

**Nitrifikation und Denitrifikation
in der Rhizosphäre von Reis:
Kleinräumige Lokalisation der mikrobiellen Prozesse**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Inko Arth

aus Neunkirchen / Saar

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungen	I
A. Zusammenfassung	1
B. Einleitung	
1. Das Reisfeld - ein anthropogenes Ökosystem	3
1.1 Globale Bedeutung des Reisanbaus und des Einsatzes von Stickstoff-Dünger	3
1.2 Nitrifikation und Denitrifikation im gefluteten Reisfeldboden	3
1.3 Einfluß der Reispflanze auf Nitrifikation und Denitrifikation	4
2. Nitrifikanten	7
2.1 Ammonium-Oxidierer	7
2.2 Nitrit-Oxidierer	9
3. Denitrifikanten	10
4. Mikroelektroden	11
5. Ziel der Arbeit	12
C. Material und Methoden	
1. Präparation der Mikrokosmen	15
2. Mehrkanal-Mikroelektroden	18
2.1 Ionen-selektive-Mikroelektroden	18
2.2 Ionenchromatographische Bestimmung von Alkali- und Erdalkali-Metallen	22
2.3 Berechnung von NO_3^- -Produktions- und Verbrauchsraten in der Rhizosphäre von Einzelwurzeln	23
2.4 Bestimmung der Perkolation	24
3. Sauerstoff-Mikroelektroden	24
4. Most Probable Number-Bestimmung von Nitrifizierern	24

4.1 Zellzahlbestimmung von Nitrifikanten an der Reiserhizoplane	24
4.2 Zellzahlbestimmung von Nitrifikanten in Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden	27

D. Ergebnisse

1. Eigenschaften der Mehrkanal-Mikroelektroden und der Einfluß von Störionen	28
2. Profilmessungen in Reismikrokosmen	29
2.1 Unbepflanzte, ungedüngte Reismikrokosmen	29
2.2 Bepflanzte Reismikrokosmen mit Harnstoff-Düngung im Flutungswasser	30
2.3 Kompartiment-Mikrokosmen	33
2.4 Rhizotron-Mikrokosmen	36
3. Nitrifizierer-Zellzahlbestimmungen	41
3.1 Nitrifizierer-Zellzahlen der Reiserhizoplane	41
3.2 Nitrifizierer-Zellzahlen in Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden	42

E. Diskussion

1. Ionen-selektive Mikroelektroden	44
2. Profilmessungen	46
2.1 Unbepflanzte Reismikrokosmen	46
2.2 Bepflanzte, ungedüngte Reismikrokosmen	47
2.3 Bepflanzte, Stickstoff-gedüngte Reismikrokosmen	47
2.4 Bepflanzte, Stickstoff-gedüngte Reiserhizotrone	50
2.5 Bepflanzte Reismikrokosmen mit oberflächlicher Harnstoff-Düngung	51
3. Populationsgröße der Nitrifizierer	53
4. Fazit	54

F. Literaturverzeichnis	56
--------------------------------	-----------

Abkürzungen

A	„flux“: Stoffmenge pro Fläche und Zeit
AD	Außendurchmesser
FG	Feuchtgewicht
FSK	fused-silica Kapillaren
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
MPN	Most Probable Number, wahrscheinlichste Zahl
n	Anzahl der Parallelen
rpm	Umdrehungen pro Minute
TG	Trockengewicht
TS	Trockensubstanz

A. Zusammenfassung

Der Stickstoff-Kreislauf in gefluteten Reisfeldböden ist gekennzeichnet durch die enge Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation. Die Nitrifikation ist dabei auf die etwa einen Millimeter dünne, oxische Oberflächenschicht begrenzt, während die Denitrifikation in dem darunterliegenden anoxischen Boden auftritt. Im bepflanzten Reisfeldboden ermöglicht der von den Reiswurzeln freigesetzte Sauerstoff in dem ansonsten anoxischen Boden Nitrifikation. Zur Lokalisation der wurzelassoziierten Nitrifikation und Denitrifikation wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Mehrkanal-Mikroelektrode entwickelt, die es ermöglichte, gleichzeitig und am selben Ort NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- *in situ* zu messen.

In ungedüngten, unbepflanzten Reisfeldboden-Mikrokosmen entwickelte sich in einer Tiefe von ungefähr 1 mm eine oxisch-anoxische Grenzfläche, oberhalb derer Nitrifikation und unterhalb derer Denitrifikation stattfand. In ungedüngten, mit Reis bepflanzten Mikrokosmen konnten dagegen weder NH_4^+ und NO_2^- noch NO_3^- in der Rhizosphäre detektiert werden. Die Assimilation durch die Reiswurzeln reduzierte die Verfügbarkeit von Stickstoff auf ein Niveau, unterhalb dessen Nitrifikation und Denitrifikation nicht mehr möglich waren. Wenige Stunden nach der Injektion von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder Harnstoff konnte jedoch in der Oberflächenschicht von bepflanzten Mikrokosmen und in einer Tiefe von 20 - 30 mm in dem durchwurzelteten Boden Nitrifikationsaktivität detektiert werden. In derselben Tiefe wurden O_2 -Konzentrationen mit Werten bis zu 150 μM gemessen. Diese O_2 -Konzentrationen konnten in dieser Tiefe nur durch Freisetzung aus den Reiswurzeln erreicht werden.

An Einzelwurzeln in Rhizotronen gemessene NH_4^+ - und NO_3^- -Profile konnten zum ersten Mal eine enge Korrelation zwischen Wurzelentwicklung und dem Auftreten von Nitrifikations- und Denitrifikationsaktivitäten zeigen. Im Bereich der Wurzelspitze, der durch hohe O_2 -Freisetzung gekennzeichnet ist, konnten hohe Nitrifikationsaktivitäten in

einem Abstand von 0 - 2 mm von der Wurzeloberfläche und hohe Denitrifikations-Aktivitäten in einer Entfernung von 1,5 - 5 mm detektiert werden. In der Elongationszone, in der durch die Ausbildung von Sklerenchymschichten der Austritt von O_2 unterbunden wird, traten weder Nitrifikation noch - als direkte Folge davon - Denitrifikation auf. Dagegen konnte in der Reifungszone, in der durch die Ausbildung von Wurzelhaaren wiederum O_2 in den umgebenden Boden freigesetzt wird, mit zunehmendem Abstand von der Wurzelspitze sowohl Nitrifikations- als auch Denitrifikations-Aktivitäten detektiert werden. Allgemein traten die Maxima von NO_3^- -Produktion und NO_3^- -Verbrauch nahe der Grenzfläche zwischen Nitrifikation und Denitrifikation auf.

Die Zugabe von Harnstoff in das Flutungswasser bepflanztter Reismikrokosmen, wie sie auch unter Feldbedingungen vorkommt, bewirkte eine Stimulation der Nitrifikation. Dabei erzeugte die Transpiration der Reispflanzen eine Wasserperkolations, die einen NH_4^+ -Massenfluß hinab zu den Reiswurzeln verursachte, der wiederum die Nitrifikation unterstützte.

Eine Zunahme der Nitrifizierer-Population konnte trotz Stickstoff-Düngung weder an der Reisorhizoplane noch im Rhizosphären-Boden beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß in der Reisorhizosphäre Stickstoff stark limitiert ist. Nach der Zugabe von Dünger starten jedoch Nitrifikations-Prozesse, die in Verbindung mit Denitrifikations-Prozessen zu erheblichen Stickstoff-Verlusten führen können. Dieses transiente Ungleichgewicht zwischen Stickstoff-Angebot und Assimilation durch die Reispflanze führte zu Denitrifikation und Stickstoff-Verlusten in den Reismikrokosmen.

B. Einleitung

1. Das Reisfeld - ein anthropogenes Ökosystem

1.1 Globale Bedeutung des Reisanbaus und des Einsatzes von Stickstoff-Dünger

Reis ist das wichtigste Grundnahrungsmittel für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung. Schätzungen der Bevölkerungsentwicklung in den Ländern, in den Reis das Grundnahrungsmittel ist, ergaben, daß eine Steigerung der Reisproduktion um 65 % bis zum Jahr 2020 notwendig wird (IRRI, 1989). Diese Produktionssteigerung kann nur durch eine Ertragssteigerung auf den bestehenden Anbauflächen erreicht werden (IRRI, 1989). Um diese Erhöhung des Ertrages zu realisieren, wird eine Steigerung des Stickstoff-Düngereintrages um das Dreifache notwendig (Cassman et al., 1998). Stickstoff ist der wichtigste Pflanzenmakronährstoff im Naßreisanbau. Der Stickstoff-Status einer Reispflanze beeinflußt sowohl die Blattflächenentwicklung als auch die Photosyntheseraten (Kropff et al., 1993). Darüberhinaus steuert der Stickstoff-Status die Aufnahme anderer Makronährstoffe (Doberman et al., 1998). In gefluteten Reisfeldern ist jedoch die Effektivität der Stickstoff-Düngung gering. Weniger als 40 % des eingesetzten Stickstoff-Düngers finden sich in den Reispflanzen wieder (Cassman et al., 1993; Cassman et al., 1996). Zum Verständnis dieser Stickstoff-Verluste ist eine genaue Kenntnis der Vorgänge im gefluteten Reisfeldboden - insbesondere der beteiligten mikrobiellen Prozesse - notwendig.

1.2 Nitrifikation und Denitrifikation im gefluteten Reisfeldboden

Gefluteter Reisfeldboden ist charakterisiert durch die Limitierung von Sauerstoff. Da die Diffusion von Gasen in Wasser etwa 10 000 - fach langsamer ist als in der Gasphase, wird der verfügbare Sauerstoff in den tieferen Bodenschichten durch chemische Prozesse und die Veratmung durch aerobe Mikroorganismen rasch verbraucht. Danach werden

sukzessiv NO_3^- , NO_2^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} und CO_2 als Elektronenakzeptor genutzt und reduziert (Ponnamperuna, 1972; Zehnder und Stinnes, 1988). So kommt es zu einer Zweiteilung des gefluteten Reisfeldbodens in eine nur wenige Millimeter mächtige, oxische Oberflächenschicht und in eine darunter liegende, reduzierte Bodenschicht (Abb. 1). Auf der dünnen, oxischen Oberflächenschicht bildet sich eine Algenschicht, deren Dicke von zahlreichen Umweltfaktoren wie Belichtungsstärke und Nährstoffverfügbarkeit abhängt. Der Einfluß der Algen auf den Stickstoff-Kreislauf ist vielfältig. Durch die Algenphotosynthese und die damit verbundene CO_2 -Aufnahme kann es zu einem Anstieg des pH-Wertes kommen, der das Gleichgewicht zwischen NH_4^+ und NH_3 zugunsten von NH_3 verschiebt. Dies hat einen starken Stickstoff-Verlust durch NH_3 -Ausgasung zur Folge (deDatta und Buresh, 1989; Vlek und Byrnes, 1986). Die Erhöhung des pH-Wertes kann darüberhinaus zu einer Verstärkung der Nitrifikationsaktivität führen (siehe unten). Ebenso kann durch eine photosynthesebedingte Erhöhung des O_2 -Gehaltes in der Oberflächenschicht die Nitrifikation stimuliert werden. Innerhalb des Reisfeldbodens ist die Nitrifikation ein Schlüsselprozeß des Stickstoff-Kreislaufes. NH_4^+ , das direkt oder in Form von Harnstoff als Stickstoff-Dünger eingesetzt wird, wird von den Nitrifizierern zu NO_2^- und NO_3^- oxidiert. Da Nitrifizierer obligate Aerobier sind, beschränken sich diese Prozesse auf die dünne, oxische Oberflächenschicht. Die oxidierten Stickstoff-Verbindungen diffundieren rasch in die darunterliegende, reduzierte Bodenschicht, wo sie von Denitrifikanten zu N_2O und N_2 reduziert werden.

1.3 Einfluß der Reispflanze auf Nitrifikation und Denitrifikation

Die Reispflanze bildet ein großflächiges Wurzelsystem auch innerhalb der reduzierten Bodenschicht aus (Abb. 2). Diese Wurzeln müssen über ein Aerenchymsystem mit O_2 versorgt werden (Armstrong, 1971). Ein Teil des O_2 diffundiert aus den Wurzeln in den umgebenden Reisfeldboden. Diese Bereiche sind an der Bildung von braunrotem FeOOH zu erkennen (Chen et al., 1980). O_2 konnte in durchwurzelttem Reisfeldboden bereits direkt nachgewiesen werden (Revsbech et al., 1999; Gilbert und Frenzel, 1995;

Frenzel et al., 1992). Der von den Reiswurzeln freigesetzte O_2 könnte neben anderen aeroben, mikrobiellen Prozessen auch Nitrifikation ermöglichen. Die durch Nitrifikation gebildeten oxidierten Stickstoff-Spezies könnten in den umgebenden, anoxischen Boden diffundieren, wo sie rasch denitrifiziert werden könnten. Diese Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation kann zu erheblichen Stickstoff-Verlusten führen (Freney et al., 1990; Soliman und Monem, 1996; Suratno et al., 1998; Arth et al., 1998).

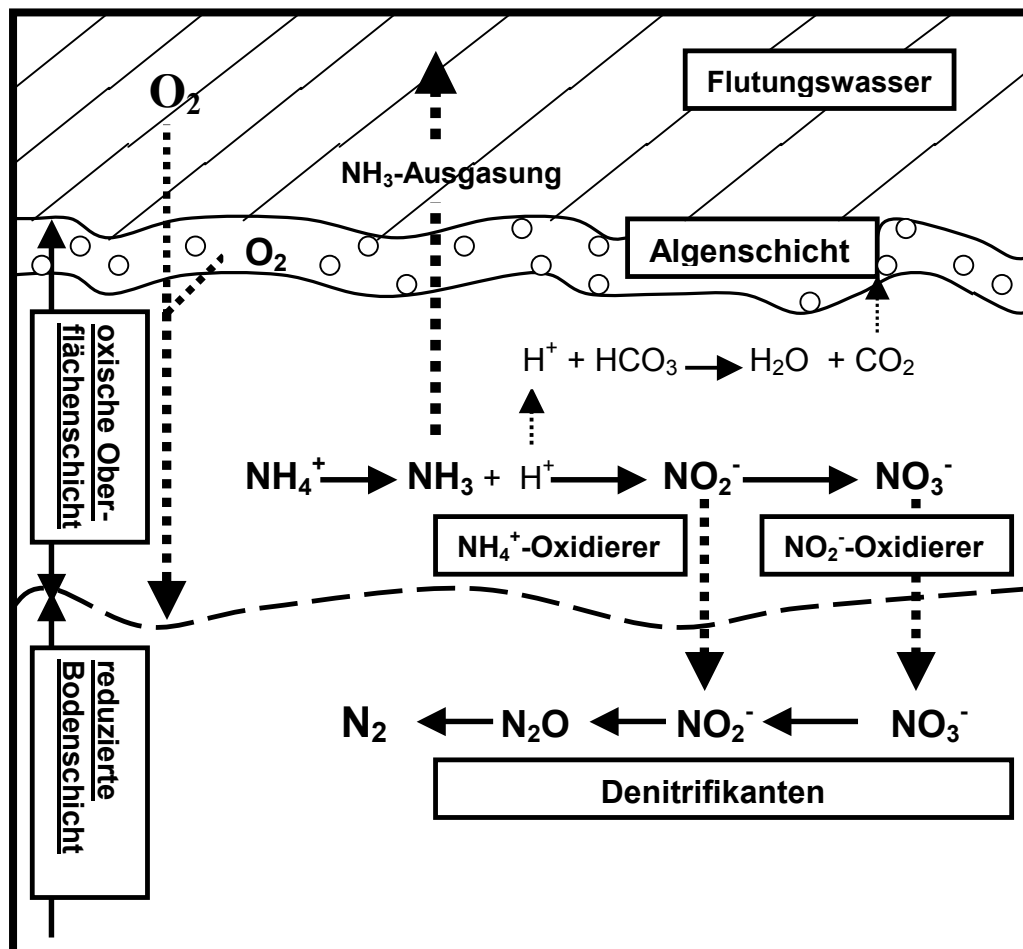


Abb. 1: Stickstoffverluste im gefluteten Reisfeldboden durch photosynthesebedingte NH_3 -Ausgasung und mikrobiell bedingte Oxidation / Reduktion des Stickstoffes. Gestrichelte Pfeile symbolisieren Diffusionsvorgänge (Einzelheiten im Text).

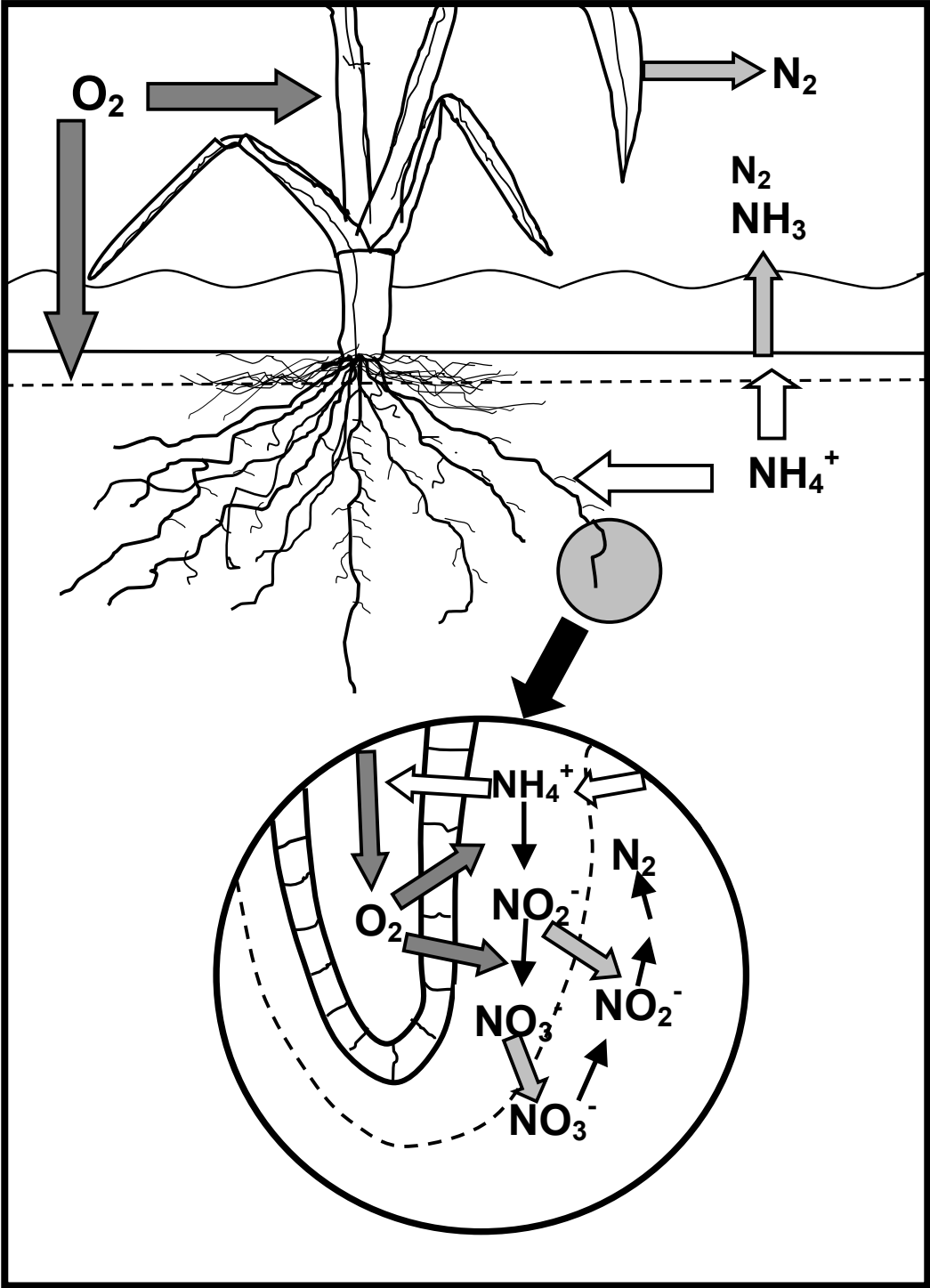


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der gekoppelten Nitrifikation-Denitrifikation im bepflanzen Reisfeldboden. Blockpfeile symbolisieren Diffusionsvorgänge; unterbrochene Linien symbolisieren oxisch-anoxische Grenzflächen.

