuren treten nach JONES et al. (1996) Fehler sowohl bei der Messung ganzer Wurzelsysteme (Unterbewertung) als auch bei der Messung bestimmter Wurzelzonen (Überbewertung) auf, weswegen es wichtig ist jeweils die Bemessungsgrundlage anzugeben. Bei der mon-

axenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ blieb die Sterilität der Lösungen über den gesamten Versuchsverlauf und auch den Zeitraum der Beprobung im Anzuchtssystem gewahrt, womit Verluste durch einen möglichen mikrobiellen Abbau an wasserlöslichen Substanzen in den Exsudaten verhindert wurden. In den Untersuchungen der Dualkultur war dagegen die Metabolisierung exsudierter organischer Substanzen durch die eingesetzten Mikroorganismen nicht zu verhindern.

Eine gute Durchwurzelbarkeit des Substrates wurde durch eine Mischung von Sand zweier Korngrößen gewährleistet. Quarzsandkulturen wurden auch von GERKE (1995) und SIMONS et al. (1996) in Versuchen zur Exsudation organischer Säuren bzw. zur Rhizosphärenkolonisation von Bakterien verwendet. Der Quarzsand wurde für die Versuche mit 12 Gewichtsprozenten Nährlösung angereichert, so dass das Substrat den Pflanzen und Mikroorganismen auf diese Weise eine bis auf Phosphat ausreichende Versorgung mit Nährstoffen bot. Grobsand allein weist eine zu niedrige Wasserhaltekapazität auf, wodurch das Substrat zu schnell ausgetrocknet wäre. Die Teilchengröße des eingesetzten Mittelsandes hätte bei ausschließlicher Verwendung zu einer Verdichtung des Substrates führen können. Die Mischung der Sände garantierte eine gute Durchwurzelbarkeit des Substrates für die Pflanzenwurzeln in Verbindung mit einer ausreichenden Wasserversorgung.

Nicht nur für die Durchwurzelbarkeit, auch in bezug auf das nur in geringen Mengen im System befindliche Phosphat war eine Mischung der Sände von Vorteil, da dadurch ein Gemisch verschieden großer Poren entsteht. Nach SCHACHTSCHABEL & BEYME (1980) wird lösliches Phosphat, das einem Boden zugefügt wurde, zunächst an der Oberfläche der Sorbentien adsorbiert oder als Calciumphosphat gefällt. Dieses so gebundene Phosphat bestimmt das Phosphatgleichgewicht mit der Bodenlösung. Im Laufe der Zeit geht ein Teil des Phosphats in eine stärkere Bindung über, ein weiterer Teil diffundiert durch feine Poren in das Innere der Sorbentien und steht dann mit der Lösung nicht mehr in direktem Gleichgewicht. Kommt es zur Absenkung der Phosphatkonzentration in der Lösung, z.B. durch Pflanzenentzug, diffundiert Phosphat aus dem Inneren der Sorbentien wieder nach außen. Die langsame Einstellung des Gleichgewichts bei der Phosphatadsorption und -desorption wird demnach durch die Geschwindigkeit der Phosphatdiffusion bedingt, die von der Größe und Form der Diffusionsräume abhängt (SCHACHTSCHABEL et al., 1989).

In dem Kultursystem sollte ein Kompromiß gefunden werden zwischen einem möglichst geringen Volumen und der Möglichkeit den Pflanzen ein natürliches Wurzelwachstum zu erlauben. Aufgrund der schmalen Röhrenform wurde mit der Tomatensorte ‚Freude‘ eine Versuchspflanze mit vornehmlich geotropen Wurzelwachstum gewählt. Bei Versuchsende war das Substrat stark durchwurzelt und der gesamte Inhalt der Röhren konnte als wurzelnahes Substrat betrachtet werden. Der Arbeit von JONES et al. (1996) zur Folge beträgt die Diffusion von organischen Säuren unter den Bedingungen des Phosphatmangels pro 24 Stunden Exsudation in Abhängigkeit von der Entfernung von der Wurzel bis zu  $0,4 \mu\text{mol} (\text{cm Boden})^{-3}$ . Die meisten organischen Säuren verbleiben dabei im Bereich bis 1 cm Entfernung von der Wurzeloberfläche (JONES et al., 1996). Auch aus diesem Grund war es notwendig, das Substratvolumen in den Versuchsröhren möglichst gering zu halten,

damit der überwiegende Anteil des goethithaltigen Sandes durch die Wurzeln beeinflusst und als wurzelnaher Boden bezeichnet werden konnte.

Eine Belüftung des Substrates mit Kohlendioxid verarmter Luft war unbedingt zur Vermeidung anoxischer Zustände notwendig. Sauerstoffmangel im Kultursystem hätte zu Änderungen in der Zusammensetzung der organischen Säuren in den Exsudaten führen können. Nach RICARD et al. (1994 IN: JONES, 1998) ändert sich unter Sauerstoffmangel der Metabolismus in den Wurzeln, so dass große Mengen von Lactat entstehen und in die Rhizosphäre abgegeben werden. Folglich könnte Lactat in der Rhizosphäre als Indikator für eine Anoxie gewertet werden. In den aufgeführten Experimenten im Kultursystem wurde kein Lactat gefunden, so dass eine Anoxie der Wurzeln ausgeschlossen werden kann.

Die verwendeten Rhizosphärenmikroorganismen sind Aerobier und sollten auf keinen Fall neben dem Phosphatmangel einem weiteren Stressfaktor wie einer Sauerstoffarmut ausgesetzt werden. Nach SØRENSEN et al. (2001) reguliert und limitiert Sauerstoffmangel die mikrobielle Aktivität und zwingt die Mikroorganismen von einem aeroben zu einem anaeroben Metabolismus. Das wiederum führt nach LYNCH (1990) zu einer Ausscheidung der Mikroorganismen von Essig- und Buttersäure und verfälscht die eigentliche Zusammensetzung der Exsudate. Vorkehrungen zur Belüftung der Sterilkultur wurden von SIMONS et al. (1996) bei den Versuchen zur Kolonisation der Rhizosphäre von Tomate durch Mikroorganismen dagegen nicht getroffen. Diese Versuche verliefen jedoch ausschließlich über einen Zeitraum von wenigen Tagen und nicht über eine oder mehrere Wochen, so dass der sich im Substrat befindliche Sauerstoff dort für den Versuchszeitraum ausgereicht haben mag, eine Anoxie zu verhindern.

Neben der Änderung der Zusammensetzung der organischen Säuren und des Metabolismus der Mikroorganismen, hätte ein Mangel an Sauerstoff im Kultursystem zu einer Verfälschung der Phosphatwerte in den Lösungen führen können, da als Phosphatquelle schwer lösliches, an das Eisenoxid/-hydroxid Goethit, sorbiertes Phosphat verwendet wurde. Nach GERKE (1995) erhöht ein niedriges Redoxpotential im Substrat die Löslichkeit des an Eisenoxide gebundenen Phosphats. Denn im reduzierenden Milieu werden Eisen-(III)-oxide unter Freisetzung der an sie gebundenen Phosphationen zu Eisen-(II)-verbindungen umgewandelt (SCHACHTSCHABEL et al., 1989). Folglich wäre es bei anaeroben Bedingungen in dem Kultursystem zu einer Erhöhung der Phosphatwerte in den Lösungen gekommen.

Außerdem wird bei der Belüftung des Wurzelbereiches mit Kohlendioxid verarmter Luft eine Absenkung des pH-Wertes durch möglicherweise aus Kohlendioxid entstehender Kohlensäure verhindert bzw. gemindert.

### 5.2.2 Sorption von Phosphat und organischen Säuren im Kultursystem

In dem unter sterilen Bedingungen im Kultursystem durchgeführten Versuch des Abschnittes 4.2.2.1 wurde eine starke Sorption des in leicht löslicher Form zugefügten Phosphats an das Substrat Sand festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von anderen Autoren (z.B. GERKE, 1993, 1995, JONES, 1998; SCHACHTMAN et al., 1998, SCHACHTSCHABEL et al., 1989).

Von dem zugefügten Phosphat waren nach einer Woche Inkubationszeit zwei Drittel der eingesetzten Menge in den wässrigen Lösungen gelöst, bzw. in pflanzenverfügbarer Form (DL-löslich) an den Sand, die Glasperlen, die Steinwolle und das Filterpapier gebunden messbar. Aufgrund der bestätigten Sterilität des Systems ist ein mikrobieller Abbau des fehlenden eingebrachten Phosphats auszuschließen. Das übrige Drittel Phosphat muss demzufolge in einer nicht wasser- und DL-löslichen Form an die Bestandteile des Kultursystems gebunden worden sein. Damit ist es in eine Form schwerer verfügbaren Phosphats übergegangen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bei SCHACHTSCHABEL et al. (1989) aufgeführten Versuchen zur Phosphatsorption. Dort wurde ein Boden mit gelöstem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  versetzt und in feuchtem Zustand bis zu 200 Tage reagieren gelassen. In den ersten 20 Tagen nahm die Phosphatkonzentration der Lösung schnell ab, was auf eine Adsorptionsreaktion zurückgeführt wurde.

Die Phosphorkonzentration in den Lösungen der sterilen Kontrollröhren ohne Goethit nahm, unabhängig von der Ausgangskonzentration des beigefügten Phosphors (2,2 bis  $8,8 \mu\text{g P ml}^{-1}$ ), nach drei bis vier Tagen auf einen Wert von  $0,4 \mu\text{g P ml}^{-1}$  ab. Diese Phosphorkonzentration entspricht demnach der Gleichgewichtskonzentration in dem Kultursystem ohne Goethit. In den nachfolgenden Versuchen zur Sorption organischer Säuren an goethithaltigen Sand konnten in den Lösungen der sterilen Kontrollkolben nur 16 bis  $22 \text{ ng P ml}^{-1}$  analysiert werden. Das entspricht lediglich 4 bis 5 % der Konzentration der Lösungen im Sand ohne Goethit. Hier wird die Funktion des Goethits als starkem, die Phosphatverfügbarkeit einschränkenden Sorbens deutlich.

In dem Versuch zum Phosphatbindungsvermögen der Röhrenbestandteile waren 94 % des nach der Inkubation DL-löslichen Phosphats im Sand gebunden, weitere 5 % konnten in der Fraktion der Glasperlen gefunden werden. Der Restanteil von 1 % fiel auf das Filterpapier und die verwendete Steinwolle. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen, dass das in den Sand eingebrachte Phosphat in diesem verbleibt und nicht im Kultursystem verlagert wird. Zum anderen beweisen die niedrigen Phosphatwerte des Filterpapiers, der Glasperlen und der Steinwolle deren geringes Phosphatsorptionsvermögen. Fast das gesamte pflanzenverfügbare Phosphat befand sich in dem Substrat Sand.

