

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Arbeitsgruppe Geomikrobiologie

Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines sibirischen Permafrostbodens

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
in der Wissenschaftsdisziplin Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Svenja Kobabe
Geboren am 24.01.1974 in Hamburg

Potsdam, im Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

Dank

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Permafrostmuster und Dauerfrostböden.....	3
2.2	Kohlenstoffkreislauf im Boden	5
2.2.1	Kohlenstoffumsatz unter anaeroben Bedingungen	7
2.3	Der phylogenetische Stammbaum	8
2.4	Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften in Böden.....	9
2.5	Stand des Anwendungsbereichs moderner Methoden zur Analyse von mikrobiellen Lebensgemeinschaften	11
2.5.1	DGGE, TGGE und T-RFLP	12
2.5.2	FISH	12
2.5.3	BIOLOG Mikrotiterplatten als Methode zur Charakterisierung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft	14
2.6	Das Untersuchungsgebiet im sibirischen Permafrost	17
2.6.1	Das Lena-Delta.....	17
2.6.2	Die Insel Samoylov	18
2.6.3	Kenntnisstand über Böden und Methanflüsse im Untersuchungsgebiet.....	20
3	Material und Methoden	26
3.1	Feldarbeiten und Probennahme	26
3.1.1	Redoxverhalten der Bodenhorizonte	26
3.2	Bodenkundliche Analysen	26
3.2.1	Bodentemperatur	26
3.2.2	Bodenart	26
3.2.3	Gesamtkohlenstoff und –stickstoff.....	27
3.3	Mikrobiologische Analysen	27
3.3.1	Fixierung der Bodenproben mit Paraformaldehyd (PFA) oder Ethanol	27
3.3.2	Verdünnung und Homogenisierung der Bodenproben.....	28
3.3.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	29
3.3.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	30

3.3.5	Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der Zellzahlen	34
3.3.6	Anreicherungskulturen der methanogenen <i>Archaea</i>	36
3.3.7	Die Charakterisierung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft mit Hilfe von BIOLOG Mikrotiterplatten	40
4	Ergebnisse	47
4.1	Bodenkundliche Beschreibung des untersuchten Permafrostbodens	47
4.2	Quantitative Charakterisierung der mikrobiellen Population mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	50
4.2.1	Quantifizierung der Gesamtzellzahlen und der aktiven Bakterien im Permafrostboden.....	50
4.2.2	Unterschiede der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften zwischen den verschiedenen Horizonten.....	51
4.2.3	Quantifizierung der <i>Archaea</i> in den verschiedenen Horizonten	57
4.3	Charakterisierung der Population der methanogenen <i>Archaea</i>	60
4.4	Das physiologische Profil der Bakteriengemeinschaften der verschiedenen Horizonte	63
4.4.1	Unterschiede der Gesamtrate des Substratumsatzes zwischen den verschiedenen Horizonten	63
4.4.2	Unterschiede in der Qualität des Substratumsatzes zwischen den verschiedenen Horizonten	65
4.4.3	Unterschiede zwischen dem aeroben und dem fakultativ anaeroben Substratumsatz	75
4.4.4	Nicht umsetzbare Substrate	77
5	Diskussion	78
5.1	Kritische Betrachtung der eingesetzten Methoden	78
5.1.1	Limitierung der quantitativen Analyse der mikrobiologischen Gemeinschaft mit FISH	78
5.1.2	Limitierung der BIOLOG-Methode bei der Analyse des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft	80
5.2	Diskussion der Ergebnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
5.2.1	Ursachen für die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Population Erörterung	81
5.2.2	Auswirkungen der phylogenetischen Unterschiede auf den Kohlenstoffumsatz im untersuchten Permafrostboden	86
6	Ausblick	89
7	Literatur	91
8	Anhang	99

Dank

Zur Fertigstellung der Arbeit, die im Rahmen meiner dreijährigen Mitarbeit am Alfred-Wegener-Institut entstand, möchte ich mich bei all jenen, die mich während dieser Zeit begleitet und auf verschiedenste Weise unterstützt haben, bedanken.

Im besonderen gilt dies:

Herrn Prof. Dr. Ingo Schneider (Universität Potsdam), dem ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortkommen der Arbeit danken möchte.

Frau Prof. Dr. Eva-Maria Pfeiffer (Universität Hamburg) und Herrn Prof. Dr. Hans-W. Hubberten (AWI Potsdam), die die Erstellung der Arbeit am Alfred-Wegener-Institut erst ermöglicht und mit konstruktiven Anregungen zu ihrer Verbesserung beigetragen haben.

Herrn Dr. Dirk Wagner (AWI Potsdam), dem Leiter der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie in der diese Arbeit durchgeführt wurde, für die mir überlassenen Freiheiten zur Themenentwicklung.

Herrn Dr. Otto Baumann (Universität Potsdam), der mir die Nutzung des CLSM ermöglichte und mit seinen Erklärungen eine große Hilfe beim Mikroskopieren war.

Herrn Dr. Thomas Kumke (AWI, Potsdam), der ein offenes Ohr für die Fragen zur statistischen Auswertungen meiner Daten und im richtigen Moment Zeit, das richtige Buch und den passenden Spruch parat hatte.

Allen russischen und deutschen Expeditionsteilnehmern, für die unvergesslich gemeinsame Zeit im Lenadelta in den Jahren 2001 und 2002 und die Hilfsbereitschaft bei allen Gelände- und Laborarbeiten.

Natürlich all meinen Kollegen und Freunden am Institut für die kollegiale Unterstützung und die nette Stimmung auf dem Telegrafenberg. Dabei besonders allen Geo- und Atmo-Mitdoktoranden, die sich durch ihre Lust am nicht-fachlichen Austausch hervorgetan haben. Herzlich sei Lars Kutzbach für seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft über alle fachlichen und menschlichen Themen, und die täglich gute Laune im, von mir völlig überheizten, Büro gedankt! Nadja Hultsch und Christian Wille gilt mein Dank für die kritische Durchsicht früherer Versionen dieser Arbeit und ihre Bereitschaft sich in die fachfremde Bakterienwelt einzudenken. Christine Flemming, Ute Bastian und Antje Eulenburg gebührt Anerkennung für die gut gelaunte Hilfe bei den Laborarbeiten.

All meinen Freunden außerhalb des Instituts und besonders Boris dafür, dass sie sich in den letzten Jahren geduldig diverse Erläuterungen über Arktisexpeditionen, nicht anfärbbare Bakterien und meine Probleme mit der schnell verrinnenden Zeit angehört haben und mir immer wieder bewusst machten, dass dies objektiv vielleicht nicht die einzigen übers glücklich sein, entscheidenden Themen sind.

Meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und ihr entgegengebrachtes Vertrauen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des multidisziplinären Deutsch-Russischen Verbundprojektes „Laptev See 2000“ erstellt. Die dargestellten bodenkundlichen und mikrobiologischen Untersuchungen verfolgten das Ziel die mikrobielle Lebensgemeinschaft eines Permafrostbodens im sibirischen Lena Delta zu charakterisieren, wobei den methanogenen Archaea besondere Beachtung zukam.

Die Probennahme wurde im August 2001 im zentralen Lenadelta, auf der Insel Samoylov durchgeführt. Das Delta liegt im Bereich des kontinuierlichen Permafrostes, was bedeutet, dass nur eine flache saisonale Auftauschicht während der Sommermonate auftaut. Aufgrund der sich jährlich wiederholenden Gefrier- und Auftauzyklen ist die Landschaft durch die Ausbildung verschiedenster Polygonformen charakterisiert. Das untersuchte Bodenprofil lag im Zentrum eines für die Landschaft repräsentativen *Low Center* Polygons. Zum Zeitpunkt der Beprobung betrug die Auftautiefe des untersuchten Bodens 45 cm. Für den als „*Typic Historthel*“ angesprochenen Boden wurden vier verschiedene torfige, sandig-lehmige Horizonte ausgewiesen, die von einem aus schwach zersetzter organischer Substanz bestehenden Oi-Horizont bedeckt waren. Der Wasserstand lag zum Untersuchungszeitpunkt 18 cm unter der Geländeoberfläche, so dass alle tiefer liegenden Horizonte durch anaerobe Verhältnisse charakterisiert waren. Die Untersuchung der bodenkundlichen Parameter ergab unter anderem eine mit zunehmender Tiefe abnehmende Konzentration von Kohlenstoff und Stickstoff, sowie eine Abnahme von Temperatur und Wurzelichte.

Um die Auswirkungen der sich mit der Tiefe verändernden Bodeneigenschaften auf die Mikroorganismen zu ermitteln, wurden die Mikroorganismenpopulationen der verschiedenen Bodentiefen mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hinsichtlich ihrer Anzahl, Aktivität und Zusammensetzung beschrieben. Für die Charakterisierung des physiologischen Profils dieser Gemeinschaften, bezüglich der von ihr umsetzbaren Kohlenstoffverbindungen, wurden BIOLOG Mikrotiterplatten unter den *in situ* Bedingungen angepassten Bedingungen eingesetzt.

Die sich im Profil verändernden Bodenparameter, vor allem die abnehmende Substratversorgung, die geringe Temperatur und die anaeroben Verhältnisse in den unteren Bodenschichten führten zu einer Veränderung der Mikroorganismenpopulation im Bodenprofil. So nahm von oben nach unten die Gesamtanzahl der ermittelten Mikroorganismen von $23,0 \times 10^8$ auf $1,2 \times 10^8$ Zellen g^{-1} ab. Gleichzeitig sank der Anteil der aktiven Zellen von 59% auf 33%. Das bedeutet, dass im Bereich von 0-5 cm 35mal mehr aktive Zellen g^{-1} als im Bereich von 40-45 cm gefunden wurden. Durch den Einsatz spezieller rRNS-Sonden konnte zusätzlich eine Abnahme der Diversität mit zunehmender Bodentiefe nachgewiesen werden.

Die geringere Aktivität der Population in den unteren Horizonten sowie die Unterschiede in der Zusammensetzung wirkten sich auf den Abbau der organischen Substanz aus. So wur-

den die mit Hilfe der BIOLOG Mikrotiterplatten angebotenen Substanzen in größerer Tiefe langsamer und unvollständiger abgebaut. Insbesondere in den oberen 5 cm konnten einige der angebotenen Polymere und Kohlehydrate deutlich besser als im restlichen Profil umgesetzt werden. Das außerdem unter anaeroben Versuchsbedingungen diese Substrate deutlich schlechter umgesetzt wurden, kann so interpretiert werden, dass die konstant anaeroben Bedingungen in den unteren Horizonten ein Auftreten der Arten, die diese Substrate umsetzen, erschweren.

Die in den oberen, aeroben Bodenabschnitten wesentlich höheren Zellzahlen und Aktivitäten und die dadurch schnellere C-Umsetzung führen auch zu einer besseren Substratversorgung der methanogenen *Archaea* in den makroskopisch aeroben Horizonten. Die erhöhte Substratverfügbarkeit erklärt die Tatsache, dass im Bereich von 0-5 cm die meisten methanogenen *Archaea* gefunden wurden, obwohl sich dieser Bereich zum Zeitpunkt der Probenahme oberhalb des wassergesättigten Bodenbereichs befand. Trotz der aeroben Bedingungen in, liegt im Bereich von 5-10 cm die für die methanogenen *Archaea* am besten geeignete Kombination aus Substratangebot und anaeroben Nischen vor. Hinzu kommt, dass in diesen Tiefen die Sommertemperaturen etwas höher liegen als in den tieferen Horizonten, was wiederum die Aktivität positiv beeinflusst.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Untersuchungsergebnisse von Anzahl, Aktivität, Zusammensetzung und Leistung der gesamten, aber im besonderen auch der methanogenen Mikroorganismenpopulation wird deutlich, dass in dem untersuchten Bodenprofil unter ökologischen Gesichtspunkten die oberen 15-20 cm den für den C-Umsatz relevantesten Bereich darstellen. Das Zusammenspiel wichtiger Bodenparameter wie Bodentemperatur, Wasserstand, Nährstoffversorgung und Durchwurzelung führt dazu, dass in dem untersuchten Tundraboden in den oberen 15–20 cm eine wesentlich größere und diversere Anzahl an Mikroorganismen existiert, die für einen schnelleren und umfassenderen Kohlenstoffumsatz in diesem Bereich des *active layers* sorgt.

Abkürzungsverzeichnis

CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
Cy3	Cyanin 3, ein Fluoreszenzfarbstoff
Cy5	Cyanin 5, ein Fluoreszenzfarbstoff
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol, ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein, ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff
EPS	Extrapolymeren Substanzen
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GOF	Geländeoberfläche
PFA	Paraformaldehyde
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
TM	Trockenmasse
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment Längen Polymorphismus
AWCD	durchschnittliche Farbentwicklung (von „average well colour development“)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Anzahl und Masse lebender Organismen im Boden [verändert nach GISI 1997].	10
Tab. 2:	Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Anregungs- und Emissionsmaxima	31
Tab. 3:	Beschreibung der verwendeten rRNA-Sonden für die Bestimmung der Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen.	32
Tab. 4:	Beschreibung der verwendeten rRNA-Sonden für die Bestimmung der verschiedenen methanbildenden <i>Archaea</i>	33
Tab. 5:	Die am Epifluoreszenzmikroskop eingesetzten Filter (Zeiss).	35
Tab. 6:	Einteilung der 31 Substrate der EcoPlate in sechs Substratklassen nach INSAM [1997].	42
Tab. 7:	Ausgewählte physikalische und chemische Bodeneigenschaften des untersuchten <i>Typic Historthel</i>	49
Tab. 8:	Augusttemperaturen in verschiedenen Bodentiefen des untersuchten <i>Typic Historthel</i>	50
Tab. 9:	Absolute Bakterienzahlen in den verschiedenen Horizonten des untersuchten <i>Typic Historthel</i> nach DTAF-Färbung, sowie die relativen Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an der Gesamtzellzahl.	54
Tab. 10:	Ergebnisse der FISH für die aus verschiedenen Bodentiefen angereicherten Proben methanogener <i>Archaea</i>	61
Tab. 11:	Ergebnisse des Fisher LSD-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Horizonten bei AWCD 0,2.	68
Tab. 12:	Ergebnisse des Fisher LSD-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Horizonten bei AWCD 0,5.	71
Tab. 13:	Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen (bei AWCD 0,2).	72
Tab. 14:	Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen (bei AWCD 0,5).	73
Tab. 15:	Ergebnisse des Fisher LSD-Test für den paarweisen Vergleich zwischen den aerob und anaerob inkubierten Proben.	76
Tab. 16:	Substrate die zur Unterscheidung zwischen aerobem und anaerobem Substratumsatz beitragen.	77
Tab. 17:	Substrate die nicht oder nur in sehr geringem Maße umgesetzt werden konnten.	77

Anhang

Tab. A 1:	Aufschlüsselung der Korngrößen in ihre Unterfraktionen.	100
Tab. A 2:	Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2.	107

Tab. A 3: Varianzanalyse der ersten 4 Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2.).....	108
Tab. A 4: Ergebnisse des Scheffé-Tests auf Signifikanz, Aerober Umsatz bei AWCD 0,2....	108
Tab. A 5: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Aerober Umsatz bei AWCD 0,2.....	109
Tab. A 6: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2.....	110
Tab. A 7: Deskriptive Statistik der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2.....	110
Tab. A 8: Varianzanalyse der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2.....	111
Tab. A 9: Ergebnisse des Scheffé-Tests für den paarweisen Vergleich der anaerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,2.....	111
Tab. A 10: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Anaerober Umsatz bei AWCD 0,2.....	112
Tab. A 11: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5.....	113
Tab. A 12: Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5.....	113
Tab. A 13: Varianzanalyse der ersten 4 Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5.).....	114
Tab. A 14: Ergebnisse der Signifikanztests für den paarweisen Vergleich der aerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,5.....	114
Tab. A 15: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Aerober Umsatz bei AWCD 0,5.....	115
Tab. A 16: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5.....	116
Tab. A 17: Deskriptive Statistik der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5.....	116
Tab. A 18: Varianzanalyse der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5.....	117
Tab. A 19: Ergebnisse des Fisher LSD Tests für den paarweisen Vergleich der anaerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,5.....	117
Tab. A 20: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Anaerober Umsatz bei AWCD 0,5.....	118
Tab. A 21: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.	119

Tab. A 22: Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.....	119
Tab. A 23: Varianzanalyse der 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.	120
Tab. A 24: Substrate und ihre Eigenvektorkomponente für die zweite Achse der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die Lage des Lenadeltas in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes [nach Brown et al. 1997].	3
Abb. 2:	Schematische Skizze eines Low-Center Polygons [C. Siegert nach einer Skizze von Romanovskii unveröffentlicht].	5
Abb. 3:	Vereinfachtes Modell des terrestrischen Kohlenstoffkreislaufs.	6
Abb. 4:	Die methanogene anaerobe Nahrungskette.	7
Abb. 5:	Phylogenetischer Stammbaum der drei Reiche (Domänen) des Lebens, basierend auf vergleichender Sequenzanalyse der ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNS) [aus Madigan 2000].	9
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung [aus Amann 2002].	13
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Untersuchung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft mit Hilfe von BIOLOG Mikrotiterplatten.	15
Abb. 8:	Darstellung des sigmoidalen Farbverlaufs in den einzelnen Vertiefungen der BIOLOG Mikrotiterplatte (nach: KONOPKA et al. 1998).	16
Abb. 9:	Lage des Lenadeltas und die Lage der Insel Samoylov im Lena-Delta.	17
Abb. 11:	Bodenkarte der Insel Samoylov.	21
Abb. 13:	Methanbildungsaktivitäten in unterschiedlichen Tiefen eines Low-center Polygons in Abhängigkeit von der Temperatur.	25
Abb. 14:	Gliederung der methanogenen Archaea mit den spezifischen Sonden.	39
Abb. 15:	Schema der Substratanordnung auf der BIOLOG EcoPlate (BIOLOG).	41
Abb. 16:	Foto der Profilwand des untersuchten Typic Historthel mit der Einteilung in verschiedene Bodenhorizonte.	47
Abb. 17:	Vertikales Profil der absoluten Bakterienzahlen und dem Anteil an aktiven Zellen die im untersuchten Typic Historthel nachgewiesen wurden.	51
Abb. 18:	Aufnahmen der Hybridisierung eines identischen mikroskopischen Feldes, mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops.	52
Abb. 19:	Aufnahmen der dreifachen Hybridisierung verschiedener Bodenproben mit DTAF, Cy3 und Cy5 mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops.	53
Abb. 20:	Vertikales Profil der Zellzahlen der einzelnen phylogenetischen Gruppen, die mit den spezifischen Sonden gefunden wurden.	55
Abb. 21:	Zusammensetzung der aktiven Organismengemeinschaft in den verschiedenen Horizonten des Typic Historthel.	56
Abb. 22:	Die Fotos zeigen ein Aggregat von Archaea, das mit der Sonde ARC markiert wurde.	58
Abb. 23:	Aufnahme einer Ansammlung von Zellen, die mit der Sonde ARC markiert wurden.	59

Abb. 24: Vertikales Profil der Archaea-Zellzahlen, die mit der Sonde ARC915 im untersuchten Centerprofil nachgewiesen wurden.	60
Abb. 25: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 0-5 cm.....	61
Abb. 26: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm.....	62
Abb. 27: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 40-45 cm.....	63
Abb. 28: Verlauf der durchschnittlichen Farbentwicklung (AWCD) für die einzelnen Horizonte im aeroben Ansatz.....	64
Abb. 29: Verlauf der durchschnittlichen Farbentwicklung (AWCD) für die einzelnen Horizonte im anaeroben Ansatz.	64
Abb. 30: Darstellung der ersten beiden Hauptachsen der Hauptkomponentenanalyse bei AWCD 0,2.....	67
Abb. 31: Darstellung der ersten beiden Achsen der Hauptkomponentenanalyse bei AWCD 0,5.....	70
Abb. 32: Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentiefen.	74
Abb. 33: Hauptkomponentenanalyse der Unterschiede zwischen aerob und anaerob inkubierten Proben, bei AWCD 0,2.	76

Anhang

Abb. A 1:Aufnahmen der zweifachen Hybridisierung verschiedener Bodenproben mit DTAF und der mit Cy3 markierten Sonde EUBmix mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops.	101
Abb. A 2:Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops..	102
Abb. A 3:Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops.	103
Abb. A 4:Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 0-5 cm. Aufgenommen ist das identische mikroskopische Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops.	104
Abb. A 5: Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentiefen. Aerober Substratumsatz.....	105
Abb. A 6:Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentiefen. Anaerober Substratumsatz.	106

1 Einleitung

Im globalen Kohlenstoffhaushalt spielen die Böden eine wichtige Rolle. Sie stellen sowohl Senken als auch Quellen für atmosphärischen Kohlenstoff dar. In den Böden und Sedimenten der arktischen Tundrangebiete sind große Mengen organischen Kohlenstoffs akkumuliert [OECHEL & BILLINGS 1992; POST et al. 1982]. Sie stellten während des gesamten Holozäns eine bedeutende Senke für atmosphärischen Kohlenstoff dar [SMITH et al. 2004; GORHAM et al. 1991]. Der Grund für die starke Anreicherung an organischem Material liegt in den extremen klimatischen Bedingungen dieser Region, durch welche die mikrobielle Zersetzung stark reduziert wird. Die von Permafrost unterlagerten arktischen Tundraböden sind den größten Teil des Jahres durchgehend gefroren. Nur ein flacher Bereich an der Bodenoberfläche, die saisonale Auftauschicht, der sogenannte *active layer*, taut während der Sommermonate auf und zeigt dann biologische Aktivität. Durch die stauende Wirkung des gefrorenen Unterbodens sind beachtliche Teile des *active layer* ständig wassergesättigt. Diese wassergesättigten, anoxischen Bedingungen führen zu einem anaeroben Abbau der organischen Substanz (anaerobe Nahrungskette). Der letzte Schritt dieses anaeroben Umsetzungsprozesses ist die Bildung des Treibhausgases Methan (Methanogenese). Ein Teil des in anaeroben Bodenbereichen gebildeten Methans (CH_4) kann in Anwesenheit von Sauerstoff durch methanoxidierende Mikroorganismen wieder zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert werden. Das nicht umgesetzte Methan gelangt in die Atmosphäre. Wegen ihrer großen räumlichen Ausdehnung werden die Tundrangebiete als eine der wichtigsten Quellen für den globalen Methanhaushalt gewertet [FUNG et al. 1991].

Nach Schätzung von POST et al. [1985] ist rund ein Drittel des globalen Bodenkohlenstoffs im Permafrost und dem aufliegenden *active layer* der nördlichen Ökosysteme gespeichert. Die prognostizierte globale Erwärmung [IPCC 2001] und der mit ihr einhergehende verstärkte Abbau großer Mengen organischer Substanz könnte diese aktuelle Senke in eine Quelle für atmosphärischen Kohlenstoff umwandeln. Ein solches Szenario hätte dann wiederum einen verstärkenden Effekt auf das sich erwärmende Klimasystem [CHRISTENSEN 1991; IPCC, 1990]. Ein Modell für die Methanflüsse in arktischen Regionen von ZHUANG et al. [2004] zeigt bereits einen Anstieg der Methanemissionen während des letzten Jahrhunderts.

Für eine bessere Abschätzung der Auswirkungen von Klimaänderungen auf den Kohlenstoffspeicher arktischer Regionen, ist unter anderem eine detaillierte Kenntnis über Zusammensetzung, Funktion und Interaktion der am Kohlenstoff-Kreislauf beteiligten Mikroorganismen wichtig, da der Kohlenstoff-Abbau im Boden hauptsächlich durch Mikroorganismen gesteuert wird.

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich eine Gruppe des multidisziplinären Deutsch-Russischen Verbundprojektes „Laptev See 2000“ seit 1998 mit der Erfassung der klimati-

schen, pedogenen und bodenmikrobiologischen Einflüsse, welche die Prozesse der Methanflüsse (Bildung, Oxidation, Emission) in Permafrostböden steuern. In diesen Rahmen ist auch diese Arbeit eingebettet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es eine vertiefende Kenntnis über die in den verschiedenen Horizonten des *active layer* vorkommenden, den Kohlenstoff-Kreislauf und damit auch den Methankreislauf steuernden Mikroorganismenpopulationen zu erhalten. Dabei sollen im Einzelnen folgende Fragen exemplarisch für einen permafrostbeeinflussten arktischen Tundrastandort in Sibirien bearbeitet werden:

- Wie unterscheiden sich die Mikroorganismenpopulationen zwischen den einzelnen Bodenhorizonten des *active layer* bezüglich **Anzahl** und **Zusammensetzung**?
- Gibt es zwischen den Bodenhorizonten des active layer Unterschiede in der **Funktionalität** der Bakterienpopulation?
- Wie wirken sich die bodenkundlichen und mikrobiellen Parameter der unterschiedlichen Bodenhorizonte auf die Aktivität der **methanogenen** Flora und ihre Zusammensetzung aus?

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Permafrostmuster und Dauerfrostböden

Permafrost

Das Untersuchungsgebiet, die Insel Samoylov liegt in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes. Als Permafrost wird ein Untergrund bezeichnet, der für mindestens zwei aufeinander folgende Jahre eine Temperatur unter 0°C aufweist. Permafrostböden sind demnach das ganze Jahr über gefroren beziehungsweise nur die oberen Dezimeter tauen während der Sommermonate auf. Diese Zone des Auftauens wird als *active layer* bezeichnet. Der sich unter dem active layer befindliche, dauerhaft gefrorene Untergrund erreicht im kontinuierlichen Permafrost mancher Gebiete Sibiriens, Alaskas und Kanadas mehrere hundert Meter. Die Bildung des heutigen Permafrostes auf der nördlichen Halbkugel begann als es vor ca. 2,5 Millionen Jahren zu einer Abkühlung der nördlichen Hemisphäre kam [JANSEN & SJØHOLM 1991]. Rekonstruktionen des Nord-Eurasischen Eisschildes von SVENDSON et al. [2004] zeigen, dass die Region zumindest seit der späten Saale-Kaltzeit (ca. 160 000 – 140 000 vor Heute) nicht vereist war und die Region von kontinuierlichem Permafrost unterlagert war. In der Zone des Permafrostes, die ungefähr 25% der Landoberfläche der nördlichen Hemisphäre einnimmt [ZHANG et al. 1999], laufen die pedogenetischen Prozesse nur während weniger Monate im Jahr ab und sind auf wenige Dezimeter Bodentiefe beschränkt.



Abb. 1: Die Lage des Lenadeltas in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes [nach BROWN et al. 1997].

Dauerfrostböden

Der unter der Auftauzone permanent gefrorene Untergrund verhindert das Eindringen und Versickern größerer Schmelzwassermengen, so dass die Böden teilweise bis an die Geländeoberfläche wassergesättigt sind oder das Wasser sogar oberhalb der Geländeoberfläche ansteht. Da aufgrund dieser sommerlichen Staunässe sowie durch das Einfrieren im Winter mit einer eventuellen Schneebedeckung die Bodendurchlüftung behindert wird, steigt der CO₂-Gehalt gegenüber der Außenluft um ein vielfaches, während die O₂-Konzentration soweit abnimmt, dass es in tieferen Schichten zur Entstehung von Reduktionshorizonten kommt. Der Abbau der organischen Substanz ist durch die Staunässe und die damit verbundenen anaeroben Verhältnisse nur über die Wege der anaeroben Nahrungskette möglich. Dadurch und durch die im *active layer* meist niedrige Bodentemperatur ist die mikrobielle Umsatzleistung eingeschränkt [NADELHOFFER et al. 1992]. So kann es, trotz einer in Permafrostgebieten meist niedrigen Primärproduktion, zu mächtigen Auflagen aus unzersetztem Pflanzenmaterial in Form von rohhumusartigen Humus oder Torfakkumulationen kommen. POST et al. [1985] schätzen, dass etwa ein Drittel des weltweit in Böden gespeicherten Kohlenstoffs in den Permafrostgebieten festgelegt ist.

Am Ende der anaeroben Nahrungskette steht die Bildung von Methan durch die Gruppe der methanogenen *Archaea*. Das gebildete Methan verlässt zumindest teilweise den Boden und gelangt in die Atmosphäre. Durch den hohen Flächenanteil der von Permafrost unterlagerten Tundragebiete ist ihr Beitrag an der gesamten globalen Methanemission erheblich: Ihr Anteil der weltweiten Feuchtgebiete an der totalen jährlichen CH₄ Emission wird auf 20% geschätzt [GALCHENCO et al. 1989], woran die nördlichen Feuchtgebiete mit ungefähr 20% beteiligt sind [BARTLETT und HARRISS 1993].

Permafrostmuster

Die Mächtigkeit der anaeroben Bodenzone mit potenzieller Methanbildung wird von der Auftautiefe, dem Wasserstand und damit auch vom Bodenrelief beeinflusst. In Gebieten mit Permafrostböden ist das Relief aufgrund von Kryoturbations-Prozessen häufig kleinräumig stark strukturiert. Durch die sich abwechselnden Auftau- und Gefrierzyklen und die mit ihnen verbundenen Erscheinungen der Eiskeilbildung und des Frosthubs, kann es zur Bildung von so genannten Frostmusterböden kommen. Eine vielfach auftretende Form dieser Frostmuster ist die Bildung von Polygonen. Die, am Untersuchungsstandort 'Samoylov' häufig vorkommenden, so genannten *Low-Center Polygone* sind in Abb. 2 dargestellt. Sie sind durch erhöhte, ringförmige Wälle entlang der Ränder der muldenförmig vertieften Polygonzentren charakterisiert. Dadurch können in den Zentren dieser Polygone die Schmelz- und Niederschlagswasser nicht abfließen. Deshalb sind zumindest die unteren Horizonte der im Zentrum befindlichen Bodenprofile durch Staunässe und daraus resultierende anaerobe Bedingungen gekennzeichnet. Der aerobe Bereich ist im Zentrum dieser Polygone häufig auf wenige Zentimeter beschränkt oder gar nicht vorhanden. Anders stellt sich die

Situation im Bodenprofil des Polygonwalls dar. Der Wall wird in Richtung des Polygonzentrums entwässert und ist daher ein trockenerer Standort, wodurch der *active layer* einen mächtigeren aeroben Bereich aufweist als die Auftauzone des Polygonzentrums.

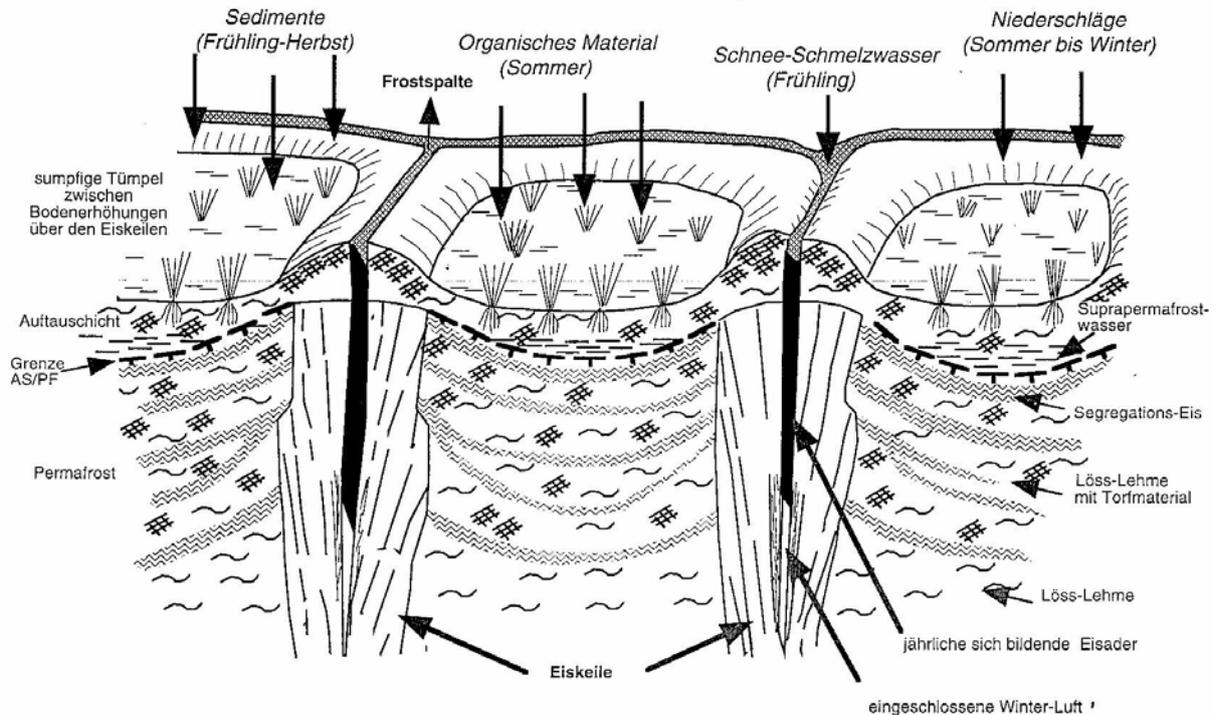


Abb. 2: Schematische Skizze eines Low-Center Polygons [SIEGERT nach einer Skizze von ROMANOVSKII unveröffentlicht]. Die Strukturierung des Permafrost-Oberflächen-Reliefs führt zur Ausprägung ökologisch differenzierter Habitate.

2.2 Kohlenstoffkreislauf im Boden

Der C-Kreislauf in der Biosphäre lässt sich in einen marinen und einen terrestrischen Teil gliedern. Die Böden als ein wichtiger Bestandteil des terrestrischen C-Kreislaufs können dabei sowohl als Quelle als auch als Senke für Kohlenstoff fungieren. Ein einfaches Modell des terrestrischen Kohlenstoffkreislaufs ist in Abb. 3 dargestellt.

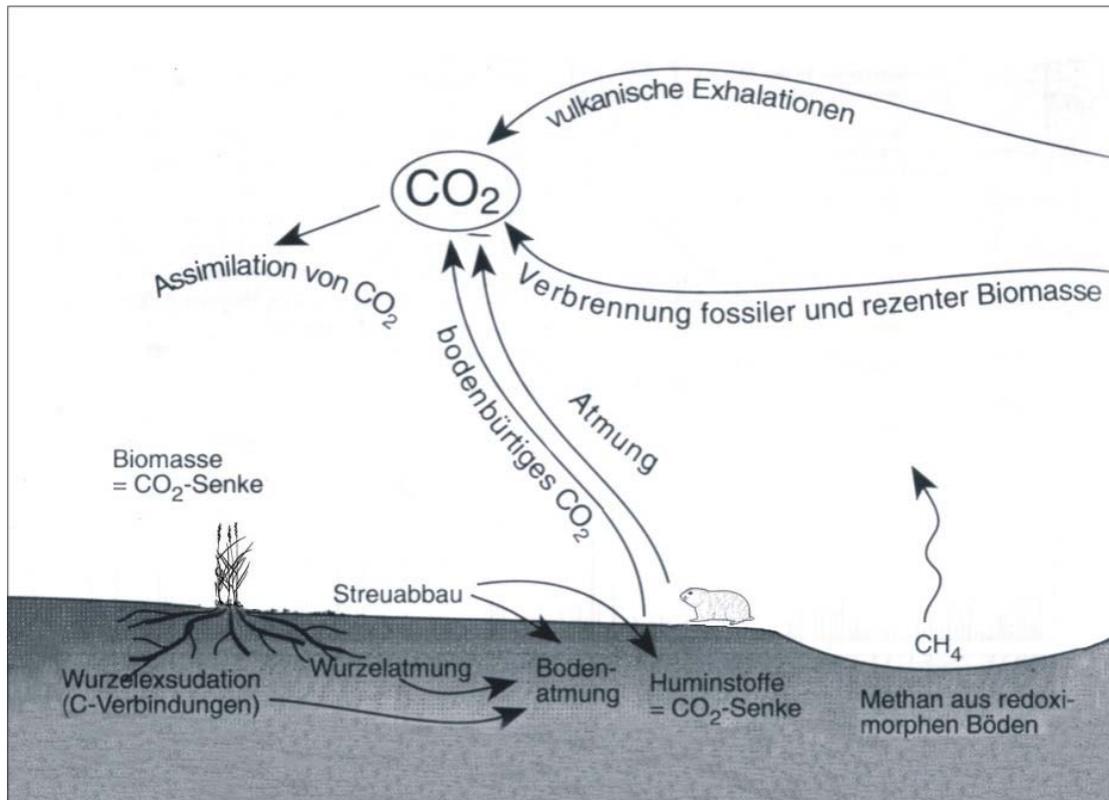


Abb. 3: Vereinfachtes Modell des terrestrischen Kohlenstoffkreislaufs. Während terrestrische Böden vorwiegend CO_2 emittieren, geben redoximorphe Böden hauptsächlich CH_4 ab [nach HINTERMAIER-ERHARD & ZECH 1997].

Das CO_2 der Atmosphäre wird von den photosynthetisch aktiven grünen Pflanzen assimiliert. Die dabei gebildeten Kohlenhydrate und ihre Folgeprodukte können zum einen von Mensch und Tier als Nahrung verwendet werden zum anderen als pflanzlicher Abfall direkt in den Boden gelangen. Der Boden dient dabei als temporärer C-Zwischenspeicher. Die Bodenorganismen, insbesondere die Bakterien, mineralisieren das abgestorbene Pflanzengewebe, wodurch der darin enthaltene Kohlenstoff zur Energiegewinnung oxidiert und wieder verfügbar wird. Unter aeroben Bedingungen entsteht bei dieser Mineralisation CO_2 als Endprodukt, welches dann zurück in die Atmosphäre gelangt. Ohne diesen Abbau würden schon nach kurzer Zeit die gesamten CO_2 -Vorräte der Luft erschöpft sein und alle Photosyntheseprozesse zum Erliegen kommen.

Neben der **Mineralisierung** erfolgt im Boden auch eine **Humifizierung** eines Teils der organischen Substanz. Dabei findet ein Umbau in der Molekülstruktur der organischen Ausgangsstoffe statt, wodurch die entstehenden Huminstoffe gegen einen weiteren mikrobiologischen Abbau stabilisiert sind und nur noch sehr langsam mineralisiert werden können. Durch die Humifizierung erfolgt also eine mittelfristige Festlegung von Kohlenstoff im Boden. Der Anteil der Huminstoffe im Boden steigt normalerweise von oben nach unten an. In geologischen Zeiträumen kann ein Teil des Kohlenstoffs in langfristige Senken gelangen, etwa durch Festlegung und Versenkung in anaeroben Milieus oder durch Umwandlung zu Kohle, Erdgas oder Erdöl.

Die verschiedenen, in den Boden gelangenden, organischen Substanzen sind unterschiedlich gut abbaubar. So können Zucker, Hemicellulosen und Cellulosen schneller abgebaut werden als zum Beispiel Lignin, dessen Abbau außerdem nur unter aeroben Bedingungen möglich ist. Generell ist der Abbau unter anaeroben Bedingungen langsamer und häufig unvollständiger als unter aeroben Bedingungen. Unter anaeroben Bedingungen wird beim Abbau der organischen Substanz zusätzlich CH_4 als Endprodukt gebildet, welches ebenso wie CO_2 als Treibhausgas wirkt.

2.2.1 Kohlenstoffumsatz unter anaeroben Bedingungen

Unter anaeroben Bedingungen verläuft die Umsetzung der organischen Stoffe über verschiedene mikrobielle Prozesse in deren Folge es zu einem stufenweisen Abbau der organischen Substanz kommt. Dabei werden die Produkte der Mikroorganismen einer Stufe von den Organismen der nächsten Stufe als Substrate verwendet. Als Endprodukt dieser anaeroben Nahrungskette wird CH_4 gebildet.

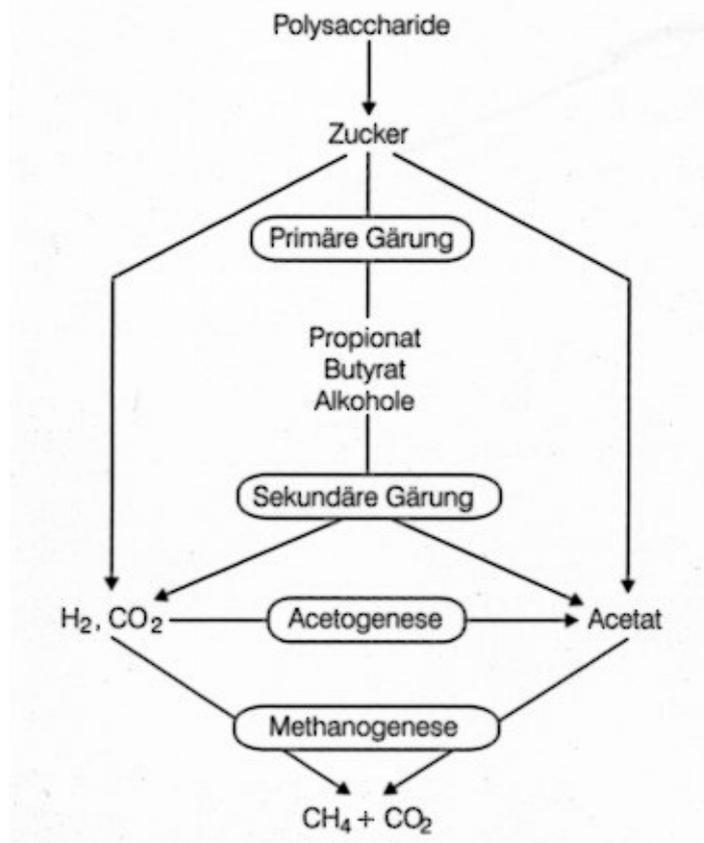
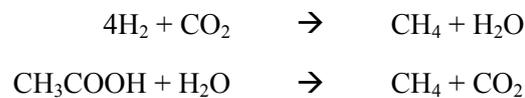


Abb. 4: Die methanogene anaerobe Nahrungskette. Am anaeroben Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden sind mehrere Bakteriengruppen mit vielen Vertretern beteiligt, die die Polymere schrittweise mineralisieren [aus FRITSCHKE 1998].

Wie aus Abb. 4 hervorgeht wird die anaerobe Nahrungskette durch verschiedene Gärungen eingeleitet. Die Endprodukte der ersten Gärungen sind Ausgangssubstrate für weitere gärende Organismen (sekundäre **Gärer**) sowie für die Acetogenese und Methanogenese. Zu den sekundären Gärern gehören Bakterienarten die Ethanol, Buttersäure und Propionsäure

zu CO₂, H₂ und Acetat vergären. Viele Gärer sind obligat anaerobe Bakterien, andere fakultative Anaerobier, die sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Sauerstoff zu wachsen vermögen. Nach den Gärungen sind zwei weitere Mikroorganismengruppen an der anaeroben Nahrungskette beteiligt, die **Acetogenen** und die **Methanogenen**.