2. Nitrifikanten

Unter Nitrifikation wird die biologische Umwandlung von reduzierten N-Verbindungen zu Nitrit und Nitrat verstanden. Die wichtigsten an diesem Prozeß beteiligten Mikroorganismen-Gruppen sind die zur Familie der Nitrobacteriaceae gehörenden Ammonium-oxidierenden und Nitrit-oxidierenden Bakterien (Watson, 1974; Bock et al., 1986). Die Nitrobacteriaceae besitzen eine Gram-negative Zellwand und sind lithoautotroph. Aus der Oxidation anorganischer Stickstoff-Verbindungen gewinnen sie Energie. CO₂ dient ihnen als einzige Kohlenstoff-Quelle zur Produktion von Zellbestandteilen (Wood, 1986).

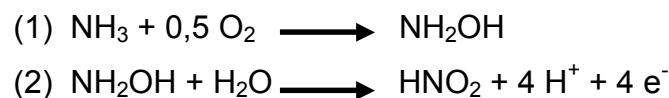
Die physiologisch definierten Gruppen der NH₄⁺-Oxidierer und NO₂⁻-Oxidierer werden nach morphologischen Gesichtspunkten unterschieden. Phylogenetisch werden sie mit anderen nichtphotosynthetischen Bakterien in drei Untergruppen der phototrophen Purpurbakterien eingeordnet (Woese et al., 1984 a und b; Woese et al., 1985).

2.1 Ammonium-Oxidierer

Die NH₄⁺-Oxidierer werden aufgrund ihrer Zellform in die fünf Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* eingeteilt. Das Präfix Nitroso- weist auf die Gemeinsamkeit der Nitrit-Bildung hin. Obwohl die drei Gattungen *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* sich morphologisch deutlich unterscheiden, sind sie phylogenetisch eng verwandt (Woese et al., 1984 b). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit ihrer 16S-rRNA werden sie in einer Gattung, *Nitrosospira*, zusammengefaßt (Head et al., 1993). Zusammen mit der Gattung *Nitrosomonas* werden sie in die Beta-Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet (Woese et al., 1984 a). *Nitrosococcus oceanus* nimmt unter den NH₄⁺-Oxidierern eine phylogenetisch isolierte Stellung ein und wird in die Gamma-Untergruppe, den *Chromatiaceae*-Zweig der Proteobakterien eingeordnet (Woese et al., 1985).

Alle bekannten NH_4^+ -Oxidierer sind obligat lithotroph (Krümmel und Harms, 1982). Das Unvermögen heterotroph zu wachsen, könnte mit dem Fehlen eines NADH-Oxidase-Systems zusammenhängen (Hooper, 1969). Als Hauptkohlenstoff-Quelle dient CO_2 , das über den Calvin-Zyklus assimiliert wird (Glover, 1983). Einfache Substrate wie Formiat, Acetat und Pyruvat können in geringem Umfang assimiliert werden (Krümmel und Harms, 1982). Die Verdopplungszeit liegt zwischen 8 Stunden und mehreren Tagen (Bock et al., 1986). NH_4^+ -Oxidierer sind sensitiv für ultraviolettes und blaues Licht (Hooper und Terry, 1974). Das Temperatur-Optimum liegt bei etwa 30°C und das pH-Optimum bei 7,8. Der minimale und maximale Wert liegt bei etwa 6,0 bzw. 9,0. Der pH-Wert beeinflusst auch das Konzentrationsverhältnis von $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$. Freies NH_3 ist wahrscheinlich das wirkliche Substrat der NH_4^+ -Oxidierer (Suzuki et al., 1974; Wood, 1986). Darüberhinaus ist bekannt, daß Membranen hoch permeabel für NH_3 , nicht aber für NH_4^+ sind (Kleiner, 1985).

Die Oxidation von NH_3 erfolgt über eine zweistufige Reaktion: Das Enzym Ammonium-Monooxygenase (AMO) oxidiert Ammoniak zu Hydroxylamin (1) und das Enzym Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO) oxidiert Hydroxylamin zu Nitrit (2):



Die erste Reaktion benötigt molekularen Sauerstoff, während in der zweiten Reaktion Sauerstoff aus Wasser übertragen wird. Dabei handelt es sich bei der AMO um ein kupferhaltiges Enzym, das die Cytoplasmamembran durchspannt (Suzuki und Kwok, 1981). Die HAO ist ein Multihäm-Enzym, das sich im periplasmatischen Raum befindet (Hooper und DiSpirito, 1985). Der einzige Energie liefernde Schritt ist dabei die durch HAO vermittelte Oxidation von Hydroxylamin. HAO überträgt bei der Oxidation von Hydroxylamin 4 Elektronen auf Cytochrom c 554 (Arciero et al., 1991). Über Cytochrom c 552 werden Elektronen entweder zur Reduktion von NAD^+ mittels des „reversen Elektronen-

Transportes“ genutzt (Wood, 1988) oder Elektronen auf die Cytochrom aa_3 -Oxidase (DiSpirito et al., 1986) bzw. Nitrit-Reduktase (NIR) übertragen (Miller und Wood, 1983). Mit Hilfe der NIR könnten NH_4^+ -Oxidierer unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen denitrifizieren. Unter mikroaerophilen Bedingungen konnte die Bildung von signifikanten Mengen an NO durch autotrophe Nitrifizierer nachgewiesen werden (Lipschultz et al., 1981). Ein geringes Wachstum von autotrophen Nitrifizierern konnte auch unter anaeroben Bedingungen mit NO_2^- als Elektronen-Akzeptor und Wasserstoff als Elektronen-Donor gezeigt werden (Bock et al., 1995). Das Auftreten von N_2O (Bremner und Blackmer, 1978) und möglicherweise N_2 (Poth, 1986) legt das Vorhandensein einer NO- bzw. N_2O -Reduktase nahe (Hooper et al., 1997). Viele NH_4^+ -Oxidierer-Stämme sind darüberhinaus in der Lage, durch die Bildung von Urease Harnstoff als Substrat zu nutzen (Watson et al., 1989).

2.2 Nitrit-Oxidierer

Die NO_2^- -Oxidierer werden nach ihrer Zellgestalt in die vier Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* und *Nitrospira* unterteilt. Das Präfix Nitro- weist auf die Gemeinsamkeit der Nitrat-Bildung hin. Die lithoautotrophen NO_2^- -Oxidierer sind Bakterien mit Gram-negativer Zellwand. Phylogenetisch sind sie nicht eng verwandt. Die bekannten *Nitrobacter*-Arten werden in die Alpha-Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet; sie weisen hohe Ähnlichkeiten zu *Rhodopseudomonas palustris* auf (Seewaldt et al., 1982). Andere Gattungen werden in die Delta- und Gamma-Untergruppe eingeordnet (Teske et al., 1994). Mit der Ausnahme einiger *Nitrobacter*-Stämme sind die NO_2^- -Oxidierer obligat lithotroph und nutzen NO_2^- als einzige Energie-Quelle. Wenn *Nitrobacter*-Stämme heterotroph wachsen können, ist ihr Wachstum ineffizient und langsam (Bock, 1976). Unter anaeroben Bedingungen sind *Nitrobacter*-Zellen zudem in der Lage, durch Denitrifikation zu wachsen (Freitag et al., 1987; Bock et al., 1988). Die meisten NO_2^- -Oxidierer-Stämme wachsen am Besten bei NO_2^- -Konzentrationen von 2 - 30 mM, einem pH-Wert von

7,5 - 8,0 und Temperaturen zwischen 25 - 30°C (Watson et al., 1989). Die Verdopplungszeiten liegen zwischen 8 h und mehreren Tagen.

Die Oxidation von NO_2^- erfolgt über eine einstufige Reaktion ohne Zwischenprodukte. Das Enzym Nitrit-Oxidoreduktase oxidiert Nitrit zu Nitrat:



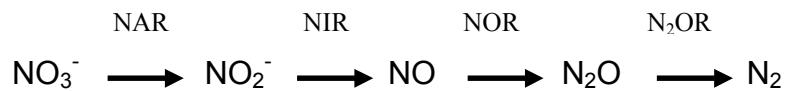
Bei dieser Reaktion stammt der übertragene Sauerstoff aus dem Wasser. Die Reaktion ist umkehrbar, so daß Nitrobacter-Zellen sowohl in der Lage sind NO_2^- zu oxidieren als auch NO_3^- zu reduzieren. Die Nitrit-Oxidoreduktase ist ein membran-gebundenes Protein, das Molybdän in Form von Molybdopterin und Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Die bei der NO_2^- -Oxidation freigesetzten Elektronen fließen über Molybdopterin und den Eisen-Schwefel-Cluster zu Cytochrom a_1 , wo sie auf Cytochrom c_1 550 und schließlich auf Cytochrom aa_3 übertragen werden. Diese Cytochrom c-Oxidase überträgt die Elektronen auf O_2 unter Bildung von Wasser. Die hierdurch gewonne Energie wird zur autotrophen CO_2 -Fixierung genutzt. Um 1 mol CO_2 zu assimilieren müssen dabei 85 - 115 mol NO_2^- oxidiert werden (Bömeke, 1954). Das Endprodukt der NO_2^- -Oxidation, NO_3^- , wirkt erst ab einer Konzentration von 30 bis 65 mM hemmend auf NO_2^- -Oxidierer.

3. Denitrifikanten

Unter Denitrifikation wird der bakterielle Atmungsprozeß verstanden bei dem Elektronen auf oxidierte Stickstoff-Verbindungen übertragen werden unter Bildung von NO, N_2O und N_2 . Die Fähigkeit zur Denitrifikation ist unter den Prokaryonten weit verbreitet. Sie findet sich in den verschiedensten Untergruppen der Proteobakterien, der Gram-positiven Bakterien sowie unter den Archaea. Bei den Archaea kommt die Denitrifikation in den halophilen und hyperthermophilen Zweigen vor. In neuerer Zeit wurden die Kernenzyme der Denitrifikation auch in den

Mitochondrien einiger Pilze gefunden (Kobayashi et al., 1996). Die am häufigsten in Böden gefundenen Denitrifizierer entstammen den Gattungen *Pseudomonas* und *Alcaligenes* (Gamble et al., 1977).

Die Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff erfolgt schrittweise durch die Enzyme Nitrat-Reduktase (NAR), Nitrit-Reduktase (NIR), Stickstoffmonooxid-Reduktase (NOR) und Distickstoffoxid-Reduktase (N₂OR):



Membrangebunden sind bei *Pseudomonas stutzeri* die Enzyme NAR und NOR, während NIR und N₂OR im periplasmatischen Raum vorliegen (Zumft, 1997). Da NO₃⁻ auf der cytoplasmatischen Seite reduziert wird, muß es durch die Membran transportiert werden. Dies geschieht möglicherweise durch einen NO₃⁻ / NO₂⁻ -Antiporter (Zumft, 1997). Abhängig von den Umweltbedingungen läuft die Reduktion von NO₃⁻ zu N₂ vollständig oder unter Anhäufung von Zwischenprodukten ab. Wenn NO₃⁻ im Überschuß vorliegt und H-Donatoren begrenzt sind, kann es zur Anhäufung von NO₂⁻, NO oder N₂O kommen.

4. Mikroelektroden

Ionen-selektive Mikroelektroden eignen sich in hervorragender Weise für kleinräumige Untersuchungen von mikrobiellen Prozessen im gefluteten Reisfeldboden *in situ*. Sie erlauben die potentiometrische Messung eines bestimmten Ions in Anwesenheit anderer Ionen. Ionen-selektive Mikroelektroden sind galvanische Halbzellen, die aus einem Elektrodenkörper, einer ionen-selektiven Membran an der Spitze des Elektrodenkörpers und einer Elektrolyt-Füll-Lösung oberhalb der Membran bestehen. Die andere Halbzelle wird durch eine Referenz-Elektrode gebildet. Der selektive Transport eines bestimmten Ions aus der Probenlösung durch die ionen-selektive Membran baut eine Potentialdifferenz zwischen der Elektrolyt-Füll-Lösung der ionen-selektiven-Mikroelektrode und der Proben-Lösung auf. In die Elektrolyt-

Füll-Lösung taucht ein chlorierter Silberdraht ein, der die Potentialänderung an ein Spannungs-Meßgerät weiterleitet. Die Selektivität der Mikroelektroden wird durch den Einsatz hoch spezifischer Carrier in den Elektroden-Membranen bedingt. Ionen-selektive Carrier sind für NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- bekannt (Umezawa, 1990; Daunert und Bachas, 1989; Stepanek et al., 1986) und im Handel erhältlich. Für NH_4^+ -selektive Membranen ist z.B. der Carrier Nonactin / Monactin gut geeignet (Abb. 5).

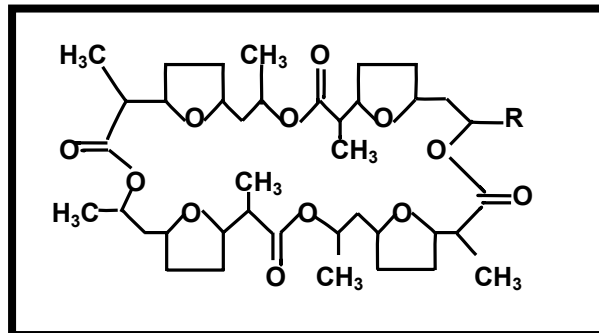


Abb. 5: Nonactin (R = CH_3) / Monactin (R = C_2H_5)

Das NH_4^+ -Ion fügt sich exakt in den Nonactin / Monactin-Ring ein, der durch die flüssige, lipophile Membran diffundieren kann und so den Transport des NH_4^+ -Ions ermöglicht. In herkömmlicher Bauweise werden ionen-selektive Mikroelektroden aus ausgezogenen Glaskapillaren hergestellt. Bei solchen Glasmikroelektroden handelt es sich um Einzelmikroelektroden.

5. Ziel der Arbeit

Während die Prozesse der Nitrifikation und Denitrifikation in der Oberflächenschicht des gefluteten Reisfeldbodens gut untersucht sind, ist nur wenig über diese Prozesse in der Reiserhizosphäre bekannt. Es liegen so gut wie keine Informationen über die kleinräumig wechselnden Umweltbedingungen im durchwurzelten Reisfeldboden vor. Gerade den wurzelassoziierten Nitrifikanten und den vermutlich eng mit ihnen verbundenen Denitrifikanten scheint eine Schlüsselrolle bei den Stickstoffverlusten im gefluteten Reisfeldboden zuzukommen. Dies zeigen makro-

skopische Untersuchungen wie z.B. N₂-Fluß-Experimente (Arth et al., 1998).

Um die Prozesse der Nitrifikation und der Denitrifikation in der komplexen Rhizosphäre räumlich hochauflösend zu lokalisieren, wurde die Entwicklung einer Mehrkanal-Mikroelektrode notwendig, die in der Lage ist, die wichtigsten Substrate und Produkte dieser Prozesse am gleichen Ort und zur gleichen Zeit zu messen. Diese Mikroelektroden müssen zudem eine hohe mechanische Stabilität gegenüber den Belastungen im durchwurzelt System aufweisen.

Der Aufklärung der Umweltbedingungen, denen die nitrifizierenden und denitrifizierenden Bakterien in der Reirhizosphäre unterworfen sind, sollten Profilmessungen mit Mehrkanal-Mikroelektroden in „feldnahen“ bepflanzten und unbepflanzten Mikrokosmen und in bepflanzten Kompartiment-Mikrokosmen dienen. In Kompartiment-Mikrokosmen sollte die Trennung von Rhizosphärenboden und wurzelunbeeinflusstem Boden erzwungen werden, um die abiotischen Faktoren der Nitrifikation und Denitrifikation in einer dichten Wurzelmatte besser untersuchen zu können. Die Profilmessungen sollten in Mikrokosmen mit unterschiedlichem Stickstoff-Status durchgeführt werden. Dazu sollten ungedüngte Ansätze sowie Ansätze mit Harnstoff- bzw. Diammoniumhydrogenphosphat-Zugabe verwendet werden. Auch die Art der Applikation des Stickstoff-Düngers sollte variiert werden durch Injektion in den Wurzelraum bzw. durch Zugabe in das Flutungswasser. Dies sollte die unterschiedlichen Feldbedingungen, wie Unterpflügen des Stickstoff-Düngers vor Flutung des Reisfeldes bzw. die Stickstoff-Zugabe im fortgeschrittenem Wachstumsstadium des Reises, simulieren. Neben den wichtigen N-haltigen Substraten und Produkten sollte auch O₂ im durchwurzelt Reirfeldboden mit Mikroelektroden gemessen werden. Das generelle Vorhandensein, die Konzentrationsverhältnisse und die räumliche Verteilung von O₂ in der Rhizosphäre könnten wichtige Informationen über Bedingungen zur Nitrifikation oder ihrer Limitierung geben.

Darüberhinaus sollten in Rhizotronen, in denen das Wachstum und die Entwicklung einzelner Reiszurzel visuell verfolgt werden kann, Profilmessungen der unterschiedlichen Stickstoff-Spezies in bestimmten Abständen von der Wurzeloberfläche durchgeführt werden. Diese Messungen sollten Aufschluß geben über Lokalisation und Ausdehnung der Nitrifikations- und Denitrifikations-Aktivitäten. Auch sollte untersucht werden, in wie weit die unterschiedlichen Wurzelentwicklungsstadien Einfluß auf die Nitrifikation und Denitrifikation haben.

Die Bestimmung der Populationsdichte der Schlüsselgruppen dieser Prozesse - den Ammonium- und Nitrit-Oxidierern - sollte die Bedeutung dieser Organismengruppen im Reisfeldboden zeigen.

C. Material und Methoden

1. Präparation der Mikrokosmen

In allen Experimenten wurde die Reisvarietät *Oryza sativa* L. Var. japonica Typ Roma verwendet. Das Saatgut stammte aus Vercelli (Oberitalien). Zur Keimung wurden Reiskörner auf feuchtem Fliespapier in Kristallisierschalen bei 25°C im Klimaraum für etwa zehn Tage inkubiert. Sobald die Reiskeimlinge eine Höhe von etwa 8 cm erreicht hatten, wurden sie in die Reisfeldboden-Mikrokosmen gepflanzt. Bei dem verwendeten Boden handelte es sich um Reisfeldboden aus Vercelli, der bereits einmal bepflanzt worden war. Die Bodenparameter sind von Schütz et al. (1989) eingehend beschrieben. Der luftgetrocknete Boden wurde mit einem Backenbrecher zerkleinert und auf eine Größe von ≤ 1 mm gesiebt. Der gesiebte Boden wurde im Gewichtsverhältnis 2:1 mit demineralisiertem Wasser aufgeschlämmt. In den Versuchen wurden drei Arten von Mikrokosmen verwendet:

(I) Mikrokosmen ohne Kompartimentierung bestanden aus Bechergläsern (Durchmesser: 8 cm) mit einem Volumen von 600 ml. Nach der Einwaage des aufgeschlämmten Reisfeldbodens (etwa 470 gTS-Reisfeldboden / Becherglas) wurde die Bodenoberfläche mit demineralisiertem Wasser etwa 2 - 5 cm überstaut und vier Tage bei 25°C vorinkubiert. Danach wurde pro Becherglas eine Reispflanze gesetzt. Die Bechergläser wurden an den Seiten mit Aluminiumfolie umwickelt, um ein Algenwachstum an der Glasinnenseite zu unterbinden. Im gesamten Versuchszeitraum war der Reisfeldboden in den Bechergläsern 2 bis 5 cm hoch mit demineralisiertem Wasser überschichtet. Bei Auftreten von Unkraut wurde dieses entfernt. Zur N-Düngung wurden jede Woche 5 ml einer 180 mM Harnstoff-Lösung (100 mg N pro Mikrokosmos) in die Wurzelzone injiziert. Die Injektion erfolgte in 5 vertikalen Linien, in denen jeweils 1 ml Harnstoff-Lösung über die gesamte Tiefe des Bodens injiziert wurde. Die Inkubation der Reismikrokosmen erfolgte im Gewächshaus bei 25°C unter einer Lichtbank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12

h bei einer photosynthetisch aktiven Beleuchtung von etwa $220\text{-}480 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Mikrovolt Integrator, Type MV2 und Quantum Sensor, Typ QS, Firma Delta-T Devices LTD, England).