In den Versuchen führte eine Addition organischer Säuren zum goethithaltigen Sand zu einer Erhöhung der Phosphorkonzentration in den wässrigen Lösungen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Phosphorkonzentration der Testlösungen um das Drei-

bis Siebenfache gestiegen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Experimenten von GERKE (1995), in denen die Phosphorkonzentration in der Gleichgewichtslösung um so höher lag, je höher der adsorbierte Anteil einer zugefügten, organischen Säure (Citrat) war. In dem Kultursystem kam es zu einer Verdrängung von sorbiertem Phosphat von den Sorptionsplätzen des Goethits durch die zugefügten, organischen Säuren. Die Phosphatverfügbarkeit in dem Kultursystem stieg durch die organischen Säuren an.

Die in die Versuchsröhren eingebrachten organischen Säuren wurden unterschiedlich stark an den Sand und das Goethit gebunden. Lediglich 1 % des zugefügten Citrats und Malats war nach einer Woche noch gelöst bzw. wasserlöslich. Ein Anteil von 4 % des Fumarats, jedoch 11 % des Succinats waren analysierbar. Diese Unterschiede in der Wiederfindung erklären sich aus der verschieden starken Sorption der einzelnen organischen Säuren an das goethithaltige Substrat und aus den Sorptionsbedingungen. Nach GERKE (1995) sind die effektivsten Säuren der Phosphatmobilisierung aus Eisen- und Aluminiumoxiden in abnehmender Effizienz Citrat, Oxalat, Malonat, Tartrat und Malat. Während Citrat und Malat in den Versuchen zur Sorption ebenfalls benutzt worden sind und beide gleichermaßen stark sorbiert wurden, wurden die übrigen von GERKE (1995) genannten organischen Säuren nicht verwendet. Statt dessen wurden Fumarat und Succinat gewählt, da diese in den Wurzelexsudaten der Tomaten in den Gewächshausversuchen vorkamen.

Der Gehalt an Formiat wurde sowohl in den sterilen Kontrollröhren als auch in den Versuchsröhren mit  $61 \mu\text{g} \cdot \text{Röhre}^{-1}$ , entsprechend  $0,9 \mu\text{mol l}^{-1}$ , bestimmt. Das Formiat muss in dem Ausgangsmaterial, dem gewaschenen Sand, vorhanden gewesen sein und ist in die Versuche mit eingebracht worden. Auch HEDLEY et al. (1982) fanden, dass in nicht inkubiertem Kontrollboden organische Säuren vorhanden waren. Der Ursprung des Formiats in dem für die Versuche verwendeten Sand ist nicht bekannt. Den Ausführungen von IMAS et al. (1997b) zur Folge könnte es sich dabei um ein Abbauprodukt anderer organischer Säuren handeln. Nach AHONEN-JONNARTH et al. (2000) besteht ebenso die Möglichkeit, dass das Formiat ein Stoffwechselprodukt von formiatproduzierenden Mikroorganismen, wie z.B. dem Mykorrhizapilz *Rhizopogon roseolus*, ist, die vor dem Autoklavieren in dem Sand gelebt hatten.

Grundsätzlich ist mit diesen Experimenten die phosphatmobilisierende Wirkung der organischen Säuren aus einer schwer verfügbaren Phosphatquelle (Phosphat sorbiert an Goethit) bestätigt worden. Da der Sand die zugefügten organischen Säuren in unterschiedlichen Anteilen sorbiert und diese Anteile von der Zusammensetzung der Exsudate und den Sorptionsbedingungen abhängt, ist eine Bilanzierung des durch organische Säuren mobilisierten Phosphats in dem Kultursystem nicht möglich.

### **5.3 Wirkung von schwer löslichem Phosphat auf die Tomatensorte ‚Freude‘ und zwei verschiedene Mikroorganismenisolate in monaxenischer und dualer Kultur**

Die Tomatensorte ‚Freude‘ und die beiden Mikroorganismenisolate *P. fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. sollten getrennt von einander im sterilen Kultursystem bei Angebot schwer verfügbaren, an Goethit sorbierten Phosphats untersucht werden. Die bisherigen Versuche fanden, im Fall der Pflanzen, unter unsterilen Bedingungen statt. Dabei ist es möglich, dass ein Teil der von den Wurzeln exsudierten organischen Säuren während der Probenahme von anhaftenden Mikroorganismen metabolisiert und somit die Exsudationsleistung der Pflanzen unterschätzt worden ist. In der monaxenischen Kultur sollte dieser Faktor ausgeschlossen werden.

Als Stickstoffquelle wurde in allen Fällen Nitrat eingesetzt. IMAS et al. (1997a) zeigten, dass Tomatenpflanzen bei Angebot von Nitrat als Stickstoffquelle, die Exsudationsleistung organischer Säuren erhöhen, wohingegen bei der Versorgung mit Ammonium die Exsudation verringert wurde. Eine durch die Stickstoffquelle bedingte Minderung der Exsudation sollte deshalb von vornherein durch die Wahl des Nitrats für die Versuche im Kultursystem vermieden werden. Auch eine Absenkung des pH-Wertes in für die Pflanzen toxische Bereiche wurde vermieden, indem Nitrat als Stickstoffquelle verwendet wurde, da die Aufnahme von Nitrat, im Gegensatz zu der von Ammonium zu einer Alkalisierung der Rhizosphäre führt (BUSCH & BOETTGER, 1997; KIRK et al., 1999).

Um die Exsudationsleistung der Mikroorganismen in dem Kultursystem abschätzen zu können, wurden diese für eine Woche ohne Pflanzen aber mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Kultursystem inkubiert. Die beiden ausgewählten Mikroorganismenisolate waren in der Flüssigkultur zwar unter monaxenischen Bedingungen gewachsen, durch die Rotationsbewegung des Schüttlers lagen die Nährstoffe dort für die Mikroorganismen jedoch stets leicht verfügbar vor. In der durchlüfteten Sandkultur des Anzucht-systems sind die Nährstoffe dagegen nur bedingt gelöst. Sie sind im Substrat sorbiert und damit schwerer verfügbar. Durch die Sorption kann es im Gegensatz zur Flüssigkultur zu einer räumlichen Trennung zwischen Nährstoffen und Mikroorganismen gekommen sein.

### 5.3.1 Monaxenische Kulturen

#### 5.3.1.1 Die Tomatensorte ‚Freude‘ in monaxenischer Kultur

In der Gewächshauskultur wurde unter den Bedingungen des Phosphatmangels eine erhöhte Exsudation organischer Säuren bei der Tomatensorte ‚Freude‘ dokumentiert. Im Gegensatz dazu wurde ein derartiges Ergebnis in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ in den Versuchsröhren bei Angebot schwer löslichen Phosphats nicht festgestellt. Statt dessen lagen die ermittelten Werte sogar weit unterhalb der Exsudation organischer Säuren der Sorte ‚Freude‘ im Gewächshaus bei ausreichender Phosphatversorgung. Als Hauptgrund für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist die unterschiedliche Art der Exsudatgewinnung im Kultursystem im Vergleich zu den Experimenten im Gewächshaus anzunehmen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass trotz des Einsatzes schwer löslichen, an Goethit sorbierten Phosphats in dem sterilen Kultursystem kein Phosphatmangel aufgetreten ist. In Bezug auf die Änderungen der Exsudatgewinnung müssen vier Gründe in Betracht gezogen werden.

Als erster Punkt ist zu nennen, dass selbst bei sehr vorsichtigem Freipräparieren der Wurzeln Verletzungen der Wurzeln nicht auszuschließen sind (GRANSEE & WITTENMAYER, 2000, JONES, 1998, SCHACHTMAN et al., 1998). Daher wurde im Gewächshausversuch nicht nur die reine Exsudation sondern z.T. auch der Inhalt beschädigter Wurzelzellen mit erfasst. Bei dem sterilen Kultursystem verblieben die Wurzeln dagegen intakt. Es wurde also ausschließlich die Exsudation der Wurzeln ermittelt.

Der zweite Punkt betrifft das größere Lösungsvolumen der Sammelgefäße von 50 ml im Gewächshausversuch, welches vermutlich zu den erhöhten ‚Exsudationsraten‘ in dem deionisierten Wasser führte. Nach JONES (1998) ist die Exsudationsleistung einer Pflanze um so höher, je niedriger die Ionenkonzentration der Außenlösung ist. In dem sterilen Kultursystem waren etwa 25 bis 30 ml Lösungsvolumen vorhanden, wovon ca. 20 ml mit der Exsudatprobe abgezogen wurden. Da sich im Substrat Nährsalze befanden ist allein deswegen eine höhere Konzentration in der Außenlösung des sterilen Kultursystems im Vergleich zu den Abstauchlösungen gewährleistet. Folglich fällt die Exsudation organischer Säuren im sterilen Kultursystem niedriger aus als in den Gewächshausexperimenten.

Als dritter Aspekt der Änderung der Exsudatgewinnung ist zu nennen, dass die abgegebenen Säuren im Gewächshausversuch frei in der Lösung verblieben, während sich im Sorptionsversuch des sterilen Kultursystems zeigte, dass ein großer Teil der organischen Säuren an den Sand und das Goethit im Kultursystem sorbiert werden. Selbst bei gleichbleibender Exsudationsleistung der Pflanzen wären somit niedrigere Konzentrationen organischer Säuren in dem Kultursystem messbar.

Der vierte Grund betrifft die Anwesenheit von Mikroorganismen im Gewächshausversuch, die zu einer nachhaltigen Erhöhung der Exsudationsraten der Wurzeln geführt haben können, da die Metabolisierung organischer Säuren durch die Mikroorganismen die Exsudation steigert. Diese Stimulation könnte sich noch während der Gewinnung der Abstauchlö-

sungen ausgewirkt haben, wohingegen in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ im Kultursystem dieser Einfluss ausgeschlossen werden kann.

