



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Einfluss von Auxin ausscheidenden Mikroorganismen auf die Sprossbiomasse von Sonnenblumen und deren Spurenelementaufnahme

Semesterarbeit von
Alexander Pirochta

Betreuung durch
Monica Marchetti
Dr. Brett H. Robinson
Prof. Rainer Schulin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Einführung | 2 |
| 1.1 Spurenelemente in der Umwelt | 2 |
| 1.2 Spurenelement Aufnahme durch Pflanzen | 2 |
| 1.3 Faktoren, die die Spurenelement Aufnahme beeinflussen | 3 |
| 1.4 Phytohormone | 4 |
| 1.4.1 Auxin | 5 |
| 1.4.2 Ausscheidung von Auxin durch Bodenmikroorganismen | 5 |
| 2. Hypothese und Grundlage | 8 |
| 3. Fragestellung und Vorgehen | 9 |
| 4. Material und Methoden | 10 |
| 4.1 Experiment Design | 10 |
| 4.2 Testaufbau | 10 |
| 4.3 Pflanzenanalyse | 14 |
| 5. Ergebnisse | 16 |
| 5.1 Wirkung der Mikroorganismen auf die Biomasse | 16 |
| 5.2 Wirkung der Mikroorganismen auf die Spurenelementaufnahme | 17 |
| 6. Diskussion | 19 |
| 7. Schlussfolgerungen und Ausblick | 23 |
| Danksagung | 24 |
| Anhang | 25 |
| Literatur | 27 |

1. Einführung

1.1 Spurenelemente in der Umwelt

Spurenelemente treten in geringen Konzentrationen (<1000 mg/kg) in der Erdkruste, Böden, Wasser und lebenden Organismen auf (Paris und Jones 1997). In Böden stammen Spurenelemente aus natürlichen und anthropogenen Quellen. Sind sie im Boden in hohen Konzentrationen vorhanden, kann dies einen negativen Effekt auf die Bodenfruchtbarkeit haben und kann für die ökologische und die menschliche Gesundheit eine Gefährdung darstellen wenn sie in die Nahrungskette oder in das Grundwasser gelangen (Robinson et al. 2005). Um die Flüsse der Spurenelemente in der Umwelt zu kontrollieren, wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Boden-Pflanzensystemmodelle erarbeitet, welche unter dem Begriff „Phytomanagement“ zusammengefasst werden. Ziele dieser Techniken sind unter anderem Defizite essentieller Spurenelementen zu vermindern und/oder das Risiko durch die Kontamination von Spurenelementen zu reduzieren (Robinson 2008).

1.2 Spurenelement Aufnahme durch Pflanzen

Einige Spurenelemente haben keinen bedeutenden Einfluss auf Pflanzen, andere wirken ab einer gewissen Konzentration toxisch und noch andere sind lebensnotwendig (essentiell). Sind essentielle Spurenelemente in zu geringen Konzentrationen vorhanden, kommt es zu Mangelerscheinungen beim Organismus. Überschreiten deren Konzentrationen jedoch bestimmte Werte, so können selbst sie toxisch wirken. Diese lebensnotwendigen Spurenelemente welche Teil der Mikronährstoffe sind, sind: Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, Ni, Cl.

Die meisten Elemente werden hauptsächlich über die Wurzeln aufgenommen. Dabei werden die gelösten Spurenelemente in der Bodenlösung hauptsächlich über die Wurzelhaare aufgenommen und gelangen entweder über den apoplastischen oder den symplastischen Weg zum Zentralzylinder (s. Abb.1). Der apoplastische Weg geschieht extrazellulär über die Zellwände, der symplastische hingegen intrazellulär von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata. Der symplastische Weg nimmt nur bestimmte gelöste Substanzen auf und wirkt so als eine Barriere für gewisse Ionen wodurch die aufgenommenen Spurenelemente ungehindert zum Zentralzylinder gelangen. Der apoplastische Weg der Wurzelrinde ist hingegen vom Zentralzylinder durch den Caspary-Streifen der Endodermis getrennt, dieser verhindert den Durchtritt von Wasser und Nährstoffe (Frossard et al. 2006). Um hier weiter zu gelangen, müssen die Nährstoffe die Plasmamembran einer Endodermiszelle passieren um über den Symplasten den Zentralzylinder zu erreichen. Somit wird sichergestellt dass keine Ionen in das Leitgewebe der Wurzel gelangen, ohne eine selektiv permeable Zellmembran passiert zu haben (Campbell und Reece 2003). Es gibt jedoch Schwachstellen wo die Caspary-Streifen weniger oder gar nicht auftreten. Dies kommt in den apikalen Meristemzellen, wo die Zelldifferenzierung noch nicht stattgefunden hat, sowie in den basalen Zonen, wo die lateralen Wurzeln die Endodermis durchdringen, vor. Diese Schwachstellen bilden nichtselektive Ionenkanäle (Marschner 1993). Einmal im Zentralzylinder angekommen, werden die Nährstoffe dann von den Endodermiszellen und den Parenchymzellen in den Zellwänden abgeladen. Damit können sie über den Apoplasten ungehindert in die Tracheiden und Xylemgefäße eintreten und somit im Spross-System aufsteigen (Campbell und Reece 2003).

Bei der Spurenelementaufnahme spielt die Grösse und die Ladung des Elementes eine wichtige Rolle. Kleine und wenig geladene Ione werden besser durch die Wurzeln aufgenommen als grosse, geladene Ione. Mikronährstoffe werden nur in geringen Mengen

benötigt und kommen in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Deshalb ist es schwierig, genaue Aussagen über ihren Aufnahmemechanismus in die Pflanze zu machen (Marschner 1993). Über nicht selektive Ionenkanäle können viele Ionen über den apoplastischen Weg in die Pflanze gelangen. Andere hochgradig selektive Transportwege erfolgen mit Hilfe von Carrier-Proteinen. Hier werden Spurenelemente mittels Transportproteinen von einem Gebiet höherer Konzentration in ein Gebiet niedriger Konzentration oder entgegen einem Konzentrationsgefälle transportiert. Letzteres kostet Energie in Form von ATP (Raven, 2005). Es existieren aber verschiedene Transportsysteme, beispielsweise für Zink, Eisen und Kupfer, welche auch andere Spurenelemente mit ähnlicher Größe durch die Zellmembran in den symplastischen Raum in den Spross schleusen. Diese Systeme werden aktiver, falls ein Mangel von einem essentiellen Spurenelement vorliegt (Reid und Hayes 2003, Robinson 2008).

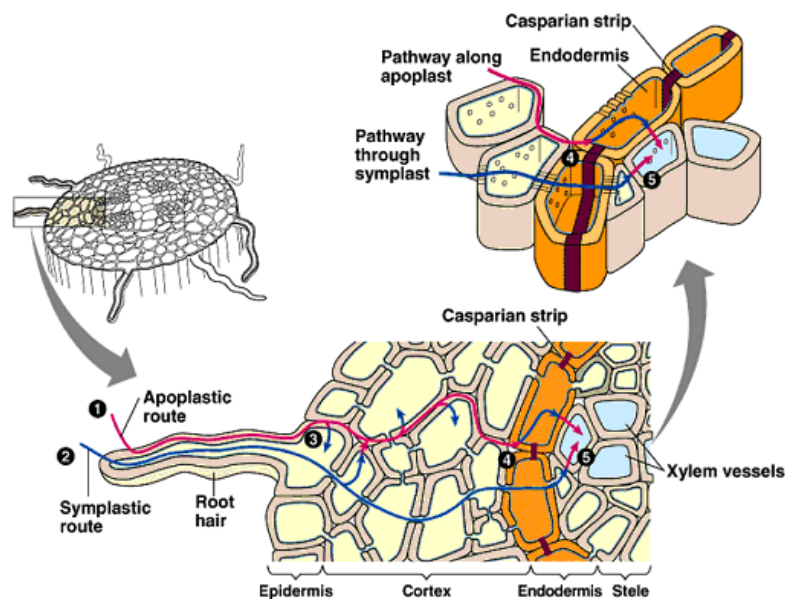


Abb.1: Aufnahmewege der Nährstoffe durch die Pflanzenwurzeln.
(Quelle: Pearson Education Inc., veröffentlicht durch Benjamin Cummings)

1.3 Faktoren, die die Spurenelement Aufnahme beeinflussen

Die Aufnahme der Spurenelemente hängt von dessen Elementeigenschaften, den Umweltfaktoren und den Pflanzeigenschaften ab. Faktoren, welche die Spurenelemente und deren Verfügbarkeit betreffen sind: Spezierung, Chelatbildung, physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften wie pH-Wert, Kationenaustauschkapazität, Redoxbedingungen, Bodenstruktur und Wassergehalt (Marschner 1993). Faktoren, die die Aufnahmefähigkeit der Pflanzen betreffen sind: Sprossbiomasse und Transpiration, Translocation und das Wurzelsystem.

Alle diese Faktoren können durch Mikroorganismen beeinflusst werden. Man unterscheidet drei Gruppen von Mechanismen.

Der erste Mechanismus betrifft Mikroorganismen welche direkt mit den Spurenelementen interagieren und somit ihre Mobilität beeinflussen. Hiermit ist die Anpassung von Organismen an Umgebungen, welche reich an Metallen sind, zum Teil der Aktivität von Mikroorganismen zu verdanken, welche die Dynamik der Metalle im Boden verändern

können (Gadd *et al.*, 1993; Gadd *et al.*, 2000; Gadd *et al.*, 2004; Vanbroekhoven *et al.*, 2007; Whiting *et al.*, 2001). Indem sie die geochemischen Verhältnisse des Bodens verändern oder indem sie direkt die Spezierung der Spurenelemente beeinflussen, können manche Mikroorganismen die Bioverfügbarkeit der Spurenelemente beeinflussen. Mehrere Mechanismen können die Mobilisierung der Metalle fördern (bsw. Chelatbildung, Protonierung, chemische Transformation). Andere Mechanismen führen eher zu einer Immobilisierung der Metalle (bsw. Ausfällung, Sorption, intrazelluläre Aufnahme, Abbau von Chelatbildner) (Tabak *et al.*, 2005).

