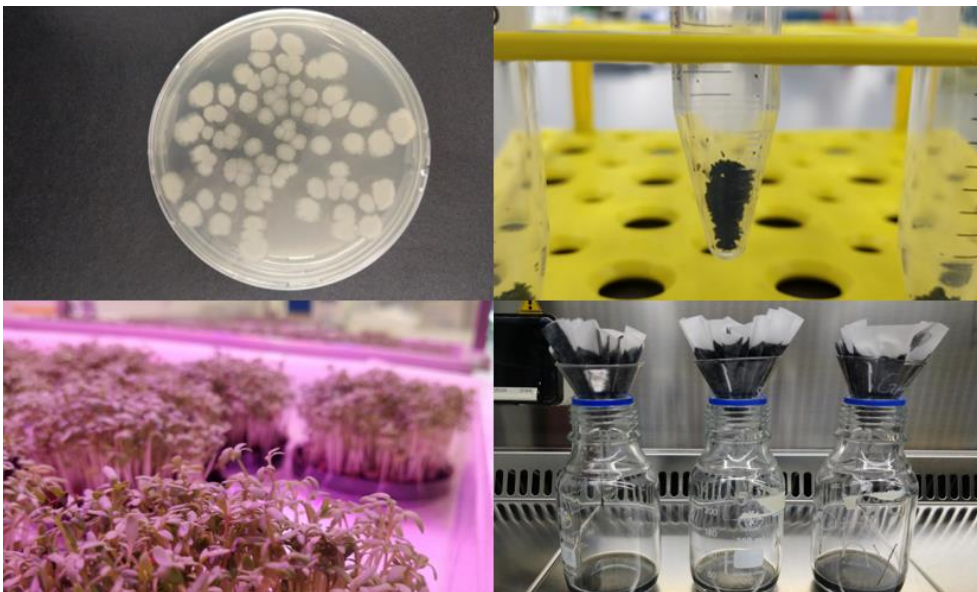


ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN

DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT

INSTITUT FÜR UMWELT UND NATÜRLICHE RESSOURCEN

# Entwicklung eines Beimpfungsverfahrens für Pflanzenkohle mit *Bacillus subtilis*



Bachelorarbeit von Samuel Gogniat

Bachelorstudiengang 2018

13.01.2022

Umweltingenieurwesen

KorrektorInnen:

Dr. Kulli Honauer, Beatrice

ZHAW, Schloss, 8820 Wädenswil, [REDACTED]

Dr. Fischer, Esther

ZHAW, Grüentalstrasse 14, 8820 Wädenswil, [REDACTED]

Mathis, Alex

ZHAW, Grüentalstrasse 14, 8820 Wädenswil, [REDACTED]

## Impressum

<b>Schlagworte</b>	Pflanzkohle, Bacillus subtilis, Inokulum, Beimpfung, shelf life, Oxidation, Kresse, Pythium ultimum
<b>Autor</b>	Samuel Gogniat, Bachelorstudiengang Umweltingenieurwesen (2018)
<b>KorrektorInnen</b>	Dr. Beatrice Kulli Honauer, ZHAW Life Sciences und Facility Management Dr. Esther Fischer, ZHAW Life Sciences und Facility Management Alex Mathis, ZHAW Life Sciences und Facility Management
<b>Zitiervorschlag</b>	Gogniat, S. (2022). Entwicklung eines Beimpfungsverfahrens für Pflanzkohle mit Bacillus subtilis
<b>Institut</b>	Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften Departement N: Life Sciences und Facility Management Campus Grüental 8820 Wädenswil

## Zusammenfassung

Die natürliche Heterogenität des Bodens ist das entscheidende Hindernis bei der Applikation pflanzen-nützlicher Organismen, weshalb eine Trägersubstanz benötigt wird, die den Zielorganismen ein geeig-netes Mikrohabitat bieten kann. Heute wird dazu meist Torf verwendet, der aber unter starker Kritik steht. In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Arbeiten publiziert, die Pflanzenkohle als Träger-mittel untersuchten. Demnach funktioniert die Beimpfung der Kohle, die Produkte können aber oft-mals nicht mit Torf als Trägersubstanz mithalten. Entsprechend sind weitere Optimierungen des Bei-mpfungsverfahrens notwendig.

In dieser Arbeit wurde ein Beimpfungsverfahren für Pflanzenkohle mit *Bacillus subtilis* entwickelt, und eine Optimierung durch eine Nährstoffanreicherung und Oxidation der Pflanzenkohle überprüft. Zu-dem wurde in einem fünfwöchigen Haltbarkeitsversuch die Lagerfähigkeit von unbehandelter und oxi-dierter Pflanzenkohle, beimpft mit *B. subtilis*, ermittelt. In einem letzten Schritt wurde getestet, ob beimpfte Pflanzenkohle (unbehandelt und oxidiert) *Pythium ultimum* bei Kresse zu unterdrücken ver-mag und dadurch das Kresse-Wachstum fördern kann.

Die Nährstoffanreicherung der Pflanzenkohle führte zu tieferen Zellzahlen im Inokulum, vermutlich weil sie eine Blockierung der Poren oder eine zu salzige Umgebung für *B. subtilis* verursachte. Im Ver-such zum Einfluss der Oxidation der Pflanzenkohle auf die Beimpfung konnte diese die resultierenden Zellzahlen signifikant erhöhen. In den folgenden Versuchen konnte die Wirkung aber nicht mehr nach-gewiesen werden und die Oxidation hatte weder einen Einfluss auf die Haltbarkeit der Formulierung noch auf die Wirkung gegen *P. ultimum* bei Kresse. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die Filtration während des Oxidierungsverfahrens zurückzuführen, denn erst in den Nachfolgever-suchen wurde auch die Kontrollkohle eingelegt und filtriert. Durch die Filtrierung wurden die kleinsten Kohlepartikel ausgewaschen, was zu einer höheren durchschnittlichen Porengrößenverteilung geführt haben könnte. Es ist anzunehmen, dass dadurch die Populationsgröße auf der beimpften Kohle erhöht wurde und die Porengrößenverteilung daher einen entscheidenden Faktor bei der Beimpfung von Pflanzenkohle darstellt. Die koloniebildenden Einheiten auf der eingelagerten Pflanzenkohle waren nach fünf Wochen signifikant tiefer als zu Beginn und entsprachen nicht den Qualitätsstandards. Eine vorgängige Abfiltrierung könnte die Ergebnisse verbessern. Das Inokulum zeigte eine positive Wirkung auf das Kresse-Wachstum und konnte den Befall durch *P. ultimum* vermindern. Diese Wirkung ist al-lerdings stärker auf die Pflanzenkohleapplikation als auf *B. subtilis* zurückzuführen. Möglicherweise hat die Pflanzenkohle die Nährstoffversorgung oder die physikalischen Eigenschaften des Substrates ver-bessert und die Vitalität der Kresse dadurch gefördert. Zudem hat die Behandlung mit beimpfter Pflan-zenkohle das Wachstum der Kresse im Vergleich zur Negativkontrolle nur leicht erhöht, was die Wich-tigkeit einer weiteren Optimierung des Verfahrens hervorhebt. Die in dieser Arbeit auf der Pflanzen-kohle erreichten Populationsgrößen entsprachen den Qualitätsstandards, weshalb das angewendete Verfahren erfolgsversprechend für weitere Verbesserungen ist.

## Abstract

The natural heterogeneity of soils is the key obstacle in the application of plant beneficial microorganisms, hence a carrier is needed that can provide a suitable microhabitat for the target organisms. Today, peat is generally the preferred material for this purpose, however it has been the subject of considerable criticism. In recent years, an increasing number of papers have been published that examined biochar as a new carrier substance. The inoculation of biochar has been successful, although the resulting products have not been able to compete with peat as a carrier substance in many cases. Accordingly, further optimisation of the inoculation process is needed.

In this thesis, an inoculation process for biochar with *Bacillus subtilis* was developed and further an optimisation through the nutrient enrichment and oxidation of biochar was tested. In addition, the shelf life of untreated and oxidised charcoal inoculated with *B. subtilis* was determined in a five-week shelf life trial. In a final experiment, it was assessed whether inoculated charcoal (untreated and oxidised) is able to suppress *Pythium ultimum* in cress and thus promote cress growth.

The nutrient enrichment of the biochar led to lower cell counts in the inoculum, presumably because it caused a blockage of pores or a too salty environment for *B. subtilis*. In the experiment assessing the influence of the biochar oxidation on the inoculation, oxidised biochar was able to host significantly higher cell counts. In the following tests, however, the effect could not be verified, and the oxidation had no influence on the shelf or the suppressive effect against *P. ultimum* in cress. These contradictory results are probably caused due to the filtration during the oxidation process, as only in the subsequent trials the control biochar was soaked and filtered as well. The filtration resulted in the leaching of the smallest biochar particles, which may have led to a higher average pore size distribution. It can be assumed that this process led to an increased population size on the inoculated biochar and hence the pore size distribution is a decisive factor in the inoculation process of biochar. The colony forming units on the inoculated biochar were significantly lower after five weeks of storage than at the beginning and did not meet the quality standards. Prior filtration may improve the results. The inoculum showed a positive effect on cress growth and was able to reduce infestation by *P. ultimum*. However, this effect was more strongly attributed to the biochar application than to *B. subtilis*. It might be that the biochar application has improved the nutrient supply or physical properties of the substrate and thus promoted the vitality of the cress. The treatment with inoculated biochar however increased the growth of cress only slightly compared to the negative control, which highlights the importance of further optimisation of the inoculation process. The population sizes achieved on the biochar in this thesis met the quality standards, thus the method used is promising for further improvements.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Theorieteil .....	3
2.1	Formulierung mikrobieller Produkte.....	3
2.1.1	Wahl des Mikroorganismus.....	3
2.1.1.1	Erwünschte Eigenschaften .....	3
2.1.1.2	Häufig verwendete Arten .....	4
2.1.1.3	Wirkungsweisen .....	5
2.1.1.4	Bacillus subtilis.....	6
2.1.2	Wahl der Formulierung .....	7
2.1.3	Wahl der Trägersubstanz.....	8
2.1.3.1	Erwünschte Eigenschaften .....	8
2.1.3.2	Häufig verwendete Träger.....	9
2.2	Pflanzkohle und ihre Eigenschaften .....	10
2.3	Analyse von Beimpfungsversuchen.....	12
2.3.1	Pflanzkohle .....	12
2.3.1.1	Chemische Eigenschaften.....	12
2.3.1.2	Physikalische Eigenschaften .....	14
2.3.2	Zielorganismus.....	16
2.3.3	Verfahren der Beimpfung.....	17
2.3.4	Wirkung inokulierter Pflanzkohle.....	21
2.4	Mögliche Optimierungen .....	24
3.	Methodik .....	26
3.1	Verwendete Pflanzkohle .....	26
3.2	Herstellung der Mutterkultur .....	27
3.3	CFU Bestimmung .....	28
3.4	Vorversuch: Optimale Inkubationszeit.....	28
3.5	Versuch 1: Nährstoffanreicherung .....	28
3.6	Versuch 2: Oxidation der Pflanzkohle .....	30
3.7	Versuch 3: Filtrationsversuch .....	31
3.8	Versuch 4: Haltbarkeit .....	32
3.9	Versuch 5: Kressetest .....	32
3.10	Statistische Auswertung.....	35

4.	Resultate.....	36
4.1	Vorversuch: Optimale Inkubationszeit.....	36
4.2	Versuch 1: Nährstoffanreicherung.....	36
4.3	Versuch 2: Oxidation der Pflanzenkohle.....	37
4.4	Versuch 3: Filtrationsversuch.....	38
4.5	Versuch 4: Haltbarkeit.....	39
4.6	Versuch 5: Kresstest.....	41
5.	Diskussion.....	45
6.	Schlussfolgerung.....	52
7.	Literaturverzeichnis.....	53
	Abbildungsverzeichnis.....	63
	Grafikverzeichnis.....	64
	Tabellenverzeichnis.....	65
	Formelverzeichnis.....	65
	Anhang.....	66
	Anhang A: Verwendete Nährsalze.....	66
	Anhang B: Verwendetes Substrat.....	66
	Anhang C: Eigenständigkeitserklärung.....	67

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMF</b>	arbuskuläre Mykorrhizapile (von engl. arbuscular mycorrhizal fungi)
<b>CFU</b>	Koloniebildende Einheiten (von engl. colony forming units)
<b>KAK</b>	Kationenaustauschkapazität
<b>LB-Medium</b>	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (von engl. lysogeny broth)
<b>PGPR</b>	pflanzenwachstumsfördernde Rhizobakterien ( von engl. plant growth promoting rhizobacteria)
<b>PAK</b>	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PK</b>	Pflanzkohle
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (Einheit, von engl. revolutions per minute)
<b>VOC</b>	Flüchtige organische Verbindungen (von engl. volatile organic compounds)
<b>WHK</b>	Wasserhaltekapazität
<b>YEM-Medium</b>	Nährmedium zur Kultivierung spezifischer Bakterien (von engl. yeast extract mannitol)

# 1. Einleitung

Eine intensive Landwirtschaft fordert einen hohen Einsatz an Dünge- und Pflanzenschutzmitteln, welche verschiedene Gefahren bezüglich Bodenfunktionalität, Biodiversität und menschlicher Gesundheit bergen (IAASTD, 2009). Eine schonendere Alternative dazu stellt der Einsatz von nützlichen Bodenorganismen dar, welche sowohl antagonistisch auf die im Boden lebenden Schadorganismen wirken können wie auch das Pflanzenwachstum positiv zu beeinflussen vermögen (Chandran et al., 2021; Shah et al., 2021; Shaikh et al., 2016). Die Idee, nützliche Mikroorganismen gezielt in der Landwirtschaft einzusetzen, besteht schon seit Jahrzehnten (Bashan et al., 2014; Santos et al., 2019; Stephens & Rask, 2000). Die kommerzielle Nutzung startete um 1895 und seither nahm das Interesse und die Forschung zu diesem Thema stetig zu (Herrmann & Lesueur, 2013; Vessey, 2003).

Die natürliche Heterogenität des Bodens ist das entscheidende Hindernis bei der Applikation pflanzen-nützlicher Organismen, da es den Mikroorganismen oft nicht gelingt, eine Nische zu finden (Bashan et al., 2014). So müssen die Nützlinge gegen die oft besser angepasste, bestehende Mikroflora konkurrieren und dem Prädationsdruck der Mikrofauna standhalten (Bashan et al., 2014; Shah et al., 2021). Zudem haben diverse abiotische Bodenparameter einen Einfluss auf die Stabilität und Wirkung einer ausgebrachten Population, dazu zählen etwa pH-Wert, Feuchtigkeit, Temperatur und Fruchtbarkeit eines Bodens (Shah et al., 2021). Entsprechend nehmen die Populationsdichten meistens bereits kurz nach der Applikation drastisch ab, wenn sie ohne passendes Trägermittel ausgebracht werden (Bashan et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013). Als Träger wird heute meist Torf verwendet, dessen Abbau aber wegen seinen gravierenden Auswirkungen auf Moor-Ökosysteme stark kritisiert wird (Rüttimann, 2019; Santos et al., 2019). Zudem werden durch die Trockenlegung der Moore als natürliche Kohlenstoffsinken grosse Mengen CO<sub>2</sub> frei, was bezüglich des Klimawandels ebenso bedenklich ist (Couwenberg, 2009). Daher ist es wichtig, neue Trägersubstanzen zu finden, die mit den hohen Standards von Torf mithalten können. In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Arbeiten publiziert, die Pflanzenkohle als Trägermittel für spezifische Beimpfungen untersuchten (Ajeng et al., 2020).

Der Einsatz von Pflanzenkohle in der Landwirtschaft wird als Möglichkeit betrachtet, die Bodenfruchtbarkeit zu steigern und durch die aktive Kohlenstoffspeicherung dem Klimawandel entgegenzuwirken (European Biochar Foundation, 2020). Pflanzenkohle bietet mit ihrer hohen inneren Oberfläche und physikalisch-chemischen Struktur gute Voraussetzungen für eine Interaktion mit Mikroorganismen (Ajeng et al., 2020). Erste Arbeiten zeigen, dass die Beimpfung der Kohle funktioniert, die Produkte aber oftmals noch nicht mit Torf als Trägersubstanz mithalten können (Ajeng et al., 2020; Vanek et al., 2016). Entsprechend sind weitere Optimierungen des Verfahrens notwendig (Ajeng et al., 2020; Hale et al., 2015; Vanek et al., 2016). Diese Arbeit soll sich mit der Weiterentwicklung des Beimpfungsverfahrens für Pflanzenkohle beschäftigen.

Als erstes werden im Rahmen einer Literaturrecherche bereits durchgeführte Beimpfungsversuche mit Pflanzenkohle im Hinblick auf das Vorgehen und den Erfolg zusammengetragen und analysiert. Es stellt sich dabei die Frage, welche Eigenschaften die Pflanzenkohle und Organismen für eine erfolgreiche Beimpfung mitbringen sollten und welcher Prozess erfolgsversprechend sein könnte. Mögliche Optimierungsmöglichkeiten sollen herausgearbeitet werden und in Laborexperimenten soll überprüft werden, ob diese zu höheren Populationsdichten auf der beimpften Kohle führen. Zudem soll die Lagerfähigkeit des modifizierten Produktes in einem Haltbarkeitsversuch untersucht werden. In einem letzten Schritt soll getestet werden, ob die Modifikation zu einem erhöhten Pflanzenwachstum und einer



verbesserten Unterdrückung von *Pythium ultimum* bei Kresse führen kann. Folgende Hypothesen sollen dabei überprüft werden:

- 1. Durch die gezielte Optimierung des Beimpfungsverfahrens können die Populationsdichten auf der Kohle nach der Beimpfung erhöht werden.**
- 2. Die Lagerfähigkeit von beimpfter Pflanzenkohle kann durch eine Optimierung des Beimpfungsverfahrens verlängert werden.**
- 3. Mit *Bacillus subtilis* beimpfte Pflanzenkohle kann *Pythium ultimum* bei Kresse unterdrücken und dadurch deren Wachstum fördern.**
- 4. Die Optimierung des Beimpfungsverfahrens führt zu einer verbesserten Unterdrückung *Pythium ultimum* bei Kresse und somit zu einem höherem Wachstum.**

## 2. Theorieteil

Der Theorieteil dieser Arbeit besteht aus vier Teilen. Im ersten Teil soll die Herstellung von mikrobiell angeimpften Düngern im Allgemeinen besprochen werden. Das Ziel dieses Teiles liegt darin, die wichtigsten Parameter und Anforderungen an die Wahl des Nützlings, der Trägersubstanz und des Beimpfungsprozesses zusammenzufassen, damit diese anschliessend auf die Herstellung beimpfter Pflanzenkohle übertragen werden können. Im zweiten Teil soll erläutert werden, durch welche Eigenschaften sich Pflanzenkohle auszeichnet und wie diese Eigenschaften durch die Wahl des Ausgangsmaterials und des Pyrolyseprozesses variieren können. Der dritte Teil soll schliesslich spezifisch Forschungsprojekte analysieren, die die gezielte Beimpfung von Pflanzenkohle untersuchten. Hier liegt das Hauptziel darin, eine Ausgangsbasis für die praktischen Versuche zu legen und mögliche Optimierungsmöglichkeiten für die Beimpfung von Pflanzenkohle herauszuarbeiten. Diese sollen im vierten Teil ausformuliert und dann in Laborexperimenten überprüft werden können.

### 2.1 Formulierung mikrobieller Produkte

Wie in der Einleitung (Kapitel 1) bereits erwähnt, stellt die Heterogenität des Bodens (biotisch und abiotisch) die entscheidende Herausforderung dar, wenn nützliche Bodenorganismen in der Landwirtschaft eingesetzt werden sollen (Bashan et al., 2014; Shah et al., 2021). So kann ein Organismus seine Wirkung unter Laborbedingungen möglicherweise optimal entfalten, doch anschliessend ein Produkt zu kreieren, welches auch unter Feldbedingungen ähnliche Resultate erzeugen kann, ist ein schwieriges Unterfangen (Herrmann & Lesueur, 2013; Stephens & Rask, 2000). Die Hauptkomponenten eines solchen Produktes stellen die Mikroorganismen, die Trägersubstanz und deren Formulierung dar. Gemäss Bashan et al. (2014) wird dabei unter Trägersubstanz das abiotische Substrat gemeint, welches im Formulierungsprozess genutzt wird. Unter Formulierung ist der Prozess der Vereinigung von Träger und Organismus zu verstehen und Inokulum meint das fertige Produkt, das sowohl Organismus und Träger enthält.

Das Resultat eines Produktes von hoher Qualität sollte eine hohe mikrobielle Biomassenproduktion, eine hohe Aktivität in der Rhizosphäre und ein guter physiologischer Zustand bei der Applikation sein, wodurch sich die Population schnell im Boden aufbauen kann (Bashan et al., 2014). Die Formulierung eines solchen Produktes ist ein mehrstufiges Verfahren, welches im Folgenden besprochen werden soll (Herrmann & Lesueur, 2013).

#### 2.1.1 Wahl des Mikroorganismus

Bereits die Wahl eines geeigneten Organismus ist von grosser Bedeutung und stellt der erste Schritt bei der Formulierung neuer Produkte dar. Im Folgenden soll besprochen werden, welche Eigenschaften ein Stamm für die Produktion eines Biodüngers aufweisen sollte, welche Arten dazu heute benutzt werden und welche Wirkungsmechanismen für die positiven Effekte verantwortlich gemacht werden. Schliesslich soll noch die hier verwendete Art, *Bacillus subtilis*, eingeführt und bezüglich dessen Wirkungsmechanismen besprochen werden.

##### 2.1.1.1 Erwünschte Eigenschaften

Das Ziel des ersten Schrittes ist es, ein «Elite-Stamm» zu wählen, der möglichst starke Effekte auf die Pflanzenvitalität hat und gleichzeitig trotzdem kompetitiv stark bleibt (Herrmann & Lesueur, 2013; Santos et al., 2019). Gemäss Herrmann & Lesueur (2013) wären wünschenswerte Eigenschaften eines Mikroorganismus für die Inokulation:

1. positive Effekte auf Wirtspflanze
2. gute Konkurrenzeigenschaften gegenüber vorhandenen Bodenorganismen
3. die Fähigkeit von der Applikationsstelle zum Wirt zu übersiedeln
4. die Möglichkeit zeitweise im Boden zu bestehen, auch wenn keine Wirtspflanze vorhanden ist
5. genetische Stabilität

Stephens & Rask (2000) kommen in ihrem Review-Paper zudem zum Schluss, dass verschiedene Stämme je nach Umweltbedingungen (Klima, Bodentyp, Bodenfeuchte etc.) und Kulturpflanze starke Unterschiede bezüglich ihrer Effektivität aufweisen. Entsprechend sollte der Stamm möglichst präzise auf die gewünschte Anwendung und das gewünschte Anwendungsgebiet selektiert werden. Dies kann damit gelöst werden, dass der Zielorganismus nicht aus einer Sammlung stammt, sondern direkt aus dem gewünschten Anwendungsgebiet aus dem Boden isoliert wird (Vasseur-Coronado et al., 2021). Andererseits kann die Schlussfolgerung von Stephens & Rask (2000) so interpretiert werden, dass eine möglichst hohe Effektivität und Effizienz unter möglichst vielen unterschiedlichen Umweltbedingungen wünschenswert wäre. Die Wahl eines geeigneten Stammes sollte verschiedene Feldversuche an unterschiedlichen Orten, sowie weitere Tests bezüglich Überlebensfähigkeit beinhalten und stellt daher ein mehrjähriger Prozess dar. In den letzten Jahren wurde viel Forschung bezüglich neuer Organismen und deren Wirkungsweise durchgeführt (Andy et al., 2020; Crossay et al., 2018; Vasseur-Coronado et al., 2021). Die wichtigsten Organismen sollen kurz vorgestellt werden.

#### 2.1.1.2 Häufig verwendete Arten

Im Reich der Pilze werden insbesondere arbuskuläre Mykorrhizapilze (engl. arbuscular mycorrhizal fungi «AMF») eingesetzt, welche als natürliche Symbionten von über 80% aller Landpflanzen gelten (Gosling et al., 2006; Herrmann & Lesueur, 2013; Verbruggen et al., 2013). Sie fördern einerseits das Wachstum der Pflanzen durch den direkten Nährstoffaustausch, können aber auch bodenbürtige Schadorganismen unterdrücken (Thakur, 2020; Verbruggen et al., 2013). AMF gehören zu der Abteilung der Glomeromycota, die meisten kommerziell erhältlichen Produkte basieren auf den Arten *Rhizoglyphus irregularis* oder *Funneliformis mosseae* (Giovannini et al., 2020). *Trichoderma harzianum* (kein AMF) aus der Familie der Hypocreaceae ist in vielen Formulierungen als Mykofungizid und Mykodünger erhältlich und wohl der bekannteste Vertreter der nützlichen Pilze in der Landwirtschaft (Thakur, 2020). Weitere Aktinomyceten, bei denen eine wachstumsfördernde und krankheitsunterdrückende Wirkung nachgewiesen werden konnte, sind den Gattungen *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* oder *Thermobifida* zuzuordnen (Merzaeva & Shirokikh, 2006).

Auf Seite der Bakterien stehen sogenannte pflanzenwachstumsfördernde Rhizobakterien (engl. plant growth promoting rhizobacteria «PGPR») im Zentrum. B. Kumari et al. (2019) definieren PGPR als wurzelbesiedelnde Bakterien, welche über direkte oder indirekte Mechanismen einen positiven Effekt auf Pflanzen ausüben. PGPR können weiter in extrazelluläre und intrazelluläre Bakterien unterteilt werden (Chandran et al., 2021). Die am häufigsten verwendeten extrazellulären Organismen sind den Gattungen *Azospirillum* oder *Bacillus* zuzuordnen, weitere bekannte Arten gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Serratia* oder *Micrococcus* (Chandran et al., 2021; Herrmann & Lesueur, 2013). Bei den intrazellulären Organismen sind insbesondere die Gattungen *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* von Bedeutung, weitere Vertreter stellen etwa *Mesorhizobium* oder *Frankia* dar (Chandran et al., 2021).

In den letzten Jahren wurden laut Santos et al. (2019) zudem vermehrt Produkte entwickelt, welche mehrere Stämme oder Arten beinhalten (sogenannte gemischte Inokulums oder Co-Inokulums), die

verschiedene mikrobielle Prozesse nutzen, um so die verschiedenen Vorteile der Arten zu kombinieren. Dadurch könnten Formulierungen nicht nur effektiver, sondern auch deren Anwendungsspektrum bezüglich Umweltfaktoren vergrößert werden (Mäder et al., 2011; Santos et al., 2019; Solanki et al., 2014). Allerdings sind die Interaktionen der verschiedenen Organismen noch wenig erforscht, wobei es wichtig wäre zu verstehen, ob es zu konkurrenzierenden oder symbiotischen Situationen kommt (Bashan et al., 2014). Auch wenn bereits verschiedene Produkte mit einer Mischung unterschiedlicher Arten auf dem Markt sind, braucht es diesbezüglich weitere Forschung (Santos et al., 2019). Zudem könnten sich technische Schwierigkeiten bei der Formulierung ergeben, da diese weniger genau auf den Zielorganismus angepasst werden kann (Bashan et al., 2014).

#### 2.1.1.3 Wirkungsweisen

Die Wirkungsweise dieser bodenbürtigen Organismen kann in direkte und indirekte Mechanismen unterteilt werden (Chandran et al., 2021; B. Kumari et al., 2019; Shah et al., 2021). Die direkten Mechanismen unterstützen das Pflanzenwachstum direkt durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Nährstoffen oder durch die Produktion von Phytohormonen (B. Kumari et al., 2019). Die beiden wichtigsten Mechanismen in diesem Zusammenhang stellen die Stickstofffixierung und Phosphorsolubilisierung dar (Chandran et al., 2021). Jedoch werden auch andere Mineralien gelöst und dadurch pflanzenverfügbar gemacht (Shah et al., 2021). Weiter produzieren gewisse PGPR auch Phytohormone wie Auxine, Cytokinine oder Gibberelline, welche das Pflanzenwachstum beeinflussen (Kudoyarova et al., 2014; Shahzad et al., 2016; P. Zhang et al., 2019). Besonders verbreitet unter PGPR ist die Möglichkeit Auxine zu produzieren, was für über 80% der Rhizobakterien möglich sein soll (Shah et al., 2021; P. Zhang et al., 2019). Auxine sind von Bedeutung im Prozess der Zellteilung und -differenzierung, der Keimung, dem Phototropismus, dem Geotropismus, bei der Biosynthese von Metaboliten und der Stresstoleranz vieler Pflanzen (Chandran et al., 2021). Durch die Produktion solcher Hormone können die Organismen in und um die Wurzel also ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Vitalität der Pflanze ausüben, indem sie die Stresstoleranz erhöhen und ein erhöhtes Wachstum induzieren.

Die indirekten Wirkungsmechanismen sind vielfältiger und komplexer. Darunter fällt beispielsweise der Antagonismus gegenüber Schaderregern (Chandran et al., 2021). Dieser zeigt sich einerseits durch einen natürlichen Konkurrenzeffekt: Können sich die pflanzenwachstumsfördernden Organismen im Wurzelraum des Wirtes etablieren, konkurrenzieren sie Pathogene um Platz und Nährstoffe und verhindern so eine Ausbreitung jener (Florio et al., 2017; Gu et al., 2020). Auf der anderen Seite produzieren insbesondere PGPR auch Metabolite mit antimikrobieller Wirkung oder Enzyme wie Chitinase, Protease und Lipase, welche eine Zellyse beim pathogenen Organismus bewirken können (S. Kumari et al., 2021; Solanki et al., 2014). Ein weiterer indirekter Wirkungsmechanismus stellt die induzierte Resistenz dar (Jogaiah et al., 2018; Le Mire et al., 2018). Dabei werden Moleküle (Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethen) produziert, welche der Pflanze eine Infektion vortäuschen, woraufhin diese ihre Abwehrmechanismen induziert (Doornbos et al., 2011; Hossain et al., 2017; Jogaiah et al., 2018; Le Mire et al., 2018). Dies kann durch physikalisch gestärkte Zellwände aber auch durch biochemische Reaktionen, wie der Bildung von Abwehrverbindungen, wie beispielsweise Peroxidase, geschehen (Mauch-Mani et al., 2017; Minaeva et al., 2018; Shaikh et al., 2016). Kommt es schliesslich tatsächlich zu einer Infektion durch Pathogene kann die Pflanze diese besser abwehren. Zuletzt können nützliche Bodenorganismen auch die Stresstoleranz bei Trockenheit oder Versalzung verbessern, indem sie die Osmoregulation durch die Abgabe von Osmolyte (bspw. Zucker, oder Aminosäuren) beeinflussen, die den Pflanzen helfen, den Zelldruck aufrecht zu halten (Ilyas et al., 2020; Yasin et al., 2018). All diese Mechanismen tragen zum Schutz der Pflanze vor abiotischem und biotischem Stress bei und beeinflussen daher

indirekt das Wachstum der Pflanze (Shah et al., 2021). Eine Kombination verschiedener Mechanismen (indirekt und direkt) ist in der Realität häufig, wahrscheinlich sogar bei den meisten Organismen vorhanden, was auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Organismus, *Bacillus subtilis*, ersichtlich wird. (Vessey, 2003).