Die zweite Ursache, warum die Exsudation organischer Säuren im sterilen Kultursystem niedriger ausgefallen ist als in den Gewächshausexperimenten, beruht auf der Annahme, dass kein wirklicher Phosphatmangel der Pflanzen bestanden haben könnte. Schließlich war die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ in den Gewächshausversuchen bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit deutlich niedriger als bei Phosphatmangel. Während jedoch in den Gewächshausversuchen bei der Phosphatmangelvariante kein Phosphat aus dem Substrat mobilisiert werden konnte, bestand in dem sterilen Kultursystem die Möglichkeit Phosphat von dem Goethit zu desorbieren. Trotz der geringen Exsudation in dem sterilen Kultursystem muss davon ausgegangen werden, dass die Pflanzen einem Phosphatmangel ausgesetzt waren. Denn nach RÖMER & SAMIE (2001) ist das nicht spezifisch an Eisenoxid/hydroxid sorbierte Phosphat und somit die alleinige Phosphatquelle im Kultursystem sehr fest gebunden und wird nicht kurzfristig freigesetzt.

Für einen ausgesprochenen Phosphatmangel der Pflanzen im Kultursystem zum Zeitpunkt der Exsudatgewinnung und Ernte sprechen verschiedene morphologische Merkmale der Pflanzen. Bei der Sorte ‚Freude‘ wurde vermerkt, dass die Keimblätter und z.T. auch die ersten Laubblätter bereits abgefallen waren. Dieses Erscheinungsbild ist in Übereinstimmung mit den Aussagen von BIELESKI (1973), der nach einer Translokation von Phosphat aus älteren in die juvenilen Bereiche der Pflanze einen Abwurf der ältesten Blätter feststellte. Weitere Anzeichen für den eindeutigen Phosphatmangel der Pflanzen in dem Kultursystem sind der gestauchte Wuchs der Sprosse und die nekrotischen Blätter sowie die rötlich-lila Färbung der Laubblätter. Gleiche Symptome eines Phosphatmangels wurden von GRINSTED et al. (1982), NEUMANN & RÖMHELD (1999) und GAUME et al. (2001) aufgeführt.

Die bisher aufgezählten morphologischen Symptome des Phosphatmangels betrafen den Spross der Pflanzen. Wäre der Wurzelbereich durch den Phosphatmangel ebenfalls im Wachstum stark eingeschränkt gewesen, hätte die exsudierende Oberfläche zu gering sein können, um messbare Mengen organischer Säuren zu produzieren. Es kam jedoch zu einem ausgeprägten Längenwachstum und zu einer starken Verzweigung der Wurzeln und daher vielen Wurzelspitzen im Kultursystem. Die Erweiterung des Wurzelsystems gilt ebenfalls als Symptom eines ausgeprägten Phosphatmangels (GAUME et al., 2001). Nach GERKE et al. (2000a/b) ist die Exsudation organischer Säuren bei Pflanzen, die keine Proteoidwurzeln bilden, auf die Wurzelspitze bzw. die Region kurz dahinter (1,5 cm) beschränkt. Durch die starke Wurzelverzweigung der Tomatensorte ‚Freude‘ im Kultursystem war folglich eine erhöhte Anzahl von Plätzen, an denen eine Exsudation organischer Säuren stattfinden konnte, gewährleistet. Infolgedessen sollte sich eine effektive Exsudation im Kultursystem ergeben haben.

Die stärkste Seitenwurzelbildung in den Versuchsröhren des Kultursystems erfolgte am unteren Ende der Röhren, in dem sich Goethit und damit auch sorbiertes Phosphat gesammelt hatte. Diese räumliche Nähe zwischen exsudierenden Wurzelspitzen und dem sorbierten Phosphat sollte nach LYNCH (1995) signifikant zur Effizienz des Wurzelwachstums beigetragen haben.

Neben den morphologisch eindeutigen Symptomen des Phosphatmangels der Tomaten sprechen auch die Phosphatgehalte der Wurzeln und Sprosse für einen ausgeprägten Phosphatmangel der Pflanzen. Demnach ist die geringe Exsudationsrate organischer Säuren im monaxenischen Kultursystem im Vergleich zu dem Gewächshausversuch nicht auf eine ausreichende Versorgung mit Phosphat zurückzuführen und kann hauptsächlich durch die unterschiedliche Art der Exsudatsammlung erklärt werden.

#### **5.3.1.2 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in monaxenischer Kultur**

Die Ergebnisse von *P. fluorescens* Pf-5 in monaxenischer Sandkultur unterschieden sich hinsichtlich des pH-Wertes der Lösungen, der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Exsudation organischer Säuren stark von den Ergebnissen des selben Organismus in der Flüssigkultur. Als Hauptgründe für die geringere Auswirkung der Kultur von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 im Versuchssystem im Vergleich zur Flüssigkultur sind zum einen eine geringere Population der Mikroorganismen und zum anderen eine höhere Pufferkapazität des goethithaltigen Sandes für Protonen, Phosphat und organische Säuren zu nennen.

In der Flüssigkultur von *P. fluorescens* Pf-5, bei der eine optimale Versorgung mit Nährstoffen bestand, die weit höher lag als unter Bodenbedingungen, war in allen drei Phosphatvarianten eine Population von  $\log 8$  bis  $\log 9$  cfu ml<sup>-1</sup> vorhanden. In der monaxenischen Kultur des Versuchssystems wurden am Versuchsende Zahlen zwischen  $\log 6$  und  $\log 7$  cfu ml<sup>-1</sup> ermittelt. Die niedrigere Population der Mikroorganismen in dem sterilen Versuchssystem läßt sich durch die geringere Glucosekonzentration erklären. Während in der Flüssigkultur den Mikroorganismen zu Versuchsbeginn eine 10 %ige Glucoselösung (10 g Glucose 100 ml<sup>-1</sup>) zur Verfügung stand, wurden dem Kultursystem im Versuchsverlauf zwei Mal je 3 ml einer 0,1 %igen Glucoselösung dem Lösungsvolumen von ca. 30 ml zugeführt. Daraus ergibt sich ein um den Faktor 1000 höheres Angebot von Glucose in der Flüssigkultur als im Versuchssystem. Diese geringere Glucoseverfügbarkeit resultiert in einer niedrigeren Population der Mikroorganismen im Kultursystem und führt damit zu einer verminderten metabolischen Aktivität. Die in der monaxenischen Kultur des Versuchssystems angebotene, der natürlichen im Boden vorkommenden Glucosekonzentration nachempfundene, Zuckermenge ist demnach zu gering, um eine vergleichbar hohe Population wie in der Flüssigkultur zu zulassen. Außerdem ist der Zucker in dem goethithaltigen Substrat nicht gleichmäßig verteilt und damit nur engräumig verfügbar, wohingegen die Mikroorganismen in der Flüssigkultur von dem zuckerhaltigen Medium umspült wurden.

Ein Einfluss von *P. fluorescens* Pf-5 auf den pH-Wert der abgezogenen Lösungen konnte im Gegensatz zu den Daten der Flüssigkultur nicht festgestellt werden. In der monaxeni-

schen Kultur des Anzuchtssystems trat keine nachhaltige Ansäuerung der Lösungen wie in der Flüssigkultur auf, wo pH-Werte zwischen 3,5 und 4,0 erreicht wurden. Statt dessen wurden ähnliche pH-Werte wie in den sterilen Kontrollen im Bereich von 4,9 bis 5,3 gemessen. Nach AMTMANN et al. (1999) können Änderungen des apoplastischen pH-Wertes durch eine Modulation der H<sup>+</sup>-ATPase erreicht werden, durch H<sup>+</sup>-gekoppelte Nährstofftransporter in der Plasmamembran sowie durch den Export von sauren Metaboliten und einen Ausstoß von CO<sub>2</sub>.

Welcher dieser pH modulierenden Faktoren in der Flüssigkultur von *P. fluorescens* Pf-5 für die starke Absenkung des pH-Wertes im Vergleich zur monaxenischen Kultur verantwortlich war, ist nicht bekannt. Bei dem reichhaltigeren Nährstoffangebot in der Flüssigkultur im Vergleich zu dem des Kultursystems ist es möglich, dass sowohl H<sup>+</sup>-gekoppelter Nährstofftransport als auch ein Ausstoß von CO<sub>2</sub> als Folge der höheren Zellatmung die Hauptursachen für den Unterschied des pH-Wertes bilden. Durch einen geringeren Nährstofftransport und eine geringere Zellatmung ist der pH-Wert der Lösungen im Kultursystem deswegen vermutlich höher als in der Flüssigkultur.

Das geringere Nährstoffangebot in dem Kultursystem im Vergleich zur Flüssigkultur hatte bei *P. fluorescens* Pf-5 vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf die alkalische Phosphatase. Durch die geringere Anzahl koloniebildender Einheiten konnte keine verlässliche Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase durchgeführt werden. Nach SØRENSEN et al. (2001) hält in monaxenischen und Rhizosphärensystemen nur eine kleine Fraktion der ursprünglich inokulierten mikrobiellen Zellen eine hohe Wachstumsaktivität aufrecht. Demnach sinkt die Enzymaktivität mit fortschreitender Kulturdauer, da größere Mengen an Zellen in einen Überdauerungszustand wechseln. Sind die Aktivitäten der Zellen zu niedrig, bzw. ist die Population zu gering, so sind Aktivitätsbestimmungen nicht mehr möglich.

In der Flüssigkultur von *P. fluorescens* Pf-5 wurden von dem Mikroorganismus große Mengen an Citrat ausgeschieden, welches auch in der Variante mit dem starken Sorbens Goethit detektierbar war. Dieses Ergebnis konnte in den mit Sand gefüllten Röhren des Kultursystems nicht wiederholt werden. Hierfür können zwei Gründe in Betracht gezogen werden. Zum einen ist aufgrund der hohen Sorptionskapazität des goethithaltigen Sandes davon auszugehen, dass die von *P. fluorescens* Pf-5 abgegebenen organischen Säuren stark sorbiert wurden. Zum anderen könnten die niedrigen Konzentrationen der organischen Säuren in den Lösungen des Kultursystems in der geringeren Population der Mikroorganismen begründet sein.

Aus den Ergebnissen von *P. fluorescens* Pf-5 in der monaxenischen Kultur ist im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Flüssigkultur keine phosphatmobilisierende Wirkung des Mikroorganismenisolats bei Angebot schwer löslichen Phosphats auf die Pflanzen zu folgern.

### 5.3.1.3 *Gordonia* sp. in monaxenischer Kultur

Die in der Flüssigkultur von *Gordonia* sp. gewonnenen Ergebnisse lassen sich im Gegensatz zu denen von *P. fluorescens* Pf-5 in der monaxenischen Kultur des Anzuchtssystems überwiegend bestätigen. Auch in diesem Fall war eine Erhöhung des pH-Wertes der Lösungen im Vergleich zu den sterilen Kontrollen festzustellen, ebenso ein kaum messbarer Gehalt der Lösungen an organischen Säuren. Dagegen konnte, wie bei *P. fluorescens* Pf-5 das Ergebnis der hohen Aktivität der alkalischen Phosphatase von *Gordonia* sp. aus der Flüssigkultur nicht wiederholt werden.

