

Interaktionen ausgewählter Mikroorganismen in der Rhizosphäre von Leguminosen und Mais

G. Höflich, H.-H. Liste, S. Köhn

Interaction of selected microorganisms within the rhizosphere of legumes and maize

1. Einleitung

Rhizosphärenmikroorganismen leisten mit Hilfe ihrer Enzyme einen wichtigen Beitrag für das Pflanzenwachstum durch Nährstofferschließung, Schutz der Pflanzen vor bodenbürtigen Schaderregern, Bereitstellung wachstumsfördernder Wirkstoffe (Phytohormone, Vitamine u. a.) und Abbau toxischer organischer Schadstoffe. Da in der Rhizosphäre inokulierte Mikroorganismen besser als im Boden überleben können, ist es möglich, durch Inokulation selektierter Mikroorganismen das Pflanzenwachstum ohne zu-

sätzlichen Einsatz von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln zu fördern.

Mit symbiontischen, nitrogenaseaktiven *Rhizobium*-Bakterien konnten die Erträge bei Leguminosen um 10 bis 20 % erhöht werden (KOSHEMYAKOV, 1989; AMARGER and DUTHION, 1983; HÖFLICH et al., 1992; 1994). Bei Getreide, Mais, Raps und Senf gelang es, wachstumsstimulierende Inokulationseffekte mit assoziativen Rhizosphärenbakterien (*Pseudomonas spec.*, *Flavobacterium spec.*, *Azospirillum spec.*, *Azotobacter spec.*, *Enterobacter spec.*, *Klebsiella spec.*, *Pantoea spec.*, *Arthrobacter spec.*, *Agrobacter spec.*, *Rhizobium spec.* und

Summary

Selected *Rhizobium* and *Pseudomonas* bacteria are able to colonize simultaneously different regions of the rhizosphere of lucerne and pea after seed coinoculation. The intensity of colonization decreased during the experiment which lasted seven weeks.

Within a period of 1–7 weeks inoculated *Pseudomonas fluorescens* (PsIA12) and *Rhizobium trifolii* (R39) did not cause significant change in the rhizosphere colonization of *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. on peas, lucerne and maize on loamy sand and sandy loam. *Agrobacterium* spp. and *Xanthomonas* spp. on maize were partly stimulated and the colonization of fungi (*Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Mucor* spp.) was reduced.

Shoot growth of pea, lucerne and maize was stimulated by 10–20 %.

Key words: rhizosphere microorganisms, legumes, maize, microorganism interactions.

Zusammenfassung

Selektierte *Rhizobium*- und *Pseudomonas*-Bakterien besiedelten, nach kombinierter Inokulation an das Saatgut, parallel unterschiedliche Wurzelzonen von Luzerne und Erbsen. Die Besiedlungsstärke nahm bis zur siebten Woche ab. Die inokulierten *Pseudomonas fluorescens* (PsIA12)- und *Rhizobium trifolii* (R39)-Bakterien bewirkten sowohl auf lehmigem Sand als auch auf sandigem Lehm bei Erbsen, Luzerne und Mais keine nachhaltigen Veränderungen der natürlichen Rhizosphärenbesiedlung durch *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. und *Streptomyces* spp. im Zeitraum von 1–7 Wochen. Bei Mais wurden *Agrobacterium* spp. und *Xanthomonas* spp. z. T. stimuliert und die Pilzbesiedlung (*Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Mucor* spp.) vermindert.

Das Sproßwachstum von Erbsen, Luzerne und Mais wurde durch die inokulierten Bakterien um 10 bis 20 % gefördert.

Schlagworte: Rhizosphärenmikroorganismen, Leguminosen, Mais, Mikroorganismeninteraktionen.

Rhodobacter spec.) im Gewächshaus oder in Feldversuchen zu erzielen (BELIMOV et al., 1995a, b; BILAL et al., 1993; BOELEN et al., 1993; HÖFLICH, 1989, 1992; HÖFLICH et al., 1994; JAGNOV, 1987; LIU and SINCLAIR, 1993; MILUS und ROTHROCK, 1993; RUPPEL, 1987; VASJUK et al., 1989, 1993).

Durch Koinokulationen von *Rhizobium* spp. mit *Pseudomonas* spp. wurde z. T. die Wirkung von Einzelorganismen bei Leguminosen verbessert (HÖFLICH et al., 1994; LISTE, 1993).

Assoziative Bakterien können auch die Symbiosen standortspezifischer *Rhizobium*-Bakterien oder Mycorrhizapilze mit Leguminosen beeinflussen (HÖFLICH et al., 1994).

Das Überleben inokulierter Bakterien in der Rhizosphäre unterschiedlicher Pflanzen (Erbsen, Lupine, Mais) wurde in Feldversuchen bis zu 23 Wochen nach der Saat (Samenreife) nachgewiesen (WIEHE und HÖFLICH, 1995a). Die Interaktionen assoziativ in der Rhizosphäre lebender Bakterien in Abhängigkeit von Pflanzenarten und Böden sind bisher jedoch ungenügend untersucht.

