

*) Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Phytomedizin, Geisenheim/Rhein, **) Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem

Möglichkeiten der Charakterisierung einer aus hydroponischer Nährlösung stammenden Bakterienflora mittels MIS (Microbial Identification System)

Means of characterizing bacteria from hydroponic nutrient solutions with MIS (Microbial Identification System)

Von Beate Berkelmann*) und S. Köhn**)

Zusammenfassung

In qualitativen Untersuchungen wurde die Bakterienflora zirkulierender Nährlösungen von Tomatenhydrokulturen (*Lycopersicon esculentum* MILL. cv. 'Lucy') in Steinwolle charakterisiert. Die Bakterienidentifizierung erfolgte anhand charakteristischer Fettsäure-Methyl-Ester-Profile mit dem Microbial Identification System (MIS; Microbial ID Inc.; Hardware Fa. Hewlett Packard, beide USA).

Von den insgesamt 160 zufallsgemäß isolierten Bakterienstämmen machten Angehörige der Gattung *Pseudomonas* mit 40% den Hauptanteil aus (davon 29% *P. facilis*). In der Reihenfolge abnehmender Häufigkeit wurden die Isolate den Gattungen *Agrobacterium* (13%), *Xanthomonas* (9%), *Comamonas* (8%), *Azospirillum* (4%) und *Enterobacter* (3%) zugeordnet. Mit maximal 2% waren die Gattungen *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Yersinia*, *Cytophaga* und *Aureobacterium* vertreten. 18% der untersuchten Populationen konnten nicht sicher oder gar nicht identifiziert werden.

Die im Programmpaket des MIS integrierte Clusteranalyse ermöglichte eine weitergehende Charakterisierung der betrachteten Populationen. Im 2-D-Plot konnten zehn deutliche Cluster abgegrenzt werden, von denen sieben die häufigsten Bakteriengattungen repräsentierten.

Die Clusteranalyse gab weiterhin einen Hinweis auf die mikrobielle Populationsdynamik. Die beteiligten Gattungen waren mit z.T. beträchtlichen Unterschieden an den vier Probenahmeterminen vertreten. Im Gegensatz dazu bestand ein großes Maß an Übereinstimmung hinsichtlich der bakteriellen Besiedelung der jeweiligen Nährlösungen, die in der Modellanlage in vierfacher Wiederholung vorlagen. Aus den Dendrogrammen ging hervor, daß Vertreter der drei Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und *Agrobacterium* regelmäßig in allen Wiederholungen auftraten, während die Gattungen *Azospirillum* und *Comamonas* eine untergeordnete Rolle spielten. Der Anteil von Arten rezedenter Gattungen war in allen vier Wiederholungen mit durchschnittlich sieben Isolaten ähnlich.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß neben der Identifizierung der Bakterien auch eine umfassende Charakterisierung der aus dem „aquatischen Biotop“ stammenden Populationen mit dem MIS gut möglich und praktikabel ist.

Abstract

In a qualitative examination bacterial flora of circulating nutrient solutions of hydroponic systems with tomatoes (*Lycopersicon esculentum* MILL. cv. 'Lucy') in rock wool was characterized. Identification of the bacteria was achieved with the aid of the Microbial Identification System (MIS; Microbial ID Inc., Hardware Hewlett Packard, both USA) using characteristic fatty acid methyl ester profiles.

Members of the genus *Pseudomonas* represented with 40% the major group of totally 160 bacterial strains isolated by a random process (29% alone belonged to *P. facilis*). The rest of the isolates were assigned – in the order of decreasing frequency – to the genera *Agrobacterium* (13%), *Xanthomonas* (9%), *Comamonas* (8%), *Azospirillum* (4%) and *Enterobacter* (3%). Represented with less than 2% were the genera *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Yersinia*, *Cytophaga* and *Aureobacterium*. 18% of the populations examined could not be identified with certainty or could not be identified at all.

The cluster analysis included in the MIS-program-packet made it possible to characterize the observed populations further. Ten clusters were clearly distinguishable in the 2-D-plot, seven of which represented the most common bacterial genera. In addition the cluster analysis pointed to the microbial population dynamics. The participant genera were represented at the four assay dates in sometimes widely differing strengths. In contrast to this there existed good correlation between the bacterial flora of the four replications of the model equipment. It was evident from the dendrograms that the three genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Agrobacterium* turned up regularly in all replications, whereas the genera *Azospirillum* and *Comamonas* played a subordinate role. The number of species of recedent genera remaining was nearly similar in all four replications with an average of seven isolates.

The results show that, apart from the identification of bacteria, a characterization of the populations originating from the described "aquatic biotope" with MIS is both possible and practicable.

Einleitung

Vor etwa 15 Jahren wurden verschiedene Hydrokultursysteme mit chemisch weitgehend inerten Substraten und gesteuerter Nährlösungsverorgung in die gärtnerische Praxis eingeführt. Den aus pflanzenbaulicher, betriebswirtschaftlicher und phytomedizinischer Sicht anstehenden Fragen wurde in einer Reihe praxisorientierter Untersuchungen nachgegangen (MOLITOR, 1990).

Erst in letzter Zeit wuchs das Interesse an der sich entwickelnden Mikroflora und den damit einhergehenden Stoffumsetzungen und direkten und indirekten Einflüssen. Erste Hinweise über mikrobielle Populationen in der Nährlösung gar-

tenbaulicher Hydrokultursysteme lieferten die von PRICE (1976) und RHEINBERG und SHAW (1976) durchgeführten Erhebungen zur Mikroflora in NFT (Nutrient Film Technique). Ein Jahrzehnt später widmeten sich WIGHT und EWART (1986) der Untersuchung mikrobieller Populationen in der Steinwollmatte kommerzieller, hydroponischer Systeme. Allerdings wurde in bisherigen Untersuchungen auf eine detaillierte Artenbestimmung – vor allem auf bakteriologischer Ebene – verzichtet.

Nicht nur in Anbetracht möglicher antagonistischer Wirkungen sollte eine Identifizierung und umfassende Charakterisierung der sich in Hydrokulturnährlösung etablierenden Bakterienflora erfolgen. Im Sinne anwendungsorientierter Grundlagenforschung wurde diese Thematik im Fachgebiet Phyto-medizin, Geisenheim, und in der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, bearbeitet.