Im Vergleich zu den sterilen Kontrollen (pH 5,0 – 5,3) war der pH-Wert der abgezogenen Lösungen der mit *Gordonia* sp. inokulierten Röhren um 0,6 bis 0,9 Einheiten erhöht. Die Kultur von *Gordonia* sp. führte demnach wie in der Flüssigkultur zu einem Anstieg des pH-Wertes der Lösungen. Der pH-Wert erreichte nicht die für die Flüssigkultur angegebenen pH-Werte von 7,0 bis 7,5. Trotzdem war der Unterschied zu den Lösungen der sterilen Kontrollen und auch zu den Lösungen der monaxenischen Kulturen von Tomate und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 mit 0,3 bis 0,6 Einheiten deutlich.

Da der mittlere Gehalt wasserlöslichen Phosphors der Lösungen um das Zwei- bis Dreifache höher lag als in den sterilen Kontrollen, ist davon auszugehen, dass es durch die Modifikation des pH-Wertes in einen weniger sauren Bereich zu einer partiellen Lösung des Goethits und damit zu einer Freisetzung des daran gebundenen Phosphats gekommen ist. Denn je höher der pH-Wert der Lösungen ist, desto eher liegt Goethit in gelöster Form vor (BAR-YOSEF, 1991).

Die Gehalte an organischen Säuren der Lösungen der mit *Gordonia* sp. inokulierten Kulturröhren waren niedriger als die der sterilen Kontrollen. Es ist davon auszugehen, dass diese von *Gordonia* sp. aufgenommen wurden. Auch der Gehalt an Succinat war geringer als in den sterilen Kontrollen, weshalb *Gordonia* sp. diese organische Säure aufnehmen muss. Dies ist überraschend da nach MARINO (2000) *Gordonia* sp. nicht auf Succinat wächst. Lediglich der Gehalt der Lösungen an Fumarat ist bei Anwesenheit von *Gordonia* sp. sechsfach höher vorhanden als in den sterilen Kontrollen. Fumarat scheint von *Gordonia* sp. als einzige organische Säure in das feste Substrat abgegeben worden zu sein.

Aufgrund der niedrigen Gehalte der Lösungen an organischen Säuren werden diese nur zu einem sehr geringen Maße zu den erhöhten Phosphatgehalten der Lösungen in der Kultur von *Gordonia* sp. beigetragen haben. Gleichwohl läßt sich wegen dieser erhöhten Phosphatgehalte der Lösungen ein positiver Effekt von *Gordonia* sp. auf die Phosphatverfügbarkeit für die Pflanze in einer gemeinsamen Kultur vermuten.

### 5.3.2 Dualkultur

Die Untersuchungen zum Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen waren in monaxenischer Kultur durchgeführt worden, damit die Reaktionen der Organismen auf den Phosphatmangel im Einzelnen geklärt werden konnten. Es stellte sich jedoch heraus, dass unter den Bedingungen dieser von äußeren Faktoren unbeeinflussten monaxenischen Kulturen die Exsudation organischer Säuren von den drei verwendeten Organismen sehr gering war. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu denen aus den Gewächshauskulturen der Pflanzen und der Flüssigkultur der Mikroorganismen bei Phosphatmangel, wo die Exsudation organischer Säuren bei der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 recht hoch war. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, in welchem Rahmen die Abgabe organischer Säuren in einem kontrollierten System aus Pflanze und Mikroorganismenisolat erfolgt. Dazu wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Tomatensorte ‚Freude‘ nach der Anzucht mit je einem der beiden Mikroorganismenisolate für je eine Woche inkubiert wurde.

#### 5.3.2.1 Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

In der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 wurden trotz einer etwas niedrigeren Inokulationsdichte bei Versuchsbeginn als in der monaxenischen Kultur des Mikroorganismus vergleichbare Zellzahlen ermittelt. Demzufolge hat *P. fluorescens* Pf-5 von der Dualkultur profitiert, auch wenn keine signifikanten Erhöhungen der Mikroorganismenpopulation, wie bei GRAYSTON et al. (1998) für die Kulturen von Straußgras, Weidelgras, Weißklee und Weizen gefunden wurden. Danach enthält der Rhizosphärenboden der vier Arten signifikant höhere Populationen von Pseudomonaden als mit Zucker versetzte und unbehandelte Böden.

Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet DARRAH (1991). Jede Wurzel, die im Boden wächst, wird von einem Bodenzylinder umgeben, in dem die mikrobielle Biomasse höher ist als in dem umgebenden Boden. In dem Bodenzylinder selbst befindet sich wurzelbürtiger Kohlenstoff, in Form löslicher Exsudate, abgetrennter Zellen oder alter Wurzelgewebe, die das Biomassewachstum vorantreiben (DARRAH, 1991, LYNCH, 1990). Die angesprochene starke Durchwurzelung des Substrates im Kultursystem durch die Tomatensorte ‚Freude‘ sollte demnach zu einer ausreichenden Versorgung der eingeführten Mikroorganismen mit Kohlenstoffverbindungen im gesamten Röhrenbereich geführt haben. Es ist deswegen anzunehmen, dass die Versorgung des Mikroorganismus in der Dualkultur mit Kohlenstoffverbindungen weitaus reichhaltiger ausfiel als in der monaxenischen Kultur und in einer höheren, jedoch nicht signifikant höheren, Population der Mikroorganismen resultierte.

Bezüglich der pH-Werte der Lösungen ist auffällig, dass sowohl die monaxenische Kultur der Tomate (pH 5,3) als auch die monaxenische Kultur von *P. fluorescens* Pf-5 (pH 5,2) niedrigere pH-Werte der Lösungen GL und EP zur Folge hatten, als die Dualkultur der

beiden Organismen (pH 5,6). Demnach war die Ansäuerung der Lösungen in der Dualkultur weniger ausgeprägt als bei der Kultivierung der einzelnen Organismen.

Eine Erklärungsmöglichkeit dieser Erhöhung des pH-Wertes der Lösungen in der Dualkultur bieten die Ergebnisse von NEUMANN & RÖMHELD (1999). Die Autoren stellten fest, dass bei sehr starkem Phosphatmangel bei Tomaten die Nitrataufnahme behindert sein kann, wodurch es zu einer gesteigerten Aufnahme von Kationen und einer Abgabe von Protonen kommt, um den Ladungsausgleich aufrecht zu erhalten. Der für den Ladungsausgleich notwendige Efflux der Protonen führte zu einer Ansäuerung des Nährmediums um drei pH-Einheiten von pH 7,0 auf pH 4,0.

Dies lässt vermuten, dass der Phosphatmangel der Tomate in der Dualkultur geringer war, als in der monaxenischen Kultur und somit mehr Nitrat aufgenommen wurde. Diese Begründung wird durch die höheren Phosphorgehalte der Wurzeln in der Dualkultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur gestützt. Der Phosphorgehalt der Tomatenwurzeln in der Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 war im Gegensatz zur monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ um ein Viertel höher als der Phosphorgehalt der Sprosse. Somit hatte die Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 über den Zeitraum von einer Woche eine Erhöhung des Phosphorgehaltes der Wurzeln zur Folge. Das Ergebnis stimmt mit den Angaben von MIMURA et al. (1990) überein, wonach Phosphatmangelpflanzen, sofern Phosphat in gelöster Form verfügbar wird, dieses sehr schnell aufnehmen und akkumulieren können. Es ist allerdings anzumerken, dass der höhere Phosphorgehalt der Wurzeln in der Dualkultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur auch in geringen Mengen auf die an den Wurzeln anhaftenden *P. fluorescens* Pf-5 Zellen zurückzuführen sein kann. Dieses Phosphat wäre dann nicht von den Wurzeln aufgenommen, sehr wohl aber zusammen mit diesen analysiert worden.

Die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 hatte einen deutlichen Einfluss auf die Quantität der organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen, denn der Gesamtgehalt an organischen Säuren übertraf den Gehalt der beiden monaxenischen Kulturen um ein Viertel. Er war dennoch niedriger als der Gesamtgehalt der organischen Säuren in den Lösungen der sterilen Kontrollen. Folglich wurden in der Dualkultur weniger organische Säuren von den Pflanzen und *P. fluorescens* Pf-5 aufgenommen bzw. mehr organische Säuren in das Substrat abgegeben als in den monaxenischen Kulturen.

Die Erhöhung des Gesamtgehaltes an wasserlöslichen organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen hatte in der Dualkultur keine Absenkung des pH-Wertes zur Folge. Statt dessen waren die pH-Werte der Lösungen höher als in den Lösungen der monaxenischen Kulturen. An dieser Stelle wird deutlich, dass mit einer erhöhten Exsudation organischer Säuren nicht zwangsläufig eine Absenkung des pH-Wertes einhergeht. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Darstellungen von GAUME et al. (2001), wonach organische Säuren in den Wurzelzellen bei den pH-Bedingungen des Cytosols in dissoziierter Form

vorliegen, so dass sie als organische Anionen freigesetzt *per se* nicht zur Ansäuerung der Rhizosphäre beitragen sollten.

Auch hinsichtlich der Qualität der organischen Säuren in den abgezogenen Lösungen unterschieden sich die monaxenischen Kulturen von der Dualkultur. Die größte Veränderung trat beim Succinat auf. Während in den monaxenischen Kulturen Succinat nicht gemessen werden konnte, wurden recht hohe Succinatkonzentrationen in der Dualkultur ermittelt. Im Vergleich zur sterilen Kontrolle wurde es sogar in fünffach höherer Konzentration analysiert. Diese Unterschiede in der Konzentration der organischen Säure können durch die Interaktionen von Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre verursacht sein (CIESLINSKY et al., 1998). So ist es möglich, dass die Mikroorganismen die Pflanzen zur Exsudation von Succinat angeregt haben, denn auch in dem Sortenvergleich im Gewächshaus wurde ein hoher Succinatanteil von fast 50 % in den Exsudaten der Tomatensorte ‚Freude‘ gefunden. Da durch Versuche zum Substratnutzungsmuster von Pseudomonaden bekannt ist, dass Succinat zu den bevorzugt metabolisierten organischen Säuren gezählt wird (MARSCHNER, pers. Mitteilungen), ist anzunehmen, dass größere als die gemessenen Succinatmengen exsudiert wurden. Woher das Succinat in den Lösungen der Dualkultur stammt, läßt sich trotz allem nur vermuten, denn das Succinat könnte auch von *P. fluorescens* Pf-5 stammen. So fand DEUBEL (1996), dass der von ihr verwendete Pseudomonade PSIA12 große Mengen Succinat abgibt.