Eine gezielte Nutzung von Rhizosphärenmikroorganismen für eine ressourcenschonende Pflanzenproduktion bzw. für die Rekultivierung von zerstörten Böden erfordert deshalb weitere Informationen zum Einfluß inokulierter Mikroorganismen auf die natürliche Rhizosphärenpopulation in unterschiedlichen Böden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen

- das Besiedlungsverhalten gleichzeitig inokulierter *Rhizobium*- und *Pseudomonas*-Bakterien und
- der Einfluß inokulierter *Pseudomonas*- bzw. *Rhizobium*-Bakterien auf bodenbürtige assoziative Mikroorganismen im Rhizosphärenraum von Leguminosen (Erbsen, Luzerne) und Nichtleguminosen (Mais) in unterschiedlichen Böden (lehmiger Sand, sandiger Lehm)

untersucht werden.

2. Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten vorwiegend mit rifampicin-resistenten Mutanten (120 ppm Rifampicin im Nährmedium) eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes (PsIA12), isoliert von Weizenwurzeln (HÖFLICH, 1992) und eines *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*-Stammes (R39), isoliert aus den Knöllchen von Rotklee (HÖFLICH, 1989). Die Stämme förderten nach Saatgutinokulation unter Feldbedingungen das Wachstum von Gramineen, Leguminosen bzw. Kreuzifern (HÖFLICH et al., 1994).

Beide Stämme verfügten über die potentielle Fähigkeit zur Bildung von Phytohormonen (Cytokinin, Auxin). Zum Teil können sie Luftstickstoff fixieren (R39), Phosphate mobilisieren (PsIA12), antagonistisch gegen bodenbürtige Wurzelschaderreger (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Gaeumannomyces graminis*) wirken (PsIA12) oder Nitrat reduzieren (R39). Sie sind osmotolerant (bis 0,8 M NaCl) und können bei pH 5 bis 8 wachsen.

Vergleichende Untersuchungen erfolgten mit wirtspflanzen-spezifischen *Rhizobium*-Stämmen für Erbsen (*R. leguminosarum*, E163) und für Luzerne (*R. meliloti*, mel8). Die rifampicin-resistenten Mutanten zeigten ähnliche wachstumsstimulierende Wirkungen, wie die Ausgangsstämme (HÖFLICH et al., 1995). Im Plattentest zeigten sich keine antagonistischen Wirkungen zwischen den inokulierten Bakterien ab.

Die Überlebensfähigkeit einzelner und kombiniert inokulierter Bakterien wurde an Erbsen (Sorte Grapis), Luzerne (Sorte Verko), Mais (Sorte Felix) in Gefäßversuchen (2 kg Boden und 4 Pflanzen je Gefäß mit 6 Wiederholungen) im Gewächshaus bei einer Bodenfeuchte von 40–60 % WK und Temperaturen am Tage von 15–22 °C, in der Nacht von 8–12 °C untersucht.

Als Versuchsboden diente bevorzugt lehmiger Sand (IS) aus der Ackerkrume eines Roggenschlages, ergänzende Untersuchungen erfolgten mit sandigem Lehm (sL) aus der Ackerkrume eines Weizenschlages. Angaben zu den Versuchsböden IS/sL in mg je 100 g Boden: N_t 56/76, C_t 600/700, P 7,0/8,6, K 8,7/8,0, pH 5,8/6,4. Der Korngrößenanteil < 0,02 mm betrug beim IS 12 % und beim sL 28 %.

Die Nährstoffgehalte wurden wie folgt analysiert: Gesamtstickstoff (N_t, Kjeldahl), Gesamtkohlenstoff (C_t, elementaranalytisch), doppellaktatlöslicher Phosphor (Molybdänblau-Methode), doppellaktatlösliches Kalium (flammenphotometrisch), pH-Wert (KCl-Extrakt).

Die Inokulation der Bakterien erfolgte in der Keimphase mit Bakteriensuspension (10⁹ cfu je ml) oder an die Samen mit Torfpräparaten (10⁸ cfu je g Präparat). Die Inokulummenge je Pflanze bzw. Samen betrug 10⁵ bis 10⁶ cfu.

Das Überleben der Bakterien wurde nach Abschütteln des anhaftenden Bodens an unterschiedlichen Wurzelzonen (0–3 cm, 5–8 cm, 10–13 cm vom Samen entfernt) nach der Verdünnungsplattenmethode auf Glyzerin-Pepton-Agar (HIRTE, 1969 a, b) mit 120 ppm Rifampicinzusatz untersucht. Die Identität der Reisolat mit den Ausgangsstämmen wurde serologisch nachgewiesen (WIEHE et al., 1996).