Zur Charakterisierung mikrobieller Biozönosen stehen heute eine Reihe miniaturisierter Identifizierungssysteme zur Verfügung, die auf der Basis stoffwechselphysiologischer Teste („Bunte Reihe“) arbeiten. Diese „testkits“ kommen oft aus der humanmedizinischen Diagnostik und verfügen in ihrer Stammbibliothek selten über ein umfangreiches Individuenspektrum ubiquitärer Organismen.

Aus diesem Grunde wurde für die beschriebenen Untersuchungen auf ein anderes System zurückgegriffen: Die Identifizierung zufallsgemäß ausgewählter Bakterien erfolgte auf chemotaxonomischem Wege anhand bakterieller Fettsäure-Methyl-Ester-Profile (FMPE) mit Hilfe des MIS (Microbial Identification System).

Material und Methoden

Hydrokulturanlage und gartenbauliche Kenndaten

Die Basis der bakteriologischen Untersuchungen – zirkulierende Hydrokulturnährlösung – stammte aus einer Tomatanlage (*Lycopersicon esculentum* MILL. cv. 'Lucy') in einem geschlossenen Hydrokultursystem mit folienummantelten Steinwollstreifen (Fa. Grodania A/S, 300 × 900 × 75 mm). Die aus vier Wiederholungen bestehende Versuchsanlage wurde auf folienbedeckten Aluminium-Wannentischen (184 × 84 × 6 cm) mit 1%igem Gefälle aufgebaut. Mittels verschiedener Kunststoffkupplungen und -schlauchverbindungen wurde ein geschlossener Nährlösungskreislauf erstellt (BERKELMANN 1992).

Jede Wiederholung umfaßte acht Tomatenpflanzen auf vier Steinwollmatten.

Die Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung basierte auf einer Düngeempfehlung für die Kultivierung von Zierpflanzen in Steinwolle (MOLITOR et al. 1985). Die Gebrauchslösungen wurden mit Leitungswasser und – soweit vorhanden – mit maximal 50 % Regenwasser in PVC-Behältern (Volumen 120 l) angesetzt.

Da in nicht gepufferten Medien die regelmäßige Kontrolle der Nährlösung von besonderer Bedeutung ist, wurden neben einer monatlichen Vollanalyse der Düngerlösung zweimal wöchentlich die Parameter pH-Wert, Leitfähigkeit, Temperatur und Sauerstoffgehalt gemessen.

Selektion der Mikroorganismen

Um Bakterienpopulationen qualitativ zu untersuchen, ist eine Vielzahl von Isolaten und die Erfassung möglichst vieler Untersuchungsmerkmale notwendig. Deshalb wurde eine große Zahl von auf Standard-I-Nährboden gewachsenen Kolonien zufallsgemäß abgeimpft, über Verdünnungsausstrich in Reinkultur gebracht und taxonomisch analysiert.

Die im folgenden beschriebene Methodik bildete die Basis zur Erstellung eines repräsentativen Querschnitts der bakteriellen Zusammensetzung zirkulierender Hydrokulturnährlösungen:

Ab der achten Kulturwoche (vier Wochen nach Pflanzung der Tomaten) wurden aerobe, heterotrophe Bakterien aus der umlaufenden Nährlösung auf Spiralplatten angezogen. Pro Wiederholung wurden die Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} verarbeitet und jeweils 10 Parallelen auf Standard-I-Nährboden angelegt. Vier Kolonien pro Platte wurden mittels einer blind aufgelegten 4-Loch-Scheibe markiert, isoliert, gereinigt und auf Standard-I-Agar weiterkultiviert. Die Isolierungen wurden im wöchentlichen Abstand durchgeführt.

Microbial Identification System (MIS)

Basierend auf Vorversuchen von KÖHN (1990) wurden die zu untersuchenden Bakterien zunächst als Verdünnungsausstrich auf YDC übertragen und für 24 h bei 25 °C bebrütet. Einzeln liegende Kolonien wurden anschließend im Quadranten-ausstrich auf das fettsäurefreie Medium TSBA überführt und inkubiert (24 h bei 28 °C).

Aus dem letzten oder vorletzten Sektor dieser Platte (späte Log-Phase der Bakterienkultur) wurden ca. 40 mg (entspricht einer gut gefüllten 4-mm-Impföse) in ein Kulturröhrchen mit Gewinde und Teflondichtung (Duran, 13 × 100 mm) gegeben.

Die Präparation der Fettsäure-Methyl-Ester (FME) wurde nach der Vorschrift von MILLER und BERGER (1985) unter Verwendung folgender Reagenzien (Tab. 1) durchgeführt. Um die Einhaltung der Reaktionszeiten zu gewährleisten, wurden maximal 20 Proben pro Durchgang parallel verarbeitet.

Die Analyse der FME erfolgte mit einem Gaschromatographen (Fa. Hewlett Packard, Modell 5890). Als unpolare, stationäre Phase fand die Kapillarsäule „Ultra 2“ (5 % di-Phenyl; 95 % di-Methyl; Polysiloxane; 25 m × 0,2 mm) Verwendung. Von jeder Probe wurden 2 µl automatisch injiziert (Hewlett Packard 7673 A autosampler).

Als Fettsäure-Standard diente der Bacterial Acid Methyl Esters CP™ Mix (Supelco; Nr. 4-7080).

Neben einer bakterienfreien Präparation (blank) wurden stets zwei Referenzstämme (*E. carotovora* pv. *atroseptica* und *P. fluorescens*) parallel aufgearbeitet und regelmäßig als Kontrolle injiziert.

Die Präparation der 160 Bakterienisolate und die anschließende GC-Analyse der FME wurde dreimal wiederholt.