Ebenso wie das Succinat ist die Formiatkonzentration in den Lösungen der Dualkultur auffällig, da sie im Vergleich zu den bisherigen Versuchen ein Fünftel niedriger war als in den monaxenischen Kulturen. Demnach erschlossen sich in der Dualkultur Möglichkeiten der Metabolisierung dieser organischen Säure durch die beiden Organismen, die in den monaxenischen Kulturen nicht gegeben waren.

Außerdem wurden geringe Mengen von Citrat und Malat in den Lösungen der Dualkultur ermittelt sowie Fumarat, das im Vergleich zu den bisherigen Versuchen die Konzentration der Lösungen der sterilen Kontrollen um den Faktor fünf übertraf. Bedenkt man die 12-fach stärkere Sorption von Citrat und Malat im Vergleich zu Succinat an den goethithaltigen Sand, ist davon auszugehen, dass insgesamt sehr viel höhere Mengen Citrat und Malat in das Substrat abgegeben worden sind und zur Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit beitragen konnten.

### 5.3.2.2 Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp.

Aus den Ergebnissen der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. im Kultursystem geht hervor, dass es zu starken Veränderungen im Vergleich zu den monaxenischen Kulturen bei Angebot von schwer löslichem, an Goethit sorbierten Phosphats gekommen ist. Diese Änderungen werden an der Erhöhung der Mikroorganismenpopulation in der Dualkultur ebenso, wie an der Erhöhung des Phosphatgehaltes der Tomatenwurzeln erkennbar. Zu besonders ausgeprägten Modifikationen kam es bei der Exsudation organischer Säuren der Organismen.

Wie in der Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *P. fluorescens* Pf-5 war auch in den Lösungen der Dualkultur der Pflanze mit *Gordonia* sp. ein positiver Einfluss auf die Population der Mikroorganismen zu bemerken. Die cfu waren höher als in der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp.. Auch in diesem Fall wird, wie von GRAYSTON et al. (1998) beschrieben, durch die bessere Versorgung mit wurzelbürtigen Kohlenstoffverbindungen das Wachstum der Mikroorganismen gefördert worden sein.

Neben dem günstigen Einfluss der Dualkultur auf die Mikroorganismen wurde auch eine positive Wirkung auf die Pflanzen festgestellt. Durch die einwöchige Inkubation der Tomatenpflanzen in der Dualkultur mit *Gordonia* sp. kam es zu einer Erhöhung des Phosphorgehaltes der Wurzeln im Vergleich zur monaxenischen Kultur der Sorte ‚Freude‘. Woher dieses Phosphat stammt, ist, ähnlich wie bei der Dualkultur der Pflanzen mit *P. fluorescens* Pf-5, nur zu vermuten. In der monaxenischen Kultur von *Gordonia* sp. wurden höhere Phosphorgehalte in den Lösungen im Vergleich zu den sterilen Kontrollen analysiert. Da in der Dualkultur, bei Anwesenheit beider Organismen, der Phosphorgehalt der Lösungen nur halb so hoch, wie bei *Gordonia* sp. in monaxenischer Kultur und geringfügig niedriger als in der monaxenischen Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ war, ist anzunehmen, dass die Pflanzen das von *Gordonia* sp. mobilisierte Phosphat aus der Lösung aufgenommen haben. Den Untersuchungen von HELAL & DRESSLER (1989) zu Folge, profitieren Pflanzen von mobilisiertem Phosphat mehr als Mikroorganismen. In den dortigen Untersuchungen wurden 80 % des verfügbaren Phosphats von den Maispflanzen und 20 % von der mikrobiellen Biomasse aufgenommen.

Die größten Veränderungen in der Dualkultur im Vergleich zu den monaxenischen Kulturen traten hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren auf, denn die Gesamtmenge organischer Säuren im Substrat stieg um ein Drittel im Vergleich zu den sterilen Kontrollen. Die höchste Konzentration organischer Säuren im Anzuchtsystem wurde somit in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. erreicht.

Neben dem Gesamtgehalt organischer Säuren in den abgezogenen Lösungen änderte sich in der Dualkultur auch die Zusammensetzung der Lösungen. Während in den monaxenischen Kulturen der Pflanzen und von *Gordonia* sp. kein Succinat messbar war, traten in der Dualkultur große Mengen von Succinat auf. In beiden Dualkulturen war Succinat die

dominierende organische Säure. Der geringere Succinatgehalt in der Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 könnte damit zusammenhängen, dass *P. fluorescens* Pf-5 diese Säure stärker metabolisiert hat als *Gordonia* sp..

Ein weiteres überraschendes Ergebnis der Zusammensetzung der organischen Säuren in der Dualkultur ist, dass Citrat und Malat in den Lösungen der monaxenischen Kulturen nicht oder kaum zu finden waren, beide aber in der Dualkultur in etwas geringeren Mengen als in den unbehandelten Kontrollen vorkamen. Demnach haben die beiden Organismen in der Dualkultur weniger Citrat und Malat aufgenommen. Gerade diesen beiden organischen Säuren wird nach GERKE (1995) eine besonders hohe phosphatmobilisierende Wirkung zugeschrieben. Daraus lässt sich folgern, dass die Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ und *Gordonia* sp. im Gegensatz zu den monaxenischen Kulturen beiden Organismen Vorteile hinsichtlich der Phosphatverfügbarkeit verschaffen kann.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht möglich die Quelle der organischen Säuren in der Dualkultur anzugeben. Es ist wahrscheinlich, dass die Mikroorganismen die Pflanzen dazu anregten, vermehrt organische Säuren in die Umgebung der Wurzeln abzugeben. Dies kann auf verschiedene Weise erfolgen. So könnten die Mikroorganismen Substanzen ausgeschieden haben, die zu einer Erhöhung der Exsudation der Pflanzen geführt haben. Es ist auch möglich, dass die Mikroorganismen organische Säuren metabolisierten, somit eine Rückresorption durch die Pflanzen vereitelten und damit bei den Pflanzen eine erhöhte Exsudation organischer Säuren initiierten. Ferner ist es denkbar, dass durch die Dualkultur bei einem oder bei beiden der Organismen die Aufnahme anderer Kohlenstoffverbindungen in den Vordergrund rückte und damit die organischen Säuren in den Lösungen des Substrates verblieben. Da Zucker in größerer Menge von Wurzeln abgegeben werden als organische Säuren, könnten diese bevorzugt von den Mikroorganismen metabolisiert worden sein, wodurch mehr organische Säuren in den Lösungen verblieben.

Betrachtet man den Gehalt an organischen Säuren der Exsudatprobe EP aus der Dualkultur im Vergleich zu den Exsudationsdaten aus dem nicht sterilen Versuch im Gewächshaus, so scheint die Anwesenheit von Mikroorganismen bei Phosphatmangel einen entscheidenden Einfluss auf die Exsudation organischer Säuren auszuüben. Während bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit in der Vergesellschaftung mit Mikroorganismen eine relativ hohe Exsudationsrate bestand, wurde diese bei Phosphatmangel der Tomatensorte ‚Freude‘ verdoppelt. Wurden die Pflanzen unter monaxenischen Bedingungen einem Phosphatmangel ausgesetzt, so konnte dagegen kaum eine Exsudation organischer Säuren festgestellt werden. Kommt die Sorte ‚Freude‘ bei Phosphatmangel mit Rhizosphärenmikroorganismen vergesellschaftet vor, so war im Fall der Dualkultur mit *P. fluorescens* Pf-5 eine leichte Erhöhung des Gehaltes an organischen Säuren in der Exsudatprobe festzustellen. Im Falle der Dualkultur der Pflanzen mit dem Actinomyceten *Gordonia* sp. wurden dagegen Gehalte wie in dem Versuch im Gewächshaus bei Phosphatmangel erzielt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Exsudationsraten organischer Säuren bei Phosphatmangel im Gewächshaus durch die Anwesenheit von Mikroorganismen maßgeblich beeinflusst worden sind.

Bei diesem Vergleich sollte auch berücksichtigt werden, dass die Exsudationsleistung in den unsterilen Versuchen anders ermittelt wurde als in dem sterilen Anzuchtsystem. In den unsterilen Versuchen wurden die Wurzeln aus dem Sand herauspräpariert und dann in Wasser überführt. Die hohen Exsudationsraten können daher z.T. auch auf Wurzelverletzungen zurückzuführen sein. Wurzelverletzungen werden dagegen im sterilen Anzuchtsystem nur in geringem Maße auftreten. Um so unmissverständlicher ist die Steigerung der Exsudation organischer Säuren in den Dualkulturen auf die Anwesenheit der Mikroorganismen zurückzuführen.

Zum Schluss dieses Kapitels stellt sich die Frage, ob die beiden Rhizosphärenmikroorganismenisolate zu einer Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit für die Pflanzen geführt haben. Der Anstieg der Exsudation organischer Säuren in den Lösungen der Dualkultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur ist bei beiden Mikroorganismenisolaten eindeutig festzustellen. Die Gesamtexsudation organischer Säuren fällt im Fall der Dualkultur mit *Gordonia* sp. dabei höher aus als bei *P. fluorescens* Pf-5 und basiert vor allem auf einer Steigerung der Succinatexsudation. Ob das Succinat, wie aus den Gewächshausversuchen angenommen, von der Tomatensorte ‚Freude‘ oder von den Mikroorganismen ausgeschieden wurde, ist aus den durchgeführten Versuchen nicht ableitbar. Sowohl die Exsudationsleistung der Pflanzen als auch die der Mikroorganismen kann durch die Anwesenheit des jeweils anderen Partners verändert worden sein.

Dieses Ergebnis hätte sich aufgrund der Daten aus der Flüssigkultur nicht erwarten lassen. Dort hatte *P. fluorescens* Pf-5 große Mengen organischer Säuren, vor allem Citrat, ausgeschieden, während *Gordonia* sp. nur geringe Mengen organischer Säuren exsudierte. Eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Flüssigkultur auf die monaxenische oder die duale Kultur im festen Substrat ist demnach nicht oder nur stark eingeschränkt möglich.