Die natürliche Bakterienpopulation wurde auf Glyzerin–Pepton–Agar ermittelt. Die Bakterien wurden in Anlehnung an HIRTE (1969a, b) aufgrund makro- und mikromorphologischer Merkmale zunächst in Typen eingeteilt und anschließend der Anteil der Typen an der Gesamtzahl ermittelt. Die Identifizierung typenspezifischer Isolate erfolgte durch Analyse der zellulären Fettsäuremethylesterprofile mit dem „Microbial Identification System“ (MIS, Microbial ID Inc., Newark, Del) nach der Methode von MILLER (1982) bzw. SASSER und MILLER (1984). Die Analyse der Pilze erfolgte auf Biomalzagar. Die Sproßtrockenmassen je Gefäß wurden bei Luzerne 7 Wochen, bei Erbsen 6 Wochen und bei Mais 4 Wochen nach Aufgang ermittelt und relativ zur inokulierten Kontrolle (= 100 %) angegeben. Die Versuchsergebnisse wurden über ANOVA bei $\alpha = 0,05$ statistisch ausgewertet.

3. Versuchsergebnisse

3.1 Besiedungsverhalten gleichzeitig inokulierter *Rhizobium*- und *Pseudomonas*-Bakterien in der Rhizosphäre von Erbsen und Luzerne und ihr Einfluß auf das Pflanzenwachstum

3.1.1 Erbse

Untersuchungen zum Besiedungsverhalten von wirtspflanzenspezifischen symbiontischen *Rhizobium*-Bakterien (E163) und assoziativen *Pseudomonas*-Bakterien (PsIA12) nach einzelner und kombinierter Saatgutinokulation mit Torfpräparaten auf lehmigem Sand zeigten, daß beide Bakterienstämme unterschiedliche Wurzelabschnitte zumindest bis 4 Wochen in ähnlichem Umfang besiedelten (Abb. 1). Zu den späteren Terminen waren die *Rhizobium*-Bakterien den *Pseudomonas*-Bakterien bei Einzelinokulation überlegen. Nach Koinokulation konnten beide Bakterienstämme in den untersuchten Wurzelabschnitten zumindest bis 8 Wochen parallel nachgewiesen werden. *Rhizobium*-Bakterien waren auch hier stärker vertreten. Die Gesamtzahlen an inokulierten Bakterien waren bei Koinokulationen nicht größer als bei Einzelinokulationen. Die Sproßtrockenmasse war nach 6 Wochen im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) durch E163 auf 118 % , PsIA12 auf 109 % und durch die Kombination auf 126 % erhöht.

3.1.2 Luzerne

In der Rhizosphäre von Luzerne waren die wirtspflanzenspezifischen *Rhizobium*-Bakterien (mel8) und assoziati-

ven *Pseudomonas*-Bakterien (PsIA12) nach einzelner und kombinierter Inokulation zumindest bis 7 Wochen nachweisbar (Tab. 1). Bei Einzelinokulationen überlebten die *Rhizobium*-Bakterien besser als die *Pseudomonas*-Bakterien. Bei Koinokulationen zeichnete sich keine eindeutige Überlegenheit der Rhizobien ab. Beide Bakterienstämme wanderten mit den sich entwickelnden Wurzeln in tiefere Wurzelabschnitte. Durch Kombination wurde die Gesamtzahl nicht erhöht, d. h. der Anteil der Einzelorganismen war im Vergleich zur Einzelinokulation geringer.