Diese beiden Gruppen konkurrieren im Boden zum einen um das bei der sekundären Gärung gebildete CO₂ und H₂, zum anderen liefern die Acetogenen mit Acetat, als dem Endprodukt ihres Stoffwechsels, ein weiteres Ausgangssubstrat für die Methanogenen. Acetat ist also ein wesentliches Zwischenprodukt in der anaeroben Nahrungskette und entsteht in dieser bei drei verschiedenen Prozessen, den primären und sekundären Gärungen sowie der Acetogenese. Die Methanogenen als Endglieder der anaeroben Nahrungskette synthetisieren CH₄ als Endprodukt im Wesentlichen durch zwei Reaktionen:



Neben diesen beiden hauptsächlich genutzten Substraten Acetat und CO₂ + H₂ können nur noch einige weitere Substrate von den Methanogenen genutzt werden: Kohlenmonoxid (CO), Formiat (HCOO⁻), Methanol (CH₃OH) sowie verschiedenen Methylamine. Physiologisch sind alle methanbildenden Arten streng anaerobe Organismen. Die verschiedenen methanogenen Arten werden im phylogenetischen Stammbaum komplett den *Archaea* zugeordnet, während die gärenden und die acetogenen Mikroorganismen verschiedenen Gruppen der *Eubacteria* angehören.

2.3 Der phylogenetische Stammbaum

Es sind zwei Arten von Klassifikationen zu unterscheiden. Zum einen die 'traditionelle', künstliche Klassifikation, die die Organismen aufgrund ihrer physiologischen Ähnlichkeiten anordnet und die hauptsächlich dem Bestimmen von Organismen dient. Zum anderen die phylogenetische Klassifikation die darauf beruht Organismen aufgrund ihrer Verwandtschaftsverhältnisse zu gruppieren. Zu diesem Zweck werden die Nukleotidsequenzen der ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNS) verglichen. Die rRNS eignet sich als phylogenetischer Marker besonders gut, da rRNS in allen Zellen enthalten ist und einen hochkonservativen Zellbestandteil darstellt.

Durch einen Vergleich der rRNS eines weiten Spektrums an Organismen entdeckten WOESE und FOX in den 70er Jahren erstmals, dass sich die rRNS-Sequenzen einiger untersuchter methanbildender „Bakterien“ grundlegend von denen der anderen Prokaryoten unterschied [FOX 1980; WOESE & FOX 1977]. WOESE und FOX schlugen vor, die methanbildenden Organismen und ihre Verwandten als „Archaeobacteria“ zu bezeichnen, um sie von den „echten“ als „Eubacteria“ bezeichneten Bakterien zu trennen. Die genetischen Unterschiede zwischen diesen beiden Prokaryontengruppen sind so groß, dass WOESE, KANDLER und WHEELIS 1990 ein neues Konzept des phylogenetischen Stammbaums vorschlugen [WOESE

et al. 1990]. Die bis dahin zweiteilige Einteilung alles Lebens in Prokaryonten und Eukaryonten wurde durch ein dreiteiliges Konzept, bestehend aus *Eukarya*, *Archaea* und *Bacteria*, ersetzt (Abb. 5).

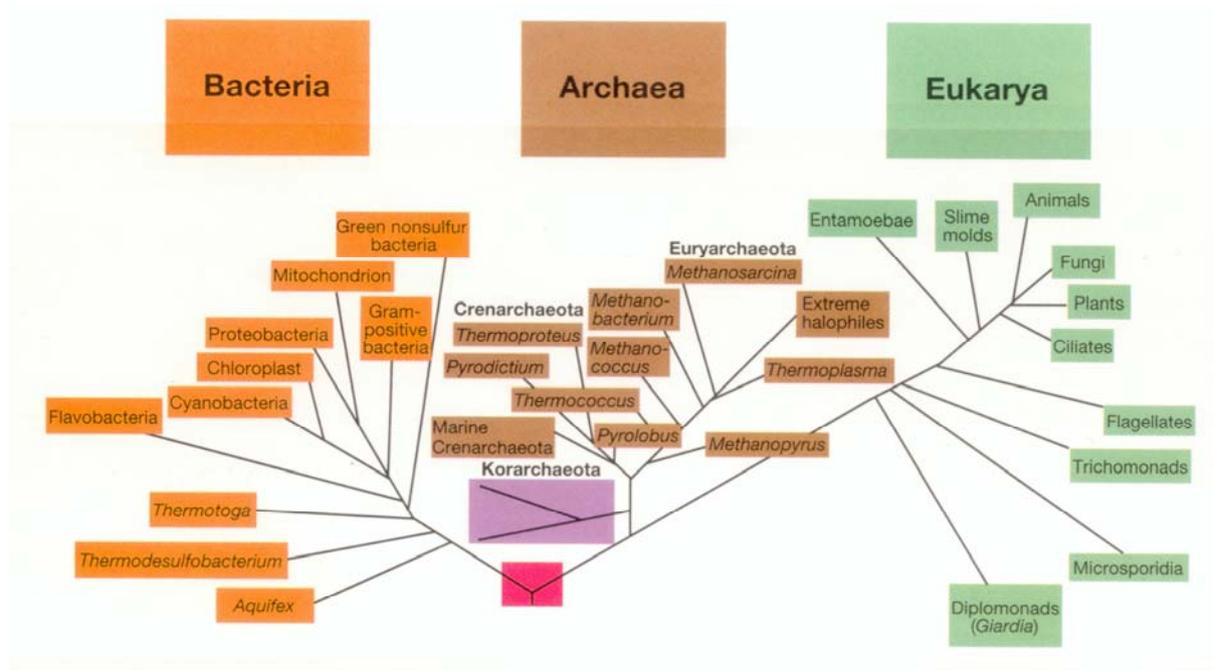


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der drei Reiche (Domänen) des Lebens, basierend auf vergleichender Sequenzanalyse der ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNS) [aus MADIGAN 2000].

Wie aus Abb. 5 ersichtlich wird, sind die großen Domänen jeweils in verschiedene phylogenetische Hauptgruppen unterteilt. Da diese Untergliederung nur auf phylogenetischen Merkmalen beruht, sind in den unterschiedlichen Gruppen häufig Arten mit sehr unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften (Gestalt, Stoffwechsel) vereint. Genauere Beschreibungen dieser unterschiedlich großen Gruppen innerhalb der *Archaea* und *Bacteria* können zum Beispiel BERGEY's *Manual of Systematic Bacteriology* [2001] entnommen werden.

2.4 Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften in Böden

Unter den vielen im Boden vorkommenden Lebewesen, stellen Bakterien mit 10^6 bis 10^9 Individuen pro Gramm trockenen Bodens zahlenmäßig die größte Organismengruppe dar [GISI 1997].

Tab. 1: Anzahl und Masse lebender Organismen im Boden [verändert nach GISI 1997].

	Anzahl lebender Organismen (g ⁻¹)	Biomasse (Trockengewicht) (g m ⁻²)
Bakterien	10 ⁶ -10 ⁹	150
Pilze	10 ⁴ -10 ⁷	350
Protozoen	10 ⁴ -10 ⁶	25
Fadenwürmer	10 ¹ -10 ³	6
Milben	1-10	2
Springschwänze	0,1-1	4
Schnecken	0,001-0,01	1
Asseln	0,001-0,01	1
Tausendfüßler	0,001-0,01	3
Regenwürmer	0,0001-0,01	56

Die große Diversität der Bodenmikroorganismen ist in zahlreichen Untersuchungen verschiedener Böden festgestellt worden [BLACKWOOD & PAUL 2003; ØVREÅS & TORSVIK 1998; LLOYD-JONES & LAU 1998; BORNEMANN et al. 1996,]. Die Bakterien erfüllen im Boden viele wichtige Funktionen, so wird der Stoffumsatz in Böden hauptsächlich von den in ihm lebenden Bakterien bewerkstelligt. Zwischen 90 und 98% der Primärproduktion wird von Bakterien verarbeitet [BLISS 1997]. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Population und die treibende Kraft, die die Struktur der komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Böden bestimmt ist bisher nur wenig bekannt [ZHOU et al. 2002]. Generell werden Anzahl, Diversität und Aktivität der Bodenorganismen von vielen Parametern beeinflusst. Wichtige steuernde Faktoren sind zum Beispiel Klima, Vegetation, Menge und Qualität der organischen Substanz, Bodentextur sowie Wasser- und Sauerstoffgehalt [Chen et al. 2003; GHOLZ et al. 2000; KILHAM 1994]. Dabei stellt der Boden als ein Gemisch aus mineralischer und organischer Substanz mit seinen verschiedenen kleinräumig sehr unterschiedlichen Strukturen aus Bodenaggregaten, Bodenporen und Rhizosphäre für die Mikroorganismen einen sehr heterogenen Lebensraum dar. Die meisten Böden weisen dabei eine vertikale Gliederung in verschiedene Bodenhorizonte auf, die sich in ihren chemischen und physikalischen Parametern unterscheiden. Verschiedene Studien, die sich mit der Zusammensetzung der mikrobiellen Population auch in tieferen Bodenschichten beschäftigt haben, konnten zeigen, dass die unteren Horizonte eine völlig anders zusammengesetzte Bakteriengemeinschaft enthalten als die oberflächennahen Horizonte [FIERER et al. 2003; BLUME et al. 2002; ZYVANGTSEV 1994]. Um die mikrobielle Population eines Bodens zu untersuchen, können verschiedene Methoden eingesetzt werden, von denen einige im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

2.5 Stand des Anwendungsbereichs moderner Methoden zur Analyse von mikrobiellen Lebensgemeinschaften

In diesem Kapitel sollen Vor- und Nachteile einiger Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Populationen dargestellt und die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Methoden kurz begründet werden.

Frühere Methoden zur Analyse mikrobieller Populationen basierten hauptsächlich auf der Kultivierung, Anreicherung und Isolierung von Organismen. Die dabei eingesetzten Medien können die wirklichen Bedingungen der Standorte der Organismen nur unzureichend gut widerspiegeln. Gegenwärtig konnte vermutlich nur 1% aller mikrobiellen Arten aus dem ursprünglichen Habitat isoliert und in Kultur gebracht werden [AMANN et al. 1995; TORSVIK et al. 1990]. Daher war es durch solche Methoden alleine nicht möglich ein wirkliches Abbild der am Standort vorhandenen Organismen zu erhalten. Dies änderte sich mit der Einführung molekularbiologischer Methoden. Sie können ohne eine vorherige Kultivierung der Organismen eingesetzt werden, wodurch auch nicht kultivierbare Organismen nachgewiesen werden können. Durch ihren Einsatz konnte gezeigt werden, dass in natürlichen Populationen eine weit größere Zahl an verschiedenen Nukleotidsequenzen auftreten als Mikroorganismen aus ihnen isoliert werden konnten. Bei den molekularbiologischen Methoden werden häufig Nukleotidsequenzen der rRNS eingesetzt. Die rRNS enthält Sequenzabschnitte unterschiedlichen Konservierungsgrades [WOESE 1987] und ist in allen Mikroorganismen vorhanden. In den letzten 15 Jahren wurden unterschiedliche molekularbiologische Methoden entwickelt und eingesetzt, um verschiedene mikrobiologische Lebensgemeinschaften zu untersuchen [DAIMS et al. 2001; HEAD et al. 1997 und Referenzen darin; AMANN et al. 1990].

Je nach Fragestellung können zur Charakterisierung unbekannter Populationen verschiedene Techniken angewendet werden. Für einen **raschen Einblick in die Diversität** einer Population werden häufig **DGGE** (Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese), **TGGE** (Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese) oder **T-RFLP** (Terminale Restriktionsfragment Längen Polymorphismus) eingesetzt. Diese Methoden liefern einen „genetischen Fingerabdruck“ der Population eines Habitats. Die **genauen, phylogenetischen Beziehungen** zwischen verschiedenen Mikroorganismen können über eine **vergleichende Sequenzanalyse** dieser Organismen hergestellt werden. Beide Ansätze ermöglichen dabei keine **Quantifizierung** der Populationen, diese ist durch eine Hybridisierung (**FISH**, „**Northern Blot**“) möglich. Die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes der 16S RNS-gestützten Methoden wurden in verschiedenen Übersichtsartikeln dargestellt [HEAD et al. 1998; O'DONNELL & GÖRRES 1999; MACRAE 2000]. Im Folgenden sollen einige Verfahren dieser molekularphylogenetischen Methoden kurz beschrieben werden.

2.5.1 DGGE, TGGE und T-RFLP

Die drei Techniken: DGGE, TGGE und T-RFLP ermöglichen einen raschen Einblick in die mikrobielle Diversität eines Ökosystems. Zunächst wird die DNA des zu untersuchenden Ökosystems möglichst vollständig extrahiert. Im nächsten Schritt, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), werden die 16S rRNS-Gene amplifiziert. Bei der DGGE und TGGE werden die so erhaltenen, gleich großen Produkte der PCR aufgrund ihres Schmelzverhaltens auf einem Gel aufgetrennt. Das Schmelzverhalten der Sequenzen hängt dabei von der Art der Basenpaare ab. Diese Auftrennung erfolgt bei der DGGE entlang eines denaturierenden Gradienten, bei der TGGE entlang eines Temperaturgradienten. Theoretisch stellt jede der so erhaltenen Banden ein einzelnes 16S rRNS-Gen dar. Das spezielle Bandenmuster das eine Population hervorruft, gibt dadurch einen Überblick über deren Diversität. Darüber hinaus können die erhaltenen Banden aus dem Gel ausgestochen, amplifiziert, sequenziert und schließlich phylogenetisch zugeordnet werden.

Dieser Ansatz zur Charakterisierung von mikrobiellen Populationen wurde 1993 von MUYZER et al. vorgestellt und seitdem unter anderem auch für die Analyse von Bodenproben genutzt [DILLY et al. 2004; SMALLA et al. 2001; SMIT et al. 1999].

Bei der erstmals 1997 von LIU et al. vorgestellten Methode der **T-RFLP** werden die PCR-Produkte mit einem Restriktionsenzym sequenzspezifisch an bestimmten Erkennungsstellen zerschnitten. Dabei entstehen verschieden lange Fragmente, die anhand ihrer Größe aufgetrennt werden können. Da jeweils nur das terminale Restriktionsfragment mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird, werden anschließend im Gel nur die jeweiligen terminalen Restriktionsfragmente der Sequenzen sichtbar. Die Diversität der Population wird folglich durch das Muster an verschiedenen langen terminalen Restriktionsfragmenten dargestellt.

Diese, auf der Amplifikation der rRNA-Gene beruhenden Methoden erlauben nur eine sehr eingeschränkt quantitative Aussage über das Vorkommen bestimmter phylogenetischer Gruppen [HEAD et al. 1998]. Da diese Methoden auf der Untersuchung der DNA beruhen, werden aktive und inaktive Mikroorganismen gleichermaßen detektiert. Für eine ökologische Fragestellung, wie sie dieser Arbeit zugrunde liegt, kann es jedoch sinnvoller sein, nicht den gesamten Genpool eines Habitats darzustellen sondern nur die aktiven Mikroorganismen zu erfassen. Dafür sind Methoden die auf der Erkennung der RNA beruhen besser geeignet, da der Gehalt der ribosomalen RNA einer Zelle von ihrem physiologischen Zustand beeinflusst wird [AMANN et al. 1995; POULSEN et al. 1993; KEMP et al. 1993; DELONG et al. 1989]. Eine der Methoden die auf der Markierung von RNA basiert, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

2.5.2 FISH

Die FISH-Methode beruht auf der Bindung von 16S rRNS-Gensonden an ribosomale RNS. Gensonden sind einzelsträngige Nukleotidsequenzen mit spezifischer Basensequenz, die

mit komplementären DNS- oder RNS-Sequenzen hybridisieren können. Diese Fragmente sind mit einem Marker, zum Beispiel einem Fluoreszenz-Farbstoff gekennzeichnet. Der Ablauf der FISH-Methode ist in Abb. 6 schematisch dargestellt und soll hier kurz erläutert werden.

Der erste Schritt ist die Permeabilisierung der Zellwände für die Sonde, wobei die Struktur der Zelle möglichst erhalten bleiben soll. Dies geschieht in der Regel mit einem Fixativ auf Aldehyd- oder Alkoholbasis. Anschließend werden die Sonden mit einem geeigneten Hybridisierungspuffer den Proben zugegeben und bei einer spezifischen Temperatur hybridisiert. Sind verschiedene Bakterienarten in einer Probe vorhanden, findet die Gensonde ihre 16S rRNS Zielsequenz und bindet nur an diese. Nach der Hybridisierung folgen mehrere „Wasch-Schritte“, um ungebundene Sonden von der Probe zu entfernen. Anschließend kann die Probe unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop analysiert werden. Dank des Fluoreszenzfarbstoffes, den die Gensonde trägt, leuchten nur die mit der Gensonde markierten Zellen unter Fluoreszenzlicht im Untersuchungsobjekt auf und die gesuchten Bakterien werden sichtbar. Es können mehrere Sonden, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind zur gleichen Zeit in der gleichen Probe benutzt werden.

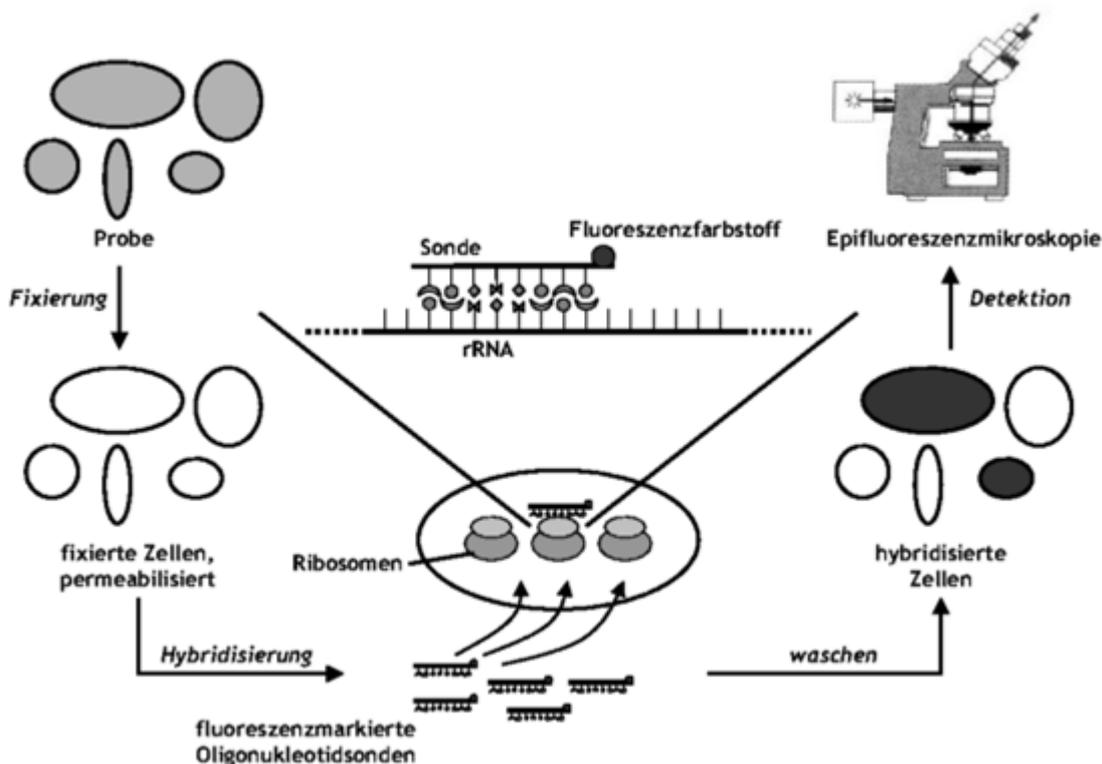


Abb. 6: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung [aus AMANN 2002].

Da bei der FISH-Methode vor der Anfärbung keine Amplifikation der DNS erfolgt, eignet sie sich besser als die schon erwähnten Methoden DGGE, TGGE und T-RFLP für eine Quantifizierung der phylogenetischen Gruppen. Dadurch, dass der Nachweis direkt in der Umweltprobe stattfinden kann, eignet sich die Methode auch dafür die räumliche Vertei-

lung der Bakterien im System zu ermitteln. In den letzten Jahren wurde die FISH-Methode zur Analyse der Bakterienpopulation verschiedenster Habitate wie Wasser [JURGENS et al. 2000; PERNTHALER et al. 1998; GLÖCKNER et al. 1998], Belebtschlamm [SNAIDR et al. 1997; KÄMPFER et al. 1996], Sediment [RAVENSCHLAG et al. 2001; ZEPP FALZ et al. 1999; LLOBET-BROSSA et al. 1998] oder Boden [DEDYSH et al. 2003; ZARDA et al. 1997; HAHN et al. 1992] eingesetzt. Der Einsatz von FISH direkt in der Bodenmatrix bringt einige Schwierigkeiten mit sich, da die mineralischen und organischen Bestandteile des Bodens häufig eine Autofluoreszenz aufweisen, die das Erkennen der Bakteriensignale erschwert. Die Vor- und Nachteile des Einsatzes der FISH-Methode in der mikrobiologischen Ökologie wurden mittlerweile in mehreren Artikeln zusammenfassend dargestellt [u.a. BOUVIER & GIORGIO 2003; MOTER & GÖBEL 2000; AMANN & LUDWIG 2000]. Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten beim Einsatz von FISH direkt in Umweltproben, wurde in dieser Arbeit diese Methode eingesetzt, da sie die schon erwähnten Vorteile der Quantifizierung und des Entdeckens der räumlichen Anordnung der Organismen bietet.

Zusammenfassend: Die molekularbiologischen Methoden leisten eine Beschreibung der **phylogenetischen** Vielfalt einer Population. Durch ihren Einsatz erhält man jedoch keine Informationen über die **physiologischen** Merkmale der Organismen. Häufig werden daher molekularbiologische Methoden mit Methoden der klassischen Mikrobiologie kombiniert. In dieser Arbeit wurden, um zusätzlich zur Information über die phylogenetische Diversität einer Population auch einen Einblick in ihre funktionelle Diversität zu erhalten, noch kommerziell erhältliche **BIOLOG Bakterien-Identifikations-Mikrotiterplatten** herangezogen.

2.5.3 BIOLOG Mikrotiterplatten als Methode zur Charakterisierung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft

Die ersten BIOLOG Mikrotiterplatten, die 1989 auf den Markt kamen, wurden ursprünglich zur Identifizierung und Charakterisierung von Isolaten entwickelt. Die 96 Vertiefungen der BIOLOG Mikrotiterplatten enthalten jeweils ein einzelnes Kohlenstoff-Substrat sowie den Redoxfarbstoff Tetrazoliumchlorid. Wenn das Substrat einer Vertiefung umgesetzt werden kann, fungiert Tetrazoliumchlorid als Elektronenakzeptor und zeigt dadurch, dass es im reduzierten Zustand eine violette Färbung annimmt, direkt die oxidative Verwertung des Substrats an [BOCHNER 1989, zitiert in RIDDECH 2002].

Zusätzlich zu der Identifizierung von Reinkulturen, können die BIOLOG-Platten auch genutzt werden, um die funktionellen Möglichkeiten einer gesamten Bakteriengesellschaft zu ermitteln. Mit Hilfe der BIOLOG-Platten kann quasi das **physiologische Profil einer Bakteriengemeinschaft** dargestellt werden. GARLAND & MILLS [1991] waren die ersten, die die BIOLOG-Platten in dieser Weise nutzten und mit ihrer Hilfe Unterschiede zwischen den Populationen verschiedener Habitate nachweisen konnten. Der Ablauf so einer Untersuchung ist in der Abb. 7 schematisch dargestellt.

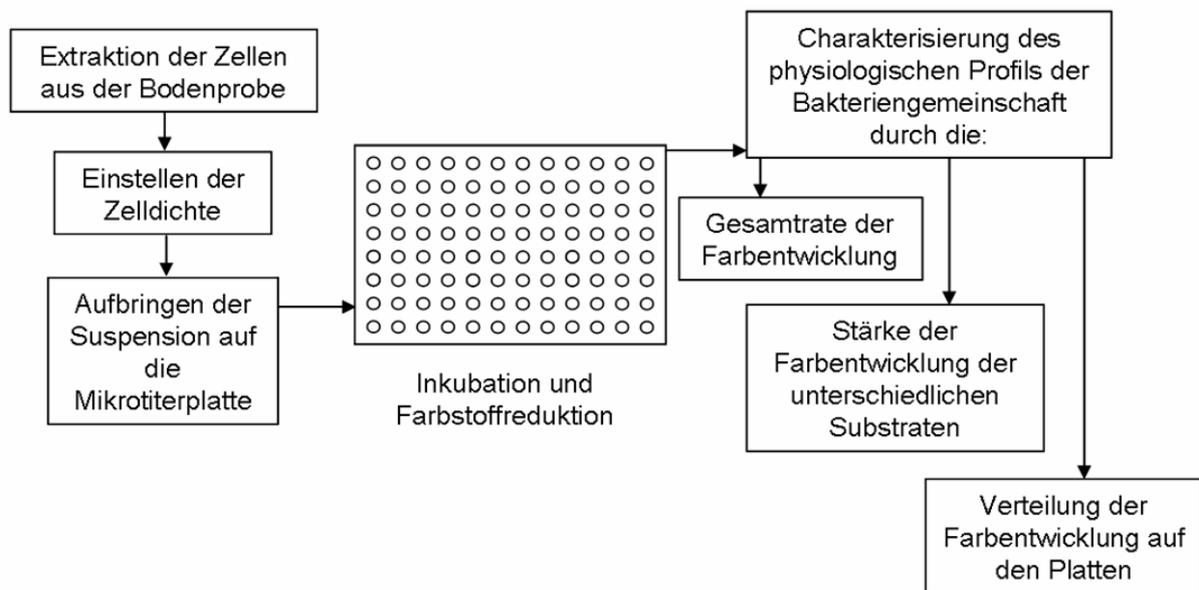


Abb. 7: Schematische Darstellung der Untersuchung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft mit Hilfe von BIOLOG Mikrotiterplatten.

Der Ablauf der Untersuchung gliedert sich in folgende Schritte:

- 1.) **Animpfen der Mikrotiterplatte:** Während Wasserproben direkt auf die Platten gegeben werden können, müssen die Zellen aus Boden- oder Sedimentproben zuvor extrahiert werden, da sonst durch die Bodensubstanz und die in ihr enthaltenen organischen Substanzen auch Kohlenstoffsubstrate auf die Mikrotiterplatte gelangen würden. Nach der Extraktion sollte die Zelldichte mit der die Platten angeimpft werden möglichst für alle Proben auf die gleiche Größe eingestellt werden. Eine erste Farbentwicklung ist nach KONOPKA et al. [1997] erst zu erwarten wenn eine Zelldichte von 10^8 ml^{-1} erreicht ist. Nach VERSCHUERE et al. [1997] hängt die hierfür benötigte Zellzahl von der Art der angeimpften Zellen ab. Auf jeden Fall ist es sinnvoll mit einer möglichst großen Zelldichte anzupflegen, um die Beeinflussung des Ergebnisses durch selektives Wachstum auf den Mikrotiterplatten möglichst gering zu halten. Außerdem können durch eine zu große Verdünnung bei der Untersuchung gemischter Bakteriengemeinschaften mit der BIOLOG-Methode 'funktionelle' Verluste auftreten [PRESTON-MAFHAM et al. 2002].
- 2.) **Inkubation:** Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgt normalerweise bei 30°C , wobei die Farbentwicklung in den verschiedenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte in regelmäßigen Abständen photometrisch bestimmt wird. In Abb. 8 ist der typische Farbverlauf in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten dargestellt.

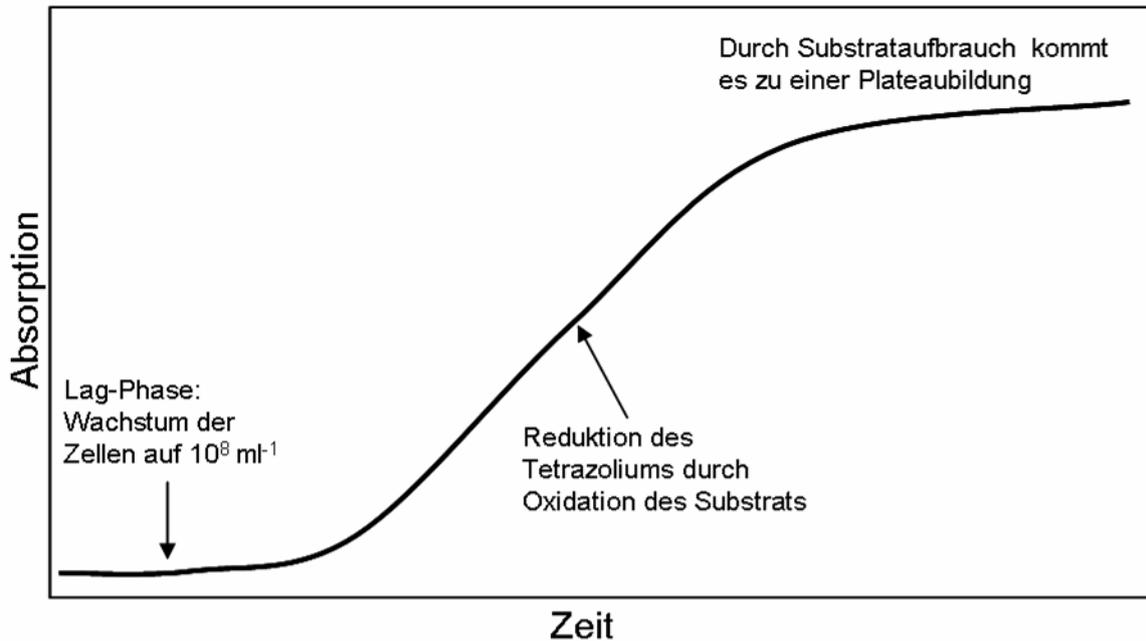


Abb. 8: Darstellung des sigmoidalen Farbverlaufs in den einzelnen Vertiefungen der BIOLOG Mikrotiterplatte (nach: KONOPKA et al. 1998).

- 3.) **Auswertung:** Für den Vergleich zwischen den verschiedenen Platten werden a) die Gesamtraten der Farbentwicklung, b) die Farbentwicklung bei den unterschiedlichen Substraten und c) die Verteilung der Farbentwicklung auf den Platten miteinander verglichen. Dabei gibt es die Möglichkeiten entweder die Platten zu bestimmten Zeitpunkten miteinander zu vergleichen [WESTERGAARD et al. 2001; GLIMM et al. 1997] oder aber die gesamte Kinetik des Farbverlaufs zu vergleichen [HACKETT & GRIFFITHS 1997; LINDSTROM 1997]. Um die Unterschiede der zu vergleichenden Proben festzustellen, werden verschiedene Methoden der multivariaten Statistik genutzt. Am häufigsten wird hierbei die Hauptkomponentenanalyse eingesetzt [PRESTON-MAFHAM 2002]. Mit ihrer Hilfe können nicht nur die relativen Unterschiede zwischen den Proben erfasst, sondern zusätzlich die Substrate gefunden werden, die für die größten Unterschiede zwischen den Proben sorgen.

Seit der Vorstellung der Methode durch GARLAND & MILLS [1991] wurde diese in zahlreichen Untersuchungen zur Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in unterschiedlichsten Habitaten wie Wasser [CHOI 1999], Belebtschlamm [VAN HEERDEN 2002], Kompost und Böden [DAWSON 2004; TAM 2001, WIDMER 2001; LAWLOR 2000] eingesetzt. Trotz der vielfältigen Anwendung, die diese Methode gefunden hat, ist sie in Anwendung und Auswertung nicht unproblematisch. Zusammenfassend und ausführlich wurden die Probleme der Methode von PRESTON-MAFHAM et al. [2002] und GARLAND [1997] dargestellt.

In dieser Arbeit soll die BIOLOG-Methode, zusätzlich zur Charakterisierung der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft mit Hilfe der FISH-Methode, Informationen über das physiologische Spektrum der unterschiedlichen Populationen liefern.

2.6 Das Untersuchungsgebiet im sibirischen Permafrost

Das Untersuchungsgebiet liegt auf der Insel Samoylov ($72^{\circ}22' N$, $126^{\circ}28' O$) im zentralen Gebiet des Lena-Deltas. Hier mündet die Lena in die Laptev-See, welche einen Teil des arktischen Ozeans bildet.

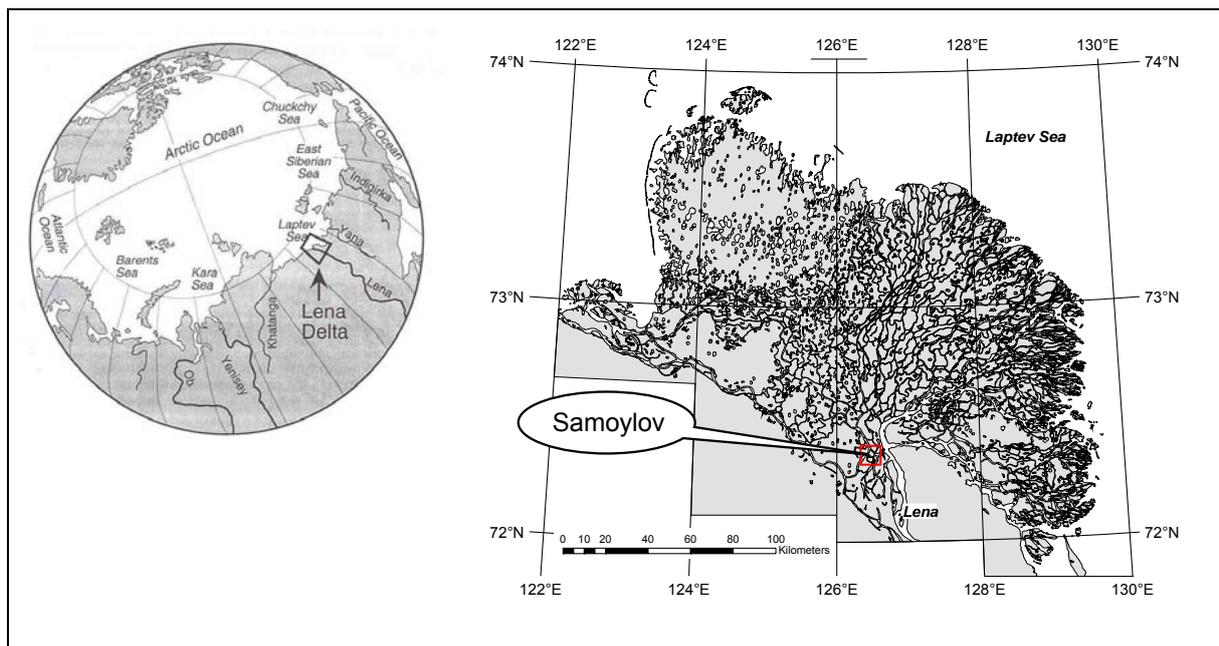


Abb. 9: Lage des Lenadeltas und die Lage der Insel Samoylov im Lena-Delta.

2.6.1 Das Lenadelta

Mit einer Fläche von $28\,000\text{ km}^2$ [REINECK & SINGH 1980] ist das Lena-Delta das größte Delta der Arktis. Ein Teil des Deltas gehört zum 'Lena Delta Wildlife Reserve', einem der größten Schutzgebiete weltweit. Aus Abb. 9 werden die geografische Lage des Lena-Deltas und die Lage der Insel Samoylov im Delta ersichtlich.

Die Lena selbst entspringt in der Nähe des Baikalsees und erstreckt sich über eine Länge von 4270 km bevor sie nördlich des 72sten Breitengrades in die Laptev-See mündet. Im Laufe eines Jahres transportiert die Lena mehr als 500 km^3 Wasser über das Delta ins Meer. Aus den Flusseinzugsgebieten werden dabei 21×10^6 Tonnen Sediment mitgeführt [RACHHOLD 1999]. Diese Sedimente sind es, die das Delta bildeten und auch heute noch umformen. Das ausgedehnte Delta besteht aus einem Netzwerk größerer und kleinerer Flüsse sowie aus Seen und ungefähr 1500 Inseln.

SCHWAMMBORN et al. [1999] beschreiben für das Lena-Delta die Existenz von drei unterschiedlich alten Flussterrassen. An einigen Stellen ist die älteste, im frühen und mittleren

Pleistozän aufgeschüttete, Terrasse noch vorhanden. Die zweite Terrasse wurde wohl im späten Pleistozän bis jungem Holozän aufgeschüttet und bildet heute den westlichen Teil des Lena-Deltas. Rezent beeinflusst durch die Lena ist der östliche Teil des Deltas. Hier befindet sich die jüngste Flussterrasse, die mittel-holozänen Ursprungs ist. Außerdem liegen hier in unterschiedlichen Geländehöhen die rezenten Überflutungsgebiete. Das gesamte Delta liegt in der Zone des kontinuierlichen Permafrostes, der hier eine Mächtigkeit von 500 bis 600 Meter erreicht. Die Tundralandschaft des Deltas ist durch das Frostmuster der Eiskeilpolygone, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden, geprägt.

2.6.2 Klima

Das Klima des Lena-Deltas ist durch niedrige Temperaturen und geringe Niederschläge gekennzeichnet und stark durch die angrenzende Laptev-See beeinflusst. Die in der Laptev-See bereits Ende September einsetzende Eisbedeckung verhindert einen Austausch mit wärmeren Luftmassen über dem Meer. Die Lena selbst beginnt im November zu gefrieren und bleibt bis Anfang Juni eisbedeckt. Für den langen Winter liegen die mittleren Lufttemperaturen für die Monate September bis Mai unterhalb der Nullgradgrenze, wobei Januar und Februar, mit minimalen Lufttemperaturen zwischen -30°C und -35°C die kältesten Monate sind. Die wärmsten Monate sind Juli und August, mit einer durchschnittlichen Lufttemperatur von 7°C . Insgesamt betrug die durchschnittliche jährliche Temperatur im Untersuchungsgebiet im Zeitraum 2001-2003 $-11,9^{\circ}\text{C}$. Diese Werte wurden vom HYDROMETEOROLOGICAL CENTRE OF RUSSIA auf einer ungefähr 8 Kilometer entfernt vom Untersuchungsgebiet Samoylov gelegenen meteorologischen Station ermittelt.

2.6.3 Die Insel Samoylov

Das engere Untersuchungsgebiet (Abb. 9), die Insel Samoylov ($72^{\circ} 22' \text{ N}$, $126^{\circ} 28' \text{ O}$), liegt im jüngsten, heute noch aktiven, Teil des Lena-Deltas. Sie hat eine Fläche von 1200 ha. Ihre maximale Geländehöhe beträgt etwa 12 m über dem Meeresspiegel. Nach AKHMADEEVA et al. [1999] existieren verschiedene Überflutungsebenen die unterschiedlich häufig überflutet werden. Der gesamte sedimentäre Aufbau der Insel wird von geschichteten Lagen fluviatilen und äolischen Ursprungs dominiert. Während im Westteil der Insel rezente Sedimentation stattfindet, erfolgt an dem steilen Kliff der Ostküste Erosion des hier vorhandenen Materials, der erwähnten mittelholozänen Flussterrasse. Diese Flussterrasse bildet ungefähr 70 % der Gesamtfläche der Insel. Sie besteht aus schluffig-sandigen Sedimenten mit Lagen aus kaum zersetzter organischer Substanz [KUTZBACH 2000]. Das in dieser Arbeit untersuchte Bodenprofil im östlichen Teil der Insel liegt im Gebiet der mittelholozänen Flussterrasse. Insgesamt sind die Böden der Insel durch Humusakkumulation und Kryoturbation geprägt [BECKER et al. 1999]. Ihre Oberfläche ist durch die Ausbildung verschiedenerer Polygonformen charakterisiert. Diese bilden sich aufgrund der sich jährlich wiederholenden Gefrier- und Auftauzyklen. Die Böden sind mindestens 8 Monate lang

komplett gefroren und nur die flache (20-60 cm) saisonale Auftauschicht taut während der Sommermonate auf.

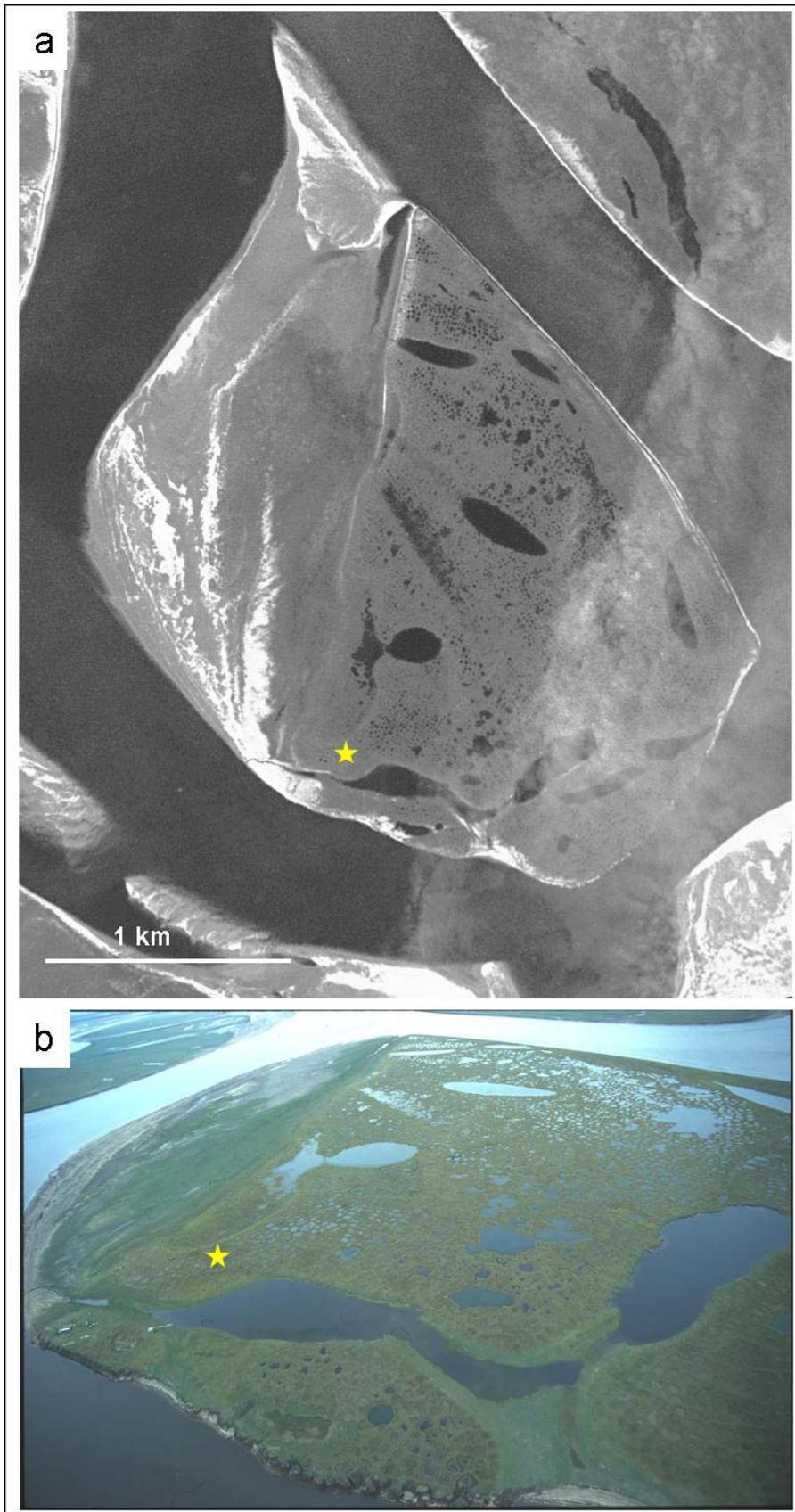


Abb. 10:

a) CORONA- Satellitenbild (18.07.1964) der Insel Samoylov [Referenziert von SPOTT 2003]

b) Luftbild (6/2002) der Insel. ★ = Standort des untersuchten Bodenprofils.