Die zweite Gruppe betrifft Mechanismen die pflanzliche Entwicklung fördern. Diese Bakterien gehören zu den „Plant growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR), welche einen positiven Einfluss auf die Pflanze haben (Kloepper & Schroth, 1978). In kontaminierten Böden können die PGPR die Aufnahme der Spurenelemente in zwei Weisen beeinflussen: durch Erhöhung der Biomasse der oberirdische Teile der Pflanze können sie eine höhere Transpiration verursachen und durch Förderung der Entwicklung des Wurzelsystems können sie die Wechselwirkung der Wurzeloberfläche mit den Spurenelementen erhöhen. Es existieren viele Mechanismen mit denen die PGPR eingreifen können. Sie können die Pflanze in indirekter Weise beeinflussen indem sie Antibiotika gegen Pathogene produzieren (Araujo *et al.*, 2005) und indem sie mit anderen schädlichen Mikroorganismen in Konkurrenz treten. Sie können die Pflanze auch in einer direkteren Weise beeinflussen indem sie die Aufnahme von Eisen und Phosphor vereinfachen (Lin *et al.*, 1983) und indem sie die Fixierung von Stickstoff begünstigen (Mallik *et al.*, 2008).

Die dritte Gruppe betrifft Mikroorganismen die die Physiologie und/oder die Morphologie des Wurzelsystemes verändern können. Obwohl die Aufnahmemechanismen mancher Metallelemente noch nicht vollständig bekannt sind wird akzeptiert, dass viele Metalle durch nicht spezifische Kanäle aufgenommen werden (Reid & Hayes, 2003). Dies kann erreicht werden, indem die Permeabilität der Endodermis verändert wird. Die Beschädigung der Endodermis kann durch phytopatogene oder endophytische Mikroorganismen durch physische oder chemische Einflüsse verursacht werden.

Die Wurzelphysiologie und -morphologie kann auch, durch von Mikroorganismen ausgeschiedenen Phytohormonen, beeinflusst werden und somit einen Einfluss auf die Spurenelementaufnahme haben. Dies werden wir in diesem Studium anhand zweier Mikroorganismen untersuchen.

1.4 Phytohormone

Phytohormone sind biochemische Botenstoffe welche als chemische Signale in den Pflanzen agieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Pflanzenwachstum und -entwicklung indem sie die Teilung, Streckung und Differenzierung von Zellen beeinflussen (Campbell und Reece 2003). Die Phytohormone werden in zwei verschiedenen Weisen hergestellt: endogene Produktion in bestimmten Pflanzenorganen oder exogene Ausscheidung durch assoziierte Mikroorganismen (Kumar und Lonsane 1989, Arshad und Frankenberger 1991, Costacurta und Vanderleyden 1995, Patten und Glick 1996). Sie wirken am Syntheseort selber und an anderen Stellen der Pflanze wo sie verfrachtet wurden, wo sie spezifische, biochemische, physiologische und morphologische Antworten auslösen (Baca und Elmerich 2007) indem sie die Expression von Genen und die Synthese von Enzymen, Pigmenten und Metaboliten erzeugen oder unterdrücken (Dörffling K. 1982, Zakharychev V.V. 1999, Kulaeva O.N. 2002, Agrinos G.N. 1997). Unter anderem hat dies eine Antwort der Pflanzen auf veränderte Umweltbedingungen zur Folge. (Baca und Elmerich 2007).

Eine wichtige Eigenschaft der Hormone ist, dass sie in sehr geringen Mengen wirksam sind und grosse Veränderungen im Organismus auslösen können. Jedes Hormon kann mehrere

Wirkungen in der Pflanze erzeugen. Seine Aktivität hängt von seinem Wirkort, dem Entwicklungsstadium der Pflanze, der Hormonkonzentration und der Reaktionbereitschaft der Pflanzenzellen ab. Wichtig ist auch die relative Konzentration der Hormone zueinander, da sie nicht unabhängig voneinander wirken sondern miteinander in Wechselbeziehung stehen. Es gibt sechs Hauptklassen der Phytohormone: Auxin, Cytokinine, Gibberelline, Ethylen, Abscisinsäure und Brassinoloide (Campbell und Reece 2003). In diesem Projekt werden wir mit Auxin arbeiten.

1.4.1 Auxin

Auxine sind von allen Phytohormonen am besten untersucht und wirken auf vielfache Art und Weise. Ihre Wirkung ist je nach Zeitpunkt, Art und Gewebe verschieden (Raven et al. 2005). In hohen Konzentrationen wirken Auxine toxisch, bei normalen Konzentrationen sind sie jedoch essentiell für die Zellteilung (Geisler und Murphy 2007).

Es gibt sowohl synthetische als auch natürliche Auxine, wovon das wichtigste und am meisten vorkommende in den meisten Pflanzen Indol-3-Essigsäure (IES) ist (s. Abb.2) (Davies 1987).

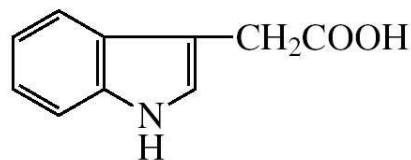


Abb.2: chemische Struktur von Indol-3-Essigsäure
(Quelle: Tsavkelova et al. 2006)

IES ist verantwortlich für die Teilung, Streckung, und Differenzierung von Pflanzenzellen und Gewebe (Tsavkelova et al. 2006). Die Hauptfunktionen betreffen die Stimulierung von Spross-Streckung, Wurzelwachstum, Zelldifferenzierung und Verzweigung. Ausserdem, steuert es die Fruchtentwicklung, fördert die Apikaldominanz und ist an Phototropismus und Gravitropismus beteiligt (Campbell und Reece 2003). Damit diese Prozesse stattfinden, besitzen Pflanzen Auxin bindende Proteine, welche Auxin mit hoher Affinität und Spezifität binden. Diese initiieren den Auxin-Signal Weg was zu verschiedenen zellulären Antworten führt (Kim et al. 2001). Dabei glaubt man, dass es zu Auxin-induzierten Veränderungen in der Genexpression kommt (Guilfoyle et al. 1998). Insbesondere ist zu erwähnen, dass Auxin in niedrigen Konzentrationen zu einer Streckung und Verästelung von Wurzeln führt, was eine grössere Wurzelbiomasse zur Folge hat (Hobbie 2007).

Bei der Zellstreckung wird durch Auxin die Protonenpumpe in der Plasmamembran der Zellen stimuliert, wodurch das Membranpotenzial erhöht und der pH-Wert in der Zellwand reduziert wird. Durch die Ansäuerung der Zellwand werden Enzyme aktiviert die zum Teil die Bindungen zwischen den Zellulose-Mikrofibrillen hydrolisieren wodurch eine Lockerung der Zellwandstruktur entsteht. Die Zunahme des Membranpotentials führt hingegen zu einer gesteigerten Ionenaufnahme der Zelle, wodurch osmotisch Wasser durch die Zelle aufgenommen wird. Dabei führt die Wasseraufnahme zusammen mit der erhöhten Plastizität der Zellwand zu einem Streckungswachstum der Zelle (Campbell und Reece 2003).

1.4.2 Ausscheidung von Auxin durch Bodenmikroorganismen

Auch boden- und pflanzenassoziierte Bakterien haben die Fähigkeit Auxin, Cytokinine und Gibberelline herzustellen was verantwortlich ist für die Förderung des Pflanzenwachstums, die symbiotische Assoziierung und auch für die Pathogenese (Baca und Elmerich 2007). Phytohormone werden als biochemische Botenstoffe für die Kommunikation zwischen der Wirtspflanze und ihrer Mikroflora benötigt. Die Fähigkeit der Mikroorganismen Phytohormone zu synthetisieren muss aber vor allem als deren Pathogenität angesehen werden, da viele pathogene Mikroorganismen Wachstumsregulatoren in exzessiven Ausmass als von der Pflanze benötigt produzieren. Dies stört das hormonelle Gleichgewicht der Pflanzen was zu verschiedenartige Krankheiten führt, wie Gallbildung, Getreidebrand, Hernie und Gefässwulst (Agrios 1997, Shimanda et al. 2000, Chung et al. 2003, Yurekli et al. 2003).

Auxinbildung wurde sowohl bei vielen Rhizosphäre- und Epiphytenbakterien festgestellt wie auch bei Pilzen. Auxin bildende Mikroorganismen sind aktuell die am besten studierten Phytohormon Produzenten, weshalb diese auch oft im Pflanzenbau Anwendung finden. Mikrobielle IES Präparate werden dabei benutzt um die Samenkeimung zu fördern, die Wurzel Bildung zu beschleunigen sowie deren Biomasse zu steigern (Tsavkelova et al. 2005). Die Produktion von IES ist unter Bodenbakterien weit verbreitet, da sie sich dadurch einen Nutzen schaffen. Durch dessen Produktion stimulieren sie das Pflanzenwachstum wodurch sie mehr Pflanzenmetabolite erhalten welche sie für das eigene Wachstum benützen können (Gaudin et al. 1994). Ein anderer Vorteil, die sie durch die IES Synthese erhalten, ist die Detoxifizierung von Tryptophan (ein Auxinpräkursor) analogen, welche schädlich für die bakteriellen Zellen sind. Zudem führt IES zu einer Inhibition der Schutz Enzymen der Pflanzen, was eine bakterielle Invasion erleichtert (Gaffney et al. 1990; Robinette und Matthyse 1990).

Von Bakterien werden viele verschiedene IES Biosynthesewege benutzt, wobei ein Bakterienstamm mehr als einen Produktionsweg benützen kann. Es existieren Hinweise, dass Mikroben je nach Umweltfaktoren selektiv einen gewissen Biosyntheseweg aussuchen. Die Synthese von IES kann dabei durch die variablen Bedingungen in der Rhizosphäre, so wie Temperatur, pH, oder Verfügbarkeit an Nahrung und Auxinpräkursore beeinflusst werden (Patten und Glick 1996).