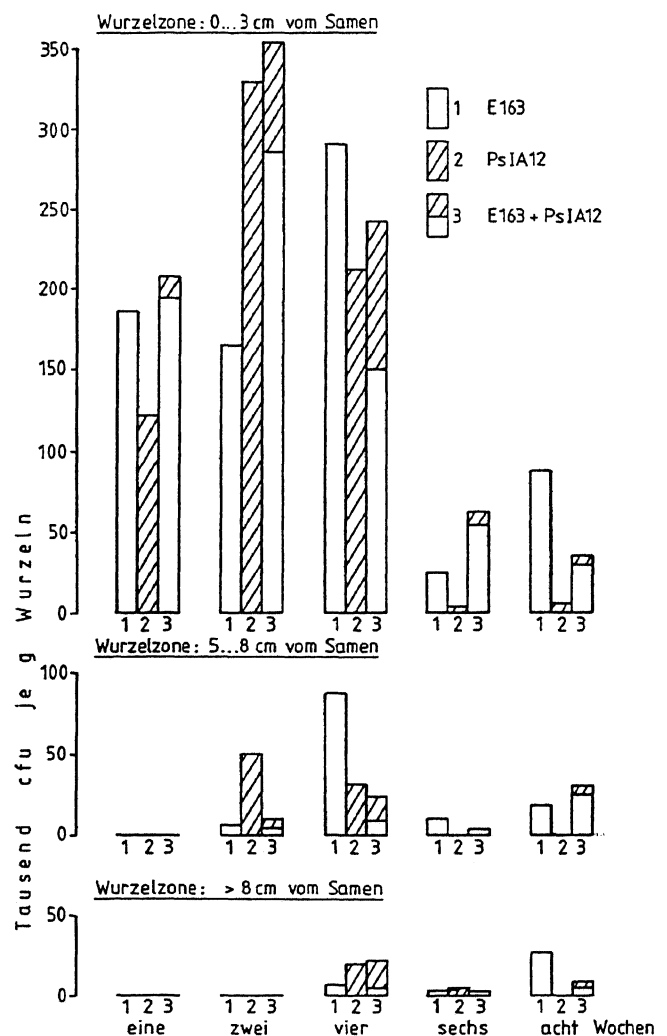


Abbildung 1: Überleben von *Rhizobium*- (E163) und *Pseudomonas*- (PsIA12) Bakterien in der Rhizosphäre von Erbsen nach Saatgutinokulation mit Torfpräparat (einzeln und kombiniert, Gefäßversuch, lehmiger Sand)
Figure 1: Survival of *Rhizobium*- (E163) and *Pseudomonas*- (PsIA12) bacteria in the rhizosphere of peas after seed inoculation (+ peat) (single and combined, pot experiment, loamy sand)

Tabelle 1: Überleben von *Rhizobium*-(mel 8) und *Pseudomonas*-(PsIA12) Bakterien in der Rhizosphäre von Luzerne nach Saatgutinokulation mit Torfpräparat (einzeln und kombiniert, Gefäßversuch, lehmiger Sand)

Table 1: Survival of *Rhizobium*-(mel 8) and *Pseudomonas*-(PsIA12) bacteria in the rhizosphere of lucerne after seed inoculation (+ peat) (single and combined, pot experiment, loamy sand)

Inokulation	Wurzelzone Entfernung vom Samen (cm)	Bakterienzahlen (Tausend cfu je g Wurzeln)			
		Wochen			
		1	2	4	7
mel 8	0-3	535,0	930,0	260,0	77,0
	5-8		102,0	63,0	21,7
	10-13			8,0	73,0
PsIA12	0-3	547,0	250,0	265,0	10,8
	5-8		28,0	25,0	0,4
	10-13			52,0	0,8
in Kombination: mel 8	0-3	267,0	150,0	22,0	11,2
	5-8		13,0	8,3	5,8
	10-13			5,0	1,2
PsIA12	0-3	453,0	400,0	3,0	2,0
	5-8		82,0	2,0	15,0
	10-123			2,0	5,0

Tabelle 2: Überleben von mit Kultursuspension inokulierten Bakterien und ihr relativer Einfluß auf die Besiedlung mit *Pseudomonas* spp. in der Rhizosphäre von Erbsen (Gefäßversuch, lehmiger Sand, 2 Wochen)

Table 2: Survival of inoculated bacteria (suspension) and their effect on *Pseudomonas* spp. colonization in the rhizosphere of peas (pot experiment, loamy sand, 2 weeks)

Inokulation*	Überleben Tausend cfu je g Wurzel	Wildpopulation von <i>Pseudomonas</i> spp. (Relativwerte)	
		Wurzelzone in cm vom Samen	
		0-3 cm	4-8
Kontrolle	0,0	100 (3,2) ¹	100 (3,7) ¹
E163	27,0	56+	35+
PsIA12	2,0	99	98
Kombination			
E163+PsIA12	10,0+18,0	88	86
LSD $\alpha = 0,05$	8,0	35	

¹) Mill. cfu je g Wurzeln

* 10⁶ cfu je Samen zur Keimung

+ signifikante Differenz zur nichtinokulierten Kontrolle

Die Besiedlungsstärken je g Wurzeln waren bei Luzerne, insbesondere in der oberen Schicht, höher als bei Erbse. Die Sproßtrockenmasse der Luzerne wurde nach 7-wöchiger Vegetation im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) durch mel8 auf 121+ %, durch PsIA12 auf 119+ % und durch die Kombination auf 125+ % erhöht.

3.2 Einfluß inokulierter Bakterien auf die Rhizosphärenbesiedlung mit bodenbürtigen assoziativen Mikroorganismen

3.2.1 Erbsen und Luzerne

Bei einer Inokulation von Erbsen in der Keimphase mit Bakteriensuspensionen von E163 und PsIA12 war die Wurzelbesiedlung der bodenbürtigen *Pseudomonas*-Wildpopulationen durch den wirtspflanzenspezifischen *Rhizobium leguminosarum*-Stamm E163 bei Einzelinokulation nach 2 Wochen gehemmt (Tab. 2). Nach 4 Wochen zeichneten sich keine Hemmwirkungen mehr ab.

Bei einer Inokulation der Samen mit Torfpräparaten wurden durch *Rhizobium*-Bakterien bzw. Kombinationen, trotz höherer Wurzelbesiedlung der Inokulumstämme (Abb. 1, Tab. 2), die bodenbürtigen *Pseudomonas* spp. auf lehmigem Sand bei Luzerne und Erbsen zu allen untersuchten Terminen nicht beeinflusst (Tab. 3). Auf sandigem Lehm zeichneten sich z. T. hemmende Wirkungen nur nach einer Woche ab.