#### 2.1.1.4 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* gehört zur Familie der Bacillaceae in der Abteilung der Firmicutes (Fritze, 2004). Das stäbchenförmige, gram-positive, aerobe Bakterium ist ca. 2 bis 6µm lang und weniger als 1µm dick (Alina et al., 2015; Errington & van der Aart, 2020). Die chemoheterotrophe Art ist einerseits beweglich, mit einer peritrichen Flagelle, kann aber auch Biofilme bilden (Alina et al., 2015). Zudem formt *B. subtilis* bei ungünstigen Umweltbedingungen (bspw. Nährstofflimitation) Endosporen, die äusserst resistent gegen extreme Temperaturen, Austrocknung oder ionisierende Strahlung sind (Higgins & Dworkin, 2012). Das Genom von *B. subtilis* wurde bereits 1997 vollständig sequenziert und seither gilt die Art als wichtiger Modellorganismus in der Forschung (Errington & van der Aart, 2020; Kunst et al., 1997). *B. subtilis* kommt weltweit in diversen Lebensräumen (sowohl aquatisch wie auch terrestrisch) vor und ist bekannt für seine Fähigkeit, die Rhizosphäre und Wurzeloberfläche von Pflanzen zu besiedeln (Earl et al., 2008; Hashem et al., 2019). Dabei fördert die Art das Pflanzenwachstum über diverse Wirkungsmechanismen.

Zu den wichtigsten Mechanismen gehört dabei die Produktion von organischen Säuren zur Phosphorsolubilisierung, wodurch der pflanzenverfügbare P-Gehalt im Boden ansteigt (Moreno-Lora et al., 2019; Saeid et al., 2018; Swain et al., 2012). Weiter kann *B. subtilis* die pflanzeigenen Mechanismen zur Eisenaufnahme aktivieren und die Eisenmobilität durch eine Ansäuerung der Rhizosphäre erleichtern (Blake et al., 2021; Freitas et al., 2015; H. Zhang et al., 2009).

Zusätzlich produziert *B. subtilis* Pflanzenhormone oder induziert die Produktion jener in der Pflanze selbst (Blake et al., 2021). Durch die Synthese von flüchtigen organischen Komponenten kann das Bakterium die Cytokinin- und Ethylen-Homöostase in seinen Wirtspflanzen beeinflussen (Ryu et al., 2003). Auch die Auxinproduktion soll über die Abgabe solcher Komponenten beeinflusst werden können ((Ali, 2015; H. Zhang et al., 2007). Einhergehend mit diesen Eingriffen in den Hormonhaushalt wurden ein höheres Wurzelwachstum (H. Zhang et al., 2007), ein höheres Triebwachstum (Egorshina et al., 2012) aber auch eine stärkere Behaarung der Wurzel (Araújo et al., 2005) in Verbindung gebracht. Neben der Wirkung auf den Hormonhaushalt der Pflanzen über organische Komponenten, wird auch die direkte Produktion von Phytohormonen, wie Cytokinin oder Gibberellin, für möglich gehalten (Arkhipova et al., 2005; Egorshina et al., 2012).

Weiter soll *B. subtilis* auch Trockenheits- und Salzstress bei verschiedenen Pflanzen reduzieren können (Blake et al., 2021; Gagné-Bourque et al., 2016; Hashem et al., 2019). Dies soll einerseits dadurch geschehen, dass *B. subtilis* die Genexpression seiner Wirtspflanze beeinflusst, wodurch die Biosynthese für die Stressregulation wichtiger Komponenten (z.B. Abscisinsäure) erhöht (Blake et al., 2021; Woo et al., 2020). Über welche Signalstoffe das Bakterium in diese Regulierungsmechanismen in der Pflanze eingreift, ist aber noch nicht geklärt (Woo et al., 2020). Zudem soll *B. subtilis* auch die Osmolyt-Akkumulation in Wurzel und Sprossen erhöhen und so ebenfalls einen Schutz vor Trockenheit bewirken (Gagné-Bourque et al., 2016).

*B. subtilis* kann aber nicht nur das Pflanzenwachstum fördern, sondern ebenso gegen Schädlinge wirken. So produziert die Art verschiedene Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften (Blake et al., 2021; Falardeau et al., 2013). Dazu zählen Lipopeptide, Exoenzyme und flüchtige organische

Verbindungen (Blake et al., 2021). So wird beispielsweise berichtet, dass *B. subtilis* Surfactin, ein Lipopeptid, produziert, welches die Zellmembran anderer Organismen zerstören kann (Fan et al., 2018). Durch die Produktion von Chitinase und Protease kann *B. subtilis* zudem antagonistisch auf pilzliche Schaderreger wirken, da diese Exoenzyme fähig sind, deren Zellwände abzubauen (Blake et al., 2021; Pant et al., 2015; Senol et al., 2014). Und bezüglich der induzierten Resistenz konnte aufgezeigt werden, dass *B. subtilis* Salicylsäure produziert, welche eine Resistenz der Wirtspflanzen gegen diverse Schädlinge auslöst (Kumar et al., 2012; Zhao et al., 2013).

Die Kombination dieser verschiedenen Mechanismen macht *B. subtilis* zu einer bekannten und beliebten Art bei der Produktion biologischer Pflanzenschutzmittel. Entsprechend sind in der Schweiz auch schon verschiedenen Produkte auf dem Markt, die *B. subtilis* beinhalten (Speiser et al., 2021).

Ist der zu verwendende Organismus bestimmt, folgt die Wahl der Formulierung, die im nächsten Kapitel besprochen werden soll.

### 2.1.2 Wahl der Formulierung

Wie in Kapitel 2.1 erwähnt, wird als Formulierung der Prozess verstanden, der den Organismus mit dem Träger zusammenführt (Bashan et al., 2014). Eine solche Formulierung zu erstellen, ist der entscheidende Schritt zur kommerziellen Nutzung von nützlichen Organismen, da sie bestimmend dafür ist, ob ein im Labor wirksamer Organismus mit gleichbleibender Qualität auch im Feld eingesetzt werden kann (Bashan et al., 2014; Berninger et al., 2018). Das Endprodukt kann drei verschiedene Formen haben: Es kann trocken (Pulver oder Granulat), schlammig (Pulver in Wasser) oder flüssig sein (Berninger et al., 2018; Herrmann & Lesueur, 2013). Die Applikation kann direkt über den Boden, über den Samen oder auch über die oberirdische Biomasse selbst erfolgen und entsprechend muss auch die Form des Inokulums gewählt werden (Bashan et al., 2014; Berninger et al., 2018). So sind flüssige Formulierungen beispielsweise besonders geeignet, wenn der Organismus über bestimmte oberirdische Organe (Stomata, Blüte) in die Pflanze eindringen sollte, hingegen ist die Behandlung von Samen nicht effektiv mit flüssigen Produkten (Bamdad et al., 2021; Berninger et al., 2018). Berninger et al. (2018) fassen weitere Faktoren zusammen, die bei der Wahl der Formulierung zu beachten sind: Die Formulierungstechnologie, die Ausbringungsmethode und verfügbare Ausrüstung, die Gewohnheiten der LandwirtInnen, pflanzeigene Merkmale (Saatgutgrösse, mehrjährig/einjährig, Empfindlichkeit etc.), das Entwicklungsstadium der Pflanze, die Kosten, der Wirkungsort und Besiedlungsweg des Inokulums.

Für die Formulierung selbst muss in jedem Fall zuerst eine Mutterkultur gezüchtet werden. Entscheidende Faktoren bei der Aufzucht der Mutterkultur sind der Sauerstoffgehalt, die Temperatur, die Schüttelgeschwindigkeit, sowie der pH-Wert (Stephens & Rask, 2000). Diese könnte theoretisch in den für Labors üblichen Kulturmedien herangezüchtet werden, was für die industrielle Produktion aber zu teuer wäre (Bashan et al., 2014; Lobo et al., 2019; Stephens & Rask, 2000). Die Nutzung von industriellen Abfallprodukten stellt aber grosse Herausforderungen in die Konstanz der Qualität und ist deshalb ebenso schwierig (Bashan et al., 2014; Lobo et al., 2019). Gemäss Stephens & Rask (2000) sollte die Mutterkultur mindestens eine Population von  $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> beherbergen.

Neben der Aufzucht der Mutterkultur ist die Sterilität des Trägermediums wichtig. Dabei kann neben der Autoklavierung auch die Sterilisation mit Gamma-Strahlen verwendet werden. Gemäss Bashan et al. (2014) ist der Vorteil dabei, dass praktisch keine chemischen und physikalischen Eigenschaften des Trägers verändert werden. Bei der Autoklavierung, insbesondere von organischem Material, sei dies möglich. Des Weiteren kann der Träger mit verschiedenen Komponenten angereichert werden, um die Wirkung und die Haltbarkeit des Produktes zu verbessern, dazu zählen etwa Makro- und

Mikronährstoffe, Kohlenstoff, Hormone oder sogar Fungizide (Herrmann & Lesueur, 2013). Am Schluss sollten gemäss internationalen Qualitätsstandards eine Populationsgrösse von ca.  $10^7$ - $10^9$  CFU  $g^{-1}$  auf dem Träger nachweisbar sein (Lobo et al., 2019; Sohaib et al., 2020; Vanek et al., 2016).

Der eigentliche Prozess der Formulierung ist schliesslich für jeden Träger und jede Applikationsart unterschiedlich. In dieser Arbeit soll Pflanzenkohle als eine neue Trägersubstanz untersucht werden. Inwiefern der Prozess der Beimpfung hierbei ablaufen könnte, wird in Kapitel 2.3.3 besprochen. Zunächst soll aber die Wahl des Trägermediums diskutiert werden.

### 2.1.3 Wahl der Trägersubstanz

Der Träger ist das Transportmittel der lebenden Organismen von der Fabrik aufs Feld und macht den grössten Anteil des Endproduktes sowohl bezüglich Gewicht wie auch Volumen aus (Bashan et al., 2014). Er sollte deshalb eine Reihe entscheidender Eigenschaften aufweisen, die im Folgenden besprochen werden sollen. Zudem sollen heute oft verwendete Trägermittel kurz vorgestellt werden.

#### 2.1.3.1 Erwünschte Eigenschaften

In erster Linie ist es von Bedeutung, dass der Träger dem Zielorganismus ein geeignetes Mikrohabitat bieten kann. Es muss dem Organismus im Boden zeitweise eine geschützte Nische bieten, dies entweder physikalisch, mit einer geschützten Oberfläche und Poren oder chemisch über die Verfügbarkeit von spezifischen Nährstoffen (Berninger et al., 2018; Herrmann & Lesueur, 2013). Weitere wichtige chemische und physikalische Voraussetzungen stellen eine hohe Wasserhaltekapazität, eine gute pH-Pufferkapazität und bestenfalls einen leicht anpassbaren pH-Wert dar (Herrmann & Lesueur, 2013). Zudem sollte der Träger steril oder gut und kostengünstig autoklavierbar sein (Bashan et al., 2014). Sterile Träger können höhere Populationen beherbergen und überzeugen mit einer längeren Haltbarkeit, insbesondere da sonst schnell wachsende Arten den gewünschten Organismus verdrängen könnten (Bashan et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013; Stephens & Rask, 2000). Stephens & Rask (2000) heben zudem die Einheitlichkeit der chemischen und physikalischen Parameter hervor, die für alle Träger eine absolute Voraussetzung sei. Sie begründen dies damit, dass die Trägersubstanz eine wesentliche Rolle in der Herstellung und der Endqualität spielt. Können messbare Kriterien, ob physikalisch, chemisch oder biologisch, nicht für jede Charge mit Sicherheit erfüllt werden, wird der Träger die Zuverlässigkeit jeder Formulierung limitieren. Eine hohe Stabilität ist bezüglich der Anwendung wichtig. Die Trägersubstanz sollte keine Klumpen bilden und fein mahlbar sein, damit sie mit anderen Chemikalien vermischt werden kann und auf dem Feld für die maschinelle Ausbringung geeignet ist (Herrmann & Lesueur, 2013). Das Produkt muss schliesslich so stabil sein, dass es während der Produktion, Verteilung, Lagerung und Applikation zu keinen Problemen kommt, insbesondere da es lebende Organismen beinhaltet, die anfällig auf Veränderungen sind (Bashan et al., 2014). Weiter hervorzuheben ist die Haltbarkeit (Bashan et al., 2014). Chemische Agrarprodukte setzen bezüglich Haltbarkeit, dem einfachen Handling und der Widerstandsfähigkeit bei unsachgemäsem Transport und Lagerung (zu hohe Temperaturen, Licht etc.) hohe Standards (Bashan et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013). Daher müssen Bioagencien ebenfalls eine möglichst lange Haltbarkeit aufweisen und möglichst wenig an Vitalität und Stabilität entlang der Lieferkette verlieren. Bashan et al. (2014) sprechen von einem Optimum von ein bis zwei Jahren bei Raumtemperatur. Herrmann & Lesueur (2013) nennen ein Minimum von 2-3 Monaten bei Raumtemperatur. Weiter sollte der Träger eine schnelle und kontrollierte Freigabe der Organismen im Boden in Nähe der Wirtswurzel sicherstellen (Herrmann & Lesueur, 2013). Die gewählte Substanz sollte zudem frei und konstant zu einem guten Preis verfügbar sein (Herrmann

& Lesueur, 2013). Und natürlich ist es ebenso von Bedeutung, dass der Träger umweltfreundlich ist, also auf jeden Fall biologisch abbaubar und nicht toxisch (Bashan et al., 2014). Welche Materialien diese Anforderungen am besten erfüllen und deshalb als Standardträger gelten soll im nächsten Kapitel besprochen werden.

#### 2.1.3.2 Häufig verwendete Träger

Gemäss Bashan et al. (2014) lassen sich heute verwendete Träger in fünf Kategorien unterteilen. Die erste Kategorie wird Böden (engl. Soils) benannt und darunter finden sich beispielsweise Torf, Kohle, Lehm und mineralisches Bodenmaterial. Die zweite Kategorie fasst verschiedene Pflanzenabfälle industriellen oder landwirtschaftlichen Ursprungs zusammen. Dazu zählen Kompost, Mist, aber auch verschiedene Presskuchen (Herrmann & Lesueur, 2013). In der dritten Kategorie werden inerte Materialien wie Polymere oder oft verwendete Gesteinsfragmente wie Perlit zusammengefasst (Bashan et al., 2014). Die vierte Kategorie umfasst lyophilisierte Kulturen oder Öl-getrocknete Bakterien. Und schliesslich sind in der fünften Kategorie verschiedene Flüssigimpfstoffe zusammengefasst, bei denen Chemikalien zugefügt wurden, um beispielsweise die Stabilität, Dispersion oder Funktion zu beeinflussen.

Torf erfüllt einen Grossteil der vorgestellten Anforderungen und ist deshalb vielfach die erste Wahl als Trägersubstanz, insbesondere bei bakteriellen Formulierungen (Herrmann & Lesueur, 2013; Stephens & Rask, 2000). Es bietet eine nährstoffreiche und geschützte Umgebung, da es sowohl auf der Oberfläche wie auch in den Rissen besiedelt werden kann und aus einem hohen Anteil organischem Material besteht (Herrmann & Lesueur, 2013; Santos et al., 2019). Weitere Vorteile von Torf sind gemäss Herrmann & Lesueur (2013), die gute pH-Pufferkapazität, dass der Wassergehalt gut angepasst werden kann und die Wasserhaltekapazität hoch ist und schliesslich auch, dass es für ein breites Spektrum an Organismen geeignet ist. Doch Torf steht auch sehr stark in Kritik, da der Torfabbau sensible Moor-Ökosysteme zerstört und sein biologischer Abbau nach der Ausbringung beachtliche Mengen CO<sub>2</sub> produziert (Couwenberg, 2009; Rüttimann, 2019; Santos et al., 2019). Dies schränkt die konstante, kostengünstige Verfügbarkeit der Substanz ein (Santos et al., 2019; Stephens & Rask, 2000). Als weitere Nachteile führen Herrmann & Lesueur (2013) die Möglichkeit auf, dass bei der unsachgemässen Trocknung und Sterilisation toxische Komponenten freigesetzt werden könnten, dass die Stabilität bezüglich der Zusammensetzung und Qualität stark variieren kann und dass die Substanz zunehmend teurer wird. Trotzdem bleibt Torf bis heute der Standardträger und wird als Vergleichswert für neue Substanzen herangezogen (Bashan et al., 2014).

Perlit, ein mineralisches Vulkangestein, wird ebenfalls oft als Trägersubstanz eingesetzt und kann bezüglich Effektivität mit Torf mithalten (Albareda et al., 2008; Bamdad et al., 2021; Daza et al., 2000; Temprano et al., 2002). Das Gestein ist aber ebenfalls eine nicht-erneuerbare Ressource und dessen Abbau nicht unbedenklich (Araujo et al., 2020). Auch Tone und Silikate (bspw. Vermiculit, Sepiolith, Attapulgit) sind leicht verfügbare und kostengünstige Träger, haben aber tiefere Nährstoffgehalte, eine höhere Schüttdichte und können bezüglich der möglichen Besiedlungsdichte weniger gut mit Torf mithalten (Albareda et al., 2008; Bamdad et al., 2021). Der Einsatz von Kompost oder ähnlichen organischen Abfällen stellt insbesondere bei der Sterilität Probleme dar, zudem ist die Einheitlichkeit oft nicht gegeben (Bashan et al., 2014; Santos et al., 2019). Lyophilisierte Bakterien überzeugen zwar mit einer sehr hohen Haltbarkeit und sind im Handling einfach, benötigen hingegen in der Herstellung spezielles Equipment und verursachen entsprechend höhere Kosten (Santos et al., 2019). Dasselbe gilt für Formulierungen mit künstlich eingekapselten Organismen, die technisch sehr viel aufwendiger und teurer sind (Herrmann & Lesueur, 2013; Santos et al., 2019). Zudem verursachen flüssige Produkte



höhere Transport- und Lagerkosten (Bamdad et al., 2021). In den letzten Jahren wurden erste Arbeiten mit Pflanzenkohle als Trägersubstanz für Beimpfungen publiziert, welche im Folgenden genauer analysiert werden sollen. Zunächst soll aber definiert werden, was Pflanzenkohle ist und durch welche Eigenschaften sie sich auszeichnet.

## 2.2 Pflanzenkohle und ihre Eigenschaften

Pflanzenkohle wird durch die European Biochar Foundation EBC (2020) als feste, heterogene Substanz definiert, welche reich an polyaromatischen Kohlenstoffen ist. Sie wird durch die Pyrolyse, die thermochemische Umwandlung unter sauerstoffarmen bis sauerstofflosen Verhältnissen, aus Biomasse hergestellt. Dabei werden Temperaturen zwischen 350°C und 1000°C angestrebt (Hagemann et al., 2016). Während der Pyrolyse wird der Kohlenstoff des Ausgangsmaterials konzentriert und andere Elemente in Dampf emittiert (Hassan et al., 2020; Shackley et al., 2013). Pflanzenkohle hat eine hohe spezifische Oberfläche und eine hohe Porosität (Lopez-Capel et al., 2013). Dadurch kann die Kohle bis zur fünffachen Menge ihres Eigengewichts an Wasser aufnehmen (Schmidt, 2011). Weiter ist die Kohle meist alkalisch (Lopez-Capel et al., 2013) und hat eine hohe Kationenaustauschkapazität (KAK), die mit der Alterung der Kohle weiter steigt (Schmidt, 2011; Wang et al., 2020). Diese Eigenschaften sprechen in Bezug mit den in Kapitel 2.1.3.1 erwähnten Anforderungen an Trägersubstanz dafür, dass sich Pflanzenkohle als solche eignen könnte. Die Pyrolysetemperatur und das Ausgangsmaterial der Pflanzenkohle haben jedoch einen starken Einfluss auf die resultierenden chemischen und physikalischen Eigenschaften (Hassan et al., 2020; Lopez-Capel et al., 2013).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht, wie sich die Pyrolysetemperatur und das Ausgangsmaterial auf die Eigenschaften der Pflanzenkohle auswirken. Mit steigender Pyrolysetemperatur nimmt die spezifische Oberfläche und die Kohlenstoffkonzentration zu (Hassan et al., 2020; Rafiq et al., 2016; Weber & Quicker, 2018). Dies liegt daran, dass mit zunehmender Temperatur mehr Substanz der ursprünglichen Biomasse verdampft und das Kohlenstoffgerüst deshalb stärker kondensiert (Hassan et al., 2020). Als Folge nehmen auch die funktionellen, sauerstoffhaltigen Gruppen (Carboxyl- und Phenolgruppen) auf der Oberfläche ab, wodurch das H/C- und O/C-Verhältnis ebenfalls abnehmen (Hassan et al., 2020; Rafiq et al., 2016; Weber & Quicker, 2018). Die KAK nimmt deshalb mit einer Erhöhung der Pyrolysetemperatur ebenfalls ab, da sie in einem starken Zusammenhang mit den funktionellen Gruppen steht (Hassan et al., 2020; Kloss et al., 2012). Die Kohle ist infolge weniger reaktiv, hydrophober, hingegen langlebiger und stabiler (Hassan et al., 2020). Weiter beeinflusst die Pyrolysetemperatur auch den pH-Wert, dieser steigt mit steigenden Prozesstemperaturen (Li et al., 2019; Pariyar et al., 2020; Weber & Quicker, 2018). Dies ist hauptsächlich auf die Spaltung schwacher Bindungen (z.B. Hydroxylbindungen) innerhalb der Kohle bei hohen Temperaturen zurückzuführen (Li et al., 2019). Als Folge dieser Zusammenhänge interagieren Pflanzenkohlen mit tieferen Prozesstemperaturen eher über elektrostatische, ionische oder polare Interaktionen, während hohe Temperaturen Interaktionen über Porenfüllung, hydrophobe Wechselwirkungen und Ausfällungen fördern (Hassan et al., 2020).

Aber auch das Ausgangsmaterial hat einen wesentlichen Effekt auf das Endprodukt. So ist die Porengrößenverteilung eine direkte Folge der Struktur des Ausgangsmaterials (Downie et al., 2009; Lopez-Capel et al., 2013). Pflanzenkohle aus Holz behält beispielsweise die Struktur von Phloem, Xylem und Zellstruktur weitgehend aufrecht und die entstanden Poren ähneln zusammenhängenden Kammern mit Durchmessern von 5-10µm (Abit et al., 2012; Downie et al., 2009). Im Gegensatz dazu ist Kohle aus Mist eher amorph mit sehr vielen Mikro- und Nanoporen und wenigen grösseren Poren. Dies wiederum beeinflusst die Wasserhaltekapazität, mehr kleine Poren sorgen für eine höhere

Wasserhaltekapazität (Hale et al., 2015; Lopez-Capel et al., 2013; Vanek et al., 2016). Viele schwache Verbindungen, die während der Pyrolyse gelöst werden können, führen zudem zu einem höheren pH-Wert (Hassan et al., 2020). Deshalb hat Pflanzenkohle aus Klärschlamm oder Mist einen höheren pH-Wert als Pflanzenkohle aus Holz. Zudem wandeln sich Zellulose und Hemizellulose bei weitaus niedrigeren Prozesstemperaturen als Lignin um, wodurch das Ausgangsmaterial schneller seine Struktur verliert und die mechanische und thermische Stabilität weniger hoch ist (Hassan et al., 2020; Kloss et al., 2012). Und schlussendlich haben gras- oder mistbasierte Pflanzenkohlen gemäss Hassan et al. (2020) mehr sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen als aus Holz hergestellte Kohle. Dadurch haben sie entsprechend wiederum eine höhere Polarität, Hydrophilität, eine höhere KAK und eine tiefere Stabilität (Hassan et al., 2020; Weber & Quicker, 2018). Auf Holzbasis hergestellte Pflanzenkohle seien hingegen wiederum kohlenstoffhaltiger, höher kondensiert und daher stabiler gegenüber thermischem Abbau. Daher sind holzige Kohlen eher an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt, während Kohlen aus Mist oder Gras eher über elektrostatische Interaktionen mit der Umgebung in Kontakt treten (Hassan et al., 2020).

All diese Zusammenhänge könnten einen wesentlichen Effekt auf die Fähigkeit einer Kohle haben, mit Mikroorganismen besiedelt zu werden. Im folgenden Kapitel soll deshalb anhand bereits durchgeführter Beimpfungsversuche evaluiert werden, welche Pflanzenkohlen dafür besonders geeignet sind.

Tabelle 1: Einfluss der Pyrolysetemperatur und des Ausgangsmateriales auf diverse Eigenschaften der resultierenden Pflanzenkohle. Die Strukturierung des Ausgangsmateriales wurde gemäss den vier Kategorien von Hassan et al. (2020) definiert. Die Strukturierung gestaltet sich demnach wie folgt: Hartholz > Weichholz > Gras > Mist.

	Steigende Pyrolysetemperatur	Steigende Strukturierung des Ausgangsmateriales
Ertrag	sinkt	steigt
C-Konzentration (%)	steigt	steigt
Aschegehalt (%)	steigt	sinkt
Aromatizität	steigt	steigt
Funktionelle Gruppen	sinkt	sinkt
H/C, bzw. O/C	sinkt	sinkt
KAK	sinkt	sinkt
Reaktivität	sinkt	sinkt
Polarität	sinkt	sinkt
Hydrophobizität	steigt	steigt
Thermische Stabilität	steigt	steigt
pH-Wert	steigt	sinkt
Spezifische Oberfläche	steigt	steigt
Durchschnittliche Porengrösse	steigt	steigt
Wasserhaltekapazität	steigt	sinkt

## 2.3 Analyse von Beimpfungsversuchen

In den letzten Jahren wurden erste Beimpfungsversuche mit Pflanzenkohle durchgeführt. Für dieses Kapitel konnten 20 Publikationen gefunden werden, die sich mit der Beimpfung von Pflanzenkohle auseinandergesetzt haben. In zwei dieser Arbeiten wurden Versuche bezüglich des Beimpfungsprozesses durchgeführt, in zehn Arbeiten wurde die Haltbarkeit (shelf-life) von mikrobiellen Formulierungen mit Pflanzenkohle untersucht und in zwölf Arbeiten wurden solche Formulierungen an Pflanzen getestet. Zudem beschäftigten sich drei Arbeiten mit der Möglichkeit zur Sanierung von schwermetallbelasteten Böden. Der Erfolg der Beimpfung hängt stark von den genutzten Trägerstoffen, den Eigenschaften der Zielorganismen, sowie dem Immobilisierungsverfahren ab (Ajeng et al., 2020). Entsprechend sollen im folgenden Kapitel diese drei Faktoren separat besprochen werden. Abschliessend soll die Wirkung der Pflanzenkohle-Formulierungen angeschaut werden. Das Ziel dieses Kapitels liegt darin, wichtige Voraussetzungen für die Beimpfung von Pflanzenkohle zu bestimmen und Optimierungsmöglichkeiten festzuhalten.

### 2.3.1 Pflanzenkohle

In den analysierten Versuchen wurde eine Vielzahl von Ausgangsmaterialien und Pyrolyseprozesse verwendet, was, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, Auswirkungen auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Pflanzenkohlen hat. Diese wiederum haben einen Einfluss auf den Prozess der Besiedelung (Hale et al., 2015; Husna et al., 2019; Zheng et al., 2019). Folglich ist es von Bedeutung zu verstehen, welche Eigenschaften der Pflanzenkohlen eine positive Wirkung auf die Inokulation haben und durch welche Prozessparameter diese gesteuert werden könnten. Dies soll im Folgenden besprochen werden.

#### 2.3.1.1 Chemische Eigenschaften

Ein bedeutender chemischer Parameter stellt der pH-Wert dar: Er beeinflusst den mikrobiellen Metabolismus, wie auch die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Spurenelementen und gehört daher zu den wichtigsten Umweltfaktoren für mikrobielle Populationen (Jin & Kirk, 2018; Ratzke & Gore, 2018). Da verschiedene Arten ihr optimales Wachstum in unterschiedlichen Säurebereichen erreichen, ist es nicht möglich, ein allgemeingültiges Optimum für den pH-Wert von Pflanzenkohle bei der Inokulation zu definieren (Jin & Kirk, 2018). Dieses ist von den Eigenheiten des ausgewählten Organismus abhängig. In verschiedenen Arbeiten konnte jedoch beobachtet werden, dass der pH der verwendeten Kohle ein entscheidender Faktor bezüglich der Überlebensfähigkeit der Organismen war (Głodowska et al., 2016, 2017; Husna et al., 2019; Sun et al., 2016; Zheng et al., 2019).

Relativiert wird die Bedeutung des pH-Wertes durch die Studie von Hale et al. (2015). Die AutorInnen untersuchten Pflanzenkohlen aus fünf verschiedenen Ausgangsmaterialien auf deren Fähigkeit, *Enterobacter cloacae* als Träger im Boden anzusiedeln. Dazu wurde die Pflanzenkohle mit dem Bakterium beimpft und mit nicht-sterilisierter Erde gemischt. Die Populationsgrösse wurde mittels eines quantitativen PCR-Test direkt nach der Beimpfung sowie erneut nach vier Wochen bestimmt. Hale et al. (2015) untersuchten in einem weiteren Schritt die Korrelationen der erhobenen Kohleparameter mit den gemessenen Populationsdichten. Dabei konnte festgestellt werden, dass unmittelbar nach der Inokulation eine Korrelation zwischen der Populationsdichte und dem pH-Wert vorhanden war, wobei sich der optimale Wert (95% Bereich) für den untersuchten Bakterienstamm zwischen 7.9 und 8.3 befindet. Nach vier Wochen war dieser Unterschied aber nicht mehr bemerkbar und keine Korrelation von Populationsgrösse und pH-Wert mehr vorhanden. Entsprechend kommen die AutorInnen zum

Schluss, dass der pH-Wert der Pflanzenkohle mittelfristig keinen Einfluss auf die Populationsdichte hat. Der bedeutende Unterschied zwischen dieser Studie und jenen, die den pH-Wert als wichtigen Parameter hervorheben, ist, dass Hale et al. (2015) nicht die Lagerung des Inokulums untersuchten, sondern dessen Entwicklung im Boden. Es scheint schlüssig, dass im Boden die negativen Eigenschaften eines pH-Wertes ausserhalb des optimalen Bereichs besser ausgeglichen werden können, als dies bei einem Lagerungsversuch in einem Plastiksack möglich ist. Entsprechend merken die AutorInnen auch an, dass der pH-Wert eine wichtige Eigenschaft der verwendeten Pflanzenkohle darstelle, wenn es darum gehe, das Inokulum zu lagern, nicht aber wenn die Kohle anschliessend direkt ausgebracht wird. Für ein kommerzielles Produkt ist die Haltbarkeit aber entscheidend, wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben wurde, da die Produkte in der Regel immer zuerst Vertrieben werden müssen.

Eine gänzliche andere Herangehensweise wählten Vanek et al. (2016), die für ihre Arbeit 32 verschiedene Pflanzenkohlen aus 14 verschiedenen Ausgangsmaterialien als mögliches Habitat für *Rhizobium tropici* untersuchten. Sie passten den pH-Wert der Kohlen unter Verwendung von  $\text{CaCO}_3$  oder HCl jenem von Torf an, welcher in den Versuchen als Kontrolle diente. Bei einer industriellen Herstellung inokulierter Pflanzenkohle könnte dies eine Möglichkeit darstellen, den Trägerstoff möglichst präzise auf den verwendeten Zielorganismus abzustimmen. So ist auch in Kapitel 2.1.3.1 die leichte Anpassbarkeit des pH-Wertes als vorteilhafte Eigenschaft einer Trägersubstanz aufgeführt. Eine Anpassung des pH-Wertes wäre auch über die Pyrolysebedingungen oder der gezielten Zugaben von Additiven vor der Pyrolyse möglich (Vanek et al., 2016).