(II) Mikrokosmen mit Kompartimentierung (Bodelier et al., 1997; Abb. 3) bestanden aus einem äußeren Edelstahlzylinder (Höhe 12 cm, Durchmesser 9 cm) und einem perforierten (1 mm Löcher), inneren Edelstahlzylinder (Höhe 12 cm, Durchmesser 4 cm). Der äußere Zylinder enthielt 580 g TG Reisfeldboden und der innere Zylinder 120 g TG Reisfeldboden. Der innere Zylinder wurde mit Nylongaze (30 μm mesh) überzogen, so daß eine räumliche Trennung zwischen Rhizosphärenboden und wurzelunbeeinflusstem Boden erreicht wurde. Eine Woche nach der Flutung wurde in jeden inneren Zylinder eine Reispflanze gesetzt. Die Mikrokosmen wurden bei 25°C in einer Phytokammer mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12 h bei einer photosynthetisch aktiven Beleuchtung von etwa $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ inkubiert. Unkraut wurde regelmäßig entfernt. Mikroelektroden-Profile wurden 7-9 Wochen nach dem Pflanzen der Reissetzlinge gemessen. Zur N-Düngung wurden jede zweite Woche je 10 ml einer 42 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - bzw. Harnstoff-Lösung in die Wurzel-Kompartimente injiziert.

(III) Rhizotron-Mikrokosmen: Eine Edelstahl-Platte trennte das Plexiglas-Rhizotron (22,0 cm x 8,0 cm x 4,0 cm) in ein kleines Kompartiment (19,5 cm x 8,0 cm x 0,8 cm) und ein großes Kompartiment (19,5 cm x 8,0 cm x 3,0 cm), in das eine 6-10 Wochen alte Reispflanze eingebettet wurde (Abb. 4). In das kleine Kompartiment wurde reduzierter, Harnstoffgedüngter (150 kg / ha) Reisfeldboden gefüllt und eine 1-3 cm lange, junge Wurzel von der Reispflanze des größeren Kompartimentes eingebettet. Danach wurden die Rhizotrone für mehrere Tage schräg in einem Wasserbad im Gewächshaus bei 25°C unter einer Lichtbank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12 h bei einer photosynthetisch aktiven Beleuchtung von etwa $220\text{-}480 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ inkubiert. Die eingebetteten Reisswurzeln wuchsen senkrecht nach unten und wurden durch die schräggestellte Plexiglaswand gezwungen, an ihr entlang zu

wachsen. Dadurch wurde es möglich, das Wurzelwachstum optisch zu verfolgen und durch kleine Bohrungen (1 mm Durchmesser) in der Seitenwand mit Mikroelektroden Profilmessungen in bestimmten Abständen von der Wurzeloberfläche durchzuführen.

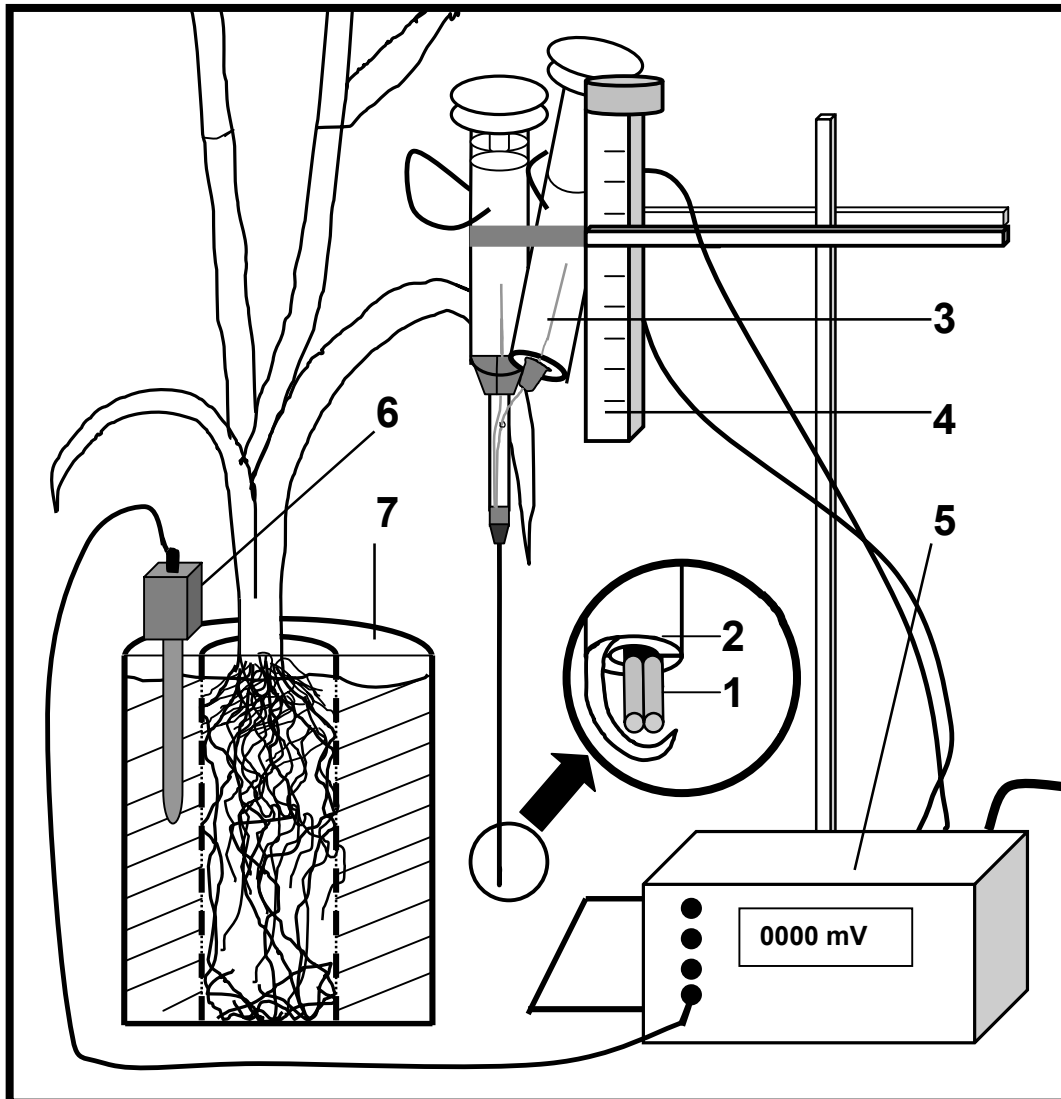


Abb. 3: Versuchsaufbau für Profilmessungen: Mehrkanal-

Mikroelektrode:(1) Fused silica-Grundkörper mit ionen-selektiven Membranen, (2) Stahlkapillare, (3) Reservoir für Elektrolyt; (4) Mikromanipulator; (5) Spannungsmessgerät; (6) Referenzelektrode; (7) Kompartiment-Mikrokosmos (Querschnitt).

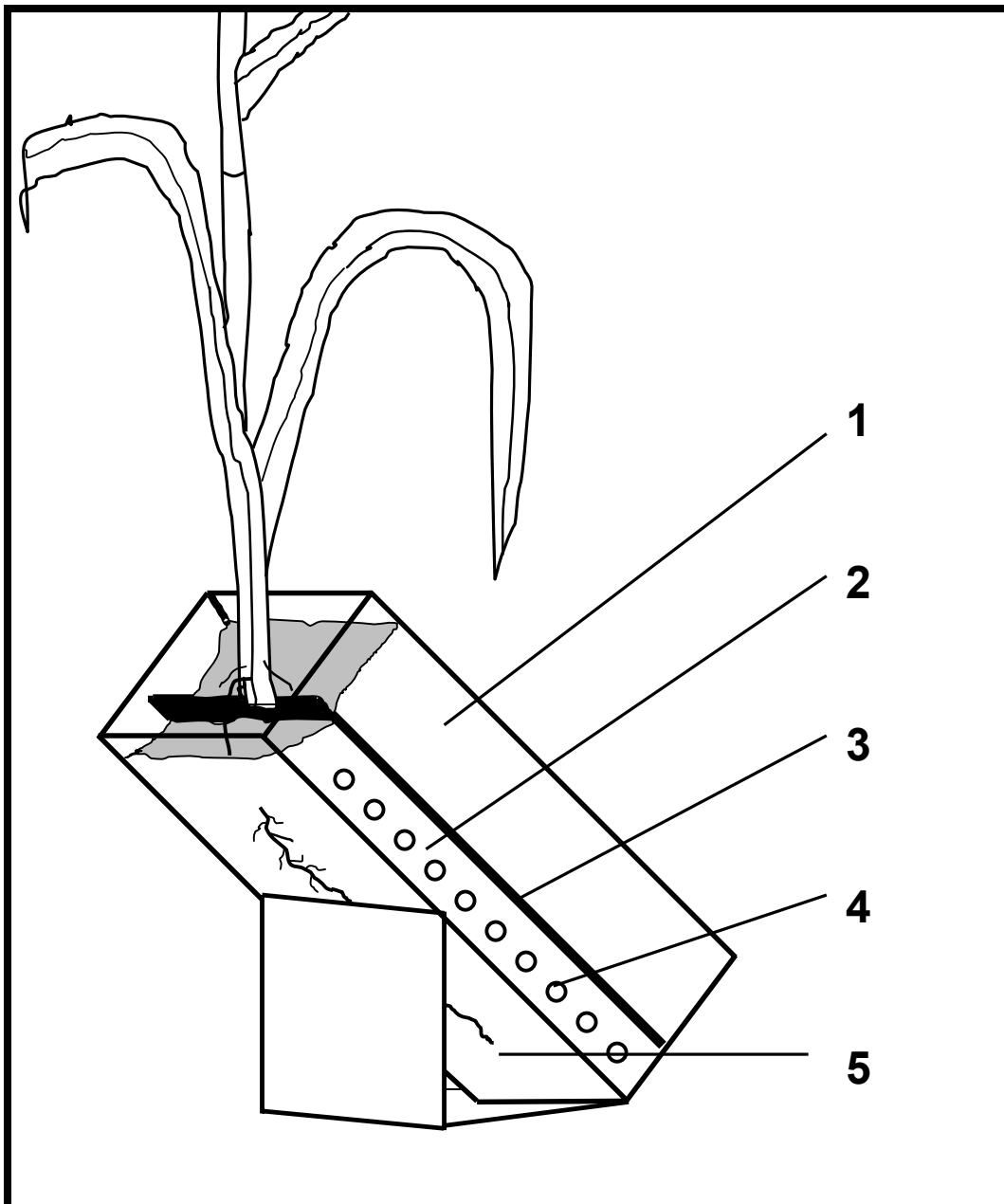


Abb. 4: Rhizotron-Mikrokosmos: (1) großes Kompartiment, (2) kleines Kompartiment, (3) Edelstahl-Platte, (4) Bohrungen für Elektroden-Messungen; (5) Reisswurzel (Einzelheiten im Text).

2. Mehrkanal-Mikroelektroden

2.1. Ionen-selektive Mikroelektroden

Ionen-selektive Mikroelektroden bestehen aus einem Elektrodenkörper, einer ionen-selektiven Membran in der Spitze des Elektrodenkörpers und

einer Elektrolyt-Füll-Lösung oberhalb der Membran. Durch den selektiven Transport eines bestimmten Ions aus der Probenlösung durch die ionen-selektive Membran wird eine Potentialdifferenz zwischen der Elektrolyt-Füll-Lösung der ionen-selektiven-Mikroelektrode und der Proben-Lösung aufgebaut. In die Elektrolyt-Füll-Lösung taucht ein chlorierter Silberdraht ein, der die Potentialänderung an ein Spannungs-Meßgerät weiterleitet.

Elektrodenkörper

Als Elektrodenkörper dienten fused-silica Kapillaren (FSK; ID 75 µm, AD 144 µm), die deaktiviert wurden mit 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyl-disilazan. Diese Kapillaren werden hauptsächlich in HPLC-Geräten verwendet. In der Verwendung als Elektroden-Grundkörper haben sie im Vergleich mit herkömmlichen Glaskapillaren den Vorteil der mechanischen Belastbarkeit, die eine Applikation in durchwurzelter Bodensystemen erst ermöglicht. Die FSK wurden in 8-12 cm lange Stücke geschnitten und mit Hilfe von Klebstoff in einer Kanülenhalterung fixiert. Damit war ein Elektroden-Grundkörper geschaffen, der leicht mit dem jeweiligen Elektrolyten und der ionen-selektiven Membran versehen werden konnte.

Ionen-selektive Membranen

Der für die Funktion einer Flüssig-Membran wichtigste Bestandteil ist das komplexierende Reagenz (Ligand), das für die Ionen-Selektivität der Membran verantwortlich ist. Den Hauptbestandteil der Flüssig-Membran bildet 2-Nitrophenyloctylether. PVC, das in Tetrahydrofuran gelöst wird, dient der Stabilisierung der Membran gegenüber mechanischer Beanspruchung. Mengenmäßig setzen sich die einzelnen Membranbestandteile wie folgt zusammen:

NH₄⁺-selektive Membranen (Bührer et al., 1988):

- | | | |
|--|-------|---------|
| • Nonactin/Monactin (Ligand) | 6,9 % | 13,8 mg |
| • Kalium-tetrakis(4-chlorophenyl)borat | 0,7 % | 1,4 mg |

- PVC 23,0 % 46,0 mg
- 2-Nitrophenyloctylether 69,4 % 138,8 mg

NO₂⁻-selektive Membranen (de Beer et al., 1997):

- Nitrit-Ionophor I (Ligand) 1,0 % 2,0 mg
- PVC 23,0 % 46,0 mg
- 2-Nitrophenyloctylether 76,0 % 152,0 mg

NO₃⁻-selektive Membranen (Miller und Zhen, 1991)

- Tridodecylmethylammoniumnitrat (Ligand) 6,0 % 12,0 mg
- PVC 23,0 % 46,0 mg
- 2-Nitrophenyloctylether 71,0 % 142,0 mg

Die Membranbestandteile wurden in 0,8 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit dem 2-Nitrophenyloctylether-Anteil gemischt. Alle für die Herstellung von Flüssig-Membranen verwendete Reagenzien stammten von Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz. Die Membranlösungen wurden bei 8°C im Kühlschrank gelagert.

Elektrolyte für ionen-selektive Mikroelektroden

Elektrolyt für NH₄⁺-selektive Mikroelektroden (Bührer et al., 1988)

- 0,010 M NH₄Cl

Elektrolyt für NO₂⁻-selektive Mikroelektroden (Schulthess et al., 1985):

- 0,010 M NaNO₂
- 0,010 M NaCl

Elektrolyt für NO₃⁻-selektive Mikroelektroden (Miller und Zhen, 1991):

- 0,10 M NaNO₃
- 0,10 M NaCl

Anfertigung von Mehrkanal-Mikroelektroden

Die FSK-Grundkörper wurden durch Aufstecken der Grundkörperhalterung auf 1 ml Plastikspritzen mit dem jeweiligen Elektrolyten befüllt. Dabei wurde darauf geachtet, Blasenbildung in der Kapillare zu vermeiden und die Kapillaren bis zu ihrer Spitze zu füllen. Eine kleine Menge der jeweiligen Membranlösung wurde in größere Glaskapillaren (ID 1 mm) gefüllt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die FSK-Spitzen in die Membranlösungen getaucht. Mit Hilfe des Spritzenkolbens wurde vorsichtig Membranlösung in die Spitze der FSK gezogen, bis eine Schichtdicke von 300-400 μm erreicht wurde. Alle Befüllungsarbeiten wurden unter einem Binokular (Typ M3C, Wild, Heerbrugg, Schweiz) bei 40-facher Vergrößerung ausgeführt. Zur Ableitung wurden chlorierte Silberdrähte (0,1 mm Durchmesser) benutzt, die an ein Kabel gelötet wurden. Durch ein in die Plastikspritze gebohrtes Loch wurden die Silberdrähte in den Elektrolyt getaucht und die Ableitungskabel an der Spritze mit Klebestreifen fixiert. Die Plastikspritzen dienten zudem als Reservoir für den jeweiligen Elektrolyten.

Bevor die Kapillaren zu einer Mehrkanal-Mikroelektrode verbunden wurden, wurden sie einzeln auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft. Die Kapillaren wurden zusammengeklebt und in Stahlnadeln (AD 1 mm) fixiert, um ihre mechanische Belastbarkeit zu erhöhen.

Meßaufbau

Der Meßaufbau ist in Abb. 3 dargestellt. Als Referenz-Elektrode diente eine ORION Reservoir Reference Electrode, Modell 90-04 (Orion Research Incorporated Laboratory Products Group, Boston, U.S.A.). Zur Messung von Membran-Potentialänderungen der Mikroelektroden diente ein Digitalmultimeter mit Scanner (DMM 199, Keithley, Cleveland, U.S.A.) in Verbindung mit einem Signalverstärker (10-fach). Die Mehrkanal-Mikroelektroden wurden in einen mechanischen Mikromanipulator montiert. In den bepflanzten Reismikrokosmen wurden die vertikalen

Profile in eine Distanz von etwa 2 cm von dem Sproß der Reispflanze durchgeführt.

Mehrkanal-Mikroelektroden wurden in Eichlösungen, die Konzentrationen von 10^{-2} mM bis 10^{-5} mM der zu messenden Ionen enthielten, geeicht.

2.2 Ionenchromatographische Bestimmung von Alkali- und Erdalkali-Metallen

Zur Bestimmung der Ionenstärke und der Konzentration von interferierenden Kationen (z. B. K^+ bei NH_4^+ -selektiven Mikroelektroden) wurden Porenwasser-Proben des gefluteten Reisfeldbodens mit einem Ionenchromatographen (Sykam, Gilching, Deutschland) untersucht.

Der Ionenchromatograph bestand aus einer HPLC-Pumpe (Sykam Solvent Delivery System S 1000), einem Säulenofen (Sykam Column Heating Modul S 3111) und einem Leitfähigkeitsdetektor (Sykam Conductivity Detector S 3110). In den Säulenofen wurde eine Kationentrennsäule Super Sep (4,6 x 125 mm Stahlsäule), gefüllt mit Kationenaustauscher auf der Basis von modifiziertem Silica, Partikelgröße 5 μ m; zur Bestimmung von Alkali- und Erdalkali-Metallen, eingebaut. Der Trennsäule wurde eine Vorsäule (4,6 x 10 mm Kartusche), gefüllt mit dem gleichen Material wie die Kationentrennsäule, vorgeschaltet, um Verunreinigungen der Trennsäule vorzubeugen.

Die Messungen von Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} in dem Filtrat (0,2 μ m Cellulose-Acetat Membranfilter; Sartorius) aus geflutetem Reisfeldboden wurden bei einem Durchfluß von 1,0 ml / min, einer Säulenofentemperatur von 40°C und einem Meßbereich von 10 μ S im Reverse Mode durchgeführt. Der Eluent bestand aus 0,61 mM Ascorbinsäure und 3,27 mM Oxalsäure.

2.3 Berechnung von NO₃⁻-Produktions- und Verbrauchsrate in der Rhizosphäre von Einzelwurzeln

Netto „flows“, d.h. die Stoffmenge pro Strecke und Zeit ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), wurden berechnet unter Benutzung der zylindrischen Version des 1. Fickschen Gesetzes der Diffusion (Henriksen et al., 1992):

$$F(r) = -2 \pi r \phi D_s (\Delta C(r) / \ln r_2/r_1)$$

r: Radius der Reisswurzel (0,5 mm)

ϕ : Porosität des Reisfeldbodens (0,8 ; Bosse et al., 1993)

D_s: Sedimentkoeffizient, berechnet aus dem molekularen Diffusionskoeffizienten in Wasser bei Inkubationstemperatur (D) und der empirischen Gleichung $D_s = D \times \phi^2$ (Lerman, 1979) (molekulare Diffusionskoeffizienten in Wasser bei 25 °C: für NH₄⁺ $1,98 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$ und für NO₃⁻ : $1,90 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$; Hui Li und Gregory, 1974)

($\Delta C(r) / \ln r_2/r_1$): gemessener Konzentrationsgradient (Henriksen et al., 1992)

Der „flow“ kann in einen „flux“, d.h. die Stoffmenge pro Fläche und Zeit ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), durch folgende Gleichung konvertiert werden:

$$J(r) = F(r) / 2 \pi r$$

Die Nettoaktivitäten wurden aus der 1. Ableitung des Netto „flux“ berechnet:

$$A(r) = (\Delta J(r) / \Delta r)$$

Positive Nettoaktivitäten sind Produktionsraten und negative Nettoaktivitäten sind Verbrauchsrate.

2.4 Bestimmung der Perkolation

In den Mikrokosmen wurde die Evapotranspiration als Gewichtsabnahme gemessen. Zur Berechnung der Transpiration der Reispflanze wurde sie um den Evaporationswert der Wasseroberfläche korrigiert. Der Evaporationswert der Wasseroberfläche wurde mit Mikrokosmen, deren Reispflanzen unterhalb der Wasseroberfläche gekappt waren, bestimmt. Da die transpirierte Wassermenge durch die Wurzeln aufgenommen worden war, ist sie äquivalent zu der Wassermenge, die in den Boden gesogen wurde.