Inokulationen mit *Pseudomonas* erhöhten die *Pseudomonas*-Populationen bei Luzerne, aber nicht bei Erbsen. Die Besiedlung mit *Bacillus* spp. wurde bei Luzerne und Erbsen auf beiden Böden durch alle Inokulationsvarianten meist nicht beeinflusst. Die *Streptomyces*-Zahlen waren bei Luzerne zu einzelnen Terminen erhöht.

Eine Analyse von Bakterienarten bei Erbsen zeigte, daß die Inokulation auf beiden Böden keinen Einfluß auf die Wurzelbesiedlung durch spezielle *Pseudomonas*-Arten (*P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. syringae*, *P. aureofaciens*, *P. putida*, *P. saccharophila*) und *Bacillus*-Arten (*B. pumilus*, *B. sphaericus*) ausübte (Versuchsunterlagen).

Bei Luzerne waren die Wurzeln unabhängig von der Art der Inokulation durch *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens* = *P. aureofaciens* > *P. marginalis*, *P. saccharophila* = *P. putida*), *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilis*, *B. amylo liquidifaciens* und *Streptomyces* spp. besiedelt (Versuchsunterlagen).

3.2.2 Mais

Aus der Rhizosphäre von Mais konnte nach Saatgutinokulation mit Torfpräparaten der *Rhizobium*-Stamm R39 in höheren Zelldichten als der *Pseudomonas*-Stamm PsIA12 reisoliert werden (Tab. 4).

PsIA12 wirkte sich nicht negativ auf die natürliche Bakterienpopulation aus. Einzelne *Pseudomonas* spp., insbeson-

Tabelle 3: Einfluß der Bakterieninokulation (Torfpräparat an das Saatgut) bei Luzerne und Erbse auf die Wurzelbesiedlung mit *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. und *Streptomyces* spp. (Mill. je g Wurzel) [Gefäßversuch, lehmiger Sand (IS), sandiger Lehm (sL), Wurzelzone 0–3 cm vom Samen]

 Table 3: Effect of seed inoculation of bacteria (+ peat) in lucerne and peas on root colonization by *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. (million per g root) [pot experiment, loamy sand (IS), sandy loam (sL), root zone 0–3cm from seed]

Fruchtart	Boden	Wochen	<i>Pseudomonas</i> spp. Inokulation:				<i>Bacillus</i> spp. Inokulation:				<i>Streptomyces</i> spp. Inokulation:			
			Kontr.	Rhiz. ¹⁾	Pseud.	Komb.	Kontr.	Rhiz. ¹⁾	Pseud.	Komb.	Kontr.	Rhiz. ¹⁾	Pseud.	Komb.
Luzerne	IS	1	4,6	3,7	10,8	4,7	0,4	0,6	0,2	0,7	0,3	0,5	0,5	0,6
		2	4,9	6,6	7,2	4,8	0,4	0,8	1,8	1,0	1,5	1,5	3,4	1,7
		4	16,8	13,6	25,6	17,3	3,3	2,3	2,8	2,3	3,2	1,8	4,4	3,3
		7	13,7	12,6	20,7	15,4	2,3	3,3	0,9	1,4	2,8	0,8	3,0	3,3
		LSD a = 5 %	2,9								1,0			
Erbse	IS	1	6,3	5,5	6,2	6,4	0,5	0,5	1,3	0,3	1,3	5,5	3,6	4,3
		2	8,6	5,8	7,0	6,0	0,8	0,6	2,3	2,6	5,8	5,0	3,0	12,8
		5	10,2	8,7	8,5	10,1	0,8	0,8	0,7	0,4	5,9	7,0	7,0	6,8
	sL	1	7,9	3,3	4,2	5,0	1,2	2,3	1,6	1,0	2,3	4,3	3,1	1,4
		2	3,7	n. a.	6,0	1,6	1,7	n. a.	1,7	1,3	7,2	n. a.	7,2	9,4
		LSD a = 5 %	2,4				0,8				1,9			

¹⁾ wirtspflanzenspezifische Rhizobien

– bei Luzerne mel 8

– bei Erbse E 163

n. a. – nicht analysiert

 Tabelle 4: Überleben von *Rhizobium*-(R39) und *Pseudomonas*-(PsIA12) Bakterien in der Rhizosphäre von Mais und ihr Einfluß auf die Bakterienwildpopulation (Gefäßversuch, lehmiger Sand, Saatgutinokulation mit Torfpräparat, Wurzelzone 0–3 cm vom Samen, Kontrolle = 100)

 Table 4: Survival of *Rhizobium*-(R39) and *Pseudomonas*-(PsIA12) bacteria in the rhizosphere of maize and their influence on wild bacterial population (pot experiment, loamy sand, seed inoculation together with peat, root zone 0–3cm from seed, control = 100)

