

## **Nachweis, Transport und Interaktionen von Mikroorganismen im Boden**

M. Maurhofer<sup>1</sup>, H. Bürgmann<sup>2</sup>, C. Keel<sup>3</sup>, G. Défago<sup>1</sup>, J. Zeyer<sup>2</sup>, und D. Haas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Pflanzenwissenschaften/Phytopathologie, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, 8092 Zürich; <sup>2</sup>Institut für Terrestrische Ökologie/Bodenbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, 8952 Schlieren; <sup>3</sup>Institut de Biologie Microbienne, Université de Lausanne, 1015 Lausanne

### **Methoden in der Umweltmikrobiologie- und Biosicherheitsforschung**

Die bodenmikrobiologische Forschung war bis vor etwa einer Dekade sehr stark durch die verfügbare Methodik eingeschränkt. Man war auf prozessorientierte Messungen am gesamten Boden und auf die Bestimmung der Biomasse angewiesen. Methoden, die sich auf die kultivierbaren Mikroorganismen im Laboratorium abstützten, konnten jedoch nur einen geringen Teil der Populationen erfassen. Insbesondere liessen sich damit keine Daten über die tatsächlichen Aktivitäten der Organismen im Boden gewinnen. Im wesentlichen mussten die mikrobiellen Populationen und ihre Aktivitäten im Boden als „black box“ betrachtet werden.

In den letzten zehn Jahren hat sich nun aber die bodenmikrobiologische Forschung explosionsartig entwickelt. Die meisten Fortschritte sind fast ausschliesslich durch die Einführung und Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden möglich geworden. Mit der Einführung der PCR durch Mullis (1986) war der Grundstein für die sensitive und selektive Detektion auch kleinster Mengen DNA gelegt worden. Durch effiziente DNA Extraktionsmethoden aus Bodenproben wurde die ganze Vielfalt molekularbiologischer Untersuchungsmethoden auch für die Bodenmikrobiologie nutzbar.

Für die Beurteilung der Biosicherheit, insbesondere mit Blick auf genetisch veränderte Organismen, sind diese Methoden zu unverzichtbaren Hilfsmitteln geworden. Nur so kann wirkungsvoll die Ausbreitung genetisch veränderter Organismen erfasst werden. Die Persistenz der Erbsubstanz kann bestimmt und das Ausmass des horizontalen Transfers von Genen kann abgeschätzt werden. Die methodischen Entwicklungen haben erlaubt, die mikrobielle Diversität im Boden besser abzubilden und ganz allgemein mikrobielle Prozesse und allfällige ökologischen Risiken im Boden besser zu prognostizieren.

Heute ergänzen sich qualitative Methoden wie PCR-basiertes genetisches Fingerprinting (RFLP, DGGE, SSCP) und die Sequenzierung und Analyse von Genen aus der Umwelt hervorragend mit eher quantitativen Ansätzen wie FISH, real-time PCR und Blot-Verfahren. Eine grosse Herausforderung stellt nach wie vor die Verbindung der strukturellen Populationsanalyse mit tatsächlichen Aktivitäten der Mikroorganismen unter natürlichen Habitatsbedingungen dar. Innovative Ansätze, basierend auf Isotopenmarkierung, Immunocapture oder direkter Analyse von ribosomaler und messenger RNA versprechen auch hier Fortschritte. Neue Verfahren für hohe Probendurchsätze (Microarrays) und Verfahren der Bioinformatik werden den Erkenntnisgewinn zusätzlich beschleunigen.

## **Biologische Bekämpfung von bodenbürtigen Pflanzenkrankheiten mit *Pseudomonas fluorescens*: Ueberleben von freigesetzten Biokontrollbakterien im Boden und Auswirkung auf die natürliche Mikroflora**

Jedes Jahr gehen 10% der Welternte durch Pflanzenkrankheiten verloren; dies entspricht der Hälfte der landwirtschaftlich nutzbaren Fläche von Nordamerika. Ein besonderes Problem sind bodenbürtige Pflanzenkrankheiten. Sie werden von im Boden lebenden Mikroorganismen verursacht, welche die Wurzeln angreifen und die Gesundheit sowie das Wachstum der Pflanzen stark reduzieren können. Durch solche Organismen verursachte Schäden nehmen ständig zu. Grund dafür ist die Schwierigkeit, bodenbürtige Krankheitserreger mit herkömmlichen Methoden zu bekämpfen. Pestizide sind wenig wirksam, und ihre Anwendung ist ökonomisch und ökologisch kaum vertretbar.