2.6.4 Kenntnisstand über Böden und Methanflüsse im Untersuchungsgebiet

Im Rahmen der russisch-deutschen Kooperation SYSTEM LAPTEV SEA 2000 wurden seit 1998 verschiedene multidisziplinäre Untersuchungen auf der Insel Samoylov und in ihrer Umgebung durchgeführt. Im Folgenden sollen einige Ergebnisse der Untersuchungen zu den Böden und den Methanflüssen des Gebietes, die der Fragestellung dieser Arbeit zugrunde liegen, kurz zusammengefasst werden.

Böden

Eine von KUTZBACH und PFEIFFER [2004] durchgeführte bodenkundliche Kartierung der Insel weist nach der Klassifizierung der *Soil Taxonomy* zehn verschiedene Bodentypen für die Insel Samoylov aus. Auf der erstellten Bodenkarte (Abb. 11) ist erkennbar, dass sich die Insel anhand der Bodentypen in acht verschiedene Bereiche untergliedern lässt. Die große Fläche der mittel-holozänen Flussterrasse im Osten der Insel wird jedoch nahezu einheitlich von der Bodengesellschaft *Typic Historthel/Glacic Aquiturbel* eingenommen. Die Oberfläche dieser Terrasse ist durch ein Mikrorelief von *Low-Center* Polygonen gekennzeichnet. Der *Typic Historthel*, der in den vertieften Polygonzentren zu finden ist, ist durch einen Wasserstand nahe der Geländeoberfläche und die anaerobe Akkumulation organischer Substanz gekennzeichnet. Der Boden des höher gelegenen Walls wurde als *Glacic Aquiturbel* klassifiziert. Dieser ist durch einen niedrigeren Wasserstand, eine geringere Akkumulation von organischer Substanz und vor allem stärkere Kryoturbationsmerkmale gekennzeichnet.

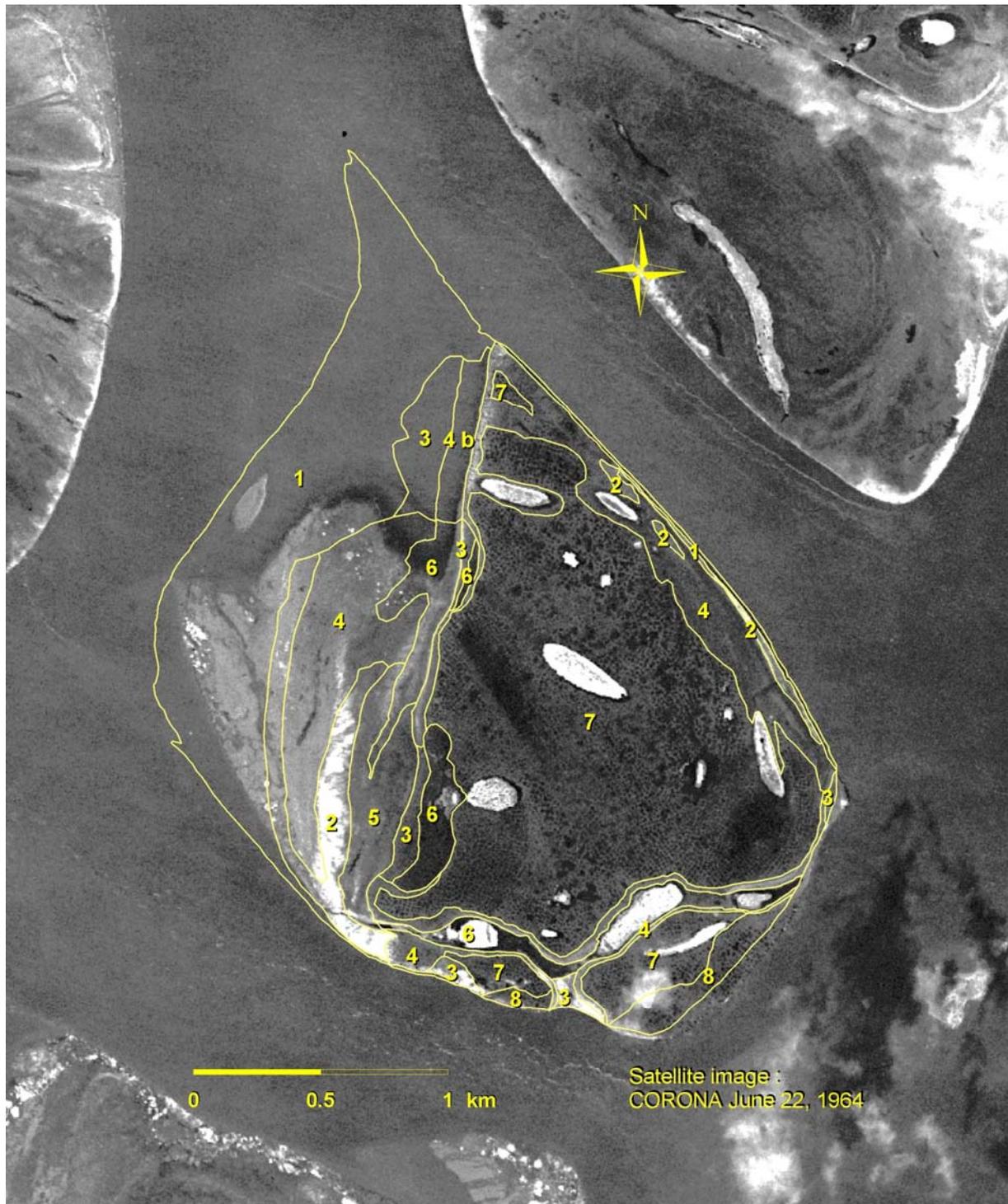


Abb. 11: Bodenkarte der Insel Samoylov. Die Zahlen repräsentieren die auf der Insel kartierten Bodeneinheiten nach Soil Taxonomy: 1=Strand, 2=Typic Psammorthel, 3=Psammentic Aquorthel, 4=Typic Aquorthel, 4b=Silty Typic Aquorthel, 5=Ruptic-Histic Aquorthel, 6=Fluvaquentic Fibristel, 7=Complex Typic Historthel/Glacic Aquiturbel, 8=Complex Typic Aquorthel/Typic Aquiturbel [nach: KUTZBACH & PFEIFFER 2004].

Aufgrund der flächenmäßigen Dominanz dieser Landschaftseinheit wurde die mittelholo-zäne Flussterrasse als Standort für diverse weitere bodenkundliche und mikrobiologische Untersuchungen ausgewählt. Die mit diesen Böden vergesellschaftete Vegetation wurde ausführlich von KUTZBACH [2000; 2004] beschrieben. Sowohl Zentrum als auch Wall weisen eine zweischichtige Vegetationsdecke auf, die aus einer etwa 5 cm mächtigen Lage aus

Moosen und Flechten sowie einer 20 bis 30 cm hohen Gefäßpflanzenlage besteht. Zwar ist die dominierende Pflanze an beiden Standorten die Segge *Carex aquatilis*, jedoch gibt es zwischen Wall und Zentrum, was die Zusammensetzung der anderen Pflanzen betrifft große Unterschiede. So besteht die Vegetation des Zentrums nur aus hydrophytischen Pflanzen, während auf dem Polygonwall hauptsächlich mesophytische Pflanzen vorkommen [KUTZBACH 2004].

Um bodenklimatische Informationen über diesen Standort zu erhalten, wurde 1998 eine Boden- und Klimastation eingerichtet [FRIEDRICH 2001; FRIEDRICH & BOIKE 1999]. Hier wurden in mehreren Tiefen Temperatursensoren, Feuchtigkeitssonden und Wärmeflussplatten eingebaut. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im Kapitel 3 dargestellt. In der Nähe dieser Bodenstation wurden 1999 von SCHULZ auch erste Untersuchungen zur Anzahl und Größe der Bakterien in diesen Böden durchgeführt. Diese ergaben für den Wall und für das Zentrum ähnliche Zellzahlen von knapp 10^8 g^{-1} trockenen Bodens. Sowohl im Wall als auch im Zentrum wurden die meisten und größten Bakterien im obersten Horizont gefunden. Insgesamt wurden in beiden Böden vor allem sehr kleine Bakterien gefunden. Bakterien bis $1 \mu\text{m}$ Länge bzw. Durchmesser machten nahezu 90% der Gesamtpopulation aus. Wie diese Bakteriengemeinschaft zusammengesetzt ist, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Dass es in den Böden methanogene Archaea geben muss, wurde jedoch auch schon 1998 im Zuge der ersten Messungen zu den Spurengasflüssen deutlich.

Methanflüsse

Messungen der Methanemissionen aus den Böden auf Samoylov werden seit 1998 durchgeführt [BECKER et al. 1999; WAGNER et al. 2000; WAGNER et al. 2001; PFEIFFER et al 2002; GANZERT et al. 2004]. Hierfür wurde ein der Bodenstation benachbartes Dauermessfeld eingerichtet (**Abb. 12c**), auf welchem die Emissionen aus Polygonzentrum und –wall mit dem Prinzip der geschlossenen Messkammer gemessen werden können.

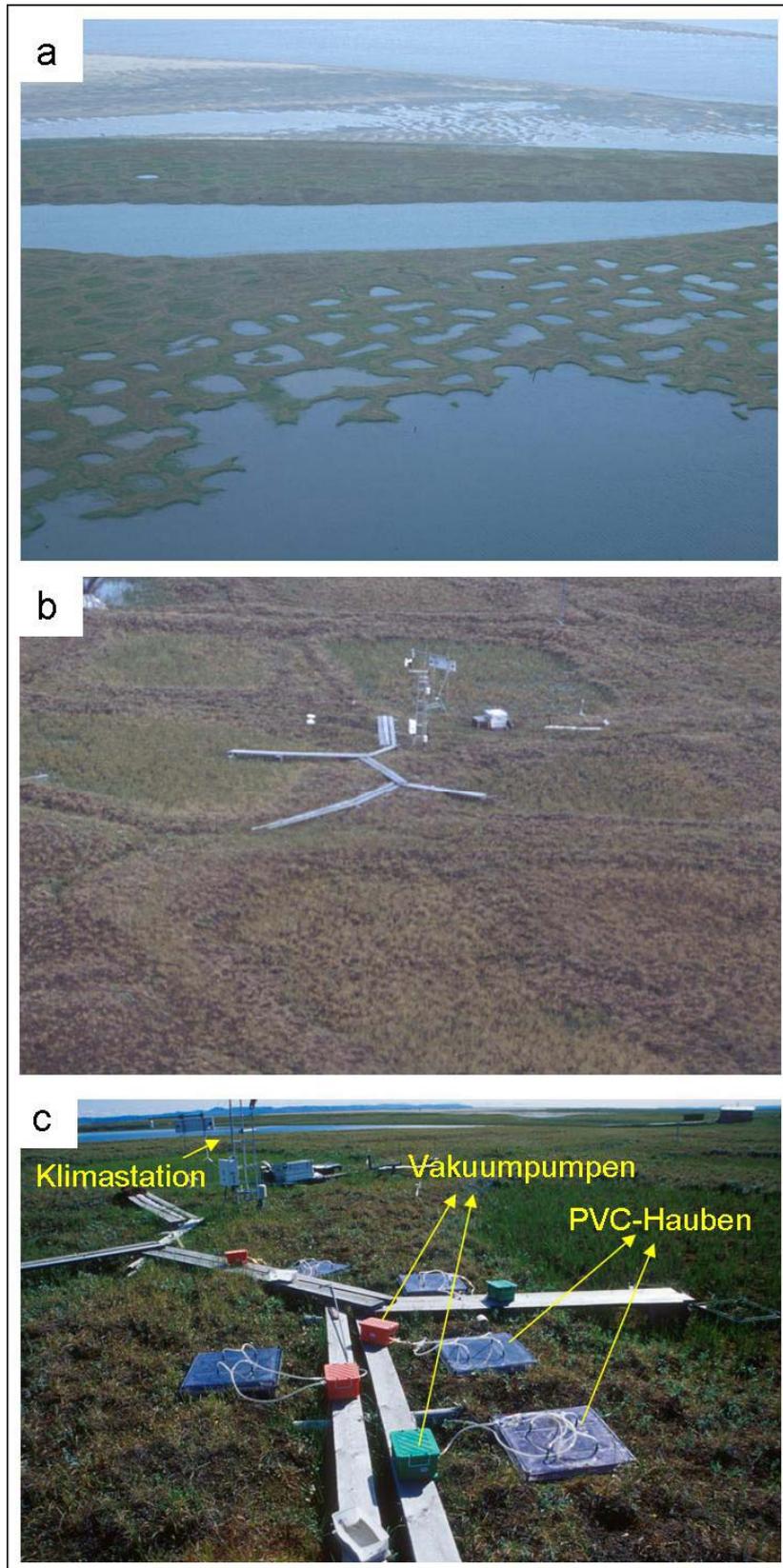


Abb. 12:

a) Luftbild (2002) der polygonalen Tundra-landschaft auf Samoylov. Zu erkennen sind Low-Center Polygone in verschiedenen Entwicklungsstadien.

b) Luftbild der Klima- Boden- und Methanemissions-messstation.

c) Messung der Methanemission aus dem Polygonwall.

Aus den in verschiedenen Jahren erhobenen Methanemissionsmessungen ergaben sich große Unterschiede zwischen der Methanemission aus Zentrum und Wall. Aus dem Zentrum wurden grundsätzlich wesentlich größere Mengen emittiert als aus dem Wall. Für das Jahr

1999 konnte für die Zeit zwischen Ende Mai und Anfang September eine durchschnittliche Methanemission von $53,2 \pm 8,7 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ermittelt werden. Dagegen wurde für den Polygonwall nur eine Emission von maximal $10 \text{ mg d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ bestimmt [WAGNER et al. 2003].

Da die Methanemission das Ergebnis der im Boden ablaufenden mikrobiologischen Prozesse der Methanbildung und -oxidation ist, wurden auch Untersuchungen dieser beiden Parameter durchgeführt. Frühere Untersuchungen zur Methanbildungsaktivität im Polygonzentrum [KOBABE, 2001] konnten zeigen, dass die Methanbildungsrate ohne Zugabe von Substrat im obersten Horizont am höchsten war (Abb. 13). Dies lässt sich durch den in diesem Horizont höchsten Gehalt an organischem Kohlenstoff und der damit besten Substratgrundlage erklären. Nach Zugabe von Glucose, einem Substrat welches erst durch andere Organismen umgewandelt werden muss, bevor die Endprodukte dieses Umbaus von den methanogenen *Archaea* genutzt werden können, nahm die Methanbildung im obersten Horizont deutlicher zu als in den tieferen Horizonten. Dies wurde als ein Hinweis auf hier zahlenmäßig stärker vertretene oder zumindest aktivere Zellen der benötigten Begleitflora interpretiert. Das unterschiedliche Temperaturoptimum der Methanbildungsrate in den verschiedenen Horizonten, wurde als ein Hinweis darauf gewertet, dass in den verschiedenen Horizonten unterschiedliche Arten für die Methanbildung verantwortlich sind. Diese beiden Thesen sollten in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

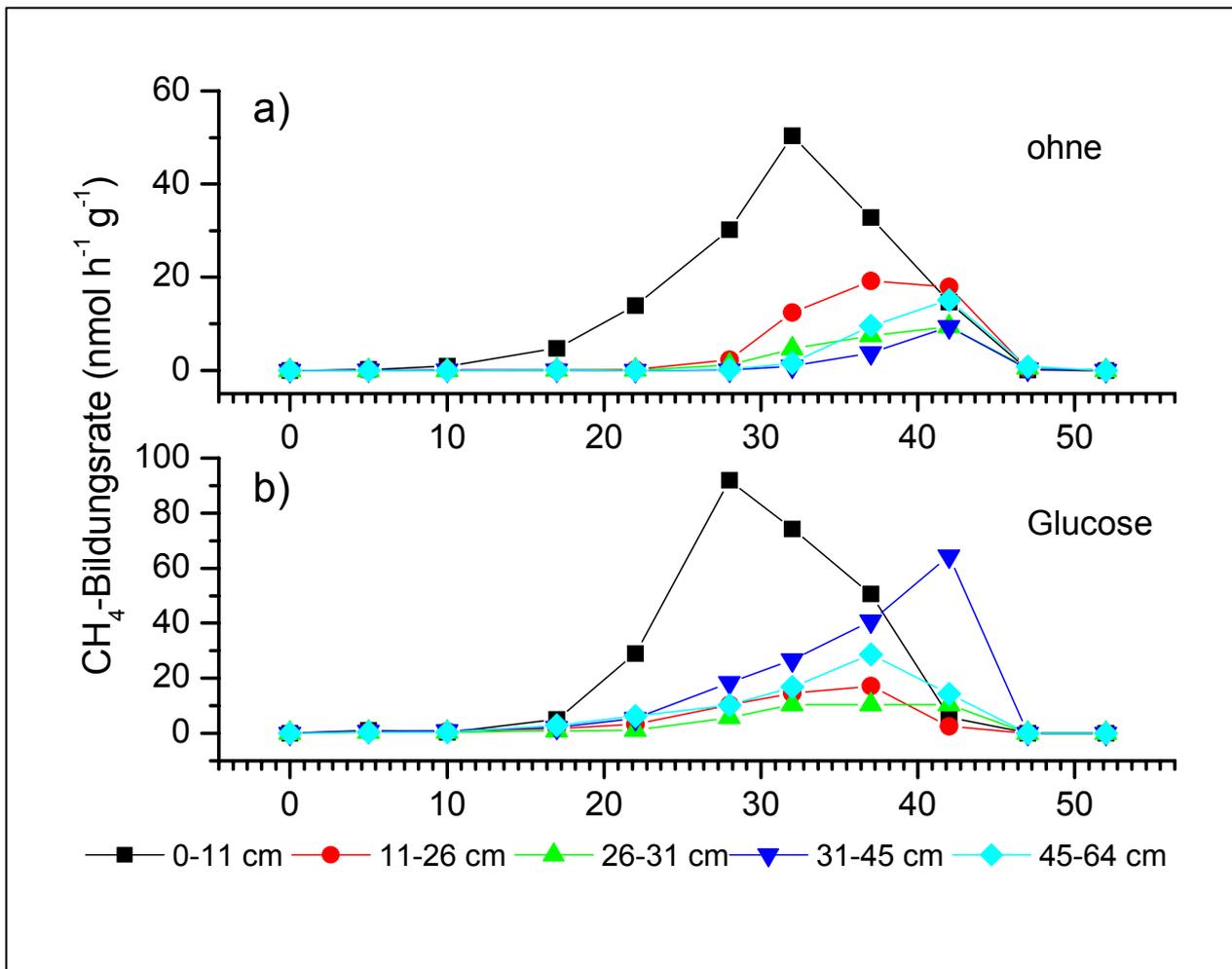


Abb. 13: Methanbildungsaktivitäten in unterschiedlichen Tiefen eines Low-center Polygons in Abhängigkeit von der Temperatur. a) ohne zusätzliches Substrat, b) nach Zugabe von Glucose (20 mM).

3 Material und Methoden

3.1 Feldarbeiten und Probennahme

Die bodenkundliche Profilansprache und die damit verbundene Probennahme wurden im August 2001 durchgeführt. Für die Beschreibung des Profils und zur anschließenden Probennahme wurde eine Profilgrube angelegt, die bis auf den Permafrost hinabreichte. Somit konnte die gesamte saisonale Auftauschicht beschrieben und beprobt werden. Die bodenkundliche Bezeichnung der Horizonte sowie die Klassifikation des Bodens erfolgten nach der *US Soil Taxonomy* [SOIL SURVEY STAFF 1998]. Die Beschreibung des Profils wurde nach dem dazugehörigen Feldbuch des 'National Soil Survey Center' [SCHÖNEBERGER et al., 2002] durchgeführt. Zur Farbbestimmung wurde die *MUNSELL Soil colour chart* [1975] genutzt.

Um eine detaillierte Untersuchung des Profils zu gewährleisten, wurden Horizonte mit einer Mächtigkeit von mehr als 10 cm noch einmal unterteilt und Unterproben genommen. Die Proben für die bodenkundliche Analytik wurden anschließend vor dem Transport nach Deutschland luftgetrocknet, während die Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen luftdicht in 250 ml Polycarbonat Dosen verpackt und eingefroren wurden.

3.1.1 Redoxverhalten der Bodenhorizonte

Das Redoxverhalten der Bodenproben wurde direkt bei der Probennahme durch Zugabe einer α - α -Dipyridil-Lösung auf feldfrische Bodenproben ermittelt [SOIL SURVEY STAFF 1998]. Lösliche, also reduziert vorliegende Eisenionen werden durch die Lösung zu einer Verbindung mit rötlicher Farbe komplexiert. Diese zeigt das Vorliegen von reduzierten Eisenionen und somit wassergesättigte, anaerobe Bedingungen an.

3.2 Bodenkundliche Analysen

3.2.1 Bodentemperatur

Seit 1998 werden am Untersuchungsstandort kontinuierliche Messungen der Bodentemperatur durchgeführt. Dazu wurden 5 Temperatursensoren des Typs *Thermistor soil temperature sensors 107* (Campbell, Scientific Ltd.) in verschiedenen Bodentiefen (7, 13, 23, 32 und 42 cm) installiert [FRIEDRICH 2001].

3.2.2 Bodenart

Zur Bestimmung der Bodenart wurde das Probenmaterial auf dem Schütteltisch (ca. 150 U/min) dispergiert, und die organische Substanz durch Zugabe von 3%igem H_2O_2 entfernt. Anschließend erfolgte mit einem Sieb der Maschenweite 63 μm eine Nasssiebung zur Abtrennung der **Sandfraktion**. Die Ermittlung der Korngrößenverteilung der aufgefangenen Feinfraktion erfolgte mit Hilfe der Sedimentationsanalyse. Zur Trennung der Schluff- und Tonfraktion wurde die auf dem Sedimentationsgesetz beruhende Methode nach ATTERBERG

verwendet. Hierfür wurde die Probe in Sedimentationszylindern mit destilliertem Wasser dispergiert und aus einer bestimmten Fallhöhe eine bestimmte Zeit (ermittelt nach dem Gesetz von Stoke) absinken gelassen. Nach dieser Zeit war der Schluffanteil der Probe unter eine Markierung abgesunken und der darüber in Suspension verbliebene Ton konnte abgesaugt und aufgefangen werden. Die Zylinder wurden so häufig wieder aufgefüllt und abgesaugt bis die Wassersäule nach dem Absinken des Schluffanteils klar blieb. Die Korngrößenfraktionen innerhalb der so getrennten Schluff- und Tonfraktionen wurden an einem Sedigraphen (Micromeritics 5100, Fa. Coulter Electronics) bestimmt. Eine ausführliche Beschreibung über die angewandte Methodik zur Korngrößenanalyse gibt MELLES [1991].

3.2.3 Gesamtkohlenstoff und –stickstoff

Die Ermittlung des Gesamtkohlenstoffs und –stickstoffs erfolgte mit einem Elementaranalysator *Vario EL II* (Elementar Analysensysteme, Deutschland). Die Analyse erfolgt durch die Verbrennung der gemahlten Probe bei 970°C und anschließender Ermittlung der Wärmeleitfähigkeitsänderung bzw. der Messung des bei der Verbrennung entstehenden Gases.

3.3 Mikrobiologische Analysen

Die bei der Bodenprofilaufnahme für die verschiedenen mikrobiologischen Untersuchungen entnommenen Bodenproben wurden direkt nach der Probennahme eingefroren und in gefrorenem Zustand transportiert.

3.3.1 Fixierung der Bodenproben mit Paraformaldehyd (PFA) oder Ethanol

Bevor die Bestimmung der Gesamtzellzahl und die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgen konnte, mussten die Zellen fixiert werden. Hierbei soll zum einen die Morphologie der Zellen erhalten bleiben, zum anderen sollen die Zellwände für die Oligonukleotidsonden permeabel gemacht werden. Dafür wurden die Bodenproben mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung versetzt.

PARAFORMALDEHYDLÖSUNG (4 %ig)

PBS-Puffer (3-fach konzentriert)	16	ml
Paraformaldehyd (PFA)	2,0-3,0	g
1 M NaOH		
1 M HCl		
pH-Wert der Lösung auf 7,0 – 7,1 einstellen		

PBS-PUFFER (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	1,44	g
Demineralisiertes H ₂ O	1000	ml

pH-Wert der Lösung auf 7,2 – 7,5 einstellen

Zur Herstellung der Lösung wurden 30 ml demineralisiertes Wasser auf 60° C erhitzt. Das Paraformaldehyd wurde hinzugegeben und durch Zugabe von wenigen Tropfen 1M NaOH gelöst. Anschließend wurde der PBS-Puffer zugefügt und nach dem Abkühlen der Lösung der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,0-7,1 eingestellt. Das abschließende Filtrieren der Lösung durch 0,2 µm Filter soll eventuell ungelöste PFA-Partikel entfernen. Die Lösung wurde für jede Fixierung frisch angesetzt und nur am selben Tag verwendet.

Für die Fixierung wurde 1 g Bodenmaterial mit 3 ml PFA-Fixativ versetzt. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 5°C wurde die PFA-Lösung durch Zentrifugieren (5 min bei 16000 x g) entfernt. Die Bodenproben wurden anschließend zweimal mit 3 ml 1xPBS gewaschen und bei -20°C in einer 1:1 Ethanol/PBS Lösung gelagert. Diese Fixierungsmethode ist nach heutigem Kenntnisstand die beste Methode um Gram-negative Zellen zu fixieren [AMANN 1990].

Um die komplexeren Zellwände der Gram-positiven Zellen zu permeabilisieren ist die Fixierung der Zellen mit **Ethanol** die übliche Methode [ROLLER et al. 1994]. Um beide Bakteriengruppen zu erfassen, wurden daher zusätzlich zu der PFA-Fixierung Unterproben mit Ethanol fixiert. Für die Ethanolfixierung wurde 1 g Boden mit 5 ml 96%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert. Die weitere Homogenisierung und Verdünnung der Proben erfolgte wie für die PFA-fixierten Proben beschrieben.

3.3.2 Verdünnung und Homogenisierung der Bodenproben

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und zur anschließenden Hybridisierung wurden die fixierten Bodenproben verdünnt und homogenisiert. Verdünnt wurden die Proben mit einer 0,01%igen Natrium-Pyrophosphat-Lösung (SPP). Das SPP löst Bindungen zwischen organischen und mineralischen Bodenbestandteilen und hilft so beim Homogenisieren der Bodenproben. Zur besseren Homogenisierung wurden die verdünnten Lösungen mit einer MS 73-Ultraschallsonde (Sonopuls HD70, Bandelin, Berlin) 30 s lang mit 20% Leistung dispergiert. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass bei der anschließenden Quantifizierung der Zellen ungefähr 100 Zellen im mikroskopischen Blickfeld lagen.

Von den so behandelten Bodenproben wurden schließlich 20 µl auf eine definierte Fläche eines, mit 10 Aussparungen versehenen, teflonbeschichteten Objektträgers übertragen. Die Bodensuspension wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Ethanolreihe (jeweils 3 Minuten bei 50%, 80% und 96% Ethanol) dehydratisiert. Um eine bessere Anhaftung der Bakterien zu gewährleisten und den Verlust von Zellen zu minimieren, wurden die Objektträger außerdem vor dem Auftragen der Bodensuspension mit Gelatine beschichtet.

GELATINELÖSUNG FÜR DIE BESCHICHTUNG DER OBJEKTTRÄGER

Gelatine	5	g
Kaliumchromsulfat	0,5	g
H ₂ O dest.	500	ml

Zur vollständigen Lösung der Gelatine wurde das obige Gemisch auf 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf etwa 40°C konnten die beschichteten Objektträger in die Gelatine-Lösung getaucht werden. Das Trocknen der Objektträger geschah in senkrechter Position bei Raumtemperatur.

3.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Erfassung der Gesamtzellzahl erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dichlorotriazinylaminofluorescein (DTAF). Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine. Bei einer Anregung von 494 nm fluoresziert er grün bei einem Emissionsmaximum von 520 nm.

DTAF (5-(4,6-DICHLOROTRIAZIN-2-YL)) – ARBEITSLÖSUNG

[Nach SHERR et al. 1987]

DTAF (Fa. Roth)	2	mg
Phosphatpuffer (0,05 M Na ₂ HPO ₄ in 0,85% NaCl-Lösung (pH9))	10	ml

Die Lösung wurde jedes Mal frisch hergestellt. Die Anfärbung erfolgte nach einem Protokoll von BLOEM et al. [1995]. Auf jedes mit getrockneter Bodensuspension bedeckte Objektträgerfeld wurde 20 µl DTAF-Arbeitslösung gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das überschüssige DTAF 3-mal 20 Minuten in einem Phosphatpufferbad abgewaschen. Abschließend wurde der Objektträger in 4 aufeinander folgenden Wasserbädern jeweils für einige Sekunden eingetaucht und anschließend getrocknet. Diese DTAF-Färbung

wurde vor der FISH durchgeführt. Da die DTAF-Färbung im Vergleich zur weit verbreiteten DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol)-Färbung aufwendiger und zeitintensiver ist, wurde sie nur für die Proben durchgeführt, die am konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) betrachtet werden sollten, da dieses nicht mit einer, für die Abbildung von DAPI benötigte, UV-Lampe ausgerüstet war. Die Proben die am Epifluoreszenzmikroskop betrachtet wurden, konnten dagegen mit DAPI angefärbt werden, zumal ein Vergleich beider Methoden keine Unterschiede in der Quantifizierung erbrachte. DAPI ist ein häufig verwendeter Farbstoff, der an doppelsträngige DNS bindet und daher ebenso unspezifisch wie DTAF alle in der Probe vorhandenen Organismen anfärbt. Bei einer Anregung im ultravioletten Bereich (358nm) fluoresziert es bläulich bei einem Emissionsmaximum von 461 nm.

DAPI (4,6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOL-DHYDROCHLORID)-ARBEITSLÖSUNG

DAPI (Fa. Roth)	10	µg
H ₂ O _{dest.}	100	ml

Die DAPI-Färbung wurde im Anschluss an die FISH durchgeführt. Jedes der 10 Objektträgerfelder wurde mit je 20 µl eiskalter DAPI-Arbeitslösung (10 µg/ml) überschichtet. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln auf Eis, wurde der Objektträger in eiskaltes destilliertes Wasser getaucht und anschließend mit Druckluft getrocknet.

3.3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Allen Arbeitsschritten bei der FISH gingen die in 3.3.1 beschriebenen Fixierungsschritte voraus.

3.3.4.1 Eingesetzte Oligonukleotidsonden

Die für die FISH benötigten Gensonden wurden bei Interactiva (Ulm) bestellt und waren mit einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe markiert: Fluos, Cy3 oder Cy5. Die optischen Eigenschaften der Farbstoffe sind in Tab. 2 dargestellt. Die Sonden wurden in getrocknetem Zustand geliefert. Die Cy3 und Cy5 markierten Sonden wurden in sterilem, destilliertem Wasser, die Fluos markierten Sonden in einem Carbonatpuffer mit pH 9,0 gelöst. Um die Sondenqualität zu testen und die Konzentration der Sonden zu bestimmen, wurde von der hergestellten Stammlösung eine 1:100 Verdünnung angesetzt und mit Hilfe eines Spektralphotometers vermessen. Dabei erhielt man für jede Sonde zwei Absorptionsmaxima; zum einen die Nukleotidabsorption (OD₂₆₀) zum anderen die Farbstoffabsorption (OD₄₉₀ für Fluos; OD₅₅₀ für Cy3; OD₆₅₀ für Cy5). Die Konzentration der Oligonukleotide wurde mit folgender Formel errechnet:

$$1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ µg DNA ml}^{-1}$$

Aus der Stammlösung konnten anschließend Arbeitslösungen hergestellt werden in denen die Konzentrationen für die Cy3- und Cy5-markierten Sonden auf $30 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ und für die Fluos-markierten Sonden auf $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt wurden. Anschließend wurden die Arbeitslösungen in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren. So konnte ein zu häufiges Auftauen und Einfrieren der Sonden verhindert werden.

Tab. 2: Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Anregungs- und Emissionsmaxima

Name	Anregung (nm)	Emission (nm)
DTAF	494	520
DAPI	359	461
Cy3	554	570
Cy5	649	666,670
Fluos	494	518

Es kamen Sonden für die Domänen *Bacteria* und *Archaea*, mehrere Sonden für spezifische phylogenetische Gruppen der *Bacteria* sowie Sonden für spezielle Gruppen der methanbildenden *Archaea* zum Einsatz. Alle Sonden, ihre Zielgruppen, die Basensequenzen sowie die verwendeten Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer und die NaCl-Konzentration im Waschpuffer, die für optimale Hybridisierungsbedingungen nötig waren, sind in den Tab. 3 und Tab. 4 dargestellt.

Tab. 3: Beschreibung der verwendeten rRNA-Sonden für die Bestimmung der Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen. Dargestellt sind die Zielorganismen, die Sondensequenz, die für die optimale Stringenz benötigten Hybridisierungsbedingungen, sowie die Referenz.

Sonde	Zielorganismen	Sondensequenz (5' - 3')	FA ^a (%)	NaCl ^b (mM)	Referenz
EUB338 [*]	Domäne <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-35	80-900	AMANN et al. 1990
EUB338 II [*]	Domäne <i>Bacteria</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-35	80-900	DAIMS et al. 1999
EUB338 III [*]	Domäne <i>Bacteria</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-35	80-900	DAIMS et al. 1999
NON338	Negativkontrolle	ACTCCTACGGGAGGCAGC	0-35	80-900	WALLNER et al. 1993
ARCH915	Domäne <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	20	225	STAHL & AMANN 1991
ALF968	Alphaproteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	35	80	NEEF 1997
BET42a	Betaproteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	80	MANZ et al, 1992
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	35	80	MANZ et al. 1992
CF319A ^{**}	Cytophaga-Flavobacterium Gruppe des CFB-Stammes	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	80	MANZ et al. 1992
CF319B ^{**}	Wie CF319A	TGGTCCGTATCTCAGTAC	35	80	MANZ et al., 1992
HGC69a	Gram-positive <i>Bacteria</i> (hoher GC Gehalt)	TATAGTTACCACCGCCGT	25	159	ROLLER et al., 1994
HGC- Kompetitor		TATAGTTACGGCCCGCCGT	25	159	ROLLER et al., 1994
LGC354A ^{***}	Gram-positive <i>Bacteria</i> (niedriger GC Gehalt)	TGGAAGATTCCTACTGC	35	80	MEIER et al. 1999
LGC354B ^{***}	Wie LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	35	80	MEIER et al. 1999
LGC354C ^{***}	Wie LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	35	80	MEIER et al. 1999

^a Konzentration (vol/vol) des Formamids im Hybridisierungspuffer

^b Konzentration des NaCl im Waschpuffer.

* - *** Sonden die mit der gleichen Anzahl * markiert sind, wurden in äquimolaren Mischungen eingesetzt.

Dabei wurde die Sonde HGC69a immer in Kombination mit dem unmarkierten HGC-Kompetitor eingesetzt. Dessen Basensequenz unterscheidet sich von der HGC Sonde nur in zwei Basen. Er verhindert Fehlbindungen der Sonde dadurch, dass er sich an rRNA-Sequenzen bindet, die sonst trotz zweier nicht komplementärer Basen fälschlicherweise von der HGC Sonde markiert werden würden. Auch die Sonden BET42a und GAM42a wurden nur in Kombination eingesetzt. Beide Sonden unterscheiden sich nur in einer Base. Würde man GAM42a alleine einsetzen, würde sie zusätzlich zu den *γ-Proteobacteria* auch die *β-Proteobacteria* markieren und umgekehrt.

Tab. 4: Beschreibung der verwendeten rRNA-Sonden für die Bestimmung der verschiedenen methanbildenden *Archaea*. Dargestellt sind die Zielorganismen, die Sondensequenz, die für die optimale Stringenz benötigten Hybridisierungsbedingungen, sowie die Referenz.

Sonde	Zielorganismen	Sondensequenz (5' - 3')	FA ^a (%)	NaCl ^b (mM)	Referenz
MSMX 860	Ordnung: Methanosarcinales	GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT	30%	112	RASKIN et al. 1994
MS 1414	Familie Mathanosarcinaceae	CTCACCCATACCTCACTCGGG	30%	112	RASKIN et al. 1994
MS 821	Gattung: Methanosarcina	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	30%	112	RASKIN et al. 1994
MX 825	Gattung: Methanosaeta	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	25%	159	RASKIN et al. 1994
MB 1174	Familie Mathanobacteriaceae	TACCGTCGTCCACTCCTTCTC	30%	112	RASKIN et al. 1994
MG 1200	Ordnung Methanomicrobiales	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	15%	318	RASKIN et al. 1994
MER 1	Methanogene <i>Archaea</i>	GGGCACGGGTCTCGCT	20%	225	HALES et al. 1995

^a Konzentration (vol/vol) des Formamids im Hybridisierungspuffer

^b Konzentration des NaCl im Waschpuffer.

3.3.4.2 Durchführung der FISH

Für die FISH wurden die nach Abschnitt 3.3.2. vorbereiteten Bodenproben auf den teflonbeschichteten Objektträgern verwendet. Die Hybridisierung wurde in Anlehnung an die Protokolle von SNAIDR et al. [1997] und STAHL & AMANN [1991] durchgeführt. Dem dafür benötigten Standardhybridisierungspuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, 0,02%ige Natriumdodecylsulfatlösung (SDS)), wurde je nach benötigter Stringenz siehe Tab. 3 und Tab. 4 noch Formamid in unterschiedlichen (15-35 %) Konzentrationen zugegeben. Das sowohl dem Hybridisierungs- wie auch dem Waschpuffer zuzugebende SDS senkt die Oberflächenspannung der Lösung und ermöglicht so eine gleichmäßigere Verteilung der Lösung auf dem Objektträger.

HYBRIDISIERUNGSPUFFER

5 M NaCl	360	µl
1 M Tris/HCl pH 8,0	40	µl
Formamid (FA) bei X % in Hybridisierungspuffer:		
15 %	300	µl
20 %	400	µl
25 %	500	µl
30 %	600	µl
35 %	700	µl
Demineralisiertes H ₂ O	auf 2000 µl auffüllen	
10 % SDS (sollte als letztes zugegeben werden)	4	µl

Für die Hybridisierung wurden 10 µl des frisch zubereiteten Hybridisierungspuffers zusammen mit 1 µl der jeweils eingesetzten Sonde (Konzentration 30 ng µl⁻¹) auf jede Bodenprobe aufgetragen. Der Objektträger wurde anschließend in ein verschließbares 50 ml

Polypropylen-Röhrchen gelegt, in welchem ein mit Hybridisierungspuffer befeuchtetes Stück Zellstoff dafür sorgte, dass diese Kammer während der anschließenden Inkubationszeit nicht austrocknete und die jeweilige Formamidkonzentration erhalten blieb [AMANN, 1995]. Der Objektträger in der verschlossenen feuchten Kammer wurde für 90 Minuten bei 46°C inkubiert. Anschließend wurde er bei 48°C für genau zehn Minuten in einem vorgewärmten Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der Waschpuffer durch kurzes Eintauchen in eiskaltes destilliertes Wasser entfernt und sofort darauf im Druckluftstrom getrocknet.

WASCHPUFFER

1 M Tris/HCl pH 8,0	1000	µl
5 M NaCl bei:		
15 % FA im Hybridisierungspuffer	3180	µl
20 % FA im Hybridisierungspuffer	2150	µl
25 % FA im Hybridisierungspuffer	1490	µl
30 % FA im Hybridisierungspuffer	1020	µl
35 % FA im Hybridisierungspuffer	700	µl
0,5 M EDTA bei FA-Konzentrationen ab 20 %	500	µl
Demineralisiertes H ₂ O	auf 50 ml auffüllen	
10 % SDS (sollte als letztes zugegeben werden)	50	µl

Um den Anteil der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen an der gesamten Bakterienvolpopulation zu bestimmen, wurde bei jeder Hybridisierung die Sondenkombination EUBmix zusammen mit einer für eine phylogenetische Gruppe spezifischen Sonde eingesetzt. Beide Sonden waren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da zusätzlich zur Hybridisierung jede Bodenprobe noch mit einem an alle Zellen bindenden Farbstoff markiert wurde (siehe 3.3.3), wurden die gesuchten Zellen mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der Zellzahlen

Um das Ausbleichen der Farbstoffe während der mikroskopischen Auswertung zu minimieren, wurden die Objektträger mit den hybridisierten Bodenproben in Citifluor-Antifading-Reagenz AF1 (Plano GmbH) eingebettet, anschließend wurden sie mit einem Deckglas versehen und mikroskopisch ausgewertet.