Entwicklungsstadium	Inokulation	Überleben Mill. cfu je g Wurzeln	Wildpopulation					
			<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Agrobacter</i> spp.	<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Streptomyces</i> spp.
2 Blatt (2 Wochen)	Kontrolle	0	100 (6,0) ¹	100 (2,6) ¹	100 (1,2) ¹	100 (2,8) ¹	100 (1,0) ¹	100 (2,6) ¹
	PsIA12	0,1	162 ⁺	288 ⁺	100	61	150	123
	R39	2,5	98	135	95	314 ⁺	250 ⁺	96
	LSD a = 0,05	1,2	50	63	24	49	53	32
6 Blatt (4 Wochen)	Kontrolle	0	100 (4,5) ¹	100 (2,5) ¹	100 (1,0) ¹	100 (3,0) ¹	100 (1,8) ¹	100 (3,8) ¹
	PsIA12	0,1	98	148	170	83	83	71
	R39	2,0	91	108	170	110	428 ⁺	50 ⁺
	LSD a = 0,05	1,2	41	54	81	37	58	51

¹⁾ Mill. cfu je g Wurzeln + signifikant

dere *P. fluorescens*, waren nach 2 Wochen stimuliert. Durch R39 wurden *Xanthomonas* spp. und z. T. *Agrobacterium* spp. stimuliert und *Streptomyces* spp. z. T. reduziert (Tab. 4).

Die Pilzpopulation wurde in der Rhizosphäre von Mais durch beide Bakterien in ihrer Entwicklung z. T. gehemmt (Tab. 5).

Die Maissproßtrockenmasse konnte nach 4-wöchiger Vegetation im Vergleich zur Kontrolle (100 %) durch PsIA12 auf 112+ % und durch R39 auf 117+ % erhöht werden.

Tabelle 5: Einfluß der Bakterieninokulation (Torfpräparat) auf die Pilzpopulation in der Rhizosphäre von Mais (Gefäßversuch, lehmiger Sand, 2 Wochen, Kontrolle = 100)

Table 5: Effect of inoculated bacteria (+ peat) on fungal populations in the rhizosphere of maize (pot experiment, loamy sand, 2 weeks, control = 100)

Inokulation	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.
Kontrolle	100 (56,8) ¹	100 (13,3) ¹	100 (15,0)	100 (6,7) ¹
PsIA12	87	32+	39+	38+
R39	70	50	12+	26+
LSD $\alpha = 0,05$	34	51	43	48

1) Tausend cfu je g Wurzeln + signifikant

4. Diskussion

Pflanzenwachstumsstimulierende Bakterien müssen erfolgreich mit der autochthonen Mikroflora bei der Besiedlung des Rhizosphärenraumes konkurrieren (KLOPPER and BEAUCHAMP, 1992). Das Überleben einzelner Bakterienstämme der Gattungen *Pseudomonas* (GLANDORF et al., 1992; DEFREITAS and GERMIDA, 1992a, b; KEMP et al., 1992), *Azospirillum* (BASHAN and LEVANY, 1989a, b) oder *Rhizobium* (THIES et al., 1992; BALDIANI and WEAVER, 1992) wurde meist nur an einzelnen Pflanzenarten ohne Beachtung ihres Einflusses auf die autochthone Rhizosphärenflora untersucht.

Vorliegende Untersuchungen zeigen, daß *Rhizobium*- und *Pseudomonas*-Isolate die Wurzeln unterschiedlicher Pflanzenarten auch bei kombinierter Saatgutinokulation parallel besiedeln können. Die Abnahme der Bakterien-dichte je g Wurzel während der Vegetationszeit muß in Beziehung zur zunehmenden Wurzelmasse der Pflanzen gesehen werden. Diese war z.B. bei Erbsen in der sechsten Woche um das Sechsfache größer als in der zweiten Woche. Auch bei relativen Bakterienzahlen je g Wurzeln überlebten die Bakterien unter Feldbedingungen an den Wurzeln von Lupine, Erbse, Mais bis zur Samenreife. Sie wanderten auf

Begleitpflanzen ab und besiedelten nachfolgend angebaute Kulturen (WIEHE und HÖFLICH, 1995a, b).

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, siedelten sich die *Rhizobium* (R39)- und *Pseudomonas* (PsIA12)-Bakterien insbesondere im Mucigel der Wurzelspitze, in den Wurzelverzweigungszonen und in den Interzellularräumen des Cortextgewebes an (WIEHE et al., 1994). Diese enge Assoziation mit der Pflanze ist in Verbindung mit ihren potentiellen Stoffwechselleistungen eine wichtige Voraussetzung für die wachstumsfördernden Wirkungen der Bakterien. Da die inokulierten Bakterien meist kolonieförmig bestimmte Wurzelareale besiedeln, verhindern sie nicht generell die Ansiedlung bodenbürtiger Bakterien im Rhizosphärenraum. *Xanthomonas* spp. oder *Agrobacterium* spp. können bei Mais sogar gefördert werden. Hemmwirkungen gegenüber Rhizosphärenbakterien (*Pseudomonas* spp.) traten meist nur kurzfristig in der ersten Woche auf und können von der Inokulumform beeinflusst werden.