Bei gewissen Synthesewegen führt die Zugabe von Tryptophan zu einer signifikanten Erhöhung der IES Herstellung. Es gibt zwei exogene Quellen für Tryptophan für Rhizobakterien: Abgabe durch Proteine bei sterbenden Zellen und durch Wurzelexudate. Da die Tryptophan Konzentration in den Wurzelexudaten je nach Pflanzenspezies verschieden ist, ist davon auszugehen, dass die Produktion von IES durch ein Rhizobakterium durch die Pflanze reguliert werden kann (Patten und Glick 1996). Pflanzen haben verschiedene Regulationssysteme mit welchen sie IES auf nicht toxischen oder physiologisch geeigneten Konzentrationen halten können (Sitbon et al. 1992). Jedoch synthetisieren phytopatogene Bakterien IES hauptsächlich über den indoleacetamid Weg, für welchen man glaubt, dass er hauptsächlich ein mikrobieller IES Biosyntheseweg ist (Manulis et al. 1991, Gaudin et al. 1994), wodurch Pflanzen die Herstellung an IES nicht beeinflussen können. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) hingegen, synthetisieren IES hauptsächlich über den indolepyruvic Weg, welcher durch die Pflanzenmetabolite reguliert werden kann (Patten und Glick 1996).

Ob mikrobielles IES wachstumsstimulierend oder pathogen bei Pflanzen wirkt hängt davon ab, wie viel des Hormons (Auxin) der Pflanze zur Verfügung steht (Patten und Glick 1996). In manchen Systemen (z.B. Wurzeln Wachstum) ist Auxin, hauptsächlich in hohen Konzentrationen, inhibitorisch (Davies 1987). Ein wichtiger Punkt um vorhersagen zu können

ob bakterielles IES für das Pflanzenwachstum stimulierend oder pathogen wirkt, ist die Kenntnis der durch die Pflanze selbst hergestellten Menge an Auxin. In Pflanzenwurzeln könnte die vorhandene endogene Menge an IES suboptimal oder optimal für das Wachstum sein (Pilet und Saugy, 1987; Taiz und Zeiger 1991). Es wird angenommen, dass ein zusätzlicher Input in den IES Pool durch Bakterien das endogene Auxin zu einer optimalen oder supraoptimalen Menge führen könnte, was jeweils entweder Pflanzenwachstum induziert oder pathogen wirken könnte (Patten und Glick 1996).

2. Hypothese und Grundlage

Aufgrund der unter der Einleitung geschilderte Erkenntnisse und schon im vorigen Jahr in diesem Bereich durchgeführten Versuche, wurden folgende Hypothesen abgeleitet:

- 1) Da Auxin ein Phytohormon ist, das die Wurzelmorphologie und/oder -physiologie beeinflusst ist davon auszugehen, dass es die Aufnahme von Spurenelemente durch die Pflanze beeinflusst.

Bereits im vorigen Jahr (2008) wurde durch Reiner an der ETH ein Versuch zum Einfluss von synthetischem Auxin auf die Aufnahme von Spurenelemente durch Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde herausgefunden, dass Auxin in gewissen Konzentrationen je nach Substrat entweder eine Zunahme oder eine Abnahme der Aufnahme von Spurenelemente durch Sonnenblumen erzeugt.

- 2) Da viele Bodenmikroorganismen ebenfalls Auxin synthetisieren, könnten diese die gleiche Wirkung besitzen wie in der ersten Hypothese für Pflanzen beschrieben.

In dieser Hinsicht haben wir für unseren Versuch zwei Mikroorganismen ausgesucht: ein Bakterium, *Paenibacillus polymyxa*, und einen Pilz, *Rhizoctonia solani*. Für diese konnte in früheren Versuchen nachgewiesen werden, dass sie Auxin produzieren, der Pilz jedoch nur unter Zugabe von tryptophan (Furukawa et al. 1996, Chanway und Nelson 1990, Selvadurai et al. 1991).

Hier ist hinzuweisen, dass in einem ebenfalls im vorigen Jahr (2008) an der ETH durchgeführten Versuch durch Vachey herausgefunden wurde, dass diese zwei Mikroorganismen die Aufnahme von Spurenelementen durch Sonnenblumen senken.

- 3) Als Pflanze wurde die Sonnenblume (*Helianthus annuus*) ausgewählt, da diese in den vorigen Versuchen durch Reiner (2008) und Vachey (2008), bei der Spurenelementeaufnahme durch Pflanzen, die am meisten signifikante Ergebnisse ergab.

3. Fragestellung und Vorgehen

Die zwei vorläufig an der ETH durchgeführten Studien im Zusammenhang mit Phytohormone und Spurenelementaufnahme durch Pflanzen wurden jeweils nur mit synthetischem Auxin auf verschiedene Substrate und mit Mikroorganismen nur auf Agar als Substrat durchgeführt. Die Idee dieses Versuches ist diese zwei Studien zu kombinieren und den Effekt von durch die Mikroorganismen *Paenibacillus polymyxa* und *Rhizoctonia solani* synthetisiertes Auxin auf die Aufnahme von Cu, Ni und Zn durch Sonnenblumen in verschiedene Substrate zu untersuchen.

Daraus und aufgrund der Theorie und der davon abgeleiteten Hypothesen wurden folgende Fragestellungen erstellt:

- 1) Welchen Effekt haben die Mikroorganismen auf die Aufnahme von Spurenelementen durch Pflanzen?
- 2) Welchen Effekt haben die Mikroorganismen auf die Biomasse der Pflanzen? (Nimmt diese zu oder ab? Kann dies eine Erklärung für eine eventuelle Änderung in der Spurenelementaufnahme sein?)
- 3) Welchen Effekt hat das Substrat auf die Mikroorganismen und die Pflanzen? (Wie verhalten sich die Mikroorganismen und die Pflanzen im Agar und in den sterilen Böden im Vergleich zu den unbehandelten Böden? Wieso?)

Um diese Fragestellungen zu beantworten wird in diesem Versuch die Rhizosphäre von Sonnenblumen, welche in vier verschiedene Medien Wachsen (Agar, zwei sterilisierten Böden und einen unbehandelten Boden) mit zwei Mikroorganismen (ein Bakterium, *Paenibacillus polymyxa*, und ein Pilz, *Rhizoctonia solani*) die Auxin ausscheiden, geimpft. Nach zwei Wochen werden die Sonnenblumen geerntet und getrocknet um den Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf die Biomasse und die Spurenelementaufnahme mittels ICP-OES zu messen.

4. Material und Methoden

4.1 Experiment Design

Es wurden vier verschiedene Substrate benützt: Agar, zwei nicht sterilisierte Böden (nicht steriler Boden 1 und 2 – NS1 und NS2) und einen mit Gamma Strahlen sterilisierte Boden (steriler Boden 1 – S1). In jedes Substrat wurde eine Sonnenblume gepflanzt. Die verschiedenen Substrate wurden jeweils drei verschiedener Behandlungen unterzogen: Impfung der Rhizosphäre mit zwei Mikroorganismen (ein Bakterium *Paenibacillus polymyxa*, und einen Pilz, *Rhizoctonia solani*) und einer sterilen LB Lösung (Kontrolle). Für jede Behandlung wurden pro Substrat fünf Wiederholungen durchgeführt. Insgesamt ergaben sich somit für das Experiment sechzig Proben.

4.2 Testaufbau

Pflanzenzüchtungsboxen

Als Pflanzenzüchtungsboxen wurden durchsichtige Plastikboxen mit einem Mikrofilter im Deckel benützt (Abb.3). Vor dem Gebrauch wurden diese autoklaviert (15 min., 121 °C) um eine Aufzucht unter sterilen Bedingungen zu gewährleisten.

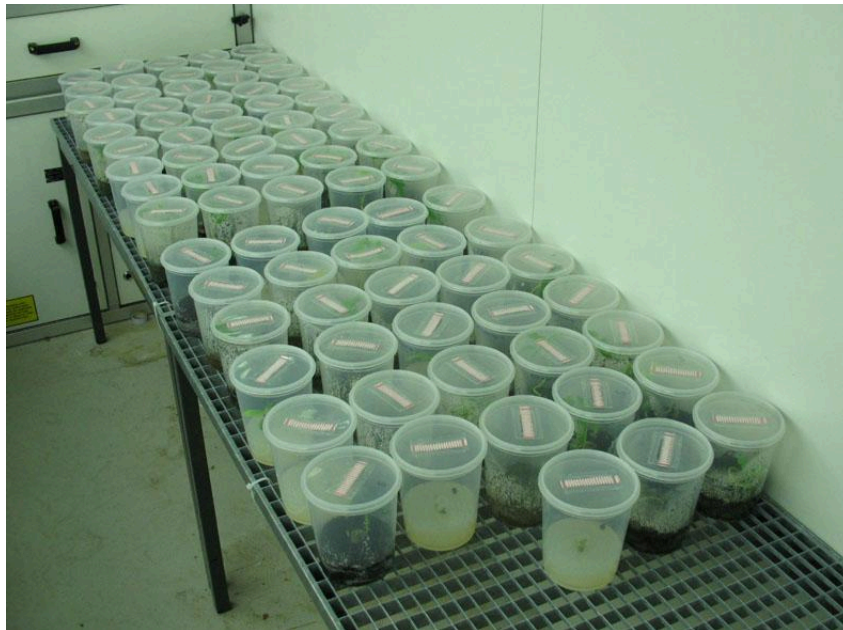


Abb.3: Pflanzenzüchtungsboxen mit Mikrofilter

Vorbereitung des Agars

In 20 Boxen wurden 250 ml 10%-iger Agarlösung (Merck KGaA, 1.01615.1000) gegeben. Diese enthielt eine Pflanzennährlösung und eine bestimmte Menge an Spurenelementen, dessen Aufnahme man untersuchen wollte. Für alle Lösungen wurde deionisiertes Wasser benützt.

Für die Pflanzennährlösung wurde eine modifizierte Hoagland's Lösung hergestellt (Tab. 1), diese enthielt sowohl Makronährstoffe als auch Mikronährstoffe.

Tab. 1 : Zusammensetzung von Hoagland's modifizierter Lösung

| Stoffe | Konzentration in mg/L | Konzentration in μM |
|-------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$ | 94.46 | 400 |
| $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 49.30 | 200 |
| KH_2PO_4 | 13.61 | 100 |
| KNO_3 | 50.55 | 500 |
| $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 2.78 | 20 |
| H_3BO_3 | 0.62 | 10 |
| $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ | 0.34 | 2 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.02 | 0.1 |
| NaCl | 1.17 | 20 |
| $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.06 | 0.2 |
| $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.05 | 0.2 |

Für die Spurenelemente war eine Stammlösung bereits vorhanden (Tab. 2). Die Agarlösung wurde so vorbereitet, dass die Spurenelemente Konzentrationen unter den Toxizitätsgrenzen für die Pflanzen lag. Die Konzentration der Spurenelemente war also 1 mg/L Pb und die molaräquivalenten von Cu, Ni und Zn (s. Tab. 2).