Die erste Kontrolle der Hybridisierungsergebnisse wurde an einem Axioskop2 Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss) durchgeführt. Als Lichtquelle diente hier eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe N HBO 103. Der Wellenlängenbereich dieser Lampe liegt zwischen 360 nm und 700 nm und kann durch Wahl der entsprechenden Filtereinsätze die Präparate

mit der entsprechenden Wellenlänge anregen. Die verwendeten Filter sind in Tabelle 5 beschrieben. Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 20-, 63- und 100-facher Vergrößerung verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte an diesem Mikroskop mit einer CCD-Farbkamera des Typs AxioCam der Firma Zeiss. Die Bildbearbeitung mit der dazugehörigen Software AxioVision 3.0 (Zeiss).

Die hauptsächliche Auswertung und Quantifizierung der Hybridisierungsergebnisse wurde an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (CSLM) des Typs LSM-510 der Firma Zeiss durchgeführt, welches mit einem Argon Ionen Laser (488 nm) sowie zwei Helium-Neon-Lasern (543 nm und 633 nm) ausgestattet war. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der LSM-510-Software (Version 2.3).

Tab. 5: Die am Epifluoreszenzmikroskop eingesetzten Filter (Zeiss).

Filtersatz	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Sichtbar machen von
02	G 365	LP 420	DAPI
10	BP 450-490	BP 515-565	Fluos
20	BP 546/12	BP 575-640	Cy3

Das CLSM besitzt gegenüber dem Epifluoreszenzmikroskop den Vorteil, ausschließlich Licht der im Fokus befindlichen Ebene durchzulassen. Dies ist gerade bei der Betrachtung von Bodenproben ein Vorteil, da die in diesen Proben häufig auftretende Autofluoreszenzen der Mineral- und Pflanzenpartikel die Auswertung der mit Fluoreszenzsonden markierten Zellen stören. Die trotzdem noch auftretende Autofluoreszenz der Bodenmatrix verhinderte den Einsatz von Bildverarbeitungsprogrammen zur Zellquantifizierung. Daher wurden sämtliche Proben manuell ausgezählt. Für jeden Hybridisierungsansatz wurden wenigstens 1000 DTAF-markierte Zellen in mindestens 10 zufällig gewählten mikroskopischen Blickfeldern gezählt.

Je nachdem welche Zellen gezählt werden sollten, wurde bei der jeweiligen Wellenlänge ein Foto der angefärbten Bodenprobe gemacht. Durch das Auszählen der mit DTAF gefärbten Zellen konnte die **absolute Zellzahl** der im Boden befindlichen Zellen bestimmt werden. Um den **Anteil der mit FISH detektierbaren Zellen** an der totalen Zellzahl zu bestimmen, wurden die mit der Sondenkombination EUBmix markierten Zellen relativ zu den DTAF angefärbten Zellen an PFA-fixierten Proben bestimmt. Dieser Wert wurde für Proben mit einem hohen Gehalt an gram-positiven Bakterien korrigiert, indem die Anzahl der von den Sonden HGC69a und LGCmix (siehe Tab. 3) in der Ethanol fixierten Probe beobachteten Zellen und die Anzahl der durch EUBmix entdeckten Zellen summiert wurde [FRIEDRICH et al., 1999].

Gruppenspezifische Zellzahlen wurden bestimmt indem DTAF-gefärbte Bodenproben gleichzeitig mit dem Cy5-markierten EUBmix und der jeweiligen gruppenspezifischen Cy3-markierten Sonde hybridisiert wurden. Diese dreifache Markierung der Zelle ermöglicht eine klare Differenzierung zwischen autofluoreszierenden Bodenpartikeln und den Bakterienzellen. Die Quantifizierung der einzelnen Gruppen wurde relativ zu den mit EUBmix hybridisierten Zellen vorgenommen. Um eventuelle Fehler die durch unspezifische Bindung von Sonden an Bodenpartikel oder Bakterien entstehen können zu eliminieren, wurden alle Hybridisierungsergebnisse korrigiert indem die Zählergebnisse abgezogen wurden, die mit der Sonde NON338 erzielt wurden. Diese Sonde besteht aus einer Nukleotidsequenz für die kein Bakterium einen komplementären Part auf seiner rRNS besitzt. Sie kann demnach in keinem Bakterium gebunden werden.

Für die Umrechnung der im Blickfeld gezählten Zellen auf die tatsächlich in einem Gramm Boden befindlichen Zellen (BZ), wurde der Mittelwert der in den verschiedenen Blickfeldern gezählten Zellen (B), der Mikroskopfaktor (Fläche der aufgetragenen Probe auf dem Objektträger/Fläche des Zählfeldes) (M), der Verdünnungsfaktor (V) und das Gewicht (G) der für die Hybridisierung fixierten Probe ermittelt und durch folgende Gleichung zueinander in Beziehung gesetzt:

$$BZ = B \times M \times V \times G^{-1}$$

3.3.6 Anreicherungskulturen der methanogenen *Archaea*

Um mit Hilfe der FISH zu untersuchen ob sich die Zusammensetzung der methanogenen Gruppen zwischen den verschiedenen Horizonten voneinander unterscheidet, wurden zunächst Anreicherungskulturen aus drei Bodentiefen des Profils angesetzt. Es wurden die Bodentiefen 0-5 cm, 17-20 cm und 40-45 cm angesetzt.

Als Medium wurde ein von BOONE et al. [1989] beschriebenes, für die Anreicherung von Methanogenen geeignetes, Medium eingesetzt. Das Medium wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

LÖSUNG A

NH ₄ Cl	100	g
MgCl x 6 H ₂ O	100	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	40	g
H ₂ O	1	l

pH-Wert der Lösung auf 4,0 einstellen

LÖSUNG B

K ₂ HPO ₄	200	g
H ₂ O	1	l

RESAZURIN-LÖSUNG

$C_{12}H_6NO_4Na$ (Resazurin)	0,5	g
H_2O	1	l

SPURENELEMENTE-LÖSUNG

$NaC_{10}H_{16}N_2O_8 \times 2 H_2O$	0,5	g
$CoCl \times 6 H_2O$	0,15	g
$MnCl \times 4 H_2O$	0,1	g
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	0,1	g
$ZnCl_2$	0,1	g
$AlCl_3 \times 6 H_2O$	0,04	g
$Na_2WO_4 \times 2 H_2O$	0,03	g
$CuCl_2 \times 2 H_2O$	0,02	g
$NiSO_4 \times 6 H_2O$	0,02	g
H_2SeO_3	0,01	g
H_3BO_2	0,01	g
$NaMo \times 2H_2O$	0,01	g
H_2O	1	l

pH-Wert der Lösung auf 3,0 einstellen

 Na_2S -LÖSUNG

$Na_2S \times 9 H_2O$	2,5	g
NaOH (10 mM)	100	ml

110 ml einer 1 mM NaOH-Lösung wurde unter N_2 -Begasung auf 100 ml eingeeengt. Nach dem Abkühlen wurden die 2,5 g Na_2S in der Lösung gelöst. Die Lösung wurde in gasdicht verschließbare 25 ml Glasflaschen gefüllt, gasdicht verschlossen, mit Stickstoff begast und anschließend autoklaviert.

 $NaHCO_3$ -LÖSUNG

$NaHCO_3$	4,2	g
H_2O	50	ml

Zur Herstellung der $NaHCO_3$ -Lösung wurde das $NaHCO_3$ in 50 ml destilliertem Wasser in 100 ml-Serumflaschen gelöst, die Flaschen gasdicht verschlossen und durch das Begasen mit N_2/CO_2 anaerobisiert. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Zur Herstellung des flüssigen Mediums wurden die Lösungen wie folgt zusammengefügt:

MEDIUM FÜR METHANOGENE ARCHAEA

Hefeextrakt	2	g
Trypticase Pepton	2	g
HSCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na	0,5	g
Lösung A	10	ml
Spurenelemente-Lösung	10	ml
H ₂ O	914	ml
Resazurin-Lösung	2	ml

Die Lösung wurde autoklaviert und beim anschließenden Abkühlen mit N₂/CO₂ begast. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml der Lösung B, 50 ml der NaHCO₃-Lösung sowie 10 ml Na₂S-Lösung dem Medium zugefügt. Nach zusammenfügen der Lösungen wurde bis zur vollständigen Entfärbung des Resazurins weiterhin mit N₂/CO₂ begast.

Jeweils 2 g der jeweiligen Bodenprobe wurden in der Anaerobier-Box in 120 ml-Serumflaschen gefüllt und 100 ml des sterilen Mediums hinzugegeben. Als Substrat wurde den Proben Acetat (20 mM) und Methanol (20 mM) zugegeben. Der Gasraum über der Probe wurde durch ein H₂/CO₂ (80:20 v/v) ersetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 28°C. Zur Kontrolle der Methanproduktion wurde in regelmäßigen Abständen der Methan-gehalt im Gasraum mittels eines Gaschromatographen (Agilent 6890) ermittelt. Nach 28 Tagen hatte sich in allen Proben Methan angereichert, es wurden 0,5 ml des Medium/Boden-Gemisch entnommen und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Fixierung und Durchführung der Hybridisierung ist unter 3.3.1 beschrieben.

Die anschließende Hybridisierung wurde mit den in Tab. 4 beschriebenen für die methanogenen *Archaea* spezifischen Sonden durchgeführt. Eine Gliederung der methanogenen *Archaea* mit den für bestimmte Gruppen spezifischen Sonden ist in Abb. 14 dargestellt.

ORDNUNG I: METHANOBACTERIALES

Familie I: Methanobacteriaceae

- | | | |
|-------------|---|---------------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanobacterium</i> |
| Gattung II | : | <i>Methanobrevibacter</i> |
| Gattung III | : | <i>Methanosphaera</i> |

MG1174

Familie II: Methanothermaceae

- | | | |
|-----------|---|-----------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanothermus</i> |
|-----------|---|-----------------------|

ORDNUNG II: METHANOCOCCALES

Familie I: Methanococcaceae

- | | | |
|-----------|---|----------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanococcus</i> |
|-----------|---|----------------------|

ORDNUNG III: METHANOMICROBIALES

Familie I: Methanomicrobiaceae

- | | | |
|-------------|---|-------------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanomicrobium</i> |
| Gattung II | : | <i>Methanogenium</i> |
| Gattung III | : | <i>Methanoculleus</i> |
| Gattung IV | : | <i>Methanospirillum</i> |

MG 1200

Familie II: Methanocorpusculaceae

- | | | |
|-----------|---|---------------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanocorpusculum</i> |
|-----------|---|---------------------------|

Familie III: Methanoplanaceae

- | | | |
|-----------|---|----------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanoplanus</i> |
|-----------|---|----------------------|

ORDNUNG IV: METHANOSARCINALES

Familie IV: Methanosarcinaceae

- | | | | |
|-------------|---|--------------------------|---------|
| Gattung I | : | <i>Methanosarcina</i> | MS821 |
| Gattung II | : | <i>Methanococcoides</i> | MS 1414 |
| Gattung III | : | <i>Methanolobus</i> | |
| Gattung IV | : | <i>Methanohalophilus</i> | |

MSMX 860

- | | | | |
|-----------|---|---------------------|--------|
| Gattung V | : | <i>Methanosaeta</i> | MX 825 |
|-----------|---|---------------------|--------|

ORDNUNG V: METHANOPYRALES

- | | | |
|-----------|---|---------------------|
| Gattung I | : | <i>Methanopyrus</i> |
|-----------|---|---------------------|

Abb. 14: Gliederung der methanogenen Archaea mit den spezifischen Sonden.

Jede Probe wurde mit allen für die methanogenen spezifischen Sonden getestet und zusätzlich mit der EUB- und der ARC- Sonde hybridisiert. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse erfolgte mit dem unter 3.3.5 beschriebenen Epifluoreszenzmikroskop „Axioskop2“ (Zeiss).

3.3.7 Die Charakterisierung des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft mit Hilfe von BIOLOG Mikrotiterplatten

3.3.7.1 Verwendete Mikrotiterplatten und Substrate

Die Charakterisierung des physiologischen Profils der Bakteriengemeinschaften in den unterschiedlichen Bodenhorizonten wurde mit Hilfe von Mikrotiterplatten der Firma BIOLOGTM durchgeführt. Es wurden Platten des Typs EcoPlate eingesetzt. Die 96 Vertiefungen dieser Platten enthalten in dreifacher Ausführung je 31 verschiedene Kohlenstoffsubstrate sowie ein Kontrollfeld ohne Substrat. Die Anordnung der einzelnen Substrate ist in Abb. 15 dargestellt.

Die EcoPlates wurden speziell für die Analyse von Umweltproben entwickelt. Die 31 Substrate können nach INSAM (1997) in 6 Substratklassen eingeteilt werden. Diese Einteilung ist in Tab. 6 dargestellt.

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Abb. 15: Schema der Substratanordnung auf der BIOLOG EcoPlate (BIOLOG).

Tab. 6: Einteilung der 31 Substrate der EcoPlate in sechs Substratklassen nach INSAM [1997].

Amine	Aminosäuren	Kohlenhydrate	Karbonsäuren	Polymere	Phenolische Verbindungen
Putrescine	L-Arginin	α -D-Lactose	α -keto-Glutarsäure	α -Cyclodextrin	2-Hydroxy-Benzoat
Phenyl-Ethylamin	L-Asparagin	β -methyl-D-Glucosid	D-Galakturonsäure	Glycogen	4-Hydroxy-Benzoat
	L-Phenylalanin	D-Cellobiose	D-Glukosaminsäure	Tween 40	
	L-Serin	D-Mannitol	D-Apfelsäure	Tween 80	
	L-Threonin	i-Erythritol	Itaconsäure		
	Glycyl-L-Glutaminsäure	Glucose-1-Phosphat	Methylpyruvat		
		D-Xylose	γ -Hydroxy-Buttersäure		
		D-Galactonic Säure γ -Lacton			
		N-acetyl-D-Glukosamin			
		D,L- α -Glycerolphosphat			

Da in einigen Horizonten des untersuchten Tundrabodens durch die auftretende Wassersättigung anaerobe Bedingungen herrschten, wurden die Proben aus allen Horizonten sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen angesetzt und inkubiert.

3.3.7.2 Extraktion der Zellen aus den Bodenproben

Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden die Bodenproben bei 3°C aufgetaut. Die Extraktion der Zellen aus dem Bodenmaterial erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von HITZL et al. [1997]. Für den aeroben sowie für den anaeroben Ansatz wurden je 10 g frisches Bodenmaterial homogenisiert und in einem Zentrifugenröhrchen mit 90 ml steriler 0,25%iger Ringerlösung versetzt.

RINGERLÖSUNG (0,25%IG)

NaCl	2,05	g
KCl	1,05	g
CaCl ₂	0,83	g
KH ₂ PO ₄	0,48	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,87	g
H ₂ O dest.	1000	ml

Die Zentrifugenröhrchen wurden in einer eisgefüllten Box mit einem Überkopfschüttler für 30 Minuten geschüttelt. Nach anschließendem 10-minütigen Zentrifugieren mit 2000 g bei 5°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet erneut mit Ringerlösung versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Der dabei erhaltene zweite Überstand wurde mit dem ersten vereint.

Anaerober Ansatz

Für den anaeroben Ansatz erfolgten alle Arbeiten unter Stickstoff-Atmosphäre einer Anaerobier Arbeitsstation des Typs MAKS MG (DWS Laborgeräte). Die Herstellung der sauerstofffreien Ringerlösung wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (WTW OXI-196) und einer Redoxsonde (WTW) überprüft. Die Ringerlösung (1 Liter) wurde zunächst autoklaviert und während des anschließenden Abkühlens mit Stickstoff begast, um eine Aufnahme von Sauerstoff zu verhindern. Danach wiesen 1000 ml der Ringerlösung eine Sauerstoffsättigung von 15% und ein Redoxpotenzial von +150 mV auf. Nach Zugabe von 3 ml einer reduzierend wirkenden Na₂S-Lösung betrug das Redoxpotenzial -10 mV und der Restsauerstoffgehalt 1 %.

Na₂S-LÖSUNG

Na ₂ S	2,5	g
NaOH-Lösung (10mM)	100	ml

Die Zellextraktion erfolgte wie für den aeroben Ansatz beschrieben, mit dem Unterschied, dass sämtliche Vorgänge unter der Stickstoffatmosphäre der Anaerobier Arbeitsstation durchgeführt wurden, um eine nachträgliche Sauerstoffkontamination zu vermeiden.

3.3.7.3 Einstellen der Zelldichte

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch eine Direktzählung. Dazu wurde 1 ml der bei der Extraktion erhaltenen Zellsuspension mit 3 ml 96%igem Ethanol fixiert. Hiervon wurden 20 µl auf eine definierte Fläche eines Objektträgers aufgetropft. Die Zellzahlbestimmung erfolgte dann wie unter 3.3.5 beschrieben. Anschließend wurde durch Verdünnung mit Ringerlösung für die Proben aller Horizonte eine Zelldichte von $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt.

3.3.7.4 Inkubation

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten wurden 125 µl Bodensuspension pipettiert. Da jede Probe auf eine eigene Platte aufgetragen wurde, konnten für jeden Horizont und jedes Substrat 3 Parallelen angelegt werden. Während der anschließenden Inkubation in Dunkelheit bei 5°C wurde die Farbentwicklung in den einzelnen Vertiefungen mit einem für Mikrotiterplatten geeigneten Photometer (SLT Spectra II Classic, TECAN) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Anaerobe Inkubation

Nach dem Auftragen der anaeroben Proben auf die Mikrotiterplatten in der Anaerobier Arbeitsstation wurden die Platten luftdicht verschlossen, indem die Deckel der Platten mit Klebeband verklebt wurden. Die Platten wurden in einer luftdicht verschlossenen Box unter Stickstoffatmosphäre inkubiert und die Farbentwicklung ebenso photometrisch ermittelt wie für die aerob angesetzten Platten.

3.3.7.5 Aufbereitung der BIOLOG-Daten

Die statistische Aufbereitung und Auswertung der Daten orientierte sich an der Methode von GLIMM et al. [1997].

1.) Abziehen des Hintergrundsignals

Um durch Substrate oder Bakterienextrakte ausgelöste Hintergrundsignale zu eliminieren, wurden die vom Photometer für die einzelnen Substrate gemessenen Rohwerte der optischen Dichten zweifach korrigiert. Zum einen wurden von allen Rohwerten die Messwerte der ersten Messung direkt nach dem Ansetzen der Platten (zum Zeitpunkt $t=0$) abgezogen. Zum anderen wurde von allen Rohwerten einer Platte der Mittelwert der 3 Kontrollfelder ohne Substrat (Hintergrundsignal) abgezogen [GIRVAN et al. 2003]. Wurden dabei für ein Feld negative Werte erzielt, erhielten diese den Wert 0.

2.) Normalisierung der Daten

Für jeden Messzeitpunkt wurde die durchschnittliche Farbentwicklung (=AWCD, von „average well colour development“) der jeweils zusammengehörenden 31 Substrate einer Parallele berechnet. Für die 31 zusammengehörigen Substrate der Parallele j , die zum Zeitpunkt t gemessen wurden, berechnet er sich wie folgt:

$$AWCD_{j,t} = \frac{1}{31} \sum_{i=1}^{31} OD(i,j,t)$$

wobei $OD(i,j,t)$ die korrigierte (s.o.) OD für die Vertiefung i der Parallele j zum Messzeitpunkt t ist.

Um den Einfluss eventuell ungleichmäßiger Animpf-Zelldichten zu minimieren, wurden alle für die Umsetzung der einzelnen Substrate erhaltenen OD-Werte einer Norma-

lisierung nach GARLAND [1996] unterzogen. Das heißt, die OD-Werte der einzelnen Substrate wurden durch den AWCD-Wert der jeweils zugehörigen 31 Substrate einer Parallele geteilt.

Die normalisierten Werte für jeden Messwert errechnen sich dann wie folgt:

$$OD_{norm.}(i, j, t) = \frac{OD(i, j, t)}{AWCD(j, t)}$$

Die auf diese Weise normalisierten Werte waren die Grundlage für die weiteren Auswertungen.

3.) Auswahl des Auswertzeitpunktes

Der Auswertzeitpunkt wurde so gewählt, dass die durchschnittliche Aktivität (ACWD) der Proben gleich groß war. Nur so können Unterschiede in der Verteilung des Substratumsatzes miteinander verglichen werden. Vergleicht man die Proben bei gleichem AWCD, das heißt zu den Zeitpunkten an denen die jeweilige Parallele auf einer Platte einen ausgewählten AWCD überschreitet, vergleicht man eventuell **unterschiedliche Zeitpunkte** miteinander. Die Proben die weniger aktive Zellen enthalten und eine längere Inkubationszeit benötigen, um den gewählten AWCD zu erreichen, werden bei einem späteren Messzeitpunkt mit früheren Messzeitpunkten der aktiveren Proben verglichen. Im Gegensatz zu der Auswertung bei gleichem Zeitpunkt, werden mit einem Vergleich bei gleicher Entwicklungsrate Effekte verschieden großer Animpfzellzahlen und –aktivitäten minimiert. Diese Wahl des Auswertzeitpunktes wurde so zum Beispiel auch von WIDMER et al. [2001]; WESTERGAARD et al. [2001] und MÜLLER et al. [2001] vorgenommen. Die Proben wurden zum einen in einem frühen Stadium der Farbentwicklung (AWCD = 0,2) und ein weiteres mal in einem späteren Zeitpunkt (AWCD = 0,5) miteinander verglichen.

- a) **AWCD 0,2:** Durch den Vergleich der Proben zu einem möglichst frühen Zeitpunkt, sollte die Beeinflussung der Bakteriengemeinschaft durch Wachstum möglichst gering gehalten werden. Je früher der Auswertzeitpunkt gewählt wird, desto größer ist der Einfluss der schnell wachsenden und der in der Probe in großer Anzahl vorhandenen Gruppen auf die Substratumsetzung. Die Auswertung an einem frühen Zeitpunkt der Farbentwicklung spiegelt am ehesten die aktuelle physiologische Leistung einer Gemeinschaft wider [GLIMM et al. 1997].
- b) **AWCD 0,5:** Im Gegensatz zu der bei AWCD 0,2 durchgeführten Auswertung spiegeln die zu diesem späteren Zeitpunkt ermittelten Substratumsetzungen eher das Potenzial der in den einzelnen Horizonten möglichen Substratumsetzung wider, da die Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt es auch langsam wachsenden Zellen und Gruppen, die in geringerer Anzahl im Boden vorkommen, ermöglicht zum Substratumsatz beizutragen.

4.) **Statistische Auswertung**

Die statistischen Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den Bakteriengemeinschaften basieren auf einer Hauptkomponentenanalyse der zuvor normalisierten Messwerte. Der Sinn der Hauptkomponentenanalyse ist eine Reduktion der Dimension einer Datenmenge, in unserem Fall der 31 Substrate, auf eine besser überschaubare Anzahl an Hauptkomponenten. Dabei soll möglichst wenig der durch die ursprünglichen Muster gegebenen Varianz verloren gehen. Dies wird durch eine lineare Transformation auf eine neue Menge von Mustern erreicht. Die neuen Hauptkomponenten sind so angeordnet, dass die erste Hauptkomponente die größte Varianz aller ursprünglichen Variablen (hier der 31 Substrate) repräsentiert. Die durchgeführte Hauptkomponentenanalyse bezieht sich auf die Kovarianzmatrix.

Im Anschluss an die Hauptkomponentenanalyse, wurden jeweils die Hauptachsen auf signifikante Unterschiede getestet, die gemeinsam ungefähr 75% der Varianz erklärten.. Hierfür wurde zunächst für jede Achse eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Um die Gemeinschaften auf signifikante Unterschiede zu testen, wurde - sofern die zuvor durchgeführte ANOVA Heterogenität der Varianzen ergeben hatte - der Fisher LSD Test angewendet (SACHS 1991). Bei Varianzhomogenität wurde für die Untersuchung der Unterschiede stattdessen der Scheffé-Test angewendet (Sachs 1991) . Das Ergebnis dieser Testverfahren ist ein Wert für die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Horizonten. Da beide Testverfahren nur zur Analyse parametrisch verteilter Werte geeignet sind (Sachs 1991), wurden schief verteilte Werte zuvor wurzeltransformiert. Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software STATISTICA, Version 6.1 [STATSOFT 2002] durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Bodenkundliche Beschreibung des untersuchten Permafrostbodens

Der untersuchte Permafrostboden ist Teil der Eiskeil-Polygonlandschaft Nord-Ost-Sibiriens. Das untersuchte Profil liegt im Zentrum eines Polygons auf einer mittelholozänen Flussterrasse (s. a. 2.6.3). Zum Zeitraum der Probennahme im August 2001 betrug die Auftautiefe 45 cm, und der Wasserspiegel lag zur Zeit der Probennahme 18 cm unter der Bodenoberfläche. Das aufgedigene und ausgeschöpfte Bodenprofil ist in Abb. 16 dargestellt.

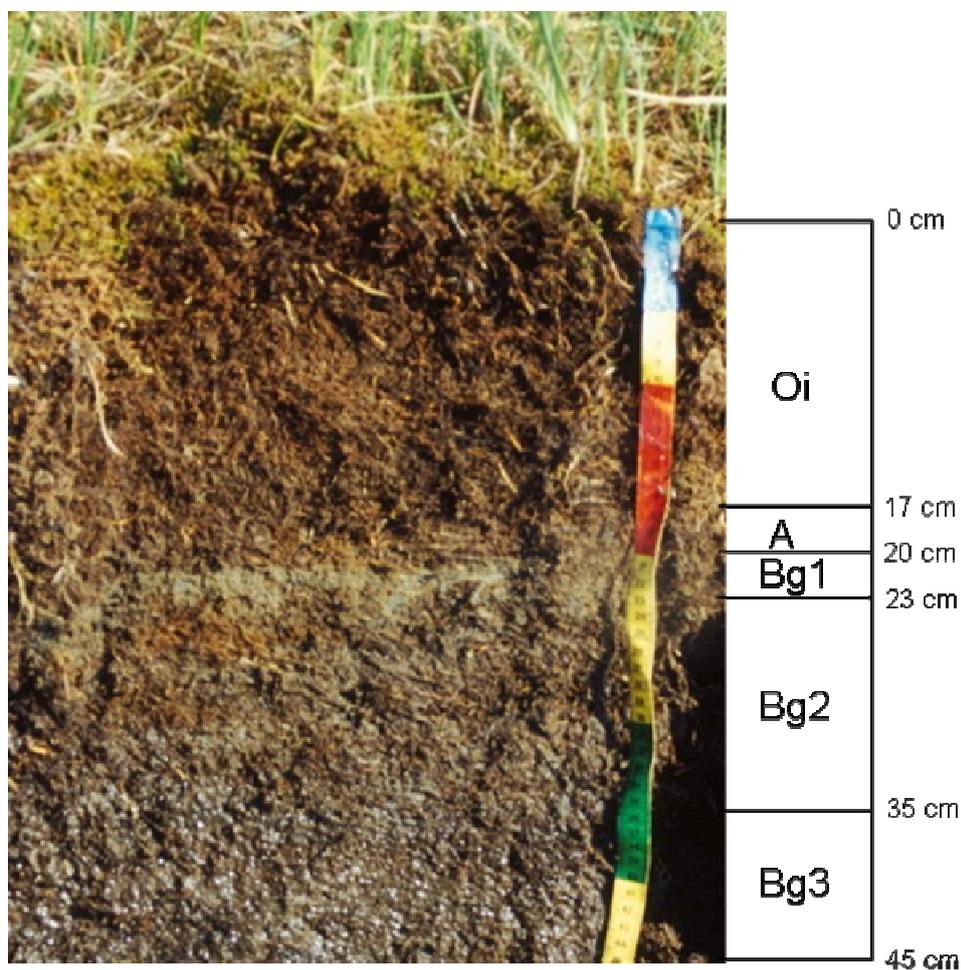


Abb. 16: Foto der Profilwand des untersuchten *Typic Historthel* mit der Einteilung in verschiedene Bodenhorizonte.

Anhand ihrer **morphologischen** Eigenschaften wurden bei der Bodenansprache vier verschiedene torfige, sandig-lehmige, wasserbeeinflusste Horizonte (A-Bg3) ausgewiesen, die von einem aus schwach zersetzter organischer Substanz bestehenden Oi-Horizont bedeckt

waren. Die Klassifizierung der Horizonte erfolgte nach der amerikanischen Bodensystematik [Soil Tax, SOIL SURVEY STAFF 1998]. Dabei ist die Ansprache der oberen 17 cm als Oi-Horizont nicht ganz eindeutig, da er zum einen zwar bei der Geländeansprache deutlich das Kriterium erfüllt, dass der mineralische Anteil des Bodens nur einen kleinen Anteil am Volumen des gesamten Materials einnehmen darf, zum anderen soll bei einem typischen O Horizont nach Soil Survey Staff aber üblicherweise das mineralische Material weniger als die Hälfte des Gewichts ausmachen, was zumindest nach der Trocknung des Materials nicht mehr für diesen Horizont zutrifft. Der Boden ist ein typischer Torfboden mit Permafrost und wurde nach der amerikanischen Klassifikation als *Typic Historthel* angesprochen, nach der internationalen der WORLD REFERENCE BASE FOR SOIL RESOURCES [1998] wird er als *Gleyi-Histic Cryosol* angesprochen und gemäß der russischen Klassifizierung als *Permafrost Peat Gley*.

Der Oi-Horizont besteht aus einem Wurzelfilz aus vorwiegend Carex-Rhizomen, schwach zersetzten Moostorfen, lebenden Moosen und äolischen Sanden. Obwohl der Wasserspiegel erst unterhalb des Oi-Horizonts anstand, war auch in der organischen Substanz des Oi-Horizonts eine große Menge Feuchtigkeit gespeichert. Die organische Substanz des A-Horizontes ist stärker zersetzt als im Oi-Horizont. Auch hier ist ein Wurzelfilz aus Carex-Rhizomen vorhanden. Der α - α -Dipyridiltest zeigte für diesen Horizont, und für alle unter ihm liegenden Horizonte, zum Beprobungszeitpunkt reduzierende Bedingungen an. Der Bg1-Horizont besteht aus einem hellen, 2 cm - 3 cm mächtigen, torfhaltigen Sandband mit Einzelkorngefüge. Die beiden sich anschließenden Horizonte Bg2 und Bg3 bestehen aus schwach zersetzten Torfen, die stark von Sand durchsetzt sind. Die Schluffkomponente dieser beiden Horizonte ist fühlbar größer als in den überliegenden Horizonten.

Für eine detaillierte Analyse wurden die Horizonte mit einer Mächtigkeit von mehr als 10 cm in Unterproben mit einer Mächtigkeit von ca. 5 cm unterteilt und beprobt. In Tab. 7 sind die Aufteilung des Profils in die verschiedenen Horizonte, die weitere Untergliederung sowie einige der **physikalischen und chemischen Bodenparameter** dargestellt.

Tab. 7: Ausgewählte physikalische und chemische Bodeneigenschaften des untersuchten Typic Historthel.

Horizont ^b	Tiefe (cm)	Korngrößenverteilung			Bodenart ^b	Bodenfarbe ^c	Wurzeln ^b	C _t ^d (%)	N ^d (%)	C/N ^e	Corg. ^d			
		(%)										Sand	Schluff	Ton
Oi	0 - 5				-	-	viele	18,7	0,5	37	18,3			
	5 - 10				-	-	viele	14,2	0,4	33	14,2			
	10 - 17				-	-	viele	13,8	0,4	38	13,7			
A	17 - 20	77	15	8	sandiger Lehm	10YR 2/1	viele	9,3	0,2	42	9,3			
Bg 1	20 - 23	76	18	6	sandiger Lehm	2,5Y 4/4	häufig	7,1	0,2	38	7,0			
Bg 2	23 - 30	69	26	5	sandiger Lehm	10YR 3/2	einige	4,6	0,2	29	4,6			
	30 - 35	68	27	5	sandiger Lehm	10YR 3/2	einige	3,6	0,1	25	3,6			
Bg 3	35 - 40	65	29	6	sandiger Lehm	10YR 4/2	keine	4,3	0,2	24	4,3			
	40 - 45	60	33	7	sandiger Lehm	10YR 4/2	keine	4,9	0,2	23	4,9			

^a Die Bodenklassifikation wurde nach dem System der US Soil Taxonomy [SOIL SURVEY STAFF, 1998] vorgenommen.

^b Die Klassifikationen wurden nach SCHOENEGER et al. [2002] durchgeführt.

^c Die Bestimmung der Bodenfarbe wurde anhand des MUNSELL *Soil Colour Chart* vorgenommen.

^e Kohlenstoff/Stickstoff-Gewichtsverhältnis

Eine genauere Aufschlüsselung der **Korngrößen** in ihre Unterfraktionen ist der im Anhang aufgeführten Tabelle Tab. A 1 zu entnehmen. Der mit der Tiefe zunehmende Schluffanteil der mineralischen Fraktion führt im Bodenartendiagramm nach SCHÖNEBERGER [2002] zu keiner Veränderung der Bodenart. Die detailliertere Einteilung der Bodenarten in der deutschen Kartieranleitung nach AG BODEN [1994] gibt die fühlbare Veränderung der Korngrößenverteilung besser wieder, da hier die Bodenart im Bg2 und Bg3 von *'schwach lehmigem Sand'* zu *'mittel schluffigem Sand'* wechselt.

Die 1998 von FRIEDRICH [2001] installierte Anlage zur Messung der Bodentemperatur zeichnete kontinuierlich die Bodentemperatur in verschiedenen Tiefen auf. Die minimale Wintertemperatur wurde mit -37°C in einer Tiefe von 7 cm gemessen. Mit zunehmender Tiefe kühlte der Boden weniger stark aus, so dass in 42 cm Tiefe die geringste Temperatur -29°C betrug. Der Bodenbereich oberhalb 23 cm war während 8 Monaten gefroren, während die unteren Horizonte für 9-10 Monaten gefroren waren. Die in Tab. 8 für die unterschiedlichen Horizonte dargestellte Augusttemperatur zeigt, dass die oberen Horizonte sich im Sommer deutlich stärker erwärmen und durch die Sonneneinstrahlung Temperaturen über 10°C erreichen.

Tab. 8: Augusttemperaturen in verschiedenen Bodentiefen des untersuchten *Typic Historthel*.

Tiefe (cm)	Temperatur (°C) im August (Mittelwert min./max.)					
	1998		1999		2001	
7	4,2	0,7 / 12,8	5,1	1,8 / 11,1	4,2	0,8 / 11,4
13	2,4	0,8 / 5,3	3,6	-0,6 / 8,6	x	x
23	1,7	0,0 / 3,2	x	x	x	x
32	0,9	0,4 / 1,7	1,9	-1,6 / 3,2	2,2	1,3 / 4,0
42	0,3	-0,6 / 0,6	0,9	0,4 / 4,1	1,2	0,6 / 2,1

x = Ausfall des Temperatursensors

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die einzelnen Horizonte (Oi, A, Bg1-3) durch unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften charakterisiert sind. Durch diese Unterschiede stellen sie auch für die in ihnen lebenden Mikroorganismen unterschiedliche Habitate dar.

4.2 Quantitative Charakterisierung der mikrobiellen Population mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

4.2.1 Quantifizierung der Gesamtzellzahlen und der aktiven Bakterien im Permafrostboden

Die durch DTAF-Färbung (Dichlorotriazinylaminofluoreszein) ermittelte Gesamtzellzahl variierte in den verschiedenen Bodenhorizonten zwischen $1,2 \times 10^8$ und $23,0 \times 10^8$ Zellen g^{-1} . Alle Angaben beziehen sich auf das Trockengewicht des Bodens. Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, waren die Gesamtzellzahlen in den oberen 5 cm am größten ($23,0 \times 10^8$) und nahmen mit zunehmender Tiefe exponentiell ($r^2 = 0,9711$) ab. Im untersten untersuchten Horizont (40-45 cm), entsprach die Zellzahl mit $1,2 \times 10^8$ Zellen g^{-1} gerade noch 5% der im obersten Horizont gefundenen Zellzahl.

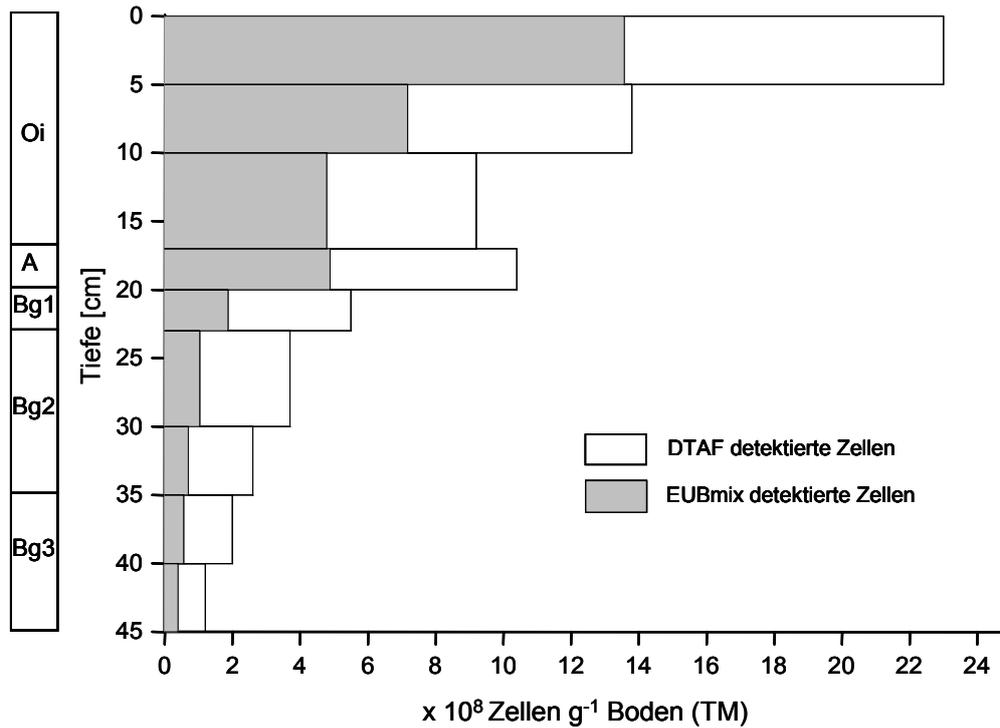


Abb. 17: Vertikales Profil der absoluten Bakterienzahlen und dem Anteil an aktiven Zellen die im untersuchten *Typic Historthel* nachgewiesen wurden.

Ebenso wie die Gesamtzellzahlen nahm auch die Menge der mit der Sondenkombination EUBmix hybridisierten Zellen mit zunehmender Tiefe exponentiell ($r^2=0,963$) ab. EUBmix soll alle Mitglieder der Domäne *Bacteria* markieren, die einen genügend hohen Ribosomengehalt aufweisen. Einige Beispiele für die Markierung der aktiven Zellen durch EUBmix finden sich im Anhang (Abb. A 1). Während im obersten Horizont noch Zellzahlen von $13,6 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ markiert wurden, konnten im untersten Horizont nur noch $0,4 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ gefunden werden (Abb. 17). Das bedeutet, dass im obersten Horizont 59% der Gesamtzellzahl mit EUBmix nachgewiesen werden konnten, während in den Horizonten unterhalb 20 cm nur noch ungefähr 30% der Zellen durch EUBmix markiert wurden.

4.2.2 Unterschiede der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften zwischen den verschiedenen Horizonten

Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften der verschiedenen Horizonte zu analysieren, wurden verschiedene phylogenetische Gruppen quantifiziert. Die in Kapitel 3.3.4.2 beschriebene dreifache Markierung der gesuchten Zellen ist in Abb. 18 exemplarisch dargestellt.

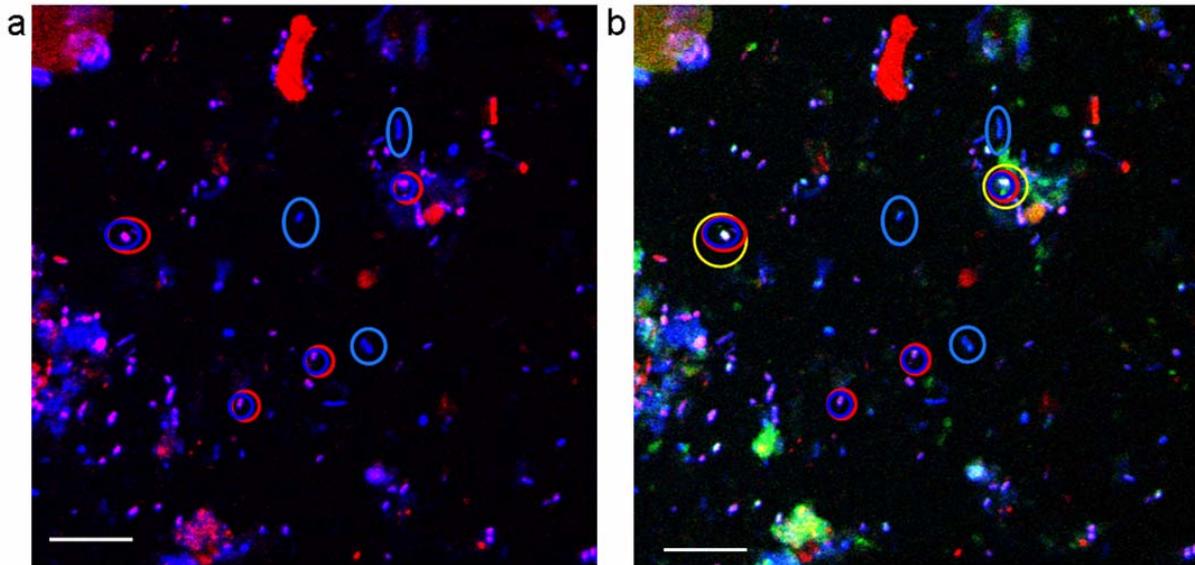


Abb. 18: Aufnahmen der Hybridisierung eines identischen mikroskopischen Feldes, mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops. Die hybridisierte Bodenprobe stammt aus den oberen 5 cm. a) stellt in blau die von DTAF gefärbten Zellen und in rot die von der Sonde EUBmix mit Cy5 markierten Zellen dar. b) zeigt zusätzlich zu den in a) dargestellten Kanälen die Markierung der *Cytophaga-Flavobacterium* Zellen durch den an die Sonde CF gebundenen Farbstoff Cy3. Die nur von DTAF markierten Zellen erscheinen blau, die zweifach markierten aktiven Eubakterien erscheinen lila und die dreifach markierten *Cytophaga-Flavobacterium* Zellen erscheinen gelb, beispielhaft sind einige der mit einem, zwei oder drei Farbstoffen markierten Zellen mit farbigen Ringen markiert. Der eingezeichnete Maßstab entspricht einer Strecke von 10 μm .