Statistische Auswertung

Die anhand der Fettsäure-Methyl-Ester-Profile (FMPE) durchgeführte Clusteranalyse und die statistische Auswertung

Tab. 1. Übersicht der vier für das MIS-Verfahren benötigten Reagenzien

Reaktion	Reagenz	Zusammensetzung
Verseifung	1	45 g NaOH 150 ml Methanol (für GC) 150 ml dest. H ₂ O
Methylierung	2	325 ml HCl (6 N) 275 ml Methanol (für GC)
Extraktion	3	200 ml n-Hexan 200 ml tert. Methylbutylether (für GC)
Basisches Waschen	4	10,8 g NaOH 900 ml dest. H ₂ O

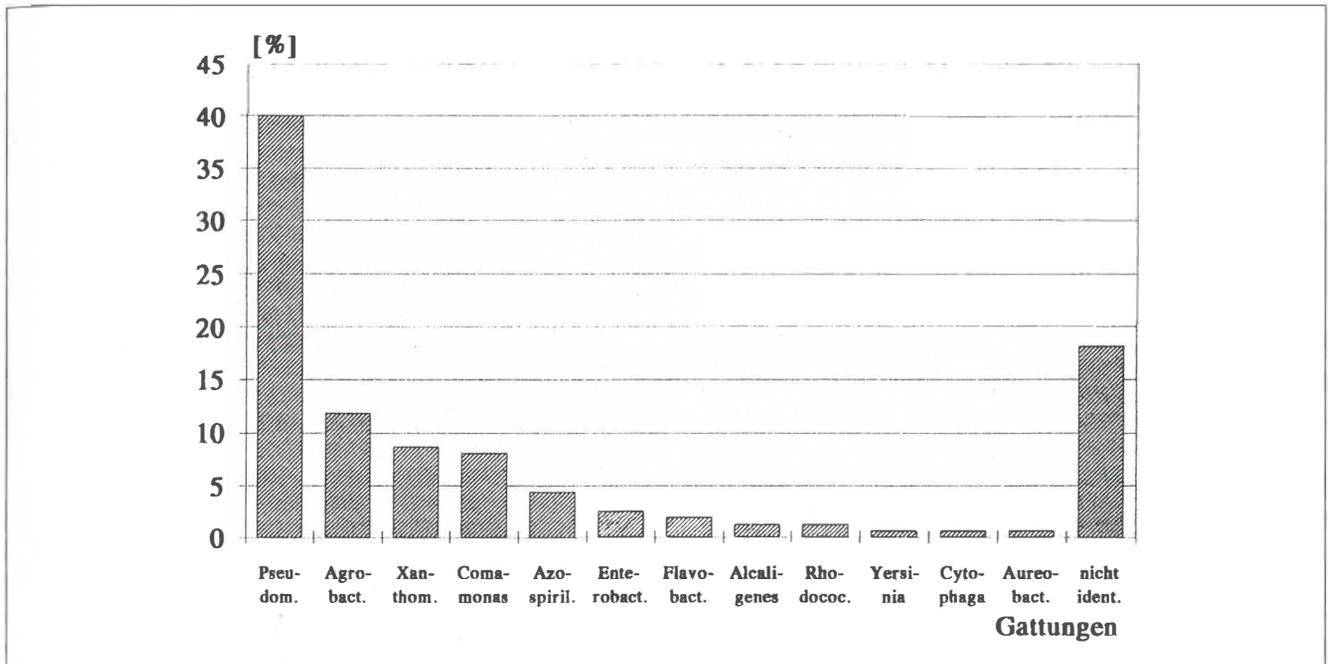


Abb. 1. Prozentuale Anteile verschiedener Bakteriengattungen und nicht identifizierbarer Organismen an der Mikroflora der aeroben, aus der zirkulierenden Nährlösung der Modellanlage isolierten Bakterien. Gesamtzahl der gewonnenen Isolate: 160.

find im Rahmen des Microbial Identification Systems (MIS) mittels der systemintegrierten Software statt.

Nach der Transformation bzw. Standardisierung der Daten wurden Übereinstimmungen zwischen den Isolaten erfaßt und das Ausmaß der Distanz berechnet. Als Dissimilaritäts-Koeffizient diente dabei die „Euklidische Distanz“. Je kleiner der Wert des Koeffizienten, desto größer ist der Grad der Verwandtschaft zwischen den betrachteten Isolaten (ROMESBURG 1984; GOODFELLOW et al., 1985).

Ergebnisse

Bestimmung des Artenspektrums anhand der Fettsäure-Methyl-Ester-Profile

Als Grenzwert der Identifizierungswahrscheinlichkeit (ID) wird bei dem eingesetzten Identifizierungsverfahren ein Wert von 50 % zugrundegelegt.

In der ersten Abbildung (Abb. 1) fanden nur solche Stämme Berücksichtigung, bei denen mindestens zwei der drei Wiederholungen eine Identifizierungswahrscheinlichkeit der Gattung bzw. Art von >50 % zu verzeichnen war. Darüber hinaus mußten die Daten der morphologischen Untersuchungen und der Primärteste mit den Literaturangaben für die genannte Bakteriengattung (und -art) übereinstimmen. Alle Isolate mit zweifelhaften Identifizierungsergebnissen und/oder atypischen Reaktionen wurden in der letzten Säule („nicht identifiziert“) zusammengefaßt.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, stellte die Gattung *Pseudomonas* den Hauptanteil der heterotrophen, aquatischen Bakterienflora. Vertreter dieser Gattung machten 40 % der mit der beschriebenen Methodik anzüchtbaren Bakterien aus, während das Kontingent der übrigen Gattungen sehr viel geringer war. In der Reihenfolge abnehmender Häufigkeit wurden die Isolate den Gattungen *Agrobacterium* (13 %), *Xanthomonas* (9 %), *Comamonas* (8 %) und *Azospirillum* (4 %) zugeordnet. Mit maximal 2 % waren die Gattungen *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Cytophaga* und

Aureobacterium vertreten. 3 % bzw. 1 % der Isolate wurden als Angehörige der Gattungen *Enterobacter* und *Yersinia* identifiziert, was durch einen anschließend durchgeführten O/F-Test und den Vergleich weiterer Merkmale mit dem idealen Phänotyp dieser Gattungen bestätigt werden konnte. Ein Anteil von 18 % der 160 Isolate ließ sich mittels MIS-Software nur mit geringer Identifizierungswahrscheinlichkeit (<50 %) oder gar nicht einordnen, da deren FMEP dem System nicht bekannt waren.