Tab. 2 : Zusammensetzung der Spurenelemente-Stammlösung

| Stoffe | mol/L | Konzentration der Stammlösung (mg/L) | Konzentration in der Agarlösung (mg/L) |
|--------|--------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Pb | 0,0048 | 1000 | 1 |
| Cu | 0,0048 | 310 | 0.31 |
| Zn | 0,0048 | 320 | 0.32 |
| Ni | 0,0048 | 280 | 0.28 |

Die Agarlösung wurde autoklaviert (15 min., 121 °C) und anschliessend unter sterilen Bedingungen in die 20 Töpfe verteilt (250 ml pro Topf). Die Töpfe wurden sofort mit einem Deckel mit Mikrofilter verschlossen um mögliche Kontaminationen zu verhindern.

Vorbereitung der Töpfe mit Erde

Zusätzlich zum Agar wurden zwei verschiedene Bodentypen benutzt: einer ein kontaminierter, der sowohl als steriler (S1) und unsteriler Boden (NS1) benutzt wurde (wird Boden 1 genannt), der andere ein unkontaminierter Boden (wird Boden 2 genannt), der nur als unsteriler Boden benutzt wurde (NS2).

Der kontaminierte Versuchsboden (Boden 1) wurde in 432 m.ü.M. hoch gelegten Witzwil im Berner Seeland (46° 58' 60" Nord und 7° 2' 60" Ost) gesammelt. Diese Region, welche ursprünglich ein grosses Moorgebiet war, konnte aufgrund der 1. Juragewässerkorrektion (1868 - 1890) und Meliorationsarbeiten, landwirtschaftlich genutzt werden. Da der Boden jedoch relativ arm an Nährstoffen war, wurde er von 1913 - 1954 mit Siedlungsabfällen der Stadt Bern gedüngt. Zu Beginn waren dies hauptsächlich organische Abfälle, die einen hohen Pflanzennährstoffgehalt aufwiesen; im Verlauf der Zeit jedoch sank die Qualität der dort entsorgten Materialien rapide ab, so dass der Anteil an nicht zersetzbaren und toxischen

Stoffen zunahm und der Boden als daraus resultierende Konsequenz stark mit Schwermetallen (Blei, Cadmium, Kupfer und Zink) kontaminiert wurde (Rytz, 2001). Ein Teil dieses Bodens wurde für diesen Versuch mit Gammastrahlen (mindestens 32 kGy) durch die Firma LEONI Studer AG (Däniken, Schweiz) sterilisiert.

Der unkontaminierte Boden (Boden 2) stammt von einem Ökosystemexperiment der WSL in Birmensdorf. Es wurde nur der Oberboden, bestehend aus leicht saurem Lehm, verwendet. Dieser stammte ursprünglich von einem Ackerboden nahe des Ortes Birr, welcher 405 m ü.M. im Kanton Aargau liegt (65° 76'46 ``Nord und 25° 42'04`` Ost). Die Gegend um die Gemeinde Birr ist eine landwirtschaftlich intensiv genutzte Ebene. In der FAO Klassifikation wird der Boden als Luvisol eingestuft (Zhao, 2006).

Tabellen 3 und 4 zeigen einige Charakteristika der benutzten Böden.

Tab. 3: Physikalische und chemische Charakteristika des kontaminierten Versuchsbodens aus Witzwil (Altorfer, 2007) und des unkontaminierten Versuchsbodens der WSL (Nowack et al., 2006).

| | Sand | Silt | Ton | pH -Wert | C _{org} | Carbonanteil |
|----------------------------------|--------|--------|--------|----------|------------------|--------------|
| Kontaminierter Boden (Boden 1) | 56,90% | 24,40% | 18,80% | 7,4 | 12,20% | 3,80% |
| Unkontaminierter Boden (Boden 2) | 35,50% | 49,40% | 15,10% | 6,4 | 1,50% | ≤ 0,1% |

Tab. 4: Elementkonzentrationen im kontaminiertem Boden, nach 0.1 NaNO₃ Extraktion (Altorfer, 2007)

| Element | Lösliche Fraktion (mg/kg Boden) |
|-----------|---------------------------------|
| Cu | 0.4 |
| Pb | 0.04 |
| Zn | 0.08 |

Pro Bodenart wurde in je 20 Töpfen eine bestimmte Menge an Erde gegeben. Der unkontaminierte Boden wurde jeweils in einer Menge von 250 g pro Topf gegeben, während in die Töpfe mit den kontaminierten Böden 150 g gegeben wurden. Für den sterilen Boden wurde wie mit dem Agar unter sterilen Bedingungen gearbeitet und nach dem Füllen der Töpfe wurden diese sofort mit einem Deckel mit Mikrofilter bedeckt.

Samensterilisation

Als Versuchspflanze wurde die Sonnenblume (*Helianthus annuus*) der UFA Schweiz verwendet. Die Samen wurden zuerst in einer 5% Natriumhypochlorid (NaOCl) Lösung sterilisiert indem sie 15 Minuten darin gerührt wurden, anschliessend wurden sie 5 mal mit sterilisiertem Wasser abgewaschen.

Samen einsetzen

Pro Topf wurden 3 Samen auf die Boden- respektiv Agaroberfläche gegeben. Für die Versuche mit den sterilen Böden und dem Agar musste unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden, also unter einem laminar Fluss Werkttisch und mit sterilen Werkzeugen, um Kontaminationen zu verhindern.

Der kontaminierte Boden wurden jeweils mit 100 ml Hahnenwasser bewässert, der sterile Boden mit 50 ml sterilem Hahnenwasser. Alle Töpfe wurden mit einem Deckel mit Mikrofilter bedeckt um gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Die Töpfe wurden anschliessend in einer Klimakammer gebracht und auf einen Tisch randomisiert ausgelegt wo sie 3,5 Wochen, bis zur Pflanzenernte, gehalten wurden. Die Klimakammer hatte einem Tages- und Nachtrhythmus von 16 bzw. 8 Stunden, die Temperatur betrug tagsüber 22° C, nachts 15° C; die Luftfeuchtigkeit lag permanent bei 75%. Die Boxen mit unsterilem Boden wurden nicht mehr bewässert, die Boxen mit sterilem Boden wurden noch einmal nach 5 Tagen mit 50 ml sterilem Hahnenwasser bewässert. Somit ergab sich unter Berücksichtigung der Textur der Böden einen Wassergehalt von 50 Vol.% für den Boden 1 und von 30 Vol.% für den Boden 2, was für beide Bodenarten eine Wassersättigung entspricht.

Gekeimte Samen Auslese

Fünf Tage nach der Saat wurden die am besten gekeimten Samen in den Töpfen gelassen, die restlichen wurden entfernt. Somit blieb ein Keim pro Topf. Um die in den Töpfen verbliebenen Keime wurden sterilisierte Plastikringe, von 1 cm Durchmesser sowie Höhe, durch leichtes Eindrücken in den Boden sowie Agar, eingesetzt. Die Ringe vermieden, dass sich die flüssige Bakterienkultur bei der Beimpfung der Rhizosphäre auf der Agar- oder Bodenoberfläche verteilte und somit direkt neben den Wurzeln infiltrieren würde.

Die ausgelesenen Keime wurden dann noch eine weitere Woche wachsen gelassen, bis sie gut entwickelt waren. Anschliessend wurde ihre Rhizosphäre mit Mikroorganismen inokuliert.

Kontrolle steriler Bedingungen

Zur Kontrolle des sterilen Boden wurde eine Suspension mit sterilem Ringerlösung gemacht, diese wurde gerührt und ablagern gelassen. Anschliessend wurde der Überstand auf einem Luria-Bertani Nährmedium (LB) Agarplatte verteilt um allfällige Kontaminationen nachzuweisen. Ebenso wurde eine Suspension mit sterilem Boden und flüssigem LB Medium vorbereitet. Diese wurde 24 Stunden lang gerührt und danach ablagern gelassen. Das Medium war noch klar (siehe Abb. 4), also haben sich keine Mikroorganismen entwickelt, was auch die Kontrolle mit der Agarplatte aussagte.

Zur Kontrolle der Samensterilisation wurden verschiedene Erlenmeier Gefässe mit 20 ml flüssigem LB Medium gefüllt und LB Agarplatten hergestellt. Darin wurde jeweils 1 Steriler Samen getan. Die Proben zeigten, dass die Oberfläche der Samen steril waren (Abb. 5).

Ebenso wurden fünf Ringe im flüssigen LB sowie auf Agar LB gesetzt um sie auf mögliche Verunreinigungen zu kontrollieren. Die Ringe waren ebenfalls steril (Abb. 6).



Abb. 4, 5 und 6 (von links nach rechts): Kontrolle steriler Bedingungen.

Benutzte Mikroorganismen und deren Vorbereitung

Für die Beimpfung der Rhizosphäre wurden zwei Mikroorganismen ausgesucht welche Auxin synthetisieren. Dies war ein Bakterium, *Paenibacillus polymyxa*, sowie ein Pilz, *Rhizoctonia solani*.

Paenibacillus polymyxa ist ein Gram-positives, sporebildendes, stickstofffixierendes Bakterium, welches im Boden und in der Rhizosphäre vorkommt (Chanway und Nelson 1990, Selvadurai et al. 1991). Es ist ein „Plant Growth Promoting Rhizobacterium“ (PGPR) (Cakmakci et al. 2007, Timmusk et al. 2005, Shishido et al. 1994, Timmusk und Wagner 1999, Rodriguez et al. 2000) und ist fakultativ anaerob (Mavingui et al. 1992).

Rhizoctonia solani ist ein phytopatogener Pilz welcher nur unter Zugabe von Tryptophan in effizienter Weise IES produziert (Furukawa et al., 1996).