Durch die Dreifache Markierung der Zellen wurde eine klare Differenzierung zwischen autofluoreszierenden Bodenpartikeln und Bakterienzellen ermöglicht. Weitere Beispiele für die spezifische Markierung der Zellen durch DATF, Cy3 und Cy5 sind in Abb. 19 dargestellt.

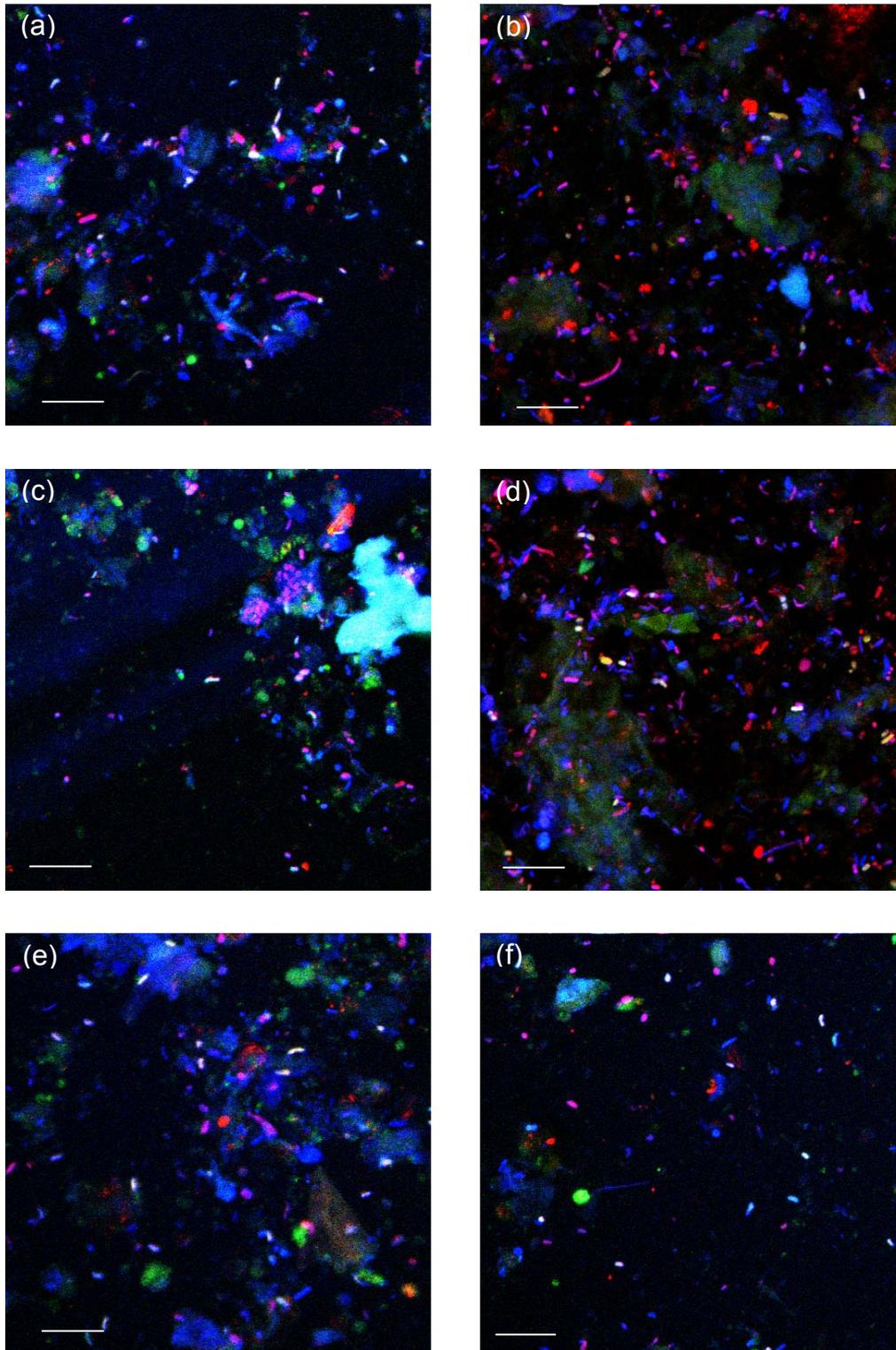


Abb. 19: Aufnahmen der dreifachen Hybridisierung verschiedener Bodenproben mit DTAF, Cy3 und Cy5 mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops. Blau markiert sind Zellen, die nur von DTAF markiert wurden, die zweifach markierten aktiven Eubakterien erscheinen lila und die dreifach mit DAPI, Cy3 und der spezifischen, mit Cy 5 markierten Sonde erscheinen gelb. a) Bodentiefe 0-5 cm, Betaproteobacteria-Sonde. b) Bodentiefe 0-5 cm, Gammaproteobacteria-Sonde. c) Bodentiefe 5-10 cm, Betaproteobacteria-Sonde. d) 5-10 Gammaproteobacteria-Sonde. e) Bodentiefe 10-17 cm, HGC-Sonde. f) Bodentiefe 17-20 cm HGC-Sonde. Der eingezeichnete Maßstab entspricht einer Strecke von 10 μm .

Wie groß der mit den spezifischen Sonden gefundene Anteil der einzelnen Gruppen an der mit DTAF gefundenen Gesamtzellzahl ist, wird in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Absolute Bakterienzahlen in den verschiedenen Horizonten des untersuchten Typic Historthel nach DTAF-Färbung, sowie die relativen Anteile der verschiedenen phylogenetischen Gruppen an der Gesamtzellzahl.

Tiefe (cm)	Absolute Zellzahlen $\times 10^8$ [Zellen g^{-1}] (Mittelwert \pm SD)	% der DTAF entdeckten Zellen (Mittelwert \pm SD) markiert mit den spezifischen Proben ^a :								% entdeckte <i>Eu-</i> <i>bacteria</i> ^b
		EUB mix	ALF968	BET42a	CF mix	GAM42a	HGC69a	LGC mix	ARC915	
0-5	23,0 \pm 7,8	59 \pm 12	1,3 \pm 1,2	11,7 \pm 3,2	8,4 \pm 5,6	3,3 \pm 0,7	4,3 \pm 2,3	5,7 \pm 2,0	0,5 \pm 0,7	34,7
5-10	13,8 \pm 3,3	52 \pm 7	0,5 \pm 0,9	6,3 \pm 1,2	3,4 \pm 3,2	9,8 \pm 2,1	7,5 \pm 2,3	1,0 \pm 1,0	22,4 \pm 30,0	29,0
10-17	9,2 \pm 2,9	52 \pm 10	5,5 \pm 2,2	11,9 \pm 2,4	5,1 \pm 5,1	3,2 \pm 1,2	10,0 \pm 4,4	7,7 \pm 7,1	9,9 \pm 23,3	44,0
17-20	10,4 \pm 3,2	47 \pm 16	1,1 \pm 1,3	9,5 \pm 0,8	0,4 \pm 1,0	2,9 \pm 0,8	12,6 \pm 3,2	3,1 \pm 2,6	5,2 \pm 11,1	31,9
20-23	5,5 \pm 2,1	34 \pm 6	2,1 \pm 1,5	4,7 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	5,6 \pm 2,5	10,8 \pm 5,8	3,2 \pm 2,2	7,2 \pm 16,6	28,5
23-30	3,7 \pm 1,5	28 \pm 6	2,8 \pm 3,5	3,4 \pm 1,0	1,1 \pm 1,1	0,0 \pm 0,0	4,7 \pm 3,3	0,4 \pm 0,8	2,6 \pm 5,8	12,2
30-35	2,6 \pm 0,7	27 \pm 10	0,4 \pm 0,9	5,2 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,9	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,8	0,9 \pm 2,4	17,2
35-40	2,0 \pm 0,7	28 \pm 5	0,2 \pm 0,6	5,5 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,5	2,2 \pm 1,2	1,2 \pm 1,8	8,1 \pm 19,3	15,2
40-45	1,2 \pm 0,5	33 \pm 8	3,8 \pm 1,8	2,9 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	4,9 \pm 2,4	0,1 \pm 0,4	1,0 \pm 1,8	12,2

^a Prozent der markierten Zellen in Relation zu den mit DTAF gefundenen absoluten Zellzahlen. Die Sondennamen sind Abkürzungen der in Tab. 3 aufgeführten Sondenbezeichnungen.

^b Die Werte ergeben sich aus der Addition der Zellzahlen, die mit den oben aufgeführten Sonden (mit Ausnahme der ARC Sonde) entdeckt wurden.

Im Unterschied zu der Verteilung der Gesamtzahl der mit EUBmix gefundenen ‘aktiven’ Bakterien, die mit zunehmender Tiefe exponentiell abnahm, konnte für keine der phylogenetischen Hauptgruppen eine klare exponentielle Abnahme mit der Tiefe gefunden werden (Abb. 20).

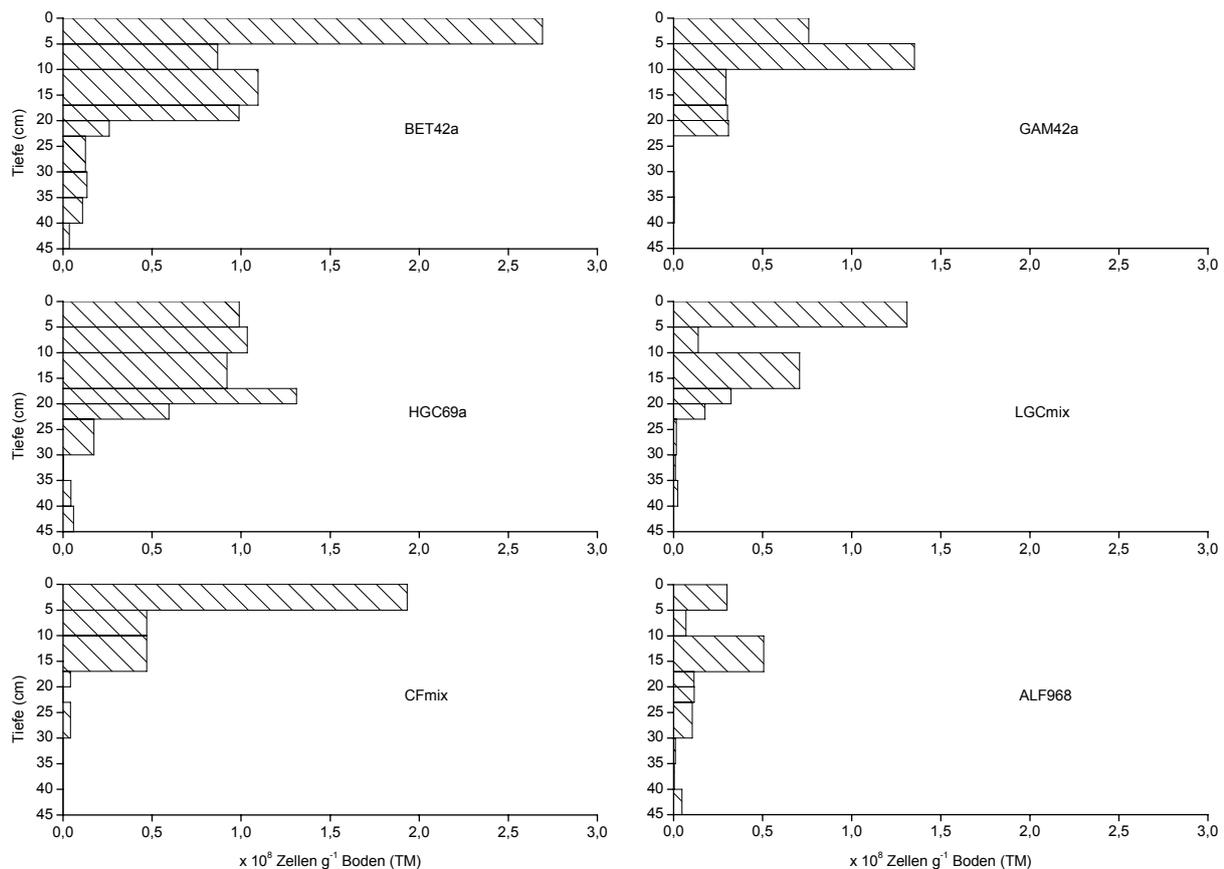


Abb. 20: Vertikales Profil der Zellzahlen der einzelnen phylogenetischen Gruppen, die mit den spezifischen Sonden gefunden wurden. Die Sondennamen und ihre Zielgruppen sind in Tab. 3 erläutert.

Für keine der einzelnen Bakteriengruppen lässt sich ein so klarer Zusammenhang zwischen dem Gehalt an organischer Substanz und der Zellzahl herstellen wie für die gesamte Domäne *Bacteria*. Die γ -*Proteobacteria* zum Beispiel hatten ihre größte Abundanz im Horizont unterhalb der oberen 5 Zentimeter, während die Anzahl der gram-positiven Zellen mit hohem G + C-Gehalt in den gesamten oberen 20 Zentimetern annähernd gleich hoch blieb (etwa $1 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$).

Die Vorkommen der einzelnen Gruppen unterschieden sich zum einen in den Gesamtzellzahlen die im gesamten Profil vorkamen. So wurden beispielsweise deutlich mehr β -*Proteobacteria* als α -*Proteobacteria* im Profil gefunden. Zum anderen unterschieden sich die Gruppen aber auch deutlich in der Verteilung der Zellen im Bodenprofil (Abb. 20).

So kommen Mitglieder der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe nur in den aeroben oberen 17 cm des Bodens vor. Dort enthielten die oberen 5 cm den höchsten Anteil an organischem Material und wiesen die größte Zellzahl dieser Gruppe auf. Dagegen wurden in den

wassergesättigten und damit anaeroben Horizonten nahezu keine Zellen dieser Gruppe mehr gefunden.

Die unterschiedlichen Abundanzen der einzelnen phylogenetischen Gruppen, die in Abb. 20 dargestellt sind, führen zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der in den verschiedenen Horizonten aktiven Bakteriengemeinschaften. In Abb. 21 sind diese Gemeinschaften für die einzelnen Horizonte dargestellt.

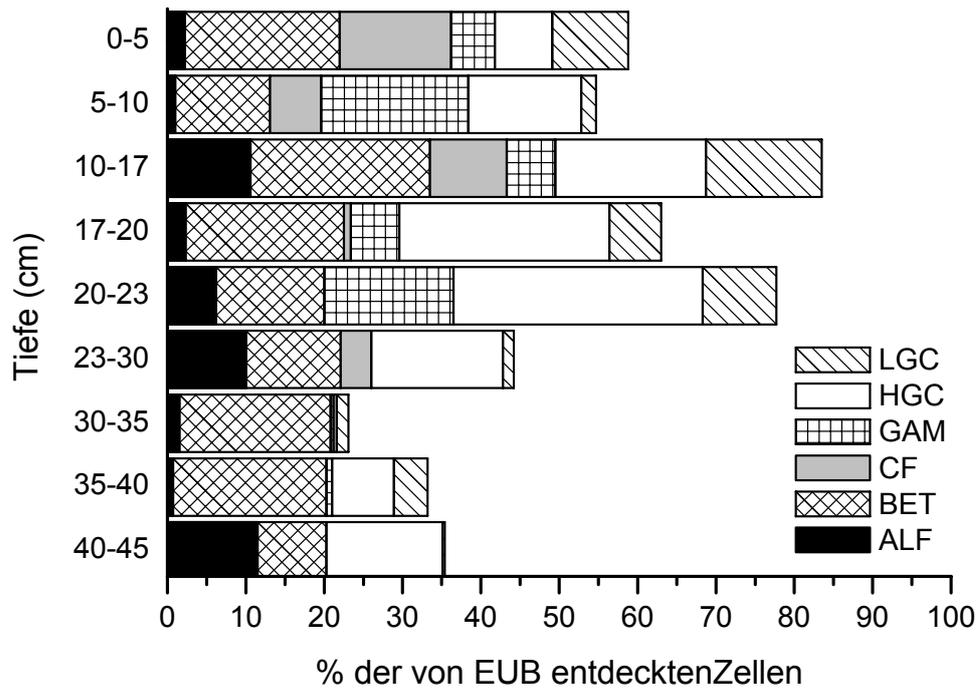


Abb. 21: Zusammensetzung der aktiven Organismengemeinschaft in den verschiedenen Horizonten des *Typic Historthel*. Sondenspezifische Zellzahlen relativ zu den mit EUBmix gefundenen Zellzahlen. Die Sondennamen sind Abkürzungen der in Tab. 3 aufgeführten Sonden.

Mit den eingesetzten Sonden konnten zwischen 12,2% und 44,0% der mit DTAF entdeckten Zellen nachgewiesen werden (Tab. 9). In den oberen 23 cm lag diese Rate zwischen 44,0% und 28,5%, in Horizonten unterhalb 23 cm zwischen 17,2% und 12,2%. Das bedeutet, dass oberhalb von 23 cm der Großteil (55-84%) der aktiven von EUBmix entdeckten Zellen einer bestimmten phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden konnte (Abb. 21), während unterhalb 23 cm nur noch 23% - 44% der aktiven Zellen mit den Sonden einer bestimmten phylogenetischen Gruppe nachgewiesen werden konnten.

Zusätzlich dazu änderte sich die Zusammensetzung der entdeckten Zellen. Zwar sind im gesamten Bodenprofil die *β-Proteobacteria* und die gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt die dominierenden Gruppen. Aus Abb. 21 wird jedoch die größere Diversität der Bakterienzusammensetzung in den oberen Horizonten ersichtlich. So konnten in den

oberen Horizonten je zwei dominante Gruppen sowie zwei weitere Gruppen mit relevanten Zellzahlen nachgewiesen werden. In den oberen fünf Zentimetern war zum Beispiel die Gruppe der *β-Proteobacteria* mit einem Anteil von 20% an allen mit EUBmix entdeckten Zellen die größte, gefolgt von der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe (14%). Außerdem wurden hier drei andere Gruppen mit Anteilen zwischen 6% und 14% gefunden. Die Zusammensetzung der gesamten aktiven Zellen ist in den oberen Horizonten demnach relativ gleichmäßig auf mehrere Gruppen verteilt. Mit zunehmender Bodentiefe nimmt diese Gleichmäßigkeit ab, beziehungsweise einige der in den oberen Horizonten vertretenen Gruppen sind gar nicht mehr nachzuweisen.

4.2.3 Quantifizierung der *Archaea* in den verschiedenen Horizonten

Die Quantifizierung der Domäne *Archaea* erwies sich als schwieriger und zeigte höhere Standardabweichungen (Tab. 9) als die der *Bacteria*. Da hier die Zellen die mit der ARC915-Sonde nachgewiesen werden konnten, besonders in den oberen Horizonten sehr häufig in Aggregaten vorlagen. Es konnten zwei Arten von Aggregaten unterschieden werden. Diese sind in Abb. 22 und Abb. 22 dargestellt.

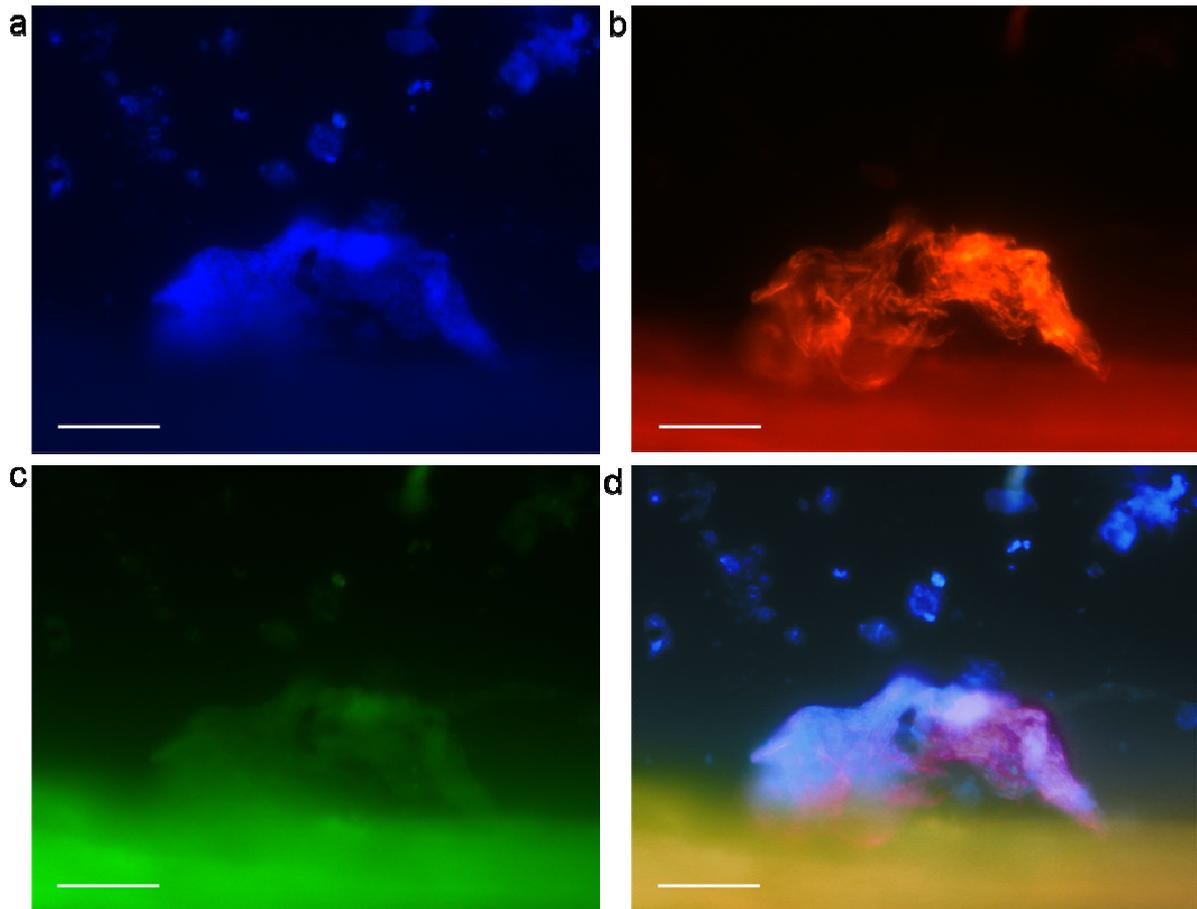


Abb. 22: Die Fotos zeigen ein Aggregat von *Archaea*, das mit der Sonde ARC markiert wurde. Die Probe stammt aus der Bodentiefe 5-10 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld, mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) zeigt die Färbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI. b) zeigt die Anfärbung der *Archaea*-Zellen durch die Sonde ARC915, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. c) zeigt die Autofluoreszenz eines Stückchens organischer Substanz der Bodenprobe bei Anregung im blauen und Absorption im grünen Wellenlängenbereich. Die Zellen zeigen keine Autofluoreszenz. d) ist das kombinierte Bild aller drei übereinander gelagerter Aufnahmen. Der Balken repräsentiert ein Strecke von 10 μm .

Die Abb. 22 zeigt ein Aggregat aus ungefähr 400 stäbchenförmigen Einzelzellen. Die einzelnen Zellen hatten Längen von ca. 1 – 1,5 µm. In Abb. 25 ist die zweite Art der Aggregatbildung gezeigt, hier erkennt man verschiedene, sarcinoid angeordnete Zellen.

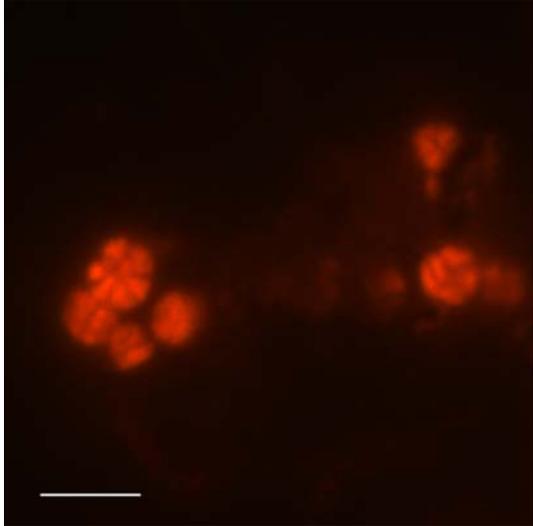


Abb. 23: Aufnahme einer Ansammlung von Zellen, die mit der Sonde ARC markiert wurden. Die Bodenprobe stammt aus der Bodentiefe 10 cm.

Die in Abb. 22 gezeigten Aggregate wurden nur im Bodenbereich von 5-17 cm gefunden, während die sarcinoid angeordneten Zellen (Abb. 23) auch noch in tieferen Bereichen gefunden wurden, dann allerdings in deutlich kleineren Ansammlungen. Die Aggregate waren selbst durch die zur Homogenisierung vorgenommenen Ultraschallbehandlung (3.3.2) nicht zu trennen. Eine Grundvoraussetzung für eine zuverlässige Zellzählung ist jedoch eine homogene Verteilung der Zellen auf jedem Objekträgerfeld.

Die durch Anfärben mit der *Archaea*-Sonde ermittelten Zellzahlen sind in Abb. 24 dargestellt. Die meisten *Archaea* wurden im Oi-Horizont zwischen 5 und 10 cm gefunden. Die Anzahl der gefundenen Zellen in diesem Horizont lag bei ca. $3,0 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 22 % der gesamten, mit DTAF quantifizierten, Zellen (Tab. 9). Die Anzahl der *Archaea* war auch in der Bodentiefe von 10 bis 23 cm höher als in den oberen 5 cm.

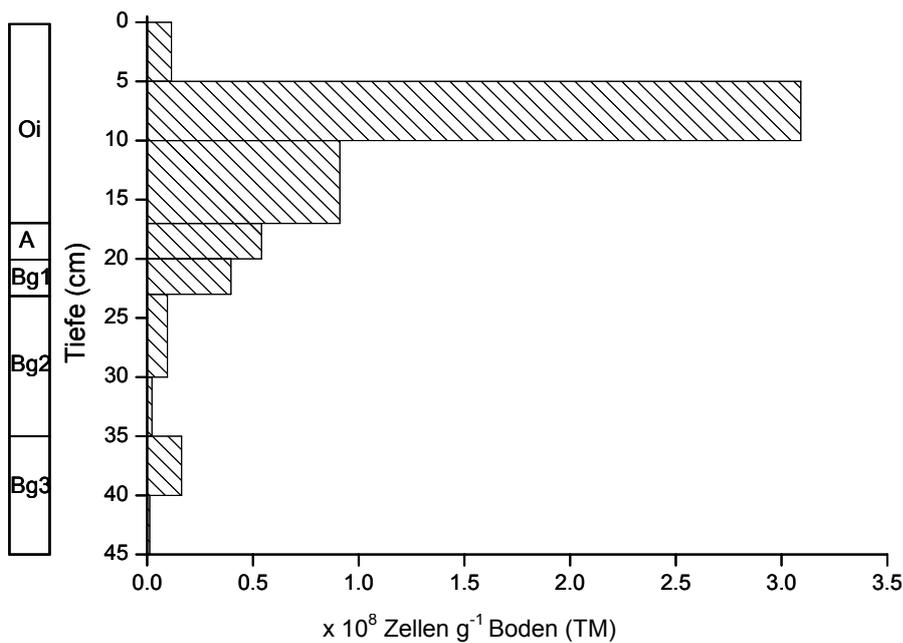


Abb. 24: Vertikales Profil der *Archaea*-Zellzahlen, die mit der Sonde ARC915 im untersuchten Centerprofil nachgewiesen wurden.

Im Folgenden werden die Zellzahlen, die mit der ARC915-Sonde ermittelt wurden, als **methanogene** *Archaea* diskutiert. Um dies zu rechtfertigen, wurden Proben aus den oberen 17 cm zusätzlich mit der Sonde MER1 [HALES et al. 1995], die spezifisch an die rRNA von methanogenen *Archaea* bindet, hybridisiert. Diese Hybridisierung ergab die gleichen Ergebnisse wie die Hybridisierung mit ARC915.

Die Bodentiefe in der die meisten Methanogenen gefunden wurden, befand sich zum Zeitpunkt der Probennahme oberhalb des Wasserspiegels und somit nicht im anaeroben Bereich des Bodens. Die Horizonte unterhalb des Oi-Horizontes bieten zwar konstant anaerobe Bedingungen, dennoch wurden hier mit zunehmender Tiefe abnehmende Zellzahlen methanogener *Archaea* nachgewiesen.

4.3 Charakterisierung der Population der methanogenen *Archaea*

Die mikroskopische Untersuchung der drei Proben auf Anwesenheit der verschiedenen methanogenen Gruppen, ergab für die verschiedenen Horizonte unterschiedliche Bilder. In allen Anreicherungen wurden neben den methanogenen *Archaea* auch Eubakterien mit der Sonde EUBmix nachgewiesen. In Tab. 10 ist dargestellt welche spezifischen Sonden, in den verschiedenen Anreicherungen, Zellen markieren konnten.

Tab. 10: Ergebnisse der FISH für die aus verschiedenen Bodentiefen angereicherten Proben methanogener *Archaea*.

Bodentiefe	MB 1174	MG 1200	MSMX 860	MS 1414	MS 821	MX 825
5-10 cm	Vereinzelte lange, schmale Stäbchen	Kein Signal	Zahlreiche, große Aggregate	Zahlreiche, große Aggregate	Zahlreiche, große Aggregate	Kein Signal
17-20 cm	Kein Signal	Diplokokken, Zellketten, Zellpakete	Kleine Aggregate	Kleine Aggregate	Kleine Aggregate	Kein Signal
40-45 cm	Kein Signal	Kein Signal	Kleine Aggregate	Kleine Aggregate	Kleine Aggregate	Kein Signal

Die Probe aus der Tiefe von 0-5 cm enthielt zu ungefähr 70 % verschieden geformte Zellen der Domäne *Eubacteria*. Die methanogenen Zellen wurden ganz eindeutig durch das Auftreten großer Aggregate von sarcinoid angeordneten Zellen bestimmt. Diese Zellen wurden mit der Sonde MS 821 der Gattung *Methanosarcina* zugeordnet. Auch die unspezifischeren Sonden für die Familie *Methanosarcinaceae* und die Ordnung *Methanosarcinales* zu der die *Methanosarcina* gehören, markierten demnach diese Zellpakete. Neben diesen, in Abb. 25 dargestellten, Paketen wurden in der obersten Probe auch noch schmale stäbchenförmige Zellen der Familie *Methanobacteriacea* nachgewiesen.

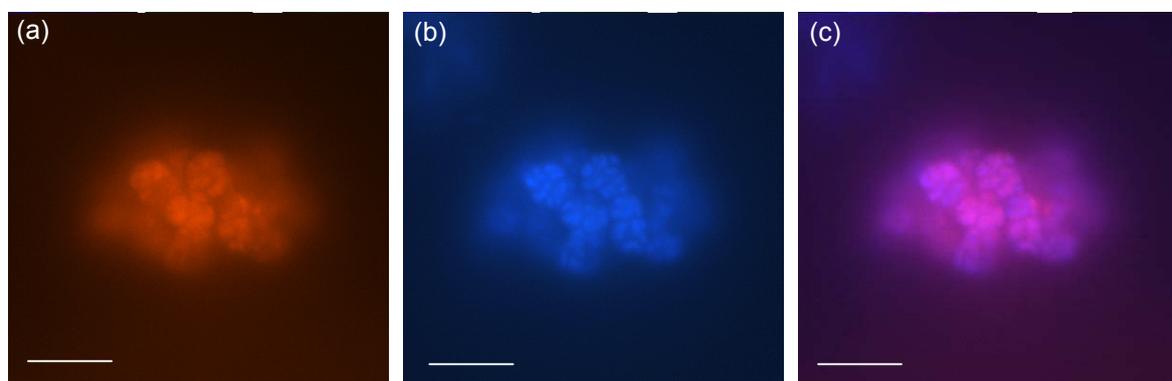


Abb. 25: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 0-5 cm. Aufgenommen ist das identische mikroskopische Feld, mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) zeigt die Anfärbung der Zellen der Gattung *Methanosarcina* durch die Sonde MS 821, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. b) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI c) ist das kombinierte Bild der zwei übereinander gelagerten Aufnahmen. Der Balken repräsentiert eine Strecke von 5 μm .

Die Anreicherung der Bodenprobe aus 17-20 cm Bodentiefe zeigte ein anderes Bild. In ihr wurden nur wenige *Methanosarcina* Zellen gefunden, zusätzlich wurden mit der spezifischen Sonde MG 1200 Zellen der Ordnung *Methanomicrobiales* markiert. Diese Zellen lagen meist als Diplokokken oder Ketten (Abb. 26b), selten als einzelne Kokken vor.

Auffällig in den Proben aus diesem Horizont war das Auftreten vieler kurzer, stäbchenförmiger Zellen, die bei Anregung im blauen Wellenlängenbereich und Absorption im grünen Bereich eine starke Autofluoreszenz aufwiesen (Abb. 26d). Diese Zellen waren ungefähr 2 μm lang und 1 μm breit, mit DAPI nur sehr schlecht und weder mit der ARC- noch mit der EUB-Sonde anfärbbar. Sie besaßen, wie in Abb. 26c + d zu erkennen ist, eine sehr dicke Zellwand. Diese kräftige Zellwand könnte auch der Grund sein, warum weder DAPI noch eine Sonde in die Zellen gelangen konnten. Die Abbildung Abb. 26 zeigt die zahlenmäßige Dominanz dieser in grün abgebildeten Zellen in der Probe.

Außerdem waren in der Probe Eubakterien zu finden, die häufig als schmale lange Stäbchen auftraten. Sie sind in der Abbildung (Abb. A 3b) zu erkennen.

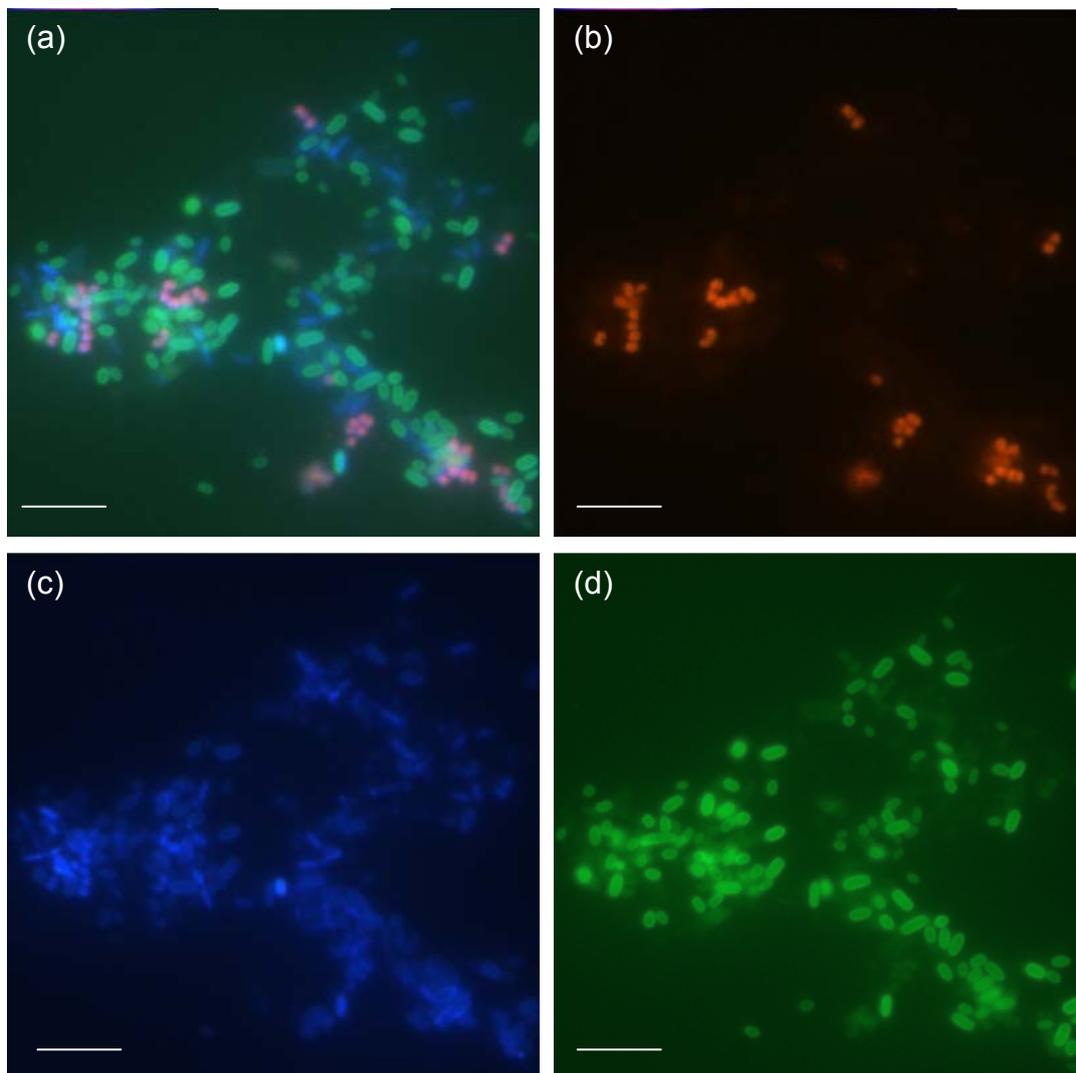


Abb. 26: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld, mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) ist das kombinierte Bild aller drei übereinander gelagerter Aufnahmen b) zeigt die Anfärbung der Zellen der Ordnung *Methanomicrobiales* durch die Sonde MG 1200, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. c) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI. d) zeigt die Autofluoreszenz einer ansonsten nicht anfärbbaren Gruppe von Zellen, bei Anregung im blauen und Absorption im grünen Wellenlängenbereich. Der Balken repräsentiert eine Strecke von 5 μm .

Die Anreicherungen aus der Bodentiefe 40-45 cm enthielten, wie schon die Anreicherungen aus 17-20 cm Bodentiefe, dickwandige Zellen die eine starke Autofluoreszenz aufwiesen, aber nicht zu hybridisieren und mit DAPI nur sehr schwach anfärbbar waren. Mit den spezifischen Sonden wurden Zellen der Gattung *Methanosarcina* gefunden. Diese lagen in wesentlich kleineren Aggregaten beieinander als in der Anreicherung der Tiefe 0-5 cm. Die *Methanosarcina* waren die einzige methanogene Gruppe die mit den Sonden markiert werden konnte.

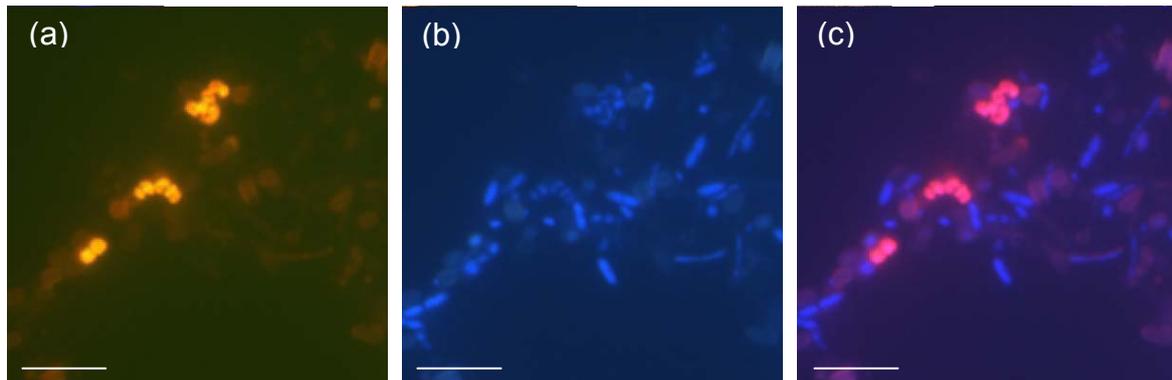


Abb. 27: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 40-45 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld, mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) zeigt die Anfärbung der Zellen der Gattung *Methanosarcina* durch die Sonde MS 821, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. b) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI c) ist das kombinierte Bild der zwei übereinander gelagerten Aufnahmen. Der Balken repräsentiert eine Strecke von 5 μm .

In den Anreicherungen aus den drei Bodentiefen wurden demnach verschiedene methanogene *Archaea* gefunden. In der obersten Probe konnten zwei verschiedene Gruppen nachgewiesen werden, während in den unteren Proben jeweils eine methanogene Gruppe gefunden wurde.

4.4 Das physiologische Profil der Bakteriengemeinschaften der verschiedenen Horizonte

4.4.1 Unterschiede der Gesamtrate des Substratumsatzes zwischen den verschiedenen Horizonten

Nach der Animpfung der Platten mit den aus den verschiedenen Horizonten extrahierten Bakteriengemeinschaften, benötigten die Proben eine unterschiedlich lange Inkubationszeit bis ein erster Substratumsatz durch beginnende Farbentwicklung angezeigt wurde. Außerdem war erkennbar, dass sich die einzelnen Proben sowohl in der Stärke ihrer gesamten Farbentwicklung als auch in der Verteilung der Farbentwicklung auf die verschiedenen Substrate voneinander unterschieden. Bevor, mit Hilfe der auf den einzelnen Platten entstandenen Muster des Substratumsatzes, die physiologischen Profile der verschiedenen Proben verglichen werden, sollen die Proben zunächst hinsichtlich der Gesamtraten des

Substratumsatzes betrachtet werden. Die Abb. 28 und Abb. 29 zeigen den Verlauf der durchschnittlichen Farbentwicklung (AWCD) der einzelnen Proben im aeroben und anaeroben Versuchsansatz.