Bei Betrachtung der identifizierten *Pseudomonas*-Spezies wird deutlich, daß insgesamt sechs verschiedene Arten sicher (ID > 50 %) vertreten waren (Abb. 2).

P. facilis nahm innerhalb der *Pseudomonas*-Arten mit über 25 % eine dominierende Stellung ein, während die Arten *P. putida*, *P. pickettii*, *P. vesicularis*, *P. aureofaciens* und *P. aeruginosa* jeweils mit maximal 6 % sicher identifiziert (ID > 50 %) werden konnten.

Im Falle der *Pseudomonas*-Arten *P. cepacia*, *P. solanacearum*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes* und *P. paucimobilis* konnte kein Isolat sicher angesprochen werden (ausschließlich Säulen ohne Muster). Da diese Spezies aber zusammen 16 % der *Pseudomonaden*-Flora ausmachten, finden sie hier Erwähnung.

Taxonomische Charakterisierung der Bakterienpopulation durch Clusteranalyse

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen der Clusteranalyse bearbeitet:

- I. Bestanden Unterschiede hinsichtlich der Artenzusammensetzung der aus den vier verschiedenen Versuchs-Wiederholungen (Tische A, B, C und D) stammenden Populationen?
- II. Konnten Stämme, die im Rahmen der GC-Analyse mit geringen ID-Werten (<50 %) versehen wurden, nach Clusteranalyse und 2-D-Plot sicher zugeordnet werden?
- III. Traten an den vier verschiedenen Probenahmeterminen Unterschiede bezüglich der Artenzusammensetzung der Organismenpopulationen auf?

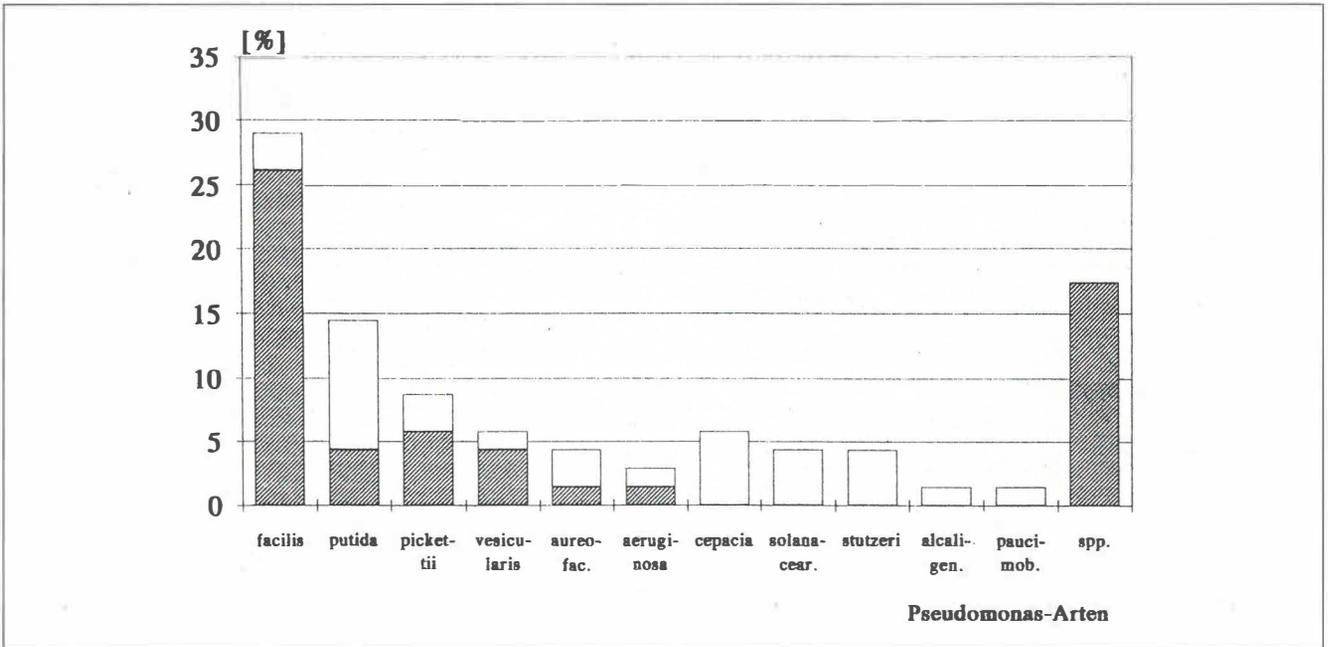


Abb. 2. Prozentuale Anteile identifizierter *Pseudomonas*-Arten an der Mikroflora der aus der zirkulierenden Nährlösung der Modellanlage isolierten acroben Bakterien. Die ungemusterten Säulen(-abschnitte) kennzeichnen die Anteile der Isolate, die in mindestens einer der drei Wiederholungen mit einer ID < 50 % angesprochen wurden.