Für das Bakterium wurde ein flüssiges Kulturmedium aus LB hergestellt. Von diesem wurden 20 ml in Erlenmeyergläser gegeben, mit Aluminiumfolie bedeckt und autoklaviert. Mittels autoklavierten Zahnstochern wurden dann Bakterienkolonien von einer Agarplatte ausgelesen und im flüssigen Kulturmedium angesetzt. Die Erlenmeyer wurden anschliessend für einen Tag bei 30°C und 140 rpm inkubiert.

Für den Pilz wurden Malzextrakt-Agarplatten hergestellt. Ein Agar Stück mit Pilzhyphen wurde dann auf die hergestellten Malzagarplatten gesetzt.

Inokulierung

Eine Woche nach der Sonnenblumenkeim Auslese, wurde die Rhizosphäre, der jetzt gut entwickelten Pflanzen, mit den Mikroorganismen oder mit steriler LB Lösung (Kontrolle) unter sterilen Bedingungen beimpft.

Eine Behandlung betraf das Inokulieren von Bakterien der Art *Paenibacillus polymyxa*, dabei wurden jeweils 100 µl der bakteriellen Lösung in den Ring gespritzt. In 100 µl betrug die Lebendzellzahl $1,342 \cdot 10^{10}$ CFU/ml.

Die zweite Behandlung war das einsetzen eines Pilzes der Art *Rhizoctonia solani*. Dabei wurde ein Stück Agar mit Pilzhyphen im Ring, neben den Wurzeln gesetzt.

Die Kontroll Töpfe dienten zur Kontrolle der Bakteriellen Inokulierung. Dabei wurden 100 µl reines LB in die Töpfe gespritzt.

Die inokulierten Töpfe wurden in der Klimakammer gelagert.

4.3 Pflanzenanalyse

Ernte

Die Sprosse der Sonnenblumen in den verschiedenen Töpfen wurden 2 Wochen nach der Impfung geerntet. Alle Pflanzensprosse, egal unter welcher Behandlung oder Bodenart, wurden unter sterilen Bedingungen geerntet.

Die geernteten Pflanzensprosse wurden in Aluminiumbehältern getan und im Trockenschrank, während 3 Tage bei einer Temperatur von 60°C, getrocknet. Das Gewicht der trockenen Biomasse wurde dann für jede Pflanzenprobe bestimmt.

Aufschluss und ICP Messung

Für den Aufschluss (Zersetzung vom organischen Material wobei die Spurenelemente in Lösung gehen) wurden zwischen 50 mg und 60 mg der getrockneten Sprosse gewogen und in

5 ml Teflonröhrchen getan; die Keimblätter wurden dabei weggelassen. Das exakte Gewicht wurde für jede Probe notiert.

Jedes der 5 ml Teflonröhrchen wurde mit 3 ml 65% Salpetersäure (HNO₃) versehen und mit einem Deckel geschlossen.

In grössere Teflonröhren wurde jeweils 10 ml Hydrogenperoxid (H₂O₂) gegossen, worin jeweils zwei 5 ml Teflonröhrchen mit der Pflanzenprobe getan wurde.

Diese fertiggestellten Proben wurden in ein Mikrowellengerät (MLS GmbH, lavis ETHOS, EM2) zum Aufschluss getan.

Bei abgeschlossener Reaktion wurde der Inhalt der 5 ml Teflonröhrchen in ein 10 ml Probenröhrchen umgeleert. Die 5 ml Teflonröhrchen wurden dann noch zwei Mal mit wenig nanopur Wasser ausgeschwenkt was ebenfalls in den Probenröhrchen geleert wurde. Die Probenröhrchen wurden anschliessend bis auf die 10 ml Marke mit nanopur Wasser aufgefüllt, mit einem Deckel geschlossen und gut geschüttelt.

Um die Qualität des Aufschlusses und der Messung zu überprüfen, wurden zusätzlich auch Blindproben mit Salpetersäure aufgeschlossen und Proben mit Referenzmaterial aus Olivenblättern (Community bureau of reference B.C.R., Reference material nr. 62, *Olea europaea*) gemessen.

Die Proben wurden anschliessend mit ICP-OES (ICP Gerät: Varian, VISTA-MPX) gemessen.

5. Ergebnisse

5.1 Wirkung der Mikroorganismen auf die Biomasse

Abbildung 7 vergleicht die Wirkung der Behandlungen auf die durchschnittliche Sprossbiomasseproduktion der Sonnenblumen in den verschiedenen Substraten.

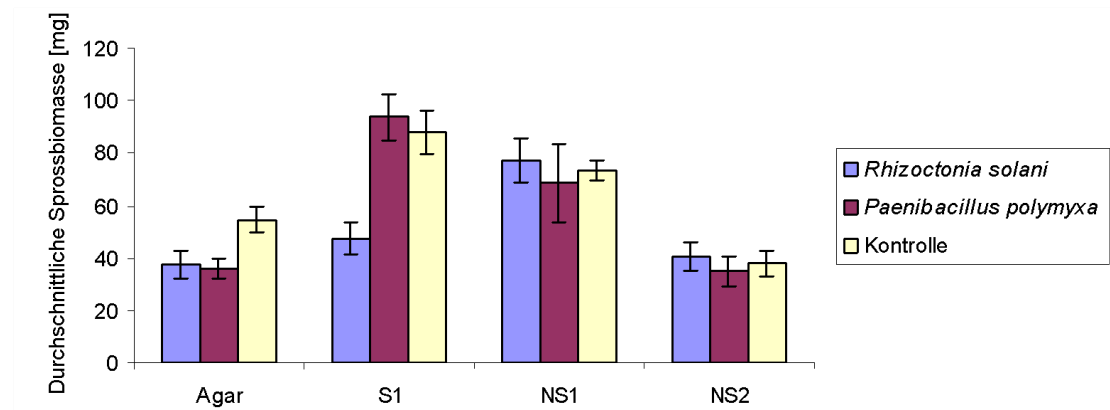


Abb.7: Durchschnittliche Sprossbiomasse mit dem jeweiligen Standardfehler.

Klar ersichtlich ist, dass im allgemeinen Pflanzen, welche auf den Substraten S1 und NS1 wuchsen, mehr Sprossbiomasse produzierten als jene, welche im Agar oder NS2 aufwuchsen. Die Durchschnittswerte der Sprossbiomasse, welche auf Agar wuchs ist unter der Behandlung der zwei Mikroorganismen ungefähr gleich, diese sind jedoch signifikant kleiner als die der Kontrolle.

Im S1 wurde unter der Behandlung mit *Paenibacillus polymyxa* und der Kontrolle im Durchschnitt ungefähr gleich viel Sprossbiomasse produziert, während mit *Rhizoctonia solani* die Produktion signifikant geringer war.

Im NS1 und NS2 ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen ersichtlich. Im Allgemeinen wurde gleich viel Sprossbiomasse hergestellt.

Für die verschiedenen Behandlungen unter den verschiedenen Substraten ist kein genereller Trend zu beobachten. Festzustellen ist jedoch, dass die Kontrolle immer im Bereich der höchsten Werte ist.

Abbildung 8 vergleicht den Einfluss der Substrate auf die Biomasseproduktion bei den verschiedenen Behandlungen.

Ersichtlich ist, dass *Rhizoctonia solani* eine signifikante Zunahme der Sprossbiomasse im NS1 im Vergleich mit den durchschnittlichen Sprossbiomassen der anderen Substrate verursachte.

Bei der Behandlung mit *Paenibacillus polymyxa* war die Zunahme am grössten im S1, aber auch im NS1 war die durchschnittliche Sprossenbiomasse unter dieser Behandlung grösser als im Agar und NS2.

Bei der Kontrolle ergab sich für die verschiedenen Substraten eine unterschiedliche Sprossbiomasseproduktion. Diese war aber wie erwartet am grössten im Boden 1 (S1 und NS1), kleiner im Agar und am kleinsten im NS2.

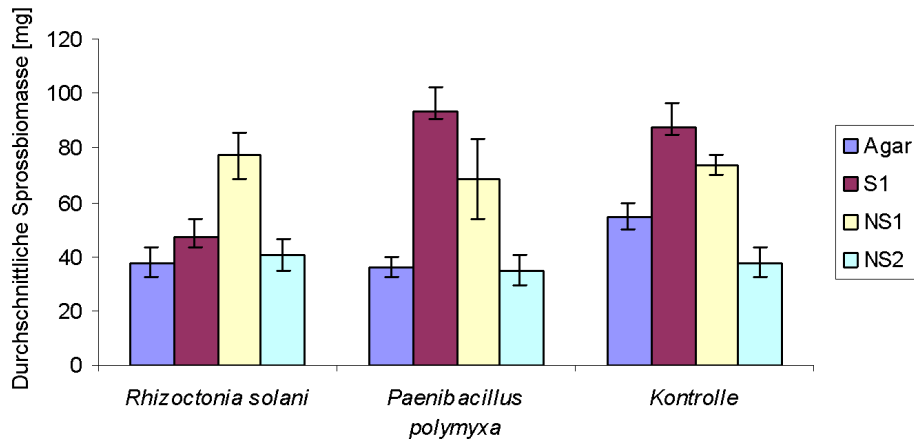


Abb. 8: Durchschnittliche Sprossbiomasse mit dem jeweiligen Standardfehler.

5.2 Wirkung der Mikroorganismen auf die Spurenelementaufnahme

In den Abbildungen 9 bis 11 wird abgebildet, wie unter den verschiedenen Substraten, die Mikroorganismen auf die Spurenelementaufnahme der Sonnenblumensprosse gewirkt haben.

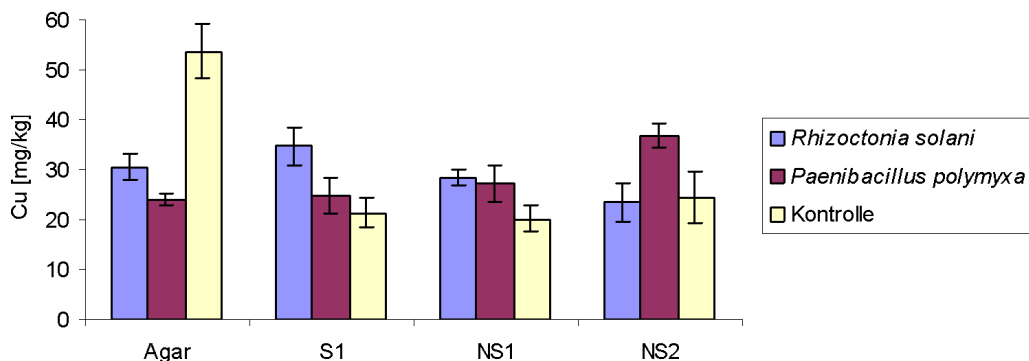


Abb.9: Einfluss der Mikroorganismen auf die Durchschnittliche Kupfer Konzentration in den Sprossen mit den respektiven Standardfehlern.