Eine generelle Störung der Rhizosphärenbakterienpopulationen zeichnete sich bei Leguminosen (Luzerne, Erbse) und Nichtleguminosen (Mais) auf lehmigem Sand und sandigem Lehm durch die inokulierten Bakterien nicht ab. Kurzfristige Reduktion der Pilzpopulationen wirkte sich nicht negativ auf das Pflanzenwachstum aus. Durch kombinierte Inokulation von symbiontischen mit assoziativen Bakterien wurde bei Erbsen der Befall mit bodenbürtigen, pilzlichen Wurzelschaderregern reduziert (HÖFLICH und WEISE, 1992).

Da die inokulierten assoziativen Bakterien nur in geringen Zahlen in den wurzelfreien Boden abwandern (BASHAN and LEVANY, 1988; WESSENDORF, 1988; HÖFLICH et al., 1995) erscheint die Gefahr einer negativen Beeinflussung der Bodenmikroorganismenpopulationen gering.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Nutzung selektierter Rhizosphärenbakterien für ein ressourcenschonendes Pflanzenwachstum bzw. für die Reaktivierung devastierter Böden ohne generelle Störung des biologischen Gleichgewichtes im Boden möglich ist. Vor einer gezielten Anwendung müssen jedoch die mikroorganismen-, pflanzenarten- bzw. bodenartenspezifischen Wirkungen überprüft werden.

Danksagung

Wir danken B. Leske, M. Roth, I. Bär für die technische Absicherung der Versuche. Die Untersuchungen wurden unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technik in Deutschland (Projekt Nr. 0319959 B).

Literatur

- AMARGER, N. and C. DUTHION (1983): The effects of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilizer on grain yield and on seed nitrogen content of Lupin. *Agronomic* 3, 995–1000.
- BALDIANI, J. I. and R. W. WEAVER (1992): Survival of clover rhizobia and their plasmid-cured derivatives in soil under heat and drought stress. *Soil Biol. Biochem.* 24, 737–742.
- BASHAN, Y. and H. LEVANONY (1988): Migration, colonization and adsorption of *Azospirillum brasilense* to wheat roots. *Lectins-Bio. Biochem. Clinical Biochem.* 6, 69–83.
- BASHAN, Y. and H. LEVANONY (1989a): Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense*. *Cd. J. Gen. Microb.* 135, 2899–2908.
- BASHAN, Y. and H. LEVANONY (1989b): Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microb.* 35, 944–963.
- BELIMOV, A. A., A. P. KOZHEMYAKOV and C. V. CHUVARLIYEVA (1995a): Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 173, 29–37.
- BELIMOV, A. A., A. M. KUNAKOVA, N. D. VASILYEVA, E. V. GRUZDEVA, N. I. VOROBIEV, A. P. KOSHEMYAKOV, O. F. KHAMOVA, S. M. POSTAVSKAYA and S. A. SOKOVA (1995b): Relationship between survival rates of associative nitrogen-fixers on roots and yield response of plants to inoculation. *FEMS Microbiology Ecology* 17, 197–196.
- BILAL, R., G. RASUL and K. A. MALIK (1993): Attachment, colonization and proliferation of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter* spp. on root surface of grasses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 63–69.
- BOELEN, J., D. ZOUTMANN, J. CAMPBELL, W. VERSTRAETE and W. PARANCHYCH (1993): The use of bioluminescence as a reporter to study the adherence of the plant growth promoting rhizospseudomonas 7NSK2 and ANP15 to canola roots. *Can. J. Microbiol.* 39, 329–334.
- DEFREITAS, J. R. and J. J. GERMIDA (1992a): Growth promotion of winter wheat by fluorescent *Pseudomonas* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1127–1135.
- DEFREITAS, J. R. and J. J. GERMIDA (1992b): Growth promotion of winter wheat by fluorescent *Pseudomonas* under field conditions. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1137–1146.
- GLANDORF, D. C. M., I. BRAND, P. A. H. M. BAKKER and B. SCHIPPERS (1992): Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies *Pseudomonas putida* in the field. *Plant Soil* 147, 135–142.
- HÖFLICH, G. (1989): Einfluß einer Inokulation mit Rhizobium-Bakterien auf das Wachstum von Getreide. *Zentralbl. Mikrobiol.* 144, 73–79.
- HÖFLICH, G. (1992): Wechselbeziehungen zwischen phytoeffektiven *Pseudomonas*-Bakterien und dem Wachstum von Kulturpflanzen. *Zentralbl. Mikrobiol.* 147, 182–191.
- HÖFLICH, G., F. GLANTE, H.-H. LISTE, I. WEISE, S. RUPPEL and C. SCHOLZ-SEIDEL (1992): Phytoeffective combination effects of symbiotic and associative microorganisms on legumes. *Symbiosis* 14, 427–438.
- HÖFLICH, G. und I. WEISE (1992): Effektivitätserhöhung der *Rhizobium*-Inokulation bei Erbse durch Kombination von *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* mit *R. leguminosarum* biovar. *trifolii*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 147, 378–387.
- HÖFLICH, G., W. WIEHE and G. KÜHN (1994): Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and assoziative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50, 897–905.
- HÖFLICH, G., W. WIEHE and Ch. HECHT-BUCHHOLZ (1995): Rhizosphere colonization of different crop with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res.* 150, 139–147.
- HIRTE, W. F. (1969a): Die Anwendung der Verdünnungsplattenmethode zur Erfassung der Bodenmikroflora. 2. Mitt.: Der qualitative Nachweis der Bakterien und Aktinomyzeten. *Zbl. Bakt. II* 123, 167–178.
- HIRTE, W. F. (1969b): Die Anwendung der Verdünnungsplattenmethode zur Erfassung der Bodenmikroflora. 3. Mitt.: Die Hauptgruppen der heterotrophen Bodenbakterien und ihre systematische Einordnung. *Zbl. Bakt. II* 123, 403–412.
- JAGNOW, G. (1987): Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria: Possible causes of success and failure with regard to yield response – a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 150, 361–368.
- KEMP, J. S., E. PATERSON, S. M. GAMMACK, M. S. CRESSER and K. KILLHAM (1992): Leaching of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* through organic soils – influence of temperature, soil pH, and roots. *Biol. Fertil. Soils* 13, 218–224.
- KLOPPER, J. W. and C. J. BEAUCHAMP (1992): A review of

- issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38, 1219–1232.
- KOZHEMYAKOV, A. P. (1989): Verfahren zur Erhöhung der Effektivität der Stickstofffixierung und Ertragsbildung von Leguminosen. Biologischer Stickstoff in der Landwirtschaft der SSSR (russ.). Moskau „Nauka“, 15–27.
- LISTE, H.-H. (1993): Förderung von Symbiose und Wachstum bei Luzerne durch kombinierte Beimpfung mit *Rhizobium meliloti* und *Pseudomonas fluorescens*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 148, 163–176.
- LIU, Z. L. and J. B. SINCLAIR (1993): Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B 153-2-2. *Soil. Biochem.* 25, 849–855.
- MILLER, L. T. (1982): Simple derivatization method for routine analysis of bacterial whole cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16, 584–586.
- MILUS, E. A. and C. S. ROTHROCK (1993): Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Can. J. Microbiol.* 39, 335–341.
- RUPPEL, S. (1987): Isolation diazotropher Bakterien aus der Rhizosphäre von Winterweizen und Charakterisierung ihrer Leistungsfähigkeit. Dissertation, Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Münchenberg.
- SASSER, M. and L. T. MILLER (1984): Identification of *pseudomonas* by fatty acid profiling. In: PSALLIDAS, P. G., ALIVAZATOS, A.S. (eds): Proceedings of the Second Working Group on *Pseudomonas syringae* Pathovars. Hellenic Phytopathological Society Publishers, Athens, 45–46.
- THIES, J. E., B. BENBOHLOOL and P. W. SINGLETON (1992): Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Can. J. Microbiol.* 38, 493–500.
- VASJUK, L. F., A. V. BOROVKOV, A. A. CHALACICKII, C. V. IONKOVA and Z. V. CEMEMLEVA (1989): Bakterii roda *Azospirillum* i ich vlijanie na produktivnostz nebebovych rastenii. *Mikrobiologija* 58, 642–648.
- VASJUK, L. F., A. E. KHALCHITSKY, N. S. IVANOV and A. V. PLYUSHCH (1993): Non-sulfur purple bacteria fixing nitrogen nonleguminous plants. *Mikrobiologija Mockau*, 529–538.
- WESSENDORF, J. (1988): Einfluß von Anzucht- und Bodenbedingungen auf das Überleben eines *Pseudomonas fluorescens* Stammes im Boden. Dissertation, Universität Hohenheim.
- WIEHE, W., Ch. HECHT-BUCHHOLZ and G. HÖFLICH (1994): Electron microscopic investigations on root colonization of *Lupinus albus* and *Pisum sativum* with two associative plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Symbiosis* 17, 15–31.
- WIEHE, W. and G. HÖFLICH (1995a): Survival of plant growth promoting rhizosphere Bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions. *Microbiol. Res.* 150, 301–306.
- WIEHE, W. and G. HÖFLICH (1995b): Establishment of plant growth promoting bacteria in the rhizosphere of subsequent plants harvest of the inoculated precrops. *Microbiol. Res.* 150, 331–336.
- WIEHE, W., M. SCHLOTER, A. HARTMANN and G. HÖFLICH (1996): Detection of Colonization by *Pseudomonas* PsIA12 of Inoculated Roots of *Lupinus albus* and *Pisum sativum* in Greenhouse Experiments with Immunological Techniques. *Symbiosis* 20, 129–145.

Die Autoren

Prof. Dr. Gisela Höflich, Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung e. V., Institut für Mikrobielle Ökologie und Bodenbiologie, Eberswalder Str. 84, D-15374 Müncheberg, Germany; Dr. Hans-Holger Liste und Dr. Sigfried Köhn, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Königin-Luisen-Str. 19, D-14195 Berlin, Germany.

Manuskript eingelangt am 8. Jänner 1996

Angenommen am 26. Februar 1996