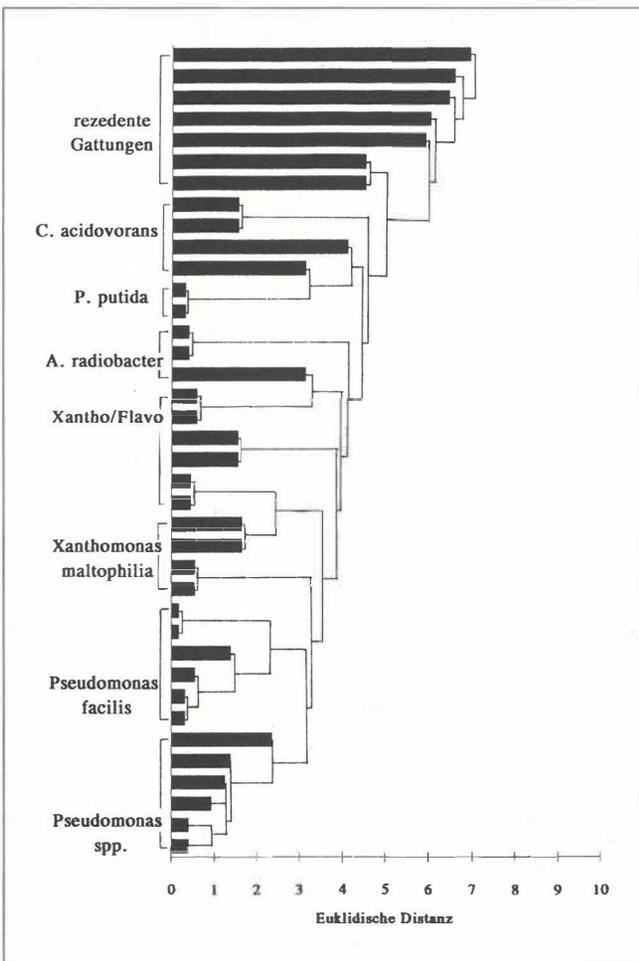


Abb. 3. Dendrogramm aller Isolate einer Wiederholung der Modellanlage; Isolate von Wiederholung (Tisch A); die Balkenlänge ist als Maß der Euklidischen Distanz eines jeden Isolates zu verstehen.

I. Vorkommen dominanter und rezedenter Gattungen

Zunächst interessierte die Artenzusammensetzung der vier Wiederholungen der Modellanlage (Tische A, B, C und D). Um diese Thematik zu bearbeiten, erfolgten *Clusteranalysen* der Fettsäure-Methyl-Ester-Profile *aller Isolate einer Wiederholung* (eines Tisches). Aus den vier Dendrogrammen ging hervor, daß die drei Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und *Agrobacterium* regelmäßig in allen Wiederholungen auftraten, wenn auch die Anteile im Einzelfall unterschiedlich waren, während die Gattungen *Azospirillum* und *Comamonas* eine untergeordnete Rolle spielten und jeweils nur partiell hervortraten. Der Anteil von Arten rezedenter Gattungen war in allen vier Wiederholungen mit durchschnittlich sieben Isolaten ähnlich. Damit wird deutlich, daß sich in den vier Versuchswiederholungen der Modellanlage vergleichbare Bakterienpopulationen aufgebaut hatten, die verschiedene dominante und subdominante Gattungen in leicht variierender Anzahl aufwiesen.

Als Maß für den Grad der Verwandtschaft zwischen den betrachteten Isolaten diente die „Euklidische Distanz“ – ein Dissimilaritäts-Koeffizient, der um so kleiner ist, je näher die Stämme miteinander verwandt sind.

Beispielhaft für die vier Wiederholungen der Modellanlage wird hier ausschließlich das Dendrogramm der Wiederholung A (Tisch A) dargestellt (Abb. 3).

II. Taxonomische Einordnung mit Hilfe der Clusteranalyse

Um den Umfang der in diesem Teil der Analyse einbezogenen Isolate zu erhöhen und auch sicher identifizierte, subdominante Arten zu integrieren, die evtl. Basis eines neuen Clusters sein könnten, erfolgte eine *Clusteranalyse* unter Berücksichtigung *aller 160 Stämme*.

Die einzelnen Cluster bestanden in diesem Fall aus bis zu 15 Isolaten, was eine Gruppenzuordnung erleichterte. Zusammen mit dem entsprechenden 2-D-Plot konnten nun auch Isolate, die aufgrund schlechter Präparation und/oder unzureichender Fettsäuregehalte nicht identifiziert wurden (sog. „No-

match“-Fälle), eine „taxonomische Zuordnung“ erfolgen. Dabei wurden zuvor ermittelte kolonie- und zellmorphologische Daten und Ergebnisse aus Primärtesten einbezogen. Im Gegensatz zur reinen Diagnostik der Stämme war somit mittels MIS eine genauere Analyse der Bakterienpopulationen möglich.

Im 2-D-Plot (Abb. 4) werden die einzelnen Bakterienisolate jeweils durch zwei Kleinbuchstaben repräsentiert (z. B. dr, fx, dm oder du). Großbuchstaben-Kombinationen stehen dagegen für zwei und mehr Stämme (siehe Legende).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnten die untersuchten Bakterienisolate zehn Hauptclustern (Gattungen) zugeordnet werden (siehe Bezeichnungen 1 bis 10). Innerhalb der großen *Pseudomonas*-Gruppe waren mehrere Subcluster (Arten-Gruppen) zu erkennen, von denen aus Gründen der Übersichtlichkeit nur zwei marginale Aggregationen – repräsentiert durch jeweils einen Vertreter der *Pseudomonas*-Sektionen II und III – eingezeichnet wurden.

Die als Gruppe „1“ gekennzeichnete Anordnung enthält einen Großteil der schwer identifizierbaren Isolate. Sie bilde-

ten zusammen mit den Angehörigen der Gattungen *Xanthomonas* und *Flavobacterium* eine größere Aggregation. Da die Stämme der Gruppe 1 auch morphologisch und stoffwechselphysiologisch den beiden Gattungen nahestanden, wurden sie im folgenden als „Xantho-Flavo-Gruppe“ bezeichnet.

III. Gegenüberstellung der vier Probenahme-Termine

Da die Isolate im wöchentlichen Abstand gewonnen wurden, interessierten natürlich auch Populationsveränderungen innerhalb des vierwöchigen Beobachtungs- und Probenahmezeitraums. Zur Klärung dieses Komplexes wurden alle 40 Isolate eines Probenahmetermins als Einzel-Population betrachtet. Veränderungen der Artenzusammensetzung im Verlauf des Untersuchungszeitraums wurden durch Gegenüberstellung der vier Clusteranalysen der Fettsäure-Methyl-Ester-Profile aller Isolate eines Termins deutlich gemacht (Abb. 5).