In Abbildung 9 sieht man, dass im NS1 mit beiden Mikroorganismen mehr Kupfer in den Spross aufgenommen wurde als unter der Kontrolle. Dies geschieht auch im S1 mit *Rhizoctonia solani* und im NS2 mit *Paenibacillus polymyxa*. Im Agar wurde hingegen deutlich mehr Kupfer durch die Sprosse der Kontrollbehandlung aufgenommen. Unter der Behandlung mit den Mikroorganismen wurde im Agar und im S1 mehr Kupfer in den Spross mit *Rhizoctonia solani* aufgenommen, hingegen im NS2 mit *Paenibacillus polymyxa*.

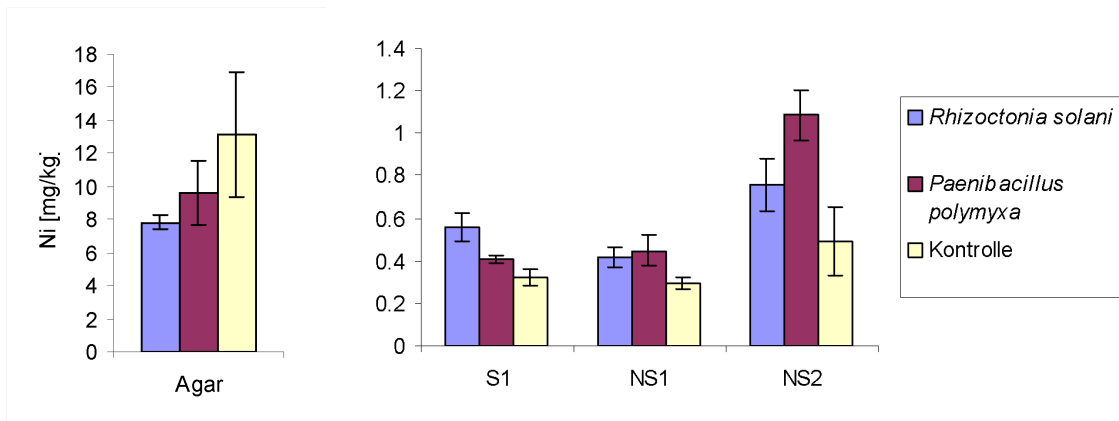


Abb.10: Einfluss der Mikroorganismen auf die durchschnittliche Nickel Konzentration der Sprosse.

In Abbildung 10 ist klar ersichtlich, dass die Nickel Konzentration der Sprosse, welche unter den drei Bodensubstraten aufgezogen wurden, deutlich kleiner ist als die Nickel Konzentration der Sprosse, welche auf Agar aufwuchsen. Die Verteilung der Nickel Konzentration unter den drei Böden ist ähnlich wie für Kupfer, jedoch ein bisschen verschieden unter berücksichtigung der Standardfehler. Es wurde ebenfalls mit beiden Mikroorganismen mehr Nickel im NS1 im Spross aufgenommen als unter der Kontrolle, hier auch im S1. Im NS2 wurde signifikant mehr Nickel nur mit *Paenibacillus polymyxa* aufgenommen. Im Agar wurde unter der Kontrolle nur signifikant mehr Nickel als mit *Rhizoctonia solani* aufgenommen.

Zwischen den Mikroorganismen ist in den drei Böden das gleiche Resultat wie für Kupfer zu beobachten: mehr Aufnahme an Nickel in den Sonnenblumensprossen auf S1 mit *Rhizoctonia solani* und in den Sprossen auf NS2 mit *Paenibacillus polymyxa*.

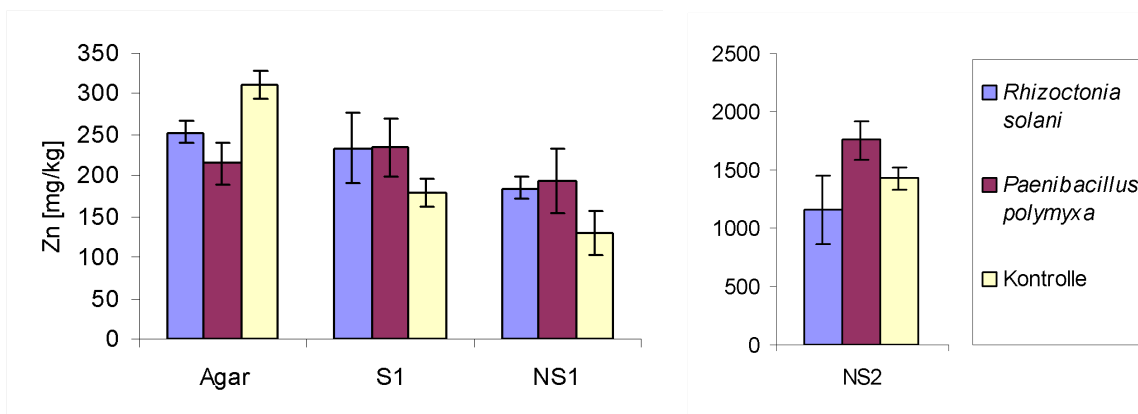


Abb.11: Einfluss der Mikroorganismen auf die durchschnittliche Zink Konzentration der Sprosse.

In Abbildung 11 ist zu sehen, dass im NS2 insgesamt deutlich mehr Zink aufgenommen wurde als in den anderen drei Substraten. Wie bei den anderen Spurenelementen weist auch Zink in den Sprossen auf den Agar die höchste Konzentration in der Kontrolle auf. Im S1 und NS2 wurde durch die Behandlung mit *Paenibacillus polymyxa* und im NS1 mit *Rhizoctonia solani* mehr Zink als unter der Behandlung mit der Kontrolle aufgenommen.

Zwischen den zwei Mikroorganismen gibt es für die Zink Aufnahme im Spross nur einen signifikanten Unterschied im NS2 wo mehr Zink unter der Behandlung mit *Paenibacillus polymyxa* aufgenommen wurde.

6. Diskussion

Sprossbiomasse

Auf dem Agar und den NS2 wurde weniger Sprossbiomasse produziert als auf den kontaminierten Böden (Boden 1 - S1 und NS1). Dies widerspiegelt das Resultat von Reiner (2008) im vorigen Versuch mit synthetischen Auxin. Die hohe Kontamination im Boden 1 war anscheinend kein grosses Problem für die Pflanzen, da der pH mit einem Wert von 7.4 ziemlich hoch war, wodurch die Spurenelemente nur wenig verfügbar sein sollten. Im NS2 kann die Ursache für eine geringere Biomasse an dem geringen organischen Kohlenstoffgehalt des Substrates liegen (Tab. 4). Im Agar hingegen kann das geringe Wachstum auf einen Nährstoffmangel zurückgeführt werden da die Pflanzen, welche auf diesem Medium aufwuchsen, durch Blattverfärbungen und eine Wachstumshemmung solche Symptome aufwiesen (Abb. 12). Es könnte auch an Sauerstoffmangel liegen da Agar ein anaerobes Medium ist. Jedoch wurden in den vorigen Versuchen durch Reiner (2008) und Vachy (2008) in dieser Hinsicht keine Probleme festgestellt, da die Pflanzen anscheinend einen Mechanismus für eine Sauerstoffzufuhr zu den Wurzeln entwickelt hatten, weshalb dies hier auszuschliessen ist. Zudem waren auch die Böden wassergesättigt was die gleiche anaerobe Bedingungen wie im Agar hervorriefen.



Abb.12: Sonnenblume auf Agar

Im Agar und im S1 war die Biomasse Produktion unter der Behandlung mit *Rhizoctonia solani* kleiner als in der Kontrolle während sie in den anderen zwei Substraten ungefähr gleich war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass *Rhizoctonia solani* seine Pathogenität unter sterilen Bedingungen wirken lassen konnte da er der Konkurrenz oder Inhibition durch anderen Mikroorganismen entzogen war. Er ist nämlich ein phytopatogener Pilz der das Faulen der Wurzeln verursachen kann (Cherif et al. 1991), was in unserem Versuch im Agar auch beobachtet wurde. Eine andere Ursache könnte das Fehlen von Tryptophan im Substrat sein. So hätte der Pilz kein Auxin bilden können, was eine Zunahme der Biomasse hätte

bewirken können. Jedoch, wie in der Einführung schon erläutert, sollte Thryptophan auch in den Wurzelexudaten vorliegen weshalb diese Annahme ausgeschlossen werden sollte.

Paenibacillus polymyxa ist ein bekanntes PGPR, aber es konnte diese Eigenschaften in unserem Versuch nicht zeigen. Zum Beispiel, wurde im Agar signifikant weniger Biomasse als in der Kontrolle produziert. Dies könnte daran liegen, dass dieses Bakterium unter gewissen Bedingungen einen leicht pathogener Effekt haben kann (Timmusk et al. 2005). Im Agar sind manche Bedingungen anders als im Boden da es ein artifizielles Milieu ist, dessen physisch-chemische Eigenschaften sehr verschieden von den Eigenschaften der Böden sind. Dies könnte einen Einfluss auf das Verhalten von *Paenibacillus polymyxa* gehabt haben. Unter der Behandlung mit diesem Bakterium wurde in unserem Versuch im Agar zudem ein geringeres Wurzelwachstum als in den Kontrollgruppen beobachtet, was auf eine leichte Pathogenität hindeuten könnte.