Eine weitere chemische Eigenschaft, die für die Profilierung von mikrobiellen Populationen von Bedeutung ist, stellt der Mikro- und Makronährstoffgehalt dar. So nennen Husna et al. (2019) die Nährstoffverfügbarkeit als einen weiteren wichtigen Parameter, da die Nährsalze die Energiequelle der Organismen auf der Kohle seien und somit deren Überlebensfähigkeit erhöhen. Dass der Nährstoffgehalt, gemessen im EC-Wert oder als Mineralgehalt in der Asche wichtig für die Überlebensfähigkeit der inokulierten Organismen ist, wird auch in anderen Studien erwähnt (Ghazi, 2017; Głodowska et al., 2016; Liu et al., 2017; Sun et al., 2016; Vanek et al., 2016; Zheng et al., 2019). Liu et al. (2017) beispielsweise haben Pflanzenkohle aus Maisstroh mit verschiedenen Lösungen (Aceton, Säure, Lauge, Wasser) gewaschen, 12 Stunden mit *Bacillus mucilaginosus* inokuliert und anschliessend dessen Populationsgrösse bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die gewaschene Pflanzenkohle in allen Varianten signifikant tiefere Populationsgrössen beherbergte als die ungewaschene Kohle. Dies wird auf die Auswaschung wichtiger Komponenten für das mikrobielle Wachstum zurückgeführt, wobei anzunehmen ist, dass die Mikro- und Makronährstoffe dabei eine entscheidende Rolle spielen. Ähnliches konnten Vanek et al. (2016) feststellen, die nach dem Waschen einer Hartholzkohle mit Aceton und verschiedener anderen Kohlen mit 1%-HCL und Aceton ebenfalls tiefere Populationsdichten beobachteten. Vanek et al. (2016) führten jedoch auch einen Versuch durch, bei dem die Nährstoffkonzentration des Nährmediums während der Inokulation erhöht (um den Faktor drei und sechs) und die bakterielle Abundanz von *R. tropici* nach einem Monat bestimmt wurde. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weshalb gefolgert wird, dass die Organismen nach einem Monat nicht nährstofflimitiert waren. Allerdings ist hier anzumerken, dass Vanek et al. (2016) bei der Inokulation der Kontrolle ebenfalls eine Nährlösung (YEM) zugaben. Entsprechend ist es nicht möglich zu beurteilen, ob es auf der Kohle alleine zu einer Nährstofflimitation gekommen wäre. Gegenteilige Erkenntnisse bezüglich Nährstoffgehalt sind in der Arbeit von Araujo et al. (2020) zu finden. Die AutorInnen haben für ihren Lagerungsversuch unter anderem zwei Pflanzenkohlen verwendet. Eine wurde aus Kiefernrinde hergestellt, die andere aus Klärschlamm. Jene Kohle aus Klärschlamm hatte dabei einen deutlich höheren EC-Wert (3.01 im Vergleich zu  $0.10 \text{ dS m}^{-1}$ ). In dem 365-tägigen Versuch hatte die Pflanzenkohle aus Klärschlamm aber

bereits nach drei Monaten eine signifikant tiefere Populationsdichte als die Kohle aus Kiefernrinde. Ob der Nährsalzgehalt aber der ausschlaggebende Parameter war, lässt sich hier nicht abschliessend klären. Auch bei Hale et al. (2015) wird die Rolle des Nährstoffgehaltes relativiert. So konnte zwar unmittelbar nach der Inokulation einen signifikanten Effekt des Stickstoffgehaltes auf die Populationsgrösse festgestellt werden, nach vier Wochen im Boden war dieser aber, ebenso wie beim pH-Wert, nicht mehr von Bedeutung. Dies würde wiederum andeuten, dass der Nährstoffgehalt der Kohlen für die Inokulation und Lagerung von Bedeutung ist, nicht aber für die Populationsentwicklung im Boden. Bei der Studie von Hale et al. (2015) wurde das Inokulum, im Gegensatz zu der Arbeit von Vanek et al. (2016), in einer sterilen NaCl-Lösung (0.85%) gefertigt. Sun et al. (2016) stellten diesbezüglich fest, dass die Zugabe von LB-Medium während der Inokulation die Abundanz von *Pseudomonas putida* in einem Lagerversuch zumindest kurzfristig verbesserte, nach 5 Monaten waren die Unterschiede aber ebenfalls nicht mehr bemerkbar. Auf die unterschiedliche Vorgehensweise im Verfahren soll in Kapitel 2.3.3 weiter eingegangen werden, an dieser Stelle kann aber festgehalten werden, dass der Einfluss des Nährstoffgehaltes der Pflanzenkohle auf deren Beimpfung nicht abschliessend geklärt werden kann.

Eine weitere wichtige Energiequelle für die Mikroorganismen stellt Kohlenstoff selbst dar. Die labile Kohlenstofffraktion könnte demnach in den oben erwähnten Waschversuchen ebenfalls ausgewaschen worden sein, was daher als negativ für die inokulierten Bakterien gewertet werden kann (Liu et al., 2017; Vanek et al., 2016). Das der labile oder gelöste Kohlenstoff die Trägereigenschaft von Pflanzenkohle fördert, vermuten auch andere AutorInnen (Azeem et al., 2021; Hale et al., 2014; Vanek et al., 2016; Zheng et al., 2019). Auf der anderen Seite kann Pflanzenkohle, insbesondere bei tiefen Pyrolysetemperaturen, flüchtige organische Verbindungen (engl.: volatile organic compounds VOC) enthalten, welche eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen haben können (Azeem et al., 2021; Hale et al., 2015; Sun et al., 2016). Inwiefern dies aber der Fall ist, wurde nicht untersucht.

Ein weiterer Parameter bezüglich der mineralischen Zusammensetzung ist das C:N-Verhältnis. Hale et al. (2015) beobachteten, dass das C:N-Verhältnis der Pflanzenkohle nicht nur gleich nach der Inokulation, sondern auch noch nach vier Wochen im Boden einen signifikanten Effekt auf die Populationsgrösse von *Enterobacter cloacae* hatte. Ein tieferes C:N-Verhältnis verbesserte die Überlebenschancen der Organismen. Demnach hat das C:N-Verhältnis einen entscheidenden Einfluss auf die mikrobielle Bodengemeinschaft. Das Ausbringen von Pflanzenkohle beeinflusst dieses Verhältnis im Boden und entsprechend auch die mikrobielle Gemeinschaft. Hale et al. (2015) betonen, dass dies je nach Bodenart aber verschieden sein könnte. Zudem ist festzuhalten, dass es dabei weniger um die Eignung der Pflanzenkohle für die Inokulation geht, sondern mehr um die Wirkung, die die Kohle auch ohne die inokulierten Organismen im Boden entfaltet. Dass ein tiefes C:N-Verhältnis auch gleich nach der Inokulation einen positiven Effekt auf die Überlebenschancen der Organismen hat, ist wie bereits erwähnt, auf den hohen Stickstoffgehalt zurückzuführen, der förderlich sein könnte.

#### 2.3.1.2 Physikalische Eigenschaften

Neben den chemischen Eigenschaften der verwendeten Pflanzenkohlen können physikalische Parameter ebenso entscheidend für deren Eignung als Inokulum sein. Ein bedeutender Faktor dabei ist die spezifische Oberfläche. Auf der einen Seite wird die spezifische Oberfläche über den Mahlgrad der verwendeten Kohle beeinflusst: Je feiner eine Kohle gemahlen ist, desto höher wird ihre spezifische Oberfläche. Verschiedene Studien konnten dabei nachweisen, dass eine kleinere Partikelgrösse eine höhere Populationsdichte nach der Beimpfung zur Folge hat (Liu et al., 2017; Tao et al., 2018). Dies wird einerseits auf eine höhere Kontaktfläche zwischen den Bakterien und der Kohle (Tao et al., 2018), aber auch zwischen Nährstoffen und Kohle zurückgeführt (Liu et al., 2017). Auf der anderen Seite wird

die spezifische Oberfläche aber auch durch die Porosität und Porengrößenverteilung der Pflanzenkohle beeinflusst: Bei gleichem Ausgangsmaterial kann mit erhöhter Prozesstemperatur eine höher spezifische Oberfläche erreicht werden, wie in Kapitel 2.2 beschrieben wurde (Hassan et al., 2020; Rafiq et al., 2016; Weber & Quicker, 2018). Laut Hale et al. (2015) ist dabei aber keine lineare Regression der spezifischen Oberfläche mit der Populationsgrösse vorhanden. Die AutorInnen beobachteten in ihrer Studie eine Korrelation mit dem Gaussischen Model, wobei das Optimum (95% Konfidenzintervall) zwischen 94 und 129 m<sup>2</sup> pro Gramm lag. Der entscheidende Unterschied zur Oberflächenvergrößerung durch Mahlen liegt dabei in der Grösse der Poren. Entsprechend ist neben der spezifischen Oberfläche immer auch die Porengrößenverteilung oder der Porenöffnungsdurchmesser zu beachten, die von verschiedenen Studien als entscheidende Parameter hervorgehoben werden (Azeem et al., 2021; Głodowska et al., 2016; Hale et al., 2015; Husna et al., 2019; Vanek et al., 2016; Zheng et al., 2019). Dabei sind sowohl Nano- und Mikroporen wie auch Makroporen wichtig.

In der Studie von Hale et al. (2015) lag dabei das Optimum bei einem Porenöffnungsdurchmesser von 36µm. Natürlich ist dieses Optimum nicht allgemeingültig, sondern als Optimum für die verwendete Art (*Enterobacter cloacae*) zu verstehen. Bei einer Länge von 1.5-2µm wäre die optimale durchschnittliche Porenöffnung rund 18- bis 24-mal so gross, wie die maximale Grösse des Bakteriums. Vanek et al. (2016) beobachteten in ihrer Arbeit das Maximum in der Bakteriendichte bei 10 bis 15µm, was leicht mehr als das Vierfache der maximalen Grösse ihres Versuchsorganismus *R. tropici* (2.5 bis 3.0 µm) darstellt. Laut den Autorinnen entspricht dies ungefähr den Werten aus der Literatur für poröses Glas, bei dem die maximale Dichte bei einer durchschnittlichen Porengrösse von zwei bis fünf Mal der Bakteriengrösse beobachtet werden kann. Da Vanek et al. (2016) zudem mehr Kohlen im Vergleich zu Hale et al. (2015) untersuchten und die Porengrösse mit zwei verschiedenen Methoden bestimmten, scheint der berechnete Richtwert realistischer. Die AutorInnen betonen aber, dass der Einfluss der Porengrösse auf die Populationsgrösse der Kohle in weiteren Arbeiten mit verschiedenen Organismen untersucht werden sollte, um den Wert zu bestätigen. Auch Husna et al. (2019) beobachteten bei der Pflanzenkohle mit dem Optimum gemäss diesem Vorschlag die höchste Populationsdichte. Laut Vanek et al. (2016) ist das Optimum damit zu erklären, dass die innere Oberfläche mit abnehmender Porengrösse zunimmt, ab einer bestimmten Grösse aber auch einer Grenze unterliegt, da die Bakterien die Poren nicht mehr bewohnen können. Und laut Hale et al. (2015), die auch nach vier Wochen noch einen signifikanten Effekt der Porengrösse auf die Populationsdichte messen konnte, ist die Schutzfunktion in Poren für die inokulierten Organismen vor Prädatoren verbessert. Husna et al. (2019) konnten zudem feststellen, dass bei den Kohlen mit grösseren Porengrössen die Organismen nur auf der Oberfläche, nicht aber in den Poren selbst zu finden waren. Dies wiederum könnte mit den Adhäsionskräften zusammenhängen, die in engeren Poren verbessert sind.

Während also viele Makroporen, die zwei bis fünf Mal so gross sind wie der Zielorganismus, die Überlebensfähigkeit der Organismen als Habitat fördern, sind Nano- und Mikroporen für den Wasserrückhalteeffekt von Pflanzenkohle bedeutend, welche in Kapitel 2.1.3.1 als weitere wichtige Eigenschaft für Trägersubstanzen hervorgehoben wurde. Entsprechend sollten auch diese bei der Auswahl der Pflanzenkohle beachtet werden, insbesondere in Bezug auf deren Lagerfähigkeit. In der Arbeit von Hale et al. (2015) hatte die Wasserhaltekapazität der Pflanzenkohle auch nach vier Wochen im Boden noch einen signifikanten Effekt auf die Populationsgrösse, allerdings weniger signifikant als die spezifische Oberfläche und die Porengrösse. Dabei sind wohl insbesondere die längere Verfügbarkeit des Wassers auf und in der Kohle bei Trockenheit ausschlaggebend (Vanek et al., 2016). Ausserdem sind im Wasser Nährstoffe gelöst, die für die Organismen so verfügbar bleiben. Vanek et al. (2016) führten einen Versuch durch, bei dem die Ausgangsmaterialien vor der Pyrolyse mit Montmorillonit vermischt

wurden (50:50 w:w). Dadurch konnte der Anteil Mikro- und Nanoporen ( $<0.3\mu\text{m}$ ) signifikant vergrößert werden, was ebenso die Wasserhaltekapazität der Kohle erhöhte. In dem anschliessend durchgeführten Austrocknungsversuch mit dem Inokulum konnte dieses so signifikant länger feucht gehalten werden, was wiederum die bakterielle Abundanz vergrösserte. Sobald bei der Austrocknung nur noch Poren, die kleiner als die Bakterien sind, wassergefüllt waren, sank die Überlebensfähigkeit der Organismen, sowohl bei der modifizierten wie auch unbehandelten Kohle, signifikant. Was darauf hinweist, dass die Organismen jenes Wasser nicht mehr mobilisieren konnten. Für die längerfristige Lagerung von inokulierter Pflanzenkohle sind demnach insbesondere jene Mikro- und Nanoporen von Bedeutung, die grösser sind als der Zielorganismus. Auch andere Studien führen die hohe Wasserhaltekapazität, und daher verlängerte Zeit bis zur völligen Austrocknung, als wichtiger Faktor diesbezüglich auf (Azeem et al., 2021; Ghazi, 2017; Husna et al., 2019).

Zusammenfassend sind chemische Eigenschaften wie der pH-Wert, der Nährstoffgehalt und die labile Kohlenstofffraktion also insbesondere für die anfängliche Populationsgrösse und die Lagerfähigkeit von Bedeutung (Hale et al., 2015). Im Boden spielt der pH-Wert aber eine untergeordnete Rolle, zudem kann er im Laufe des Beimpfungsprozess angepasst werden (Hale et al., 2015; Vanek et al., 2016). Wie sich der Nährstoffgehalt längerfristig auf die Eignung einer Kohle zur Beimpfung auswirkt, kann allerdings noch nicht abschliessend geklärt werden (Sun et al., 2016; Vanek et al., 2016). Die physikalischen Parameter wie die spezifische Oberfläche, die Porengrössenverteilung und die durchschnittliche Porenöffnung sind hingegen sowohl bei der Lagerung als auch bei der Wirkung im Boden wichtig (Hale et al., 2015). Eine möglichst hohe spezifische Oberfläche (Liu et al., 2017; Tao et al., 2018) und eine durchschnittliche Porengrössenverteilung, die zwei bis fünf Mal der Grösse des Zielorganismus entspricht, sind wünschenswert (Vanek et al., 2016). Viele Mikro und Nanoporen (die allerdings nicht kleiner sind als der Organismus selbst) fördern die Überlebensfähigkeit der Organismen durch eine verbesserte Wasserhaltekapazität weiter (Azeem et al., 2021; Vanek et al., 2016). Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, kann die spezifische Oberfläche durch hohe Pyrolysetemperaturen erhöht werden und die Porengrössenverteilung wird mit holzigen Ausgangsmaterialien optimiert (Downie et al., 2009; Hassan et al., 2020; Weber & Quicker, 2018). Dies wiederum führt auch zu stabileren Kohlestrukturen, was ebenso wichtig für die Eignung der Pflanzenkohle als Träger ist, wie in Kapitel 2.1.3.1 besprochen wurde. Entsprechend sind Pflanzenkohle aus holzigem Ausgangsmaterial, das bei hohen Pyrolysetemperaturen hergestellt wurde, besonders geeignet für die Formulierung mikrobieller Agenzien (Azeem et al., 2021; Głodowska et al., 2016; Hale et al., 2015). Neben der Trägersubstanz bildet der Organismus die zweite Schlüsselkomponente der Formulierung, diese soll im folgenden Kapitel besprochen werden.

### 2.3.2 Zielorganismus

In den 20 Studien wurde eine Vielzahl an Organismen verwendet, eine vollständige Auflistung kann Tabelle 2 entnommen werden. Dabei wurden 13 verschiedene Bakteriengattungen in 28 Versuchen und zwei Pilzgattungen in drei Anwendungen untersucht. *Bacillus* war die am häufigsten verwendete Gattung der Bakterien mit sechs Arbeiten, in denen diese vorkam, gefolgt von *Pseudomonas* mit fünf und *Burkholderia* mit drei Arbeiten. Bei den Pilzen wurde *Trichoderma* in zwei Papers benutzt und in einem weiteren *Penicillium*. In vier Arbeiten wurden gemischte Inokulums verwendet, die in Kapitel 2.1.1 als eine mögliche Optimierungsmöglichkeit diskutiert wurden (Santos et al., 2019).

Ein Vergleich der Eignung der Arten ist allerdings nicht möglich, da die verwendeten Pflanzenkohlen und das Immobilisierungsverfahren ebenso bedeutend sind und sich in den Versuchen stark unterscheiden. Einzig Zheng et al. (2019) merkt an, dass *Pseudomonas* in ihrer Studie weniger kompetitiv

war als *Bacillus*. Die AutorInnen führen dies darauf zurück, dass die Pflanzenkohle alkalische Bedingungen bietet, während *Pseudomonas* eher saure Umgebungen bevorzugt. Wie aber in Kapitel 2.3.1 beschrieben, liesse sich der pH-Wert entsprechend anpassen.

Die Wahl des Zielorganismus erfolgte in den Arbeiten denn auch weniger aufgrund der Eignung zur Beimpfung als auf Basis deren gewünschten Effekte auf die Pflanzen. Tiefergehende Untersuchungen bezüglich der Eignung verschiedener Organismen zur Beimpfung mit Pflanzenkohle als Träger wären aber von Bedeutung, um möglichst optimierte Produkte zu entwickeln. Denn wird mit ungeeigneten Organismen gearbeitet, könnte dies zu falschen Schlüssen bezüglich Pflanzenkohle als Trägersubstanz führen. Das Immobilisierungsverfahren ist der nächste Schritt in der Formulierung und soll nun im nächsten Kapitel besprochen werden.

### 2.3.3 Verfahren der Beimpfung

Im Grundsatz verfolgten die meisten Studien, welche eine Beimpfung von Pflanzenkohle untersuchten, dieselbe Strategie. Dabei wird in einem ersten Schritt eine Mutterkultur in einem flüssigen Nährmedium gezüchtet. Anschliessend wird in einem zweiten Schritt eine bestimmte Menge dieser Mutterkultur mit der Pflanzenkohle vermischt und unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur, Schüttlerstärke) für eine bestimmte Zeit inkubiert. Abschliessend wird das fertige Inokulum ausgebracht oder eingelagert. Nur zwei Arbeiten wichen gänzlich von diesem Verfahren ab und gaben die Kohle bereits bei der Zucht der Mutterkultur ins Medium. Die Inkubation ist zudem eher als optional zu bezeichnen und wurde nur in neun der 20 Arbeiten durchgeführt. Zehn der Studien brachten das Inokulum direkt aus oder lagerten es ohne Inkubationszeit ein. Bei einer Studie fehlen Angaben diesbezüglich.

In den Feinheiten unterscheiden sich die Verfahren noch stärker. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der angewendeten Parameter. Von Bedeutung sind dabei hauptsächlich die Siebgrösse der Kohle, die Mischverhältnisse, die Zellzahl der Mutterkultur, die Inkubationszeit und Temperatur und die Schüttlergeschwindigkeit. Die Unterschiede zwischen den Versuchen sind diesbezüglich sehr gross. Die tiefste Siebgrösse beispielsweise, die in den 20 Arbeiten verwendet wurde, lag bei <300mesh, was in etwa 50µm entspricht (Tripti et al., 2016), während Azeem et al. (2021) eine Siebgrösse von <1cm verwendete. Ähnlich grosse Unterschiede sind auch bei den Mischverhältnissen zu finden. Eine weitere Unterscheidung kann zwischen Verfahren gemacht werden, welche die Organismen vor der Beimpfung gewaschen, aufkonzentriert und resuspendiert haben und jenen, die die Zellkultur direkt im Nährmedium auf die Kohle gegeben haben. Sechs der 20 Arbeiten führten eine solche Aufkonzentrierung durch, in 13 Arbeiten wurde darauf verzichtet und in einer Arbeit kann der Methodik nicht entnommen werden, wie vorgegangen wurde. Zusätzlich sind einige Modifikationen des Verfahrens erkennbar. So wurden die Mikroorganismen in einem der analysierten Versuche auf die Kohle gesprayed, statt nur vermischt (Medeiros et al., 2020). Und bei einer weiteren Arbeit wurde die Zellsuspension mit einer Spritze auf die Kohle appliziert (Husna et al., 2019). Und Sun et al. (2016) zogen die Bakteriensuspension mittels einer Vakuumentleitung in die Poren der Pflanzenkohle. Die grosse Variabilität der Verfahren hängt teilweise mit den verwendeten Organismen und Pflanzenkohle zusammen. So ist beispielsweise zu erwarten, dass die Inkubationstemperatur und -zeit dem Optimum der verwendeten Mikroorganismen angepasst wurde. Weiter kann das Mischverhältnis auf die Wasserhaltekapazität der Kohle angepasst sein. Diese Variabilität erschwert jedoch einen systematischen Vergleich der Verfahren und somit dessen Optimierung. Die Schwierigkeit wird weiter dadurch erhöht, dass die Ergebnisse ebenso von den Mikroorganismen und der Pflanzenkohle abhängig sind und das Verfahren deshalb nicht unabhängig von diesen beurteilt werden kann.



Ein systematischer Ansatz zur Untersuchung des Beimpfungsverfahrens findet sich in einer Studie von Tao et al. (2018). Die AutorInnen verwendeten dabei pulverisierte Baumwollstiele als Ausgangsmaterial für die Pyrolyse und beimpften die so hergestellte Pflanzenkohle mit einem Stamm des Bakteriums *Bacillus subtilis*. Dabei wurden unterschiedliche Inkubationszeiten (1h, 6h, 12h, 24h), unterschiedliche Partikelgrößen (40-180mesh), verschiedene Mischverhältnisse (20:1, 10:1, 5:1, v/w) und verschiedene Schüttelstärken (80rpm, 130rpm, 180rpm) untersucht. Für alle Versuche wurden die Bakterien in einem Flüssigmedium kultiviert, anschliessend zweimal mit einer sterilen 0.85%-NaCl-Lösung gewaschen, in dieser resuspendiert und schliesslich mit der Kohle bei 30°C inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die grösste Populationsdichte mit einer Inkubationszeit von 24h, einem Mischverhältnis von 5:1 (v/w) und einer Schüttelgeschwindigkeit von 130rpm zustande kam. Zur Inkubationszeit merken Tao et al. (2018) an, dass der grösste Teil der Bakterien bereits nach einer Stunde an die Pflanzenkohle adsorbiert wurde und die Adsorptionsrate anschliessend abnahm. Jedoch seien auch in der Zeit zwischen einer und 24 Stunden weitere Bakterien adsorbiert worden, weshalb die höchste Populationsdichte dennoch erst nach 24 Stunden erreicht wurde. Weiter konnte eine signifikante Erhöhung in der Menge an adsorbierten Bakterien zwischen der Inkubation mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 80rpm zu 130rpm festgestellt werden, eine weitere Beschleunigung auf 180rpm wirkte sich jedoch wiederum negativ aus. Die AutorInnen führen dies darauf zurück, dass bei der tiefen Geschwindigkeit von 80rpm eine ungenügende Durchmischung der Pflanzenkohle mit der Suspension zustande kam, während sich die Bakterien bei einer zu hohen Geschwindigkeit nicht mehr genug effektiv an die Pflanzenkohle anhaften konnten. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Menge an adsorbierten Bakterien mit sinkender Partikelgrösse zunahm, wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde. So konnten die besten Ergebnisse bei einer Siebgrösse von 140 – 160mesh erzielt werden. Die AutorInnen folgern entsprechend, dass die Kontaktfläche einer der wichtigsten Faktoren im Adsorptionsprozess sein könnte.

Die Resultate von Tao et al. (2018) zeigen auf, dass, auch wenn zwischen den verschiedenen Studien ein Konsens bezüglich des groben Vorgehens besteht, die Feinheiten des Verfahrens ebenso von Bedeutung sind. So resultierten aus geringfügigen Änderungen im Prozess unterschiedliche Ergebnisse. In dieser Arbeit soll deshalb das Verfahren von Tao et al. (2018) als Grundlage für weitere Optimierungen dienen. Entsprechend wird dieselbe Art (*Bacillus subtilis*) verwendet.

Nachdem nun Organismus, Kohle und Immobilisierungsprozess ausführlich besprochen wurden, stellt sich die Frage, ob die fertigen Inokulums in ihrer Wirkung die gewünschten Effekte erzielen konnten. Dies soll im nächsten Kapitel besprochen werden.

Tabelle 2: Die wichtigsten Parameter der Beimpfungsverfahren von Pflanzenkohle in 20 wissenschaftlichen Publikationen. Zu den mit Stern (\*) versehenen Werten konnten keine Angaben im Text gefunden werden, weshalb sie aus den Visualisierungen abgelesen wurden. Bei Publikationen mit mehreren Versuchen ist bei den Populationsdichten auf der Kohle der ungefähre Bereich aller Resultate angegeben.

Referenz	Zielorganismus	Siebgröße	Aufkonzentrierung	Mischverhältnis	Mutterkultur	Inkubationszeit	Inkubationstemp.	Geschwindigkeit Schüttler	Populationsdichte auf Kohle	Weitere Modifikationen
Araujo et al. (2020)	<i>Bradyrhizobium</i>	<70µm	Ja	49-53% WHK	> 1 x 10 <sup>9</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			Ca. 5 x 10 <sup>9</sup> CFU g <sup>-1</sup>	-
Azeem et al. (2021)	<i>Bacillus cereus</i>	<1cm	Nein	20ml:50g	kA	24h	kA	still	9.46 – 9.48 log CFU g <sup>-1</sup>	-
Chuaphasuk & Prapagdee (2019)	<i>Arthrobacter sp. / Micrococcus sp.</i>	kA	Nein	2 % (w/v)	keine	72h	28°C	150rpm	6.12 – 6.64 log CFU g <sup>-1</sup>	Kohle direkt in Kultur
Ghazi (2017)	<i>Rhizobium phaseoli</i>	<150µm	Nein	35% WHK	25.6 x 10 <sup>11</sup> Zellen ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			12.61 log CFU g <sup>-1</sup>	-
Godowska et al. (2016)	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<500µm	Nein	1.2ml:30g	4.9 x 10 <sup>9</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			*6 – 8 log CFU ml <sup>-1</sup>	-
Godowska et al. (2017)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	kA	Nein	1.2ml:30g	4.9 x 10 <sup>9</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			*5 – 8 log CFU ml <sup>-1</sup>	-
Hale et al. (2014)	<i>Enterobacter cloacae</i>	kA	Ja	5:1 (w/v)	kA	24h	25°C	kA	7 x 10 <sup>8</sup> – 7 x 10 <sup>9</sup> CFU g <sup>-1</sup>	-
Hale et al. (2015)	<i>Enterobacter cloacae</i>	kA	Ja	20ml:2g	5.6 x 10 <sup>9</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	24h	25°C	kA	*9 – 10.5 log GFP copy number g <sup>-1</sup> soil	-
Husna et al. (2019)	<i>Paenibacillus alvei + Burkholderia cepacian + Acinetobacter baumannii + Penicillium variable</i>	± 1mm	Nein	1.2ml:30g	5.31 x 10 <sup>12</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			*12 - 14 log CFU g <sup>-1</sup>	Mit Spritze appliziert
Lebrun et al. (2020)	<i>Bacillus sp.</i>	0.2-0.4mm	Ja	10% (w/v)	kA	6h	30°C	kA	kA	-
Liu et al. (2017)	<i>Bacillus mucilaginosus</i>	0.25-2mm	Nein	0.6% (w/v)	keine	12h	30°C	180rpm	* 10 <sup>6</sup> – 3.5 x 10 <sup>6</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	Kohle direkt in Kultur
Medeiros et al. (2020)	<i>Trichoderma aureoviride</i>	<2mm	Nein	100ml	1 x 10 <sup>6</sup> Konidien ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			kA	Mit Spray appliziert

Muter et al. (2017)	<i>Trichoderma viride</i>	<2mm	Nein	1L:250g	$1.4 \times 10^7$ CFU L <sup>-1</sup>	Über Nacht	24°C	kA	kA	-
Sun et al. (2016)	<i>Pseudomonas putida</i>	kA	Ja	kA	kA	Keine Inkubation			$4.9 \times 10^8$ CFU g <sup>-1</sup>	Mit Vakuum appliziert, Nährstoffanreicherung
Tao et al. (2018)	<i>Bacillus subtilis</i>	40-60mesh/ 100-120mesh/ 160-180mesh	Ja	5:1 / 10:1 / 20:1 (v/w)	$8 - 9 \log_{10}$ CFU ml <sup>-1</sup>	1h / 6h / 12h / 24h	30°C	80, 130, 180rpm	*8 - 10 log CFU g <sup>-1</sup>	-
Tripti et al. (2016)	<i>Burkholderia sp. / Bacillus megaterium</i>	<300mesh	Nein	40% WHK	$1 \times 10^{10}$ CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			10 log CFU g <sup>-1</sup>	-
Tu et al. (2020)	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<0.25mm	Nein	1:3 (w/v)	OD <sub>600</sub> = 1	8h	kA	kA	kA	-
Vanek et al. (2016)	<i>Rhizobium tropici</i>	<149um + 50% <75um	Nein	kA, gem. WHK	$10^7 \cdot 10^8$ CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			9 – 11 log CFU g <sup>-1</sup>	Nährstoffanreicherung Ton bei Pyrolyse
Wei et al. (2020)	<i>Pseudomonas putida</i>	pulverisiert	Nein	1ml:12.5g	$1 \times 10^9$ CFU ml <sup>-1</sup>	Keine Inkubation			kA	-
Zheng et al. (2019)	<i>Arthrobacter defluvi</i> , + <i>Murkholderia cepacian</i> + <i>Bacillus megaterium</i> + <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> + <i>Rhodanobacter sp.</i> + <i>Variovorax paradoxus</i> + <i>Streptomyces prasinopilosus</i>	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	-

#### 2.3.4 Wirkung inokulierter Pflanzenkohle

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, wurden in zwölf Arbeiten Versuche mit den Kohle-Formulierungen an Pflanzen durchgeführt. Diese sollen folgend besprochen werden, um zu einer Einschätzung bezüglich der Wirksamkeit der Produkte zu gelangen.