3. Sauerstoff-Mikroelektroden

Zur Messung von Sauerstoff-Profilen wurden Sauerstoff-Mikroelektroden des Clark-Typs (Revsbech, 1989) mit einem Spitzendurchmesser von 10 bis 100 µm verwendet. Bezogen wurden diese Elektroden von der Firma MasCom (Bremen).

4. Most Probable Number-Bestimmung von Nitrifizierern

4.1 Zellzahlbestimmung von Nitrifikanten an der Reishizoplane

Für die Nitrifikanten-Zählungen wurden Wurzeln acht Wochen alter Reispflanzen benutzt. Die Wurzeln wurden durch vorsichtiges Spülen mit Leitungswasser von anhaftendem Boden befreit und in etwa 2 cm lange Stücke geschnitten. Diese wurden durchmisch, um eine möglichst homogene Verteilung der einzelnen Wurzelabschnitte zu erzielen. Jeweils 5 g FG Reispflanzen, 50 g sterile Glasperlen (\varnothing 1 mm) und 50 ml der jeweiligen Medien wurden in sterile 300 ml Erlenmeyer-Kolben eingewogen. Die Erlenmeyer-Kolben wurden bei 25°C im Dunkeln auf einem Horizontal-Schüttler bei 200 rpm für 2 h inkubiert, um die Nitrifikanten von der Wurzel abzulösen (Bosse und Frenzel, 1997).

Aus den inkubierten Ansätzen wurden mit Hilfe einer Achtkanalpipette (Dynatech, Denkendorf) jeweils 100 µl in die erste Reihe einer Mikrotiterplatte, Multiple Well Plate 96-Well (Sarstedt, Newton, U.S.A.), gegeben. Jede Vertiefung (8 Vertiefungen pro Reihe und 12 Reihen pro Platte) wurde mit 100 µl Medium beladen und die Ausgangssuspension über 3 Platten in 1:2 Verdünnungsschritten ausverdünnt (Gesamtverdünnung $6,78 \cdot 10^{10}$). Als Kontrolle diente eine Reihe pro Platte, die nur Medium enthielt.

Um die Ansätze während der mehrwöchigen Inkubationszeiten vor Austrocknung zu schützen, wurden die Mikrotiterplatten in verschließbaren PVC-Kisten mit ausreichender Wassermenge zur Feuchteregulation gelagert.

Die Auswertung erfolgte nach den jeweiligen Inkubationszeiten mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes E max (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, U.S.A.). Der Umschlag des pH-Indikators Phenolrot von rotviolett (pH 8, Absorptionsmaximum bei 557-560 nm) zu bräunlichgelb (pH 6,5, Absorptionsmaximum bei 430-435 nm) wurde unter Verwendung eines 430 nm Filters bestimmt. Der Nachweis von NO_2^- erfolgte mit Hilfe eines 490 nm Filters.

Aus der Zahlenkombination, die sich aus dem Muster bewachsener und unbewachsener Vertiefungen ergab, wurde die wahrscheinlichste Zellzahl berechnet (Rowe et al., 1977). Um zu testen, ob zwei ermittelte Werte signifikant verschieden waren, wurde der t-Wert nach Cochran (1950) berechnet:

$$t = \frac{\log d_1 - \log d_2}{0,55 \times \sqrt{\log \frac{a_1}{n_1} \log \frac{a_2}{n_2}}}$$

$d_{1,2}$: ermittelte Zellzahlen

$a_{1,2}$: Verdünnungsstufen (2)

$n_{1,2}$: Anzahl der Parallelen pro Verdünnungsstufe (7)

Dieser Wert wurde verglichen mit dem tabellierten t-Wert für einen zweiseitigen Test bei 12 Freiheitsgraden ($n_1 + n_2 - 2 = 12$) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Sachs, Angewandte Statistik).

Ammonium-Oxidierer

Die Zählungen der Ammonium-Oxidierer wurden mit drei verschiedenen Medien durchgeführt (Watson, 1971; Soriano und Walker, 1968; Krümmel und Harms, 1982), da unterschiedliche NH_4^+ -Oxidierer-Medien zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Bestimmung der Zellzahlen von NH_4^+ -Oxidierern führen können (Belser, 1979).

Den Medien wurden jeweils 0,1ml einer 0,5 % Phenolrot-Lösung pro 1000 ml zugesetzt, um eine Ansäuerung der Medien durch NH_4^+ -Oxidation nachzuweisen. Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt und die Mikrotiterplatten im Dunkeln bei 30°C inkubiert, da dies den Wachstumsoptima der meisten NH_4^+ -Oxidierern entspricht (Watson et al., 1988). Die Inkubationsdauer betrug 16 Wochen, da ausgeschlossen werden sollte, daß durch eine zu kurze Inkubationszeit die Zellzahlen unterschätzt würden.

Nitrit-Oxidierer

Die Zählung der Nitrit-Oxidierer wurde unter Verwendung eines Nitrit-Mineralsalz-Mediums (Laanbroek und Schotman, 1991) durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene NO_2^- -Konzentrationen (5,0 mM und 0,05 mM) eingesetzt, da unterschiedliche NO_2^- -Konzentrationen zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der NO_2^- -Oxidierer-Zellzahl-Bestimmung führen können (Both et al., 1990).

Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt und die Mikrotiterplatten im Dunkeln bei 30°C inkubiert, da dies den Wachstumsoptima der meisten NO_2^- -Oxidierern entspricht.

4.2 Zellzahlbestimmung von Nitrifikanten in Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden

Für die Nitrifikanten-Zählungen im Reisfeldboden wurden jeweils 50 g FG Boden aus dem Wurzel-Kompartiment und dem Nichtwurzel-Kompartiment entnommen und in einem 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml der jeweiligen Medien aufgeschlämmt. Der Erlenmeyer-Kolben wurde bei 25 °C im Dunkeln auf einem Horizontal-Schüttler bei 200 rpm für 2 h inkubiert, um die Nitrifikanten von den Bodenpartikeln abzulösen.

Die Zählung der Ammonium-Oxidierer wurde mit dem Medium von Watson (1971) durchgeführt, da unterschiedliche Medien in den obigen Versuchen zu vergleichbaren Zellzahlen geführt hatten (Tab. 1). Die Zählung der Nitrit-Oxidierer wurde mit dem Medium von Laanbroek und Schotman (1991) durchgeführt. Die oben beschriebenen Parameter wurden beibehalten.

Anstelle der oben beschriebenen Mikrotiterplatten wurden Multiple Well Plate 24-Well (Sarstedt, Newton, U.S.A) mit 4 Vertiefungen pro Reihe und 6 Reihen pro Platte verwendet. Mit Hilfe einer 1 ml Pipette wurden 0,8 ml aus den vorinkubierten Ansätzen in 1:3,5 Verdünnungsschritten über jeweils 3 Platten mit vorgelegten 2 ml Medium in jeder Vertiefung ausverdünnt (Gesamtverdünnung $6,2 \cdot 10^9$). Die Auswertung erfolgte nach den jeweiligen Inkubationszeiten wie oben beschrieben.

Aus den Zellzahlen der Verdünnungsreihen der Parallelen ($n = 4$) wurde das geometrische Mittel bestimmt. Um zu testen, ob zwei ermittelte Werte signifikant verschieden waren, wurde nach Cochran (1950) der t-Wert berechnet (siehe oben). Dieser Wert wurde verglichen mit dem tabellierten t-Wert für einen zweiseitigen Test bei 6 Freiheitsgraden ($n_1 + n_2 - 2 = 6$) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Sachs, Angewandte Statistik).

D. Ergebnisse

1. Eigenschaften der Mehrkanal-Mikroelektroden und der Einfluß von Störionen

Die untere Konzentrationsgrenze bis zu der die Mikroelektroden eine log-lineare Antwort zeigten, lag bei bis hinunter zu Konzentrationen von 10 μM für NH_4^+ - und NO_2^- -Elektroden und bei 50 μM für NO_3^- -Elektroden. Die Signaldrift lag unter $3 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Antwortzeit, d.h. die Zeit bis zu der bei einer dekadischen Konzentrationsänderung 90 % des Endwertes erreicht wurde, lag zwischen 40 und 90 s. Die Länge der Antwortzeit war abhängig von der Schichtdicke der Ionen-selektiven Membran. Je dünner die Membranschicht desto kürzer war die Antwortzeit. Allerdings war die Stabilität der Membran gegenüber mechanischen Belastungen desto höher, je dicker die Membranschicht war. Die Versuchsbedingungen in einem durchwurzelten Bodensystem machten eine hohe Belastbarkeit unabdingbar, so daß eine Schichtdicke von 300 - 400 μm auf Kosten einer schnelleren Antwortzeit gewählt wurde.

Porenwasseranalysen frisch aufgeschlammten Reisfeldbodens ergaben folgende Konzentrationen möglicherweise mit Ionen-selektiven Membranen interferierender Ionen: 0,21 mM Na^+ , 0,43 mM K^+ , 1,30 mM Ca^{2+} , 4,00 mM Mg^{2+} und 0,20 mM Cl^- . Nach dem Fluten des Reisfeldbodens sinken die NO_3^- -Konzentrationen schnell unter vernachlässigbare Werte. Aus der obigen Ionenbilanz konnte eine Konzentration für HCO_3^- von etwa 11 mM berechnet werden. In Reismikrokosmen mit 8 Wochen alten Reispflanzen fielen die apparenten NH_4^+ - und NO_2^- -Konzentrationen jedoch gegen Null (Abb. 8 A-D, 9, 10 A-B, 11). Dies zeigt, daß die interferierenden Ionen in großem Umfang von den Reispflanzen assimiliert wurden. Im Gegensatz dazu wurde eine anhaltende Interferenz mit der NO_3^- -Elektrode beobachtet (Abb. 9). In diesem Mikrokosmos ohne NH_4^+ ist keine Nitrifikation möglich, daher beruhte das Signal der NO_3^- -Elektrode wahrscheinlich auf der Interferenz mit HCO_3^- . Bei einer HCO_3^- -Konzentration von 11 mM und eine 160-fachen höheren Selektivität für

NO_3^- als für HCO_3^- (Miller und Zhen, 1991) ergibt sich eine apparente NO_3^- -Konzentration von $70 \mu\text{M}$. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Abbildung 9.

2. Profilmessungen in Reismikrokosmen

2.1 Unbepflanzte, ungedüngte Reismikrokosmen

Aus dem NH_4^+ -Profil in Abb 6. kann auf eine NH_4^+ -Quelle in einer Tiefe $> 4 \text{ mm}$ des Mikrokosmos geschlossen werden. NH_4^+ diffundierte in die Oberflächenschicht, wo es in einer Tiefe von $0,5 - 1,0 \text{ mm}$ verbraucht wurde. Die höchsten NO_3^- -Konzentrationen wurden in einer Tiefe von $1,0 \text{ mm}$ (Abb. 7) gemessen. Die O_2 -Konzentrationen (nicht dargestellt) in der Oberflächenschicht betragen zwischen 140 und $190 \mu\text{M}$ (abhängig von Algenbewuchs und Beleuchtungstärke) und strebte in einer Tiefe von ungefähr $1,2 \text{ mm}$ gegen Null. Diese Profile zeigten, daß in unbepflanztem, ungedüngtem Reisfeldboden eine oxisch-anoxische Grenzfläche mit Nitrifikation oberhalb und Denitrifikation unterhalb der Grenzfläche in einer Tiefe von ungefähr $1,0 \text{ mm}$ vorkommt.

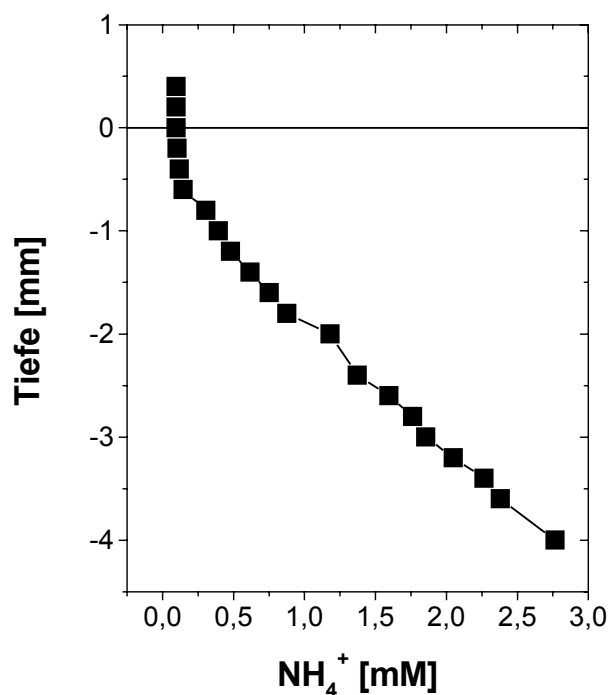


Abb. 6: NH_4^+ -Profil, gemessen in einem ungedüngten, unbepflanzten Mikrokosmos.

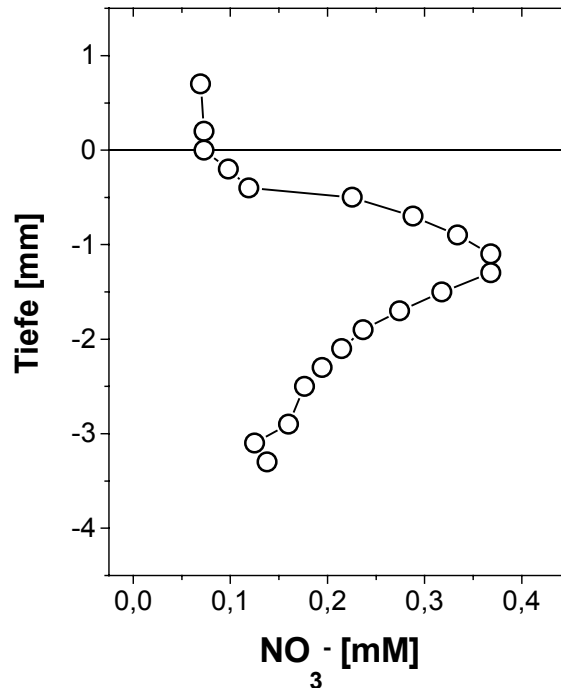


Abb. 7: NO₃⁻-Profil, gemessen in einem unbepflanzten, ungedüngten Mikrokosmos.

2.2 Bepflanzte Reismikrokosmen mit Harnstoff-Düngung im Flutungswasser

Unter Feldbedingungen werden die Reispflanzen in der späten vegetativen Phase durch die Zugabe von Harnstoff in das Flutungswasser (top-dressing) gedüngt. Dies wurde durch die Zugabe von Harnstoff (150 kg/ha) in das Flutungswasser von ungedüngten Reismikrokosmen ohne Kompartimentierung mit 8 Wochen alten Reispflanzen simuliert. Achtzehn Stunden nach der Harnstoffzugabe betrug die NH₄⁺-Konzentration an der Oberfläche 2 mM und stieg bis zu einer Tiefe von 8,0 mm auf einen Wert von 12 mM an (Abb. 8 A). Danach fiel die NH₄⁺-Konzentration bis zu einer Tiefe von 18 mm auf einen Wert von 3,5 mM ab. NO₂⁻-Bildung kam sowohl an der Oberfläche als auch in einer Tiefe zwischen 4 mm und 10 mm vor. Dagegen kam eine NO₃⁻-Bildung nur in der Zone zwischen 4 und 12 mm vor.

Zweiundvierzig Stunden nach der Harnstoffzugabe stieg die NH_4^+ -Konzentration bis zu 12 mM in einer Tiefe von 12 mm an (Abb. 8 B). In einer Zone zwischen 12 mm und 25 mm schwankte die NH_4^+ -Konzentration zwischen 10 und 12 mM. Danach nahm die NH_4^+ -Konzentration ab bis unter 4 mM in einer Tiefe von 37 mm. Die NO_2^- -Konzentration betrug von der Oberfläche bis in 12 mm Tiefe etwa 2,8 mM. Hohe NO_3^- -Konzentrationen kamen von der Oberfläche bis in 25 mm Tiefe vor, mit einem Maximum in etwa 6 mm Tiefe (3,5 mM). Nachdem die Mikroprofile gemessen worden waren, wurde die Perkolation in zwei Mikrokosmen bestimmt. Die Lage der NH_4^+ -Maxima 18 h und 42 h nach der Düngung korrespondierten gut mit den jeweiligen Tiefen von 16 und 32 mm, die mit den jeweiligen Perkulationsraten von 0,90 und 0,55 $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ erreicht werden konnten.

In einem Mikrokosmos wurde die Reispflanze vor der Düngung unterhalb der Wasseroberfläche gekappt. Die 41 h nach der Düngung gemessenen Mikroprofile zeigten an der Oberfläche ungefähr gleich hohe NH_4^+ -Konzentrationen wie diejenigen mit intakten Reispflanzen (Abb. 8 A und C). Mit zunehmender Tiefe nahm die NH_4^+ -Konzentration jedoch bis auf Werte unter 0,5 mM in einer Tiefe von 20 mm ab. NO_3^- wurde nur in der millimeter-dicken Oberflächenschicht detektiert. Dies zeigte eine Nitrifikationsaktivität in der Oberflächenschicht an. Keinerlei oxidierte N-Spezies traten in tieferen Bodenschichten auf.

In den Mikrokosmen mit intakten Reispflanzen hatte sich nach einem Monat ein Gleichgewicht eingestellt (Abb. 8 D). Von der Oberfläche bis zu einer Tiefe von 5 mm nahm die NH_4^+ -Konzentration von 0,9 mM auf über 1,3 mM zu. Im Bereich von 6 mm bis 13 mm blieb die NH_4^+ -Konzentration konstant, um danach bis in eine Tiefe von 30 mm auf einen Wert unter 0,6 mM zu fallen. Eine vergleichsweise geringe NO_2^- -Konzentration von unter 0,4 mM wurde an der Oberfläche gemessen, die bis in 10 mm Tiefe auf Null zurückging. Die NO_3^- -Konzentration an der Oberfläche war mit 0,9 mM mehr als doppelt so hoch als die NO_2^- -Konzentration. Bis in eine Tiefe von 12 mm ging die NO_3^- -Konzentration auf Null zurück.

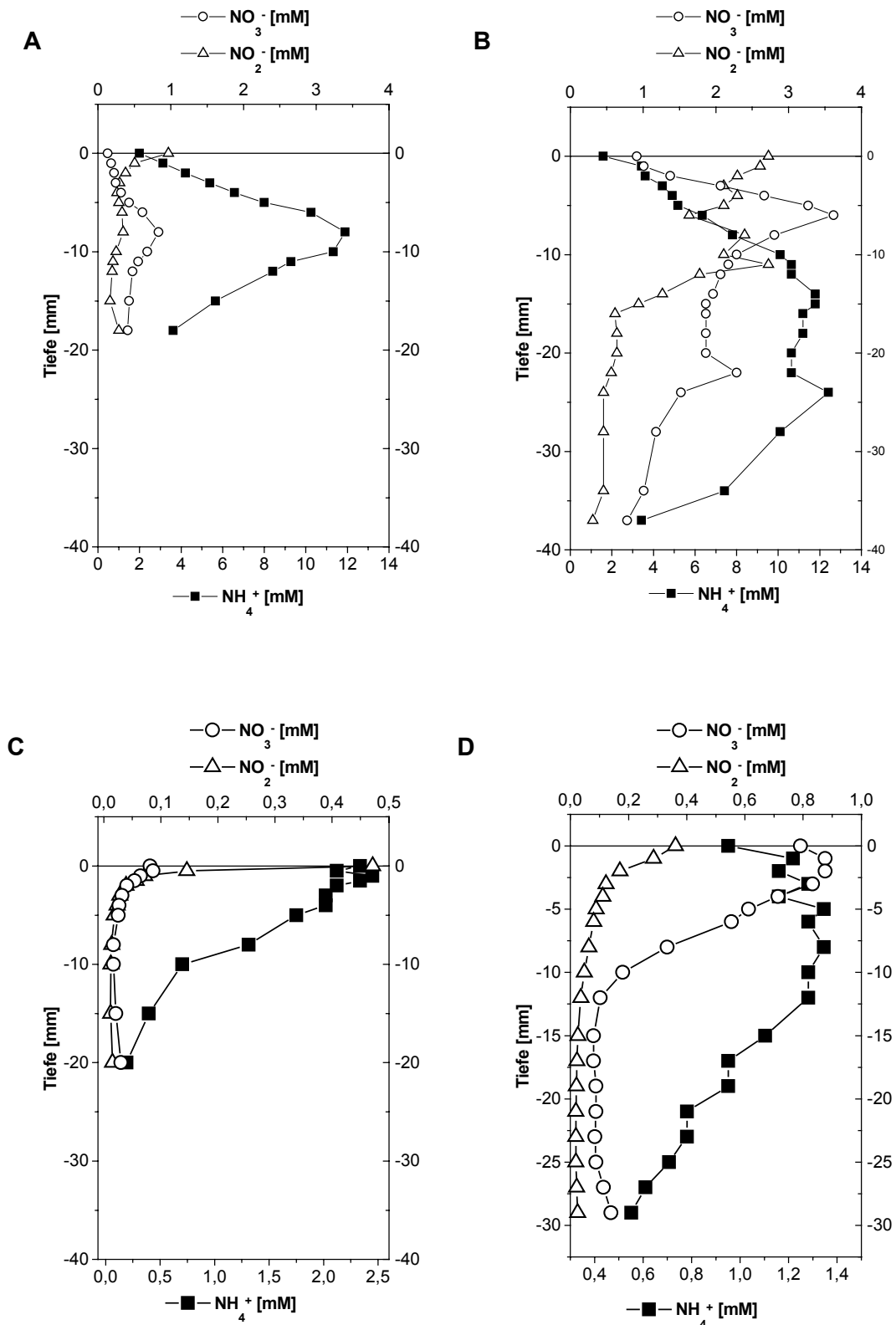


Abb. 8: NH_4^+ -, NO_2^- - und NO_3^- -Profile, gemessen in einem bepflanzten Mikrokosmos, der durch Harnstoffzugabe ins Flutungswasser gedüngt wurde. Die Skalierung ist in A und B gleich, aber unterschiedlich in C und D. **(A)** 18 h nach Düngung. **(B)** 42 h nach Düngung. **(C)** 41 h nach Düngung, aber mit unter der Wasseroberfläche gekappten Reispflanzen, so daß die pflanzenbedingte Perkolation unterbunden wurde. **(D)** Ein Monat nach der Düngung (mit intakter Reispflanze).