Interessant bei den Versuchen mit Agar als Substrat ist, dass wir andere Ergebnisse als Vachey (2008) bekommen haben. Vachey beobachtete keine Unterschiede der Sprossbiomassen zwischen den verschiedenen Behandlungen. Er hatte jedoch festgestellt, dass mit diesen beiden Mikroorganismen gewisse Makronährstoffe (Ca, K und Mn) weniger durch die Pflanze aufgenommen werden als ohne Beimpfung. Dies könnte in unseren Versuch einen Einfluss auf die Biomasseproduktion gehabt haben, was er jedoch in seinen Versuch nicht beobachtet hatte.

Im S1 unter der Behandlung mit *Paenibacillus polymyxa* und in den zwei nicht sterilen Böden (NS1 und NS2) bei Zugabe der Mikroorganismen, gab es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Eine Ursache dafür könnte sein, dass sich die Mikroorganismen nicht gut entwickeln konnten. In den nicht sterilen Böden, könnten sie eine Konkurrenz oder Inhibition durch anderen Mikroorganismen erfahren haben. Im Fall der Bakterieninokulation könnte das Luria-Bertani Nährmedium auch diese ernährt und somit gefördert haben. Für *Paenibacillus polymyxa* ist auch wichtig zu erwähnen, dass er sehr spezifisch auf einige Pflanzensorten wirkt (Chanway und Nelson 1990). Wahrscheinlich waren die Sonnenblumen, die wir benutzt haben, nicht empfindlich zur Wachstumsförderung dieses Bakterium.

Im Versuch von Reiner (2008), welcher mit den gleichen Substraten wie in diesen Versuch durchgeführt wurde, hatte synthetisches Auxin, in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-9} M (abgesehen vom Boden 2 in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M) entweder keinen oder einen fördernden Einfluss auf die Sprossbiomasseproduktion. Eine Konzentration von 10^{-5} M hatte im Boden hingegen einen negativen Effekt auf die Sprossbiomasse. In unserem Versuch konnte keine fördernde Auswirkung auf die Biomasse durch die Mikroorganismen hervorgerufen werden. Dies könnte daran liegen, dass Auxin keine Auswirkung auf die Pflanze hatte, dass gar kein Auxin hergestellt wurde oder nur in den Substraten wo sie einen negativen Effekt hatten, denn hier hätten die Mikroorganismen es in toxischen Mengen herstellen können. Ein Grund dafür könnte eine zu hohe Inokulationsdichte dieses Bakteriums sein, wodurch Auxin in toxischen Mengen produziert wurde. Ein wichtiger Grund, weshalb die Mikroorganismen kein Auxin produzieren konnten ist das zur Verfügung stehende Tryptophan, welches jedoch vorhanden sein sollte denn es sollte sowohl in Wurzelexudate wie im Luria-Bertani Nährmedium (LB) vorhanden sein. Jedoch stellt sich die Frage, ob dieses in einer richtige Menge vorhanden war um eine genügend grosse Menge an Auxin zu produzieren damit es einen Einfluss auf das Pflanzenwachstum haben konnte. Oder ob es in zu hoher Menge zur Verfügung stand, wodurch es eine Überproduktion an Auxin verursachte, was somit eine toxische Wirkung auslöste.

Im Allgemeinen können wir wahrscheinlich annehmen, dass für *Rhizoctonia solani* die Pathogenität stärker war als die eventuelle Wachstumsförderung durch Auxin Ausscheidung und dass *Paenibacillus polymyxa* keine Wirkung auf die benutzte Sonnenblumensorte zeigen konnte.

Spurenelementaufnahme

Bei der Speicherung von Cu, Ni und Zn in den Sprossen kann man im Allgemeinen sagen dass im Agar mehr bei die Kontrolle als bei der Behandlung mit den Mikroorganismen aufgenommen wurde. In den drei verschiedenen Böden hingegen wurde entweder gleich viel oder mehr durch die Behandlung mit einen oder beide Mikroorganismen aufgenommen als unter der Kontrollgruppe.

Die Tatsache, dass die Metallaufnahme unter der Behandlung mit Mikroorganismen im Vergleich zur Kontrolle im Agarmedium abnahm und unter den Böden gleich hoch oder grösser war, kann an verschiedenen Mechanismen liegen.

Für den Agar fanden wir das gleiche Ergebnis wie Vachey (2008). Dies kann daran liegen, wie er selbst schon argumentierte, dass das Agar für Mechanismen der Mikroorganismen die die Spurenelementaufnahme in den Pflanzen erhöhen nicht geeignet ist. In diesen Medium können die Mikroorganismen die Spurenelementmobilisierung nicht in bedeutender Weise beeinflussen, dies da sie schon zu 100% bioverfügbar sind, wodurch eine metabolisierung des Agars nur eine geringe Auswirkung hat. Hingegen können mehrere Mechanismen die die Aufnahme an Spurenelementen senken durchgeführt werden. Dies indem sie die Spezierung der Spurenelementen oder ihre Bioverfügbarkeit durch Ausfällung, Absorption oder Akkumulation (Gadd, 2000) beeinflussen. Im Agar kann die Bioabsorption durch die Mikroorganismen eine bedeutende Senke für die Metalle darstellen. Jedoch ist hier erneut zu betonen, dass im Agar beobachtet wurde, dass die Wurzeln die den Mikroorganismen ausgesetzt waren entweder verfault oder nicht vollständig entwickelt waren, was als Resultat eine geringere Spurenelement Aufnahme hervorgerufen haben könnte.

Für die unsterilen Böden (NS1 und NS2) kann der Grund, dass es unter den Mikroorganismen nie eine geringere Aufnahme an Spurenelemente als in der Kontrolle gab, daran liegen, dass die Mikroorganismen ihre Pathogenität nicht entwickeln konnten. Dies, wie für die Biomasse schon erläutert, könnte durch eine Inhibition oder Konkurrenz durch anderen Mikroorganismen hervorgerufen worden sein. Als Argumentation für alle drei Böden kann es hingegen daran liegen, im Gegensatz zum Agar, dass Mechanismen der Mikroorganismen zur Erhöhung der Spurenelementaufnahmen durchgeführt werden konnten. Im Boden ist nur ein geringer Anteil der Spurenelemente bioverfügbar. Somit kann eine erhöhte Metall Konzentration in der Bodenlösung durch die Metabolisierung von Huminsäuren durch Bakterien einen grossen Effekt auf die Spurenelementaufnahme durch Pflanzen haben. Ausserdem hat die Bioabsorption durch Mikroorganismen im Boden einen geringeren Einfluss, da die Bodenlösung in ein dynamisches Gleichgewicht mit einem viel grösseren Pool an Metallen, die an Bodenpartikeln gebunden sind, ist. Wo es mit der Behandlung der Mikroorganismen eine grössere Aufnahme an Spurenelemente durch die Pflanzen als bei Pflanzen der Kontrollgruppe gab, kann es sein, dass Auxin ins Spiel gekommen ist, was eine Änderung in der Physiologie oder Morphologie der Wurzel hervorgerufen haben könnte. Wir können annehmen das Auxin produziert wurde da im kontaminierten Boden (S1 und NS1) auch durch Reiner (2008) festgestellt wurde, dass es unter der Zugabe an synthetischen Auxin eine höhere Aufnahme an Spurenelementen gab, was dessen Herstellung durch die Mikroorganismen in unseren Versuch bestätigen könnte.

Durch *Paenibacillus polymyxa* wurde in den zwei nicht sterilen Böden (NS1 und NS2), ausser im NS2 für Cu, immer eine Zunahme der Konzentration an Spurenelemente in den Sprossen erzeugt. Dies kann daran liegen weil es ein PGPR für viele Pflanzen ist. Er beschützt sein Wirt indem er Antibiotika ausscheidet (Timmusk et al. 2005) womit er die schädigende Wirkung anderer Organismen verhindern kann und somit die Entwicklung der Pflanze fördert, was einen Einfluss auf die Spurenelementaufnahme haben könnte.

Unter dem Vergleich der Menge an aufgenommenen Spurenelementen und der Zunahme an Sprossbiomasse welche unter den verschiedene Substraten und Behandlungen gebildet wurde, ist festzustellen, dass ausser im Agar diese nicht übereinstimmen, was bezeugt dass diese keinen Zusammenhang haben. Dies wurde auch durch Rainer (2008) festgestellt. Das bedeutet aber nicht, dass die Mikroorganismen kein Auxin ausgeschieden haben, da festgestellt wurde, dass dieses Phytohormon eine grössere Zunahme in der Wurzelbiomasse als in der Sprossbiomasse verursacht (Holl 1988). Die erhöhte Spurenelementaufnahme kann also als eine Wirkung des Auxins gesehen werden, wobei der Mechanismus wahrscheinlich nicht in einer erhöhten Sprossbiomasse liegt, sondern in einer Wirkung auf den Wurzeln.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Allgemeinen kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass das Substrat einen Einfluss auf die Mikroorganismen hat, welche wiederum die Biomasse so wie die Spurenelementaufnahme des Wirts beeinflussen. Also hängen die Interaktion Mikroorganismus-Pflanze und seine Auswirkungen auf Sprossbiomasseproduktion und Spurenelementaufnahme grösstenteils vom Substrat ab. Auxin spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle in diesen Wirkungen. Um dies festzustellen, sollten deshalb zukünftige Versuche auf Wurzel Eigenschaften und Auxin Quantifizierung fokussieren.

Danksagung

Besonders möchte ich Monica Marchetti für ihre grosse Unterstützung und wertvolle Tipps, die sie mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Semesterarbeit gab, danken.
Danken möchte ich auch Brett Robinson für seine Kommentare und Verbesserungsvorschläge.