In den Versuchen wurde die inokulierte Kohle an Strauchbohnen (Araujo et al., 2020), Mungbohnen (Azeem et al., 2021), Sojabohnen (Głodowska et al., 2017), Kidneybohnen (Ghazi, 2017), Mais (Głodowska et al., 2016; Muter et al., 2017; Sun et al., 2016), Gurke (Hale et al., 2014), Melonen (Medeiros et al., 2020), Tomaten (Tripti et al., 2016), Wein (Wei et al., 2020) und Raps (Zheng et al., 2019) untersucht. Araujo et al. (2020) beispielsweise führten Versuche mit *Bradyrhizobium* inokulierter Pflanzenkohle auf acht Bauernhöfen in der Dominikanischen Republik durch. Der Ertrag von Strauchbohnen auf den Feldern mit inokulierter Kohle wies keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Feldern mit einer Stickstoffdüngung (125 und 210 kg N/ha) auf, war aber signifikant grösser als ohne Dünger. Es kann also gefolgert werden, dass die Formulierung eine chemische Düngung ersetzen könnte. Dass die inokulierte Kohle das Pflanzenwachstum förderte, wurde auch in den anderen Studien beobachtet. Zudem konnten höhere Enzymaktivitäten (Urease, Dehydrogenase, Phosphatase) und eine höhere mikrobielle Biomasse bei Feldern mit inokulierter Kohle im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Azeem et al., 2021; Medeiros et al., 2020; Tripti et al., 2016). Hale et al. (2014) beobachtete hingegen keine Unterschiede in der bakteriellen Populationsdichte des Gesamtbodenlebens. Zudem wies auch die mikrobielle Zusammensetzung des Bodens in verschiedenen Arbeiten Unterschiede aufgrund der Zugabe des Inokulums auf (Azeem et al., 2021; Muter et al., 2017; Sun et al., 2016; Wei et al., 2020). Die Wirkung diesbezüglich führte aber zu uneinheitlichen Reaktionsmustern in verschiedenen Studien, was Sun et al. (2016) auf die Variation der nativen mikrobiellen Bodengemeinschaft in Abhängigkeit von pH-Wert, Pflanzenart und anderen Umweltfaktoren zurückführen.

Andererseits sind manche Effekte wohl eher mit der Wirkung der Pflanzenkohle selbst zu erklären, die, unabhängig von den inokulierten Organismen, mit den geladenen Nährstoffen auch eine direkte Düngerquelle darstellt und die Wasserhaltekapazität und Schüttdichte des Bodens verbessern kann (Głodowska et al., 2016; Hale et al., 2014). Zudem wird auch das Bodenleben durch die Pflanzenkohleapplikation beeinflusst (Azeem et al., 2021; Hale et al., 2015). Hale et al. (2014) stellten fest, dass die Kohleapplikation unabhängig von der Präsenz von nützlichen Mikroorganismen zu höheren Biomassen und besserer Wurzelentwicklung führte. Mehrere Arbeiten bestätigen andererseits, dass weder die separate Applikation der Organismen noch die Applikation der unbeimpften Kohle alleine zu signifikant gleichwertigen Ertragssteigerungen führten (Muter et al., 2017; Zheng et al., 2019). Und Sun et al. (2016) beobachteten, dass die Kombination von Pflanzenkohle und *Pseudomonas putida* den Salzstress bei Mais reduzieren konnten und folglich eine höhere Biomassenproduktion ermöglichten, was weder bei Applikation des Stammes noch der Kohle alleine beobachtet wurde. Diese Effekte sind laut Zheng et al. (2019) darauf zurückzuführen, dass die Pflanzenkohle den Organismen einen besseren Lebensraum bietet, woraufhin diese ihre Wirkung besser entfalten können. So konnten Hale et al. (2014) feststellen, dass die Dichte an lebensfähiger Zellen nach drei Wochen 10-mal höher war, wenn sie auf der Pflanzenkohle ausgebracht wurden, im Vergleich zu der Applikation des flüssigen Inokulums allein. Eine verbesserte Besiedelung des Bodens konnten auch Muter et al. (2017) feststellen. Der massgebende Punkt ist aber der Vergleich zu anderen Trägersubstanzen: Bei Araujo et al. (2020) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Pflanzenwachstum zwischen Perlit und Pflanzenkohle als Träger gefunden werden. Bei anderen Arbeiten waren die Populationsdichten im Boden mit

Pflanzkohle als Träger jedoch sogar höher, als wenn Torf als Träger verwendet wurde (Azeem et al., 2021; Sun et al., 2016).

Diese ersten Resultate zeigen, dass sich Pflanzkohle grundsätzlich als Träger eignet und mit Pflanzkohle-Formulierungen Biodünger hergestellt werden können, die sich positiv auf das Pflanzenwachstum auswirken. Im Vergleich zu anderen Trägersubstanzen sticht Pflanzkohle aber noch nicht hervor. Dies verdeutlichen auch die durchgeführten Haltbarkeitsversuche, wobei elf Versuche in den analysierten Publikationen gefunden wurden. Dabei wurden unter anderem Perlite, Vermiculit, Flugasche, Mist, Zuckerrohrpressschlamm und Torf als Kontrolle miteinbezogen (Araujo et al., 2020; Ghazi, 2017; Głodowska et al., 2016, 2017; Sun et al., 2016; Tripti et al., 2016; Vanek et al., 2016). Teilweise wurden auch verschiedene Kohlen ohne Kontrolle miteinander verglichen oder die Organismen ohne Trägersubstanz dienten als Kontrolle (Husna et al., 2019; Tao et al., 2018). In Tabelle 3 sind jene Lagerversuche aufgeführt, die Torf als Kontrolle verwendeten, da Torf gemäss Bashan et al. (2014) als beste Trägersubstanz gilt und daher den Vergleichswert für neue Substanzen darstellen sollte. Zudem sind die Ausgangsmaterialien der verwendeten Kohle sowie die wichtigsten Pyrolyseparameter aufgeführt. Wurden in einem Versuch mehrere Pflanzkohlen als Träger verwendet, so sind diese hier als einzelne Zeilen aufgeführt. Die Färbung der Zeilen stellen die Resultate dar (siehe Tabellenbeschriftung), wobei immer das Ergebnis am Ende der Lagerdauer ausschlaggebend für die Einfärbung war. Dabei wird schon auf den ersten Blick ersichtlich, dass die Resultate sehr unterschiedlich sind und keine abschliessende Beurteilung der Haltbarkeit von Pflanzkohle-Formulierungen im Vergleich zu Torf-Formulierungen zulassen. Acht der 25 untersuchten Pflanzkohlen erzeugten demnach signifikant bessere Ergebnisse als Torf, bei zehn Kohlen konnte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden und bei sieben Pflanzkohlen waren die Ergebnisse signifikant schlechter. Interessanterweise sind es insbesondere die bei hohen Temperaturen hergestellten Pflanzkohlen, die besser als Torf abschnitten, was in Kapitel 2.3.1 bereits so festgehalten werden konnte.

Vanek et al. (2016) merken zudem an, dass viele ihrer Kohlen zwar statistisch gleichwertige Kolonienzahlen zu beherbergen vermochten, Torf aber trotzdem tendenziell die höchsten Werte im Vergleich mit allen anderen Trägern hatte. Sie folgern deshalb, dass die Leistungen von Pflanzkohle als Träger mit weiteren Anpassungen noch verbessert werden könnten. Und auch Hale et al. (2015) befinden, dass weitere Anpassungen dazu führen könnten, dass Pflanzkohle sogar der bessere Träger als Torf darstellt. Im nächsten Kapitel sollen deshalb mögliche Optimierungen besprochen werden, die dann in den Laborexperimenten untersucht werden können.

Tabelle 3: Die Haltbarkeit von Pflanzenkohle und Torf als Träger für Mikroorganismen im Vergleich. Grün eingefärbte Resultate visualisieren signifikant bessere Koloniezahlen auf der Pflanzenkohle. Gelb eingefärbte Resultate verweisen auf statistisch gleichwertige Resultate und rot eingefärbte Zeilen zeigen tiefere Koloniezahlen im Vergleich zu Torf. Visualisiert wurde die Zellzahl der letzten Erhebung des Versuches. Sterne (\*) verweisen auf keine Angaben bezüglich Signifikanz, die Einfärbung erfolgte aufgrund der Rohdaten.

Ausgangsmaterial	Pyrolysetemperatur	Verweilzeit	Versuchsdauer	Lagertemperatur	Population am Ende der Lagerdauer	Referenz
Hartholz	>700	wenige min.	22w	21°C	5.50 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2016)
Weichholz	>700	wenige min.	22w	21°C	5.98 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2016)
Hartholz	kA	kA	22w	21°C	5.66 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2016)
Weichholz	±450	2.5h	22w	21°C	0 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2016)
Hartholz	>700	wenige min.	37w	21°C	4.8 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2017)
Weichholz	>700	wenige min.	37w	21°C	6.3 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2017)
Hartholz	kA	kA	37w	21°C	0 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2017)
Weichholz	±450	2.5h	37w	21°C	0 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Głodowska et al. (2017)
Pinienholz	600	1.5h	5m	4°C	Ca. 9 log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup>	Sun et al. (2016)
Teeblätter	350°C	2h	90d	0/10/20°C	0°C: 7.52 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup> 10°C: 9.51 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup> 20°C: 8.91 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Azeem et al. (2021)*
Teeblätter	600°C	2h	90d	0/10/20°C	0°C: 7.71 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup> 10°C: 10.68 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup> 20°C: 9.85 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Azeem et al. (2021)*
Kieferholz	450°C	1h	6m	27°C	7.81 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Douglasienholz	450°C	1h	6m	27°C	8.03 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Ahornholz gemischt	450°C	1h	6m	27°C	9.12 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Hartholz gemischt	450°C	1h	6m	27°C	9.17 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Stechpalmenholz	450°C	1h	6m	27°C	9.55 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Tulpenbaumholz	450°C	1h	6m	27°C	9.40 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Roteichenholz	450°C	1h	6m	27°C	7.40 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Weinrebenholz	450°C	1h	6m	27°C	9.25 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Maisstroh	450°C	1h	6m	27°C	8.47 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Zuckerrohrbagasse	450°C	1h	6m	27°C	9.60 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Reisstroh	450°C	1h	6m	27°C	7.97 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Haselnusschalen	450°C	1h	6m	27°C	7.57 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Reishülsen	450°C	1h	6m	27°C	6.85 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Vanek et al. (2016)
Reisstroh	600°C	1h – 1.5h	180d	Raumtemp.	9.98 log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Ghazi (2017)

## 2.4 Mögliche Optimierungen

Gemäss den Erkenntnissen aus Kapitel 2.3.1 eignet sich Pflanzenkohle aus holzigem Ausgangsmaterial am besten zur Beimpfung mit Mikroorganismen, da sie in ihrer Porengrössenverteilung, mit vielen Poren in der Grösse von 5-10 $\mu$ m, am ehesten dem Optimum entspricht (Downie et al., 2009; Vanek et al., 2016). Dies wiederum bringt den Nachteil mit sich, dass die Kohle ärmer an Nährstoffen ist (vgl. Kapitel 2.2). Der Nährstoffgehalt der Kohle scheint aber einen Einfluss auf die initiale Populationsdichte nach der Beimpfung und auf die Lagerfähigkeit zu haben (Hale et al., 2014). Wird also Kohle aus holzigem Ausgangsmaterial als Trägersubstanz eingesetzt, könnte eine Nährstoffanreicherung jener die Resultate weiter verbessern. Dies wird auch in mehreren Arbeiten als mögliches Schlüsselement erwähnt, damit Pflanzenkohle gleichwertige Resultate wie Torf erzielt (Hale et al., 2014, 2015; Vanek et al., 2016). Erste Versuche diesbezüglich wurden in der Arbeit von Sun et al. (2016) durchgeführt. Dabei reicherten die AutorInnen die Kohle mit LB-Medium, Wurmkomposttee und sterilem Wurmkompost an. Die Variante mit LB-Medium hatte nach einem und drei Monaten Lagerungszeit signifikant höhere Populationsdichten auf der Kohle als die unbehandelte Kohle. Im ersten Monat war die Zellzahl sogar höher als bei Torf. Nach fünf Monaten waren die Unterschiede aber nicht mehr signifikant. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Nährstoffe des Mediums nach einer gewissen Zeitspanne weitgehend aufgebracht waren und die Proliferation der Bakterien deshalb nicht mehr gefördert haben. Dementsprechend müsste vielleicht eine stärker dosierte Nährlösung benutzt werden. Da der Wurmkompost die Resultate des Lagerversuches nicht signifikant zu verbessern vermochte, führen Sun et al. (2016) darauf zurück, dass das organische Material möglicherweise die Poren verstopfte und so die spezifische Oberfläche der Kohle verkleinerte. Diese ist enorm wichtig zum Aufbau einer grossen Population, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde (Liu et al., 2017; Tao et al., 2018). Für diese Arbeit soll dementsprechend überprüft werden, ob eine Anreicherung der Kohle mit Rinderurin die initiale Abundanz der Bakterien auf der Kohle verbessern kann, da Rinderurin nährstoffreicher ist und bereits positive Wirkungen mit Pflanzenkohle zeigte (Schmidt et al., 2015; Sutradhar et al., 2021). Conte et al. (2014) zeigten zudem, dass die Interaktion von Wasser mit Pflanzenkohle auch temperaturabhängig ist: Ab einer Temperatur von 50°C werden die Verbindungen schwächer und der dreidimensionale Austausch mit dem Innern der Kohle nimmt zu. Entsprechend könnte die Nährstoffanreicherung verbessert werden, wenn die Kohle in der Nährlösung über 50°C erhitzt wird, so dass die Flüssigkeit besser ins Innere der Poren gelangt und dort binden kann. Auch dies soll im praktischen Teil dieser Arbeit überprüft werden.

Eine zweite Optimierungsmöglichkeit beruht auf der Interaktion der Organismen mit der Pflanzenkohle. Gemäss Ajeng et al. (2020) läuft die Adhäsion der Bakterien auf der Pflanzenkohleoberfläche in zwei Phasen ab. Die erste Phase basiert auf den physikalisch-chemischen Interaktionen der Bakterien mit der Kohleoberfläche, die zu der Anhaftung der Bakterien führen. In der zweiten Phase binden sich die Organismen gemäss Ajeng et al. (2020) mit molekularen und zellulären Mechanismen, dazu zählen elektrostatische, ionische (Säure/Base Lewis) und hydrophobe (van der Waals) Interaktionen. Dabei spielen funktionelle Gruppen eine entscheidende Rolle: Sie fördern eine schnelle Immobilisierung und verstärken die Verbindung zwischen dem Organismus und der Kohle (Ajeng et al., 2020). Die Wahl von holzigem Ausgangsmaterial und hohen Pyrolysetemperaturen führen aber dazu, dass die Kohle weniger funktionelle Gruppen auf der Oberfläche hat (Hassan et al., 2020). Eine gezielte Modifizierung dahingehend könnte also eine Möglichkeit darstellen, die Adsorption der Bakterien zu verbessern. Die Oxidation der Pflanzenkohle führt dazu, dass die Anzahl funktioneller Gruppen zunimmt (Fan et al., 2018). Bereits konnte gezeigt werden, dass die Absorptionsleistung bei Schwermetallen damit einhergehend ebenfalls verbessert wird (Fan et al., 2018; Xue et al., 2012). In dieser Arbeit soll überprüft

werden, ob ebenso ein positiver Einfluss auf die Adsorption von Mikroorganismen durch eine Oxidation der Pflanzenkohle erzielt werden kann. Die erste der in Kapitel 1 aufgestellten Hypothesen könnte entsprechend weiter unterteilt werden:

**1.1 Das Einlegen der Pflanzenkohle in einer Rinderurin ähnlichen Nährlösung kann die Populationsdichten auf der Kohle nach der Beimpfung erhöhen.**

**1.2 Das Einlegen und Erhitzen (60°C) der Pflanzenkohle in einer Rinderurin ähnlichen Nährlösung kann die Populationsdichten auf der Kohle nach der Beimpfung erhöhen.**

**1.3 Die Oxidation der Pflanzenkohle kann die Populationsdichten auf der Kohle nach der Beimpfung erhöhen.**



### 3. Methodik

Der praktische Teil dieser Arbeit besteht aus einem Vorversuch und fünf Folgeversuchen. Der Vorversuch befasste sich mit der optimalen Inkubationszeit für die benutzte Pflanzenkohle und den benutzten Bakterienstamm. Versuche 1 bis 3 beschäftigten sich mit den in Kapitel 2.4 beschriebenen Optimierungsmöglichkeiten. In Versuch 4 wurde eine Haltbarkeitsstudie durchgeführt und bei Versuch 5 handelt es sich um einen Kresstest mit *Pythium ultimum*. In allen Teilen wurde dieselbe Pflanzenkohle und derselbe Bakterienstamm verwendet, die nun zuerst beschrieben werden sollen.

#### 3.1 Verwendete Pflanzenkohle

Die Pflanzenkohle, die in dieser Arbeit verwendet wurde, stammt aus der Pyrolyseanlage der INEGA AG (Maienfeld, GR). Sie wurde am 03.03.2021 hergestellt, am 08.03.2021 abgeholt und anschliessend bei 5°C und in Dunkelheit bis zu ihrem Gebrauch in einem Plastiksack gelagert. Die Kohle wurde aus Waldholz-Hackschnitzel hergestellt, die Pyrolysetemperatur betrug 650°C bis 750°C und die Reaktorzeit ca. 50 Minuten. Die verwendete Pflanzenkohle wurde für die Masterarbeit von René Altorfer charakterisiert, die erhobenen Daten sind Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen (Altorfer, 2021).

Tabelle 4: Die wichtigsten chemischen Parameter der verwendeten Pflanzenkohle

	Pflanzenkohle
pH	7.74
EC [ $\mu\text{s}/\text{cm}$ ]	313
C <sub>tot</sub> [%]	84.10
H <sub>tot</sub> [%]	1.90
N <sub>tot</sub> [%]	0.53
C <sub>org</sub> [%]	82.70

Tabelle 5: Die Ergebnisse der Elementaranalyse der verwendeten Pflanzenkohle.

	H <sub>2</sub> O-Extraktion	EDTA-Extraktion	KW-Extraktion
Calcium [mg/kg]	54.7	7'815.9	18'491.2
Kupfer [mg/kg]	≤0.1	2.3	10.9
Eisen [mg/kg]	≤0.1	12.2	279.0
Kalium [mg/kg]	519.0	1'051.3	40'984.2
Mangan [mg/kg]	≤0.1	30.7	176.2
Phosphor [mg/kg]	8.2	86.8	1'531.6
Zink [mg/kg]	≤0.1	7.5	34.2

Gemäss den Erkenntnissen des Theorieteils sollte die Beimpfung mit möglichst fein gemahlenem Pulver erfolgen. Vergleiche zwischen dem Mahlen in einer Schwingmühle (RETSCH GmbH, MM400, 2 Minuten, 25Hz) und dem Zerkleinern der Kohle in einem Mörser zeigten, dass zweiteres ausreichte, um die gewünschte Feinheit zu erreichen. Um ein erfolgreiches Sieben zu ermöglichen, wurde die Kohle vorgängig für 24h bei 105°C getrocknet, bevor sie auf einem Siebturm (Retsch AS200 digit cA) mit

einem Sieb mit Maschenweite 125µm abgeseibt wurde. Das Kohlepulver wurde in einer Schottflasche bei 5°C und in Dunkelheit bis zum jeweiligen Versuchsstart gelagert.

Die Kohle wurde für alle Versuche, ausser beim Vorversuch (Kapitel 3.4), bei 121°C für 20 Minuten ohne Vakuum autoklaviert (Systec VX-75).

### 3.2 Herstellung der Mutterkultur

Für alle Versuche wurde der Stamm *Bacillus subtilis* CCOS #14 (The Culture Collection of Switzerland) verwendet, der eingefroren gelagert war. Die Kultur wurde auf LB-Agar-Platten ausgebracht und bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Mutterkultur wurde für jeden Versuch neu hergestellt. In den Versuchen 1 und 2 wich das Verfahren von dem hier beschriebenen ab, was in den jeweiligen Kapiteln (4.2 und 4.3) noch genauer erläutert wird. Jeweils vier Tage vor Versuchsbeginn wurden drei bis fünf Einzelkolonien auf separate LB-Platten überimpft und bis zum Versuchsstart bei Raumtemperatur inkubiert, damit mit Sicherheit eine vitale Kultur für den Versuch zur Verfügung stand. Zur Herstellung der Mutterkultur wurde eine grosse Einzelkolonie von *Bacillus subtilis* in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Medium überimpft, wie in Abbildung 1 zu erkennen ist. Das Volumen des eingesetzten Mediums wurde anhand der nachher zu beimpfender Kohle berechnet: Pro Gramm Kohle wurden 25ml LB-flüssig-Medium eingesetzt. Die Bakterien wurden bei Raumtemperatur und 130rpm für 24h inkubiert. Anschliessend wurde die Zellsuspension in Falcon-Tubes (50ml) abgefüllt und zentrifugiert (4500rpm, 30min). Der Überstand wurde abgossen und die Zellen in NaCl-Lösung (0.9%) suspendiert (5ml pro 25ml Startvolumen). Das Verfahren wurde ein zweites Mal wiederholt und die suspendierten Zellen danach miteinander vermischt. Durch dieses Prozedere wurde die Mutterkultur auf 1/5 des Startvolumens konzentriert. So standen pro 1g Pflanzenkohle 5ml Zellsuspension zu Verfügung, was dem optimalen Mischverhältnis nach Tao et al. (2018) entspricht. Von jeder Mutterkultur wurde die Kolonienzahl mittels dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Verfahren bestimmt.



Abbildung 1: Für die Herstellung der Mutterkultur wurde eine Einzelkultur (links) in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Medium übertragen und für 24h bei 130rpm und Raumtemperatur inkubiert (rechts). (eigene Aufnahmen)

### 3.3 CFU Bestimmung

Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurden die Proben auf LB-Agar ausplattiert und ausgezählt. Dazu wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Probe mit einer NaCl-Lösung (0.9%) im Verhältnis 10:1 erstellt. Von jeder relevanten Verdünnung wurde eine Teilprobe von 100µl auf die Agarplatten pipettiert und gleichmässig verteilt. Die Platten wurden verschlossen und bei 30°C inkubiert. Schliesslich wurden nach 24 Stunden alle Kolonien von Platten mit einer Kolonienzahl zwischen 30 und 300 ausgezählt, eine weitere Auszählung nach 48 Stunden erwies sich als überflüssig. Anhand Formel 1 wurden so die koloniebildenden Einheiten (engl. Colony-Forming-Units) pro Milliliter Probe ermittelt. Da in der Literatur die CFU per Gramm Träger angegeben werden, wurde dies gemäss Formel 2 berechnet. Für die visuelle Darstellung der Ergebnisse wurde der dekadische Logarithmus der CFU g<sup>-1</sup> verwendet.

Formel 1: Berechnung der Colony-Forming-Units CFU pro Milliliter Inokulum

$$CFU\ ml^{-1} = C \times \frac{1}{DF} \times \frac{1}{V}$$

C = Anzahl Kolonien auf Platte

DF = Verdünnungsfaktor (Dilution Factor)

V = Volumen der Probe auf Platte [ml]

Formel 2: Berechnung der Colony-Forming-Units CFU pro Gramm Trägersubstanz

$$CFU\ g^{-1} = CFU\ ml^{-1} \times \frac{v}{m}$$

$CFU\ ml^{-1}$  = koloniebildende Einheiten pro Milliliter gemäss Formel 1

v = Volumen der Suspension für das Inokulum [ml]

m = Gewicht der Pflanzenkohle für das Inokulum [g]

### 3.4 Vorversuch: Optimale Inkubationszeit

Im Vorversuch wurde die optimale Inkubationszeit ermittelt. Entsprechend den Resultaten von Tao et al. (2018), bei welchen das Optimum bei 24 Stunden lag (siehe Kapitel 2.3.3), wurden drei Varianten überprüft: Bei Variante 1 wurden die Proben für 21 Stunden, bei Variante 2 für 24 Stunden und bei Variante 3 für 28 Stunden inkubiert. Für jede der drei Varianten wurde in dreifacher Wiederholung ein Falcon-Tube (15ml) mit 1g Pflanzenkohle eingewogen. Jede Wiederholung erhielt folgend 5ml der Mutterkultur. Die Proben wurden auf dem Vortex gut gemischt und bei 130rpm und 30°C in einem Inkubationsschrank inkubiert. Nach Ablauf der individuellen Inkubationszeiten der drei Varianten wurde jeder Ansatz gemäss Kapitel 3.3 ausgewertet.

### 3.5 Versuch 1: Nährstoffanreicherung

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die Zugabe von NPK-Dünger während der Inokulation die Besiedelung der Pflanzenkohle durch *Bacillus subtilis* verbessern kann. Dabei wurden vier verschiedene Varianten überprüft, wobei für jede Variante drei Wiederholungen angesetzt wurden. Die erste Variante diente als Kontrolle und wurde gemäss dem Verfahren von Tao et al. (2018) erstellt: Dazu

wurden die Pflanzenkohle und die Bakterien in einer NaCl-Lösung (0.9%) inkubiert, wie es bereits im Vorversuch durchgeführt worden war. Bei der zweiten Variante wurde dasselbe Vorgehen angewandt, die NaCl-Lösung aber durch eine Nährlösung ersetzt (spezifische Informationen im nächsten Abschnitt). Für die dritte Variante wurde die Pflanzenkohle bereits 24 Stunden vor der Zugabe der Bakterien in die Nährlösung eingelegt und bei 30°C inkubiert. Und bei der vierten Variante wurde die Kohle ebenfalls 24 Stunden vor Versuchsbeginn in die Nährlösung eingelegt, allerdings bei 60°C inkubiert.

Die verwendete Nährlösung sollte dem Nährstoffgehalt von Rinderurin entsprechen (pro Liter: 62g N-Total, 0.7g P<sub>2</sub>O, 21g K<sub>2</sub>O), der in der Literatur eine positive Wirkung in Zusammenhang mit Pflanzenkohle zeigte (Schmidt et al., 2015; Sutradhar et al., 2021). Dazu wurden Nährsalze (Anhang A) verwendet, die in entsprechenden Konzentrationen abgewogen und schliesslich nacheinander in destilliertem Wasser gelöst wurden. Die Nährlösung wurde vor deren Verwendung für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert (Systec VX-95). Für die Nährstoffanreicherung der Pflanzenkohle bei Variante 3 und 4 wurde je 4g der Kohle in ein Falcon-Tube (50ml) abgewogen, 20ml der Nährlösung dazu pipettiert und auf dem Vortex gut vermischt. Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen (30°C oder 60°C) für 24 Stunden inkubiert. Die Kohlegemische für Varianten 1 und 2 wurden unmittelbar vor der Inokulation hergestellt. Erneut wurden 4g Pflanzenkohle je Variante in ein Falcon-Tube (50ml) abgewogen und 20ml der entsprechenden Lösung (NaCl-Lösung bei Variante 1 und Nährlösung bei Variante 2) hinzu pipettiert und vermischt.

Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, wurde hier das Verfahren zur Anzucht der Mutterkultur leicht abgeändert, da die Kohle bereits vorgängig in der Nährlösung eingelegt war. Die suspendierten Bakterien wurden nach der ersten Zentrifugierung zusammengemischt und auf 12 Falcon-Tubes (15ml) verteilt, so dass jedes Tube 5ml der Mutterkultur erhielt. Die Tubes wurden erneut zentrifugiert (4500rpm, 30min) und der Überstand abgegossen. Den Zellpellets wurde dann jeweils 5ml des entsprechenden Kohlegemischs zu pipettiert. Nachdem sie mit dem Vortex gut vermischt wurden, sind die Proben für 24 Stunden bei 30°C inkubiert worden. Da sich im Vorversuch die Kohle während der Inokulation nach 24 Stunden am Boden absetzte, wurde die Schüttlergeschwindigkeit soweit erhöht, dass von Auge eine gute Durchmischung ersichtlich wurde (260rpm). Aus demselben Grund wurden die Proben horizontal und nicht mehr vertikal, wie im Vorversuch, inkubiert, ersichtlich in Abbildung 2. Alle Ansätze wurden erneut gemäss dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Verfahren ausgewertet.



Abbildung 2: Die in der Zellsuspension gelöste Pflanzenkohle (links) wurde für die restlichen Versuche horizontal (rechts) auf dem Schüttler platziert. (eigene Aufnahmen)

### 3.6 Versuch 2: Oxidation der Pflanzenkohle

Als weitere Möglichkeit das Beimpfungsverfahren weiterzuentwickeln, wurde der Einfluss der vorgängigen Oxidation der Pflanzenkohle auf die Besiedelung durch *Bacillus subtilis* überprüft. Dazu wurde ein Versuch mit vier Varianten und drei Wiederholungen pro Variante durchgeführt. Die erste Variante diente erneut als Kontrolle, indem wie bereits in den vorherigen Versuchen, eine NaCl-Lösung (0.9%) bei der Inokulation von nicht-oxidierte Pflanzenkohle verwendet wurde (vgl. Tao et al., 2018). In der zweiten Variante wurde die nicht-oxidierte Kohle erneut zusammen mit der Nährlösung inokuliert. Für Varianten 3 und 4 wurde die Pflanzenkohle vorgängig oxidiert (nähere Informationen im nächsten Abschnitt). Anschliessend wurde für Variante 3 bei der Inokulation erneut die NaCl-Lösung verwendet und bei Variante vier die Nährlösung. Die verwendete Nährlösung dieses Versuches war dieselbe wie im vorherigen Versuch (Kapitel 3.5). Die Mutterkultur wurde nach demselben abgeänderten Verfahren wie in Kapitel 3.5 hergestellt. Die Proben wurden schliesslich erneut bei 30°C, 260rpm für 24h inkubiert und gemäss Kapitel 3.3 ausgewertet.

Für die Oxidation der Kohle wurden in drei Falcon-Tubes (50ml) je 5g Pflanzenkohle abgewogen. Der Kohle wurde in einem nächsten Schritt pro Tube je 30ml 10%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung beigegeben (Verfahren nach Youngwilai et al. (2020)). Nachdem das Gemisch für zwei Stunden stehen gelassen wurde, ist jedes Tubes in ein Faltenfilter gegeben (4-7µm) und abfiltriert worden, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. Jeder Filter wurde mit der NaCl-Lösung (0.9%) gewaschen, indem 10ml der Lösung gleichmässig über den Filter pipettiert wurden. Die Filter wurden für eine halbe Stunde stehen gelassen, damit die Flüssigkeit gut ablaufen konnte. Schliesslich wurden sie aus dem Trichter entnommen und in einer Glasschale eine weitere Stunde liegen gelassen, so dass die Kohle vortrocknen konnte. Es folgte die Trocknung für 24 Stunden bei 80°C, wobei die Schale mit einer Alu-Folie leicht bedeckt wurde. Nach den 24 Stunden konnte die Kohle vom Filter genommen und in ein Falcon-Tube überführt werden. Bis zum Versuchstart wurde sie bei 5°C und in Dunkelheit gelagert.



Abbildung 3: Für die Oxidation der Pflanzenkohle wurde diese zuerst 2 Stunden in einer 10%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung eingelegt (links) und anschliessend abfiltriert (rechts). (eigene Aufnahmen)

### 3.7 Versuch 3: Filtrationsversuch

In den Versuchen der vorherigen Kapitel wurde immer das gesamte Inokulum, also die Pflanzenkohle mitsamt der Flüssigkeit, in der sie schwimmt, ausgewertet. Von besonderem Interesse sind aber die Bakterien, die sich auf der Kohle befinden und nicht jene, die in der Flüssigkeit daneben schwimmen. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt angestrebt, diese einzeln auszuwerten.