2.3 Kompartiment-Mikrokosmen

In ungedüngten Mikrokosmen konnten 7 Wochen nach der Pflanzung weder NH_4^+ noch NO_3^- in dem durchwurzelten Boden nachgewiesen werden (Abb. 9). Der geringe Konzentrations-Anstieg mit zunehmender Tiefe in dem NO_3^- -Profil ist ein Artefakt, das wahrscheinlich durch interferierende Ionen wie HCO_3^- verursacht wurde (siehe oben).

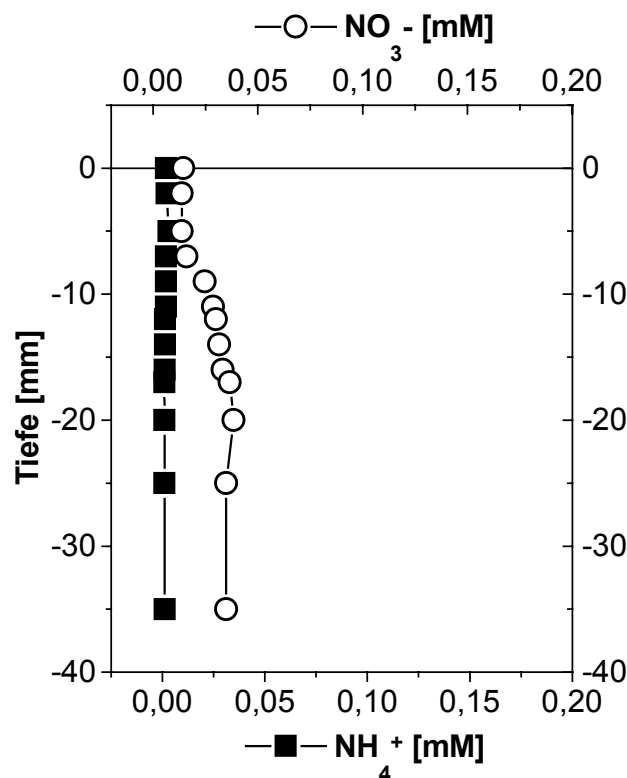


Abb. 9: NH_4^+ - und NO_3^- -Profile, gemessen in einem bepflanzten, ungedüngten Mikrokosmos.

Abbildung 10 A zeigt die NH_4^+ - und NO_3^- -Profile eines Mikrokosmos 9 Wochen nach der Bepflanzung und 6 h nach der $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Injektion. Höhere NO_3^- -Konzentrationen wurden in der Oberflächenschicht und in einer Tiefe von 22 mm gemessen. Die NO_3^- -Profile desselben Mikrokosmos 2 Tage nach der $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Injektion zeigten ebenfalls einen Anstieg der NO_3^- -Konzentration in der Oberflächenschicht und in einer tiefer gelegenen Schicht (27 mm) (Abb. 10 B). Die Verteilung von NH_4^+ variierte ebenfalls, was wahrscheinlich auf die inhomogene Verteilung des

Düngers bei der Injektion und die unterschiedliche NH_4^+ -Aufnahme durch die Wurzeln zurückzuführen war (Abb. 10 A/B).

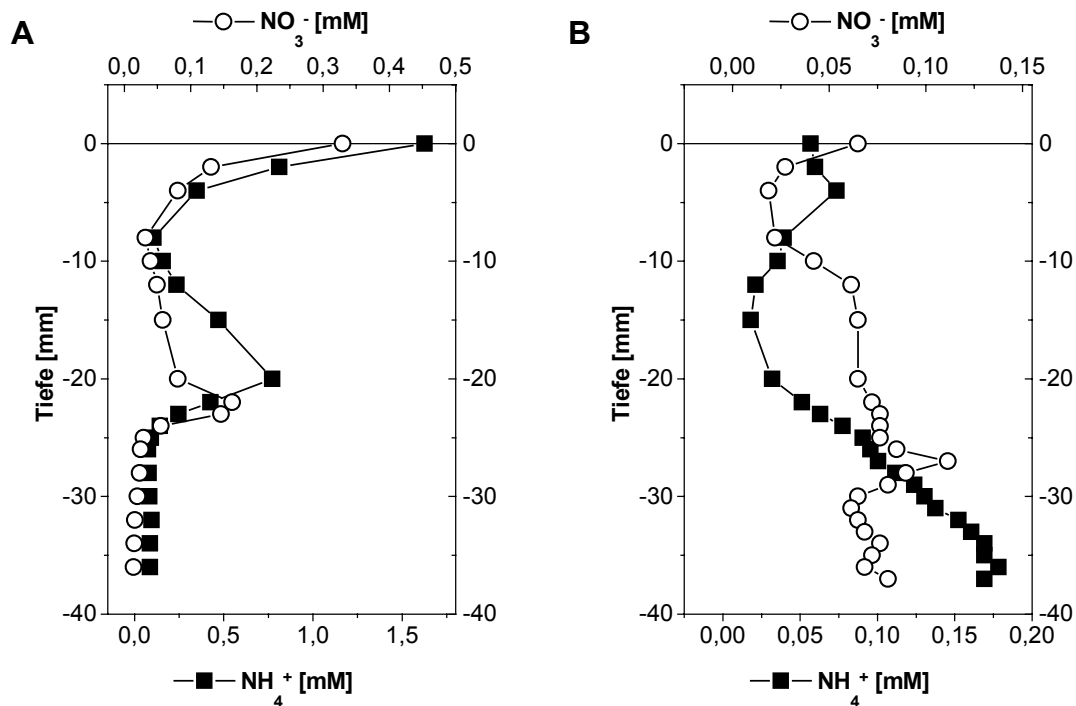


Abb. 10: NH_4^+ - und NO_3^- -Profile, gemessen in dem Wurzel-Kompartiment eines be-pflanzten Mikrokosmos, der durch die Injektion von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ gedüngt wurde. (A) 6 h nach Düngung. (B) 2 d nach Düngung.

Die Injektion von Harnstoff führte zu vergleichbaren Profilen (Abb. 11). In diesem Experiment konnte zum ersten Mal eine funktionierende NO_2^- -Mikroelektrode mit NH_4^+ - und NO_3^- -Mikroelektroden kombiniert werden. Die NH_4^+ - und NO_3^- -Profile des be-pflanzten Kompartiment Mikrokosmos 6 h nach der Harnstoff-Injektion korrespondierten mit den Profilen des be-pflanzten Kompartiment-Mikrokosmos 6 h nach $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Injektion. In der Oberflächenschicht wurde eine hohe NO_2^- -Konzentration gemessen, während unterhalb von 5 mm kein NO_2^- nachgewiesen werden konnte.

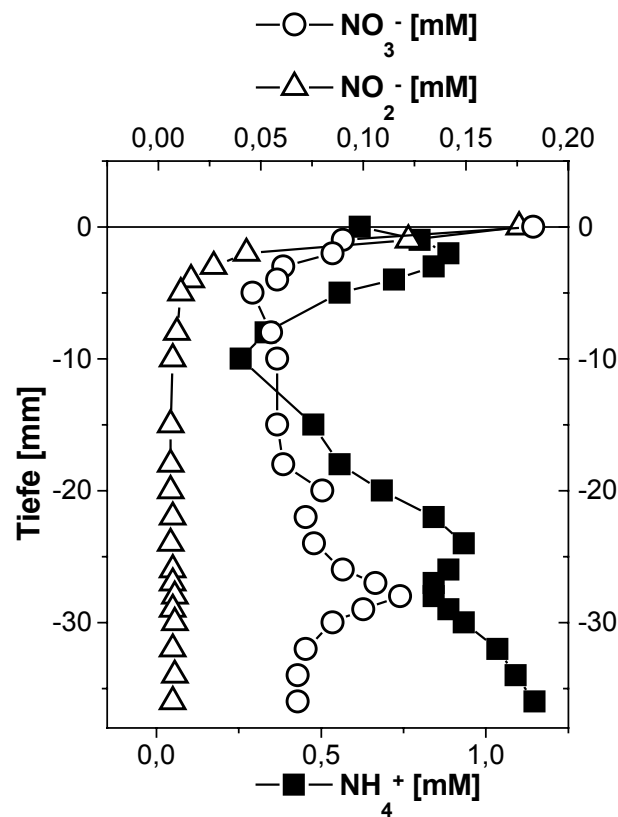


Abb. 11: NH_4^+ -, NO_2^- - und NO_3^- -Profile, gemessen in dem Wurzel-Kompartiment eines Mikrokosmos, der durch Harnstoff-Injektion gedüngt wurde (6 h nach Düngung).

Ein typisches O_2 -Profil eines N-gedüngten Mikrokosmos ist in Abb. 12 A dargestellt. Die O_2 -Konzentration fiel von 180 μM an der Oberfläche bis auf Null in einer Tiefe von etwa 2,0 mm. Zwischen 15 und 25 mm Tiefe konnte jedoch ein O_2 -Konzentrations-Anstieg bis zu einem Wert von 70 μM festgestellt werden. Die Zusammenfassung von 14 O_2 -Profilen (Abb. 12 B; 522 Meßpunkte) zeigt übereinstimmend, daß in einer Tiefe zwischen 12 mm und 25 mm eine höhere O_2 -Konzentration auftrat. Tiefe und räumliche Ausdehnung des O_2 -enthaltenden Gebietes deckt sich mit der Tiefe und der räumlichen Ausdehnung der NO_3^- -Bildungszonen (Abb. 10 A/B, 11) in gedüngten Reismikrokosmen.

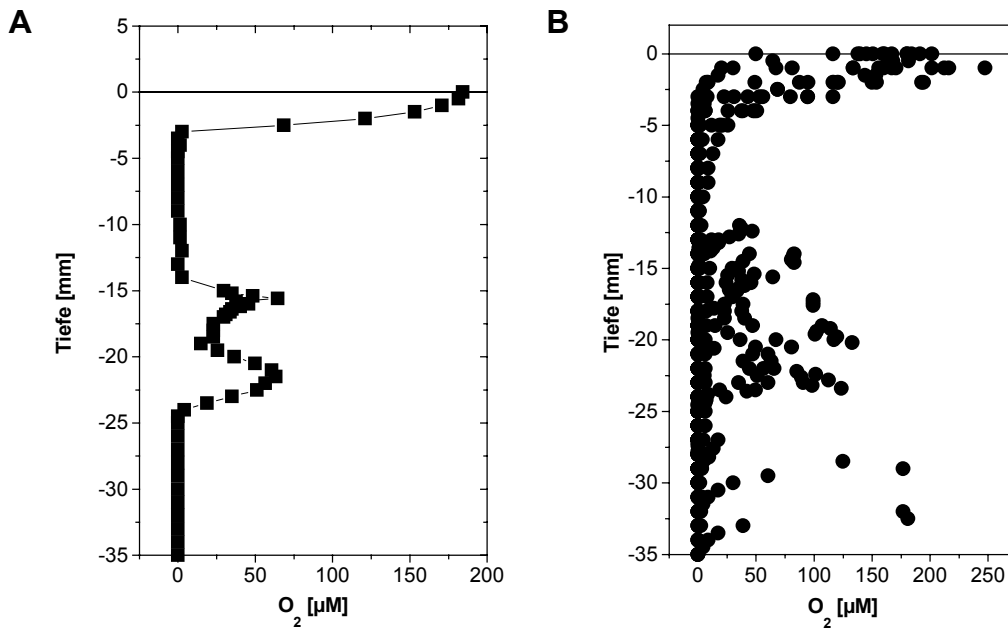


Abb. 12: (A) O_2 -Profil, gemessen im Wurzel-Kompartiment eines gedüngten Mikrokosmos 10 Wochen nach dem Bepflanzen. (B) Kumulative Tiefen-Verteilung von O_2 in den Wurzel-Kompartimenten von gedüngten Mikrokosmen, gemessen 4, 7 und 10 Wochen nach dem Bepflanzen (14 Profile, 522 Meßpunkte).

2.4 Rhizotron-Mikrokosmen

Ein typisches Beispiel für NH_4^+ - und NO_3^- -Profile, die an einzelnen Reiswurzeln im Apexbereich gemessen wurden, ist in Abb. 13 A dargestellt. Der Abstand zum Wurzelapex betrug 2,0 mm. In einem Abstand von 3,0 mm von der Wurzel bis zur Wurzeloberfläche nahm die NH_4^+ -Konzentration ab und die NO_3^- -Konzentration zu. Dagegen blieben die NH_4^+ - und NO_3^- -Konzentrationen in einer Entfernung > 8 mm von der Wurzeloberfläche mehr oder weniger konstant. Abb. 13 B zeigt die dazugehörigen, berechneten NH_4^+ - und NO_3^- -Nettoaktivitäten. In einer Entfernung von 0 -1 mm von der Wurzeloberfläche erfolgte NH_4^+ -Nettoverbrauch und in einer Entfernung von 2 - 3 mm NH_4^+ -Nettoproduktion. Die NH_4^+ -Nettoproduktion resultiert wahrscheinlich aus der Hydrolyse von Harnstoff. In einer Entfernung von 0 -2 mm von der Wurzeloberfläche zeigte sich NO_3^- -Nettoproduktion und in einer Entfernung von 3 - 5 mm NO_3^- -Nettoverbrauch.

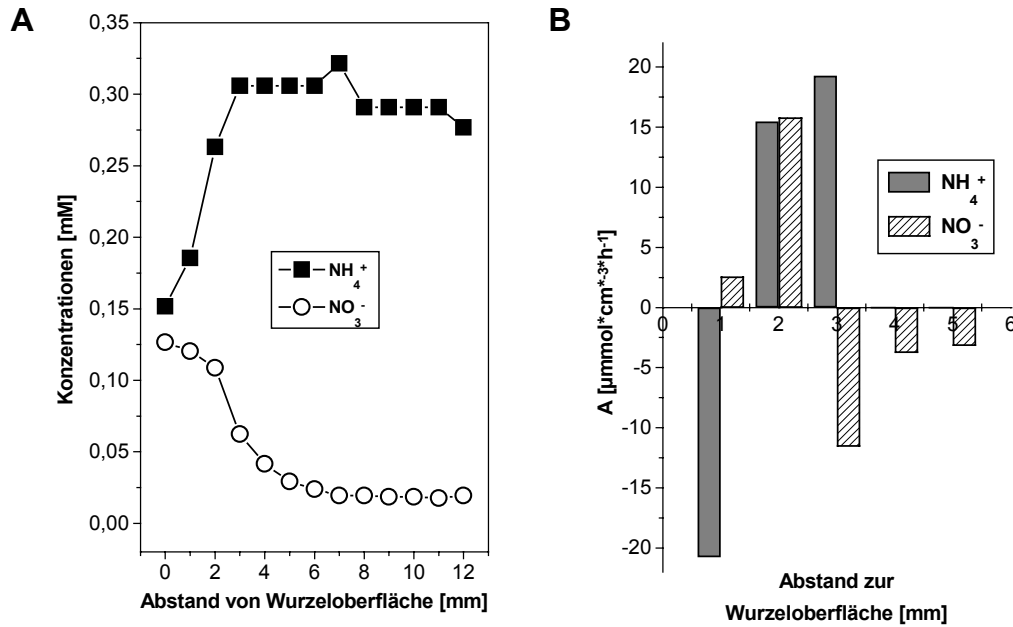


Abb. 13: Nitrifikation und Denitrifikation, gemessen an einer Einzel-Wurzel in einem Rhizotron. Die Entfernung zur Wurzelspitze betrug 2 mm. Die Aktivitäten sind für NH_4^+ in einer Entfernung zwischen 0 und 3 mm von der Wurzeloberfläche, und für NO_3^- in einer Entfernung zwischen 0 und 5 mm von der Wurzeloberfläche dargestellt. **(A)** Radiale NH_4^+ - und NO_3^- -Profile. **(B)** NH_4^+ - und NO_3^- - Aktivitäten. Positive Aktivitäten zeigen Produktionsraten und negative Aktivitäten zeigen Verbrauchsdaten an.

Abbildung 14 zeigt ein typisches Beispiel für NH_4^+ - und NO_3^- -Profile aus dem Elongationsbereich einer einzelnen Reiswurzel. Der Abstand zur Wurzelapex betrug 20 mm. In einem Abstand von der Wurzel von 4 mm bis zur Wurzeloberfläche nahm die NH_4^+ -Konzentration stark ab. Dagegen blieb die NO_3^- -Konzentration auf sehr niedrigem Niveau konstant. Dies zeigt, daß in der Elongationszone keine Nitrifikation und damit auch keine Denitrifikation auftrat.

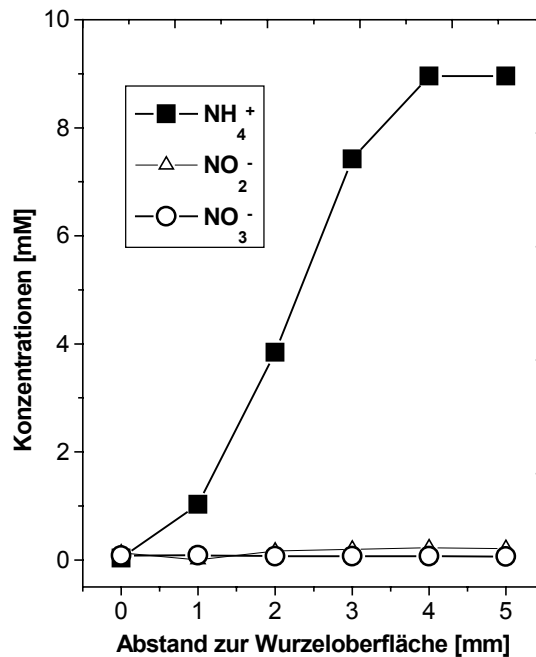


Abb. 14: NH₄⁺- und NO₃⁻-Profile, gemessen im Elongationsbereich einer einzelnen Reiswurzel in einem Rhizotron. Der Abstand zur Wurzelapex betrug 20 mm.

Im Übergangsbereich zwischen Elongations- und Reifungszone kommt es wieder zum Auftreten von Nitrifikation und Denitrifikation. Abb. 15 zeigt ein typisches Beispiel für NH₄⁺- und NO₃⁻-Profile in diesem Bereich. Der Abstand zur Apex betrug 35 mm. Wieder ist eine Abnahme der NH₄⁺-Konzentration und eine Zunahme der NO₃⁻-Konzentration in einem Abstand von 3 mm von der Wurzel bis zur Wurzeloberfläche zu beobachten. In einem Abstand > 3 mm von der Wurzeloberfläche blieben die Konzentrationen konstant. Die berechneten NH₄⁺-Nettoaktivitäten waren denen des Apexbereiches ähnlich (Abb. 13 B und Tab. 4). Die NO₃⁻-Nettoaktivitäten zeigten allerdings nur einen NO₃⁻-Nettoverbrauch in einem Bereich von 0 - 3 mm. Dies deutet auf eine Nitrifikationsaktivität ausschließlich auf der Wurzeloberfläche hin. Direkt daran schließt sich die Denitrifikationszone an.