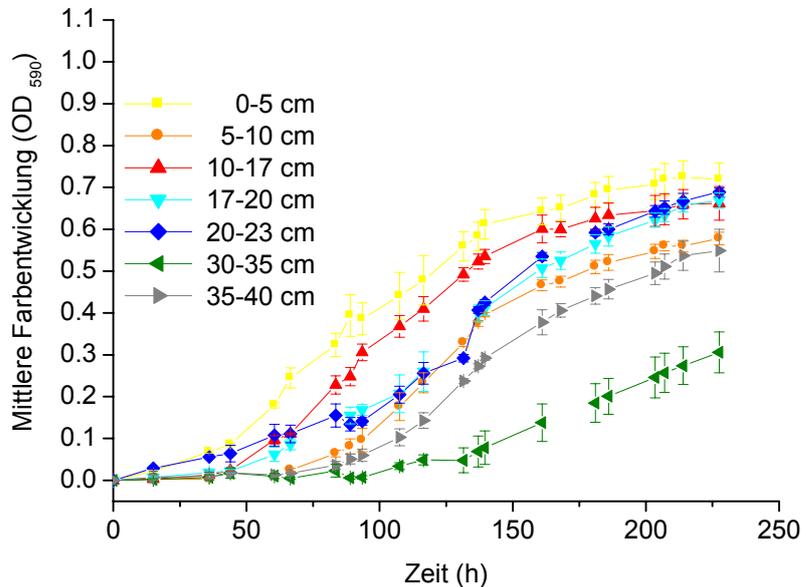


Abb. 28: Verlauf der durchschnittlichen Farbentwicklung (AWCD) für die einzelnen Horizonte im aeroben Ansatz. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (n=3).

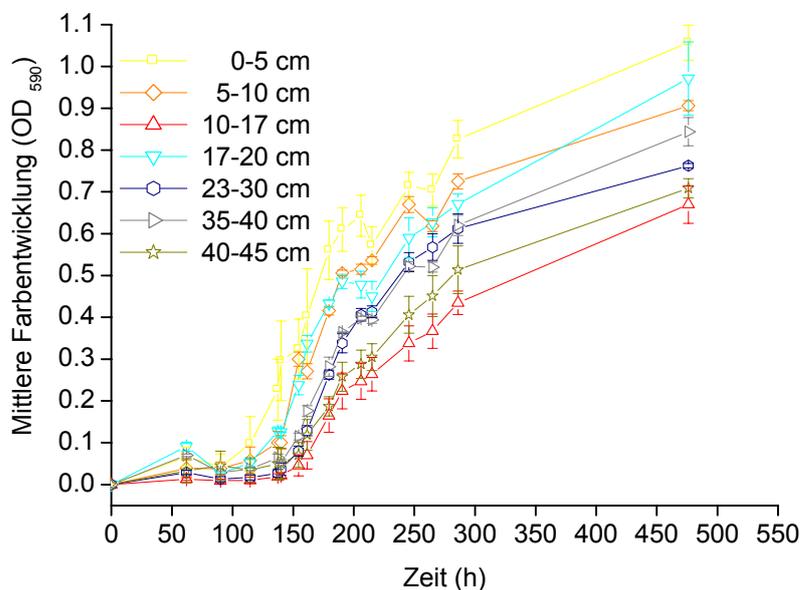


Abb. 29: Verlauf der durchschnittlichen Farbentwicklung (AWCD) für die einzelnen Horizonte im anaeroben Ansatz. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (n=3).

Obwohl alle Mikrotiterplatten mit gleicher Zellzahl angeimpft worden waren, wichen die Verläufe der Gesamtraten der Farbentwicklung auf den einzelnen Platten stark voneinander ab.

Zum einen unterschied sich die Entwicklung der Gesamtrate der Farbentwicklung zwischen aerobem und anaerobem Probensatz. Unter anaeroben Bedingungen, bei denen fakultativ anaerobe Bakterien für den Hauptsubstratumsatz verantwortlich sind, lief der Substratumsatz langsamer ab und es kam vor der ersten Farbentwicklung zu einer längeren Anlaufphase als bei den unter aeroben Bedingungen inkubierten Proben.

Außerdem gab es auch innerhalb der Proben der beiden Ansätze Unterschiede in der Gesamtrate der Farbentwicklung. Bis auf wenige Ausnahmen setzte der Substratumsatz sowohl in den aeroben Proben als auch bei den anaeroben Proben in den oberen Horizonten früher ein und wies zu allen Messzeitpunkten eine höhere Gesamtumsatzrate auf als in den unteren Horizonten. Da alle Platten mit gleichen Zellmengen (5×10^7 Zellen ml^{-1}) angeimpft wurden, ist die kürzere Inkubationszeit der oberen Horizonte nicht auf Unterschiede der absoluten Zellzahlen zurückzuführen. Vielmehr wird sie durch die, schon mit FISH festgestellten (Absatz 4.2.1), größeren Anteile **aktiver** Zellen in den oberen Horizonten hervorgerufen.

Bei einem Vergleich von Proben bei gleichem Inkubationszeitpunkt kann durch die unterschiedliche Gesamtumsatzrate der verschiedenen Proben ein völlig falsches Ergebnis der Unterschiede des physiologischen Profils entstehen [BUYER et al. 2001]. In diesem Fall gibt ein Vergleich bei gleichem Zeitpunkt durch die unterschiedliche Stärke der gesamten Farbentwicklung zwar Hinweise auf die unterschiedlichen Anteile an aktiven Zellen, ist aber nicht geeignet die Verteilungsmuster des Substratumsatzes auf den verschiedenen Platten miteinander zu vergleichen. In diesem Fall könnten selbst bei zwei sich identisch verhaltenden Platten, die sich nur in der Menge der aufgetragenen Bakterien unterscheiden, unterschiedliche Substratverteilungen festgestellt werden.

Um zu entscheiden ob sich die Bakteriengemeinschaften der aktiven Zellen auch in der Art des Substratumsatzes voneinander unterscheiden, wurden daher die Muster des Substratumsatzes bei gleichem AWCD-Wert (also gleicher Gesamtrate) miteinander verglichen.

4.4.2 Unterschiede in der Qualität des Substratumsatzes zwischen den verschiedenen Horizonten

Die physiologischen Möglichkeiten des Kohlenstoffumsatzes der Bakteriengemeinschaften der verschiedenen Horizonte wurden zu einem sehr frühen Zeitpunkt (AWCD der einzelnen Probe = 0,2) sowie zu einem etwas späteren Zeitpunkt (AWCD der einzelnen Proben = 0,5) miteinander verglichen.

Im Frühstadium der Inkubation

Für einen Vergleich der Proben zu einem frühen Zeitpunkt, bei dem die Beeinflussung der ursprünglichen Bakteriengemeinschaft durch das auf den Platten stattfindende Wachstum möglichst gering sein sollte, wurden die Proben miteinander verglichen wenn sie jeweils einen AWCD-Wert von 0,2 ($\pm 0,01$) erreicht hatten. Diesen Wert der durchschnittlichen Gesamtumsatzrate erlangten die aeroben Proben, bis auf eine Ausnahme, nach einer Inkubationszeit von 63 bis 133 h. Die anaerob inkubierten Proben erreichten diesen Wert nach 135 bis 190 Stunden.

Bei der Aufbereitung der Daten durch die Hauptkomponentenanalyse konnten durch die ersten vier der dabei festgelegten Achsen für die aeroben Proben 74 % und für die anaeroben Proben 76% der Gesamtvarianz erklärt werden (Tab. A 1 und Abb. A 6). Die in Abb. 30 dargestellten beiden ersten Achsen erklärten dabei bereits 46 % bzw. 55 % der Gesamtvarianz.

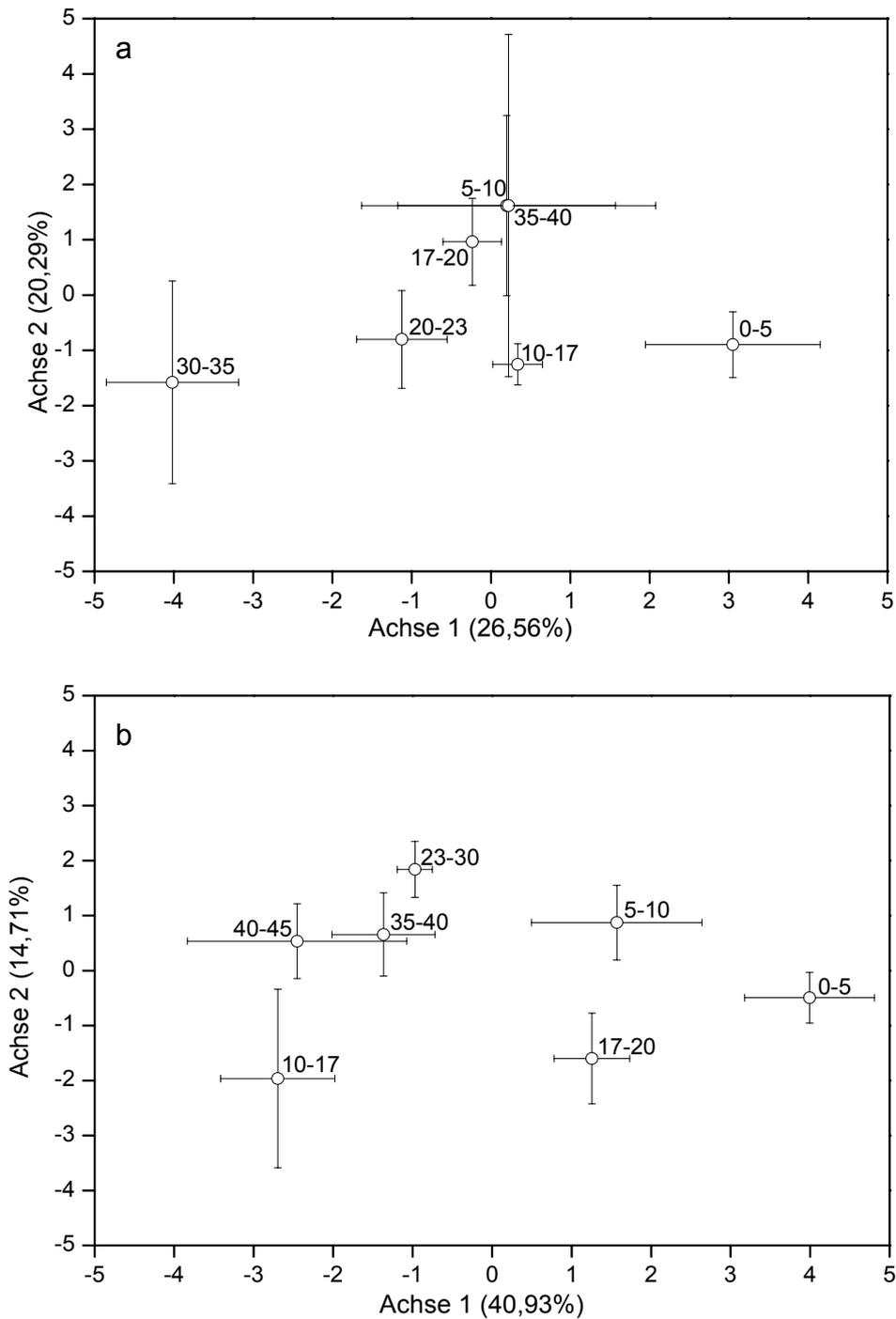


Abb. 30: Darstellung der ersten beiden Hauptachsen der Hauptkomponentenanalyse bei AWCD 0,2. In Klammern angegeben sind die prozentualen Werte der auf der jeweiligen Achse dargestellten Anteile der gesamten Varianz. a) Unter aeroben Inkubationsbedingungen. b) Unter anaeroben Inkubationsbedingungen. Die Bodentiefe aus der die Proben stammen, ist in Zentimetern angegeben. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwertes dar (n=3).

Die Darstellung der auf drei Parallelen beruhenden Mittelwerte der verschiedenen Horizonte und ihrer Standardabweichung (Abb. 30) zeigt die Unterschiede zwischen den Horizonten anhand der ersten beiden Achsen der Hauptkomponentenanalyse. Um herauszufinden, ob sich die Horizonte trotz der teils hohen Streuung der Werte voneinander unterscheiden lassen, wurde für die ersten vier Achsen ein statistischer Test auf signifikante Unterschiede durchgeführt. Aufgrund der hohen Schiefe ihrer Verteilung (Tab. A2) wurden die Werte für die Achse 2, vor dem Signifikanztest einer Wurzeltransformation unterzogen. Die Ergebnisse für die ersten beiden Achsen sind in Tab. 11 dargestellt. Die Ergebnisse der Achsen drei und vier sind der Tab. A 4 des Anhangs zu entnehmen.

Tab. 11: Ergebnisse des Fisher LSD-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Horizonten bei AWCD 0,2. *Markierte* Differenzen sind signifikant für $p < 0,05$.

(a) aerobe Inkubation

Tiefe unter GOF [cm]	0-5		5-10		10-17		17-20		20-23		30-35	
	Achse		Achse		Achse		Achse		Achse		Achse	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5-10	< 0,01	0,75										
10-17	< 0,01	0,99	0,91	0,58								
17-20	< 0,01	0,87	0,43	0,99	0,49	0,73						
20-23	< 0,01	1	0,08	0,77	0,10	0,99	0,30	0,89				
30-35	< 0,01	0,97	< 0,01	0,33	< 0,01	0,99	< 0,01	0,45	< 0,01	0,96		
35-40	< 0,01	0,78	0,80	1	0,89	0,62	0,59	0,99	0,13	0,80	< 0,01	0,36

(b) anaerobe Inkubation

Tiefe unter GOF [cm]	0-5 c		5-10		10-17		17-20		23-30		35-40	
	Achse		Achse		Achse		Achse		Achse		Achse	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5-10	< 0,05	< 0,05										
10-17	< 0,01	0,05	< 0,01	< 0,01								
17-20	< 0,01	0,13	0,204	< 0,01	< 0,01	0,61						
23-30	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,27	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01				
35-40	< 0,01	0,12	< 0,01	0,59	0,09	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,60	0,11		
40-45	< 0,01	0,16	< 0,01	0,49	0,75	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,06	0,08	0,16	0,87

Die Auswertung der Signifikanztests auf Mittelwertunterschiede ergab für die ersten 4 Achsen (Tab. 11 a und Tab. A 4), dass für den aeroben Ansatz die Proben 0-5 cm und 30-35 cm entlang der ersten Achse signifikant von allen anderen zu unterscheiden waren. Während sich die weiteren Tiefen nicht voneinander unterscheiden ließen.

Im anaeroben Ansatz unterscheiden sich anhand der ersten beiden Achsen die Proben des oberen Bodenbereichs, bis 20 cm, von den Proben aus allen anderen Tiefen. Dagegen lassen sich die drei Proben aus dem unteren Bodenbereich zwar signifikant von allen oberen, nicht jedoch untereinander unterscheiden. Auch die Achsen drei und vier (Tab. A 8) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben. Sowohl im aeroben als auch im anaeroben Ansatz weist die Probe 0-5 cm den höchsten Wert für die erste Achse auf, unterscheidet sich demnach deutlich von den anderen Proben.

Zum fortgeschritteneren Inkubationszeitpunkt

Zwischen dem frühen und dem zweiten Auswertzeitpunkt, zu dem die einzelnen Proben jeweils den AWCD 0,5 erreicht hatten, lagen bei den meisten Proben ca. 60 Stunden (Abb. 28, Abb. 29). Durch diese weitere Inkubationszeit war es auf den Platten auch Gruppen möglich, die entweder langsamer wachsen, oder in geringerer Zahl in der angeimpften Gemeinschaft vertreten waren, zur Farbentwicklung beizutragen. Dieser zweite Vergleich zum späteren Zeitpunkt schließt also, im Gegensatz zum Vergleich bei AWCD 0,2 eher Gruppen die im Boden nur in geringer Anzahl vorhanden sind, mit ein.

Bei der Aufbereitung der Daten durch die Hauptkomponentenanalyse wurden für die Erklärung von ungefähr 75 % der Varianz für den aeroben Umsatz die ersten vier Achsen benötigt, während für den anaeroben Ansatz auf die ersten fünf Achsen nötig waren, um 75 % der Varianz zu erklären. (Tab. A 11 und Tab. A 6).

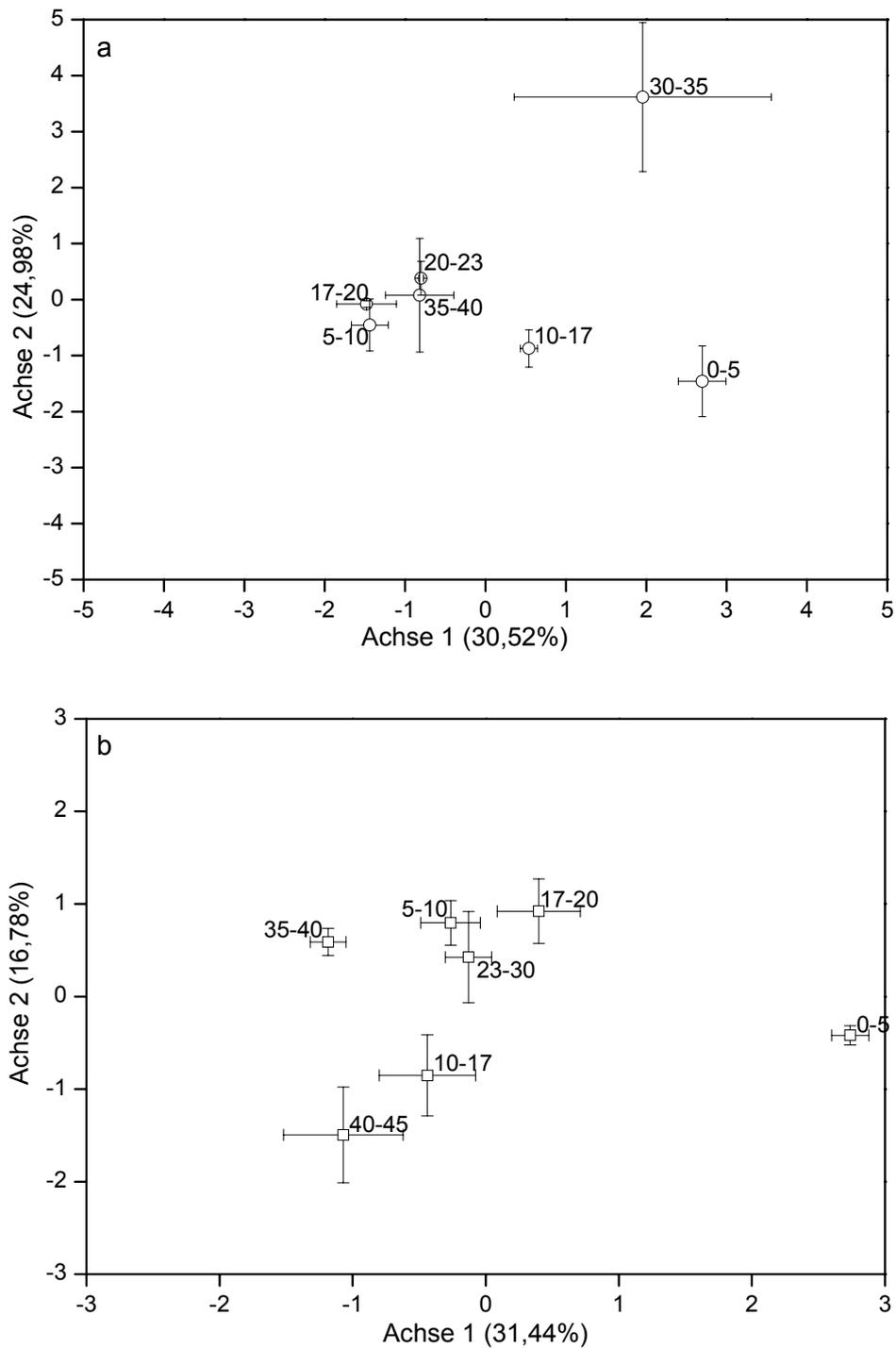


Abb. 31: Darstellung der ersten beiden Achsen der Hauptkomponentenanalyse bei AWCD 0,5. In Klammern angegeben sind die prozentualen Werte der auf der jeweiligen Achse dargestellten Anteile der gesamten Varianz. a) Unter aeroben Inkubationsbedingungen. b) Unter anaeroben Inkubationsbedingungen. Die Bodentiefe aus der die Proben stammen, ist in Zentimetern angegeben. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen vom Mittelwertes dar (n=3).

Wie schon beim Vergleich der verschiedenen Horizonte zu einem früheren Inkubationszeitpunkt unterschieden sich die meisten Proben auch zum späteren Zeitpunkt der Inkubation voneinander. Allerdings liegen die Mittelwerte dichter beieinander als bei der Auswertung zum früheren Zeitpunkt (Abb. 30). Da jedoch auch die Standardabweichungen der einzelnen Proben geringer geworden sind, lassen sich dennoch die meisten Horizonte signifikant voneinander unterscheiden, wie Tab. 12 zeigt. Aufgrund der hohen Schiefe ihrer Verteilung (Tab. A12 und 17) wurden die aeroben Werte für die Achse zwei und die anaeroben Werte für die erste Achse vor dem Signifikanztest einer Wurzeltransformation unterzogen.

Tab. 12: Ergebnisse des Fisher LSD-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Horizonten bei AWCD 0,5. *Markierte* Differenzen sind signifikant unterschiedlich für $p < 0,05$.

(a) aerobe Inkubation

Tiefe unter GOF (cm)	0-5 cm		5-10 cm		10-17 cm		17-20 cm		20-23 cm		30-35 cm	
	Achse		Achse		Achse		Achse		Achse		Achse	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5-10	< 0,01	< 0,01										
10-17	< 0,01	0,16	< 0,01	0,41								
17-20	< 0,01	< 0,01	0,93	0,47	< 0,01	0,13						
20-23	< 0,01	< 0,01	0,16	0,14	< 0,01	< 0,05	0,13	0,43				
30-35	0,14	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01		
35-40	< 0,01	< 0,01	0,17	0,37	< 0,01	0,10	0,14	0,87	0,97	0,53	< 0,01	< 0,01

(b) anaerobe Inkubation

Tiefe unter GOF (cm)	0-5 cm		5-10 cm		10-17 cm		17-20 cm		23-30 cm		35-40 cm	
	Achse		Achse		Achse		Achse		Achse		Achse	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5-10	< 0,01	< 0,01										
10-17	< 0,01	0,16	0,59	< 0,01								
17-20	< 0,01	< 0,01	< 0,05	0,76	< 0,01	< 0,01						
23-30	< 0,01	< 0,01	0,48	0,19	0,22	< 0,01	0,08	0,11				
35-40	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,42	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,27	< 0,01	0,58		
40-45	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,01	0,64	< 0,01

Die Auswertung der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Ansatz ergab ein ähnliches Bild wie zum frühen Zeitpunkt. Wie schon dort unterschieden sich die Proben 0-5 cm und 30-35 cm von allen anderen Proben. Zusätzlich ließ sich die Probe 10-17 cm von allen Proben signifikant unterscheiden ($< 0,05$), während die restlichen Proben anhand der ersten beiden Achsen nicht voneinander zu unterscheiden waren. Im anaeroben Ansatz dagegen ließen sich beinahe alle Proben mit Hilfe der ersten beiden Achsen voneinander unterscheiden, bis auf die Probe 23-30 cm, deren Substratumsatz sich nur durch die Achsen 3 und 4 (Tab. A 12 und Tab. A 16) von dem in 5-10 cm und 17-20 cm unterscheiden ließ.

Wie bei der frühen Messung unterscheidet sich auch zum späteren Messzeitpunkt die Probe 0-5 cm entlang der ersten Achse sowohl im aeroben als auch im anaeroben Ansatz am deutlichsten von allen anderen Proben.

4.4.2.1 Stark unterschiedlich umgesetzte Substrate

Um abzuschätzen welche Substrate zur Unterscheidung der Proben beitragen, wurde die Korrelationen zwischen den 31 Substrate und den jeweiligen Achsen bestimmt. So erhält man die so genannte Hauptkomponentenladung, eine Maßzahl für den relativen Einfluss eines Substrats auf die jeweilige Komponente. Eine positive Korrelation zeigt einen höheren Umsatz dieses Substrats in Proben mit hohem Wert auf der jeweiligen Koordinate an, negative Ladungen zeigen einen höheren Umsatz in Proben mit negativem Wert auf der jeweiligen Koordinate.

Die Substrate, die für die Unterscheidung der Horizonte zum frühen Messzeitpunkt beitragen werden in

Tab. 13 dargestellt. Es sind jeweils die Eigenvektorkomponenten der Substrate mit dem größten Einfluss auf die Achsen eins und zwei dargestellt. Die Eigenvektorkomponenten aller Substrate für die Hauptkomponenten eins und zwei sind der Tab. A 5 des Anhangs zu entnehmen.

Tab. 13: Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen (bei AWCD 0,2). Dargestellt in der Reihenfolge ihrer Eigenvektorkomponente.

Aerober Umsatz

Achse 1			Achse 2		
Eigenvektor-komponente	Substrat	Substratgruppe	Eigenvektor-komponente	Substrat	Substratgruppe
-0,75	Methylpyruvat	Karbonsäuren	0,85	L-Arginin	Aminosäuren
0,71	L-Serin	Aminosäuren	-0,67	L-Asparagin	Aminosäuren
-0,65	L-Asparagin	Aminosäuren	0,59	Phenyl-Ethylamin	Amine
0,62	α -Cyclodextrin	Polymere	0,56	D-Galactonic Säure- γ -Lactone	Kohlenhydrate
0,61	Glycogen	Polymere	-0,49	2-Hydroxy Benzoat	Phenolische V.
-0,55	Putrescine	Amine	0,46	Putrescine	Amine

Anaerober Umsatz

Achse 1			Achse 2		
Eigenvektor-komponente	Substrat	Substratgruppe	Eigenvektor-komponente	Substrat	Substratgruppe
-0,95	L-Asparagin	Aminosäuren	0,72	L-Serin	Aminosäuren
0,77	D-Apfelsäure	Karbonsäuren	-0,71	N-Acetyl-D-Glucosamin	Kohlenhydrate
-0,76	D-Mannitol	Kohlenhydrate	-0,68	β -methyl-D-Glucosid	Kohlenhydrate
0,74	D-Xylose	Kohlenhydrate	0,59	L-Arginin	Aminosäuren
0,72	α -keto-Glutarsäure	Karbonsäuren	0,54	Glycogen	Polymere
0,64	Tween 40	Polymere	-0,45	Glucose-1-Phosphate	Kohlenhydrate

Wie aus Tabelle Tab. 11 hervorgeht, lassen sich für den aeroben Umsatz nur die Horizonte 0-5 cm und 30-35 cm von den anderen Horizonten unterscheiden. Die Analyse der Korrelationen zwischen Substraten und der ersten Achse zeigt, dass sich die Probe 30-35 cm durch einen stärkeren Umsatz von Methylpyruvat und L-Asparagin von den anderen Proben un-

terscheidet, während es in der Probe 0-5 cm L-Serin und die Polymere α -Cyclodextrin und Glycogen sind, die deutlich besser umgesetzt werden als in allen anderen Proben.

Die Unterscheidung der Proben des anaeroben Ansatzes war ebenfalls stark durch die unterschiedliche Umsetzbarkeit von L-Asparagin beeinflusst, welches in der Probe 10-17 cm und der untersten Probe (40-45 cm) deutlich besser umgesetzt werden konnte. Ansonsten wurde die Unterscheidung der anaeroben Proben durch andere Substrate verursacht als die der aeroben Proben. Die Probe 0-5 cm wies auch im anaeroben Ansatz den höchsten Wert auf der ersten Achse auf, in ihr wird D-Apfelsäure, D-Xylose und α -keto-Glutarsäure deutlich stärker als in den Proben unterhalb 5 cm umgesetzt.

Die Auswertung des Substratumsatzes zum späteren Zeitpunkt (Abb. 31) ergab noch deutlicher, als für die Auswertung bei AWCD 0,2, dass der Unterschied zwischen der Probe 0-5 cm und den andern Proben am größten war. Sie unterschied sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Inkubationsbedingungen am deutlichsten von allen anderen Proben. Die Eigenvektorkomponenten der für die Trennung hauptverantwortlichen Substrate sind in Tab. 14 dargestellt. Eine Tabelle der Eigenvektorkomponenten aller weiteren Substrate befindet sich im Anhang (Tab. A 20).

Tab. 14: Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen (bei AWCD 0,5). Dargestellt in der Reihenfolge ihrer Eigenvektorkomponenten.

Aerober Umsatz					
Achse 1			Achse 2		
Eigenvektorkomponente	Substrat	Substratgruppe	Eigenvektorkomponente	Substrat	Substratgruppe
0,94	α -Cyclodextrin	Polymere	0,84	L-Asparagin	Aminosäuren
0,89	D-Cellobiose	Kohlenhydrate	0,83	D-Galacturonsäure	Karbonsäuren
0,75	Glycogen	Polymere	0,70	D-Glucosaminsäure	Karbonsäuren
-0,73	L-Arginin	Aminosäuren	-0,68	β -Methyl-D-Glucoside	Kohlenhydrate
-0,72	Phenyl-Ethylamin	Amine	0,61	Putrescine	Amine
-0,67	D-Mannitol	Kohlenhydrate	0,58	Tween 80	Polymere

Anaerober Umsatz					
Achse 1			Achse 2		
Eigenvektorkomponente	Substrat	Substratgruppe	Eigenvektorkomponente	Substrat	Substratgruppe
0,92	β -Methyl-D-Glucosid	Kohlenhydrate	0,73	γ -Hydroxy-Buttersäure	Karbonsäuren
-0,79	D-Mannitol	Kohlenhydrate	-0,73	D-Cellobiose	Kohlenhydrate
-0,76	Phenyl-Ethylamin	Amine	-0,73	D-Xylose	Kohlenhydrate
0,69	Glucose-1-Phosphate	Kohlenhydrate	-0,68	α -Cyclodextrin	Polymere
-0,69	Tween 80	Polymere	-0,68	α -D-Lactose	Kohlenhydrate
-0,67	D-Glucosaminsäure	Karbonsäuren	-0,59	D-Glucosaminsäure	Karbonsäuren

Die positiven Abweichungen entlang der ersten Achse, die in erster Linie die Probe 0-5 cm betreffen, werden aerob, genau wie auch schon zum frühen Zeitpunkt, durch den besseren Umsatz der beiden Polymere: α -Cyclodextrin und Glycogen verursacht. Außerdem kann D-Cellobiose in dieser Probe deutlich besser umgesetzt werden. Anaerob wird der große Un-

terschied der obersten Probe ebenfalls durch den besseren Umsatz zweier Kohlenhydrate: β -Methyl-D-Glucoside und Glucose-1-Phosphate verursacht.

Auch für den Unterschied entlang der zweiten Achse sind für die anaeroben Proben unter anderem drei Kohlenhydrate hauptverantwortlich. Die Probe 40-45 cm unterscheidet sich von den anderen durch den schlechteren Umsatz von D-Cellobiose, D-Xylose, α -D-Lactose und dem Polymer α -Cyclodextrin. In beiden Ansätzen und zu beiden Messzeitpunkten ist die Probe 0-5 cm durch den besseren Umsatz verschiedener Polymere und Kohlenhydrate am deutlichsten von allen anderen Substraten zu unterscheiden. Während es gerade die schlechtere Verwertung der Substrate dieser beiden Gruppen ist, die einige tiefere Horizonte von den anderen trennt. Diese Tatsache wird auch aus Abb. 32 deutlich.

Teilt man die 31 Substrate in die von INSAM [1997] vorgeschlagenen 6 Hauptklassen ein und vergleicht dann die Substratumsatzkurven wird der Unterschied zwischen den oberen 5 cm und allen anderen Tiefen besonders deutlich. In Abb. 32 sind die Umsatzraten der verschiedenen Substratgruppen für den aeroben Umsatz in drei Bodentiefen exemplarisch dargestellt. Die übrigen Horizonte und der anaerobe Umsatz zeigen einen, den Abbildungen (b) und (c) sehr ähnlichen Kurvenverlauf und sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang (Abb. A 5 und Abb. A 6) dargestellt.

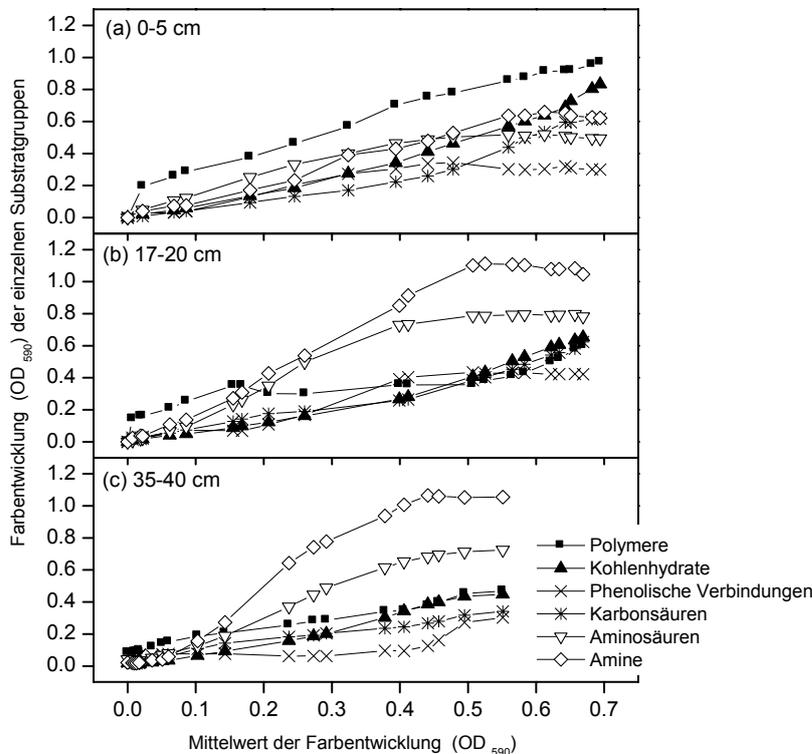


Abb. 32: Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentiefen. Der Umsatz ist gegen die jeweilige Gesamtumsatzrate aufgetragen.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Substrate aus der Gruppe der phenolischen Verbindungen im gesamten Profil kaum umgesetzt werden. Die Substratgruppen Amine und Aminosäuren dagegen können in allen Bodentiefen gut und vor allem schnell umgesetzt werden. Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Verbindungen in ihrer Umsetzbarkeit stark voneinander. Von den sechs auf den Platten angebotenen Aminosäuren, werden L-Asparagin und L-Serin in allen Horizonten unter anaeroben und aeroben Bedingungen am stärksten umgesetzt, während L-Phenylalanin und L-Threonin gar nicht umgesetzt werden können.

Während die stickstoffhaltigen Substrate in allen Bodentiefen unterhalb der oberen 5 cm die am besten zu verwertenden Substrate sind, wird in den oberen 5 cm die Gruppe der Polymere zu jedem Zeitpunkt am besten umgesetzt. Von den vier zu den Polymeren gehörenden Substraten werden Tween 40 und Tween 80 in allen Horizonten ungefähr gleich gut umgesetzt, während der Umsatz von Glycogen und α -Cyclodextrin unterhalb der oberen 5 cm kaum, oder erst nach sehr langer Inkubationszeit möglich ist.

4.4.3 Unterschiede zwischen dem aeroben und dem fakultativ anaeroben Substratumsatz

Um festzustellen, ob sich der Substratumsatz in den Horizonten bei aeroben oder anaeroben Bedingungen unterscheidet, wurde eine gemeinsame Hauptkomponentenanalyse [LEGENDRE & LEGENDRE 1998] für die aerob und anaerob inkubierten Proben der oberen 20 cm durchgeführt.

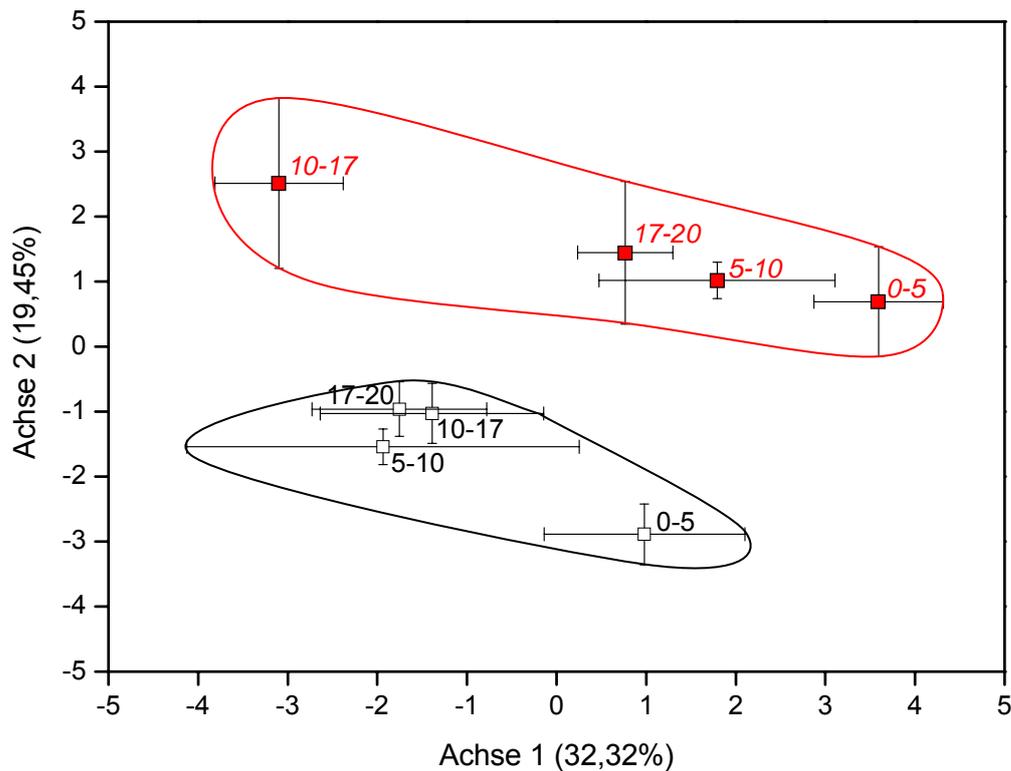


Abb. 33: Hauptkomponentenanalyse der Unterschiede zwischen aerob und anaerob inkubierten Proben, bei AWCD 0,2. Abgebildet sind die ersten beiden Achsen. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen des Mittelwertes dar (n=3). Die Zahlen geben die Bodentiefe, aus der die einzelnen Proben stammen, in Zentimetern an. In rot und kursiv sind die anaerob inkubierten Horizonte dargestellt.

Wie aus der Abbildung und den Ergebnissen des paarweisen Signifikanztests (Tab. 15) hervorgeht, unterscheidet sich in allen untersuchten Horizonten der aerobe vom anaeroben Substratumsatz.

Tab. 15: Ergebnisse des Fisher LSD-Test für den paarweisen Vergleich zwischen den aerob und anaerob inkubierten Proben. *Markierte* Differenzen signifikant für $p < 0,05$.

Tiefe unter GOF (cm)	Hauptkomponente 1	Hauptkomponente 2
0-5	< 0,05	< 0,001
5-10	< 0,05	< 0,05
10-17	0,11	< 0,001
17-20	< 0,05	< 0,01

Da sich die aeroben von den anaeroben Proben hauptsächlich anhand der zweiten Achse unterscheiden, sind in Tab. 16 die Eigenvektorkomponenten der sechs wichtigsten Substrate gegeben. Die Eigenvektorkomponenten aller weiteren Substrate sind der Tab. A 16 zu entnehmen.

Tab. 16: Substrate die zur Unterscheidung zwischen aerobem und anaerobem Substratumsatz beitragen. Dargestellt in der Reihenfolge Ihrer Eigenvektorkomponente auf der zweiten Achse.

Eigenvektorkomponente	Substrat	Substratklasse
-0,93	L-Serin	Aminosäure
-0,66	D-Cellobiose	Kohlenhydrate
0,58	Methylpyruvat	Karbonsäuren
-0,56	α -Cyclodextrin	Polymere
0,47	Putrescine	Amine

Aerober und anaerober Umsatz unterscheiden sich hauptsächlich im Umsatz von L-Serin, welches unter aeroben Versuchsbedingungen in den untersuchten Horizonten deutlich besser umgesetzt werden konnte als unter anaeroben. Der unterschiedliche Umsatz einiger weiterer Substrate trägt zur deutlichen Unterscheidung zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei. So können in den aerob inkubierten Proben D-Cellobiose, α -Cyclodextrin besser, Methylpyruvat und Putrescine dagegen schlechter umgesetzt werden als in den entsprechenden anaeroben Proben.

4.4.4 Nicht umsetzbare Substrate

Bei der Analyse des Substratumsatzes fiel auf, dass einige der 31 Substrate gar nicht, oder nur minimal umgesetzt werden konnten. In Tab. 17 sind diese Substrate aufgeführt.

Tab. 17: Substrate die nicht oder nur in sehr geringem Maße umgesetzt werden konnten.

Substrat	Bemerkung
L-Threonin	Wird in allen Tiefen weder aerob noch anaerob umgesetzt.
L-Phenylalanin	Wird in allen Tiefen weder aerob noch anaerob umgesetzt
α -keto-Glutarsäure	Wird in allen Tiefen weder aerob noch anaerob umgesetzt.
i-Erythritol	Wird nur in wenigen anaeroben Proben sehr spät umgesetzt.
2-Hydroxy-Benzoat	Wird gar nicht, bzw. in wenigen Tiefen sehr spät umgesetzt.
D-Cellobiose	Wird in den oberen 5 cm aerob und anaerob stark umgesetzt, in allen anderen Tiefen erst nach sehr langer Inkubationszeit.

Bei den nicht umgesetzten Substraten handelt es sich nicht um Substrate die grundsätzlich nicht in natürlichen Habitaten umgesetzt werden können. Lediglich von den aus dem Tundraboden extrahierten Mikroorganismen wurden sie kaum oder gar nicht umgesetzt. Mögliche Ursachen hierfür werden in der Diskussion dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung der eingesetzten Methoden

Bei allen Möglichkeiten, die die Anwendungen der FISH und der BIOLOG-Methode zur phylogenetischen und physiologischen Charakterisierung einer Bakteriengemeinschaft bieten, gibt es Einschränkungen, die bei der Anwendung und der anschließenden Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden sollten. Diese werden hier näher dargestellt.