Zuerst wurde überprüft, ob mikroskopisch qualitativ bestimmt werden könnte, ob sich die Bakterien hauptsächlich auf oder neben der Kohle befinden. Dazu wurde ein Tropfen des fertigen Inokulums auf eine Glasplatte gegeben und 1:1 mit einem Tropfen Wasser vermischt. Die Probe wurde anschliessend unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Für eine quantitative Auswertung wurde ein Versuch durchgeführt, in dem die Pflanzenkohle mittels Filtration von der Flüssigkeit, in der sie schwimmt, getrennt wurde. Um eine gute Filtrierung sicherzustellen, wurde eine höhere Siebmaschenweite benutzt. Die mit dem Mörser zerkleinerte Pflanzenkohle wurde auf dem Siebturm mit zwei Sieben (125 $\mu$ m, 200 $\mu$ m) separiert. Die Fraktion zwischen 125 $\mu$ m und 200 $\mu$ m wurde schliesslich in einen Plastiksack überführt und für den Versuch verwendet. Der Unterschied in der Partikelgrösse ist in Abbildung 4 ersichtlich.

Der Versuch beinhaltete zwei Varianten. In der ersten Variante wurde nicht-oxidierte Kohle verwendet und in der zweiten Variante oxidierte Kohle. Bei beiden Varianten wurden die Bakterien in einer NaCl-Lösung (0.9%) mit der Pflanzenkohle inokuliert. Pro Variante wurden erneut drei Wiederholungen erstellt. Die Oxidation fand nach selbem Schema wie in Kapitel 3.6 beschrieben statt.

Während der Beimpfung absorbierte die Pflanzenkohle die Zellsuspension stärker, weshalb die Verdünnung auf 1:10 (w:v) erhöht werden musste, um ein Pipettieren der Proben zu ermöglichen. Aus demselben Grund mussten die Pipettenspitzen mit einer abgeflammt Schere abgetrennt werden. Erneut wurden alle Ansätze für 24h bei 30°C und 260rpm inkubiert und nach dem Schema von Kapitel 3.3 ausgewertet. Es folgte die Filtration aller Ansätze: Dazu wurde das Kohlegemisch in einen Glastrichter mit Faltenfilter gegeben (15 $\mu$ m) und mit 10ml NaCl-Lösung (0.9%) gewaschen. Die Proben wurden für 30 Minuten im Filter gelassen, damit sie absickern konnten. Anschliessend wurden je 0.1g Pflanzenkohle jeder Probe in ein Falcon-Tube (15ml) überführt und in 1ml NaCl-Lösung (0.9%) gelöst, damit wiederum ein Verhältnis von 1:10 (w:v) erreicht wurde. Die resuspendierte Kohle wurde schliesslich erneut nach dem Verfahren aus Kapitel 3.3 ausgewertet.



Abbildung 4: Beim Filtrationsversuch wurden grössere Kohlepartikel (125 – 200, links) verwendet als in den restlichen Versuchen (<250 $\mu$ m, rechts). (eigene Aufnahmen)

### 3.8 Versuch 4: Haltbarkeit

In diesem Versuch wurde die Haltbarkeit der untersuchten Formulierung überprüft. Der Versuch wurde mit zwei Varianten an je vier Wiederholungen durchgeführt. Variante 1 wurde mit unbehandelter Pflanzenkohle angesetzt und bei Variante 2 wurde erneut oxidierte Kohle verwendet. Die Kohle wurde nach dem Verfahren von Kapitel 3.6 oxidiert. Für diesen Versuch wurde die nicht-oxidierte Kohle jedoch ebenfalls nach demselben Muster behandelt, wobei statt einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung deionisiertes Wasser verwendet wurde. Das Ziel dieses Vorgehens war, einen allfälligen Einfluss der Filtration selbst zu erkennen. Es wurden je 1g Kohle pro Wiederholung in ein Falcon-Tube (15ml) abgewogen, mit 5ml Mutterkultur vermischt und für 24h bei 260rpm und 30°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kolonienzahl aller Proben gemäss Kapitel 3.3 ausgewertet. Die Proben wurden schliesslich bei 5°C und Dunkelheit eingelagert. Während sechs Wochen wurden die Proben jeweils einmal pro Woche ausgewertet. Dazu wurde den Tubes je eine Teilprobe entnommen, welche erneut nach dem Standardverfahren (Kapitel 3.3) ausplattiert und ausgewertet wurde.

Nach 4 Wochen konnten Kolonien auf den Platten gefunden werden, die visuell nicht *Bacillus subtilis* zuzuordnen waren. Diese Kolonien wurden unter dem Lichtmikroskop betrachtet (eingefärbt mit Baumwollblau), um mögliche Hinweise über ihre taxonomische Zugehörigkeit zu erhalten.

### 3.9 Versuch 5: Kressetest

Mit einem Kressetest wurde untersucht, ob die Formulierung mit Pflanzenkohle und *Bacillus subtilis* in der Lage ist, *Pythium ultimum* bei Kresse zu unterdrücken. Für diesen Versuch wurden 14 Varianten mit je vier Wiederholungen überprüft. Dabei wurde oxidierte Pflanzenkohle und unbehandelte Pflanzenkohle, beimpft mit *Bacillus subtilis*, in jeweils drei verschiedenen Applikationsmengen verwendet. Als Kontrolle diente die Applikation von *Bacillus subtilis* ohne Trägersubstanz. Die unterschiedlichen Varianten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Als Parameter für die Vitalität der Kresse wurden die Wuchshöhe gemessen, der Krankheitsbefall bonitiert und das Feucht- und Trockengewicht der gewachsenen Kresse bestimmt.

Tabelle 6: Die 13 Varianten des Kressetest. Angegeben ist die jeweilig verwendete Pflanzenkohle und angewendete Konzentration, sowie ob *B. subtilis* und/oder *P. ultimum* eingesetzt wurden.

Variante	Kohle	Konzentration	Bacillus subtilis	Pythium ultimum
1	Oxidiert	1.5ml	Ja	Ja
2	Oxidiert	3ml	Ja	Ja
3	Oxidiert	6ml	Ja	Ja
4	Unbehandelt	1.5ml	Ja	Ja
5	Unbehandelt	3ml	Ja	Ja
6	Unbehandelt	6ml	Ja	Ja
7	Keine	3ml	Ja	Ja
8	Keine	-	Nein	Ja
9	Oxidiert	3ml	Nein	Ja
10	Unbehandelt	3ml	Nein	Ja
11	Oxidiert	3ml	Nein	Nein
12	Unbehandelt	3ml	Nein	Nein
13	Keine	-	Nein	Nein

Die drei Applikationsmengen orientieren sich am Produkt Bioter Carbon von Andermatt Biocontrol AG. Bei Topfpflanzen empfiehlt die Firma die Zugabe von bis zu 8kg pro Kubikmeter Substrat (Andermatt Biocontrol Suisse AG, 2021). Die für den Versuch verwendeten Petrischalen haben gemäss Hersteller ein Volumen von 80ml (Greiner Bio-One GmbH, 2015). Demnach wären, auf den Empfehlungen von

Andermatt Biocontrol basierend, bis zu 0.64g Pflanzenkohle unter das Substrat jeder Petrischale zu mischen. Für den Versuch wurde für ein vereinfachtes Prozedere deshalb 0.6g Pflanzenkohle pro Schale als Standardkonzentration verwendet. Bei einem Mischverhältnis von 1:5 entspricht dies 3ml des Inokulums. Weiter wurde neben der Standardkonzentration je eine Variante mit der halben und der doppelten Konzentration behandelt. Dies entsprach 1.5ml und 6ml des Inokulums.

Die Kohle wurde erneut nach dem in Kapitel 3.6 beschriebenen Verfahren oxidiert, wobei die nicht oxidierte Pflanzenkohle erneut demselben Verfahren mit deionisiertem Wasser unterzogen wurde. Die Mutterkultur wurde gemäss Kapitel 3.2 hergestellt. Schliesslich wurden zweimal 5g Pflanzenkohle pro Variante in ein Falcon-Tube (50ml) eingewogen, mit je 25ml der Mutterkultur pro Tube ergänzt und auf dem Vortex gut miteinander vermischt. Die Proben wurden bei 30°C und 260rpm für 24h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben derselben Variante in einer Glasschottflasche zusammen gemischt, ausplattiert und ausgewertet (Kapitel 3.3). Die so entstandene Formulierung wurde schliesslich für den Kresseversuch verwendet.

Für die Kresse der Variante 7, die mit *Bacillus subtilis* ohne Trägersubstanz behandelt wurde, ist dieselbe Mutterkultur wie für die Beimpfung der Kohle verwendet worden. Es wurde die Standardkonzentration angewendet (3ml). Für Varianten 9-12 wurden je 5g Pflanzenkohle (unbehandelt und oxidiert) in ein Falcon-Tube (50ml) abgewogen und in 25ml NaCl-Lösung (0.9%) suspendiert. Dies wurde unmittelbar vor dem Versuch durchgeführt. Es wurde erneut die Standardkonzentration angewendet.

Sieben Tage bevor die Kresse gesät wurde, wurden 10 Malz-Agar-Platten mit *Pythium ultimum* (Stamm #67-1) beimpft. Dazu wurde aus bereits infizierten Platten mit einem Skalpell ein Quadrat entfernt und mit dem Myzel gegen unten gerichtet auf die zu beimpfende Platte übertragen. Die Platten wurden verschlossen und bis zum Versuchsstart bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Ansaat der Kresse wurden mit einem Korkstecher Rondellen aus den mit *P. ultimum* befallenen Agarplatten gestochen und für jede Wiederholung mit *P. ultimum* (Varianten 1-10) wurden fünf Rondellen mit dem Myzel gegen oben in leere Petrischalen (9cm) gestellt (Abbildung 5, links). Bei jenen Varianten ohne *P. ultimum* wurden Rondellen aus leeren Malz Agarplatten gestochen und ebenfalls in leere Petrischalen übertragen. Schliesslich wurden alle Platten gut mit Substrat (Floradur Block Bio, Floragard GmbH, Anhang B) gefüllt (Abbildung 5, mitte).



Abbildung 5: Pro Wiederholung wurden 5 mit *P. ultimum* befallene Rondellen in eine leere Petrischale gestellt (links), die Petrischale wurde mit Substrat gefüllt (mitte) und die beimpfte Pflanzenkohle untergemischt. Abschliessend wurden alle Ansätze mit 30ml Leitungswasser bewässert und gleichmässig mit Kresse besät (rechts). (eigene Aufnahmen)

Anschliessend erhielt jede Petrischale die entsprechende Menge Pflanzenkohle oder *Bacillus subtilis* ohne Trägersubstanz. Dazu wurde die Kohle in der Schottflasche gut geschüttelt, auf die Petrischale pipettiert und von Hand oberflächlich ins Substrat gemischt. Alle Ansätze, die weniger als 6ml Probe flüssigkeit erhielten, wurden mit einer NaCl-Lösung (0.9%) auf dasselbe Volumen ergänzt und alle



Wiederholungen wurden mit je 30ml Leitungswasser bewässert. Schliesslich wurde die Kresse (Kresse einfach, Bigler Samen AG) gesät. Die Saat erfolgte mit einem Eppentorf-Tube (1.5ml), das bis oben mit Samen gefüllt und schliesslich gleichmässig auf der Petrischale verteilt wurde (Abbildung 5, rechts). Die Petrischalen wurden zugedeckt und zufällig auf vier Behälter unter einer künstlichen Beleuchtung verteilt (eine LED-Leiste pro Kiste). Die Beleuchtung war über eine Zeitschaltuhr jeweils von 6 bis 19:30 Uhr eingeschaltet. Die Anordnung wurde im Nachhinein festgehalten und ist in Abbildung 6 dargestellt.

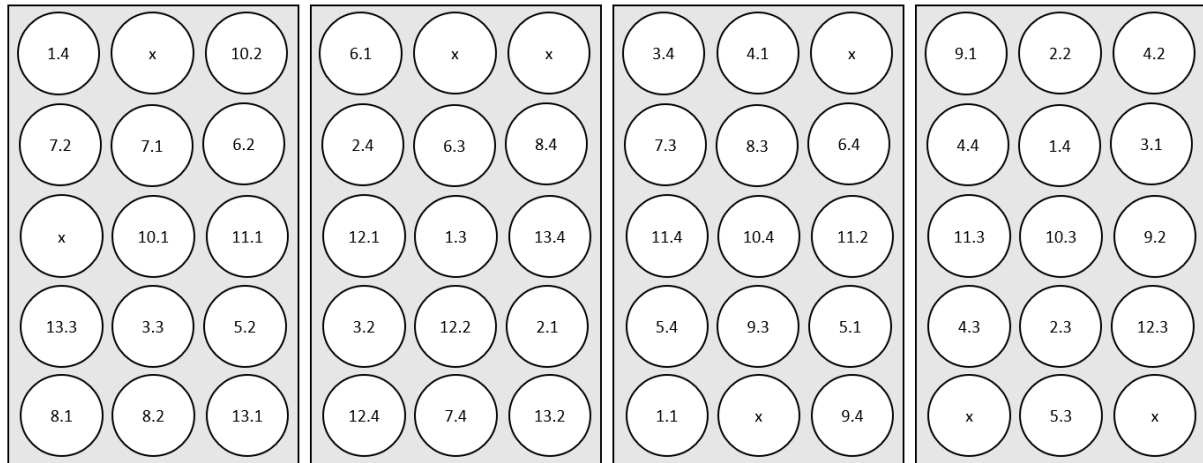


Abbildung 6: Die Anordnung aller Ansätze in den vier Behältern. Pro Behälter war mittig eine LED-Leiste vorhanden, die jeweils von 6 bis 19:30 Uhr Tageslicht simuliert.



Abbildung 7: Die Kresse nach sieben Tagen, verteilt auf die vier Behälter mit künstlichem Tageslicht. Anschliessend wurde von jedem Ansatz die Befallsstärke, die Wuchshöhe, das Feucht- und das Trockengewicht bestimmt. (eigene Aufnahme).

Nach 3 Tagen drückten die Keimlinge den Deckel der Petrischalen nach oben, worauf die Deckel entfernt wurden. Am vierten und fünften Tag erhielten alle Aussaaten erneut 10ml Leitungswasser. Am sechsten Tag wurden 20ml Wasser zugegeben, da sich die Substrate trocken anfühlten. Am siebten Tag fand die Auswertung statt, da die ersten Pflanzen umzukippen drohten (Abbildung 7). Dazu wurden Wuchshöhe und Befallsstärke bemessen, sowie das Feucht- und Trockengewicht bestimmt. Für die Wuchshöhe wurde die durchschnittliche Höhe der Kresse ab dem oberen Rand der Petrischalen mit

einem Lineal auf 0.25cm genau gemessen. Die Befallstärke wurde in prozentuaem Anteil der Fläche bestimmt. Dabei wurden die Stufen 0%, 5%, 10% etc. bis 100% gewählt. Für die Bestimmung des Trockengewichts wurde die Kresse jeder Petrischale auf Substrathöhe abgeschnitten und eingewogen. Die geschnittene Kresse wurde bei 60°C getrocknet und nach 24h und 25h ausgewogen, um die vollständige Trocknung sicherzustellen.

Bei fünf zufällig ausgewählten Ansätzen wurde das Gewicht des eingefüllten Substrates, sowie der gesäten Kresse bestimmt. Zudem wurde das Substrat in fünf Wiederholungen für 24h bei 105°C getrocknet, um dessen Trockengewicht zu bestimmen. Die Auswaage erfolgte ein zweites Mal nach 25h, um die vollständige Trocknung sicherzustellen. Es wurden durchschnittlich 1.24g ( $\pm$  0.04g) Samen auf 35.98g ( $\pm$  2.06g) Substrat pro Wiederholung gesät. Das Substrat hatte ein Feuchtigkeitsgehalt von 63.66% ( $\pm$  0.22%).

### 3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit R (Version 3.5.1) in Kombination mit RStudio (Version 1.1.456). Alle statistischen Tests wurden zweiseitig geführt, das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha = 5\%$  festgelegt. Die Visualisierung der Daten erfolgte ebenfalls mit R in Kombination mit R Studio und dem Package «ggplot2». Für die statistische Analyse wurden die koloniebildenden Einheiten pro Gramm Träger verwendet. Bei der Visualisierung wurde der dekadische Logarithmus dieser eingesetzt.

Die Ergebnisse des Vorversuches und von Versuch 1-3 wurden zuerst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf die Normalverteilung der Residuen und mit dem Bartlett-Test auf die Varianzhomogenität geprüft. Im Falle von normalverteilten Residuen ( $p$ -Wert  $> 0.05$ ) und homogenen Varianzen ( $p$ -Wert  $> 0.05$ ) wurde anschliessend eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANVOA) durchgeführt. War die Varianzhomogenität nicht gegeben, die Normalverteilung aber schon, wurde der Oneway-Test zur Signifikanzanalyse eingesetzt. Falls die Normverteilung der Daten nicht erfüllt war, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als Post-Hoc-Test wurde bei der einfaktoriellen Varianzanalyse der Tukeys HSD-Test und ansonsten der Pairwise-T-Test angewandt.

Bei Versuch 4 fand die statistische Auswertung für jede der wöchentlichen Erhebungen einzeln statt. Dazu wurden die Daten erneut auf normalverteilte Residuen (Shapiro-Wilk-Test,  $p$ -Wert  $> 0.05$ ) und homogene Varianzen (F-Test) überprüft. Bei homogenen Varianzen ( $p > 0.05$ ) wurde der Student t-Test zur Signifikanzanalyse eingesetzt, bei heterogenen Varianzen ( $p < 0.05$ ) der Welch t-Test. Zudem wurden die koloniebildenden Einheiten des ersten und letzten Versuchstages für beide Varianten separat mit demselben Verfahren auf statistische Unterschiede überprüft.

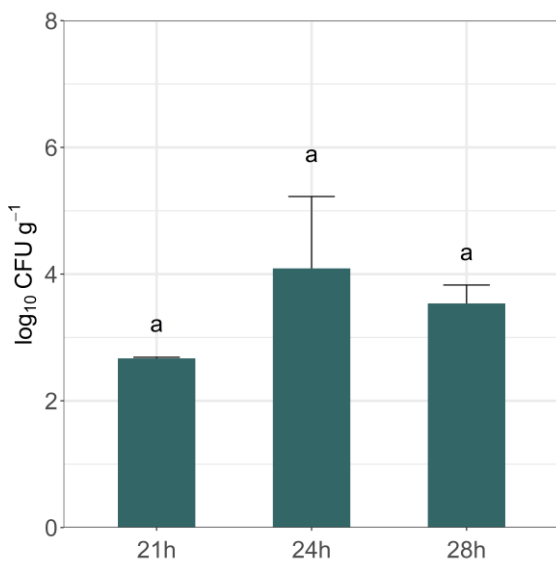
Für die statistische Auswertung beim Kresstest wurden alle Varianten, die mit der Standardkonzentration behandelt wurden, zusammen auf signifikante Unterschiede überprüft. Zu dieser Gruppe wurden die Negativkontrolle und die Positivkontrolle (Varianten 8 und 13) ebenfalls dazugezählt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass jene Varianten, die nur die halbe oder die doppelte Konzentration erhielten, von der ersten Analyse ausgeschlossen waren. Die Analyse erfolgte nach dem Schema wie für die Versuche 1-3. Anschliessend wurden in einer zweiten Analyse auf statistische Unterschiede aufgrund der applizierten Konzentration überprüft. Dazu wurden die Varianten 1-3, sowie 4-6 in separaten Signifikanzanalysen untersucht. Erneut wurde dasselbe Schema angewandt.

## 4. Resultate

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente und ihre statistischen Auswertungen vorgestellt. Die gesamten Rohdaten sind dem Anhang zu entnehmen.

### 4.1 Vorversuch: Optimale Inkubationszeit

Die drei untersuchten Inkubationszeiten hatten keine signifikant unterschiedlichen Koloniezahlen auf der Kohle zur Folge. Die Ergebnisse sind in Grafik 1 visualisiert: Nach 21 Stunden konnten  $4.7 \times 10^2$  CFU  $g^{-1}$  auf der Pflanzenkohle gemessen werden, nach 24 Stunden waren es  $8.06 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  und nach 28 Stunden  $3.96 \times 10^3$  CFU  $g^{-1}$ . Bei der Mutterkultur konnte eine Koloniezahl von  $6.7 \times 10^8$  CFU  $ml^{-1}$  bestimmt werden. Ausserdem waren auf mehreren Platten Kolonien von oranger Farbe erkennbar, die eindeutig nicht *Bacillus subtilis* zuzuordnen waren (siehe Abbildung 8).



Grafik 1: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle nach 21, 24 und 28 Stunden Inkubationszeit. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis)

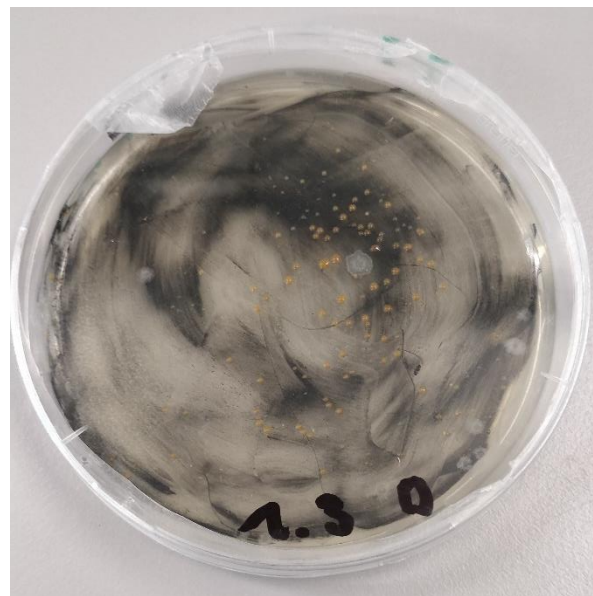
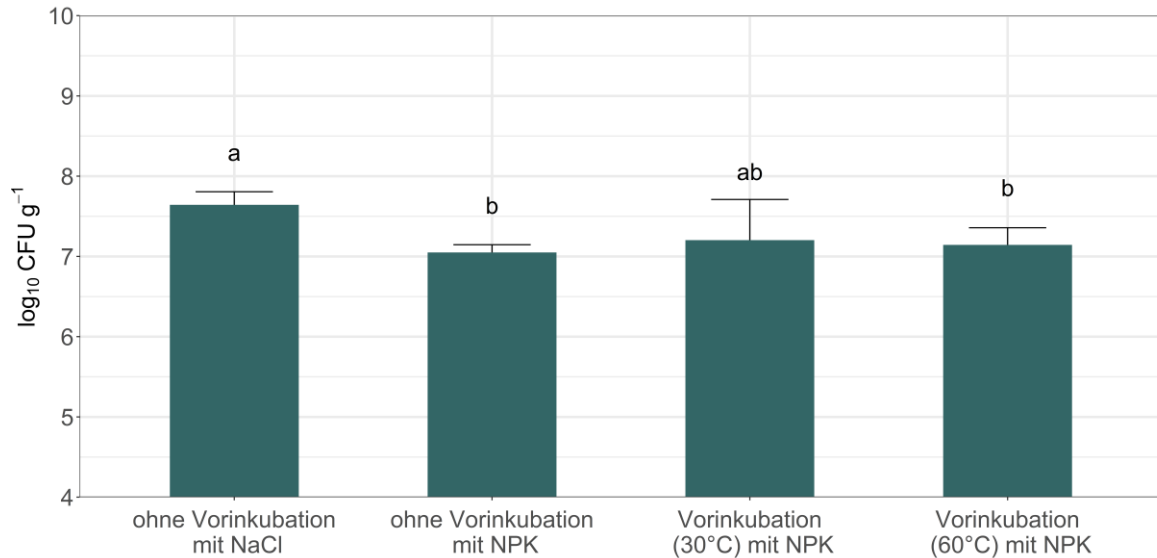


Abbildung 8: Unerwünschte orange Kolonien auf den Platten des Vorversuchs, die nicht *B. subtilis* sein können.

### 4.2 Versuch 1: Nährstoffanreicherung

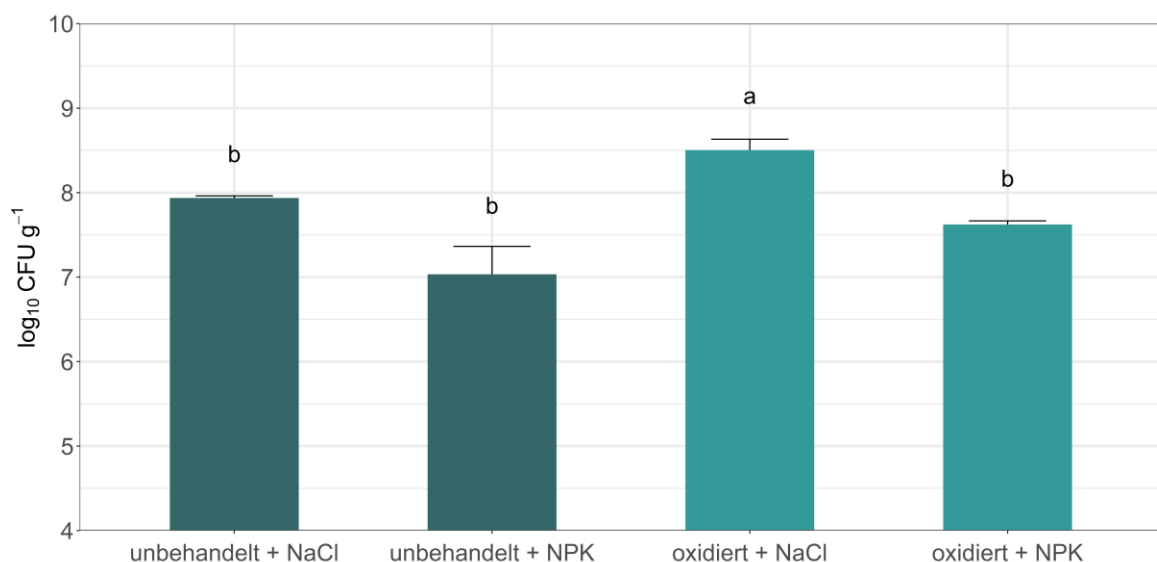
Die Ergebnisse des Versuches zur Nährstoffanreicherung der Pflanzenkohle sind in Grafik 2 visualisiert. Die höchsten Zellzahlen wurden im Inokulum des Kontrollverfahrens gemessen, bei dem die Pflanzenkohle mit der NaCl-Lösung inkubiert wurde ( $4.62 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ). Die zweithöchsten Koloniezahlen wies die Pflanzenkohle mit einer Vorinkubation mit NPK-Dünger bei 30°C auf ( $2.24 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ). Die beiden Verfahren unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die anderen beiden Verfahren führten im Vergleich zur Kontrolle hingegen zu signifikant tieferen Zellzahlen. Bei der Variante mit einer Vorinkubation mit NPK-Dünger bei 60°C lag der Wert bei  $1.51 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$  und auf der Pflanzenkohle, die ohne Vorinkubation mit NPK-Dünger inokuliert wurde, konnten  $1.14 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$  gemessen werden. Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren war nicht signifikant. Die Zellkonzentration in der Mutterkultur betrug  $5.6 \times 10^8$  CFU  $ml^{-1}$ .



Grafik 2: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle mit unterschiedlicher Nährstoffanreicherung. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , ANOVA)

#### 4.3 Versuch 2: Oxidation der Pflanzenkohle

Die oxidierte Pflanzenkohle, die in der NaCl-Lösung inokuliert wurde, wies mit  $2.28 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> eine signifikant höhere Kolonienzahl auf als alle anderen Varianten (Grafik 3). Die anderen drei Varianten unterschieden sich bezüglich Zellzahlen nicht signifikant voneinander. Bei jener Variante, bei der die oxidierte Kohle in NPK-Dünger inokuliert wurde, konnten  $4.22 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> gemessen werden. Bei der unbehandelten Pflanzenkohle in der NaCl-Lösung wurden  $8.63 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> festgestellt und bei der Variante mit unbehandelter Pflanzenkohle und NPK-Dünger lag der Wert bei  $1.30 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup>. Bei der Mutterkultur dieses Versuches konnten  $2.52 \times 10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> ermittelt werden.



Grafik 3: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehandelter und oxidierter Pflanzenkohle, die für eine Variante jeweils in NaCl und für eine zweite Variante in NPK-Dünger inokuliert wurde. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis)

#### 4.4 Versuch 3: Filtrationsversuch

Die Betrachtung des Inokulums unter dem Lichtmikroskop konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob sich die Bakterien vermehrt in der Flüssigkeit oder auf der Kohle selbst befinden. In Abbildung 9 sind zwei Aufnahmen zu sehen. Die linke Seite zeigt die schwarz-braunen Kohlestücke in der Flüssigkeit des Inokulums. Es sind keine Bakterien zu erkennen, rund um grössere Kohlestücke war aber Bewegung wahrzunehmen. Auf der rechten Seite wurde ein Objekt, das sich bewegte und deswegen womöglich ein Bakterium hätte sein können, vermessen: Es war ca.  $1.86\mu\text{m}$  gross.

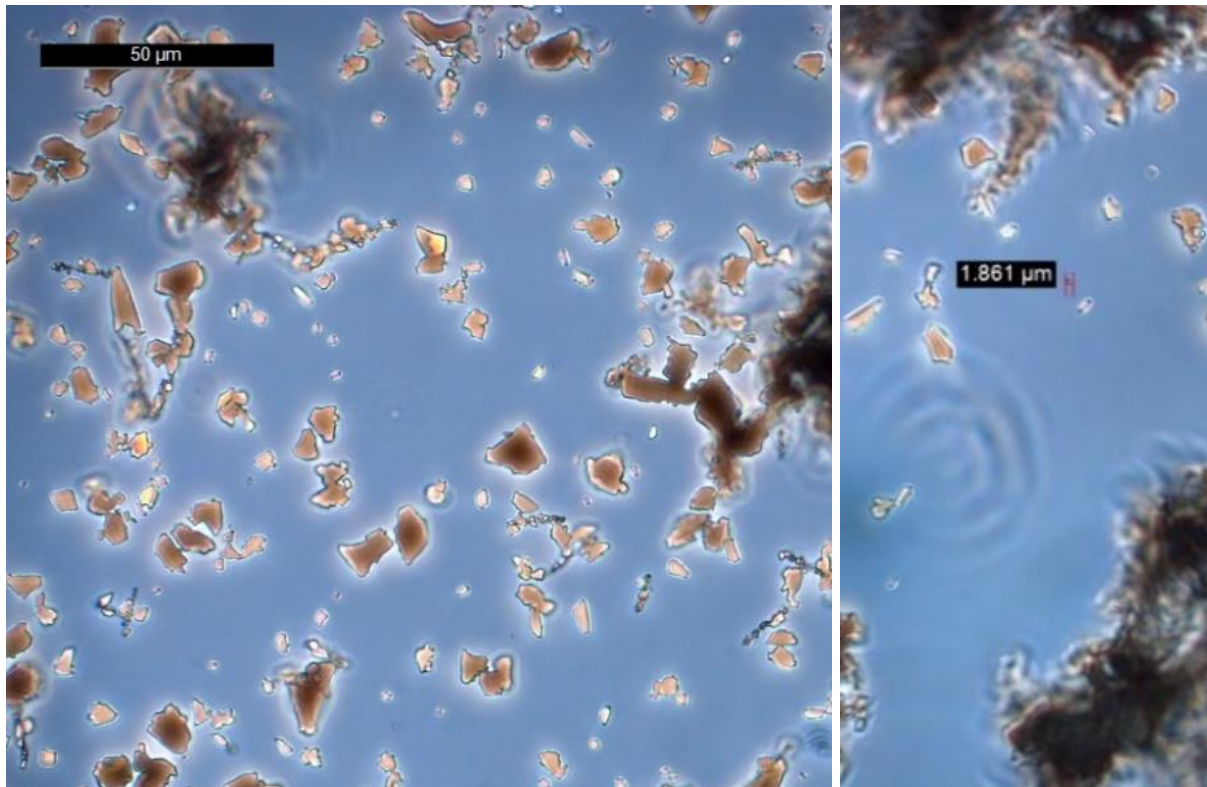
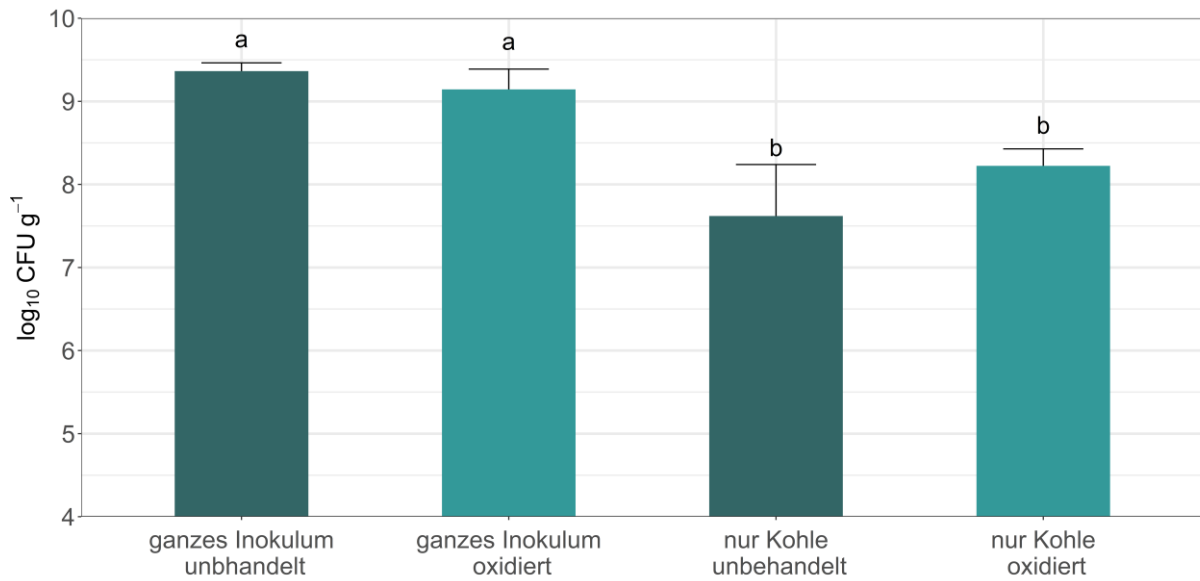


Abbildung 9: Aufnahmen des Inokulums von Versuch 3 unter dem Lichtmikroskop. Zu erkennen sind links schwarz-braune Kohlestücke in einer flüssigen Matrix und rechts die Vermessung eines einzelnen Bakteriums in der Flüssigkeit.