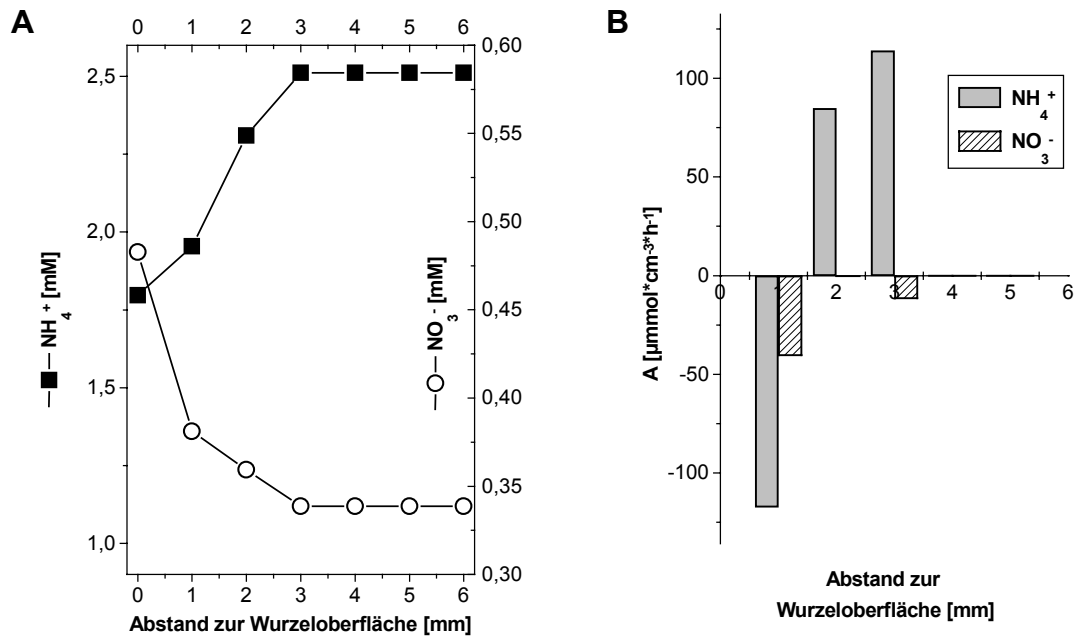


Abb. 15: Nitrifikation und Denitrifikation, gemessen an einer Einzel-Wurzel in einem Rhizotron. Die Entfernung zur Wurzelspitze betrug 35 mm. Die Aktivitäten sind für NH_4^+ und NO_3^- in einer Entfernung von 0 bis 6 mm von der Wurzeloberfläche dargestellt. **(A)** Radiale NH_4^+ - und NO_3^- -Profile. **(B)** NH_4^+ - und NO_3^- - Aktivitäten. Positive Aktivitäten zeigen Produktionsraten und negative Aktivitäten zeigen Verbrauchsraten an.

Die aus den in unterschiedlichen Entfernungen vom Wurzelapex gemessenen NO_3^- -Profilen berechneten NO_3^- -Nettoaktivitäten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die NO_3^- -Nettoproduktions- und NO_3^- -Nettoverbrauchsmaxima befanden sich nahe der geschätzten Grenzfläche zwischen Nitrifikation und Denitrifikation.

Tab. 1: NO₃⁻-Produktions und -Verbrauchsrate, berechnet aus den in verschiedenen Abständen von der Oberfläche von Einzel-Wurzeln gemessenen Profilen. Die Wurzeln hatten ein Alter zwischen 3 und 10 d. ^{a)} Profil dargestellt in Abb. 13 A. ^{b)} Profil dargestellt in Abb. 14. ^{c)} Profil dargestellt in Abb. 15 A. ^{d)} Meßschrittweite 0,5 mm, ansonsten 1 mm. n.d. = nicht detektierbar (Nitrat unter Meßgrenze)

		<u>NO₃⁻-Netto-Produktions-Zone</u>	<u>NO₃⁻-Netto-Verbrauchs-Zone</u>
Abstand von der Wurzelspitze [mm]		Abstand zur Wurzel-Oberfläche [mm]	Abstand zur Wurzel-Oberfläche [mm]
<u>Apex</u>	2 ^{a)}	0 - 2	3 - 5
	2 ^{d)}	0 - 1	1,5
	3	0 - 2	3 - 4
	4	0 - 1	2 - 3
<u>Elongations-Zone</u>	20 ^{b)}	n.d.	n.d.
	30	n.d.	n.d.
	30	n.d.	n.d.
	35 ^{c)}	0	1 - 3
<u>Reifungs-Zone</u>	50	0	1 - 4
	50	0	1 - 3
	90	0 - 1	2 - 4

3. Nitrifizierer-Zellzahlbestimmungen

3.1 Nitrifizierer-Zellzahlen der Reishizoplane

Nitrifizierer von der Rhizoplane wurden sowohl in Harnstoff-gedüngter Mikrokosmen als auch in solchen ohne Harnstoffdüngung gezählt (Tab. 3). Unterschiedliche Medien für NH_4^+ -Oxidierer führten zu keinen signifikanten Unterschieden ($\alpha = 0,05$; $n = 7$) bei der Zellzahl-Bestimmung (Tab. 2). Auch die Zellzahlen der NH_4^+ -Oxidierer von der Rhizoplane waren trotz unterschiedlichem Stickstoff-Angebot in den Mikrokosmen nicht signifikant verschieden ($\alpha = 0,05$; $n = 7$). Die Harnstoffdüngung beeinflusste allerdings die Zellzahl der NO_2^- -Oxidierer. Die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer an der Reishizoplane aus den Mikrokosmen mit „einfacher“ Düngung waren signifikant höher als die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer an der Reishizoplane aus den Mikrokosmen mit „fünffacher“ Düngung ($\alpha = 0,05$; $n = 7$), d.h. daß durch Düngung eine Abnahme der NO_2^- -Oxidierer Population erfolgte. Die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer an der Reishizoplane aus den Mikrokosmen mit „einfacher“ Düngung, die in Medium mit niedriger NO_2^- -Konzentration (0,05 mM) gezählt wurden, waren signifikant höher als die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer an der Reishizoplane aus den Mikrokosmen mit „einfacher“ Düngung, die in Medium mit hoher NO_2^- -Konzentration (5,00 mM) gezählt wurden.

Tab. 2: Einfluß verschiedener NH_4^+ -Oxidierer-Medien auf die Zellzahl von NH_4^+ -Oxidierern an der Rhizoplane aus ungedüngten, bepflanzt Mikrokosmen.

NH_4^+-Oxidierer-Medien	NH_4^+-Oxidierer (Zellen / g Frischgewicht Reiswurzel)
Watson, 1971	$3,3 * 10^5$
Seriano u. Walker, 1968	$2,3 * 10^5$
Krümmel u. Harms, 1982	$3,1 * 10^5$

Tab. 3: Nitrifizierer-Zellzahlen an der Reiserhizoplane von 8 Wochen alten Reispflanzen aus Mikrokosmen mit unterschiedlichem Stickstoff-Status. ^{a)} Eine Düngung mit 100 mg N- Harnstoff / Mikrokosmos vor der Pflanzung. ^{b)} 5 Düngungen mit 100 mg N-Harnstoff / Mikrokosmos, 1 x pro Woche in den Wurzelraum injiziert. ^{c)} NO₂⁻-Konzentration im MPN-Medium. n.b. = nicht bestimmt

Düngung	NH ₄ ⁺ -Oxidierer (Zellen / g Frischgewicht Reiswurzel)	NO ₂ ⁻ -Oxidierer (Zellen / g Frischgewicht Reiswurzel)	
		<u>0,05 mM</u> ^{c)}	<u>5,0 mM</u> ^{c)}
Ungedüngt	3,0 * 10 ⁵	n.b.	n.b.
1 x gedüngt ^{a)}	3,1 * 10 ⁵	5,0 * 10 ⁴	7,2 * 10 ¹
5 x gedüngt ^{b)}	5,2 * 10 ⁵	6,3 * 10 ³	1,4 * 10 ³

3.2 Nitrifizierer-Zellzahlen in Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden

Weder die Nitrifizierer-Zellzahlen der unterschiedlichen Düngungstufen noch die Nitrifizierer-Zellzahlen von Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden unterschieden sich signifikant ($\alpha = 0,05$; $n = 4$; Tab. 4).

Tab. 4: Nitrifizierer-Zellzahlen in Rhizosphärenboden und Nichtrhizosphärenboden aus Kompartiment-Mikrokosmen mit unterschiedlichem Stickstoff-Status. NRB = Nichtrhizosphärenboden, RB = Rhizosphärenboden, HS = kg N-Harnstoff / ha, AP = kg N-Diammoniumhydrogenphosphat / ha.

Düngung	NH₄⁺-Oxidierer (Zellen / g Frischgewicht Reiswurzel)		NO₂⁻-Oxidierer (Zellen / g Frischgewicht Reiswurzel)	
	<u>NRB</u>	<u>RB</u>	<u>NRB</u>	<u>RB</u>
Ungedüngt	9,6 * 10 ⁴	3,2 * 10 ⁴	3,0 * 10 ⁵	2,3 * 10 ⁵
200 HS	5,8 * 10 ⁴	1,0 * 10 ⁵	3,1 * 10 ⁵	2,6 * 10 ⁵
400 HS	2,3 * 10 ⁵	6,2 * 10 ⁵	3,2 * 10 ⁵	4,5 * 10 ⁵
200 AP	3,3 * 10 ⁵	1,7 * 10 ⁵	5,0 * 10 ⁵	6,0 * 10 ⁵
400 AP	1,1 * 10 ⁵	1,2 * 10 ⁵	2,0 * 10 ⁶	3,8 * 10 ⁶

E. Diskussion

Gekoppelte Nitrifikation-Denitrifikation kann sowohl in der dünnen, oxischen Oberflächenschicht von gefluteten Reisfeldböden als auch in der Reiserhizosphäre, die aufgrund des weitverzweigten Wurzelsystems einen beachtlichen Raum einnimmt, vorkommen. Letzteres wurde indirekt aus der Bilanz von N-Zugabe und N-Wiederfindung in Reispflanzen und Böden (Fillery et al., 1984; Fillery et al., 1986; Reddy und Patrick, 1986), durch direkte Gasmessungen der Denitrifikations-Produkte mit Hilfe der ^{15}N Technik (Buresh und Austin, 1988; Buresh und DeDatta, 1989; Mosier et al., 1989; Lindau et al., 1990; Reddy et al., 1989) und mit der N_2 -Fluß-Methode (Arth et al., 1998) gezeigt. Diese Versuche konnten allerdings keinen Einblick in die kleinräumigen Umweltbedingungen von Nitrifikanten und Denitrifikanten am Mikrostandort „Reiserhizosphäre“ geben. Von entscheidender Bedeutung für die Lebensbedingungen von NH_4^+ -Oxidierern, NO_2^- -Oxidierern und denitrifizierenden Bakterien ist das Vorhandensein von NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- . Die Konzentrationen dieser Ionen können *in situ* mit Hilfe von Ionen-selektiven Mikroelektroden bestimmt werden.

1. Ionen-selektive Mikroelektroden

Ionen-selektive Mikroelektroden wurden für histochemische und zytologische Untersuchungen entwickelt (Oesch et al., 1986). Für diese Anwendungen wurden Glaskapillaren mit einem Spitzendurchmesser von ungefähr 1 μm benutzt. Ähnliche Mikrosensoren sind erfolgreich in Biofilmen (z.B. Kühl und Joergensen, 1992; de Beer et al., 1997) und in Sedimenten (z.B. Sweerts und de Beer, 1989; de Beer et al., 1991; Revsbech und Joergensen, 1986) angewandt worden. Diese Systeme sind jedoch näherungsweise eindimensional und nahezu homogen. In solchen Systemen wurden auch verschiedene Ionen mit parallel angeordneten Einzelmikroelektroden erfolgreich gemessen (Müller et al., 1997). Bedingungen, wie sie an der Oberfläche von gefluteten Reisfeldböden angetroffen werden, sind mit denen in Biofilmen und Sedimenten vergleichbar. Hier ist der Einsatz von Einzelmikroelektroden

sinnvoll. Die Reiserhizosphäre unterscheidet sich dagegen grundlegend von der Oberflächenschicht durch ihre wurzelbedingte Heterogenität und ihre dreidimensionale räumliche Ausdehnung. Diese Bedingungen erfordern Mehrkanal-Mikroelektroden, die es ermöglichen, alle für Nitrifikations- und Denitrifikationsprozesse relevanten Ionen *in situ* am selben Ort und zur gleichen Zeit zu messen. Mehrkanal-Mikroelektroden auf der Basis herkömmlicher, miteinander verbundener Glaskapillaren besitzen zwei entscheidende Nachteile: Die Ausbeute beim Bau von Mehrkanal-Mikroelektroden ist aufgrund einfacher mathematischer Beziehungen, die sich aus ihrer Verbundstruktur ergeben, äußerst gering (Multiplikation der Wahrscheinlichkeiten). Diese geringe Ausbeute wird noch verringert durch die Notwendigkeit, die PVC-haltigen Membranlösungen von hinten („backfilling“) in die Kapillarspitzen zu füllen. Denn das Befüllen von vorne („frontfilling“), wie es bei Einzelmikroelektroden durch einfaches Eintauchen in die Membranlösung möglich ist, führt generell zu einer größeren Zahl blasenfreier und damit funktionsfähiger Elektroden. Noch entscheidender ist der Umstand, daß Mikroelektroden auf der Basis von Glaskapillaren den mechanischen Belastungen im durchwurzelten Reisfeldboden nicht gewachsen sind. Dies scheint einer der Hauptgründe dafür zu sein, daß bis heute noch keinerlei gleichzeitige Profilmessungen von verschiedenen Ionen in durchwurzelten Böden vorliegen. Im Gegensatz dazu sind Mehrkanal-Mikroelektroden auf der Basis von Glaskapillaren schon häufig in zytologischen Studien eingesetzt worden, auch eignen sie sich für Untersuchungen an isolierten Wurzeln (Colmer und Bloom, 1998; Henriksen et al., 1990; Henriksen et al., 1992; Ryan et al., 1990; Bloom, 1997). Für Untersuchungen im durchwurzelten Reisfeldboden gelang in dieser Arbeit der entscheidende Durchbruch mit der Entwicklung einer neuartigen Mehrkanal-Mikroelektrode. Als Grundkörper wurden fused silica-Kapillaren verwendet, die extrem unempfindlich gegenüber mechanischen Belastungen sind. Diese konnten nach der Befüllung mit Membran- und Elektrolytlösung zunächst auf Funktionsfähigkeit getestet und danach zu Mehrkanal-Mikroelektroden zusammengefügt werden. Dies steigerte die Ausbeute beträchtlich. Mit diesen robusten Mehrkanal-Mikroelektroden, die zu ihrem zusätzlichen Schutz in

einer Stahlkapillare fixiert wurden, konnte in den dreidimensionalen Raum der dicht durchwurzelten Reiserhizosphäre vorgedrungen werden.

2. Profilmessungen

2.1 Unbepflanzte Reismikrokosmen

Mit Einzelmikroelektroden, die für NH_4^+ und NO_3^- selektiv waren, konnte in unbepflanzten Mikrokosmen eine oxisch-anoxische Grenzfläche in einer Tiefe von ungefähr 1 mm gezeigt werden. Oberhalb dieser Grenzfläche trat Nitrifikation und unterhalb davon Denitrifikation auftrat. NH_4^+ diffundierte von einer Quelle in der Tiefe in Richtung Oberfläche. Diese Quelle wurde wahrscheinlich durch Mineralisation von organischem Material gespeist. Profile in Süßwassersedimenten zeigten eine ähnliche Gestalt (de Beer und Sweerts, 1989; Sweerts und de Beer, 1989; Jensen et al., 1993). Aus dem Vergleich der Profile in den Abbildungen 6 und 7 kann man allerdings auch ersehen, daß die kleinräumigen Umweltbedingungen zweier unterschiedlicher Orten eines scheinbar homogenen Systems sich erheblich unterscheiden können. Aus dem Verlauf des NH_4^+ -Profils ist zu schließen, daß Nitrifikation in einer Tiefe von 0,7 mm vorkommt (Abb. 6). Der Verlauf des NO_3^- -Profils weist dagegen auf eine Nitrifikationszone in einer Tiefe von 1,2 mm hin, in der ein Maximum der NO_3^- -Konzentration gemessen wurde (Abb. 7). Dieser Widerspruch zeigt, daß sogar in einem nahezu eindimensionalen System wie dem unbepflanzten Reisfeldboden die Anwendung einer Mehrkanal-Mikroelektrode vorzuziehen ist.

Es ist davon auszugehen, daß NH_4^+ in der reduzierten Bodenschicht nur in geringem Umfang - z.B. durch Assimilation durch anaerobe Bakterien - verbraucht wird. In der Literatur wird auch die Möglichkeit der anaeroben NH_4^+ -Oxidation diskutiert (Broda, 1977; Jørgenson et al., 1991; van de Graaf et al., 1995). Allerdings wird für die anaerobe NH_4^+ -Oxidation nach den vorgeschlagenen Reaktionen zusätzlich entweder NO_3^- oder NO_2^- benötigt. Diese N-Spezies kommen im Anaeroben nur an der oxisch-

anoxischen Grenzfläche vor. Eine Kopplung von aerober NH_4^+ - und NO_2^- -Oxidation auf der einen und anaeroben NH_4^+ -Oxidation auf der anderen Seite wäre dazu notwendig. Eine mögliche Konkurrenz zwischen den postulierten anaeroben NH_4^+ -Oxidierern und den Denitrifikanten ist im Rahmen dieser Arbeit nicht detektierbar. Auf der Prozeßebene ist eine Unterscheidung nicht erforderlich, da das Endprodukt der Denitrifikanten als auch der anaeroben NH_4^+ -Oxidierer N_2 ist (Broda, 1977; Jørgenson et al., 1991; van de Graaf et al., 1995).

2.2 Bepflanzte, ungedüngte Reismikrokosmen

In bepflanzten, ungedüngten Mikrokosmen konnte nahezu kein NH_4^+ und daher auch kein NO_3^- detektiert werden (Abb. 7). Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen, die aus Porenwasser-Analysen derselben Mikrokosmen erzielt worden waren (Bodelier et al., submitted). Höchst wahrscheinlich wird dieses Fehlen von NH_4^+ durch NH_4^+ -Assimilation der Reispflanze bedingt, was zu einer Hemmung der Nitrifikation führt. Dies stimmt gut mit Ergebnissen früherer Untersuchungen mit Hilfe der N_2 -Fluß-Technik überein, in denen gezeigt werden konnte, daß in ungedüngten Mikrokosmen mit gleichaltrigen Reispflanzen gekoppelte Nitrifikation-Denitrifikation vollständig unterbunden war (Arth et al., 1998). Konkurrenz zwischen nitrifizierenden Bakterien und Pflanzenwurzeln wurde auch bei *Glyceria maxima* gefunden (Verhagen et al., 1994; Bodelier et al., 1998), und es scheint, daß dies ein allgemein auftretendes Phänomen in pflanzenbedeckten Feuchtgebieten und Reisfeldern ohne äußere Stickstoff-Zufuhr ist.

2.3 Bepflanzte, Stickstoff-gedüngte Reismikrokosmen

Nach der Stickstoff-Düngung startet die Nitrifikation nahezu sofort (Abb. 10A, 11A). Theoretisch finden nitrifizierende Bakterien äußerst günstige Bedingungen vor, wenn eine Wurzel in anoxischen Boden vordringt, in dem sich NH_4^+ angehäuft hat (Abb. 6). Während der kurzfristigen Periode, in der O_2 verfügbar (Armstrong, 1971; Flessa und Fischer, 1992; Gilbert

und Frenzel, 1998) und gleichzeitig NH_4^+ vorhanden ist, ist Nitrifikation möglich (siehe unten und Tab. 1). Dies trifft wahrscheinlich in den ersten Wochen nach der Aussaat oder dem Pflanzen von Reis zu. Später kann in einem dicht durchwurzelten Boden zwar O_2 vorhanden sein (Abb. 12 A und B), aber niedrige NH_4^+ -Konzentrationen können zu einer strengen Energielimitierung führen (Abb. 9). An solche Umweltbedingungen scheinen nitrifizierende Bakterien jedoch gut angepaßt zu sein. Sie überleben sowohl anoxische Perioden (Bodelier et al., 1996) als auch NH_4^+ -Mangelbedingungen. Während Mangelbedingungen herrschen, bleiben sowohl Protein- und RNA-Spiegel als auch die potentielle NH_4^+ -oxidierende Aktivität hoch (Johnstone und Jones, 1985). In den verwendeten Mikrokosmen hatte die Produktion von CH_4 im anoxischen Boden einen positiven Einfluß auf die Überlebensfähigkeit von NH_4^+ -Oxidierern (Bodelier et al., submitted). CH_4 ist ein alternatives Substrat für die Ammonium-Monooxygenase und scheint für den Erhalt der NH_4^+ -Oxidationsaktivität von Vorteil zu sein (Stein und Arp, 1998).