5.1.1 Limitierung der quantitativen Analyse der mikrobiologischen Gemeinschaft mit FISH

Die FISH wurde direkt in den verschiedenen Bodenproben durchgeführt, da eine Extraktion von Zellen aus dem Bodenmaterial nicht ohne Zellverluste möglich ist [CHRISTENSEN et al. 1999]. Der Nachteil der Hybridisierung direkt in der Bodenmatrix ist, dass durch mineralische und organische Bodenbestandteile Autofluoreszenz hervorgerufen wird. Beim Versuch, die Autofluoreszenz durch Zugabe von Toluidine-Blau zu vermindern, wie von ELLER et al. [2001] beschrieben, konnte keine bedeutende Verbesserung festgestellt werden. Da die Proben der verschiedenen Horizonte unterschiedliche Anteile organischer und mineralischer Substanz enthielten, das Mischungsverhältnis jedoch ausschlaggebend für die Anfärbbarkeit der Zellen im Boden ist, musste für jede einzelne Bodenprobe diejenige geeignete Verdünnung herausgefunden und eingestellt werden, bei der die Autofluoreszenz weitestgehend vermindert wurde, ohne dass die zu zählenden Zellen zu stark verdünnt wurden. Um auszuschließen, dass es durch die Autofluoreszenz der Bodenpartikel zu falschen positiven Zellzählungen kommt, wurde für jede Bodenprobe ein Feld ohne Sonde belassen und ein weiteres mit der NONEub-Sonde, die optimalerweise keine der bekannten Eubacteria detektieren sollte, hybridisiert. Diese Kontrollen ergaben keine falschen Signale da die Form und Größe der organischen und mineralischen Bodenpartikel sowie die Intensität der Signale gut von den markierten Zellen zu unterscheiden war. Allerdings verhinderte die Autofluoreszenz der organischen und mineralischen Bodenpartikel eine computergestützte Bildauswertung. Dadurch war die Auswertung sehr zeitintensiv und konnte in dieser Arbeit exemplarisch nur für ein Bodenprofil zu einem Zeitpunkt durchgeführt werden.

Die Tatsache, dass bei der Hybridisierung nur Zellen mit einer ausreichenden Anzahl an Ribosomen markiert werden können, wurde genutzt, um zwischen den Gesamtzellzahlen und den aktiven Zellen zu unterscheiden. Um den Unterschied zwischen den durch Hybridisierung nachweisbaren, Ribosomen-reicheren Zellen und den nicht nachzuweisenden Zellen, besser verifizieren zu können, wäre ein Vergleich der Eub-Hybridisierungsergebnisse mit einer Lebendfärbemethode, wie zum Beispiel mit Acridine-Orange oder das parallele Anfärben einer Unterprobe mit SYTO 9 und Propidium Bromid sinnvoll. Letztere Farbstoffkombination unterscheidet zwischen intakten und nicht intakten Zellwänden und wäre

daher eine ergänzende Information zu der mit FISH oder Acridine-Orange erhaltenen Information über den RNA-Gehalt.

Ein Problem bei der zuverlässigen Quantifizierung mit Hilfe der FISH kann die dafür benötigte homogene Verteilung der gesuchten Zellen auf dem Objektträger sein. Diese ist zum Beispiel bei Zellen, die in Aggregaten vorliegen, nicht immer zu erreichen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben erschien die Quantifizierung der Aggregate bildenden *Archaea* am unsichersten. Die hohen Abweichungen vom Mittelwert wurden durch die ungleichmäßige Verteilung der Zellen hervorgerufen und lassen die Ergebnisse der Zellzählungen sehr unsicher erscheinen. Die Verteilung der methanogenen Zellen in diesem Profil wurde allerdings durch eine weitere, von Herrn Dr. A. Gattinger (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) durchgeführte Bestimmung der *Archaea*-Zellzahlen bestätigt [WAGNER et al. eingereicht]. Dabei wurden die Zellzahlen der *Archaea* anhand der Konzentration der Phospholipid-Etherlipide (PLEL) bestimmt. PLELs werden als Biomarker für die *Archaea*-Biomasse im Boden genutzt [WACHINGER et al. 2000; BAI et al. 2000; GATTINGER et al. 2002, 2003]. Die PLEL-Daten ergaben die gleiche Verteilung der *Archaea* im Profil wie die eigenen FISH-Zählungen.

Eine weitere Schwierigkeit der Hybridisierung in natürlichen Proben ohne vorherige Anreicherung ist, dass für ein zuverlässiges Auffinden der Gruppen eine Mindestanzahl der gesuchten Zellen im Boden vorhanden sein muss. Ist dies nicht gewährleistet, kann, wie in unserem Fall für die methanogenen *Archaea*, der Schritt der Anreicherung eingeschaltet werden. Dabei ergibt sich das Problem, dass nur Zellen, die unter diesen *in vitro* Bedingungen ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten können in den Anreicherungen wachsen. So konnten zum Beispiel die im Bodenbereich von 5-17 cm häufig auftretenden Aggregate schmaler Stäbchen in keiner der Anreicherungen nachgewiesen werden. Die Methode ist - wie alle kulturabhängigen Techniken - demnach nicht geeignet, ein reales Abbild der *in situ* vorhandenen Gruppen zu liefern. Sie kann jedoch dazu dienen indirekte Zusatzinformationen zu liefern. Da alle Anreicherungen unter den gleichen Bedingungen angesetzt wurden, ist es anzunehmen, dass eine Gruppe, die in allen drei Bodenproben vertreten ist, entweder in allen dreien oder aber in keiner Anreicherung wachsen würde. In den Anreicherungen konnte ein weiteres mögliches Problem der FISH, nämlich die nicht ausreichende Permeabilisierung der Zellwand, beobachtet werden. Die in diesem Ansatz nicht markierten Zellen, wiesen eine sehr kräftige Zellwand auf (Abb. A 2c + d, S.102), die durch die Fixierung mit Paraformaldehyde (S.27) offenbar nicht durchlässig gemacht werden konnte. Auch durch eine Fixierung in Ethanol, die für gram-positive Zellen empfohlen wird [ROLLER et al. 1994], und eine zusätzliche Fixierung mit Lysozym war es nicht möglich, diese Zellen anzufärben. Da es sich um eine Anreicherung handelte und die Zellen häufig in der Probe auftraten, also mit dem Medium und den Bedingungen zurechtkamen, ist es unwahrscheinlich, dass die Zellen aufgrund eines zu geringen Ribosomengehaltes nicht anfärbbar sind. Es ist jedoch möglich, dass es sich um dickwandige Sporen handelt.

Trotz aller methodischen Einschränkungen, die bei der Anwendung bedacht werden sollten, ist die FISH eine geeignete, wenn auch zeitaufwendige, Methode eine detaillierte Charakterisierung der Organismengemeinschaft des *Typic Historthel* zum Zeitpunkt der Probenahme zu liefern. Da Böden jedoch sowohl räumlich als auch zeitlich sehr heterogene Habitate sind, repräsentieren die hier mit der FISH-Methode ermittelten Bakterienzusammensetzungen nur einen ersten Einblick in die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im untersuchten sibirischen Bodenprofil. Für ein Monitoring von Böden - um zum Beispiel den Einfluss verschiedener Wasserstände auf die Organismenverteilung im Profil zu beobachten - ist die Methode durch den mit ihr verbundenen hohen Zeitaufwand nur als Ergänzung einer nicht so detaillierten Identifizierung und weniger zeitintensiven Methode geeignet. Hier wäre eine Beobachtung der zeitlichen Veränderung mittels DGGE-Analyse (2.5.1) denkbar, die durch die FISH-Methode ergänzt wird.

5.1.2 Limitierung der BIOLOG-Methode bei der Analyse des physiologischen Profils einer Bakteriengemeinschaft

Bei der Interpretation der Ergebnisse der BIOLOG-Daten ist zu bedenken, dass ein Test der funktionellen Diversität einer Gemeinschaft mittels eines BIOLOG-Tests keine *in situ* Methode ist. Die Farbentwicklung auf den Platten ist immer auch durch ein Wachstum der Bakterien auf den Platten beeinflusst. Nur Zellen die in der Lage sind, auf flüssigem Medium zu wachsen, oder zumindest ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, können überhaupt zur Auswertung beitragen. Daher sind die Gemeinschaften, die die Farbentwicklungen auf den Platten bestimmen, bereits durch selektive Anreicherungen verändert und stellen nicht mehr die im Boden vorliegende Ausgangsgemeinschaft dar. Der auf den Platten vollzogene Substratumsatz wird hauptsächlich durch Organismen beeinflusst, die in der Lage sind, unter den auf der Platte herrschenden Bedingungen schnell zu wachsen [DEGENS & HARRIS 1997]. Nach GLIMM et al. [1999] spiegelt ein möglichst früh gewählter Zeitpunkt am ehesten den zum Zeitpunkt der Probenahme im Boden vorliegenden Zustand der Bakteriengemeinschaft wider. Dagegen stellt der spätere Vergleich eher das Potenzial des Substratumsatzes der verschiedenen Gemeinschaften dar, da der spätere Zeitpunkt es auch langsam wachsenden Zellen und Gruppen, die in geringerer Anzahl im Boden vorkommen, ermöglicht zum Substratumsatz beizutragen.

Die Auswertung der Farbentwicklung auf den Platten ergab zum frühen Auswertzeitpunkt zum Teil recht große Streuungen der drei parallelen Ansätze (Abb. 30, S.67). Da zu diesem Zeitpunkt die Farbentwicklung auf den Platten noch sehr schwach war, müssen die Abweichungen nicht notwendigerweise durch die unterschiedliche Umsetzung der Substrate in den drei Parallelen begründet sein, sondern könnten durch Mineralpartikel hervorgerufen sein, die sich im Bakterienextrakt befinden. Die beim späteren Auswertzeitpunkt vergleichsweise geringere Standardabweichung der Mittelwerte (Abb. 31, S.70) liegt in den

höheren Absorptionswerten begründet, die den störenden Effekt von Mineralpartikeln im angeimpften Bakterienextrakt überdecken.

Auf Grund der Entfernung zum arktischen Untersuchungsgebiet konnten die Untersuchungen nicht direkt nach der Probennahme durchgeführt werden. Da alle Proben denselben gefrorenen Transport- und Lagerbedingungen ausgesetzt waren, wird davon ausgegangen, dass die Proben für einen Vergleich untereinander geeignet sind. Das Substratumsatzpotenzial frischer Proben ist aber möglicherweise größer. Da außerdem, die auf den Platten angebotenen Substrate von den tatsächlich im Boden vorhandenen Verbindungen abweichen, kann von den Umsetzungen auf den Platten nicht direkt auf die im Boden vorherrschenden Umsetzungen geschlossen werden. KONOPKA et al. [1998] empfahlen daher, die BIOLOG-Methode hauptsächlich dafür einzusetzen, verschiedene Gemeinschaften miteinander zu vergleichen, anstatt direkte Schlussfolgerungen auf die im Habitat tatsächlich geleisteten Umsätze zu ziehen. Die in dieser Arbeit erwünschten Hinweise auf Unterschiede der physiologischen Leistung in den verschiedenen Horizonten können trotz aller Einschränkungen abgeleitet werden.

5.2 Ursachen für die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Population

Es konnte gezeigt werden, dass im untersuchten Tundraboden (*Typic Historthel*) nahmen von oben nach unten sowohl die **Gesamtzellzahl** als auch der Anteil der mit FISH detektierbaren Zellen ab. Die Gesamtzahlen der gefundenen Zellen waren vergleichbar mit denen, die in anderen arktischen Böden [SCHMIDT 1999] und Torfhorizonten [DEDYSH et al. 2003] gefunden wurden.

Die nur mit dem unspezifisch alle vorhandenen Zellen anfärbbaren Fluoreszenzfarbstoff DTAF nicht aber mit EUBmix nachgewiesenen Zellen besitzen wahrscheinlich einen zu geringen Ribosomengehalt, um mit der FISH-Methode detektierbar zu sein. Da der Gehalt an Ribosomen vom Aktivitätszustand einer Zelle abhängt [POULSEN et al. 1993; KEMP et al. 1993; DELONG et al. 1989], sind die FISH-Ergebnisse abhängig vom Aktivitätszustand der Zellen (HAHN et al. 1992; MOTER & GÖBEL 2000; PERNTHALER et al. 2001; CHRISTENSEN et al. 1999; AMANN et al. 1997). Zwar kann das FISH-Signal nicht direkt auf den Aktivitätszustand der Zellen übertragen werden, aber ein Zusammenhang zwischen Aktivität und Detektionsrate ist nachgewiesen [BOUVIER & DEL GIORGIO 2003]. Das heißt, dass die mit FISH nachgewiesenen Zellen im Gegensatz zu den nicht detektierbaren eine gewisse Mindestaktivität aufweisen. Die Anzahl dieser aktiven Zellen liegt in den Horizonten oberhalb 20 cm deutlich über der tieferen Horizonte. In den oberen 5 cm wurden 35mal mehr aktive Zellen nachgewiesen als in der Tiefe von 40-45 cm.

Ein Vergleich des in diesem Boden gefundenen Anteils an **aktiven** Zellen mit anderen Böden ist nur begrenzt möglich, da FISH in Böden bislang hauptsächlich in den obersten Zentimetern eingesetzt wurde [ZARDA 1997, CHRISTENSEN 1999]. Der in den bisher veröffentlichten Untersuchungen ermittelte Anteil der durch FISH detektierbaren Zellen variierte stark. So entdeckten ZARDA et al. [1997] in den oberen 10 Zentimetern eines schluffigen Tones mit 5,6% organischer Substanz 41% der Gesamtzellzahlen mit der EUB Sonde, während CHRISTENSEN et al. [1999] in einem sandig lehmigen Boden mit einem C-Gehalt von 1,1 % nur 5% der Gesamtzellzahl mit EUB nachweisen konnten. Beide Untersuchungsstandorte befanden sich in gemäßigten Breiten. Ein dem untersuchten Profil ähnlicheres Habitat ist ein von DEDYSH et al. [2003] untersuchter sibirischer Torf, in dem 65% der Gesamtzellen mit EUB nachgewiesen wurden. In dem untersuchten *Typic Historthel* und im von DEDYSH untersuchten Torf wurden vergleichsweise hohe Anteile der Zellen mit der EUB-detektiert. Dies könnte auf den relativ hohen Gehalt an organischer Substanz in diesen Proben zurückzuführen sein. Die Verfügbarkeit von Kohlenstoff ist als ein wichtiger limitierender Faktor für mikrobielle Aktivität in Böden bekannt [FIERER et al. 2003; ALDEN et al. 2001; LYNCH 1998; SMITH & PAUL 1990]. Der Einfluss des Kohlenstoffs auf die Aktivität der Zellen und damit auf ihren Ribosomengehalt beeinflusst die Detektierbarkeit mit FISH im Boden. Die EUB-Detektionsraten im untersuchten Bodenprofil zeigten eine starke Korrelation ($r^2 = 0,951$, $p < 0,0001$, $N = 9$) zum Gehalt an organischem Kohlenstoff. Wichtiger als der Kohlenstoffgehalt ist dabei die C-Qualität, genauer gesagt die Verfügbarkeit des vorliegenden Kohlenstoffs für die Organismen. Für das untersuchte Profil liegen dafür keine Untersuchungen vor. Allerdings ist bekannt, dass in den meisten Böden die oberflächennahen Horizonte durch den Eintrag von Wurzelexsudaten, frischen Pflanzenabfällen und abgestorbenen Wurzelresten reich an verfügbaren Kohlenstoffquellen sind und der in die tieferen Horizonte eingetragene Kohlenstoff häufig weniger gut für die Mikroorganismen umsetzbar ist [TRUMBORE 2000].

Die mit den spezifischen Sonden im Boden nachgewiesenen **phylogenetischen Gruppen** der *Eubacteria* unterschieden sich deutlich in der Verteilung der Zellen im Bodenprofil (Abb. 20, S. 55). Die unterschiedlichen Verteilungsmuster sind durch die unterschiedlichen Habitatansprüche der verschiedenen Bakteriengruppen sowie durch positive und negative Interaktionen zwischen den einzelnen Gruppen zu erklären. Da zu den einzelnen, mit den Sonden bestimmten, phylogenetischen Gruppen eine große Anzahl von Arten gehören, die sehr unterschiedliche Ansprüche an ein Habitat haben können, kommen Vertreter einer einzigen phylogenetischen Gruppe in sehr unterschiedlichen Horizonten vor. Lediglich für die relativ kleine und somit überschaubare *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe, die mit den Sonden CF319 A+B nachgewiesen werden konnte, ist die Verteilung der Zellen durch die für diese Gruppe bekannten Eigenschaften zu erklären. Die meisten der bekannten Arten dieser Gruppe sind organotrophe, aerobe Bakterien, die auf die Zersetzung komplexer Makromoleküle wie Pektine, Proteine oder Cellulose spezialisiert sind [HOLMES 1999; REI-

CHENBACH 1999]. Der Einfluss von Wasserstand und organischer Substanz auf die Abundanz der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe war offensichtlich, da die Zellen der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe nur in den aeroben oberen 17 cm nachgewiesen wurden.

Neben der Gesamtzellzahl und dem Anteil der aktiven Zellen nahm auch der Anteil der Zellen mit zunehmender Tiefe ab, die mit einer spezifischen Sonde einer bestimmten phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden konnte (Abb. 21). Theoretisch könnte diese Abnahme der Detektierbarkeit daraufhin deuten, dass in den unteren Horizonten ein größerer Anteil der Zellen nicht den phylogenetischen Gruppen angehört, die durch den eingesetzten Probensatz abgedeckt werden. Wahrscheinlicher ist es aber, dass die Zellen in den unteren Horizonten zwar genügend rRNS besitzen, um mit der EUBmix Sonde erkannt zu werden, dass der rRNS Gehalt jedoch nicht ausreicht, um mit den einzelnen für die phylogenetischen Gruppen spezifischen Sonden entdeckt zu werden. Es ist bekannt, dass die Intensität der Signale zwischen den unterschiedlichen Sonden variiert und von der Bindungsstelle der jeweiligen Sonde an die rRNS beeinflusst wird [FUCHS et al. 1998]. Die EUB-Sonde gibt im Vergleich zu vielen anderen Sonden ein besonders starkes Signal ab. Es ist daher möglich, dass eine Zelle genügend rRNS besitzt, um mit der EUB-Sonde deutlich markiert zu werden, der rRNA-Gehalt jedoch nicht ausreicht, um auch mit den schwächer markierenden spezifischen Sonden entdeckt zu werden. Die Vermutung, dass mit zunehmender Tiefe auch die mit EUB markierten Zellen eine geringere Aktivität aufwiesen als in den oberen Horizonten, wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass das EUBmix Signal mit zunehmender Tiefe schwächer wurde. Auch die Diversität der Gemeinschaft nahm mit zunehmender Tiefe und abnehmender Aktivität ab (Abb. 21). Ein direkter Vergleich mit anderen Studien ist kaum möglich, da die meisten bisherigen FISH Studien im Boden auf die Bodenoberfläche beschränkt sind [ZARDA 1997, CHRISTENSEN 1999]. Durch den Einsatz von Phospholipidsäure-Analysen oder TRFLP-Analysen wurde jedoch auch in anderen Bodenuntersuchungen [LAMONTAGNE et al. 2003; BLUME et al., 2002; FIERER et al. 2002, FRITZE et al. 2000] eine signifikante Abnahme der Diversität mit zunehmender Tiefe nachgewiesen.

Die Gründe für die größere Anzahl, **Diversität** und Aktivität der Zellen in den oberen Horizonten können vielfältig sein. Mit zunehmender Tiefe verändern sich zahlreiche Habitatbedingungen. So nimmt die Quantität und wahrscheinlich auch die Qualität der Kohlenstoffsubstrate ab, die tieferen Horizonte sind anaerob, die Temperaturen sinken und weisen ein kleineres Spektrum auf und die Durchwurzelung nimmt ab. Als Hauptursache für die Verringerung der Diversität wird die Abnahme des Kohlenstoffgehalts mit der Tiefe angenommen. Nach der Artenzahl-Energie Hypothese, die davon ausgeht, dass die Artenzahl von der Verfügbarkeit von Energie im Ökosystem abhängt, würde man in Horizonten mit weniger organischer Substanz eine geringere Diversität voraussagen. Eine Abnahme der Diversität mit der Tiefe und damit mit abnehmendem Kohlenstoffangebot wurde ebenfalls von LA MONTAGNE [2003] und FIERER [2003] in mehreren Bodenprofilen nachgewiesen.

In den oberen Horizonten wird zusätzlich die höhere Wurzel­dichte und damit der erhöhte Anteil der Rhizosphäre maßgeblich zur größeren Aktivität beitragen. Die Wurzel­dichte in den oberen 23 Zentimetern ist relativ hoch, während zwischen 23 cm und 35 cm kaum noch Wurzeln und unter 35 cm gar keine Wurzeln mehr gefunden wurden. Bereits 1956 wurde von ROVIRA beschrieben, dass die Rhizosphäre ein Bodenbereich mit hoher biologischer Aktivität ist. In der Rhizosphäre werden mikrobiologische Aktivität und Wachstum durch die Abgabe von Verbindungen wie Aminosäuren und Zuckern in den Wurzelexsudaten gefördert [ROVIRA 1956]. Daher sind die Organismengemeinschaften, die in der Rhizosphäre leben, häufig aktiver als die im umgebenden Boden [BOLTON et al. 1993]. Die Annahme, dass die Durchwurzelung maßgeblich zur gefundenen Diversität beiträgt, wird von einer Untersuchung von vier arktischen Böden durch TAM et al. [2001] gestützt. In den untersuchten arktischen Böden wurde eine größere Diversität in der Rhizosphäre als im umgebenden Boden festgestellt. Ein weiterer positiver Effekt der Rhizosphäre ist die dort häufig bessere Sauerstoffversorgung. Durch das Aerenchym der Pflanzen wird Sauerstoff aus der bodennahen Atmosphäre in den Wurzelraum transportiert. Dieser Transport ist für viele Pflanzen der Feuchtgebiete als Anpassung an die anaeroben Bodenbedingungen beschrieben worden [ARMSTRONG et al. 1996; BRIX et al. 1996; BENDIX et al. 1994]. Für den untersuchten Standort zeigten KUTZBACH et al. [2004], dass die großvolumigen Aerenchyme in der Wurzel von *Carex aquatilis* als Leitungsbahnen für den Gastransport dienen. Die Anwesenheit von Sauerstoff im Wurzelraum könnte in diesem Mikrohabitat die Anwesenheit von aeroben Arten auch in einem Bodenhorizont ermöglichen, der makroskopisch durch reduzierende Bedingungen charakterisiert ist. So können, wie in dieser Arbeit gefunden, in derselben Bodentiefe aerobe und anaerobe Organismen existieren.

Des Weiteren tragen die mit der Tiefe abnehmenden Temperaturen (Abb. 8) zu der geringeren Diversität bei. Selbst psychrophile oder psychrotolerante Mikroorganismen würden bei den Temperaturen, die im oberen Profilbereich herrschen, besser wachsen. Insgesamt führt das Zusammenwirken mehrerer Faktoren in den tieferen Horizonten zu einer reduzierten Aktivität der Zellen und zu einem Verschwinden der Zellen, die diesen ungünstigeren Bedingungen nicht gewachsen sind.

Die Bodentiefe, in der die meisten **Methanogenen** gefunden wurden, befand sich zum Zeitpunkt der Probennahme oberhalb der wassergesättigten Bodenzone und somit nicht im aeroben Bereich des Bodens. Die Methanogenen sind als streng anaerobe Organismen bekannt [WHITMAN et al. 1992]. Für diese Gruppe wies dieser Horizont also makroskopisch keine optimalen Bedingungen auf, da sie in ihm nur in anaeroben Mikrohabitaten leben kann. Allerdings wurde bereits in anderen Bodenuntersuchungen beschrieben, dass Methanogene in anoxischen Aggregaten in aeroben Bodenhorizonten vorkommen können [WAGNER & PFEIFFER 1997; MAYER & CONRAD 1990; PETERS & CONRAD 1995]. Der Grund für die große Anzahl der Methanogenen in den makroskopisch aeroben Horizonten trotz der nicht optimalen Sauerstoffbedingungen wird mit der besseren Substratversorgung in diesen

Horizonten zusammenhängen. Der obere Horizont des *Typic Historthel* enthält einen hohen Gehalt an organischem Kohlenstoff und zusätzlich, wie mit FISH nachgewiesen wurde, viele Eubakterien, die die komplexen Makromoleküle in für die Methanogenen nutzbaren Substrate umwandeln. Durch einen hohen C-Umsatz werden auf diese Weise zum einen Substrate (Acetat, H₂, Methanol) bereitgestellt, die von den Methanogenen umgesetzt werden können, zum anderen wird gleichzeitig der vorhandene Sauerstoff verbraucht. Dadurch werden auch in aeroben Horizonten anaerobe Mikrohabitate für die methanogenen *Archaea* geschaffen. Ein Zusammenhang zwischen Quantität und Qualität der organischen Substanz im Boden und der Anzahl und Aktivität der Methanogenen wurde ebenfalls in anderen Studien [WACHINGER et al. 2000, VALENTINE et al. 1994] nachgewiesen. Trotz der großen Menge organischer Substanz, die in den oberen 5 cm zu finden ist, wurden fast keine *Archaea* in dieser obersten Bodenzone nachgewiesen. Diese oberen 5 cm sind geringer kompaktiert und dadurch stärker durchlüftet als die Zone von 5-10 cm. Dadurch weisen sie wahrscheinlich auch weniger anaerobe Mikrohabitate und somit kaum methanogene *Archaea* auf. Dass in den Horizonten unterhalb des Oi-Horizontes trotz der dort konstant anaeroben Bedingungen mit zunehmender Tiefe abnehmende Zellzahlen methanogener *Archaea* gefunden wurden, weist auf eine Substratlimitierung in diesen Horizonten hin. Im Bodenbereich von 5-23 cm scheint für die methanogenen *Archaea* die am besten geeignete Kombination aus Substratangebot und anaeroben Nischen vorzuliegen. Hinzu kommt, dass in diesen Tiefen die Sommertemperaturen etwas höher liegen als in den tieferen Horizonten, was die Aktivität positiv beeinflusst.

In diesem Bereich (5-23 cm) treten nicht nur zahlenmäßig die meisten methanogenen *Archaea* auf, auch werden in den oberen Proben, im Gegensatz zu tieferen Proben verschiedenen Zellformen methanogener *Archaea* direkt in der Bodenprobe gefunden. Auch konnte aus den oberen Horizonten neben der Gattung *Methanosarcina* jeweils zumindest eine weitere methanogene Art angereichert werden, während in der Probe aus dem untersten Horizont nur *Methanosarcina* Zellen zu finden waren. Die oberen Horizonte scheinen ein breiteres Spektrum an methanogenen *Archaea* zu enthalten als die tieferen Bodenbereiche. Die auffällige Aggregatbildung der methanogenen *Archaea* (Abb. 22) gerade in den oberen Bodenproben hat für die Organismen viele Vorteile. Mikroorganismen sind innerhalb von Aggregaten in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet. Eine wichtige Aufgabe der EPS-Matrix ist das Zurückhalten von Wasser, wodurch das Austrocknen der Aggregate verhindert werden kann. FLEMMING & WINGENDER [2001] beschrieben die Möglichkeit, dass die EPS außerdem als Diffusionsbarriere wirken können. Es ist denkbar, dass in den oberen Horizonten, in denen der Großteil der markierten *Archaea* in Aggregaten vorlag, die Aggregate unter anderem einen Schutz vor Sauerstoff darstellen.

5.3 Auswirkungen der phylogenetischen Unterschiede auf den Kohlenstoffumsatz im untersuchten Permafrostboden

Die durch eine Kombination verschiedener Parameter verursachte, geringere Aktivität der Bakterien in den unteren Horizonten, wirkte sich auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes aus, die mit zunehmender Bodentiefe abnahm.

Dass sich außerdem die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft auf die Art der Substratumsetzung auswirkte, wurde aus den bei der Hauptkomponentenanalyse ermittelten Unterschieden deutlich. Eine Veränderung des physiologischen Profils der Bakteriengemeinschaften mit der Bodentiefe wurde auch von GRIFFITHS et al. [2003] in einem schottischen Grünlandboden gefunden. Wie im untersuchten *Typic Historthel* nahm auch in diesem, allerdings von dem sibirischen Profil stark abweichenden Boden, die Verwertbarkeit der Substrate von oben nach unten ab. Für einen Vergleich besser geeignete Studien ähnlicherer Böden liegen nicht vor.

Der deutlichste Unterschied in der Art des Substratumsatzes ist im *Typic Historthel* zwischen der Probe aus den oberen 5 cm und den restlichen Proben festzustellen. Während die Aminosäuren und Amine, die unter *in situ* Bedingungen im Boden eine wichtige Stickstoffquelle für Mikroorganismen darstellen, von den Proben aus allen Tiefen gut umgesetzt werden konnten, wurden einige der angebotenen Kohlenhydrate und Polymere im obersten Horizont deutlich besser als in allen tieferen Proben umgesetzt. Da der Umsatz von Glycogen und α -Cyclodextrin, D-Cellobiose unterhalb der oberen 5 cm kaum, oder erst nach sehr langer Inkubationszeit möglich war, scheinen, verglichen mit den oberen 5 cm, in den darunter liegenden Bodenbereichen deutlich weniger Bakterien vorzukommen, die diese Substrate umsetzen können. Die geringere Anzahl der Polymere und Kohlenhydrate umsetzenden Bakterien in den unteren Bodenbereichen, kann entweder dadurch begründet sein, dass in den tieferen Horizonten diese Substrate unter *in situ* Bedingungen kaum vorkommen und daher auch nur wenig Bakterien existieren die sie umsetzen können. Die andere Möglichkeit ist, dass die Substrate zwar auch in tieferen Horizonten vorhanden sind, aber das Vorkommen der sie umsetzenden Bakterien durch andere Umweltfaktoren, wie anaerobe Bedingungen, die tieferen Temperaturen oder andere limitiert ist.

Die Tatsache, dass unter anaeroben Bedingungen auch in den oberen 5 cm der Umsatz von D-Cellobiose, α -Cyclodextrin und Glycogen (Tab. A 24: Substrate und ihre Eigenvektorkomponente für die zweite Achse der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.) sehr viel geringer war als unter aeroben Bedingungen, ist ein Zeichen dafür, dass durch die konstant anaeroben Bedingungen in den unteren Bodenhorizonten, das Auftreten von Arten, die diese Substrate umsetzen eingeschränkt wird. Denkbar ist, dass die Gruppe der CFB (siehe Tab. 3, S.32), die in den oberen 5 cm in größerer Anzahl gefunden wurde, für den Abbau der Polymere und der D-Cellobiose auf den Platten der obersten Probe verantwortlich ist. Diese Gruppe kann in tie-

feren Bodenhorizonten aufgrund der dort herrschenden anaeroben Verhältnisse nicht vorkommen, da alle zugehörigen Arten aerobe Organismen sind.

Zusätzlich zu der Tatsache, dass der Substratumsatz im obersten Horizont schneller und umfassender abläuft, wird er innerhalb der oberen 20 cm auch noch stark durch den Wasserstand und die sich mit ihm verändernden Sauerstoffgehalte. Bei hohem Wasserstand und damit anaeroben Bedingungen, wird auch in den oberen Horizonten der Substratumsatz langsamer ablaufen und die bevorzugt umgesetzten Substrate werden sich verändern.

Methanbildung im untersuchten Profil

Die, aufgrund früherer Untersuchungsergebnisse [KOBABE 2001], aufgestellte Hypothese (2.6.4, S.20), dass der Methanumsatz im untersuchten Permafrostboden substratlimitiert ist, da die Organismen der anaeroben Nahrungskette nicht genügend der von den methanogenen *Archaea* umsetzbaren Substrate bereitstellen, wurde durch die durchgeführten Untersuchungen unterstützt. Die mit FISH nachgewiesenen, in den oberen Bodenabschnitten wesentlich höheren Zellzahlen und die höhere Diversität bewirken eine schnellere Kohlenstoffumsetzung und damit eine bessere Substratbereitstellung für die methanogenen *Archaea* in den oberen Horizonten. Da die Substratlimitierung in den tieferen Horizonten, aufgrund der dort geringeren Anzahl an Bakterien und der geringeren Umsatzraten stärker ist, wird der Hauptanteil des im Bodenprofil gebildeten Methans nicht in den permanent anaeroben tieferen Horizonten (Bg1-Bg3), sondern in weiter oben liegenden Horizonten (Oi + A) gebildet. Auch ein von WAGNER et al. [2003] an einem ähnlichen Standort durchgeführter Versuch zur *in situ* Methanbildung zeigte, die höchste Methanbildungsrate in den oberen 10 cm des untersuchten Bodenprofils.

Neben der besseren Substratversorgung in den oberen Zentimetern, kann die dort höhere Temperatur einen weiteren Vorteil für die methanogenen *Archaea* in den oberen Schichten des *active layers* darstellen. Zwar konnte in den von WAGNER et al. [2000, 2003] durchgeführten Versuchen zur Methanbildungsaktivität bei Temperaturen unter 3°C noch eine geringe Methanbildung nachgewiesen werden, was auf eine an Kälte angepasste methanogene Flora schließen lässt, jedoch wird die Methanbildungsrate durch eine Temperaturerhöhung deutlich gesteigert, wie die durchgeführten Versuche zur Temperaturabhängigkeit der Methanbildung [KOBABE 2001] zeigten. Da in den untersuchten Bodenprofilen mit zunehmender Tiefe sowohl die Temperatur als auch die Substratversorgung abnimmt, ist der Umfang des Temperatureinflusses *in situ* nicht eindeutig einzuschätzen. Die unterschiedlichen maximalen Bodentemperaturen in den Sommermonaten in den Bodentiefen 7, 13 und 42 cm von ca. 1°C, 5°C und 11°C (Tab. 8, S.50) liegen jedoch in einem Bereich, in dem für die *in vitro* untersuchten Proben [KOBABE 2001] eine deutliche Steigerungen der Methanbildung durch Temperaturerhöhung festgestellt werden konnte.

Zusätzlich zu der geringeren Methanbildungsaktivität in den tieferen, anaeroben Horizonten, kommt es in diesen dauerhaft wassergesättigten, anaeroben Horizonten, zu einer größe-

ren Speicherung des dort gebildeten Methans, was sich in höheren Methangehalten in diesen Horizonten darstellt. Im wassergesättigten Bereich der unteren Horizonte ist durch die wassergefüllten Porenräume nur eine eingeschränkte Diffusion des Methans möglich, so dass das produzierte Methan daher nicht so einfach aus dem Boden entweichen kann wie in den oberen Horizonten wo die Poren zumindest zum Teil luftgefüllt sind. Zwar kann durch den höheren Sauerstoffgehalt in den oberen Horizonten, hier auch mehr Methan oxidiert werden als in den unteren Horizonten aber die hier auftretende starke Durchwurzelung ermöglicht es einem Teil des Methans über die Aerenchyme der Pflanzen in die Atmosphäre zu gelangen [KUTZBACH 2000].

Bei zusammenfassender Betrachtung der Untersuchungsergebnisse zu Anzahl, Aktivität, Zusammensetzung und Leistung der gesamten, aber im besonderen auch der methanogenen Mikroorganismenpopulation wird deutlich, dass in dem untersuchten Bodenprofil unter ökologischen Gesichtspunkten die oberen 15-20 cm den relevantesten Bereich darstellen. Das Zusammenspiel wichtiger Bodenparameter wie Bodentemperatur, Wasserstand, Nährstoffversorgung und Durchwurzelung führt dazu, dass in dem untersuchten Tundraboden in den oberen 15 – 20 cm eine wesentlich größere und diversere Anzahl an Mikroorganismen existiert, die für einen schnelleren und umfassenderen Kohlenstoffumsatz in diesen Bodenbereichen sorgt.

6 Ausblick

Die erzielten Ergebnisse geben einen detaillierten Überblick über den Zustand der Mikroorganismen im untersuchten Tundraboden während des arktischen Sommers (August). Da es aus im Rahmen dieser Arbeit nur möglich war einen exemplarischen Boden zu beproben, müsste die Übertragbarkeit auf andere Low Center Polygone überprüft werden. Beprobungen an benachbarten Standorten mit anderen Wasserständen und zu verschiedenen Zeitpunkten wären nötig. Da die FISH-Methode eine sehr zeitaufwendige Methode ist, bietet sich für einen lediglich qualitativen Vergleich der Bakterienpopulation verschiedener Standorte und verschiedener Zeitpunkte eine nicht so zeitaufwendige Methode wie zum Beispiel die DGGE-Methode an.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse warfen zudem einige Anregungen für weitere Untersuchungen auf:

Die mit zunehmender Bodentiefe stark abnehmende Anzahl aktiver Bakterien wurde auf den abnehmenden Gehalt an organischem Kohlenstoff zurückgeführt. Die Vermutung, dass außerdem mit zunehmender Tiefe auch die **Qualität der Kohlenstoffverbindungen** abnimmt, sollte durch eine vertiefende Analyse der Zusammensetzung der organischen Substanz verifiziert werden. Eine chemische Analyse der organischen Substanz in den verschiedenen Bodentiefen, die eine Beprobung zu verschiedenen Zeitpunkten mit einschließt, würde eine genauere Aussage über die Ursachen der Unterschiede zwischen den Bakteriengemeinschaften ermöglichen.

Der Unterschied in der **Diversität der Bakteriengemeinschaften** war am größten am Übergang zwischen den Horizonten mit guter Durchwurzelung und den schwach bis gar nicht durchwurzelten Horizonten. Eine räumlich genauere Untersuchung, die eine getrennte Untersuchung des Wurzelraumes (Rhizosphäre) mit einschließt, wäre sinnvoll, um den Einfluss der Durchwurzelung auf die Bakterien und damit den von ihnen geleisteten Kohlenstoffumsatz besser abschätzen zu können.

Die aus den Bodenproben in dieser Arbeit angesetzten Anreicherungen der methanogenen *Archaea* werden im Rahmen der Arbeitsgruppe *Geomikrobiologie* des Alfred-Wegener-Instituts zurzeit weiteren Isolationsschritten unterzogen. Sollte eine Isolierung einer Art gelingen, soll mit Hilfe einer anschließenden genetischen Sequenzanalyse die phylogenetische Einordnung der Organismen geklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen dass in dem untersuchten Bodenprofil unter ökologischen Gesichtspunkten die obersten 15-20 cm den relevantesten Bereich darstellen. Für eine bessere Abschätzungen wie eine prognostizierte ansteigende Temperatur sich auf den Kohlenstoffumsatz im Boden auswirken würde, wäre es sinnvoll die Auswirkungen geringer Temperatur-

unterschiede auf die Quantität des Kohlenstoffumsatzes in den oberen 20 cm zu untersuchen.

Für weiterführende Untersuchungen arktischer Habitate, ist die weitere Optimierung verschiedener mikrobiologischer Methoden auf die besonderen Bedingungen dieser Naturproben notwendig.

7 Literatur

- AKHMADEEVA, I.; BECKER, H.; FRIEDRICH, K.; WAGNER, D.; PFEIFFER, E.-M.; QUASS, W.; ZHURBENKO, M.; ZÖLLNER, E. [1999]: Investigation Site Samoylov. In: Expeditions in Siberia in 1998. (Hrsg. Rachold, V.) Ber. Polarf. 315:19-21.
- ALDÉN, L.; DEMOLING, F.; BAATH, E. [2001]: Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. Appl. Environ. Microbiol. 67:1830-1838.
- AMANN, R. [2002]: Molekulare Populationsanalyse von Mikroorganismen. In: Bayerische Akademie der Wissenschaften (Herausgeber): Rundgespräche der Kommission für Ökologie. Band 23: Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt, Seiten 31-40. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 2002.
- AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A. [1990]: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925.
- AMANN, R.; GLÖCKNER, F.-O.; NEEF, A. [1997]: Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. 20:191-200.
- AMANN, R.; LUDWIG, W. [2000]: Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. 24:555-565.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. [1995]: Phylogenetic identification and insitu detecting of individual microbial cells without cultivation. FEMS Microbiol. Rev. 59:143-169.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. [1993]: Microbial Ecology Fundamentals and Applications. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, California.
- BAI, Q.; GATTINGER, A.; ZELLES, L. [2000]: Characterisation of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis. Microbial Ecology 39:273-281.
- BARTLETT, K. B.; HARRISS, R. C. [1993]: Review and assessment of methane emissions from wetlands. Chemosphere 26:261-320.
- BECKER, H.; Akhmadeeva, I.; Wagner, D.; Pfeiffer, E.-M.; Quass, W. [1999]: Soils of Samoylov Island. In: Expeditions in Siberia in 1998. (Hrsg. Rachold, V.) Ber. Polarf. 315:21-27.
- BECKER, H.; WAGNER, D.; PFEIFFER, E.-M. [1999]: Trace gas fluxes in permafrost affected soils. In: Expeditions in Siberia in 1998. (Hrsg. Rachold, V.) Ber. Polarf. 315:21-27.
- BENDIX, M.; TORNBJERG, T.; BRIX, H. [1994]: Internal gas transport in *Typha latifolia* L. and *Typha angustifolia* L. 1. Humidity-induced pressurization and convective throughflow. Aqu. Bot. 49:75-89.
- BERGEY, D.; BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E.; COWAN, S. T. [2001] Bergeys Manual of Systematic Bacteriology 9th edition. Baltimore: Williams and Wilkins.
- BLACKWOOD, C. B.; PAUL, E. A. [2003]: Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. Soil Biol. Biochem. 35:1245-1255.
- BLOEM, J.; VENINGA, M.; SHEPHARD, J. [1995]: Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. Appl. Environ. Microbiol. 61:926-936.
- BLUME, E.; BISCHOFF, M.; REICHERT, J.; MOORMAN, T.; KONOPKA, A.; TURCO, R. [2002]: Surface and subsurface community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. Appl. Soil Ecol. 592:1-11.
- BOCHNER, B. [1989]: "Breathprints" at the microbial level. Am. Soc. Microbiol. 55:536-539.
- BOONE, D. R.; JOHNSON, R. L.; LIU, Y. [1989]: Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. Appl. Environ. Microbiol. 55:1735-1741.