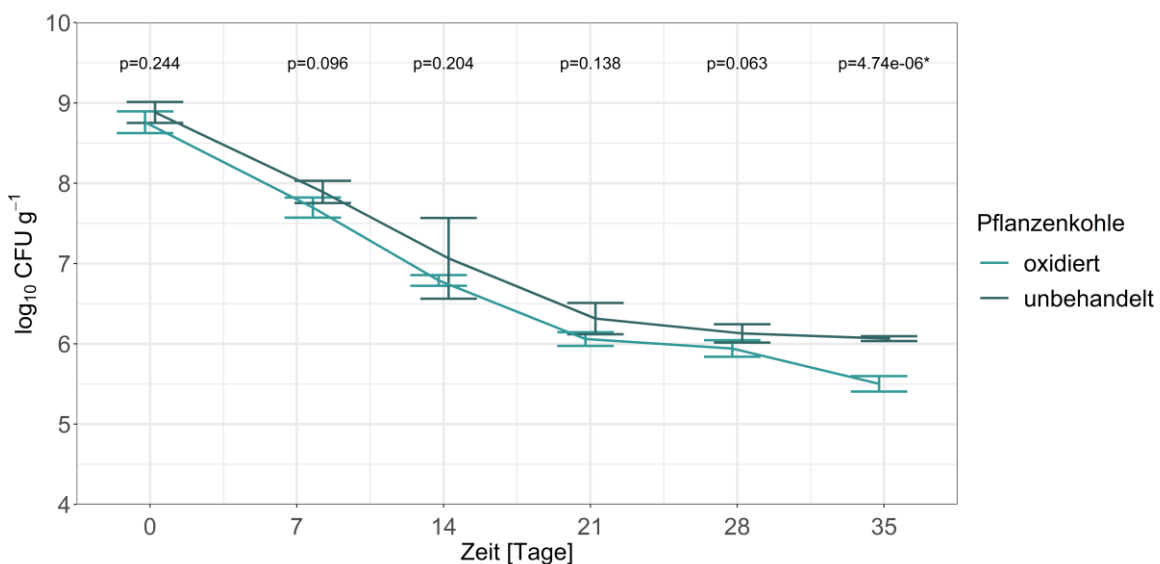
Aufgrund der uneindeutigen Ergebnisse wurde entschieden, ein Versuch durchzuführen, bei dem die Kohle von der Flüssigkeit des Inokulums abfiltriert wurde (vgl. Kapitel 3.7). Die Ergebnisse wurden in Grafik 4 visualisiert. Die Filtrierung führte bei beiden Kohlen (unbehandelt und oxidiert) zu signifikant tieferen Koloniezahlen. So konnten im unbehandelten Inokulum vor der Filtrierung  $2.33 \times 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$  nachgewiesen werden, auf der Kohle selbst waren es  $6.92 \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$ . Dieselbe Beobachtung konnte bei der oxidierten Kohle gemacht werden, wobei die Zellzahl von  $1.55 \times 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$  auf  $1.8 \times 10^8 \text{ CFU g}^{-1}$  sank. Zwischen den zwei Pflanzenkohlen waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Bei der Mutterkultur konnten  $7.3 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  gemessen werden.



Grafik 4: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehauelter und oxidiierter Pflanzenkohle, im ganzen Inokulum (Kohle + Flüssigkeit) und nur auf der Kohle selbst gemessen. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Oneway)

#### 4.5 Versuch 4: Haltbarkeit

Grafik 5 zeigt den Verlauf der Koloniezahlen der Proben während den fünf Wochen Lagerzeit. Die unbehauelte Pflanzenkohle beherbergte während der ganzen Versuchszeit tendenziell höhere Populationen von *B. subtilis*. Anhand der angegebenen p-Werte ist jedoch zu erkennen, dass die Unterschiede nur an Tag 35 signifikant waren. An Tag 28 und 35 konnten auf zwei Wiederholungen der oxidierten Pflanzenkohle orangefarbene Kolonien auf den Platten entdeckt werden, welche unter dem Lichtmikroskop betrachtet und als ca. 1.5µm grosse Bakterien identifiziert wurden (Abbildung 10)



Grafik 5: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehauelter und oxidiierter Pflanzenkohle im Verlauf von 5 Wochen. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die p-Werte zeigen die statistische Auswertung, mit Stern (\*) versehene Werte weisen auf signifikante Unterschiede hin ( $p < 0.05$ , Student-t-Test bei Tag 0, 8, 28, 35, Welch-t-Test bei Tag 14, 21).

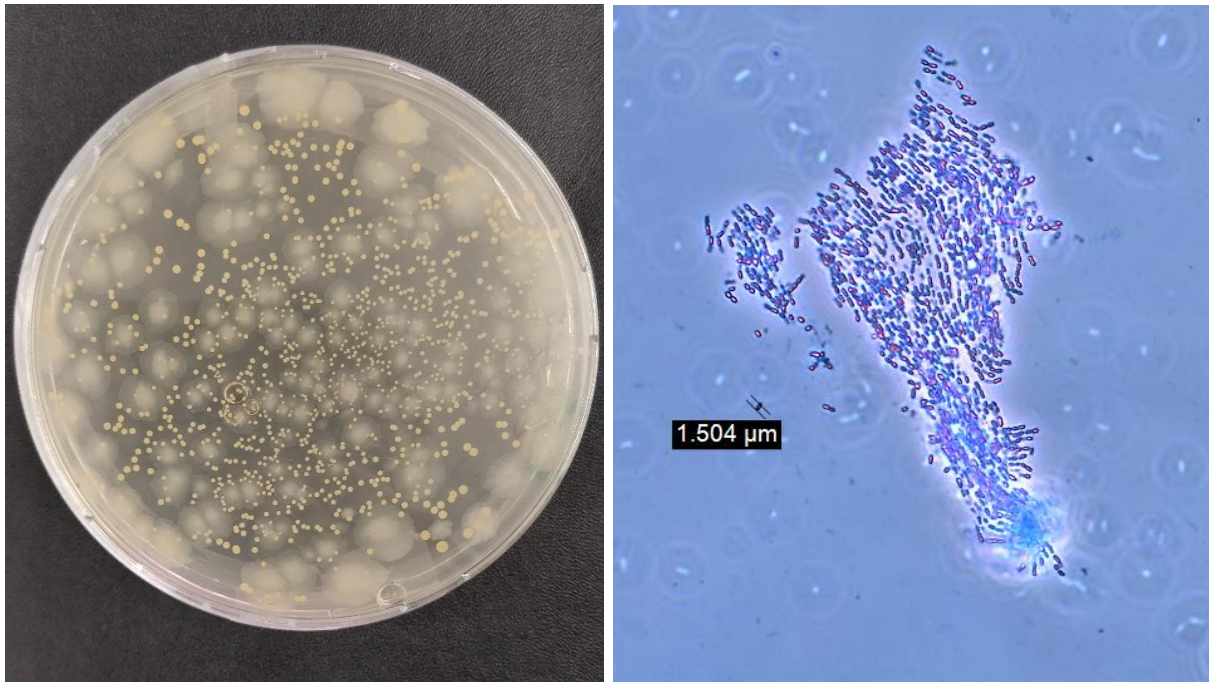
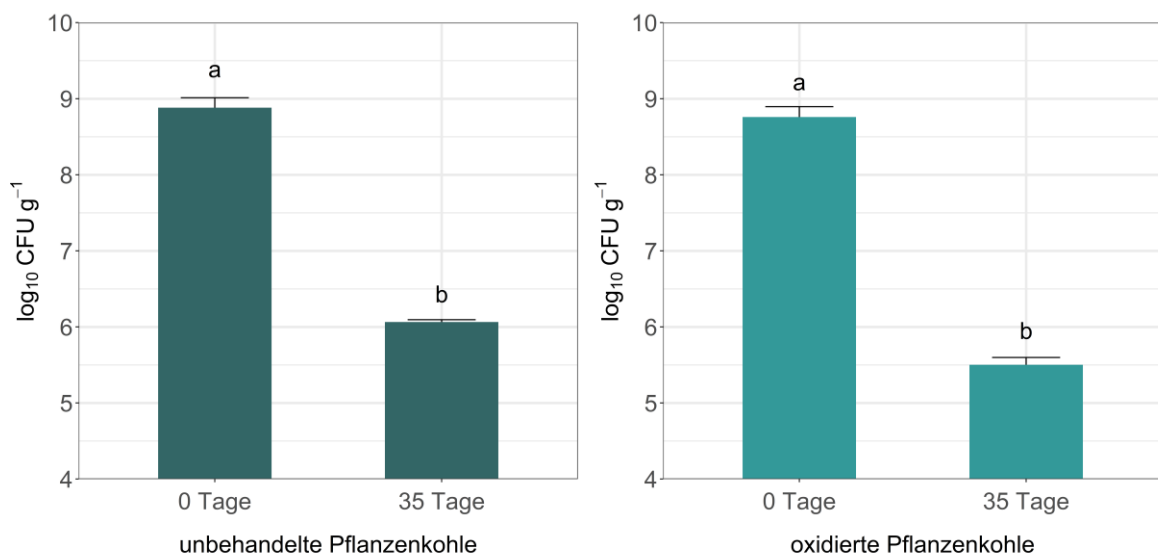


Abbildung 10: Auf den Platten der eingelagerten, oxidierten Pflanzenkohle waren in Woche vier und fünf orange Kolonien zu erkennen (links). Die Kolonien konnten unter dem Lichtmikroskop als ca. 1.5µm grosse Bakterien identifiziert werden (rechts).

Weiter wurden, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, die Koloniezahlen des ersten und letzten Versuchstages für beide Varianten auf statistische Unterschiede geprüft. Die Unterschiede waren sowohl für die unbehandelte wie auch für die oxidierte Kohle signifikant, wie in Grafik 6 erkennbar ist. Bei der unbehandelten Kohle sank die Population von  $7.92 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> auf  $1.16 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>. Im Inokulum mit oxidiertes Pflanzenkohle als Träger wurden zu Beginn  $5.93 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> gemessen, während es nach fünf Wochen noch  $3.27 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> waren.



Grafik 6: Die koloniebildenden Einheiten von *B. subtilis* pro Gramm Pflanzenkohle am ersten und letzten Tag des Versuches, bei unbehandelter und oxidiertes Pflanzenkohle. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Welch-t-Test)

#### 4.6 Versuch 5: Kresstest

Bei der Mutterkultur konnte eine Zellzahl von  $1.12 \times 10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> bestimmt werden. Die resultierende Populationsdichte betrug  $2.5 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> auf der unbehandelten und  $3.15 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> auf der oxidierten Pflanzenkohle.

Die Ergebnisse der ersten Signifikanzanalyse des Kresstests sind in Grafik 7 visualisiert. Es wurden alle Varianten, die mit der Standardkonzentration (3ml) behandelt wurden, sowie die Positiv- und Negativkontrolle, miteinbezogen.

Für die Variante mit unbehandelter Pflanzenkohle, beimpft mit *B. subtilis*, wurde im Vergleich zur Negativkontrolle einen signifikant tieferen Befall mit *P. ultimum* und signifikant höhere Feucht- und Trockengewichte gemessen. Bezüglich Wuchshöhe unterschied sich die Variante nicht signifikant von der Negativkontrolle. Im Vergleich zur Positivkontrolle wies die Variante mit unbehandelter, beimpfter Kohle eine statistisch gleichwertige Befallsstärke und ein gleichwertiges Trockengewicht auf. Wuchshöhe und Feuchtgewicht hingegen waren signifikant tiefer als bei der Positivkontrolle.

Im Vergleich zu der Variante ohne Trägermedium führte die Applikation der unbehandelten, beimpften Kohle zu einem signifikant tieferen Befall mit *P. ultimum*. Bezüglich den anderen drei Parameter unterschieden sich die Varianten nicht signifikant voneinander. Und wurde dieselbe Kohle ohne *B. subtilis* zur Behandlung der Kresse eingesetzt, führte das bezüglich allen vier Parameter zu statistisch gleichwertigen Resultaten.

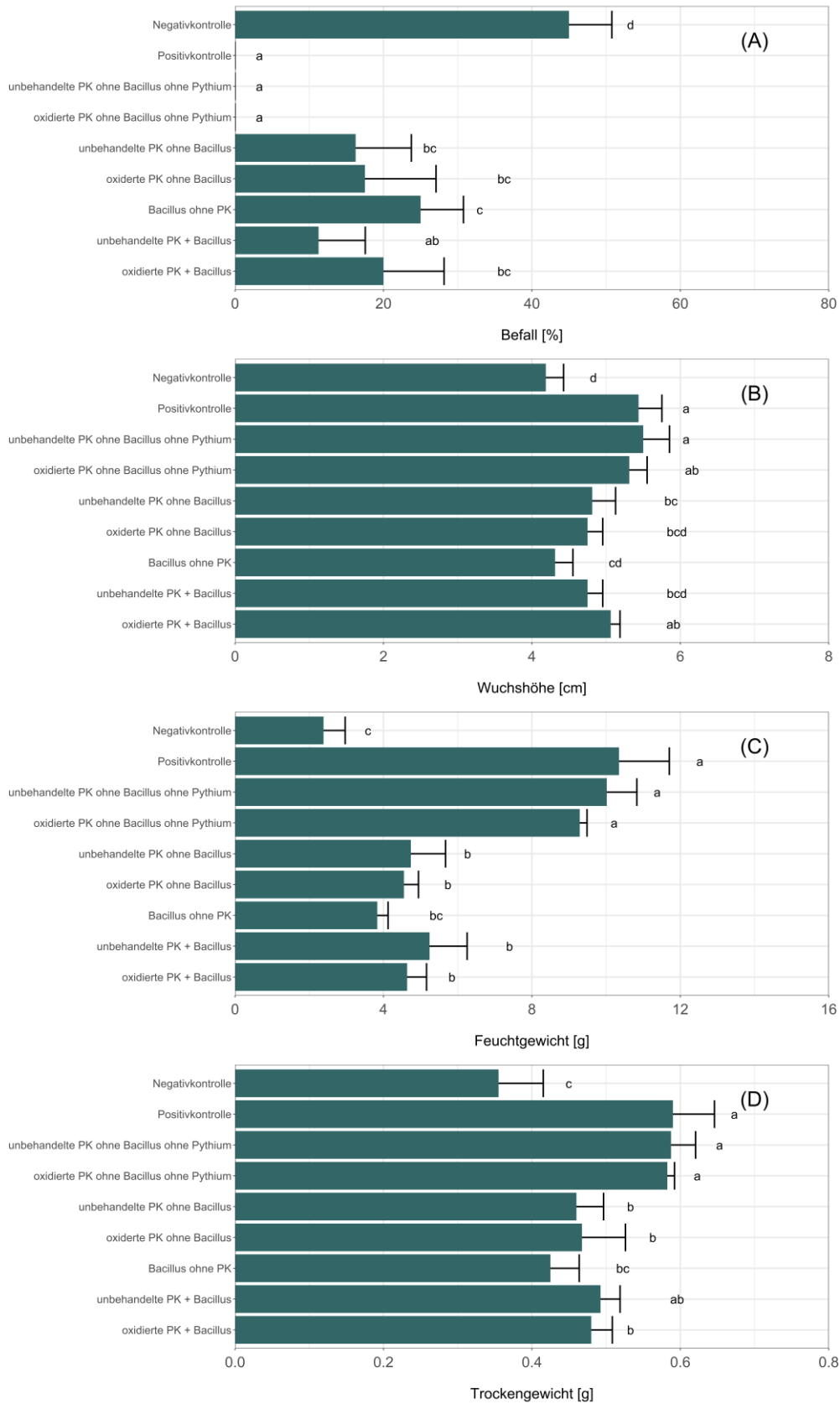
Bei der Variante mit oxidierte, beimpfter Kohle, wurden im Vergleich zur Negativkontrolle, sowohl ein signifikant tieferer Befall mit *P. ultimum*, wie auch eine signifikant höhere Wuchshöhe sowie Feucht- und Trockengewichte erzielt. Im Vergleich zur Positivkontrolle war der Befall mit *P. ultimum* signifikant höher und das Feucht- und Trockengewicht signifikant tiefer. Bei der Wuchshöhe waren die beiden Varianten statistisch gleichwertig. Der Vergleich zwischen der Variante mit beimpfter, oxidierte Pflanzenkohle und der Positivkontrolle ist in Abbildung 11 dargestellt.

Wird die Variante mit beimpfter, oxidierte Kohle mit der Variante mit *B. subtilis* ohne Träger verglichen, so schneiden die beiden Varianten bezüglich aller Parameter, ausser der Wuchshöhe, statistisch gleichwertig ab. Die Wuchshöhe war bei der Variante mit Trägersubstanz signifikant höher. Und wurde dieselbe Kohle ohne *B. subtilis* eingesetzt, wurden ebenfalls in allen Parameter statistisch gleichwertige Werte gemessen.

Zwischen einer Behandlung mit beimpfter unbehandelter Kohle und beimpfter oxidierte Kohle wurden bezüglich aller vier Parameter keine statistischen Unterschiede festgestellt.

Die Behandlung mit unbeimpfter Pflanzenkohle (oxidiert und unbehandelt) von nicht infizierter Kresse führte bei allen vier erhobenen Parameter zu signifikant gleichwertigen Resultaten wie bei der Positivkontrolle.



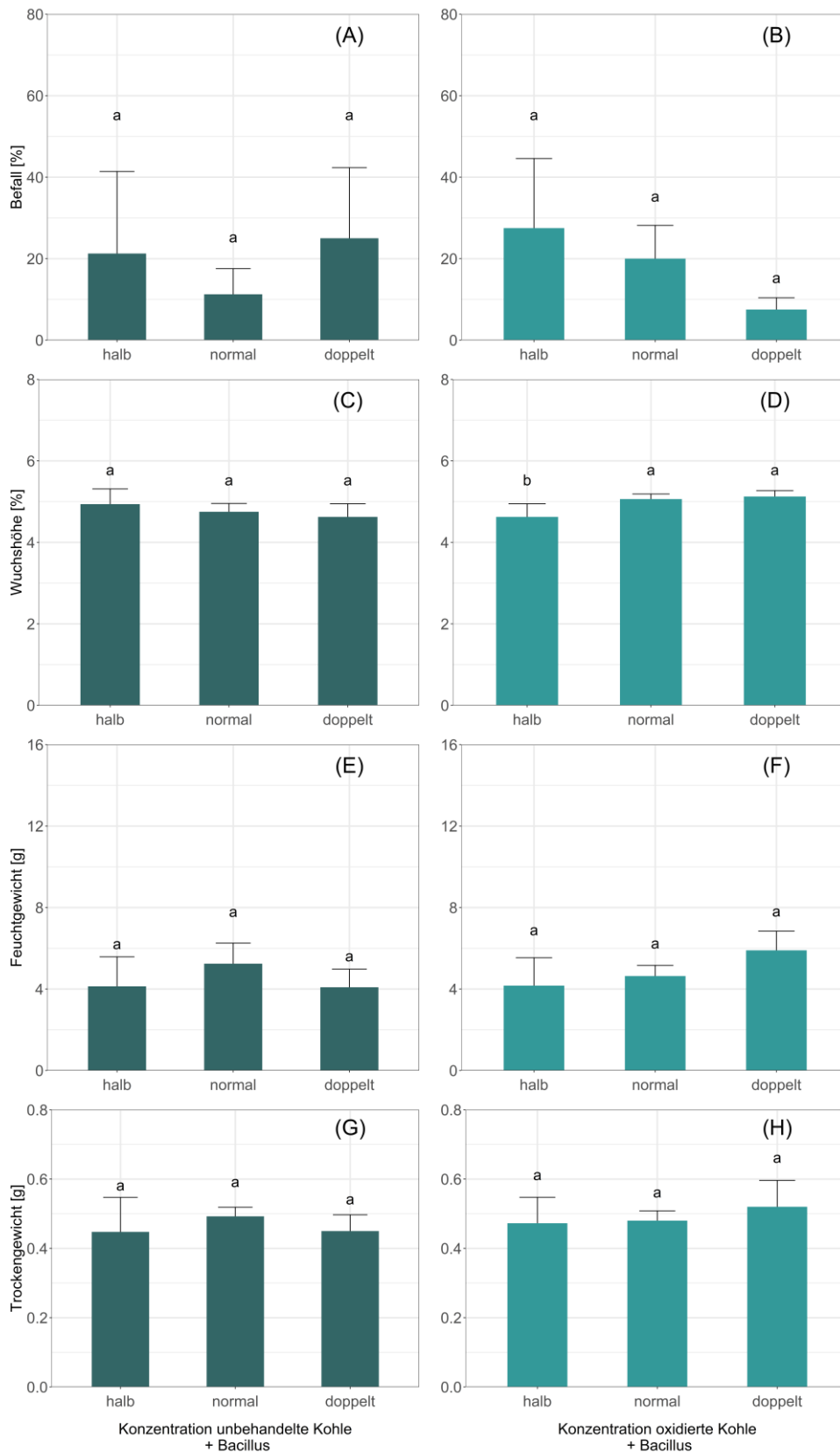


Grafik 7: Der Befall mit *P. ultimum* (A), die Wuchshöhe (B), das Feucht- (C) und Trockengewicht (D) von Kresse nach der Behandlung mit Pflanzenkohle (unbehandelt oder oxidiert) und *B. subtilis* in verschiedenen Varianten. Visualisiert wurde der Mittelwert aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis bei (A), ANOVA bei (B), (C) und (D))



Abbildung 11: Der Vergleich zwischen einem Ansatz mit oxidierter, beimpfter Pflanzenkohle (3ml) an infizierter Kresse (links) und der Positivkontrolle (rechts). Die Unterschiede im Wurzelwachstum (oben), der Wuchshöhe (mitte) und dem Befall (unten) waren deutlich erkennbar.

Eine Veränderung der angewendeten Konzentration führte nur in einem Fall zu statistischen Unterschieden: Die Behandlung mit der halben Konzentration von oxidierter, beimpfter Pflanzenkohle führte im Vergleich zu den anderen beiden Konzentrationen zu signifikant tieferen Wuchshöhen (Grafik 8, D). Ansonsten hat die Konzentrationsänderung zu keinen signifikanten Unterschieden geführt.



Grafik 8: Der Befall mit *P. ultimum* (A,B), die Wuchshöhe (C,D), das Feucht- (E,F) und Trockengewicht (G,H) von Kresse nach der Behandlung mit Pflanzenkohle (unbehandelt (A,C,E,G) oder oxidiert (B,D,F,H)) und *B. subtilis* in verschiedenen Konzentrationen. Visualisiert wurde der Mittelwert aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis bei (A) und (E), One-way bei (B), ANOVA bei (C), (D), (F), (G) und (H)).

## 5. Diskussion

Im Vorversuch wurden bei allen drei Inkubationszeiten vergleichsweise tiefe Koloniezahlen erreicht ( $10^2 - 10^5$  CFU  $g^{-1}$  Kohle), die nicht den Qualitätsstandards entsprechen ( $10^7-10^9$  CFU  $g^{-1}$ , vgl. Kapitel 2.1.2) (Lobo et al., 2019). Zudem war die Variabilität zwischen den Wiederholungen und somit auch die Standardabweichung gross. Die tieferen Zellzahlen können einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die Pflanzenkohle während der Inkubation nicht genügend mit der Zellsuspension vermischt wurde. Dies war daran zu erkennen, dass sich die Kohle während der Inkubationszeit absetzte. Die Kontaktfläche ist gemäss Tao et al. (2018) ein entscheidender Faktor bei der Adsorption der Bakterien auf der Kohle, weshalb eine genügende Durchmischung von grosser Bedeutung ist. Die Geschwindigkeit des Schüttlers beim Vorversuch entsprach der von Tao et al. (2018) als optimal bestimmten Geschwindigkeit, weshalb eine genügende Durchmischung hätte erwartet werden können. Jedoch kann auch das verwendete Probegefäss oder dessen Positionierung auf dem Schüttler die Durchmischung beeinflussen. Diesbezüglich sind bei Tao et al. (2018) keine Angaben zu finden. Um die Durchmischung zu erhöhen, wurde für die Folgeversuche eine höhere Geschwindigkeit gewählt und die Proben wurden vertikal auf den Schüttler gelegt (vgl. Kapitel 3.5). Ein weiterer Grund für die tiefen Populationsdichten könnte die fehlende Autoklavierung der Kohle für den Vorversuch gewesen sein (vgl. Kapitel 3.1). Unerwünschte Organismen auf dem Träger können den Erfolg der Beimpfung wesentlich verschlechtern, da sie die Zielorganismen verdrängen und diese um Platz und Nährstoffe konkurrenzieren (Bashan et al., 2014). Auf den Platten des Vorversuchs konnten Nicht-Zielarten identifiziert werden (vgl. Kapitel 4.1, Abbildung 8). Diese könnten *B. subtilis* konkurrenziert haben und somit die tiefen Koloniezahlen erklären. Deshalb wurde bei allen weiteren Versuchen autoklavierte Kohle verwendet (vgl. Kapitel 3.1). Die optimale Inkubationszeit der verwendeten Kohle und *B. subtilis* lässt sich deshalb nicht eindeutig aus den vorhandenen Daten bestimmen. Tendenziell waren die Zellzahlen aber nach 24 Stunden am höchsten, was den Ergebnissen von Tao et al. (2018) entspricht und deshalb für die weiteren Versuche so übernommen wurde. Die getroffenen Veränderungen führten in den folgenden Versuchen zu höheren Populationsdichten.

Im Versuch zur Nährstoffanreicherung der Kohle lagen die Koloniezahlen mit  $10^7 - 10^8$  CFU  $g^{-1}$  Kohle im unteren Bereich der Qualitätsstandards (Lobo et al., 2019). Die Nährstoffanreicherung selbst führte aber zu tieferen Zellzahlen als das Kontrollverfahren. Vanek et al. (2016) konnten bei ihrer Arbeit zur Nährstoffanreicherung, bei der die Nährstoffkonzentration des Nährmediums erhöht wurde, keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz von *R. tropici* feststellen (vgl. Kapitel 2.3.1.1). Und wie in Kapitel 2.4 beschrieben, führte bei der Arbeit von Sun et al. (2016) die Zugabe von LB-Medium während der Inokulation mittelfristig (über drei Monate) zu höheren Populationsdichten, während Wurmkompost und steriler Wurmkomposttee keine signifikanten Unterschiede verursachten. Zudem berichten mehrere AutorInnen davon, dass der Nährstoffgehalt der Kohle selbst einen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Abundanz im Inokulum hatte (Ghazi, 2017; Głodowska et al., 2016; Husna et al., 2019; Liu et al., 2017; Zheng et al., 2019). In keiner Arbeit aber wurde berichtet, dass die Zugabe von Nährstoffen eine Verschlechterung im Vergleich zum Standardverfahren verursachte. In den vergleichbaren Arbeiten wurde LB-Medium bzw. YEM-Medium eingesetzt, was deutlich weniger nährstoffhaltig ist als der hier verwendete NPK-Dünger, der Rinderurin simulieren sollte (Sun et al., 2016; Vanek et al., 2016). Entsprechend könnte eine mögliche Erklärung für die hier gefundenen Resultate darin liegen, dass die verwendete Nährlösung zu salzig für *B. subtilis* war. Wobei, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, absichtlich eine höhere Nährstoffkonzentration gewählt wurde, da bei Sun et al. (2016) das LB-Medium nur über drei Monate eine verbesserte Proliferation der Organismen auslösen konnte. Dass der Wurmkompost

und der sterile Wurmkomposttee in der Arbeit von Sun et al. (2016) keine positive Wirkung bezüglich der Populationsgrösse auf der Kohle zeigten, erklären sich die AutorInnen unter anderem damit, dass das organische Material an der Pflanzenkohle haftete und so den Porendurchmesser verringerte. Demnach könnte die Nährlösung in dieser Arbeit ebenfalls die Bindungsstellen der Kohle und somit die Poren blockiert haben. Wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben, spielt die spezifische Oberfläche und die durchschnittliche Porengrösse eine wesentliche Rolle bei der Beimpfung von Pflanzenkohle (Tao et al., 2018; Vanek et al., 2016). Die Hypothese, dass eine Nährstoffanreicherung der Pflanzenkohle mit Rinderurin die Populationsgrössen des Inokulums erhöhen könnte (vgl. Hypothese 1.1 und 1.2 in Kapitel 2.4), muss verworfen werden. Trotzdem ist gemäss der Literaturrecherche davon auszugehen, dass eine Nährstoffanreicherung förderlich sein könnte (Hale et al., 2014; Vanek et al., 2016). Für weitere Arbeiten diesbezüglich könnte die Wirkung weiterer Nährlösungen auf das Inokulum untersucht werden, um ein mögliches Optimum der Nährstoffkonzentration zu bestimmen.