Die Anteile identifizierter Gattungen waren an den vier Probenahme-Terminen z.T. beträchtlichen Schwankungen unterlegen. So wurden beispielsweise am letzten Entnahmezeitpunkt mehr als doppelt so viele Angehörige der Gattung

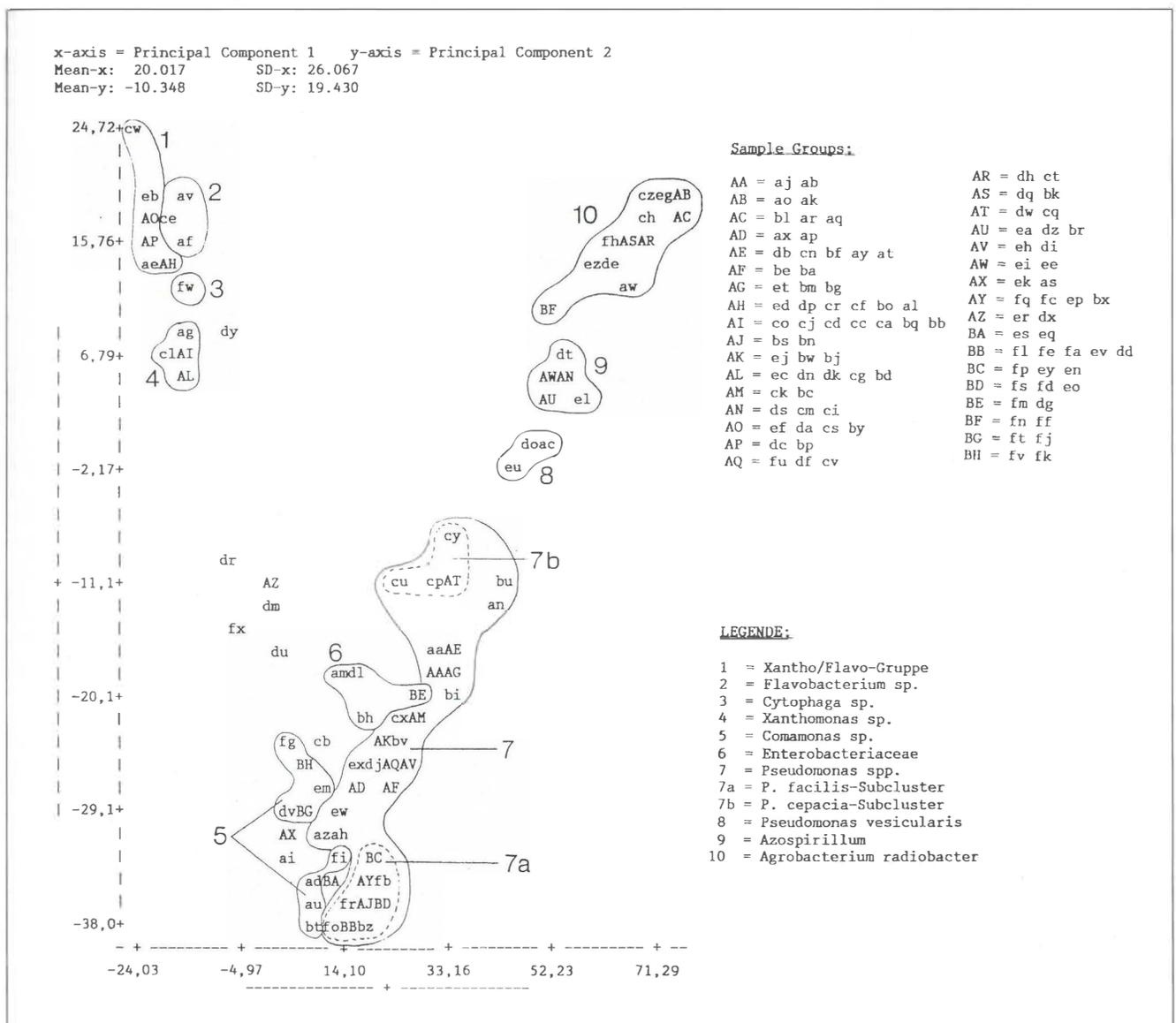


Abb. 4. 2-D-Plot der aus dem Hydrokultursystem isolierten Bakterien; Testparameter: Principal Components 1 und 2; Großbuchstaben repräsentieren jeweils zwei und mehr Isolate (siehe „Sample Groups“); 154 von 160 Stämmen wurden im Rahmen der „Principal-Component-Analyse“ berücksichtigt.