Für eine Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit durch die Mikroorganismen für die Pflanzen spricht der Anstieg des Phosphatgehaltes in den Pflanzenwurzeln in der Dualkultur im Vergleich zur monaxenischen Kultur. Dieses Phosphat könnte durch die in größeren Konzentrationen messbaren organischen Säuren mobilisiert worden sein, bzw. in geringen Mengen von an den Wurzeln anhaftenden Mikroorganismen resultieren. Die Erhöhung des Phosphorgehaltes der Tomatenwurzeln dürfte jedoch auch auf längere Sicht nicht dazu ausgereicht haben, den Phosphormangel der Pflanzen zu beheben. Aufgrund der sehr geringen Phosphorkonzentrationen der wässrigen Lösungen in der Dualkultur im Vergleich zu den monaxenischen Kulturen ist auf eine schnelle Aufnahme freigesetzten Phosphats zu schließen.

Neben der Phosphatmobilisierungsleistung der organischen Säuren ist weiterhin denkbar, dass die organischen Säuren den Mikroorganismen als Substrat dienten, so dass weitere phosphatsolubilisierende Prozesse, wie die Modifikation des pH-Wertes in den Lösungen und die Steigerung der Aktivität von Phosphatasen, ermöglicht wurden.

Unabhängig davon, ob die Pflanzen oder die Mikroorganismen die Konzentration der organischen Säuren in den Lösungen des Kultursystems in der Dualkultur erhöht haben, können beide Organismen daraus einen Nutzen ziehen. Die Mikroorganismen haben folglich einen positiven Einfluss auf die Pflanzen. Setzt man voraus, dass organische Säuren in der Rhizosphäre zu einer Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit führen, so steht dieses Ergebnis in direktem Widerspruch zu der Aussage von GERKE (1995). In der dortigen Arbeit wird angegeben, „dass die mikrobielle Aktivität über den Abbau der in der Rhizosphäre ausgeschiedenen organischen Säuren die Phosphatverfügbarkeit eher erniedrigt, aber nicht erhöht“. Für die Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ und *P. fluorescens* Pf-5 im Vergleich zu den monaxenischen Kulturen und besonders für die Dualkultur der Sorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. kann diese Aussage angezweifelt werden.

#### **5.4 Ausblick**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen untersucht. Dazu wurde zunächst eine Versuchspflanze ermittelt, die unter den Bedingungen des Phosphatmangels mit einer erhöhten Exsudation organischer Säuren reagiert. Zwei verschiedene Mikroorganismenisolate der Rhizosphäre wurden ausgewählt, um die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen bei Angebot schwer löslichen Phosphats analysieren zu können. Statt eines natürlichen Bodens wurde goethithaltiger Sand als Substrat genutzt.

Die Ergebnisse aus den monaxenischen und dualen Kulturen im System zur sterilen Anzucht sowie sterilen und störungsarmen Probenahme unter definierten Bedingungen weisen darauf hin, dass in dem vielschichtigen System aus Pflanzen, Mikroorganismen und Boden die Vergesellschaftung der Organismen für beide Partner vorteilhaft sein kann. Im folgenden sollten Versuche durchgeführt werden, in denen mehr als ein Mikroorganismenisolat eingesetzt wird, da auch im natürlichen Boden viele verschiedene Mikroorganismen vorkommen, die ebenfalls zu einer Mobilisierung von Phosphat beitragen. Besondere Beachtung sollte den pflanzlichen und mikrobiellen Phosphatasen geschenkt werden, da bis zu 80 % des Bodenphosphats als organische Phosphatverbindungen vorliegt.

Die Erkenntnis, dass Mikroorganismen eine große Rolle bei der Phosphatmobilisierung im Boden spielen, führte zu diversen Untersuchungen, inwieweit die Phosphatversorgung der Pflanzen davon Nutzen ziehen könnte (DEFREITAS et al., 1997; DEUBEL, 1996; RICHARDSON, 2001). Gesetzt den Fall eine Manipulation der Mikroorganismen wird angestrebt, so werden zwei Hauptstrategien verfolgt. Zum einen das Management bestehender Populationen, um die Phosphatmobilisierungskapazität der Mikroorganismen zu optimieren, zum anderen die Entwicklung spezieller Inokula. Sofern Pflanzen mit phosphatmobilisierenden Mikroorganismen inokuliert werden, können die Mikroorganismen das Wachstum und die Phosphataufnahme der Pflanzen im Gewächshaus aber auch unter Freilandbedingungen fördern.

Weitere Phosphatsolubilisierer wie z.B. Mykorrhizapilze sollten eingehender im Zusammenhang mit den bakteriellen Phosphatsolubilisierern untersucht werden. So zeigte RICHARDSON (2001), dass eine Co-Inokulation von Pflanzen mit Mykorrhizapilzen und phosphatsolubilisierenden oder mineralisierenden Mikroorganismen die Phosphataufnahme der Pflanzen steigern kann. Dieser Sachverhalt weist auf Synergismen zwischen den Organismen hin.

In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Böden einen Mangel an pflanzenverfügbarem Phosphat aufweisen und Phosphatdünger in der landwirtschaftlichen Produktion zu beträchtlichen Kosten führt, besteht ein großes Interesse darin, Bodenmikroorganismen als Inokulum zur Mobilisierung schwer verfügbarer Phosphatressourcen einzusetzen. Obwohl die Entwicklung eines derartigen Inokulums möglich scheint, bleibt eine weitverbreitete Anwendung dadurch limitiert, dass von der mikrobiellen Ökologie und Populationsdynamik im Boden bisher nur wenig bekannt ist.

Mikroorganismen sind ein wesentlicher Bestandteil des Bodenphosphatzyklus und spielen eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Phosphatverfügbarkeit im Boden für Pflanzenwurzeln. Die mikrobiellen Prozesse müssen deswegen für jegliche Verbesserung der Mobilisierung von Bodenphosphat beachtet werden. Ob jedoch für die landwirtschaftliche Produktion eine Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit im Boden durch ein besseres Management der vorhandenen mikrobiellen Biomasse im Boden erzielt werden kann oder aber durch die Entwicklung effektiverer Inokula, muss abgewartet werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Versuche dienten der Untersuchung des Einflusses der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen. Mit Hilfe eines Artenvergleichs im Gewächshaus konnte bei Angebot leicht löslichen Phosphats festgestellt werden, dass die Exsudation organischer Säuren bei einigen Pflanzenarten von der Phosphatverfügbarkeit beeinflusst wird. So führte Phosphatmangel bei Luzerne und Tomate zu einer Steigerung der Exsudation organischer Säuren. Dagegen wies Rettich bei ausreichender Phosphatverfügbarkeit eine höhere Konzentrationen organischer Säuren in seinen Exsudaten auf als unter Phosphatmangel, während Mais, Raps, Rotklee und Zuckerrübe keinen Einfluss der Phosphatverfügbarkeit auf die Exsudation organischer Säuren erkennen ließen.

In einem Sortenvergleich mit acht Tomatencultivaren wurde eine große Variabilität in der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel im Vergleich zu ausreichender Phosphatverfügbarkeit ermittelt. Folglich sind die im Artenvergleich aufgetretenen Unterschiede nicht auf das Artniveau begrenzt. Die Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel kann demzufolge nicht bei allen Pflanzenarten zu den grundlegenden Mechanismen der Phosphatmobilisierung gezählt werden. Statt dessen können die Arten und Sorten einer Art in Gruppen eingeteilt werden, in denen einige die Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel erhöhen, während andere offensichtlich andersartige Wege der Phosphatmobilisierung gehen.

Eine Flüssigkultur der Rhizosphärenmikroorganismen *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. bei drei unterschiedlichen Phosphatangeboten zeigte, dass bei den Mikroorganismen große Unterschiede hinsichtlich der Exsudation organischer Säuren bestehen. Die Abgabe organischer Säuren war bei *P. fluorescens* Pf-5 unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit, während *Gordonia* sp. bei sinkender Phosphatverfügbarkeit die Exsudation minderte. Eine Erhöhung der Exsudation organischer Säuren bei Phosphatmangel konnte bei den Mikroorganismen nicht festgestellt werden. Bei beiden Isolaten wurden Modifikationen des pH-Wertes in allen Varianten ermittelt. Demnach führt ein Phosphatmangel bei den verwendeten Mikroorganismen nicht zu einer Steigerung der Exsudation organischer Säuren. Zur Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit wurden von den Mikroorganismen andere Mechanismen, wie z.B. die Modifikation des pH-Wertes, eingesetzt.

Die entwickelte Versuchsanordnung erfüllt die Aufgaben der sterilen Pflanzenanzucht sowie der sterilen und störungsarmen Probenahme wasserlöslicher Substanzen unter definierten Bedingungen. Eine sterile Kultur der Pflanzen über einen Zeitraum von mehreren Wochen ist in diesem System möglich. Das Substrat gewährleistet eine gute Durchwurzelbarkeit und somit ein uneingeschränktes Wurzelwachstum, so dass das gesamte Substrat als wurzelnahe Substrat betrachtet werden kann. Eine Belüftung dient der Vermeidung von Sauerstoffmangel im System. Schließlich ist aufgrund des Röhrenaufbaus eine verletzungsfreie Gewinnung der Lösungen aus dem Wurzelbereich gegeben.

Durch die spezifischen Bedingungen in der Klimakammer bzw. dem Klimaschrank sind licht- und temperaturbedingte Schwankungen in der Wurzelexsudation auszuschließen. Dies ist ein Vorteil des Kultursystems im Vergleich zu Kulturen im Gewächshaus, da die Versuche dort den jahreszeitlichen Schwankungen ausgesetzt sind. Ein Einfluss auf die Exsudation wasserlöslicher Substanzen von Pflanzen und Mikroorganismen durch Veränderungen abiotischer Faktoren ist in dem neu entwickelten System ausgeschlossen.

Bei den untersuchten Parametern Phosphat und organische Säuren ist aufgrund der hohen Sorptionsfähigkeit des goethithaltigen Sandes eine vollständige Bilanzierung nicht möglich. Die eingesetzten organischen Säuren führen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einer Mobilisierung von Phosphat, eine Quantifizierung ist jedoch nicht möglich, da die organischen Säuren in unterschiedlichen Anteilen an das System sorbiert werden und nicht abzusehen ist, welche organische Säure wieviel Phosphat freisetzt.

Die monaxenische Kultur der Tomatensorte ‚Freude‘ sollte zeigen, welche organischen Säuren die Pflanzen in dem eigens dafür entwickelten Kultursystem bei schwer löslichem Phosphat exsudieren. Bei monaxenischem Wachstum wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ weniger organische Säuren in den Lösungen des Kultursystems nachgewiesen als in denen der sterilen unbehandelten Kontrollen. Die Exsudationsraten organischer Säuren, die in den Abstauchlösungen der im Gewächshaus kultivierten Pflanzen erzielt wurden, konnten in der monaxenischen Kultur nicht erreicht werden. Daraus ist zu schließen, dass die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ auch von anderen Faktoren als der Phosphatverfügbarkeit bestimmt wird.