Auch die methanotrophen Bakterien sind in ungedüngten Mikrokosmen Stickstoff-limitiert und werden durch Düngung stimuliert (Bodelier et al., submitted). Diese Bakterien könnten potentiell für einen signifikanten Teil der NH_4^+ -Oxidation in den Reismikrokosmen verantwortlich sein (Bodelier und Frenzel, 1999; Bodelier et al., submitted). An der beobachteten NH_4^+ -Oxidation könnten also sowohl Nitrifizierer als auch Methanotrophe beteiligt sein, die um das vorhandene NH_4^+ konkurrieren.

Sogar nach Stickstoff-Düngung wird die wurzel-assoziierte Nitrifikation teilweise durch wurzelverursachte Konkurrenz unterbunden. Die NH_4^+ -Profile der Stickstoff-gedüngten Kompartiment-Mikrokosmen zeigten eine starke NH_4^+ -Senke ohne detektierbare Nitrifikationsprodukte in einer Schicht zwischen 5 mm und 15 mm Tiefe (Abb. 10 A,B und 11). Dort bildet die Reispflanze eine dichte Matte feiner, sekundärer Wurzeln aus. Diese feinen Wurzeln sind wahrscheinlich für die Aufnahme von Nährstoffen wichtig (Kirk, 1993). Es ist anzunehmen, daß in dieser Zone die NH_4^+ -Abnahme auf pflanzenbedingte NH_4^+ -Aufnahme zurückzuführen

ist. Die resultierenden NH_4^+ -Konzentrationen von unter $250 \mu\text{M}$ waren offensichtlich zu niedrig, um eine wurzel-assoziierte Nitrifikation zu ermöglichen. Allerdings ist nicht vollständig auszuschließen, daß in dieser Schicht eine geringe Nitrifikationsaktivität stattfand, da die dichte Wurzelmatte Nitrifikationsprodukte ebenso effizient aufnehmen könnte wie NH_4^+ .

Neben NH_4^+ ist O_2 essentiell für NH_4^+ -Oxidierer. Apparente K_m -Werte von NH_4^+ - und NO_3^- -oxidierenden Bakterien liegen zwischen $1 - 40 \mu\text{M O}_2$ bzw. zwischen $10 - 166 \mu\text{M O}_2$ (Sharma und Ahlert, 1977; Goreau, 1980; Stenstrom und Poduska, 1980; Painter, 1986; Laanbroek und Gerards, 1993; Laanbroek et al., 1994). In einer früheren Arbeit wurden Clarke-Typ O_2 -Mikroelektroden mit einem Spitzen-Durchmesser von ungefähr $100 \mu\text{m}$ verwendet (Frenzel et al., 1992). Dabei wurden O_2 -Konzentrationen bis zu $150 \mu\text{M}$ in Mikrokosmen mit 50 Tagen alten Reispflanzen gemessen. Mit O_2 -Mikroelektroden des Kathoden-Typs, deren Spitzen-Durchmesser ungefähr 1 mm betrug, wurden bis zu $40 \mu\text{M O}_2$ in einem mit Reis bepflanzten Rhizotron gemessen (Gilbert und Frenzel, 1998). Dabei war es nahezu unmöglich, mit diesen Elektroden die Wurzeln zu durchdringen, so daß es sich bei den gemessenen O_2 -Konzentrationen um Porenwasser-Werte handeln muß. In der hier vorliegenden Arbeit wurden O_2 -Mikroelektroden des Clark-Typs mit einem Spitzen-Durchmesser von ungefähr $30 \mu\text{m}$ verwendet. Dabei wurden O_2 -Konzentrationen bis zu $180 \mu\text{M}$ gemessen, was 72% Luftsättigung entspricht (Abb. 12 B). Allerdings ist bei diesen dünnen Mikroelektroden eine Penetration der Reispflanzen nicht auszuschließen, so daß es sich bei den höchsten O_2 -Werten um Konzentrationen innerhalb des Aerenchyms und nicht um Rhizosphären-Werte handeln könnte (Revsbech et al., in press). Die Ausdehnung der O_2 -Peaks betrug bis zu 5 mm (Abb. 12 A), während die maximalen Wurzel-Durchmesser kleiner als $1,2 \text{ mm}$ waren. Dies zeigt, daß eine oxidierte Rhizosphäre in dem hier verwendeten System auftrat. Möglicherweise überlappten sich bestimmte Bereiche mit benachbarten Wurzeln. Die gemessenen O_2 -Konzentrationen waren hoch genug, um sowohl NH_4^+ - als auch NO_2^- -Oxidation zu ermöglichen. Dies wird durch die in den Kompartiment-Mikrokosmen gemessenen NO_3^- -Werte unterstützt, deren

Ausdehnung und Lage in der Rhizosphäre gut mit denen der O_2 -Werte korrelieren (vergleiche dazu Abb. 10 A und B, Abb. 11 mit Abb. 12 A). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden in einem Reisfeld bei Temperaturen von 30 - 32°C nur sehr kleine, oberflächennahe O_2 -Peaks gemessen (Revsbech et al., in press). Diese Werte kamen wahrscheinlich zustande, indem die Mikroelektroden die Reisswurzeln penetrierten. Für die Verfügbarkeit von O_2 sind nicht nur der pflanzenvermittelte Transport und die Diffusion, sondern auch die O_2 -Senken entscheidend. Während in dem für Reisfelder interessierenden Temperatur-Bereich der Diffusionskoeffizient mit der Temperatur nahezu linear ansteigt, nehmen biologische Prozesse wie die Respiration mit einem Q_{10} von ≥ 2 zu. Die unterschiedlichen Ausdehnungen der oxidierten Reissrhizosphären (Revsbech et al., in press; Abb. 12 A und B) könnten also das Ergebnis eines Temperatur-Effektes sein. Neben der Temperatur könnten auch die unterschiedlichen Reduktionspotentiale des umgebenden Bodens, der physiologische Status der Reisswurzeln und ihr Alter die Ausdehnung der oxidierten Zone innerhalb der Reissrhizosphäre beeinflussen (Frenzel et al., 1992).

2.4 Bepflanzte, Stickstoff-gedüngte Reissrhizotrone

Profile, die radial zu den wachsenden Reisswurzeln in Rhizotronen gemessen wurden, erlaubten eine detaillierte Untersuchung der longitudinalen Differentiation der wurzel-assoziierten Nitrifikation und Denitrifikation. Die Aktivitätsberechnungen zeigten, daß an der Wurzelspitze die Maxima der Netto-Nitrifikationsaktivitäten in einiger Entfernung von der Wurzeloberfläche auftraten (Abb. 13 B und Tab. 1); in der Elongationszone dagegen trat so gut wie keine meßbare Nitrifikation auf (Abb. 14 und Tab. 1). In der Reifungszone war die Nitrifikation weitgehend auf die Rhizoplane beschränkt (Abb. 15 B und Tab. 1). Auch wenn die absoluten Entfernungen zur Wurzel durch die eingeschränkte radiale Diffusion an der Rhizotronwand beeinflusst sein könnten, ändert dies nichts an der grundsätzlichen Aussagefähigkeit der vorliegenden Profil-Messungen.

Die Faktoren, die diese Unterschiede hervorrufen, sind komplex. An der Wurzelspitze wird NH_4^+ sehr effizient absorbiert (Bloom, 1997). Die NH_4^+ -Aufnahme könnte einen starken Abfall des pH-Wertes an der Wurzeloberfläche bewirken (Colmer und Bloom, 1998). In anderen Reisfeldböden wurde eine pH-Abnahme von 6,5 im Boden auf 4,0 an der Wurzeloberfläche gefunden (Begg et al., 1994). Das Zusammenwirken niedriger NH_4^+ -Konzentrationen und niedriger pH-Werte an der Rhizoplane könnte erklären, warum an der Rhizoplane der Wurzelspitze nur eine geringe Nitrifikationsaktivität auftritt. Allerdings sind die berechneten Nitrifikationsaktivitäten Netto-Aktivitäten, und es ist nicht auszuschließen, daß hohe Brutto-Nitrifikationsaktivitäten an der Rhizoplane der Wurzelspitze vorkommen könnten, die aber durch eine starke Aufnahme der Nitrifikationsprodukte von der Wurzel verdeckt werden.

Die radialen O_2 -Flüsse nehmen mit zunehmendem Abstand von der Wurzelspitze ab. Die niedrigsten O_2 -Konzentrationen kommen in 30 - 60 mm Entfernung von der Wurzelspitze vor (Armstrong, 1971; Gilbert und Frenzel, 1998). Diese Zone niedriger O_2 -Freisetzung korreliert mit der Suberisation der Exodermis und der Entwicklung einer Sklerenchym-schicht auf der externalen Seite des Cortex, was eine O_2 -Barriere bewirkt und möglicherweise auch die Aufnahme von Nährstoffen unterbindet (Clark und Harris, 1981). Hier wurde die Nitrifikation unterdrückt (Tab. 1). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zum ersten Mal, wie die Nitrifikation in der Reisorhizosphäre mit der Anatomie und Physiologie der Reisswurzel korreliert. Die longitudinale Differentiation könnte dabei ein gemeinsames Merkmal der Rhizosphäre sein: Sowohl der Umfang der NH_4^+ - und NO_3^- -Aufnahme (Henriksen et al., 1992) als auch der Umfang der Exudation von Zuckern und Aminosäuren (Jaeger et al., 1999) variiert entlang der Wurzelachse.

2.5 Bepflanzte Reismikrokosmen mit oberflächlicher Harnstoff-Düngung

Die experimentelle Injektion von Stickstoff-Dünger und die Isolation von Wurzeln halfen, die Kontroll-Mechanismen von Nitrifikation und

Denitrifikation in der Reishizosphäre zu verstehen, doch diese Methoden sind fern der wirklichen Feldbedingungen. Während das tiefe Einbringen des Harnstoffes als Möglichkeit zur Verringerung von Stickstoffverlusten durch NH_3 -Ausgasung diskutiert wird (Gaudin und Dupuy, 1999; Suratno et al., 1998), wird in der Praxis der Dünger auf die Oberfläche gestreut. In den Mikrokosmen wie auch im Reisfeld wird der Harnstoff rasch hydrolysiert (Ma et al., 1995). Aufgrund der hohen Perkolationsrate war NH_4^+ über weite Bereiche der durchwurzelten Bodenschicht verfügbar (Abb. 8 A - C). NO_3^- war zuletzt bis in eine Tiefe von 35 mm detektierbar, während NO_2^- nur nahe der Oberfläche und bis zu einer Tiefe von 15 mm in höheren Konzentrationen auftrat (Abb. 8 B). Die Gründe für das Ungleichgewicht zwischen den Aktivitäten von NH_4^+ -Oxidierern und NO_2^- -Oxidierern sind unklar. Über einen längeren Zeitraum gesehen nahm die NH_4^+ -Konzentration wieder ab, und Nitrifikation war nur noch in der Oberflächenschicht nachweisbar (Abb. 8 D).

In ungedüngtem Reisfeldboden ist die Rhizosphäre jedoch charakterisiert durch die Konkurrenz um NH_4^+ zwischen Reiwurzeln und nitrifizierenden Bakterien, wobei letztere unterlegen sind. Neben der Reispflanze konkurrieren auch andere Mikroorganismen mit den Nitrifizierern um die Substrate. So sind NH_4^+ -Oxidierer schlechtere Konkurrenten für NH_4^+ im Vergleich zu heterotrophen Bakterien (Verhagen und Laanbroek, 1991), die durch Wurzel-Exudate stimuliert werden. NH_4^+ -Oxidierer können auch durch methanotrophe Bakterien unterdrückt werden (Megraw und Knowles, 1987; Roy und Knowles, 1994). Auf der Prozessebene ist dies allerdings unerheblich, da methanotrophe Bakterien für signifikante Teile der NH_4^+ -Oxidation verantwortlich sein könnten (Bodelier und Frenzel, 1999; Bodelier et al., submitted).

Höhere NO_3^- -Konzentrationen können sowohl in anaeroben Böden als auch in Reisboden-Aufschlammungen zur Unterdrückung der Methanogenese führen (Achnich et al., 1995; Klüber und Conrad, 1998; Laskowski und Morgan, 1967). In der Reishizosphäre waren die NO_3^- -Konzentrationen meist niedrig. Eine Ausnahme wurde nach Harnstoff-Zugabe in das Flutungswasser beobachtet, wobei die NO_3^- -Konzentration

3,5 mM betrug (Abb. 8 B). Es erscheint also, daß die Harnstoff-Zugabe in das Flutungswasser die Methanogenese im durchwurzeltem Reisfeldboden unterdrücken kann. Dies geschieht möglicherweise durch Konkurrenz um Substrate mit denitrifizierenden Bakterien oder durch Inhibition durch oxidierte Stickstoff-Spezies (Roy und Conrad, 1999).

3. Populationsgröße der Nitrifizierer

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die wurzel-assoziierte Nitrifikation über längere Zeiträume bzw. für bestimmte Bereiche der Rhizosphäre aus vielfältigen Gründen begrenzt ist. Dies spiegelt sich in den durch die „most probable number“-Methode bestimmten Populationsgrößen der Nitrifizierer in der Reisorhizosphäre wider. Die Populationsgröße der NH_4^+ -Oxidierer an der Rhizoplane zeigte trotz Stickstoff-Düngung keine Zunahme (Tab. 2 und 3). Die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer aus den Mikrokosmen mit einfacher Harnstoff-Düngung, die in Medium mit niedriger NO_2^- -Konzentration (0,05 mM) gezählt worden waren, waren signifikant höher als die Zellzahlen der NO_2^- -Oxidierer aus den Mikrokosmen mit einfacher Harnstoff-Düngung, die in Medium mit hoher NO_2^- -Konzentration (5,0 mM) gezählt worden waren (Tab. 3). Dies könnte in Zusammenhang damit stehen, daß zwei Gruppen von NO_2^- -Oxidierern existieren, die sensitiv bzw. nicht-sensitiv für hohe NO_2^- -Konzentrationen sind (Both et al., 1990). Dadurch ließe sich auch erklären, warum die Zellzahlen von NO_2^- -Oxidierern aus Mikrokosmen mit fünf-facher Harnstoff-Zugabe, die in Medium mit geringer NO_2^- -Konzentration gezählt worden waren, nicht signifikant höher waren als die Zellzahlen von NO_2^- -Oxidierern aus Mikrokosmen mit fünf-facher Harnstoff-Zugabe, die in Medium mit hoher NO_2^- -Konzentration gezählt worden waren: Durch hohe Harnstoff-Zugabe könnte eine hohe NH_4^+ -Konzentrations-Zunahme in der Reisorhizosphäre erfolgen. Dies könnte über eine kürzere Zeitperiode (bis z.B. der pH-Wert zu stark durch NH_4^+ -Aufnahme gesunken ist; siehe oben) eine hohe Nitrifikations-Aktivität an der Wurzel-Oberfläche mit hoher NO_2^- -Bildung verursachen. Diese könnte die NO_2^- -sensitiven NO_2^- -Oxidierer schädigen. So ist schon mehrfach gezeigt worden, daß nach der

Substrat-Zugabe zuerst ein Übergewicht der NO_2^- -Produktion besteht, bevor die NO_2^- -Oxidation aufholt (z.B. Arth et al., 1998).

Die verschiedenen Stickstoff-Düngungen hatten auch auf die Populationsgröße der Nitrifizierer des Rhizosphärenbodens keinen positiven Effekt (Tab. 4). Allerdings ist es möglich, daß in den Wurzelkompartimenten, in denen die Zählungen vorgenommen wurden, das von den Wurzeln nicht beeinflusste Bodenvolumen wesentlich größer war als das von den Wurzeln beeinflusste Bodenvolumen. So könnte eine geringe Zellzunahme nicht detektierbar gewesen sein. Ähnlich Ergebnisse sind in der Literatur beschrieben worden (Uhel et al., 1989; Adhya et al., 1996; Bodelier et al., 1999). Im Gegensatz dazu nahmen mit der Zeit die Zellzahlen anderer aerober Bakterien, wie z.B. der CH_4 -Oxidierer (Gilbert und Frenzel, 1998; Bodelier et al., 1999), in der Reiserhizosphäre vergleichbarer Systeme zu. Dies könnte in der größeren Verfügbarkeit des CH_4 , das von keinen anderen Organismen außer CH_4 - und NH_4^+ -Oxidierern genutzt wird, und der im Vergleich zu den NH_4^+ -Oxidierern wesentlich höheren Wachstumsraten begründet sein.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in der Reiserhizosphäre stieg die NH_4^+ -Oxidierer-Population in Verbindung mit Stickstoff-Düngung in der Oberflächenschicht von bepflanzt und unbepflanztem Reisfeldboden an (Adhya et al., 1996). In Übereinstimmung damit zeigten Stickstoff-gedüngte Reismikrokosmen eine hohe Nitrifikationsaktivität mit NO_2^- - und NO_3^- -Bildung. Es erscheint, daß eine konstantere Verfügbarkeit von Nitrifizierer-Substraten, wie NH_4^+ und O_2 , und eine geringere Konkurrenz mit Reiswurzeln und CH_4 -Oxidierern um NH_4^+ im Vergleich zu den Bedingungen in der Rhizosphäre in der dünnen oxischen Oberflächenschicht ein detektierbares Wachstum von Nitrifizierern erlaubt.

4. Fazit

Die kleinräumigen Umweltbedingungen der Reiserhizosphäre sind charakterisiert durch die räumlich heterogene Verteilung der Substrate mit

nicht vorhersehbaren, zeitlichen Konzentrations-Änderungen. Die Aktivitäten der Nitrifizierer und - wegen der engen Kopplung - der Denitrifizierer sind von der Verfügbarkeit von O_2 und NH_4^+ abhängig. Sowohl O_2 als auch NH_4^+ können für die rhizosphärische Nitrifikation limitierende Faktoren sein. Nach der Entwicklung einer dichten Wurzelschicht ist NH_4^+ am stärksten limitiert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse über die kleinräumigen Umweltbedingungen stehen in Übereinstimmung mit den bekannten Felduntersuchungen. Nitrifikation und im Anschluß daran Denitrifikation kann auftreten, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Stickstoff-Versorgung und Stickstoff-Bedarf der Reispflanze ein Anwachsen der NH_4^+ -Konzentration in der Rhizosphäre erlaubt. Dies kommt nur in Verbindung mit Düngung vor. Der Transport von reduzierten Stickstoff-Verbindungen hinab in die Rhizosphäre wird durch den pflanzengetriebenen Wasserfluß durch den Boden ermöglicht. Dies ist ein wichtiger Faktor für den Stickstoff-Kreislauf im gefluteten Reisfeld.

F. Literaturverzeichnis

- Adhya, T.K., Patnaik, P., Rao, V.R., Sethunathan, N.** (1996) Nitrification of ammonium in different components of a flooded rice soil system. *Biol Fert Soils* **32**, 321-326.
- Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R.** (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol Fertil Soils* **19**, 65-72.
- Ammann, D.** (1986) Ion-selective microelectrodes-Principles, design and application. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
- Arciero, D. Balny, C., Hooper, A.B.** (1991) Spectroscopic and rapid kinetic studies of reduction of cytochrome c554 by hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrisomonas europaea*. *Biochem* **30**, 11466-11472.
- Armstrong, W.** (1971) Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. *Physiol Plant* **25**, 192-197.
- Armstrong, W.** (1994) Polarographic oxygen electrodes and their use in plant aeration studies. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* **102B**, 511-527.
- Arth, I., Frenzel, P., Conrad, R.** (1998) Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. *Soil Biol Biochem* **30**, 509-515.
- Begg, C.B.M., Kirk, G.J.D., Mackenzie, A.F., Neue, H.U.** (1994) Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytologist* **128**, 469-477.
- Belser, L.W. und Schmidt, E.L.** (1980) Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers. *FEMS Microbiol Letters* **7**, 213-216.
- Belser, L.W.** (1977) Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **34**, 403-410.
- Belser, L.W.** (1979) Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Reviews Microbiol* **33**, 309-333.