Es gibt Böden, in denen Pflanzen trotz Anwesenheit pathogener Mikroorganismen gesund bleiben. Dafür sorgen nützliche Bakterien und Pilze, welche natürlicherweise im Boden vorkommen und die Wurzeln besiedeln. Solche Antagonisten können gegen bodenbürtige Krankheiten eingesetzt werden. Bereits werden in verschiedenen Ländern natürliche, aber auch genetisch manipulierte Mikroorganismen in kommerziellem Mass grossflächig genutzt. In der Schweiz sind bis jetzt noch kaum solche Produkte auf dem Markt. Für die wirksame Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten oder auch für den Abbau von Schadstoffen im Boden (bioremediation) müssen Bakterien in sehr hohen Dosierungen ausgebracht werden. Eine gründliche Risikoabklärung ist daher Voraussetzung für die kommerzielle Anwendung von Nutzbakterien.

Unsere Forschungsgruppe am Institut für Pflanzenwissenschaften an der ETH Zürich unter der Leitung von Professorin Geneviève Défago untersucht seit einigen Jahren, wie sich freigesetzte Bakterien im Boden verbreiten, wo und wie lange sie in der Erde überleben und wie sie andere Mikroorganismen im Boden beeinflussen. Als Modellorganismus benutzen wir *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0, ein natürlich vorkommendes Bakterium, welches aus suppressiven Böden in Morens (FR) isoliert wurde. CHA0 schützt Pflanzen vor Wurzelkrankheiten und ist wissenschaftlich gut charakterisiert. Mindestens zwei durch CHA0 produzierte antimikrobiell wirksame Substanzen (2,4-Diacetylphloroglucinol und Blausäure) sind an der Krankheitsunterdrückung beteiligt.

### **Bisherige Resultate**

**Überleben von freigesetzten Bakterien.** Um freigesetzte Bakterien in der Umwelt zu überwachen, wurde eine Methode zum direkten und spezifischen Nachweis der Zellen im Boden entwickelt. Immunofluoreszenz-Mikroskopie gekoppelt mit einem Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität zeigten, dass unter gewissen Bedingungen nur ein kleiner Teil (< 1%) der freigelassenen Bakterien mit traditionellen Methoden wie Kultivierung auf Nährmedien nachweisbar ist. Der Hauptanteil der Bakterien stirbt jedoch entgegen bisheriger Annahmen nicht ab, sondern überlebt längere Zeit als unkultivierbare Subpopulation im Boden. Interessant ist, dass auf den Wurzeln und in der Rhizosphäre der grösste Teil von freigesetzten CHA0-Zellen metabolisch aktiv bleibt, im unbewachsenen Boden und in tieferen Bodenschichten die meisten Zellen dagegen in einem inaktiven „schlafähnlichen“ Zustand überdauern. CHA0 ist nicht nur fähig mehrere Monate im Boden zu überdauern, sondern überlebt auch lange Zeit auf Ernterückständen. Versuche mit einer

antibiotika-negativen Mutante von CHA0 zeigten, dass die Bildung antimikrobieller Metaboliten die Überlebenschancen dieses Bakteriums in der Umwelt vergrössert.

**Können Bakterien ins Grundwasser gelangen?** Bisher nahm man an, dass freigelassene Bakterien sich kaum über oberflächennahe Schichten hinaus verbreiten. Untersuchungen in Freiland-Lysimetern (2 m Durchmesser, 2.5 m Tiefe) und Bodenprofilen haben aber gezeigt, dass Bakterien bei starkem Regenfall entlang von Rissen, Regenwurm- und Wurzelkanälen in grosser Anzahl und sehr rasch in mehrere Meter tiefe Bodenschichten vordringen. Es besteht daher ein gewisses Risiko, dass freigesetzte Bakterien bis ins Grundwasser gelangen können.

**Beeinflussen freigesetzte Bakterien die natürliche Mikroflora?** Versuche in Mikrokosmen mit natürlicher Erde zeigten, dass sowohl der Wildstamm CHA0 als auch eine genetisch veränderte antibiotika-überproduzierende Mutante nur kleine Veränderungen in der residenten Bakterienpopulation auslösen. Diese Effekte waren i) vorübergehend, ii) ähnlich für den Wildstamm und den genetisch veränderten Stamm und iii) weniger ausgeprägt als die Veränderungen der Population im Laufe der natürlichen, zeitlich bedingten Veränderungen (Pflanzenalter, Jahreszeiten) und scheinen daher vom Standpunkt der Biosicherheit betrachtet, von geringer Bedeutung zu sein.