Die Mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 und *Gordonia* sp. wurden jeweils unter monaxenischen Bedingungen im Kultursystem kultiviert. Im Gegensatz zu den Flüssigkulturen der beiden Mikroorganismen, traten in den monaxenischen Kulturen im Versuchssystem bei *P. fluorescens* Pf-5 keine und bei *Gordonia* sp. nur geringe Modifikationen des pH-Wertes in den Lösungen auf. Dies ist auf die höhere Pufferwirkung des nährstoffhaltigen Sandes im Kultursystem im Vergleich zu den Lösungen der Flüssigkultur zurückzuführen.

Neben der verminderten Modifikation des pH-Wertes konnte bei beiden Mikroorganismenisolaten eine deutlich verringerte Exsudation organischer Säuren im Versuchssystem im Vergleich zur Flüssigkultur ermittelt werden. Dies mag auf die starke Sorptionsfähigkeit des goethithaltigen Sandes im Kultursystem für organische Säuren zurückzuführen sein, oder durch die höhere Populationsdichte der Mikroorganismen in der Flüssigkultur begründet werden. Eine Kombination der beiden Faktoren ist wahrscheinlich.

In der Dualkultur ist die Exsudation organischer Säuren der Tomatensorte ‚Freude‘ und je einem der Mikroorganismenisolate bei Angebot schwer löslichen Phosphats im Vergleich

zur monaxenischen Kultur erhöht. Durch die Vergesellschaftung der Tomatenpflanzen mit den Mikroorganismen wird zumindest einer der beiden Organismen zu einer verstärkten Exsudation organischer Säuren angeregt. Welcher der beiden Organismen in der Dualkultur die Abgabe der organischen Säuren forciert betreibt, lässt sich aus den Experimenten nicht begründen.

Die Untersuchungen der monaxenischen Kulturen im Versuchssystem bezüglich der von den einzelnen Organismen abgegebenen organischen Säuren zeigten, dass eine Bilanzierung des mobilisierten Phosphats nicht möglich ist. In der Dualkultur wurde festgestellt, dass die Vergesellschaftung von Pflanzen und Mikroorganismen zu einer Erhöhung der Exsudation organischer Säuren führt und damit mittelbar auch zu einer Erhöhung der Phosphatverfügbarkeit. Dabei wurden in der Dualkultur der Tomatensorte ‚Freude‘ mit *Gordonia* sp. Exsudationsraten organischer Säuren wie in der Phosphatmangelvariante derselben Sorte im Gewächshaus ermittelt.

## 7 Literatur

- AHONEN-JONNARTH, U., VAN HEES, A.W., LUNDSTRÖM, U.S. & FINLAY, R.D. (2000)** Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytology*, **146**: 557-567.
- AL-NIEMI, T. S., KAHN, M.L. & MCDERMOTT, T.R. (1998)** Phosphorus uptake in bean nodules. *Plant and Soil*, **198**: 71-78.
- AMANN, C. & AMBERGER, A. (1989)** Phosphorus efficiency of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Zeitung für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **152**: 181-189.
- AMTMANN, A., JELITTO, T.C. & SANDERS, D. (1999)** K<sup>+</sup>-selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots. *Plant Physiology*, **119**: 331-338.
- AZAIZEH, H.A., MARSCHNER, H. & V. RÖMHELD (1995)** Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth, mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. *Mycorrhiza*, **5**: 321-327.
- BARBER D.A. & GUNN K.B. (1974)** The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *New Phytologist* **73**: 39-45.
- BAR-YOSEF, B. (1991)** Root excretions and their environmental effects -Influence on availability of phosphorus. In: WAISEL, Y., ESHEL, A. & KAFKAFI, U. (eds): *The hidden half*. Marcel Dekker, Inc. S. 529-557.
- BEIBNER, L. & RÖMER, W. (1999)** Der Einfluß von P-Ernährung und pH auf die Phosphataseaktivität von Zuckerrübenwurzeln. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **162**: 83-88.
- BIELESKI, R.L. (1973)** Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology*, **24**: 225-252.
- BOWDEN, J.W., NAGARAJAH, S., BARROW, N.J. & POSNER, A.M. (1980)** Describing the adsorption of phosphate, citrate and selenite on a variable-charge mineral surface. *Australian Journal of Soil Research*, **18**: 49-60.
- BUSCH, M.A. & BÖTTGER, M. (1997)** Net proton secretion as a parameter for nitrate uptake. *Protoplasma*, **196**: 65-68.

- CIESLINSKI, G., VAN REES, K.C.J., SZMIGIELSKA, A.M., KRISHNAMURTI, G.S.R. & HUANG, P.M. (1998)** Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant and Soil*, **203**: 109-117.
- CIERESZKO, I., ZAMBRZYCKA, A. & RYCHTER, A. (1998)** Sucrose hydrolysis in bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *Plant Science*, **133**: 139-144.
- DARRAH, P.R. (1991)** Models of the rhizosphere - II. A quasi three-dimensional simulation of the microbial population dynamics around a growing root releasing soluble exudates. *Plant and Soil*, **138**: 147-158.
- DARRAH, P.R. (1993)** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, **155**: 1-20.
- DE FREITAS, J.R., BANERJEE, M.R. & GERMIDA, J.J. (1997)** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology & Fertility in Soils*, **24**: 358-364.
- DEUBEL, A. (1996)** Einfluß wurzelbürtiger organischer Kohlenstoffverbindungen auf Wachstum und Phosphatmobilisierungsleistung verschiedener Rhizosphärenbakterien. Dissertation, Shaker Verlag, Halle/Saale. p. 114.
- DEUBEL, A. & A. GRANSEE (1995)** Mechanismen der Phosphatmobilisierung aus Calciumphosphaten durch 2 Bakterienstämme. *Ökophysiologie des Wurzelraumes*, **6**: 119-126.
- DEUBEL, A., GRANSEE, A. & MERBACH, (2000)** Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**: 387-392.
- DINKELAKER, B., C. HENGELER & H. MARSCHNER (1994)** Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanica Acta*, **108**: 183-200.
- DYE, C. (1995)** Effect of citrate and tartrate on phosphate adsorption by amorphous ferric hydroxide. *Fertilizer Research*, **40**: 129-134.
- FINDENEGG, G.R. (1994)** Verfügbarkeit von Bodenphosphaten für Pflanzenwurzeln: Laboratoriumsversuche und Computer-Simulationen. *Ökophysiologie des Wurzelraumes*, **5**.

- FOEHSE, D., CLAASSEN, N. & JUNGK, A. (1988)** Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant and Soil*, **110**, 101-109.
- FORDE, B. & LORENZO, H. (2001)** The nutritional control of root development. *Plant and Soil*, **232**, 51-68.
- GAUME, A., MÄCHLER, F., DE LEON, C., NARRO, L. & FROSSARD, E. (2001)** Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant and Soil*, **228**: 253-264.
- GERKE, J. (1993)** Solubilization of Fe(III) from humic-Fe complexes, humic/Fe-oxide mixtures and from poorly ordered Fe-oxide by organic acids - consequences for P-adsorption. *Zeitung für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **156**: 253-257.
- GERKE, J. (1995)** Chemische Prozesse der Nährstoffmobilisierung in der Rhizosphäre und ihre Bedeutung für den Übergang vom Boden in die Pflanze. Habilitationsschrift, 1-139. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- GERKE, J., RÖMER, W. & JUNGK, A. (1994)** The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* L.; effects on soil solution concentrations of phosphate, iron and aluminum in the proteoid rhizosphere in samples of an oxisol and a luvisol. *Zeitung für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **157**: 289-294.
- GERKE, J., RÖMER, W. & BEIBNER, L. (2000a)** The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. I. The basic concept and determination of soil parameters. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**: 207-212.
- GERKE, J., RÖMER, W. & BEIBNER, L. (2000b)** The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. II. The importance of soil and plant parameters for uptake of mobilized P. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**: 213-219.
- GISI, U., SCHENKER, R., SCHULIN, R., STADELMANN, F.X. & STICHER, H. (1990)** Bodenökologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- GRANSEE, A. & WITTENMAYER, L. (2000)** Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**: 381-385.
- GRAYSTON, S.J., WANG, S., CAMPBELL, C.D. & EDWARDS, A.C. (1998)** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**: 369-378.

- GRIERSON, P.F. (1992)** Organic acids in the rhizosphere of *Banksia integrifolia* L.f.  
Plant and Soil, **144**: 259-265.
- GRIERSON, P.F. & COMERFORD, N.B. (2000)** Non-destructive measurement of acid phosphatase activity in the rhizosphere using nitrocellulose membranes and image analysis.  
Plant and Soil, 218: 49-57.
- GRINSTED, M.J., HEDLEY, M.J., WHITE, R.E. & P.H.NYE (1982)** Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. I. pH changes and the increase in P concentration in the soil solution.  
New Phytology, **91**: 19-29.
- HAYAKAWA, M. & NONOMURA, H. (1987)** Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes.  
Actinomycetologica, **3**: 95-104.
- HEDLEY, M.J., NYE, P.H. & R.E. WHITE (1982)** Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. II. Origin of the pH changes.  
New Phytology, **91**: 31-44.
- HELAL, H.M. & DRESSLER, A. (1989)** Mobilization and turnover of soil phosphorus in the rhizosphere.  
Zeitung für Pflanzenernährung und Bodenkunde, **152**: 175-180.
- HILTNER, L., (1904)** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und der Brache.  
Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft, **98**: 59-78.
- HOFFLAND, E. (1992)** Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape.  
Plant and Soil, **140**: 279-289.
- HOFFLAND, E., VAN DEN BOOGAARD, R., NELEMANS, J. & G. FINDENEGG (1992)** Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants.  
New Phytologist, **122**: 675-680.
- HUANG, C.-T., XU, K.D., MCFETERS, G.A. & STEWART, P.S. (1998)** Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation.  
Applied and Environmental Microbiology, **64**: 1526-1531.
- IMAS, P., BAR-YOSEF, B., KAFKAFI, U. & GANMORE-NEUMANN, R. (1997a)** Release of carboxylic anions and protons by tomato roots in response to ammonium nitrate ration and pH in nutrient solution.  
Plant and Soil, **191**: 27-34.