Im Versuch zur Oxidation der Pflanzenkohle konnte diese die Zellzahlen auf der Kohle signifikant erhöhen. Bei Fan et al. (2018) führte die Oxidation der Kohle zu einer verbesserten Absorption von Cadmium, was auf die höhere Reaktivität, aufgrund der steigenden Zahl funktioneller Gruppen auf der Kohleoberfläche, zurückgeführt wird. Dieselbe Beobachtung wurde bereits mehrfach gemacht, auch bei anderen Schwermetallen oder  $\text{NO}_3$  (Fan et al., 2018; Sanford et al., 2019). Dies könnte ebenso die Erklärung für die hier gemachte Beobachtung sein, wenn davon ausgegangen wird, dass die Bakterien über elektrostatische, molekulare Bindungen mit der Pflanzenkohle interagieren (Ajeng et al., 2020). Im Gegensatz dazu führte die Oxidation der Pflanzenkohle im Filtrationsversuch und in der Haltbarkeitsstudie nicht zu höheren Populationsdichten auf der Kohle (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5). Die Ergebnisse der drei Versuche sind demnach widersprüchlich. Der grosse Unterschied zwischen den Verfahren besteht darin, dass die nicht oxidierte Kohle bei der Haltbarkeitsstudie ebenfalls eingelegt und filtriert wurde, nicht aber im Versuch zur Oxidation der Pflanzenkohle. Dabei wurde statt Wasserstoffperoxid deionisiertes Wasser verwendet (vgl. Kapitel 3.8). Demnach wäre es plausibel, dass die Filtrierung der Kohle, und nicht die Oxidation, die resultierenden Zellzahlen auf der Kohle erhöhte.

Jedoch steht diese Erkenntnis im Widerspruch zu den Ergebnissen von Liu et al. (2017). In deren Arbeit wurde Pflanzenkohle mit Aceton, Säure und Lauge, aber auch mit Wasser gewaschen und als Ergebnis davon nahmen die Koloniezahlen nach der Beimpfung ab (vgl. Kapitel 2.3.1.1). Und auch Vanek et al. (2016) konnten, nachdem die Kohle mit Aceton oder HCl gewaschen wurde, tiefere Koloniezahlen beobachten. Wobei dies ein stärkerer Eingriff darstellt als das Waschen mit Wasser. Liu et al. (2017) führten ihre Ergebnisse darauf zurück, dass für die Proliferation wichtige Komponenten von der Pflanzenkohle ausgewaschen wurden. Dies betrifft insbesondere Mikro- und Makronährstoffe, sowie gelösten Kohlenstoff. Beim Verfahren der Oxidation in dieser Arbeit hätte dies ebenfalls erwartet werden können. Dabei ist allerdings zu beachten, dass in der Arbeit von Liu et al. (2017) Pflanzenkohle aus Maisstroh verwendet wurde, die weit nährstoffhaltiger war, als die hier verwendete Kohle aus Holz. Entsprechend ist zu erwarten, dass der Effekt auch grösser ausgefallen ist. Zudem könnten andere Effekte den möglichen Nährstoffverlust überkompensiert haben.

Dabei könnte es einerseits sein, dass die in dieser Arbeit verwendete Kohle für die Organismen toxische Komponenten enthielt. Durch die Filtrierung wären diese ausgewaschen worden, was den Verlust der Nährstoffe überkompensiert haben könnte. Dabei sind insbesondere VOC und PAK zu erwähnen (Buss et al., 2015; Oleszczuk et al., 2013). Jedoch entstehen solche toxischen Nebenprodukte der Pyrolyse hauptsächlich bei tiefen Prozesstemperaturen und werden durch das EBC reguliert (L. Chen et al., 2013; European Biochar Foundation, 2020; Spokas et al., 2011). Die hier verwendete Pflanzenkohle

wurde bei 650°C-750°C von einem professionellen Unternehmen pyrolysiert (vgl. Kapitel 3.1), weshalb ausgeschlossen werden kann, dass relevante Mengen toxischer Nebenprodukte in der Kohle waren.

Ein weiterer Grund könnte das Auswaschen der kleinsten Kohlepartikel darstellen. Es ist anzunehmen, dass bei der Filtrierung nicht nur Nährstoffe und gelöster Kohlenstoff ausgewaschen wurden, sondern auch Kohlepartikel. So war das Filtrat trotz des engmaschigen Faltenfilters (4-7µm) von schwarz-grauer Farbe (vgl. Abbildung 3). In Kapitel 2.3.1.2 wurde dargelegt, dass ein möglichst feiner Mahlgrad der Kohlepartikel die Besiedelung der Kohle fördert, da somit die spezifische Oberfläche vergrössert wird (Liu et al., 2017; Tao et al., 2018). Allerdings war der feinste Mahlgrad bei Liu et al. (2017) 0.178mm und bei Tao et al. (2018) 160-180mesh (ca. 90-80µm). Die hier ausgewaschenen Partikel waren entsprechend dem verwendeten Filter aber noch deutlich kleiner. So zeigte die Betrachtung der Proben unter dem Mikroskop (vgl. Abbildung 9, rechts) eine grosse Anzahl sehr kleiner Partikel, welche vermutlich durch eine zu starke Verkleinerung in der Schwingmühle zustande kamen. Die Zerkleinerung der Pflanzenkohle hat zur Folge, dass Makroporen verloren gehen, während der prozentuale Anteil an Mikro- und Nanoporen zunimmt (He et al., 2018). In Kapitel 2.3.1.2 wurde aufgezeigt, dass viele Makroporen, die zwei bis fünf Mal der Grösse des Zielorganismus entsprechen, die Besiedelung der Kohle fördern (Vanek et al., 2016). Diese Poren bieten den Mikroorganismen eine Schutzfunktion und bilden das Optimum zwischen einer möglichst hohen inneren Oberfläche und einer unteren Grenze, welche die Besiedelung der Poren überhaupt ermöglicht (Hale et al., 2015; Vanek et al., 2016). Folglich könnte die Zerkleinerung der Pflanzenkohle in dieser Arbeit dazu geführt haben, dass viele ganz kleine Kohlepartikel entstanden, welche nur wenige Makroporen, hingegen mehr Mikro- und Nanoporen hatten. Durch die Filtrierung während der Oxidation wurden die kleinsten Partikel wiederum ausgewaschen, wodurch sich die Porengrössenverteilung wieder Richtung grössere Poren verschob, was sich positiv auf die resultierenden Zellzahlen auswirkte.

Diese These wird dadurch gestützt, dass beim Filtrationsversuch durch die Wahl eines gröbereren Mahlgrades auch eine untere Grenze definiert (125µm) und dementsprechend die kleinsten Partikel ohne Filtration abgesiebt wurden. Zudem sind in diesem Versuch die höchsten Zellzahlen gemessen worden, was sich demnach durch den höheren Anteil Makroporen durch die Wahl der grösseren Kohlepartikel erklären lassen könnte. Bei der Haltbarkeitsstudie sorgte die Filtrierung der nicht-oxidierten Kohle im Verfahren für denselben Effekt. Weiter wurde in den Arbeiten, die ein möglichst feiner Mahlgrad als förderlich für die Besiedelung der Kohle hervorheben, Pflanzenkohle aus Maisstroh bzw. Baumwollstielen verwendet (Liu et al., 2017; Tao et al., 2018). Diese sind weniger gut strukturiert im Vergleich zu den hier verwendeten Holzschnitzel und haben deshalb, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, natürlicherweise bereits weniger Makroporen. Entsprechend könnte der Verlust der Makroporen durch die Zerkleinerung der Kohle bei diesen Publikationen auch weniger starke Auswirkungen auf die Ergebnisse der Beimpfung gehabt haben. Da die Porengrössenverteilung der Kohle hier nicht erhoben wurde, kann die These nicht abschliessend verifiziert werden.

Diese Überlegungen zeigen jedoch auf, dass die physikalischen Eigenschaften der verwendeten Kohle von grosser Bedeutung sind und womöglich sogar eine Auswaschung von Nährstoffen zu überkompensieren vermochten. In weiteren Entwicklungsarbeiten sollte das Verhältnis der Partikelgrösse und der Porengrössenverteilung weiter untersucht werden, so dass ein Mahlgrad bestimmt werden kann, der ein Optimum zwischen der spezifischen Oberfläche und den vorhandenen Makroporen darstellt.

Weiter bedeutet dies, dass die Oxidation der Pflanzenkohle keinen Einfluss auf die resultierenden Zellzahlen hatte. Was dadurch bestätigt wird, dass die oxidierte Pflanzenkohle weder in der Haltbarkeitsstudie noch im Kressetest bessere Ergebnisse als die unbehandelte Pflanzenkohle erzeugte. Wie in

Kapitel 2.4 beschrieben, führt die Oxidation der Pflanzenkohle dazu, dass sauerstoffhaltige-funktionelle Gruppen auf der Pflanzenkohleoberfläche gebildet werden (Fan et al., 2018; Sanford et al., 2019). Daher könnte gefolgert werden, dass die Interaktion der Organismen nicht über diese chemische Oberflächenfunktionen ablaufen, bzw. nicht durch diese gefördert werden. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen jedoch auf, dass die funktionellen Gruppen der Pflanzenkohle deren Fähigkeit fördern, den Mikroorganismen als Elektronendonator- oder Akzeptor zu dienen (S. Chen et al., 2014; Xu et al., 2019). Zudem konnte in der Arbeit von Youngwilai et al. (2020) beobachtet werden, dass oxidierte Pflanzenkohle doppelt so viele Organismen (*Streptomyces violarus*) adsorbierte wie unbehandelte Kohle. Allerdings lagen die Werte in einem weitaus tieferen Bereich (ca.  $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>), als in den hier analysierten Publikationen. Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Wirkung der Oxidation auf das Inokulum, könnte eine unzureichende Oxidation im Vergleich zur Kontrollkohle gewesen sein. So sind Pflanzenkohlen, die bei hohen Prozesstemperaturen gefertigt wurden, aufgrund des stabileren Kohlenstoffgerüsts weniger anfällig für eine Oxidation (Suliman et al., 2016). Zudem ist die Oxidation der Pflanzenkohle, und die damit einhergehende Zunahme an sauerstoffhaltigen, funktionellen Gruppen, ein Teil des natürlichen Alterungsprozesses von Pflanzenkohle und wohl auch während der Lagerung aufgetreten (Wang et al., 2020). Auch das Vermahlen der Kohle macht diese reaktiver, da durch die Zerteilung des Kohlenstoffgerüsts Enden frei werden, die mit Sauerstoff reagieren können, wodurch sich ebenfalls funktionelle Gruppen bilden (Lyu et al., 2018). Und schliesslich ist zu erwarten, dass auch bei der Autoklavierung eine Oxidation stattfindet, da diese mit einer Heissluftoxidation vergleichbar ist (Suliman et al., 2016). Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, kann die Autoklavierung insbesondere bei organischem Material Veränderungen in dessen chemischen Eigenschaften verursachen (Bashan et al., 2014). Diese Erklärungsversuche werden aber dadurch entkräftigt, dass der Prozess der Oxidierung äusserst exotherm war. Die dabei entstandenen Gase sprechen klar dafür, dass die Zugabe des Wasserstoffperoxids eine starke Reaktion auf der Kohle auslöste (vgl. Abbildung 9, links).

Eine weitere Erklärung für die fehlende Wirkung der Oxidation auf das Inokulum könnte darin liegen, dass die entstandenen funktionellen Gruppen Poren blockierten und die spezifische Oberfläche der Kohle deshalb verringerten (Suliman et al., 2016). Suliman et al. (2016) beobachteten, dass die Heissluftoxidation von Pflanzenkohle teilweise zu grösseren und teilweise zu tieferen spezifischen Oberflächen führten. Sie führen dies darauf zurück, dass die Oxidation die Wände der kohlenstoffhaltigen Struktur zerstören, dass aber auch eine Blockierung der Poren durch die funktionellen Gruppen entstehen kann. Dies würde wiederum die Wichtigkeit der physikalischen Porenstruktur der Pflanzenkohle für die Beimpfung hervorheben. Ebenso könnte eine erhöhte Nährstoffauswaschung als Grund aufgeführt werden. So führte in der bereits erwähnten Arbeit von Liu et al. (2017) das Waschen der Kohle mit einer Säure zu tieferen Koloniezahlen als das Waschen mit Wasser. Das hier verwendete Wasserstoffperoxid ist ebenfalls eine schwache Säure, weshalb es möglich wäre, dass die Auswaschung höher war als bei der Kontrollvariante mit Wasser. Zudem kann die Oxidation auch zu einem erhöhten pH-Wert führen, welcher möglicherweise weniger passend für den Zielorganismus ist (Suliman et al., 2016). Wie in Kapitel 2.3.1.1 aufgeführt, spielt der pH-Wert der Pflanzenkohle eine wesentliche Rolle bei der Beimpfung. Auch wenn der Grund nicht abschliessend geklärt werden kann, ist Hypothese 1.3 (Kapitel 2.4), dass die Oxidation der Pflanzenkohle deren Beimpfung verbessert, zu verworfen.

Mit dem Filtrationsversuch konnte aufgezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil der Bakterien tatsächlich auf der Kohle selbst hafteten und nicht in der umgebenden Flüssigkeit schwammen. Entsprechend ist die hier erfolgte Umrechnung von CFU ml<sup>-1</sup> in CFU g<sup>-1</sup> (vgl. Formel 2, Kapitel 3.3) nicht korrekt, da bei dieser davon ausgegangen wird, dass alle Bakterien in der Suspension auf der Kohle selbst sind.

Für zukünftige Versuche sollte die Kohle vor der Zellzahlbestimmung deshalb abfiltriert werden, da diese Werte eher der Realität entsprechen, und ein einheitliches Vorgehen die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Arbeiten verbessert.

Der Vergleich mit Literaturwerten ist jedoch auch sonst schwierig. Je nach Mischverhältnis von Pflanzenkohle und Suspension, die wie in Kapitel 2.3.3 dargelegt, sehr unterschiedlich sein können, führt eine Keimzahlbestimmung vor der Filtrierung zu starken Unterschieden in den Ergebnissen. In den meisten Arbeiten wurde keine Filtrierung durchgeführt, Lebrun et al. (2020) beispielsweise filterten die Kohle aber ab, bevor sie appliziert wurde. Zudem ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse, in Abhängigkeit davon, ob die Auswertung kulturbasiert oder molekularbiologisch erfolgte. Kulturbasierte Auszählungen, wie die hier verwendete, erfassen nur lebende, noch zellteilfähige Organismen (Hale et al., 2014). Bei molekularbiologischen Methoden werden auch Organismen mitausgewertet, die sich nicht mehr in kulturfähigem Zustand befinden und demnach wohl auch nicht mehr fähig wären, die Rhizosphäre zu besiedeln (Sun et al., 2016). Entsprechend erzeugt eine molekularbiologische Methode höhere Ergebnisse (Hale et al., 2014; Sun et al., 2016). Deshalb erschwert dies den Vergleich der Ergebnisse der Literatur je nach Methodik weiter.

Trotzdem kann festgehalten werden, dass die hier durchgeführten Beimpfungen zu Koloniezahlen führten, welche im ungefähren Bereich der Literaturwerte liegen und den Qualitätsstandards genügen. Dies trifft auch auf die Zellzahlen nach der Filtrierung zu. Deshalb kann das angewendete Verfahren als erfolgsversprechend bezeichnet werden. Die Modifizierungen hingegen zeigten nicht die gewünschte Wirkung und die Hypothese, dass eine Optimierung des Beimpfungsverfahrens höhere Populationen auf der Pflanzenkohle verursachen würde, muss deshalb verworfen werden. In weiteren Arbeiten könnte das hier angewendete Verfahren jedoch weiter verbessert werden.

Bei der Haltbarkeit des Produktes konnte das in dieser Arbeit erstellte Inokulum den Qualitätsstandards nicht genügen. So nahm die Populationsgrösse bereits innerhalb eines Monats signifikant ab. In Kapitel 2.1.3.1 wurde erwähnt, dass eine minimale Haltbarkeit von zwei bis drei Monaten und ein Optimum von ein bis zwei Jahren bei Raumtemperatur erwartet wird (Bashan et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013). Und Vanek et al. (2016) sprechen von einem Standard von mindestens  $10^8$  CFU  $g^{-1}$  Träger nach sechsmonatiger Lagerung. Auch mit Literaturangaben von ähnlichen Versuchen (Tabelle 3) können die Resultate dieser Arbeit nicht mithalten. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die Abnahme nach dem 21. Tag weniger stark war als in den ersten drei Wochen. Dies könnte in Bezug zum Filtrationsversuch daran liegen, dass in den ersten Wochen insbesondere die Organismen in der Flüssigkeit des Inokulums gestorben sind und den schnellen Rückgang der Zellzahlen verursachten. Die Organismen auf der Kohle selbst könnten länger überlebt haben und eine höhere Haltbarkeit aufweisen. Entsprechend wäre es womöglich auch für die Einlagerung sinnvoll, die beimpfte Kohle zuerst abzufiltern. So ist bei Formulierungen mit Torf als Trägermittel beispielsweise bekannt, dass eine Trocknung auf 40-50% der Wasserhaltekapazität die Haltbarkeit optimiert (Bashan et al., 2014). Ähnlich könnte dies auch bei Pflanzenkohle der Fall sein. In weiteren Arbeiten könnte also eine Filtrierung vor der Einlagerung miteinbezogen werden.

Dass die oxidierte Pflanzenkohle am letzten Versuchstag signifikant tiefere Populationsgrössen als die unbehandelte Kohle beherbergte, ist auf den starken Rückgang der Zellzahlen in der letzten Woche zurückzuführen. Dies wiederum könnte durch die fremden Kolonien zu erklären sein, die in zwei Proben identifiziert wurden (vgl. Kapitel 4.5, Abbildung 10). Wie bereits erwähnt, können diese *B. subtilis* um Platz und Nährstoffe konkurrenzieren (Bashan et al., 2014). Dies zeigt zudem auf, dass andere Bakterien für eine Beimpfung mit Pflanzenkohle womöglich besser geeignet wären. Wie bereits in Kapitel



2.3.2 erwähnt, sind deshalb weitere Arbeiten mit unterschiedlichen Organismen nötig, um zu bestimmen, welche Mikroorganismen besonders gut auf Pflanzenkohle überleben. Die Unterschiede zwischen den Zellzahlen auf der oxidierten und unbehandelten Kohle waren während des restlichen Verlaufes der Haltbarkeitsstudie aber nicht systematisch. Entsprechend muss Hypothese 2 (vgl. Kapitel 1), wonach ein optimiertes Verfahren ebenso die Haltbarkeit des Produktes verbessern sollte, zu verwerfen. Dies liegt daran, dass die Oxidation der Kohle keine höheren Zellzahlen verursachte, sondern dies, wie bereits ausgeführt wurde, nur in Versuch 2 der Fall war.

Beim Kresstest konnte die beimpfte Pflanzenkohle (unbehandelt und oxidiert), im Vergleich zur Negativkontrolle, einen signifikant tieferen Befall mit *P. ultimum* und dadurch ein verbessertes Wachstum der Kresse verursachen. Wenn *B. subtilis* ohne Träger angewendet wurde, war das Wachstum der Kresse tendenziell schlechter als mit Pflanzenkohle als Trägersubstanz, führte aber nur in Einzelfällen zu signifikanten Unterschieden. Entsprechend könnte davon ausgegangen werden, dass die Kohle sich grundsätzlich als Träger eignet und es vermag, die natürliche Heterogenität des Substrates als grösstes Hindernis bei der Applikation von nützlichen Mikroorganismen teilweise zu überwinden (Bashan et al., 2014). Dieser Einordnung widerspricht die Tatsache, dass die Varianten, bei denen die Kohle ohne *B. subtilis* appliziert wurde, in allen Fällen gleichwertige Resultate erzeugten, wie bei den Varianten mit *B. subtilis*. Daraus kann gefolgert werden, dass die Wirkung der Formulierung durch die Kohle verursacht wurde und *B. subtilis* dabei wenig, bis keine Bedeutung hatte. Wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, stellten auch Hale et al. (2014) fest, dass die Pflanzenkohle unabhängig von der Präsenz der Organismen zu höheren Biomassen und einer besseren Wurzelentwicklung führte. Demnach hat die Pflanzenkohle die Wasserhaltekapazität und die Schüttdichte des Bodens verbessert, wodurch die Beobachtungen zu erklären sind. Auch Głodowska et al. (2016) stellen die Hypothese auf, dass der grösste Effekt auf das Pflanzenwachstum auf die vorhandenen Makro- und Mikronährstoffe, sowie die verbesserte Wasserverfügbarkeit zurückzuführen seien. Dies könnte auch hier die Erklärung für die Resultate sein. Die Varianten mit Pflanzenkohle, aber ohne *P. ultimum* und *B. subtilis*, wiesen jedoch kein höheres Wachstum im Vergleich zur Positivkontrolle auf. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Kresse mit dem verwendeten Substrat und einer Versuchsdauer von sieben Tagen nicht unter einer Nährstofflimitierung litt. Ein Grund für die geringe Wirkung durch *B. subtilis* könnte die kurze Versuchsdauer des Kresstests sein. Womöglich konnten die Organismen die Wurzeln noch zu wenig stark besiedeln und dementsprechend waren noch keine positiven Effekte erkennbar. Als weiterer Schritt könnte die Formulierung deshalb an Kulturen mit längeren Wachstumsphasen untersucht werden.

Die Pflanzenkohleapplikation verbesserte in dieser Arbeit aber nicht nur das Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle, sondern unterdrückte ebenso den Befall mit *P. ultimum*, was einen wesentlichen Unterschied zu den erwähnten Arbeiten darstellt. In einer Meta-Studie stellten Bonanomi et al. (2015) fest, dass Pflanzenkohle (auch unbeimpft) eine suppressive Wirkung auf bodenbürtige Schadorganismen haben kann. Dabei wurden 12 Publikationen mit 61 Experimenten analysiert, wobei in 85% eine suppressive Wirkung vorhanden war, bei 12% keine Unterschiede festgestellt werden konnten und in 3% der Befall durch die Pathogene zunahm. Die AutorInnen nennen dabei fünf verschiedene Mechanismen, mit denen diese Resultate begründet wurden. Der erste Mechanismus beschreibt eine induzierte systemische oder systemisch erworbene Resistenz. So beobachteten Meller Harel et al. (2012) beispielsweise, dass Erdbeeren, die in Substrat mit Pflanzenkohle wuchsen, eine höhere Expression von Genen hatten, die in Zusammenhang mit den Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Pathogene stehen. Und Mehari et al. (2015) stellten fest, dass die induzierte Resistenz von Tomaten gegen *Botrytis cinerea* durch Pflanzenkohle über den Stoffwechselweg mit Jasmonsäure läuft. Bonanomi et al. (2015) halten aber fest, dass die vorhandenen Daten nicht ausreichend Auskunft darüber geben, ob die

Wirkung durch eine Veränderung der Mikroflora ausgelöst wird, oder ob die Kohle tatsächlich chemische Komponenten enthält, die diese Resistenzen hervorrufen. Gemäss dem zweiten Mechanismus wäre die positive Wirkung der Pflanzenkohle gegen Pathogene auf eine erhöhte Abundanz und Aktivität nützlicher Mikroorganismen im Substrat nach der Pflanzenkohleapplikation zurückzuführen. Der dritte Mechanismus beschreibt die Idee, dass die Pflanzenkohle die Bodeneigenschaften und die Nährstoffversorgung verbessert, wodurch wiederum die Vitalität der Pflanzen gefördert wird. Laut dem vierten Mechanismus hängt die Suppressivität mit der fungiziden Wirkung von chemischen Komponenten der Kohle zusammen, wobei dieser Mechanismus vernachlässigbar sei. Der letzte Erklärungsversuch beruht auf der Idee, dass die Kohle allelopathische und phytotoxische Komponenten des Bodens absorbiert haben soll. Bonanomi et al. (2015) betonen, dass noch zu wenig Publikationen zu Verfügung stehen, um ein umfassendes Bild über die Wechselwirkung von Pflanzenkohle und Phytopathogenen zu erhalten. Ob die Wirkung der Pflanzenkohle auf *P. ultimum* in dieser Arbeit mit einer dieser Mechanismen in Zusammenhang steht, ist unklar. Dass die Pflanzenkohle das Wachstum der Kresse auch ohne *B. subtilis* förderte und *P. ultimum* gleichwertig unterdrücken konnte, zeigt aber deutlich, dass sich die Kohle als Trägersubstanz eignet. So wurde bei einer Meta-Analyse zur Suppressivität von unbeimpftem Torf nur in 4% der Fälle eine positive Wirkung beobachtet, wobei die Datenlage aber ungleich grösser war (Bonanomi et al., 2007)

Die dritte Hypothese, die eine positive Wirkung von beimpfter Pflanzenkohle bei mit *P. ultimum* infizierter Kresse erwartet, kann bestätigt werden, auch wenn die Wirkung stärker von der Kohle als von *B. subtilis* ausging. Der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus ist allerdings unklar. Zudem war das Wachstum nicht durchgehend signifikant unterschiedlich und nur leicht höher. Dies zeigt auf, dass eine Optimierung des Verfahrens in der weiteren Entwicklungsarbeit angestrebt werden sollte.

Die oxidierte beimpfte Pflanzenkohle erzeugte im Vergleich zur unbehandelten beimpften Kohle weder ein höheres Wachstum der Kresse, noch einen tieferen Befall durch *P. ultimum*, weshalb die vierte Hypothese verworfen werden muss. Es kann davon ausgegangen werden, dass erneut die bereits ausgeführten Begründungen hierfür verantwortlich sind. Und auch bezüglich der applizierten Konzentration konnten keine Unterschiede gefunden werden, weshalb eine Anwendung gemäss dem Referenzprodukt sinnvoll erscheint. Es ist anzunehmen, dass die gewählten Unterschiede zu klein waren, um unterschiedlich starke Effekte auszulösen. Entsprechend könnten weitere Versuche mit stärker variierenden Applikationsmengen gemacht werden.

## 6. Schlussfolgerung

Die Nährstoffanreicherung der Pflanzenkohle führte zu tieferen Zellzahlen im Inokulum, vermutlich weil sie eine Blockierung der Poren verursachte oder eine zu salzige Umgebung für *B. subtilis* darstellte. Im Versuch zum Einfluss der Oxidation der Pflanzenkohle auf die Beimpfung konnte diese die resultierenden Zellzahlen signifikant erhöhen. In den folgenden Versuchen konnte die Wirkung aber nicht mehr nachgewiesen werden und die Oxidation hatte weder einen Einfluss auf die Haltbarkeit der Formulierung, noch auf die Wirkung gegen *P. ultimum* bei Kresse. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die Filtration während des Oxidierungsverfahrens zurückzuführen, da erst in den Nachfolgeversuchen auch die Kontrollkohle eingelegt und filtriert wurde. Durch die Filtrierung wurden die kleinsten Kohlepartikel ausgewaschen, was zu einer höheren durchschnittlichen Porengrößenverteilung geführt haben könnte. Es ist anzunehmen, dass dadurch die Populationsgrösse auf der beimpften Kohle vergrößert wurde und die Porengrößenverteilung daher einen entscheidenden Faktor bei der Beimpfung von Pflanzenkohle darstellt. Das Verhältnis zwischen der Partikelgrößen und der Porengrößenverteilung bedarf daher weiterer Forschung. Es kann aber gefolgert werden, dass die Oxidation der Pflanzenkohle keine höheren Populationsdichten auf der Kohle zur Folge hat.

Die auf der Pflanzenkohle erreichten Populationsgrößen entsprachen den Qualitätsstandards, weshalb das angewendete Verfahren erfolgsversprechend für weitere Verbesserungen ist. Die Kohle sollte jedoch vor der Keimzahlbestimmung filtriert werden, um realitätsnahe Ergebnisse zu erhalten. Die Haltbarkeit des hier formulierten Produktes war noch ungenügend und könnte womöglich ebenfalls durch ein Abfiltrieren vor der Einlagerung verbessert werden.