**Horizontaler Gentransfer.** Um eine Optimierung der biologischen Krankheitsbekämpfung mit Bakterien zu erzielen, versucht man Mutanten mit verbesserten Biokontroll-Eigenschaften herzustellen. In Zusammenarbeit mit dem mikrobiologischen Labor von Professor Dieter Haas an der Universität von Lausanne konnten einige für die Krankheitsunterdrückung wichtige Regulationsmechanismen bestimmt werden. Zudem ist es gelungen eine Mutante zu konstruieren, welche eine Überproduktion an antimikrobiellen Substanzen aufweist und daher Pflanzen besser vor bodenbürtigen Pathogenen schützen kann. Für eine Freisetzung solcher Mutanten ist es jedoch wichtig zu untersuchen, ob Gene eines genetisch manipulierten oder auch eines Wildstammes in der Natur zu anderen Bakterien transferiert werden können. Versuche in Mikrokosmen mit künstlicher Erde mit *P. fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigten, dass tatsächlich ein chromosomaler Gentransfer in der Rhizosphäre von Weizen nicht aber in unbepflanztem Boden stattfindet. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Vorgangs und das Auftreten von Rekombinanten hängt jedoch stark vom selektiven Vorteil der Rekombinanten ab.

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen des Schwerpunktprogramms Biotechnologie (SPP Biotech) durchgeführt und waren auch Teil von vier (zwei bereits abgeschlossenen und zwei noch laufenden) EU-Projekten und eines COST-Projektes. Aus den Arbeiten resultierten 30 wissenschaftliche Publikationen. Geneviève Défago war Mitglied der „Eidgenössischen Fachkommission für Biologische Sicherheit“ (EFBS, Vizepräsidentin von 1997-2001) und Expertin für die Kommission für EU-Direktiven betreffend „placing of microbial plant protection products on the market“ (91/414/EEC und 2001/36/EC).

## **Ausblick**

Die Forschung der letzten Jahre hat einige Methoden und molekulare Werkzeuge geliefert, um Mikroorganismen in der Umwelt zu verfolgen und ihre metabolische Aktivität zu untersuchen. Es hat sich gezeigt, dass in den Boden eingeführte Bakterien fähig sind, sehr lange zu überleben und auch bis ins Grundwasser zu gelangen. Es gibt auch Hinweise darauf, dass sogar Tier- und Humanpathogene gewisse Kulturen, vor allem Gemüsekulturen, besiedeln können und auch auf

Pflanzenresten gut überleben. Das Bakterium *P. aeruginosa*, welches auch als Humanpathogen bekannt ist, kann sich im Boden ohne Probleme vermehren und Pflanzenwurzeln besiedeln. Auch von *Burkholderia cepacia* gibt es innerhalb derselben Spezies nahe verwandte Stämme, von welchen die einen humanpathogen, die anderen pflanzenpathogen, die dritten jedoch harmlos sind oder sogar Pflanzenkrankheiten unterdrücken können. Bis jetzt gibt es keine Möglichkeiten, diese Stämme mit einfachen Tests zu unterscheiden. In zukünftigen Forschungsprogrammen wäre nun folgende Frage zu untersuchen: Welches sind die Kriterien für die Unterscheidung von Pflanzenpathogenen, Tier- und Humanpathogenen, bzw. nützlichen Bakterien? Hat man die geeigneten molekularen Marker dafür gefunden, könnten Bakterienpopulationen im Boden mit Microarrays auf ihr Schad- bzw. Nutzpotalential untersucht werden.

Pathogenitäts- und auch Biokontrollfaktoren hängen von Signalen ab, welche Bakterien aussenden, wenn sie eine genügend grosse Populationsdichte erreicht haben (quorum sensing). Die Frage ist offen, ob unterschiedliche Stämme oder sogar Spezies „die gleiche Sprache sprechen“. Es müsste abgeklärt werden, ob Signale von gutartigen Stämmen Pathogenitätsfaktoren in anderen Bakterien (z. B. in den Boden gelangte Human- oder Tierpathogene) aktivieren können. Generell ist bis jetzt wenig bekannt über die Interaktion verschiedener Mikroorganismen im Boden.

*Hinweis:*

*Illustrationen zu diesem Abstract finden Sie auf dem dem Internet unter <http://www.bats.ch/bern/index.html>.*

*Dieses Thema wurde auch in der Ausgabe 12 und 14 „focus Biosicherheit“ Hrsg. Fachstelle B.I.C.S.). Die Publikationen liegen auf der Tagung aus oder können über das Zentrum BATS bezogen werden.*