Anhang

A: Messresultate

A.1: Trockengewichte

Tab. A.1: Durchschnittliche Sprossbiomasse [mg]

| | Agar | Standard-fe | S1 | Standard-fe | NS1 | Standard-fe | NS2 | Standard-fe |
|-------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| | hler | hler | | hler | | hler | | hler |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 37.78 | 5.32 | 47.23 | 6.34 | 77.18 | 8.38 | 40.47 | 5.63 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 36.06 | 3.75 | 93.75 | 8.55 | 68.47 | 14.68 | 34.95 | 5.82 |
| Kontrolle | 54.57 | 4.78 | 87.71 | 8.55 | 73.55 | 3.86 | 37.90 | 5.20 |

A.2: Konzentrationen der Spurenelemente im Spross

Tab A.2a: Durchschnittliche Konzentration an Kupfer [mg/kg]

| | Agar | Standard-fe | S1 | Standard-fe | NS1 | Standard-fe | NS2 | Standard-fe |
|-------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| | hler | hler | | hler | | hler | | hler |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 30.59 | 2.49 | 34.61 | 3.94 | 28.40 | 1.70 | 23.49 | 3.77 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 24.03 | 1.30 | 24.90 | 3.53 | 27.21 | 3.68 | 36.76 | 2.42 |
| Kontrolle | 53.75 | 5.44 | 21.36 | 3.13 | 20.09 | 2.51 | 24.51 | 5.28 |

Tab A.2b: Durchschnittliche Konzentration an Nickel [mg/kg]

| | Agar | Standard-fe | S1 | Standard-fe | NS1 | Standard-fe | NS2 | Standard-fe |
|-------------------------------|-------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|
| | hler | hler | | hler | | hler | | hler |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 7.80 | 0.44 | 0.56 | 0.07 | 0.42 | 0.05 | 0.76 | 0.12 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 9.65 | 1.93 | 0.41 | 0.02 | 0.45 | 0.07 | 1.08 | 0.12 |
| Kontrolle | 13.13 | 3.77 | 0.32 | 0.04 | 0.29 | 0.03 | 0.49 | 0.16 |

Tab A.2c: Durchschnittliche Konzentration an Zink [mg/kg]

| | Agar | Standard-fe | S1 | Standard-fe | NS1 | Standard-fe | NS2 | Standard-fe |
|-------------------------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|---------|-------------|
| | hler | hler | | hler | | hler | | hler |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 252.64 | 13.34 | 232.66 | 42.90 | 184.36 | 13.48 | 1162.87 | 292.99 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 214.69 | 25.87 | 233.98 | 35.50 | 193.27 | 38.36 | 1755.13 | 162.93 |
| Kontrolle | 310.27 | 17.61 | 179.85 | 17.09 | 129.22 | 27.48 | 1426.93 | 91.22 |

Literatur

Agrios G.N., 1997. Plant Pathology, Ed. New York: Academic.

Altorfer A., 2007. Einfluss von Phosphor und Phytohormonen auf die Allokation von Schwermetallen in Soja und Weizen. Diplomarbeit am Institut für terrestrische Ökosysteme, ETH Zürich.

Araujo F.F., Henning A., Hungria M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 1639-1645.

Arshad M., Frankenberger Jr. W. T., 1991. Microbial production of plant hormones. In D. L. Keister, and P. B. Cregan (Eds), *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 327-334.

Baca B.E., Elmerich C., 2007. Mikrobielproduktion von pflanzlichen Hormonen. In C. Elmerich and W.E. Newton (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer: 113-143

Cakmakci R., Donmez M.F., Erdogan U., 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31: 189-199.

Campbell N.A., Reece J.B., 2003. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.

Chanway C.P., Nelson L.M., 1990. Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol. Biochem* 22: 789-795.

Chérif M., Benhamou N., Bélanger R.R., 1991. Ultrastructural and cytochemical studies of fungal development and host reactions in cucumber plants infected with *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 353-375.

Chung K., Shilts T., Erturk U., Timmer L., Ueng P., 2003. *FEMS Microbiol. Letts.*, vol. 226, no. 1: 23-30.

Costacurta A., Vanderleyden J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 21: 1-18.

Davies P.J., 1987. *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*. In: *Plant hormones: and their role in plant growth and development*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Dörffling K., 1982. *Das Hormonsystem der Pflanzen*, Stuttgart: Thieme.

Domy C.A., 1986. Relevance of bioavailability to biological response and risk. In: *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal* (2nd ed). Springer-Verlag, New York: 63-64.

- Frossard E., Mächler F., Gaume A., 2006. Physiologie der Pflanzenernährung. In: Skript zur Vorlesung Plant Nutrition I: The Physiology of Plant Nutrition and Fertilization Practices, ETH Zürich.
- Furukawa T., Koga J., Adachi T., Kishi K., Syono K., 1996. Efficient Conversion of L-Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid and/or Tryptophol by Some Species of Rhizoctonia. *Plant Cell Physiol.* 37(7): 899-905.
- Gadd G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *GEODERMA*, 122: 109-119.
- Gadd G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current opinion in biotechnology*, 11: 271-279.
- Gadd G.M., White C., 1993. Microbial treatment of metal pollution- a working biotechnology? *Trends in biotechnology*, 11: 353-359.
- Gaffney T.D., da Costa e Silva O., Yamanda T., Kosuge T., 1990. Indoleacetic acid operon of *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi*: transcription analysis and promoter identification. *J. Bacteriol.* 172: 5593-5601.
- Gaudin V., Vrain T., Jouanin L., 1994 Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 11-29.
- Geisler M., Murphy A.S., 2006. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in Plant development. *Federation of European Biochemical Societies* 580: 1094-1102.
- Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., Murfett J., 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.*, 118: 341-347.
- Hobbie L.J., 2007: Auxin. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Holl FB, Chanway CP, Turkington R and Radley RA, 1988. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 20(1):19-24.
- Kim Y. S., Min J. K., Kim D., Jung J., 2001. A soluble auxin-binding protein, ABP57. *J. Biol. Chem.*, 276: 10730-10736.
- Kloepper J.W., Schroth M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria*, INRA, 2: 879-882.
- Kulaeva O.N., Kuznetsov V.V., *Fiziol. Rastenii*, 2002. vol. 49, no. 4: 626-640.
- Kumar P. K. R., Lonsane B. K., 1989. Microbial production of gibberellins: State of the art. *Adv.Appl. Microbiol.*, 34: 29-139.

- Lin W., Okon Y., Hardy R.W.F., 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1775-1779.
- Mallik M.A.B., Williams R.D., 2008. Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*: 321-345.
- Manulis S., Valinski L., Gafni Y., Hershenhorn J., 1991. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 161-171.
- Marschner H., 1993. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- Nowack B., Rais D., Frey B., Menon M., Schulin R., Günthardt-Goerg M., Luster J., 2006. Influence of metal contamination on soil parameters in a lysimeter experiment designed to evaluate phytostabilization by afforestation. *Forest Snow and Landscape Research* 80, 2: 201-211.
- Pais I., Jones J.B., 1997. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca Raton (Florida).
- Patten C. L., Glick B. R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 42: 207-220.
- Pilet P.E., Saugy M., 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. *Plant Physiol.* 83: 33-38.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichorn S.E., 2005. *Biology of Plants*. Worth Publishers, New York.
- Reid R., Hayes J., 2003. Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International Review of Cytology- a survey of cell biology*, 229: 73-114.
- Reiner J., 2008. Aufnahme und Allokation von Spurenelementen in Kulturpflanzen unter Einfluss des Phytohormons Auxin. Diplomarbeit am Institut für Terrestrische Ökosysteme, ETH Zürich.
- Robinette D., Matthyse A.G., 1990. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 172: 5742-5749.
- Robinson B.H., 2008: *The Phytomanagement of Trace Elements*. Habilitation Thesis. Institute of Terrestrial Ecosystems, Department of Environmental Sciences, ETH Zürich.
- Robinson B.H., Bolan N.S. Mahimairaja S., Clothier B.E., 2005. Solubility, Mobility, and Bioaccumulation of trace Elements : Abiotic Processes in the Rhizosphere. In: *Trace Elements in the Environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation* (Eds. MNV Prasad, KS Sajwan, R Naidu). CRC press, Boca Raton, Florida: 93-106.

Rodriguez H., Gonzalez T., Selman G., 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 84: 155-164.

Rytz I., 2001: Bodenbelastung „Scherbenland Witzwil“ – Schlussbericht. Herausgeber: Amt für Landwirtschaft, Abteilung Umwelt (Kanton Bern).

Selvadurai E.M., Brown A.E., Hamilton J.T.G., 1991. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biol. Biochem.* 23: 401-403.

Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A., Tanaka S., Kawano T., Kimura Y., 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 64, no. 1: 187-189.

Shishido M., Chanway C.P., 1994. Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. *Canadian journal of Forest Research*, 30: 845-854.

Sitbon F., Hennion S., Sundberg B., Little C.H.A., Olsson O., Sandberg G., 1992. Transgenic tobacco plants coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens* *iaaM* and *iaaH* genes display altered growth and indoleacetic acid metabolism. *Plant Physiol.* 99: 1062-1069.

Tabak H., Lens P., Van Hullebusch E., Dejonghe W., 2005. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Environmental Science and Bio/Technology*, 4: 115-156.

Taiz L., Zeiger E., 1991. *Plant physiology*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Redwood City, Calif.: 298-425.

Timmusk S., Grantcharova N., Gerhart E., Wagner H., 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 71: 7292-7300.

Timmusk S., Wagner E.G.H., 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 951-959.

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I., 2005. Auxin production by bacteria associated with orchids roots. *Microbiology*, 74 (1): 46-53 jan-feb.

Tsavkelova E.A., Klimova S. Yu., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I., 2006. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 42, No. 2: 117-126.

Vachey A., 2008. Développement d'une méthode de criblage pour évaluer l'influence de micro-organismes sur l'assimilation de métaux par le blé et le tournesol. Diplomarbeit am Institut für Terrestrische Ökosysteme, ETH Zürich.

Vanbroekhoven K., Van Roy S., Gielen, C., Maesen M., Ryngaert A., Diels L., Seuntjens P., 2007. Microbial processes as key drivers for metal (im)mobilization along a redox gradient in the saturated zone. *Environmental Pollution*, 148 : 759-769.

Whiting S.N., De Souza M.P., Terry N., 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science & Technology*, 35 : 3144-3150.

Yurekli F., Geckil H., Topcuoglu F., 2003. *Mycol. Res.*, vol. 107, no. 3: 305-309.

Zakharychev V.V., 1999. *Fitogormony, ikh analogi i antagonisty v kachestve gerbitsidov i regulyatorov rosta rastenii (Phytohormones, Their Analogues and Antagonists As Herbicides and Regulators of Plant Growth)*, Moscow: RKhTU Im. D.I. Mendeleeva.

Zhao L., 2006: *In situ investigation of the mobilization of Cu and Zn in Soil columns*. Dissertation ETH Zürich No. 16868.