- Belser, L.W. und Mays, E.L.** (1980) Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* **39**, 505-510.
- Belser, L.W. und Mays, E.L.** (1982) Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **43**, 945-948.
- Bloom, A.J.** (1997) Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Z Pflanzenernähr Bodenk* **160**, 253-259.
- Bodelier, P.L.E. und Frenzel, P.** (1999) The contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rice rhizosphere using new methods for discrimination. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1826-1833.
- Bodelier, P.L.E., Hahn, A.P., Arth, I., Frenzel, P.** (submitted) Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice. *Biogeochem.*
- Bodelier, P.L.E., Libochant, J.A., Blom, C.W.P.M., Laanbroek, H. J.** (1996) Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4100-4107.
- Bodelier, P.L.E., Wijnhuizen, A.G., Blom, C.W.P.M., Laanbroek, H. J.** (1997) Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant Soil* **190**, 91-103.
- Bodelier, P.L.E., Duyts, H., Blom, C.W.P.M., Laanbroek, H.J.** (1998) Interactions between nitrifying and denitrifying bacteria in gnotobiotic microcosms planted with the emergent macrophyte *Glyceria maxima*. *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 63-78.
- Bock, E.** (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch Microbiol* **108**, 305-312.
- Bock, E., Wilderer, P.A., Freitag, A.** (1988) Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Water Res* **22**, 245-250.

- Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R., Zart, D.** (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch Microbiol* **163**, 16-20.
- Bömeke, H.** (1954) Über das Verhältnis des oxidierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner. *Arch Mikrobiol* **20**, 176-182.
- Bosse, U., Frenzel, P., Conrad, R.** (1993) Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **13**, 123-134.
- Bosse, U. und Frenzel, P.** (1997) Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and rice plants (*Oryza sativa*). *Appl Environ Microbiol* **63**, 1199-1207.
- Both, G.J., Gerards, S. und Laanbroek, H.J.** (1990) Enumeration of nitrite-oxidizing bacteria in grassland soils using a Most Probable Number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure. *FEMS Microbiol Ecol* **74**, 277-286.
- Bremner, J.M. und Blackmer, A.M.** (1978) Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science* **199**, 295-296.
- Broda, E.** (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z Allg Mikrobiol* **17**, 491-493.
- Bührer, T., Peter, H., Simon, W.** (1988) NH_4^+ ion-selective microelectrode based on the antibiotics nonactin/monactin. *Pflügers Arch* **412**, 359-362.
- Buresh, R. J. und Austin E. R.** (1988) Direct measurements of dinitrogen and nitrous oxide flux in flooded rice fields. *Soil Sci Am J* **52**, 681-688.
- Buresh R. J. und DeDatta S. K.** (1990) Denitrification losses from puddled rice soils in the tropics. *Biol Fertil Soils* **9**, 1-13.
- Cassman, K.G., KropM.J., Gaunt, J., Peng, S.** (1993) Nitrogen use efficiency of rice reconsidered: what are the key constraints. *Plant Soil* **155**, 359-362.

- Cassman, K.G., Gines, G.C., Dizon, M.A., Samson, M.I., Alcantra, J.M.** (1996) Nitrogen-use efficiency in tropical lowland rice systems: contributions from indigenous and applied nitrogen. *Field Crops Res* **47**, 1-12.
- Cassman, K.G., Peng, S., Olk, D.C., Ladha, J.K., Reichardt, W., Doberman, A., Singh, U.** (1998) Canadian freshwater wetlands and climate change. *Field Crops Res* **56**, 7-39.
- Chen, C.C., Dixon, J.B., Turner, F.T.** (1980) Iron coatings on rice roots: Mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Sci Soc Am J* **44**, 635-638.
- Christensen, P. B.; Revsbech, N. P., Sandjensen, K.** (1994) Microsensor analysis of oxygen in the rhizosphere of the aquatic macrophyte *Littorella uniflora* (L) Ascherson. *Plant Physiol* **105**, 847-852.
- Clark, L.H. und Harris, W.H.** (1981) Observations on the root anatomy of rice (*Oryza sativa* L.). *Am J Bota* **68**, 154-161.
- Cochran, W. G.** (1950) Estimation of bacterial densities by means of the Most Probable Number. *Biometrics* **6**, 105-116.
- Colmer, T.D. und Bloom, A.J.** (1998) A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net flux along roots of rice and maize. *Plant Cell Envir* **21**, 240-246.
- Dauert, S. und Bachas, L. G.** (1989) Anion-selective electrodes based on a hydrophobic vitamin B12 derivative. *Anal. Chem.* **61**, 499-503.
- De Beer, D. und Sweerts, J-P.R.A.** (1989) Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode. *Anal Chim Acta* **219**, 351-356.
- De Beer, D., Sweerts, J-P.R.A., van den Heuvel, J. C.** (1991) Microelectrode measurement of ammonium profiles in freshwater sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **86**, 1-6.
- De Beer, D., Schramm, A., Santegoeds, C.M., Kühl, M.** (1997) A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. *Appl Envir Microbiol* **63**, 973-977.
- De Datta, S.K. und Buresh, R.J.** (1989) Integrated nitrogen management in irrigated rice. *Adv Soil Sci* **10**, 143-169.

- Di Spirito, A.A., Lipscomb, J.D., Hooper, A.B.** (1986) Cytochrome aa₃ from *Nitrosomonas europaea*. *J Biol Chem* **261**, 17048-17056.
- Doberman, A., Cassman, K.G., Mamarial, C.P., Sheehy, J. E.** (1998) Management of phosphorous, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice fields. *Field Crops Res* **56**, 113-138.
- Fillery, I.R.P., Simpson, J.R., DeDatta, S.K.** (1984) Influence of field environment and fertilizer management on ammonia loss from flooded rice. *Soil Sci Am J* **48**, 914-920.
- Fillery, I.R.P., Simpson, J.R., DeDatta, S.K.** (1986) Contribution of ammonia volatilization to total nitrogen loss after applications of urea to wetland rice fields. *Fertilizer Res* **8**, 193-202.
- Fillery, I.R.P., Roger, P.A., DeDatta, S.K.** (1986) Ammonia volatilization from nitrogen sources applied to rice fields: II. Floodwater properties and submerged photosynthetic biomass. *Soil Sci Soc Am J* **50**, 86-91.
- Flessa, H. und Fischer, W.R.** (1992) Plant-induced changes in the redox potentials of rice rhizosphere. *Plant Soil* **143**, 55-60.
- Freitag, A., Rudert, M., Bock, E.** (1987) Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiol Lett* **48**, 105-109.
- Freney, J.R., Trevitt, A.C.F., De Datta, S.K., Obcemea, W.N., Real, J.G.** (1990) The interdependence of ammonia volatilization and denitrification as nitrogen loss processes in flooded rice fields in the Philippines. *Biol Fertil Soils* **9**, 31-36.
- Frenzel, P., Rothfuss, F., Conrad, R.** (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosms. *Biol Fertil Soils* **14**, 84-89.
- Gamble, T.N., Betlach, M.R., Tiedje, J.M.** (1977) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl Environ Microbiol* **33**, 926-939.
- Gaudin, R. und Dupuy, J** (1999) Ammoniacal nutrition of transplanted rice fertilized with large urea granules. *Agron J* **91**, 33-36.

- Gilbert, B. und Frenzel, P.** (1995) Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biol Fertil Soils* **20**, 93-100.
- Gilbert, B. und Frenzel, P.** (1998) Rice roots and CH₄ oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil Biol Biochem* **30**, 1903-1916.
- Glover, H.E.** (1983) Measurement of chemoautotrophic CO₂ assimilation in marine nitrifying bacteria: an enzymatic approach. *Mar Biol* **74**, 295-300.
- Goreau, T.J., Kaplan, W.A., Wofsy, S.C., Malroy, M.B., Valois, F.W., Watson, S.W.** (1980) Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl Environ Microbiol* **40**, 526-532.
- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A., Kuenen, J.G.** (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1246-1251.
- Head, I.M., Hiorons, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R.** (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16 S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* **139**, 1147-1153.
- Henriksen, G.H., Bloom, A.J., Spanswick, R.M.** (1990) Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol* **93**, 271-280.
- Henriksen, G.H., Raman, D.R., Walker, L.P., Spanswick, R.M.** (1992) Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes. II. Patterns of uptake along the root axis and evaluation of the microelectrode flux estimation technique. *Plant Physiol* **99**, 734-747.
- Hooper, A.B.** (1969) Lag phase of ammonia oxidation of resting cells of *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **97**, 968-969.
- Hooper, A.B. und Terry, K.R.** (1974) Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J Bacteriol* **119**, 899-906.

- Hooper, A.B. und Di Spirito, A.A.** (1985) In bacteria which grow on simple reductants generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol Rev* **49**, 140-157.
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M.** (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 59-67.
- IRRI** (1989) IRRI toward 2000 and beyond. International Rice Research Institute, Philippinen.
- Jaeger, C.H., Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E., Firestone, M.K.** (1999) Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan [in process citation]. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2685-2690.
- Jensen, K., Revsbech, N.P., Nielsen, L.** (1993) Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3287-3296
- Jørgensen, B.B., Fossing, H., Wirsén, C.O., Jannash, H.W.** (1991) Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline. *Deep-Sea Res* **38**, 1083-1103.
- Johnstone, B.H., und Jones, R.D.** (1985) Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonium-oxidizing bacterium. *Mar Ecol Progr Ser* **26**, 175-179.
- Kirk, G.J.D.** (1993) Root ventilation, rhizosphere modification, and nutrient uptake by rice. In: Penning de Vries FWTea (Ed) System approaches for agricultural development (221-232). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kleiner, D.** (1985) Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 87-100.
- Klüber, H.D. und Conrad, R.** (1998) Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 301-318.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F. Shoun, H.** (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem* **271**, 16263-16267.

- Koops, K.-P., Harms, H., Wehrmann, H.** (1976) Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch Microbiol* **141**, 214-218.
- Kropff, M.J., Cassman, K.G., van Laar, H.H., Peng, S.** (1993) Nitrogen and yield potential of irrigated rice. *Plant Soil* **155**, 391-394.
- Krümmel, A. und Harms, H.** (1982) Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol* **133**, 50-54.
- Kühl, M. und Jørgensen, B.B.** (1992) Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfite oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1164-1174.
- Laanbroek, H.J. und Schotman, J.M.T.** (1991) Effect of nitrite concentration and pH on Most Probable Number enumeration of non-growing *Nitrobacter* spp.. *FEMS Microbiol Ecol* **85**, 269-278.
- Laanbroek, H. J. und Gerards, S.** (1993) Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. *Arch Microbiol* **159**, 453-459.
- Laanbroek, H. J.; Bodelier, P. L. E., Gerards, S.** (1994) Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Arch Microbiol* **161**, 156-162.
- Laskowski, D. und Morgan, J.T.** (1967) The effect of nitrate and nitrous oxide on hydrogen and methane accumulation in anaerobically-incubated soils. *Plant Soil* **27**, 357-368.
- Lerman, A.** (1979) Geochemical processes. Water and sediment environments. Wiley, New York: 481.
- Li, Y.-H. und Gregory, S.** (1974) Diffusion of ions in sea water and deep-sea sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **38**, 703-714.
- Lindau, C. W., DeLaune, R.D., Patrick, W. H. Jr., Bollich P. K.** (1990) Fertilizer effects on dinitrogen, nitrous oxide, and methane emissions from lowland rice. *Soil Sci Am J* **54**, 1789-1794.

- Lipschultz, F., Zafiriou, O.C., Wofsy, S.C., McElroy, M.B., Valois, F.W., Watson, S.W.** (1981) Production of NO and N₂O by soil nitrifying bacteria. *Nature* **294**, 641-643.
- Ma, L.W., Hongprayoon, C., Lindau, C.W., Selim, H.M.** (1995) Transport of urea in flooded soil profiles as affected by water percolation rates and NBPT. *Soil Sci* **160**, 101-110.
- Megraw, S. und Knowles, R.** (1987) Active methanotrophs suppress nitrification in a humisol. *Biol Fertil Soils* **4**, 581-605.
- Miller, A.J. und Zhen, R.-G.** (1991) Measurement of intercellular nitrate concentrations in *Chara* using nitrate-selective electrodes. *Planta* **184**, 47-52.
- Miller, D.J. und Wood, P.M.** (1983) The soluble cytochrome oxidase of *Nitrosomonas europaea*. *J Gen Microbiol* **129**, 1645-1650.
- Mosier, A. R., Chapman, S. L., Freney, J. R.** (1989) Determination of dinitrogen emission and retention in floodwater and porewater of a lowland rice field fertilized with ¹⁵N-urea. *Fertil Res* **19**, 127-136.
- Müller, B., Wehrli, B., Power, M., Vandermeer, J.R.** (1997) Structure and activity of microbial communities in sediments. *Chimia* **51**, 878-883.
- Oesch, U., Amman, D., Simon, W.** (1986) Ion-selective membrane electrodes for clinical use. *Clin Chem* **32**, 1448-1459.
- Painter, H.A.** (1986) Nitrification in the treatment of sewage and waste treatment. In: Posser, J.I. (Ed) Nitrification (185-211). IRL Press, Oxford.
- Ponnamperuma, F. N.** (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* **24**, 29-61.
- Poth, M.** (1986) Dinitrogen production from nitrite by *Nitrosomonas* isolate. *Appl Environ Microbiol* **52**, 957-959.
- Raimbault, M., Rinando, G., Garcia, J. L., Boureau, M.** (1977) A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **9**, 193-196.
- Reddy, K.R. und Patrick, W.H.** (1986) Fate of fertilizer nitrogen in the rice root zone. *Soil Sci Am J* **50**, 649-651.

- Reddy, K.R., Patrick, W.H., Lindau, C.W.** (1989) Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnol Oceanogr* **34**, 1004-1013.
- Rowe, R., Todd, R., Waide, J.** (1977) Microtechnique for Most Probable Number Analysis. *Appl Environ Microbiol* **33**, 675-680.
- Revsbech, N.P.** (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol Oceanogr* **34**, 474-478.
- Revsbech, N.P. und Jørgensen, B.B.** (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology. *Adv Micr Ecol* **9**, 293-352.
- Revsbech, N.P., Pedersen, O., Reichardt, W., Briones, A** (in press) Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere. *Biol Fertil Soil*: in press.
- Roy, R. und Conrad, R.** (1999) Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in oxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* **28**, 49-61.
- Roy, R. und Knowles, R.** (1994) Effects of methane metabolism on nitrification and nitrous oxide production in polluted freshwater sediment. *Appl Envir Microbiol* **60**, 3307-3314.
- Ryan, P.R., Newman, I.A., Shields, B.** (1990) Ion fluxes in corn roots measured by microelectrodes with ion-specific liquid membranes. *J Membr Sci* **53**, 59-69.
- Sachs, L** (1984) *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokoy
- Savant, N.K. und DeDatta, S.K.** (1982) Nitrogen transformation in wetland rice soils. *Adv Agro* **35**, 241-302.
- Schulthess, P., Ammann, D., Krätler, B., Caderas, C., Stepanek, R., Simon, W.** (1985) Nitrite-selective liquid membrane electrode. *Anal Chem* **57**, 1397-1401.
- Schütz, H., Holzapfel-Peschorn, A., Conrad, R., Renneberg, H., Seiler, W.** (1989) A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *J Geophys Res* **94**, 16405-16416.

- Seewaldt, E., Schleifer, K.-H., Bock, E., Stackebrandt, E.** (1982) The close phylogenetic relationship of *Nitrobacter* and *Rhodopseudomonas palustris*. *Arch Microbiol* **131**, 287-290.
- Sharma, B. und Ahlert, R.C.** (1977) Nitrification and nitrogen removal. *Wat Res* **11**, 897-925.
- Soliman, S.M. und Monem, M.A.S.A.** (1996) Effect of method of N-application and modified urea on N-15 recovery by rice. *Fert Res* **43**, 143-148.
- Soriano, S. und Walker, N** (1968) Isolation of ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *J Appl Bacteriol* **31**, 493-497.
- Stein, Y.L. und Arp, D.J.** (1998) Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1514-1521.
- Stenstrom, M.K. und Poduska, R.A.** (1980) The effects of dissolved oxygen concentrations on nitrification. *Wat Res* **14**, 643-649.
- Stepanek, R. , Kräutler, B., Schulthess, P., Lindemann, B., Amman, D, Simon, W.** (1986) Aquocyanocobalt (III)-hepta (2-phenylethyl)-cobyrinate as a cationic carrier for nitrite-selective liquid-membrane electrodes. *Anal. Chim. Acta* **182**, 83-90.
- Suratno, W., Murdiyarso, D., Suratmo, F.G., Anas, I., Saeni, M.S., Rambe, A.** (1998) Nitrous oxide flux from irrigated rice fields in west Java. *Environ Pollution* **102**, 159-166.
- Suzuki, I., Dular, U, Kwok, S.C.** (1974) Ammonia and ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas* cells and extracts. *J Bacteriol* **176**, 556-558.
- Suzuki, I. und Kwok, S.C.** (1981) A partial resolution and reconstitution of the ammonia-oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: role of cytochrome c_{554} . *Can J Biochem* **59**, 484-488.
- Sweerts, J-P.R.A und de Beer, D.** (1989) Microelectrode measurement of nitrate gradients in the littoral and profundal sediments of a meso-eutrophic lake (Lake Vechent, Netherlands). *Appl Environ Microbiol* **55**, 754-757.

- Teske, A., Alam, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittman, B.E., Stahl, D.A.** (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* **176**, 6623-6630.
- Uhel, C., Roumet, C., Salsac, L.** (1989) Inducible nitrate reductase of rice plants as a possible indicator of nitrification in waterlogged paddy soils. *Plant Soil* **116**, 197-206.
- Umezawa, Y.** (1990) CRC handbook of ion -selective electrodes: selectivity coefficients. CRC Press, Boca Raton.
- Verhagen, F.J.M. und Laanbroek, H.J.** (1991) Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3255-3263.
- Verhagen, F.J.M., Duyts, H., Laanbroek, H.J.** (1992) Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3303-3311.
- Verhagen, F.J.M., Hageman, P.E.J., Woldendorp, J.W., Laanbroek, H.J.** (1994) Competition for ammonium between nitrifying bacteria and plant roots in soil in pots - effects of grazing by flagellates and fertilization. *Soil Biol Biochem* **26**, 89-96.
- Vlek, P.L.G. und Byrnes, B.H.** (1986) The efficacy and loss of fertilizer N in lowland rice. *Fert Res* **9**, 131-147.
- Watson, S.W.** (1971) Reisolation of *Nitrosospira briensis* S. Winogradsky and H. Winogradsky. In: Buchanan, R.E. und Gibbons, N.E. (Ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., (450-456) Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Watson, S.W.** (1974) Taxonomic considerations of the family Nitrobacteraceae Buchanan. Requests for opinions. *Int J Syst Bacteriol* **21**, 254-270.
- Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.P., Hooper, A.B.** (1989) Nitrifying bacteria, S 1808-1834. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (Ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3. Williams und Wilkins, Baltimore.

- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H., Fox, G.E.** (1984a) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, 315-326.
- Woese, C.R., Weisburg, W.G., Hahn, C.M., Paster, B.J., Tanner, R.S., Krieg, N.R., Koops, H.-P., Harms, H., Stackebrandt, E.**, (1984b) The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, 327-336.
- Woese, C.R., Weisburg, W.G., Hahn, C.M., Paster, B.J., Zablen, L.B., Lewis, B.J., Macke, T.J., Ludwig, W., Stackebrandt, E.**, (1985) The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst Appl Microbiol* **6**, 25-33.
- Wood, P.M.** (1986) Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser, J.I. (Ed.) Nitrification. Special publication 20. Society for General Microbiology. IRL Press, Oxford.
- Wood, P.M.** (1988) Chemolithotrophy. In: Anthony C (Ed) Bacterial Energy Transduction (183-230) Academic Press, London.
- Wullenweber, M., Koops, H.P., Martiny, H.** (1978) Der Einfluß von Nitrit auf den Verlauf des Wachstums von *Nitrosomonas* Stamm Nm1. *Mitteilungen des Institutes für Allgemeine Botanik Hamburg* **16**, 159-164.
- Zehnder, A.J.B. und Stumm, W.** (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: Zehnder (Ed.) Biology of anaerobic microorganisms. (1-38) Wiley Interscience Publications, New York.
- Zumft, W.G.** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Molec Biol Rev* **61**, 533-616.