- IMAS, P., BAR-YOSEF, B., KAFKAFI, U. & GANMORE-NEUMANN, R. (1997b)** Phosphate induced carboxylate and proton release by tomato roots. *Plant and Soil*, **191**: 35-39.
- ITOH, S. & BARBER, S.A. (1983)** Phosphorus uptake by six plant species as related to root hairs. *Agronomy Journal*, **75**: 457-461.
- JONES, D.L. (1998)** Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, **205**: 25-44.
- JONES, D.L. & P.R. DARRAH (1994)** Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, **166**: 247-257.
- JONES, D.L. DARRAH, P.R. & KOCHIAN, L.V. (1996)** Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant and Soil*, **180**: 57-66.
- JUNGK, A. & CLAASEN, N. (1986)** Availability of phosphate and potassium as the result of interactions between root and soil in the rhizosphere. *Zeitung für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **149**: 411-427.
- KIRK, G.J.D., SANTOS, E.E. & SANTOS, M.B. (1999)** Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice growing in aerobic soil: rates of excretion and decomposition, effects of rhizosphere pH and effects on phosphate solubility and uptake. *New Phytologist*, **142**: 185-200.
- LIPTON, D.S., BLANCHAR, R.W. & BLEVINS, D.G. (1987)** Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology*, **85**: 315-317.
- LOPER, J.E. & LINDOW, S.E. (1994)** A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 1934-1941.
- LUGTENBERG, B.J.J., KRAVCHENKO, L.V. & SIMONS, M. (1999)** Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology*, **1**: 439-446.
- LYNCH, J. (1990)** *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- LYNCH, J.P. (1995)** Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, **109**: 7-13.

- LYNCH, J.P. (1997)** Root architecture and phosphorus acquisition. Efficiency in common bean. IN: FLORES, H.E., LYNCH, J.P. & EISSENSTAT, D. (eds). Advances and perspectives on the future of plant roots. American Society of Plant Physiologists. 81-91.
- MARINO, W. (2000)** Bedeutung der Pflanze für die Bodenmikroflora – Untersuchungen an zwei tropischen Nutzpflanzen Zentralamazoniens. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- MARSCHNER, H. (1995)** Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. 889 S.
- MARSCHNER, P. (2001)** Persönliche Mitteilungen. Department of Soil and Water, Adelaide University, South Australia.
- MCLAUGHLIN, M.J. & A.M. ALSTON (1987)** Transformation and movement of P in the rhizosphere. Plant and Soil, **97**: 391-399.
- MEHARG, A.A. & KILLHAM, K. (1995)** Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. Plant & Soil, **170**: 345-349.
- MERBACH, W., RUPPEL, S. & RIETZ, C. (1991)** Einfluß der Mikrobenbesiedlung auf die <sup>14</sup>C-Freisetzung durch Wurzeln unter Bodenbedingungen. Ökophysiologie des Wurzelraumes, Vorträge zur 2. wissenschaftlichen Arbeitstagung vom 30.09. bis 02.10 1991 in Borkheide, 66-68.
- MIMURA, T., DIETZ, K.-J., KAISER, W., SCHRAMM, M.J. & U. HEBER (1990)** Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. Planta, **180**: 139-146.
- MURPHY, J. & RILEY, J.P. (1962)** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytical Chimica Acta, **27**: 31-36.
- NAGARAJAH, S., POSNER, A.M., & QUIRK, J.P. (1970)** Competitive adsorption of phosphate with polygalacturonate and other organic anions on kaolinite and oxide surfaces. Nature, **228**: 83-85.
- NEUMANN, G. (1999)** Persönliche Mitteilungen. Institut für Pflanzenernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- NEUMANN, G. & RÖMHELD, V. (1999)** Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant and Soil, **211**: 121-130.

- NEUMANN, G. & RÖMHELD, V. (2000)** The release of root exudates as affected by the plant physiological status. IN: PRINTON, R., VARANINI, Z. & NANNI-POIERI, Z. (eds.) The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker.
- NEUMANN, G., MASSONNEAU, A., MARTINOIA, E. & RÖMHELD, V. (1999)** Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta*, **208**: 373-382.
- OHWAKI, Y. & SUGAHARA, K. (1997)** Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil*, **189**: 49-55.
- PETERSEN, W. & BÖTTGER, M. (1991)** Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant and Soil*, **132**: 159-163.
- RATNAYAKE, M., LEONARD, R.T. & J.A. MENGE (1978)** Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist*, **81**: 543-552.
- RICARD, B., COUEE, I., RAYMOND, P., SAGLIO, P.H., SAINTGES, V. & PRADET, A. (1994)** Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry*, **32**: 1-10.
- RICHARDSON, A.E. (2001)** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus to plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**: 897-906.
- RICHTER, C. & ULORO, Y. (2000)** Phosphoreffizienz verschiedener Sorten von *Phaseolus vulgaris* und *Sorghum bicolor* auf einem Alfisol im Hochland von Ost-Äthiopien. IN: MERBACH, W., WITTENMAYER, L., AUGUSTIN, B. (eds.). Rhizodeposition und Stoffverwertung. 10. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes. B.G. Teubner, Stuttgart, Leipzig. 56-62.
- RICHTER, G. (1996)** Biochemie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 522 S..
- RIEHM, H. (1945)** Bestimmung der Sorptionskapazität des Bodens bei Massenerhebungen nach H. Riehm und ihre Bedeutung insbesondere für die Auswertung der Laktatwerte. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **37**: 61-74.
- RÖMER, W. & SAMIE, I.F. (2001)** Einfluss eisenhaltiger Klärschlämme auf Kenngrößen der P-Verfügbarkeit in Ackerböden. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **164**: 321-328.

- RÖMER, W. & SCHILLING, G. (1986)** Phosphorus requirements of the wheat plant in various stages of its life cycle.  
Plant and Soil, **91**: 221-22.
- ROVIRA, A.D. (1959)** Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation.  
Plant & Soil, **11**: 53-64.
- SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. & S.M. AYLING (1998)** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.  
Plant Physiology, **116**: 447-453.
- SCHACHTSCHABEL, P. & BEYME, B. (1980)** Löslichkeit des anorganischen Bodenphosphors und Phosphatdüngung.  
Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, **143**: 306-316.
- SCHACHTSCHABEL, P., BLUME, H.P., BRÜMMER, G., HARTGE, K.H. & SCHWERTMANN, U. (1989)** Lehrbuch der Bodenkunde. 12., neu bearbeitete Auflage.  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 491 S.
- SCHWERTMANN, U. & CORNELL, R.M. (1991)** Iron oxides in the laboratory.  
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. 132p.
- SCHLEGEL, H.G. (1992)** Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl.  
Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- SIMONS, M., VAN DER BIJ, A.J., BRAND, I., DE WEGNER, L.A., WIJFFELMAN, C.A. & LUGTENBERG, B.J.J. (1996)** Gnotobiotic systems for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria.  
Molecular Plant-Microbe Interactions, **9**: 600-607.
- SØRENSEN, J., JENSEN, L.E. & NYBROE, O. (2001)** Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single cell studies.  
Plant and Soil, **232**: 97-108.
- STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H. & SCHIMPER, A.F.W. (1998)** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 34. Auflage, neubearbeitet von SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F. & BRESINSKY, A.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1007 Seiten.
- STRÖM, L., OLSSON, T. & TYLER, G. (1994)** Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids.  
Plant and Soil, **167**: 239-245.
- TAKEUCHI, M. & HATANO, K. (1998)** *Gordonia rhizosphaera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere.  
International Journal of Systematic Bacteriology, **48**: 907-912.

- VETTERLEIN, D., BERGMANN, C. & HÜTTL, R.F. (1999)** Phosphorus availability in different types of open-cast mine spoil and the potential impact of organic matter application.  
Plant and Soil, **213**: 189-194.
- ZHANG, F.S., MA, J. & CAO, Y.P. (1997)** Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants.  
In: Plant nutrition - for sustainable food production and environment. Kluwer Academic Publishers. 301-304.
- ZHENG, S.J., FENG, J. & MATSUMOTO, H. (1998)** Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress.  
Physiologia Plantarum, **103**: 209-214.

## 8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AbL = Abstauchlösung

ad = zu

Aqua deion. = deionisiertes Wasser

AuL = Austauschlösung

bzw. = beziehungsweise

°C = Grad Celsius

ca. = circa

cfu = engl.: colony forming units (koloniebildende Einheiten)

cm = Zentimeter

CO = Consortium

CO<sub>2</sub> = Kohlendioxid

DL = Doppellactat

EP = Exsudatprobe

et al. = und andere

E = Summe

Fa. = Firma

g = Gramm

GL = Gleichgewichtslösung

GmbH = Gesellschaft mit beschränkter Haftung

Goe-P = Phosphat an Goethit sorbiert

g/v = Gramm pro Volumen

h = Stunde

kg = Kilogramm

konz. = konzentriert

l = Liter

μE = Mikroeinstein

μg = Mikrogramm

μm = Mikrometer

μmol = Mikromol

m = Meter

mg = Milligramm

min = Minute

ml = Milliliter

mm = Millimeter

mM = Millimol

M = Mol  
MU = Methylumbelliferon  
MUP = Methylumbelliferylphosphat  
N = Normal  
n.d. = nicht detektierbar  
nm = Nanometer  
nmol = Nanomol  
O<sub>2</sub> = Sauerstoff  
P = Phosphor  
*P.* = Pseudomonas  
PE-Gefäße = Polyethylengefäße  
% = Prozent  
RhL = Rhizoplanenlösung  
s = Sekunde  
s.o. siehe oben  
sp. = species  
TM = Trockenmasse  
u.a. = unter anderem  
U min<sup>-1</sup> = Umdrehungen pro Minute  
x g = multipliziert mit der Erdbeschleunigung  
z.T. = zum Teil

## **Wissenschaftlicher Werdegang**

Esther Hoberg, geb. Goertz, wurde am 23.02.1969 in Hamburg geboren.

Von Oktober 1992 bis April 1998 studierte sie an der Universität Hamburg Biologie mit dem Hauptfach Allgemeine Botanik und den Nebenfächern Angewandte Botanik, Genetik und Bodenkunde.

Ihr Studium beendete sie mit einer Diplomarbeit im Bereich der Physiologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Böttger) am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg. Das Thema dieser Arbeit lautete „Stickstoff-Aufnahme von Wurzeln - Mechanismen und regulative Faktoren“.

Das Promotionsvorhaben führte sie auf dem Gebiet der Nutzpflanzenbiologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Lieberei) am Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg in den Jahren 1998 bis 2001 durch. Die Doktorarbeit trägt den Titel „Einfluss der Phosphaternährung auf die Exsudation organischer Säuren von Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen“.