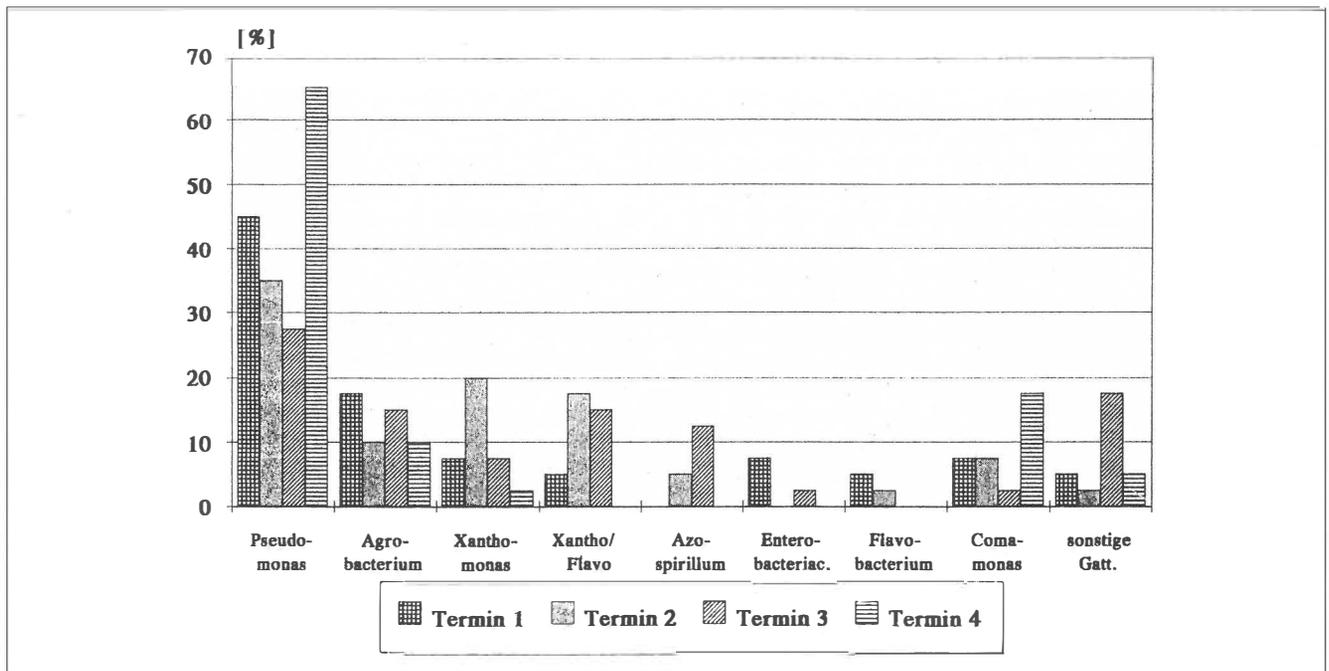


Abb. 5. Unterschiedliche Anteile der identifizierten und sonstigen Bakteriengattungen (und der Familie der Enterobacteriaceae) an den vier Probenahmeterminen; pro Termin wurden zufallsgemäß 40 Stämme isoliert.

Pseudomonas isoliert (65%) als zum dritten Termin. Umgekehrt sank der Anteil der als *Xanthomonas* identifizierten Isolate am letzten Probenahme-Termin auf weniger als 3% ab, während Vertreter dieser Gattung zu einem anderen Zeitpunkt (Termin 2) 20% ausmachten.

Diskussion

Obwohl Hydrokultursysteme bereits vor 30 Jahren Einzug in die gartenbauliche Praxis fanden (PENNINGSFELD, 1982), wurden bisher nur wenige detaillierte Untersuchungen zur Mikroorganismenflora solcher Produktionsanlagen durchgeführt (PRICE, 1976; RHEINBERG und SHAW, 1976; WIGHT und EWART, 1986; VAN PEER, 1990). Somit ist über Art und Umfang der mikrobiologischen Besiedlung dieser Systeme im Vergleich zum Boden relativ wenig bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine mikrobiologische Charakterisierung der sich in der umlaufenden Nährlösung etablierenden Bakterienflora, die zum Verständnis der hier vorliegenden mikrobiellen Aktivitäten, phytopathologischen Zusammenhänge und möglichen antagonistischen Wirkungen beitragen sollte.

In den verschiedenen Bereichen der Bakteriologie stehen heute zur Identifizierung der Mikroorganismen eine Vielzahl von Testverfahren zur Verfügung, die auf unterschiedlichsten Prinzipien beruhen.

Die Tatsache, daß die Fettsäurezusammensetzung von unter standardisierten Bedingungen kultivierten Bakterien komplex, stabil und arttypisch ist, machte FMEP zu wichtigen taxonomischen Werkzeugen (SASSER und FIELDHOUSE, 1984). Im Rahmen der Phytopathologie wurde die Fettsäureanalytik in den letzten Jahren primär zur Identifizierung von Bakterien (MOSS et al., 1972; VALERO-GUILLEN et al., 1985; VAN DER ZWET und SASSER, 1985; WELLS und MOLINE, 1991), aber auch zur Charakterisierung von Populationen unterschiedlicher Wirte oder geographischer Herkünfte (GITAITIS und BEAVER, 1990; GRAHAM et al., 1990) eingesetzt.

Das MIS als besondere Form der Fettsäureanalytik dient heute sowohl zur Bestimmung phytopathogener Bakterien (ROY, 1988; SASSER, 1990b) als auch apathogener Prokaryonten (MILLER und BERGER, 1985). Erste Erfahrungen bei der Klassifizierung aquatischer Mikroorganismen mit dem MIS liegen von LANGLEY et al. (1987) vor, die diese Methodik zur Identifizierung von 195 Wasserbakterien heranzogen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren zunächst zur Identifizierung der aus der zirkulierenden Nährlösung isolierten Bakterien eingesetzt. 82% der 160 Isolate konnten damit sicher angesprochen werden. Insbesondere das Artenspektrum der dominanten Gattung *Pseudomonas* wurde detailliert untersucht.

Es sei darauf hingewiesen, daß es sich bei den Identifizierungsergebnissen um statistisch ausgewertete Übereinstimmungen mit gespeicherten Referenzspektren handelt. Insbesondere auf der Artenebene wurden die Isolate oftmals nicht „sicher“ (ID < 50%) identifiziert.

Da bestimmte Isolate aber nach allen drei Wiederholungen der FMEP-Präparationen im Rahmen der FMEP-Analyse mit demselben Artnamen versehen wurden und z. T. einen größeren Anteil an der *Pseudomonas*-Gesamtpopulation ausmachten, fanden sie Erwähnung.

Insgesamt machten die Vertreter der Familie der Pseudomonadaceae annähernd die Hälfte der aus dem Hydrokultursystem isolierten Bakterien aus, wenn man den Anteil der als *Xanthomonas* identifizierten Stämme integriert.

Bei den Vertretern der übrigen Gattungen handelt es sich um typische Bodenbakterien, deren Vorkommen in aquatischen Habitaten aber ebenso belegt ist.

Das MIS bietet im Rahmen der automatisierten Datenauswertung neben der Identifizierung von Mikroorganismen weitere Möglichkeiten der taxonomischen Beschreibung bakterieller Populationen und deren Dynamik. Eine anschließende Clusteranalyse kann zur weitergehenden Charakterisierung der zu untersuchenden Population herangezogen werden (SASSER, 1990a, b). So ermöglichte dieses Bestimmungssystem

über die eigentliche Diagnostik hinaus eine *Darstellung verwandtschaftlicher Beziehungen* mittels Dendrogrammen und 2-D-Plots – vor allem im Falle schlecht zuzuordnender Stämme. Beispielsweise konnten die Isolate mit sogenanntem „No-match“-Ergebnis zumindest eingruppiert werden (hier als Mischgruppe „Xantho/Flavo“ bezeichnet).

Darüber hinaus zeigte die Analyse entstandener Agglomerationen im 2-D-Plot neue Aspekte der taxonomischen Verhältnisse innerhalb der betrachteten Bakterienpopulation auf. Dieses Verfahren wurde von MUKAWAYA und WELCH (1989) erfolgreich für die taxonomische Bearbeitung verschiedener *P. cepacia*-Stämme und zur detaillierten Untersuchung von aus Kläranlagen stammenden Bakteriengemeinschaften eingesetzt (KROPFENSTEDT, 1991; pers. Mitteilung).