Das Inokulum zeigte eine positive Wirkung auf das Kressewachstum und konnte den Befall durch *P. ultimum* vermindern. Diese Wirkung ist allerdings stärker auf die Pflanzenkohleapplikation als auf *B. subtilis* zurückzuführen. Möglicherweise hat die Pflanzenkohle die Nährstoffversorgung oder die physikalischen Eigenschaften des Substrates verbessert und die Vitalität der Kresse dadurch gefördert. Die Behandlung mit beimpfter Pflanzenkohle erhöhte das Wachstum der Kresse im Vergleich zur Negativkontrolle jedoch nur leicht, was die Wichtigkeit einer weiteren Optimierung des Verfahrens hervorhebt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abit, S. M., Bolster, C. H., Cai, P., & Walker, S. L. (2012). Influence of Feedstock and Pyrolysis Temperature of Biochar Amendments on Transport of *Escherichia coli* in Saturated and Unsaturated Soil. *Environmental Science & Technology*, 46(15), 8097–8105. <https://doi.org/10.1021/es300797z>
- Ajeng, A. A., Abdullah, R., Ling, T. C., Ismail, S., Lau, B. F., Ong, H. C., Chew, K. W., Show, P. L., & Chang, J.-S. (2020). Bioformulation of biochar as a potential inoculant carrier for sustainable agriculture. *Environmental Technology & Innovation*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101168>
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771–2779. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
- Ali, B. (2015). Bacterial auxin signaling: Comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turkish Journal of Botany*, 39(1), 1–9. <https://doi.org/10.3906/bot-1401-31>
- Alina, S. O., Constantinescu, F., & Petruța, C. C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(5), 10737–10750.
- Altorfer, R. (2021). *Entwicklung einer Methode zur kurzfristigen Vorkonditionierung pflanzenverträglicher Biokohle für den Einsatz in Substraten* [Masterarbeit]. Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaft, Wädenswil.
- Andermatt Biocontrol Suisse AG. (2021). *Gebrauchsanleitung Bioter Carbon*. [https://www.biocontrol.ch/de\\_bc/bioter-carbon](https://www.biocontrol.ch/de_bc/bioter-carbon)
- Andy, A. K., Masih, S. A., & Gour, V. S. (2020). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soils of selected pulses. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101685>
- Araújo, F. F., Henning, A. A., & Hungria, M. (2005). Phytohormones and Antibiotics Produced by *Bacillus subtilis* and their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1639–1645. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-3621-x>
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C.-A., Urbano, B., & González-Andrés, F. (2020). Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125985>
- Arkipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Azeem, M., Hassan, T. U., Tahir, M. I., Ali, A., Jeyasundar, P. G. S. A., Hussain, Q., Bashir, S., Mehmood, S., & Zhang, Z. (2021). Tea leaves biochar as a carrier of *Bacillus cereus* improves the soil function and crop productivity. *Applied Soil Ecology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103732>
- Bamdad, H., Papari, S., Lazarovits, G., & Berruti, F. (2021). Soil amendments for sustainable agriculture: Microbial organic fertilizers. *Soil Use and Management*, 00, 1–27. <https://doi.org/10.1111/sum.12762>

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, *378*(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Berninger, T., González López, Ó., Bejarano, A., Preininger, C., & Sessitsch, A. (2018). Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microbial Biotechnology*, *11*(2), 277–301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12880>
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., & Scala, F. (2007). Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology*, *89*(3), 311–324.
- Bonanomi, G., Ippolito, F., & Scala, F. (2015). A „Black“ Future for Plant Pathology? Biochar as a New Soil Amendment for Controlling Plant Diseases. *Journal of Plant Pathology*, *97*(2), 223–234.
- Buss, W., Mašek, O., Graham, M., & Wüst, D. (2015). Inherent organic compounds in biochar—Their content, composition and potential toxic effects. *Journal of Environmental Management*, *156*, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.035>
- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Green Alternative for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, *13*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/su131910986>
- Chen, L., Zheng, H., & Wang, Z. Y. (2013). The Formation of Toxic Compounds during Biochar Production. *Applied Mechanics and Materials*, *361–363*, 867–870. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.361-363.867>
- Chen, S., Rotaru, A.-E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Liu, F., Fan, W., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2014). Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Scientific Reports*, *4*(5019). <https://doi.org/10.1038/srep05019>
- Chuaphasuk, C., & Prapagdee, B. (2019). Effects of biochar-immobilized bacteria on phytoremediation of cadmium-polluted soil. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(23), 23679–23688. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05661-6>
- Conte, P., Hanke, U. M., Marsala, V., Cimò, G., Alonzo, G., & Glaser, B. (2014). Mechanisms of Water Interaction with Pore Systems of Hydrochar and Pyrochar from Poplar Forestry Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(21), 4917–4923. <https://doi.org/10.1021/jf5010034>
- Couwenberg, J. (2009). *Emission factors for managed peat soils—An analysis of IPCC default values*. Wetlands International. <https://www.wetlands.org/publications/emission-factors-for-managed-peat-soils-an-analysis-of-ipcc-default-values/>
- Crossay, T., Cilia, A., Cavaloc, Y., Amir, H., & Redecker, D. (2018). Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycological Progress*, *17*(6), 729–744. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1386-5>
- Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., Orive, R., & Temprano, F. (2000). Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(4), 567–572. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00185-6)
- Doornbos, R. F., Geraats, B. P. J., Kuramae, E. E., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2011). Effects of Jasmonic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid Signaling on the Rhizosphere Bacterial Community of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(4), 395–407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0115>

- Downie, A., Crosky, A., & Munroe, P. (2009). Physical Properties of Biochar. In J. Lehmann & S. Joseph (Hrsg.), *Biochar for Environmental Management: Science and Technology* (S. 13–32). Earthscan.
- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, *16*(6), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Egorshina, A. A., Khairullin, R. M., Sakhabutdinova, A. R., & Luk'yantsev, M. A. (2012). Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* strain 11BM. *Russian Journal of Plant Physiology*, *59*(1), 134–140. <https://doi.org/10.1134/S1021443711050062>
- Errington, J., & van der Aart, L. T. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, *166*(5), 425–427. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>
- European Biochar Foundation. (2020). *EBC (2012) „European Biochar Certificate –Richtlinien für die nachhaltige Produktion von Pflanzenkohle“. Version 8.4G*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4658.7043>
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Fan, Q., Sun, J., Chu, L., Cui, L., Quan, G., Yan, J., Hussain, Q., & Iqbal, M. (2018). Effects of chemical oxidation on surface oxygen-containing functional groups and adsorption behavior of biochar. *Chemosphere*, *207*, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.044>
- Florio, A., Pommier, T., Gervais, J., Bérard, A., & Le Roux, X. (2017). Soil C and N statuses determine the effect of maize inoculation by plant growth-promoting rhizobacteria on nitrifying and denitrifying communities. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08589-4>
- Freitas, M. A., Medeiros, F. H. V., Carvalho, S. P., Guilherme, L. R. G., Teixeira, W. D., Zhang, H., & Paré, P. W. (2015). Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00596>
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *Phytopathology*, *94*(11), 1245–1248. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>
- Gagné-Bourque, F., Bertrand, A., Claessens, A., Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2016). Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00584>
- Ghazi, A. A. (2017). Potential for Biochar as an Alternate Carrier to Peat Moss for the Preparation of Rhizobia Bio Inoculum. *Microbiology Research Journal International*, *18*(4), 1–9.
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., & Giovannetti, M. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Microbiota as Plant Biostimulants: Research Strategies for the Selection of the Best Performing Inocula. *Agronomy*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010106>
- Głodowska, M., Husk, B., Schwinghamer, T., & Smith, D. (2016). Biochar is a growth-promoting alternative to peat moss for the inoculation of corn with a pseudomonad. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(1). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0356-z>
- Głodowska, M., Schwinghamer, T., Husk, B., & Smith, D. (2017). Biochar Based Inoculants Improve Soybean Growth and Nodulation. *Agricultural Sciences*, *8*(9), 1048–1064. <https://doi.org/10.4236/as.2017.89076>

- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *113*(1–4), 17–35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>
- Greiner Bio-One GmbH. (2015). *Product Data Sheet: Petri Dish With Vents, Sterile, Item-No. 633181*. <https://shop.gbo.com/de/switzerland/products/bioscience/mikrobiologie-bakteriologie/schalen/633181.html>
- Gu, S., Wei, Z., Shao, Z., Friman, V.-P., Cao, K., Yang, T., Kramer, J., Wang, X., Li, M., Mei, X., Xu, Y., Shen, Q., Kümmerli, R., & Jousset, A. (2020). Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology*, *5*(8), 1002–1010. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0719-8>
- Hagemann, N., Schmidt, Hans-Peter, Kammann, C., Husson, O., Kappler, A., & Behrens, S. (2016). Limited impact of biochar on nitrogen geochemistry and greenhouse-gas emissions in an optimized aerobic manure composting system. In N. Hagemann (Hrsg.), *The impact of biochar on microbial nitrogen and carbon transformations in soil and aerobic composting of manure*. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Hale, L., Luth, M., & Crowley, D. (2015). Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*, *81*, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.023>
- Hale, L., Luth, M., Kenney, R., & Crowley, D. (2014). Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*, *84*, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.001>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd\_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hassan, M., Liu, Y., Naidu, R., Parikh, S. J., Du, J., Qi, F., & Willett, I. R. (2020). Influences of feedstock sources and pyrolysis temperature on the properties of biochar and functionality as adsorbents: A meta-analysis. *Science of The Total Environment*, *744*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140714>
- He, P., Liu, Y., Shao, L., Zhang, H., & Lü, F. (2018). Particle size dependence of the physicochemical properties of biochar. *Chemosphere*, *212*, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.106>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Hossain, Md. M., Sultana, F., & Hyakumachi, M. (2017). Role of ethylene signalling in growth and systemic resistance induction by the plant growth-promoting fungus *Penicillium viridicatum* in *Arabidopsis*. *Journal of Phytopathology*, *165*(7–8), 432–441. <https://doi.org/10.1111/jph.12577>
- Husna, N., Budianta, D., Munandar, M., & Napoleon, A. (2019). Evaluation of Several Biochar Types as Inoculant Carrier for Indigenous Phosphate Solubilizing Microorganism from Acid Sulphate Soil. *Journal of Ecological Engineering*, *20*(6), 1–8. <https://doi.org/10.12911/22998993/109078>
- IAASTD. (2009). *International Assessment of Agricultural Knowledge, Science, and Technology for Development (IAASTD). Agriculture at a Crossroads: Global report* (B. D. McIntyre, H. R. Herren, J. Wakhungu, & R. T. Watson, Hrsg.). Island Press.

- Ilyas, N., Mumtaz, K., Akhtar, N., Yasmin, H., Sayyed, R. Z., Khan, W., Enshasy, H. A. E., Dailin, D. J., Elsayed, E. A., & Ali, Z. (2020). Exopolysaccharides Producing Bacteria for the Amelioration of Drought Stress in Wheat. *Sustainability*, 12(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/su12218876>
- Jin, Q., & Kirk, M. F. (2018). pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6(21). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>
- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L.-S. P., & Ito, S.-I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 870–882. <https://doi.org/10.1111/mpp.12571>
- Kloss, S., Zehetner, F., Dellantonio, A., Hamid, R., Ottner, F., Liedtke, V., Schwanninger, M., Gerzabek, M. H., & Soja, G. (2012). Characterization of Slow Pyrolysis Biochars: Effects of Feedstocks and Pyrolysis Temperature on Biochar Properties. *Journal of Environmental Quality*, 41(4), 990–1000. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0070>
- Kudoyarova, G. R., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., Timergalina, L. N., Arkhipova, T. N., Shendel, G. V., Kuz'mina, L. Y., Dodd, I. C., & Veselov, S. Y. (2014). Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.015>
- Kumar, A. S., Lakshmanan, V., Caplan, J. L., Powell, D., Czymmek, K. J., Levia, D. F., & Bais, H. P. (2012). Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *The Plant Journal*, 72(4), 694–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05116.x>
- Kumari, B., Mallick, M., Solanki, M., Solanki, A., Hora, A., & Guo, W. (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Modern Prospects for Sustainable Agriculture. In A. A. Rizwan & M. Irshad (Hrsg.), *Plant Health Under Biotic Stress. Volume 2: Microbial Interactions* (S. 109–127). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_6)
- Kumari, S., Khanna, V., & Singh, A. (2021). Characterization and evaluation of extracellular hydrolytic proteins from rhizobacterial antagonists isolated from *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Ciceris* infected chickpea fields. *Indian Phytopathology*. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00443-y>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M.-N., Gaucher, M., Deleu, M., & Jijakli, M. H. (2018). Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture*, 8(1), 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>
- Lebrun, M., Miard, F., Bucci, A., Trupiano, D., Nandillon, R., Naclerio, G., Scippa, G. S., Morabito, D., & Bourgerie, S. (2020). Evaluation of direct and biochar carrier-based inoculation of *Bacillus* sp. on As- and Pb-contaminated technosol: Effect on metal(loid) availability, *Salix viminalis* growth, and soil microbial diversity/activity. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11355-1>
- Li, S., Harris, S., Anandhi, A., & Chen, G. (2019). Predicting biochar properties and functions based on feedstock and pyrolysis temperature: A review and data syntheses. *Journal of Cleaner Production*, 215, 890–902. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.106>



- Liu, S., Tang, W., Yang, F., Meng, J., Chen, W., & Li, X. (2017). Influence of biochar application on potassium-solubilizing *Bacillus mucilaginosus* as potential biofertilizer. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(1), 32–37. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1155062>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lopez-Capel, E., Zwart, K., Shackley, S., Postma, R., Stenstrom, J., Rasse, D. P., Budai, A., & Glaser, B. (2013). Biochar properties. In S. Shackley, G. Ruysschaert, K. Zwart, & B. Glaser (Hrsg.), *Biochar in European soils and agriculture: Science and practice* (S. 41–72). Routledge.
- Lyu, H., Gao, B., He, F., Zimmerman, A. R., Ding, C., Huang, H., & Tang, J. (2018). Effects of ball milling on the physicochemical and sorptive properties of biochar: Experimental observations and governing mechanisms. *Environmental Pollution*, 233, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.037>
- Mäder, P., Kaiser, F., Adholeya, A., Singh, R., Uppal, H. S., Sharma, A. K., Srivastava, R., Sahai, V., Aragno, M., Wiemken, A., Johri, B. N., & Fried, P. M. (2011). Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat–rice and wheat–black gram rotations in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.031>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Medeiros, E. V. de, Moraes, M. de C. H. dos S., Costa, D. P. da, Duda, G. P., Oliveira, J. B. de, Silva, J. A. da, Lima, J. R. de S., & Hammecker, C. (2020). Effect of biochar and inoculation with *Trichoderma aureoviride* on melon growth and sandy Entisol quality. *Australian Journal of Crop Science*, 14(6), 971–977. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.06.p2302>
- Mehari, Z. H., Elad, Y., Rav-David, D., Graber, E. R., & Harel, Y. M. (2015). Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant and Soil*, 395(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2445-1>
- Meller Harel, Y., Elad, Y., Rav-David, D., Borenstein, M., Shulchani, R., Lew, B., & Graber, E. (2012). Biochar mediates systemic response to strawberry to fungal pathogens. *Plant and Soil*, 357(1–2), 245–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1129-3>
- Merzaeva, O. V., & Shirokikh, I. G. (2006). Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology*, 75(2), 226–230. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020184>
- Minaeva, O. M., Akimova, E. E., Tereshchenko, N. N., Zyubanova, T. I., Apenysheva, M. V., & Kravets, A. V. (2018). Effect of *Pseudomonas* Bacteria on Peroxidase Activity in Wheat Plants when Infected with *Bipolaris sorokiniana*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(5), 717–725. <https://doi.org/10.1134/S1021443718040052>
- Moreno-Lora, A., Recena, R., & Delgado, A. (2019). *Bacillus subtilis* QST713 and cellulose amendment enhance phosphorus uptake while improving zinc biofortification in wheat. *Applied Soil Ecology*, 142, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.013>
- Muter, O., Grantina-Ivina, L., Makarenkova, G., Vecstaudza, D., Strikauska, S., Selga, T., Kasparinskis, R., Stelmahere, S., Steiner, C., & others. (2017). Effect of biochar and *Trichoderma* application on fungal diversity and growth of *Zea mays* in a sandy loam soil. *Environmental and Experimental Biology*, 15, 289–296.

- Oleszczuk, P., Joško, I., & Kuśmierz, M. (2013). Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.044>
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R. G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>
- Pariyar, P., Kumari, K., Jain, M. K., & Jadhao, P. S. (2020). Evaluation of change in biochar properties derived from different feedstock and pyrolysis temperature for environmental and agricultural application. *Science of The Total Environment*, 713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136433>
- Rafiq, M. K., Bachmann, R. T., Rafiq, M. T., Shang, Z., Joseph, S., & Long, R. (2016). Influence of Pyrolysis Temperature on Physico-Chemical Properties of Corn Stover (*Zea mays* L.) Biochar and Feasibility for Carbon Capture and Energy Balance. *PLoS One*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156894>
- Ratzke, C., & Gore, J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS Biology*, 16(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>
- Rüttimann, U. (2019). Torfausstieg: Fortschritt mit Risiken. *g'plus*, 22, 10–14.
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*, 23(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Sanford, J. R., Larson, R. A., & Runge, T. (2019). Nitrate sorption to biochar following chemical oxidation. *Science of The Total Environment*, 669, 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.061>
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Schmidt, H.-P. (2011). Wege zu Terra Preta – Aktivierung von Pflanzenkohle. *Ithaka Journal*, 11(1), 28–32.
- Schmidt, H.-P., Pandit, B., Martinsen, V., Cornelissen, G., Conte, P., & Kammann, C. (2015). Fourfold Increase in Pumpkin Yield in Response to Low-Dosage Root Zone Application of Urine-Enhanced Biochar to a Fertile Tropical Soil. *Agriculture*, 5(3), 723–741. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030723>
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., & Kotan, R. (2014). Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0035-3>
- Shackley, S., Schmidt, H.-P., & Glaser, B. (2013). Introduction. In S. Shackley, G. Ruysschaert, K. Zwart, & B. Glaser (Hrsg.), *Biochar in European soils and agriculture: Science and practice* (S. 1–16). Routledge.
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>

- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S.-M., Yun, B.-W., & Lee, I.-J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *106*, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.006>
- Shaikh, S., Sayyed, R., & Reddy, M. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Sustainable Approach to Agro-ecosystem. In K. R. Hakeem, M. S. Akhter, & S. N. Abdullah (Hrsg.), *Plant, Soil and Microbes. Volume 1: Implications in Crop Science* (S. 181–201). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_10)
- Sohaib, M., Zahir, Z. A., Khan, M. Y., Ans, M., Asghar, H. N., Yasin, S., & Al-Barakah, F. N. I. (2020). Comparative evaluation of different carrier-based multi-strain bacterial formulations to mitigate the salt stress in wheat. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(3), 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.034>
- Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2014). Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(6), 585–597. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200564>
- Speiser, B., Tamm, L., Leschenne, V., Kretschmar, U., Maurer, V., Biasio, A., Schneider, C., & Chevillat, V. (2021). *Betriebsmittelliste 2021 für den biologischen Landbau in der Schweiz*. Forschungsanstalt für biologischen Landbau (FiBL).
- Spokas, K. A., Novak, J. M., Stewart, C. E., Cantrell, K. B., Uchimiya, M., DuSaire, M. G., & Ro, K. S. (2011). Qualitative analysis of volatile organic compounds on biochar. *Chemosphere*, *85*(5), 869–882. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.108>
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, *65*(2), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)
- Suliman, W., Harsh, J. B., Abu-Lail, N. I., Fortuna, A.-M., Dallmeyer, I., & Garcia-Perez, M. (2016). Modification of biochar surface by air oxidation: Role of pyrolysis temperature. *Biomass and Bioenergy*, *85*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.030>
- Sun, D., Hale, L., & Crowley, D. (2016). Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils*, *52*(4), 515–522.
- Sutradhar, I., Jackson-deGraffenried, M., Akter, S., McMahon, S., Waid, J., Schmidt, H.-P., Wendt, A., & Gabrysch, S. (2021). Introducing urine-enriched biochar-based fertilizer for vegetable production: Acceptability and results from rural Bangladesh. *Environment, Development and Sustainability*, *23*, 12954–12975. <https://doi.org/10.1007/s10668-020-01194-y>
- Swain, M. R., Laxminarayana, K., & Ray, R. C. (2012). Phosphorus Solubilization by Thermotolerant *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung Microflora. *Agricultural Research*, *1*(3), 273–279. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0022-x>
- Tao, S., Wu, Z., He, X., Ye, B.-C., & Li, C. (2018). Characterization of Biochar Prepared from Cotton Stalks as Efficient Inoculum Carriers for *Bacillus subtilis* SL-13. *BioResources*, *13*(1), 1773–1786.
- Temprano, F., Albareda, M., Camacho, M., Daza, A., Santamaría, C., & Rodríguez-Navarro, N. D. (2002). Survival of several *Rhizobium*/*Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *International Microbiology*, *5*, 81–86. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0067-y>
- Thakur, M. (2020). Fungi as a Biological Tool for Sustainable Agriculture. In A. N. Yadav, S. Mishra, D. Kour, N. Yadav, & A. Kumar (Hrsg.), *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture: Volume 1: Perspective for Diversity and Crop Productivity* (S. 255–273). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45971-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45971-0_11)

- Tripti, Kumar, A., Usmani, Z., Kumar, V., & Anshumali. (2016). Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. *Journal of Environmental Management*, *190*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.060>
- Tu, C., Wei, J., Guan, F., Liu, Y., Sun, Y., & Luo, Y. (2020). Biochar and bacteria inoculated biochar enhanced Cd and Cu immobilization and enzymatic activity in a polluted soil. *Environment International*, *137*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105576>
- Vanek, S., Thies, J., Wang, B., Hanley, K., & Lehmann, J. (2016). Pore-Size and Water Activity Effects on Survival of *Rhizobium tropici* in Biochar Inoculant Carriers. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, *8*(4), 296–306. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000300>
- Vasseur-Coronado, M., du Boulois, H. D., Pertot, I., & Puopolo, G. (2021). Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiological Research*, *245*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126672>
- Verbruggen, E., Heijden, M. G. A. van der, Rillig, M. C., & Kiers, E. T. (2013). Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: Factors determining inoculation success. *New Phytologist*, *197*(4), 1104–1109. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04348.x>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, *255*(2), 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Wang, L., O'Connor, D., Rinklebe, J., Ok, Y. S., Tsang, D. C. W., Shen, Z., & Hou, D. (2020). Biochar Aging: Mechanisms, Physicochemical Changes, Assessment, And Implications for Field Applications. *Environmental Science & Technology*, *54*(23), 14797–14814. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04033>
- Weber, K., & Quicker, P. (2018). Properties of biochar. *Fuel*, *217*, 240–261. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.054>
- Wei, M., Liu, X., He, Y., Xu, X., Wu, Z., Yu, K., & Zheng, X. (2020). Biochar inoculated with *Pseudomonas putida* improves grape (*Vitis vinifera* L.) fruit quality and alters bacterial diversity. *Rhizosphere*, *16*. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100261>
- Woo, O.-G., Kim, H., Kim, J.-S., Keum, H. L., Lee, K.-C., Sul, W. J., & Lee, J.-H. (2020). *Bacillus subtilis* strain GOT9 confers enhanced tolerance to drought and salt stresses in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica campestris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *148*, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.032>
- Xu, X., Huang, H., Zhang, Y., Xu, Z., & Cao, X. (2019). Biochar as both electron donor and electron shuttle for the reduction transformation of Cr(VI) during its sorption. *Environmental Pollution*, *244*, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.068>
- Xue, Y., Gao, B., Yao, Y., Inyang, M., Zhang, M., Zimmerman, A. R., & Ro, K. S. (2012). Hydrogen peroxide modification enhances the ability of biochar (hydrochar) produced from hydrothermal carbonization of peanut hull to remove aqueous heavy metals: Batch and column tests. *Chemical Engineering Journal*, *200–202*, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.116>
- Yasin, N. A., Akram, W., Khan, W. U., Ahmad, S. R., Ahmad, A., & Ali, A. (2018). Halotolerant plant-growth promoting rhizobacteria modulate gene expression and osmolyte production to improve salinity tolerance and growth in *Capsicum annum* L. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(23), 23236–23250. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2381-8>
- Youngwilai, A., Kidkhunthod, P., Jearanaikoon, N., Chairapa, J., Supanchaiyamat, N., Hunt, A. J., Ngernyen, Y., Ratpukdi, T., Khan, E., & Siripattanakul-Ratpukdi, S. (2020). Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violaceus* strain SBP1 cell-immobilized biochar. *Science of The Total Environment*, *713*, 136708. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136708>

- Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C.-M., Allen, R., Melo, I. S., & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, *226*(4), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M.-S., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal*, *58*(4), 568–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x>
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules*, *24*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
- Zhao, Q., Ran, W., Wang, H., Li, X., Shen, Q., Shen, S., & Xu, Y. (2013). Biocontrol of Fusarium wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. *BioControl*, *58*(2), 283–292. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9496-5>
- Zheng, B.-X., Ding, K., Yang, X.-R., Wadaan, M. A. M., Hozzein, W. N., Peñuelas, J., & Zhu, Y.-G. (2019). Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Science of The Total Environment*, *647*, 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.454>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Für die Herstellung der Mutterkultur wurde eine Einzelkultur (links) in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Medium übertragen und für 24h bei 130rpm und Raumtemperatur inkubiert (rechts). (eigene Aufnahmen) .....	27
Abbildung 2: Die in der Zellsuspension gelöste Pflanzenkohle (links) wurde für die restlichen Versuche horizontal (rechts) auf dem Schüttler platziert. (eigene Aufnahmen).....	29
Abbildung 3: Für die Oxidation der Pflanzenkohle wurde diese zuerst 2 Stunden in einer 10%-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung eingelegt (links) und anschliessend abfiltriert (rechts). (eigene Aufnahmen).....	30
Abbildung 4: Beim Filtrationsversuch wurden grössere Kohlepartikel (125 – 200, links) verwendet als in den restlichen Versuchen (<250um, rechts). (eigene Aufnahmen) .....	31
Abbildung 5: Pro Wiederholung wurden 5 mit <i>P. ultimum</i> befallene Rondellen in eine leere Petrischale gestellt (links), die Petrischale wurde mit Substrat gefüllt (mitte) und die beimpfte Pflanzenkohle untergemischt. Abschliessend wurden alle Ansätze mit 30ml Leitungswasser bewässert und gleichmässig mit Kresse besät (rechts). (eigene Aufnahmen) .....	33
Abbildung 6: Die Anordnung aller Ansätze in den vier Behältern. Pro Behälter war mittig eine LED-Leiste vorhanden, die jeweils von 6 bis 19:30 Uhr Tageslicht simulierte.....	34
Abbildung 7: Die Kresse nach sieben Tagen, verteilt auf die vier Behälter mit künstlichem Tageslicht. Anschliessend wurde von jedem Ansatz die Befallsstärke, die Wuchshöhe, das Feucht- und das Trockengewicht bestimmt. (eigene Aufnahme).....	34
Abbildung 8: Unerwünschte orange Kolonien auf den Platten des Vorversuchs, die nicht <i>B. subtilis</i> sein können.....	36
Abbildung 9: Aufnahmen des Inokulums von Versuch 3 unter dem Lichtmikroskop. Zu erkennen sind links schwarz-braune Kohlestücke in einer flüssigen Matrix und rechts die Vermessung eines einzelnen Bakteriums in der Flüssigkeit.....	38
Abbildung 10: Auf den Platten der eingelagerten, oxidierten Pflanzenkohle waren in Woche vier und fünf orange Kolonien zu erkennen (links). Die Kolonien konnten unter dem Lichtmikroskop als ca. 1.5µm grosse Bakterien identifiziert werden (rechts). .....	40
Abbildung 11: Der Vergleich zwischen einem Ansatz mit oxidiertes, beimpfte Pflanzenkohle (3ml) an infizierter Kresse (links) und der Positivkontrolle (rechts). Die Unterschiede im Wurzelwachstum (oben), der Wuchshöhe (mitte) und dem Befall (unten) waren deutlich erkennbar.....	43

## Grafikverzeichnis

Grafik 1: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle nach 21, 24 und 28 Stunden Inkubationszeit. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruska-Wallis) .....	36
Grafik 2: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle mit unterschiedlicher Nährstoffanreicherung. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , ANOVA).....	37
Grafik 3: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehandelter und oxidierter Pflanzenkohle, die für eine Variante jeweils in NaCl und für ein zweite Variante in NPK-Dünger inokuliert wurde. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis) .....	37
Grafik 4: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehandelter und oxidierter Pflanzenkohle, im ganzen Inokulum (Kohle + Flüssigkeit) und nur auf der Kohle selbst gemessen. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Oneway) .....	39
Grafik 5: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle bei unbehandelter und oxidierter Pflanzenkohle im Verlauf von 5 Wochen. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die p-Werte zeigen die statistische Auswertung, mit Stern (*) versehene Werte weisen auf signifikante Unterschiede hin ( $p < 0.05$ , Student-t-Test bei Tag 0, 8, 28, 35, Welch-t-Test bei Tag 14, 21). .....	39
Grafik 6: Die koloniebildenden Einheiten von <i>B. subtilis</i> pro Gramm Pflanzenkohle am ersten und letzten Tag des Versuches, bei unbehandelter und oxidierter Pflanzenkohle. Visualisiert wurde der Mittelwert der dekadischen Logarithmen aller drei Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Welch-t-Test).....	40
Grafik 7: Der Befall mit <i>P. ultimum</i> (A), die Wuchshöhe (B), das Feucht- (C) und Trockengewicht (D) von Kresse nach der Behandlung mit Pflanzenkohle (unbehandelt oder oxidiert) und <i>B. subtilis</i> in verschiedenen Varianten. Visualisiert wurde der Mittelwert aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Oneway bei (A), ANOVA bei (B), (C) und (D)) .....	42
Grafik 8: Der Befall mit <i>P. ultimum</i> (A,B), die Wuchshöhe (C,D), das Feucht- (E,F) und Trockengewicht (G,H) von Kresse nach der Behandlung mit Pflanzenkohle (unbehandelt (A,C,E,G) oder oxidiert (B,D,F,H)) und <i>B. subtilis</i> in verschiedenen Konzentrationen. Visualisiert wurde der Mittelwert aller vier Wiederholungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben verweisen auf signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis bei (A) und (E), Oneway bei (B), ANOVA bei (C), (D), (F), (G) und (H)).....	44

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss der Pyrolysetemperatur und des Ausgangsmateriales auf diverse Eigenschaften der resultierenden Pflanzenkohle. Die Strukturierung des Ausgangsmateriales wurde gemäss den vier Kategorien von Hassan et al. (2020) definiert. Die Strukturierung gestaltet sich demnach wie folgt: Hartholz > Weichholz > Gras > Mist. ....	11
Tabelle 2: Die wichtigsten Parameter der Beimpfungsverfahren von Pflanzenkohle in 20 wissenschaftlichen Publikationen. Zu den mit Stern (*) versehenen Werten konnten keine Angaben im Text gefunden werden, weshalb sie aus den Visualisierungen abgelesen wurden. Bei Publikationen mit mehreren Versuchen ist bei den Populationsdichten auf der Kohle der ungefähre Bereich aller Resultate angegeben.....	19
Tabelle 3: Die Haltbarkeit von Pflanzenkohle und Torf als Träger für Mikroorganismen im Vergleich. Grün eingefärbte Resultate visualisieren signifikant bessere Koloniezahlen auf der Pflanzenkohle. Gelb eingefärbte Resultate verweisen auf statistisch gleichwertige Resultate und rot eingefärbte Zeilen zeigen tiefere Koloniezahlen im Vergleich zu Torf. Visualisiert wurde die Zellzahl der letzten Erhebung des Versuches. Sterne (*) verweisen auf keine Angaben bezüglich Signifikanz, die Einfärbung erfolgte aufgrund der Rohdaten. ....	23
Tabelle 4: Die wichtigsten chemischen Parameter der verwendeten Pflanzenkohle.....	26
Tabelle 5: Die Ergebnisse der Elementaranalyse der verwendeten Pflanzenkohle.....	26
Tabelle 6: Die 13 Varianten des Kressetest. Angegeben ist die jeweilig verwendete Pflanzenkohle und angewendete Konzentration, sowie ob <i>B. subtilis</i> und/oder <i>P. ultimum</i> eingesetzt wurden. ....	32

## Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Colony-Forming-Units CFU pro Milliliter Inokulum.....	28
Formel 2: Berechnung der Colony-Forming-Units CFU pro Gramm Trägersubstanz.....	28




# Anhang

## Anhang A: Verwendete Nährsalze

Produkt	N <sub>tot</sub> [%]	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [%]	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [%]	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [%]	K <sub>2</sub> O [%]	SO <sub>3</sub> [%]	CaO [%]	Einwaage [g/L]
YaraTera KRISTA MKP				52	34			0.7g
YaraTera CALCINIT	15.5	14.4	1.1				26	62g
YaraTera KRISTA SOP					51	45		21g

Quelle: YARA GmbH & Co. KG. (2018). *YaraTera® KRISTA®*. Produktbroschüre. <https://www.yara.de/pflanzenernaeh-rung/duengemittel/yaratera/yaratera-krista-mkp/>

## Anhang B: Verwendetes Substrat



### Floradur Block Bio



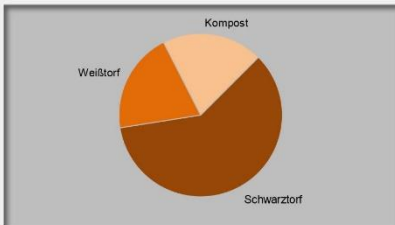

**Rezeptur:** 10334

**Anwendungsbereich:**  
Presstopfsubstrat für die Anzucht von Gemüsejungpflanzen.

Trays   
  Anzucht allgemein, Presstöpfe   
  Growbag   
  Kübel   
  Ampel   
  Pflanzerde   
  Rasen  
 Topfen, Topfgröße:   
 7-9 cm   
 8-11 cm   
 8-14 cm   
 >12 cm   
 Cont. >1 l   
 Cont. >3 l   
 kundenspezifisch

**Technische Daten:**

**Zusammensetzung**

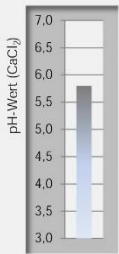


enthält Netzmittel (Instant Plus)   
  enthält Ton   
  enthält Sand   
  enthält Langzeitdünger

**Chemische Eigenschaften (zum Zeitpunkt der Herstellung)**

pH-Wert * (CaCl <sub>2</sub> )	5,8
Salzgehalt * (g/l)	1,0
N-Stickstoff * (CaCl <sub>2</sub> )	150 mg/l
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Phosphat * (CAL)	150 mg/l
K <sub>2</sub> O-Kalium * (CAL)	420 mg/l
Struktur	fein

Dem Substrat wurden Nährstoffe org.-min. Form zugeführt.




\* Schwankungsbreite gemäß Gütebestimmungen für Substrate der Gütegemeinschaft Substrate für Pflanzen e.V.

Quelle: Floragard Vertriebs-GmbH. (2020). *Floradur Block Bio Rezeptur Nr. 10334*. Produktdatenblatt. <https://professional.floragard.de/de-de/gartenbau/suchergebnis/substrate-bio-substrate/579/floradur-block-bio>

## Anhang C: Eigenständigkeitserklärung

Mit der Abgabe dieser Arbeit versichert der Studierende, dass er die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Arbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Wädenswil, 12.01.2021

.....

Unterschrift