Im vorliegenden Falle ergab sich ein V-förmiges Verteilungsmuster, das mehrere deutlich abgegrenzte Aggregationen aufwies. Bei isolierter Betrachtung der Familie der Pseudomonadaceae ließen sich zwischen dieser Darstellung und dem Verteilungsmuster der RNA- und DNA-Homologie-Gruppen (PALLERONI, 1984; nach früheren Arbeiten von N. J. Palleroni modifiziert) Parallelen erkennen, was auch in der Kurzmitteilung von SASSER und SMITH (1987) belegt wird.

Wie aus den Ergebnissen zur qualitativen Charakterisierung von aquatischen Bakterienpopulationen hervorgeht, konnte mittels MIS neben der Diagnose der Bakterien eine Darstellung der bakteriellen Populationsdynamik und die Beschreibung verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb der betrachteten „Biozönose“ erfolgen.

Literatur

- BERKELMANN, B., 1992: Charakterisierung der Bakterienflora und des antagonistischen Potentials in der zirkulierenden Nährlösung einer Tomatenkultur (*Lycopersicon esculentum* MILL.) in Steinwolle. Geisenheimer Berichte, Band 10, Geisenheim.
- GITAITIS, R. D. and R. W. BEAVER, 1990: Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 80, 318–321.
- GOODFELLOW, M., D. JONES and F. G. PRIEST, 1985: Computer-Assisted Bacterial Systematics. Published for the Society for General Microbiology by Academic Press, London, New York and Tokyo.
- GRAHAM, J. H., J. S. HARTUNG, R. E. STALL and A. R. CHASE, 1990: Pathological, restriction-fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationship between *Xanthomonas campestris* from *Citrus* and noncitrus hosts. Phytopathology 80 (9), 829–836.
- KÖHN, S., 1990: Das „Microbial Identification System“ (MIS) und sein Einsatz zur Diagnose phytopathogener Bakterien. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt f. Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 266, 461.
- LANGLEY, D. E., J. B. CLARK, P. A. HALL and S. T. KELLOGG, 1987: An evaluation of whole cell fatty acid profiles as a means of identifying aquatic microorganisms. Abstracts of the 87th Annual Meeting of the American Society of Microbiology, 260.
- MILLER, L. T. and T. BERGER, 1985: Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Comp. Application Note 228-41, 1–8.
- MOLITOR, H.-D., G. TIMM and W. WOHANKA, 1985: Mutterpflanzen und Schnittblumen auf Steinwolle. Leitfaden zur Kultur auf Steinwolle. Deutscher Gartenbau 32 (39), 1518–1521.
- MOLITOR, H.-D. (Hrsg.), 1990: Geschlossene Kulturverfahren – Zierpflanzenbau. Taspo-Praxis 18, Verlag Bernhard Thalacker, Braunschweig.
- MOSS, W. C., S. B. SAMUELS and R. E. WEAVER, 1972: Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. 24 (4), 596–598.
- MUKAWAYA, G. M. and D. F. WELCH, 1989: Subgrouping of *Pseudomonas cepacia* by cellular fatty acid composition. J. Clin. Microbiol. 27, 2640–2646.
- PALLERONI, N. J., 1984: The Genus *Pseudomonas*. In: N. R. KRIEG and J. G. HOLT: BERGEYS Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore; Vol. 1, 141–199.
- PENNINGSFELD, F., 1982: Fortschritte auf dem Gebiet der Hydrokulturtechnik. Kali-Briefe 16 (3), 175–183.
- PRICE, D., 1976: Nutrient-Film Culture: Investigations on root microflora. Ann. Report Glassh. Crops Res. Inst., Littlehampton, 109–110.
- RHEINBERG, P. and D. S. SHAW, 1976: The microbial ecology of a nutrient film hydroponic system. IWOSC-Proceed., 4th Intern. Congress on Soilless Culture, 137–148.
- ROMESBURG, H. C., 1984: Cluster Analysis for Researchers. Lifetime Learning Publications, Belmont, California.
- ROY, M. A., 1988: Use of fatty acids for the identification of phytopathogenic bacteria. Plant Disease 72 (5), 460.
- SASSER, J. M. and D. J. FIELDHOUSE, 1984: Computer assisted identification of bacteria based on fatty acid analysis (Abstract). Phytopathology 74 (7), 882.
- SASSER, J. M. and D. H. SMITH, 1987: Parallels between ribosomal RNA and DNA homologies and fatty acid composition in *Pseudomonas*. Abstract of the 87th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 241.
- SASSER, J. M., 1990a: „Tracking“ a strain using the microbial identification system. Microbial ID Inc., Newark, Delaware, Technical Note 102.
- SASSER, J. M., 1990b: Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Z. KLEMENT, K. RUDOLF and D. C. SANDS: Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó und Nyomda Vállalat, Budapest, Hungary, 199–204.
- VALERO-GUILLEN, P. L., F. PACHECO and F. MARTIN-LUENGO, 1985: Fatty acid composition and mycolic pattern of some chromogenic mycobacteria. J. Appl. Bacteriol. 59, 113–126.
- VAN DER ZWET, T. and J. M. SASSER, 1985: Characterization of *Erwinia amylovora* through fatty acid profiling. Phytopathology 75 (11), 1281.
- VAN PEER, R., 1990: Microbial Interactions and Plant Responses in Soilless Cultures – Root colonization by Pseudomonads: mechanisms, plant responses and effect on *Fusarium* wilt. Ph.D. Thesis, Univ. Utrecht, The Netherlands.
- WELLS, J. M. and H. E. MOLINE, 1991: Differentiation of the soft-rotting *Erwinias* (the *Carotovora* Group) by fatty acid composition. J. Phytopathol. 131, 22–32.
- WIGHT, P. N. and J. M. EWART, 1986: Plant-microbe interaction in a rock-wool environment. Soilless Culture 2 (1), 74–75.