- BORNEMANN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JAMSEM, J. L.; NIENHUIS, J.; TRIPLET, E. W. [1996]: Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1935-1943.
- BOUVIER, T.; DEL GIORGIO, P.A. [2003]: Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:3-15.
- BRIX, H.; SORRELL, B. K.; SCHIERUP, H. H. [1996]: Gas fluxes achieved by *in situ* convective flow in *Phragmites australis*. *Aqu. Bot.* 54:151-163.
- BROWN, J.; FERRIANS, O. J.; JR., HEGINBOTTOM, J. A.; MELNIKOV, E. S. [1997]: Circum-arctic map of permafrost and ground conditions. United States Geological -Ice Survey Series, CP-45. Reston, VA, USA. (ISBN , Circum-Pacific Map 0-607-88745-1).
- CHEN, G.; ZHU, H.; ZHANG, Y. [2003]: Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.* 154:393-398.
- CHOI, K.-H.; DOBBS, F. C. [1999]: Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Jrnl. Microbiol. Meth.* 36:203-213.
- CHRISTENSEN, H.; HANSEN, M.; SØRENSEN, J. [1999]: Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1753-1761.
- CHRISTENSEN, T. [1991]: Arctic and sub-Arctic soil emissions: possible implications for global climate change. *Polar Rec.* 27:205-210.
- CHRISTENSEN, T. R.; JONASSON, S.; HAVSTRÖM, M.; LIVENS, F. R. [1999]: Carbon cycling and methane exchange in Eurasian tundra ecosystems. *Ambio* 28:239-244.
- DAIMS, H.; RAMSING, N. B.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. [2001]: Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence *in situ* hybridization. *App. Environ. Microbiol.* 67:5810-5818.
- DE LONG, E. F.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. [1989]: Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243 :1360-1362.
- DEDYSH, S.N.; DUNFIELD, P.F.; DERAKSHANI, M.; STUBNER, S.; HEYER, J.; LIESACK, W. [2003]: Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:299-308.
- DEGENS, B. P.; HARRIS, J. A. [1997] Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 29:1309-1320.
- ELLER, G.; STUBNER, S.; FRENZEL, P. [2001] Group-specific 16S rRNA targeted probes für the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* 198, 91-97.
- FELSKE, A.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. [1998]: *In situ* detection of an uncultured predominant bacillus in Dutch grassland soils. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64:4588-4590.
- FIERER, N.; SCHIMMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. [2003]: Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.* 35:167-176.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. [2001] Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen. *Biologie in unserer Zeit* 31, 169-180.
- FOX, G. E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R. B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T. A.; WOLFE, R. S.; BALCH, W. E.; TANNER, R.; MAGRUM, L.; ZABLEN, L. B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B. J.; STAHL, D. A.; LUEHRSEN, K. R.; CHEN, K. N.; WOESE, C. R. [1980]: The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209:457-463.
- FRIEDRICH, K. [2001]: Energie- und Wasserhaushalt eines Tundrenstandortes im Lena-Delta. Diploma-thesis, TU Dresden.
- FRIEDRICH, K.; BOIKE, J. [1999]: Energy and Water balance of the active layer. In: Expeditions in Siberia in 1998. (Hrsg. Rachold, V.) *Ber. Polarf.* 315:27-31.

- FRIEDRICH, U.; NAISMITH, M.M.; ALTENDORF, K.; LIPSKI, A. [1999]: Community analysis of biofilters using fluorescence *in situ* hybridization including a new probe for the Xanthomonas branch of the class Proteobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65:3547-3554.
- FRITSCH, W. [1998]: Umwelt-Mikrobiologie – Grundlagen und Anwendungen. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- FRITZE, H.; PIETKAINEN, J.; PENNANEN, T. [2000] Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. Eur. J. of Soil Sci. 51, 565-573.
- FUCHS, B. M.; WALLNER, G.; BEISKER, W.; SCHWIPPL, I.; LUDWIG, W.; AMANN, R. [1998] Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4973-4982.
- FUNG, I.; JOHN, J.; LERNER, J.; MATTHEWS, E.; PRATHER, M.; STEELE L. P.; FRASER, P. J. [1991] Three dimensional model synthesis of the global methane cycle. J. Geophys. Res. 96:13033-13065.
- GALCHENCO, V. F.; LEIN, A.; IVANOV, M. [1989]: Biological sinks of methane. In: Andrae, M. O.; Schimel, D. S., (Hrsg.) Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Wiley, Chichester, 59-71.
- GANZERT, L.; ZIMMERMANN, U.; WAGNER, D. [2004]: Microbial process studies on methane fluxes from permafrost environments. In: Russian-German Cooperation System Laptev Sea 2000: The Expedition Lena-Anabar 2003. (Hrsg. Schirrmeyer et al.) Ber. Polarf. 489.
- GARLAND, J. L. [1996]: Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. Soil Biol. Biochem. 28:213-221.
- GARLAND, J. L. [1997]: Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 289-300.
- GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. [1991]: Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source-utilization. App. Environm. Microbiol. 57:2351-2359.
- GATTINGER, A.; Günthner, A.; Schloter, M.; Munch, J. C. [2003] Characterisation of Archaea in soils by polar lipid analysis. Acta Biotech. 23:21-28.
- GATTINGER, A.; RUSER, R.; SCHLOTTER, M.; MUNCH J. C. [2002]: Microbial community structure varies in different soil zones of a potato field. Jour. Plant Nutr. Soil Science 165:421-426.
- GHOLZ, H. L.; WEDIN, D. A.; SMITHERMAN, S. M. [2000]: Long-term dynamics of pine and hardwood litter in contrasting environments: toward a global model of decomposition. Global Change Biol. 6:751-765.
- GISI, U.; SCHENKER, R.; SCHULIN, R.; STADELMANN, F. X.; STICHER, H. [1997]: Bodenökologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- GLIMM, E.; HEUER, H.; ENGELEN, B.; SMALLA, K.; BACKHAUS, H. [1997]: Statistical comparison of community catabolic profiles. Jour. Microbiol. Meth. 30:71-80.
- GLÖCKNER, F. O.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. [1998]: Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based in fluorescence *in situ* hybridization. Allied Environm. Microbiol. 65:3721-3726.
- GORHAM, E. [1991]: Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. Ecol. Appl. 1:182-195.
- GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. [2003]: Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43:35-43.
- GUCKERT, J. B.; CARR, G. J.; JOHNSON, T. D.; HAMM, B. G.; DAVIDSON, D. H.; KUMAGI, Y. [1996]: Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. Jour. Microbiol. Meth. 27:183-197.
- HAHN, D.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; AKKERMANN, A. D. L.; SCHLEIFER, K.-H. [1992]: Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. J. Gen. Microbiol. 138:879-887.

- HALES, B.A.; EDWARDS, C.; RITCHIE, D.A.; HALL, G.; PICKUP, R.W.; SAUNDERS, J.R. [1995]: Isolation and identification of methaongen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:668-675.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. [1998]: Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecol.* 35:1-21.
- HINTERMAIER-ERHARD, G.; ZECH, W. [1997]: Wörterbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- HOLMES, B. [1999]: The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weeksella* In: *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*, (Dworkin, M. et al., Eds.), 3rd edition, release 3.0, 1999, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- HYDROMETEOROLOGICAL CENTRE OF RUSSIA. „Russia’s Wheather“ <http://meteo.infospace.ru>
- INSAM, R. [1997]: A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial communities: functional versus structural approaches*. (Hrsg: Insam, R. und Rangger, A.) Springer-Verlag, Berlin.
- IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE) [2001]: *Climate Change 2001 Synthesis report. Scientific Assessment*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- JAMSEN, E.; SJØHOLM, J. [1991] Reconstruction of glaciation over the past 6 Myr from ice-borne deposits in the Norwegian Sea. *Nature* 349
- JURGENS, G.; GLÖCKNER, F.-O.; AMANN, R.; SAANO, A.; MONTONEN, L.; LIKOLAMMI, M.; MÜNSTER, U. [2000]: Identification of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:45-56.
- KÄMPFER, P.; ERHART, R.; BEIMFOHR, C.; WAGNER, M.; AMANN, R. [1996]: Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecol.* 32:101-121.
- KEMP, P. F.; LEE, S.; LAROCHE, J. [1993]: Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2594-2601.
- KILHAM, K. [1994]: *Soil Ecology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- KUTZBACH, L. [2000]: Die Bedeutung der Vegetation und bodeneigener Parameter für die Methanflüsse in Permafrostböden. Diplomarbeit. Universität Hamburg, Institut für Bodenkunde.
- KUTZBACH, L.; WAGNER, D.; PFEIFFER, E.-M. [2004]: Effect of microrelief and vegetation on methane emission from wet polygonal tundra, Lena Delta, North. Siberia. *Biogeochem.* 69:341-362.
- LAMONTAGNE, M. G.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. [2003]: Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microbial Ecol.* 46:216-217.
- LAWLOR, K.; KNIGHT, B. P.; BARBOSA-JEFFERSON, V. L.; LANE, P. W.; LILLEY, A. K.; PATON, G. I.; MCGRATH, S. P.; O’FLAHERTY, S. M.; HIRSCH, P. R. [2000]: Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:129-137.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. [1998]: *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- LINDSTROM, J. E.; BARRY, R. P.; BRADDOCK, J. F. [1997] Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biol. Biochem.* 30, 231-239.
- LIU, W.-T.; TERENCE, L. M.; CHENG, H.; FORNEY, L. [1997]: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environm. Microbiol.* 63 :4516-4522.
- LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. [1998]: Microbial Community of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environm. Microbiol.* 64:2691-2696.

- LLOYD-JONES, G.; LAU, P. C. K. [1998]: A molecular view of microbial diversity in a dynamic landfill in Quebec. *FEMS Microbiology Letters* 162:219-226.
- LYNCH, J. M. [1998]: Microorganisms in their natural environments: the terrestrial environment. In: *Micro-organisms in action: concepts and applications in microbial ecology* (Lynch, J. M.; Hobbie, J. E., Eds.), S. 103-131 Blackwell Scientific Publications, London, England.
- MACRAE, A. [2000]: The use of 16SRDNA methods in soil microbial ecology. *Braz. Jour. Microbiol.* 31:77-82.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. [2000]: *Brock Biology of Microorganisms* 9th edition. Prentice Hall International, Inc.
- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K-H. [1992]: Phylogenetic Oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15:593-600.
- MAYER, H.-P.; CONRAD, R. [1990]: Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73:103-112.
- MEIER, H.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. [1999]: Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *System. Appl. Microbiol.* 22:186-196.
- MELLES, M. [1991] Paläoglazie und Paläoozeanographie im Spätquartär am Kontinentalrand des südlichen Weddellmeeres, Antarktis. *Ber. Polarf.* 81.
- MOTER, A.; GÖBEL, U. B. [2000]: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 41:85-112.
- MÜLLER, A. K.; WESTERGAARD, K.; CHRISTENSEN, S.; SØRENSEN, S. J. [2001] The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 11-19.
- MUNSELL [1975] Soil colour chart. Kolmogen, Baltimore.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. [1993] Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73
- NADELHOEFFER, K. J.; GIBLIN, G. R.; SHAVER, G. R.; LINKINS, A. E. [1992] Microbial processes and plant nutrient availability in arctic soils. In: *Arctic ecosystems in a changing climate. An ecophysiological perspective.* (Chapin, F. S., Ed.) Academic, San Diego, California.
- NEEF, A. [1997]: Anwendung der *in situ* Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph. D. Thesis, Technische Universität München.
- O'DONNELL, A. G.; GÖRRES, H. E. [1999]: 16S rDNA methods in soil microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:225-229.
- OECHEL, W. C.; BILLINGS, W. D. [1992]: Effects of global change on the carbon balance of arctic plants and ecosystems. In: *Arctic ecosystems in a changing climate. An ecophysiological perspective.* (Chapin, F.S., Ed.) Academic, San Diego, California.
- ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. [1998]: Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbiol. Ecol.* 36:303-315.
- PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F.O.; SCHÖNHUBER, W.; AMANN, R. [2001]: Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: *Methods in Microbiology: Marine Microbiology.* Vol. 30. (Paul, J., Ed.) Academic Press Ltd., London.
- PETERS, V.; CONRAD, R. [1995]: Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1673-1676.
- PFEIFFER, E.-M.; KUTZBACH, L. [2004]: Properties, genesis and classification of Gelisols in the Lena Delta, 2nd international conference and field workshop on soil classification 2004. Petrozavodsk, Russia.
- PFEIFFER, E.-M.; WAGNER, D.; KOBABE, S.; KUTZBACH, L.; KURCHATOVA, A.; STOOFF, G.; WILLE, C. [2002]: Modern processes in permafrost affected soils. In: *Russian-German Cooperation*

- System Laptev Sea 2000: The Expedition LENA 2001. (Hrsg. Pfeiffer, E.-M. & Grigoriev, M. N.) Ber. Polarf. 426:21-42.
- POST, W. M.; EMANUEL, W. R.; ZINKE, P. J.; STANGENBERGER, A. G. [1982]: Soil carbon pools and world life zones. *Nature* 298:156-159.
- POST, W. M.; PASTOR, J.; ZINKE, P.J.; STRANGENBERGER, A. G. [1985]: Global patterns of soil nitrogen. *Nature* 317:613-616.
- POULSEN, L. K.; BALLARD, G.; STAHL, D. A. [1993]: Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1354-1360.
- PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P. F. [2002]: Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *Fems Microbiol. Ecol.* 42:1-14.
- Rachhold, V. [1999] Major trace and rare earth element geochemistry of suspended particulate material of East Siberian rivers draining to the Arctic Ocean. In: *Land-ocean systems in the Siberian Arctic: dynamics and history.* (Hrsg. Kassens, H.; Bauch, H.; Dmitrenko, I.; Eicken, H.; Hubberten, H. W.; Melles, M.; Tiede, J.; Timokhov, L. Springer, Berlin 199-222.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. [1994]: Group-Specific 16SrRNA Hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environm. Microbiol.* 60:1232-1240.
- RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; AMANN, R. [2001] Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 387-395.
- REICHENBACH, H. [1999]: The order Cytophagales In: *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community,* (Dworkin, M. et al., eds.), 3rd edition, release 3.0, 1999, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- REINECK, H.-E.; SINGH, I. B. [1980]: *Depositional sedimentary environments.* Springer-Verlag, Berlin.
- ROLLER C.; WAGNER M.; AMANN R.; LUDWIG W.; SCHLEIFER, K.-H. [1994]: *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA- targeted oligonucleotides. *Microbiol.* 140:2849-2858.
- SACHS, L. [1991] *Angewandte Statistik.* Springer Verlag, Berlin.
- SCHOENEBERGER, P. J.; WYSOCKI, D. A.; BENHAM, E. C.; BRODERSON, W.D. (Eds.) [2002] *Fieldbook for describing and sampling soils, Version 2.0.* Natural Resources Conservation service, National Soil Survey Center, Lincoln, NE.
- SCHULZ, B. [1999]: *Bodenmikrobiologische Untersuchungen an einem Low-Center-Polygon im Lena Delta (Sibirien).* Diplomarbeit Uni Kiel.
- SCHWAMMBORN, G.; SCHNEIDER, W.; GRIGOYEV, M. [1999]: Sedimentation and environmental history of the Lena Delta. In: *Expeditions in Siberia in 1998.* (Hrsg. Rachold, V.) Ber. Polarf. 315:94-111.
- SHERR, B. F.; SHERR, E. B.; FALLON, R. D. [1987]: Use of monodispersed, fluorescently labelled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:958-965.
- SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. [2001]: Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environm. Microbiol.* 67:4742-4751.
- SMITH, J. L.; PAUL, E. A. [1990]: The significance of soil microbial biomass estimations. In: *Soil biochemistry* (Bollag, J.-M. and Stotzky G., Eds.). Marcel Dekker, Inc., pp. 357-395. New York, N.Y.
- SMITH, L. C.; MACDONALD, G. M.; VELICHKO, A. A.; BEILMAN, D. W.; BORISOVA, O. K.; FREY, K.E.; KREMENETSKI, K.V.; SHENG, Y. [2004]: Siberian peatlands a net carbon sink and global methane source since the early holocene. *Science* 303:353-356.
- SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. [1997]: Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2884-2896.

- SOIL SURVEY STAFF [1998]: Keys to Soil taxonomy, 8th edition. USDA-The national resources conservation service, Lincoln.
- SPOTT, O. [2003]: Frostmusterbedingte Seen der Polygonalen Tundra und ihre Funktion als Quellen atmosphärischen Methans. Diplomarbeit. Universität Leipzig, Institut für Geographie.
- STAHL, D. A.; AMANN, R. [1991]: Development and application of nucleic acid probes. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.) pp. 205-248. Wiley and Sons, New York.
- STATSOFT, Inc. [2002]: STATISTICA für Windows [Software-System für Datenanalyse] Version 6. www.statsoft.com
- SVENDSEN, J. I.; ALEXANDERSON, H. ASTAKHOV, V. I.; DEMIDOV, I. et al. [2004] Late quaternary ice sheet history of northern Eurasia. Quaternary Science Reviews 23, 1229-1271.
- TAM, L.; DERRY, A. M.; KEVAN, P. G.; TREVORS, J. T. [2001] Functional diversity and community structure of microorganisms in rhizosphere and non-rhizosphere Canadian arctic soils. Biodiversity and Conservation 10, 1933-1947.
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. [1990]: High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56:782-787.
- TRUMBORE, S. [2000]: Age of soil organic matter and soil respiration: radiocarbon constrains on belowground C dynamics. Ecol. Appl. 10:399-411.
- VAN HEERDEN, J.; KORF, C.; EHLERS, M. M.; CLOETE, T. E. [2002]: Biolog for the determination of diversity in microbial communities. Water SA 28:29-35.
- WACHINGER, G.; FIEDLER, S.; ZEPP, K.; GATTINGER, A.; SOMMER, M.; ROTH, K. [2000]: Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and archaeal populations. Soil Biol. Biochem. 32:1121-1130.
- WAGNER D.; LIPSKI A.; EMBACHER A.; GATTINGER A. [eingereicht] Methane fluxes in extreme permafrost habitats of the Lena Delta: effects of microbial community structure and organic matter quality. Environmental Microbiology.
- WAGNER, D.; KOBABE, S.; PFEIFFER, E.-M.; HUBBERTEN, H.-W. [2003]: Microbial controls on methane fluxes from a polygonal Tundra of the Lena Delta, Siberia. Permafrost and Periglac. Process. 14:173-185.
- WAGNER, D.; KURCHATOVA, A.; STOOF, G. [2001]: Modern processes in permafrost affected soils. In: Russian-German Cooperation System Laptev Sea 2000: The Expedition LENA 2000. (Hrsg. Rachold, V. & Grigoriev, M. N.) Ber. Polarf. 388:16-23.
- WAGNER, D.; KUTZBACH, L.; BECKER, H.; VLASENKO, A.; PFEIFFER, E.-M. [2000]: Seasonal variability of trace gas emission (CH₄, CO₂) and *in situ* process studies. In: Expeditions in Siberia in 1999. (Hrsg. Rachold, V.) Ber. Polarf. 354:28-36.
- WAGNER, D.; PFEIFFER, E.-M. [1997]: Two temperature optima of methane production in a typical soil of the Elbe river marshland. FEMS Microbiol. Ecol. 22:145-153.
- WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W. [1993]: Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry 14:136-143.
- WESTERGAARD, K.; MÜLLER, A. K.; CHRISTENSEN, S.; BLOEM, J.; SØRENSEN, S. J. [2001]: Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. Soil Biol. Biochem. 33:2061-2071.
- WHITMAN, W. B.; BOWEN, T.C.; BOONE, D. R. [1992]: The methanogenic bacteria. In: The prokaryotes (Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K. H., Eds.) Vol. 1:719-767, Springer.
- WIDMER, F.; FLIEßBACH, A.; LACZKÓ, E.; SCHULZE-AURICH, J.; ZEYER, J. [2001]: Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DANN-, PFLA. and Biolog – analysis. Soil Biol. Biochem. 33:1029-1036.
- WOESE, C. R. [1987]: Bacterial evolution. Microbiological Review 51:221-271.

- WOESE, C. R.; FOX, G. E. [1977]: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:5088-5090.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. [1990]: Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Arcaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:4576-4579.
- WORLD REFERENCE BASE OF SOIL RESOURCES [1998] (Hrsg. Food and agriculture organization of the United Nations).
- ZARDA, B.; HAHN, D.; CHATZINOTAS, A.; SCHÖNHUBER, W.; NEEF, A.; AMANN, R. I.; ZEYER, J. [1997]: Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* 168:185-192.
- ZEPP-FALZ, K.; HOLLIGER, C.; GROßKOPF, R.; LIESACK, W.; NOZHENIKOVA, A. N.; MÜLLER, B.; WEHRLI, B.; HAHN, D. [1999]: Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2402-2408.
- ZHANG T.; BARRY, R. G.; KNOWLES, K.; HEGINBOTTOM, J. A.; BROWN, J. [1999]: Statistics and characteristics of permafrot and ground-ice distribution in the northern hemisphere. *Polar Geogr.* 23(2):132-154.
- ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D. S.; WU, L.-Y.; MARSH, T. L.; O'NEILL, R. V.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J.M. [2002] Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:326-334.
- ZHUANG, Q.; MELILLO, J. M.; KICKLIGHTER, D. W.; PRINN, R. G.; MCGUIRE, A. D.; STEUDLER, P. A.; FELZER, B. S.; HU, S. [2004]: Methane fluxes betwenn terrestrial ecosystems and the atmosphere at northern latitudes during the past century: A retrospective analysis with a process-based biogeochemistry model. *Global Biogeochemical Cycles* 18.
- ZYVANGTSEV, D. [1994]: Vertical distribution of microbial communities in soils. In: *Beyond the biomass* (Hrsg: Ritz, K.; Dighton, J.; Giller, K.) pp. 29-37, Wiley, West Sussex, UK.

8 Anhang

Tab. A 1: Aufschlüsselung der Korngrößen in ihre Unterfraktionen.

Probtiefe		Kies	Sand	Silt	Ton	Ton						Schluff					Sand					Skelett	
von	bis	2-8 mm	63-2000	2-63 µm	< 2 µm	< 2 µm	2 - 4 µm	4 - 8 µm	8 - 16 µm	16 - 32 µm	32 - 63 µm	63 - 125 µm	125 - 250 µm	250 - 500µm	500 - 1000µm	1000-2000µm	2000-4000µm	4000-8000µm					
[cm]	[cm]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]					
0	- 5	0,00	78,98	18,64	2,38	2,3756	0,7703	1,0665	2,3700	7,4063	7,0311	25,2601	41,6867	11,2106	0,8228	0,0000	0,0000	0,0000					
5	- 10	0,00	73,25	24,00	2,75	2,7457	1,9571	1,8283	4,2232	9,9400	6,0516	17,9320	42,7955	11,5320	0,9944	0,0000	0,0000	0,0000					
10	- 17	0,00	71,97	24,64	3,40	3,3978	1,0555	1,2100	3,3982	11,0183	7,9548	15,9351	56,0305	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000					
17	- 20	0,00	76,63	15,44	7,94	7,9390	0,9384	0,7928	2,4756	7,3134	3,9156	18,2819	44,3559	13,8372	0,1502	0,0000	0,0000	0,0000					
20	- 23	0,00	75,72	18,21	6,06	6,0642	0,8458	1,0150	2,4435	8,3832	5,5262	19,6588	40,5716	15,0955	0,3962	0,0000	0,0000	0,0000					
23	- 30	0,00	69,15	25,85	4,99	4,9928	1,0807	1,5399	3,3500	11,1577	8,7263	24,5657	24,5904	19,7896	0,2069	0,0000	0,0000	0,0000					
30	- 35	0,00	67,70	26,96	5,34	5,3445	1,5609	1,9582	3,5190	10,9260	8,9962	18,9383	37,9666	10,5139	0,2766	0,0000	0,0000	0,0000					
35	- 40	0,00	64,57	29,06	6,37	6,3694	1,3645	1,4575	2,7910	13,7377	9,7063	16,9395	32,4384	15,1958	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000					
40	- 45	0,00	59,88	33,37	6,75	6,7464	2,4613	2,9536	4,8172	13,8890	9,2476	13,8443	32,2199	13,5301	0,2906	0,0000	0,0000	0,0000					

8.1 Weitere Abbildung der FISH in Bodenproben

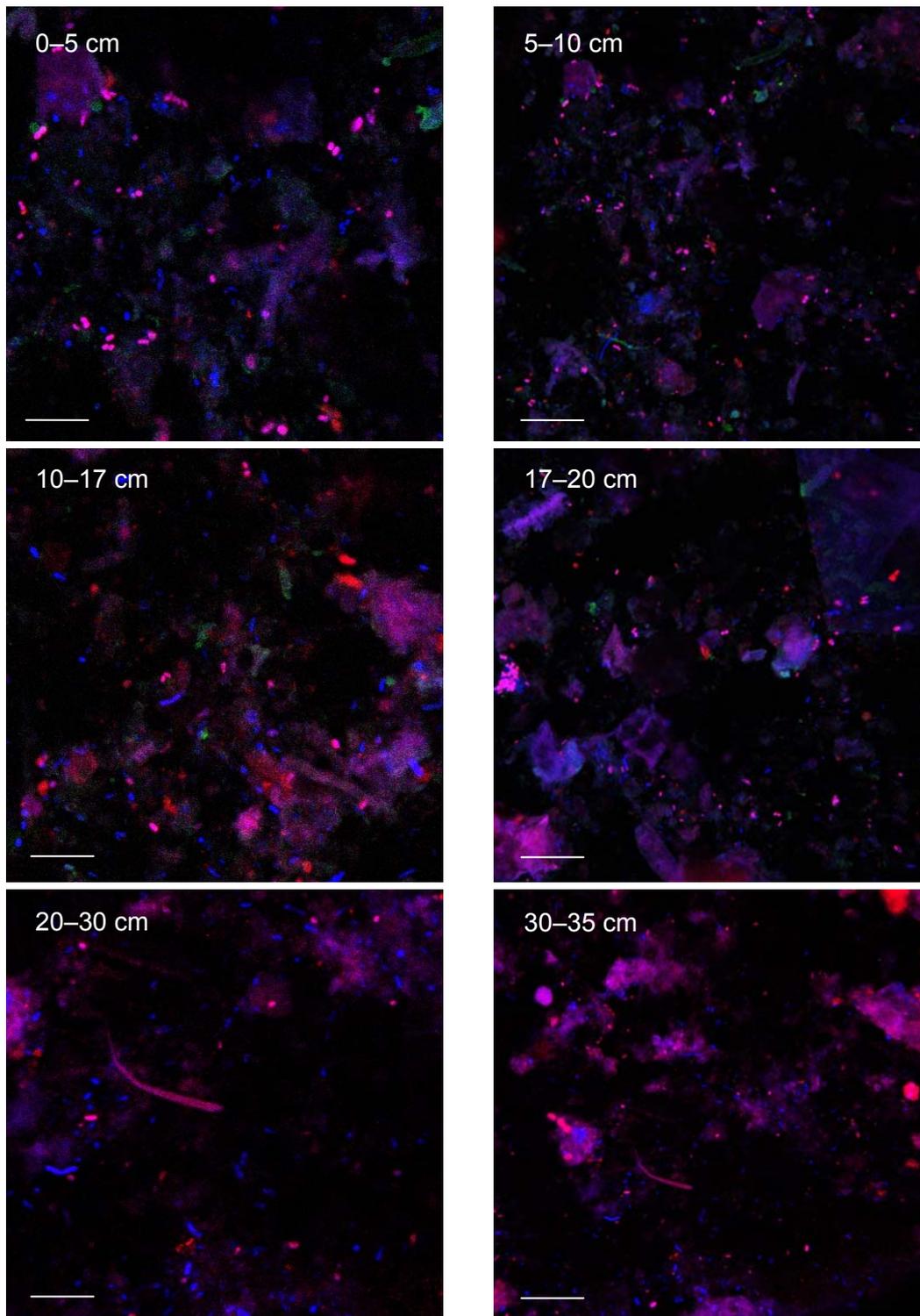


Abb. A 1: Aufnahmen der zweifachen Hybridisierung verschiedener Bodenproben mit DTAF und der mit Cy3 markierten Sonde EUBmix mit verschiedenen Kanälen des konfokalen Laser Scanningmikroskops. Blau markiert sind Zellen, die nur von DTAF markiert wurden, die zweifach markierten aktiven Eubakterien erscheinen lila. Der eingezeichnete Maßstab entspricht einer Strecke von 10 μm .

8.2 Weitere Abbildung der FISH in den Anreicherungen

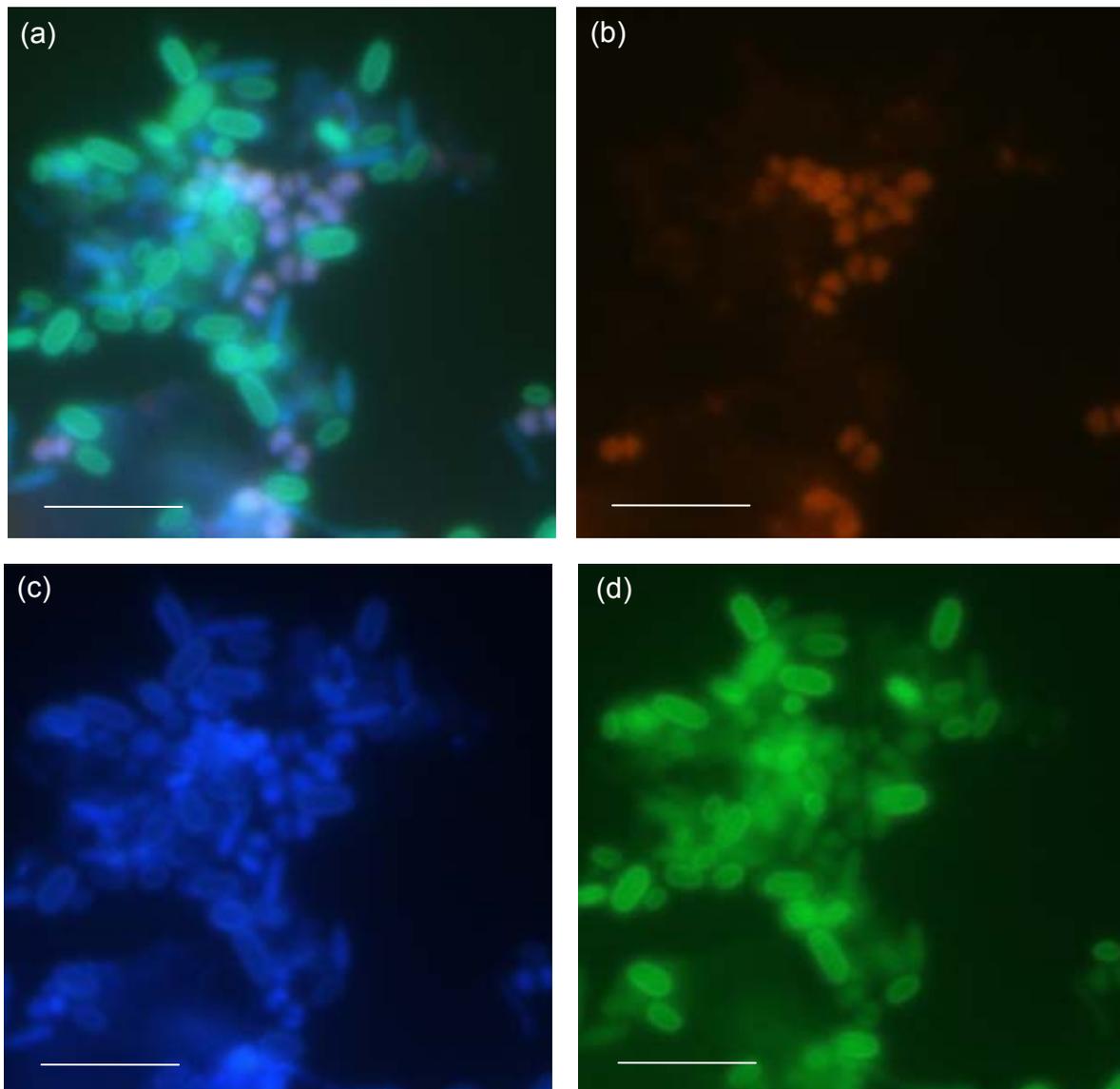


Abb. A 2: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) ist das kombinierte Bild aller drei übereinander gelagerter Aufnahmen. b) zeigt die Anfärbung der Zellen der Ordnung Methanomicrobiales durch die Sonde MG 1200, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. c) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI. d). zeigt die Autofluoreszenz einer Gruppe von Zellen bei Anregung im blauen und Absorption im grünen Wellenlängenbereich. Der Balken repräsentiert ein Strecke von 10 μm .

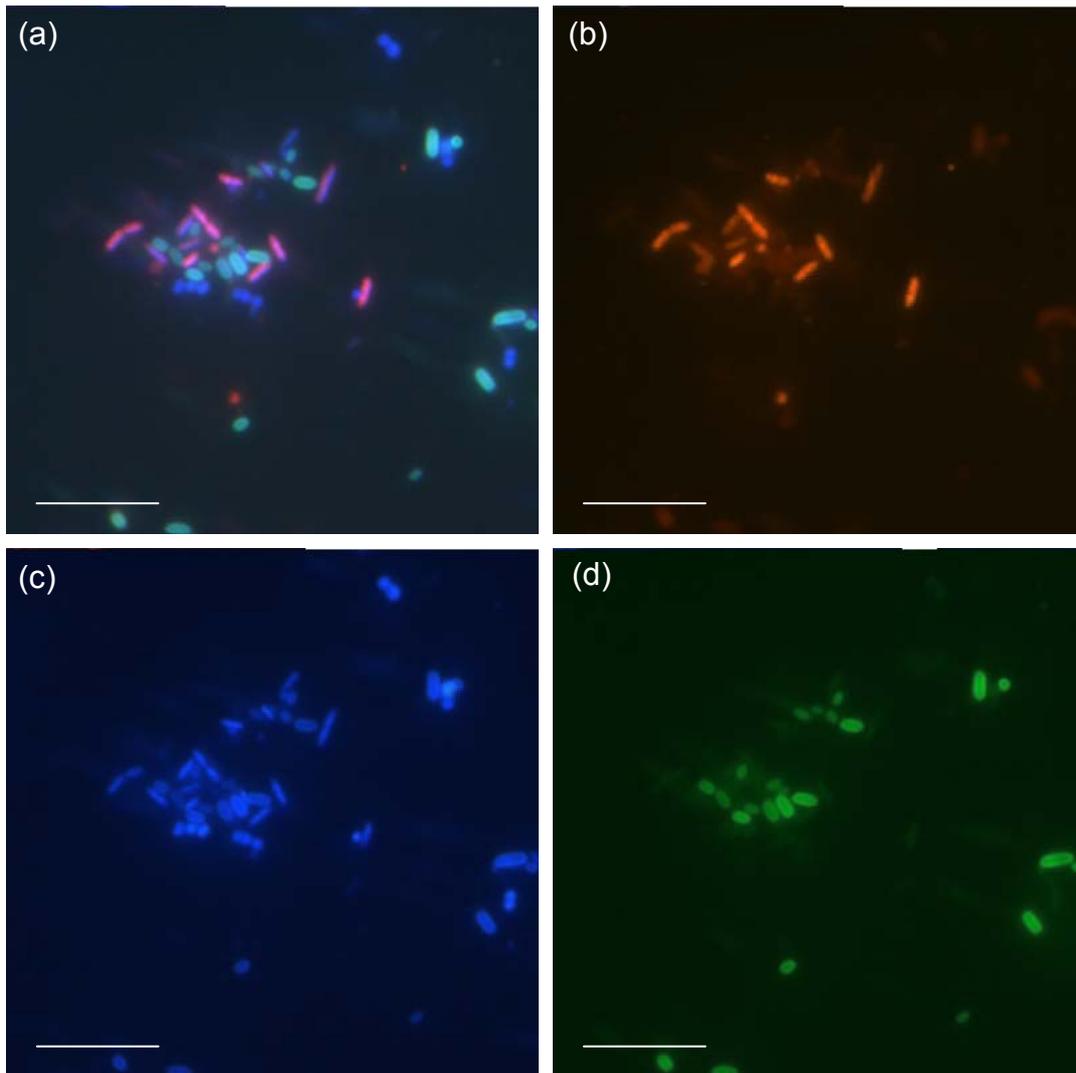


Abb. A 3: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 17-20 cm. Aufgenommen ist ein identisches mikroskopisches Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) ist das kombinierte Bild aller drei übereinander gelagerter Aufnahmen. b) zeigt die Anfärbung der Zellen der Domäne *Eubacteria* durch den Sondenmix EUBmix, der mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. c) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI. d) zeigt die Autofluoreszenz einer Gruppe von Zellen bei Anregung im blauen und Absorption im grünen Wellenlängenbereich. Der Balken repräsentiert eine Strecke von 10 μm .

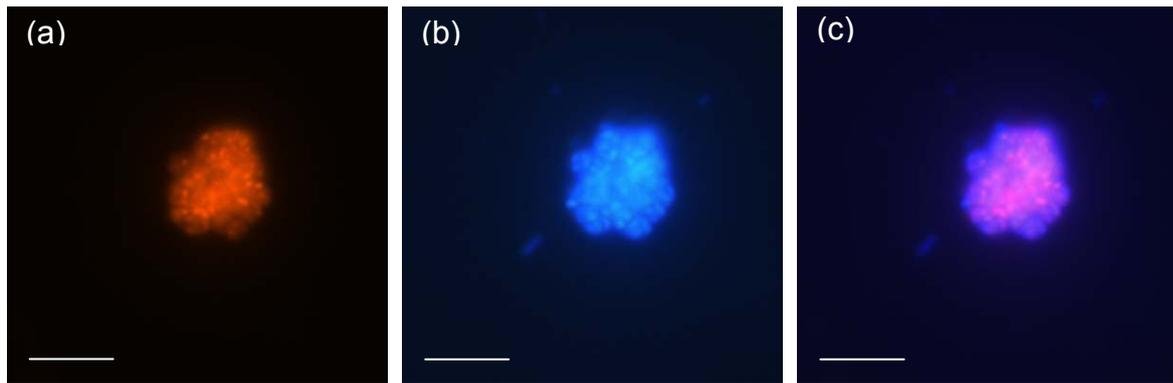


Abb. A 4: Aufnahmen der Anreicherung aus der Bodentiefe 0-5 cm. Aufgenommen ist das identische mikroskopische Feld mit verschiedenen Filtern des Epifluoreszenzmikroskops. a) zeigt die Anfärbung der Zellen der Familie *Methanosarcinaceae* durch die Sonde MS 1414, die mit dem Farbstoff Cy3 markiert ist. b) zeigt die Anfärbung aller im Blickfeld befindlichen Zellen mit DAPI c) ist das kombinierte Bild der zwei übereinander gelagerten Aufnahmen. Der Balken repräsentiert eine Strecke von 5 μm .

8.3 Weitere Abbildungen und Tabellen zum BIOLOG-Versuch zum Vergleich des Substratumsatzes zwischen den Horizonten

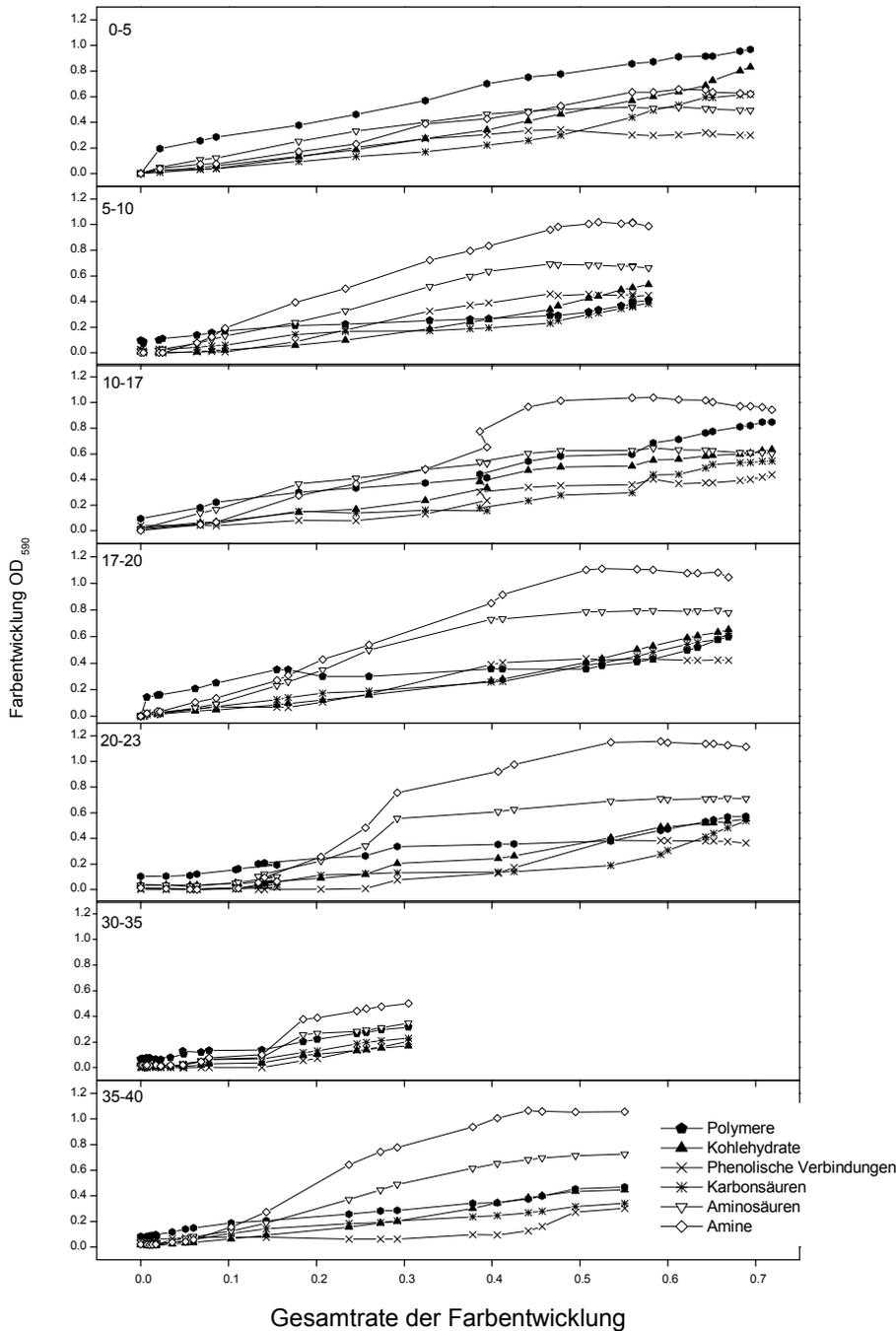


Abb. A 5: Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentiefen. Der Umsatz ist gegen die jeweilige Gesamtrate der Farbentwicklung aufgetragen.

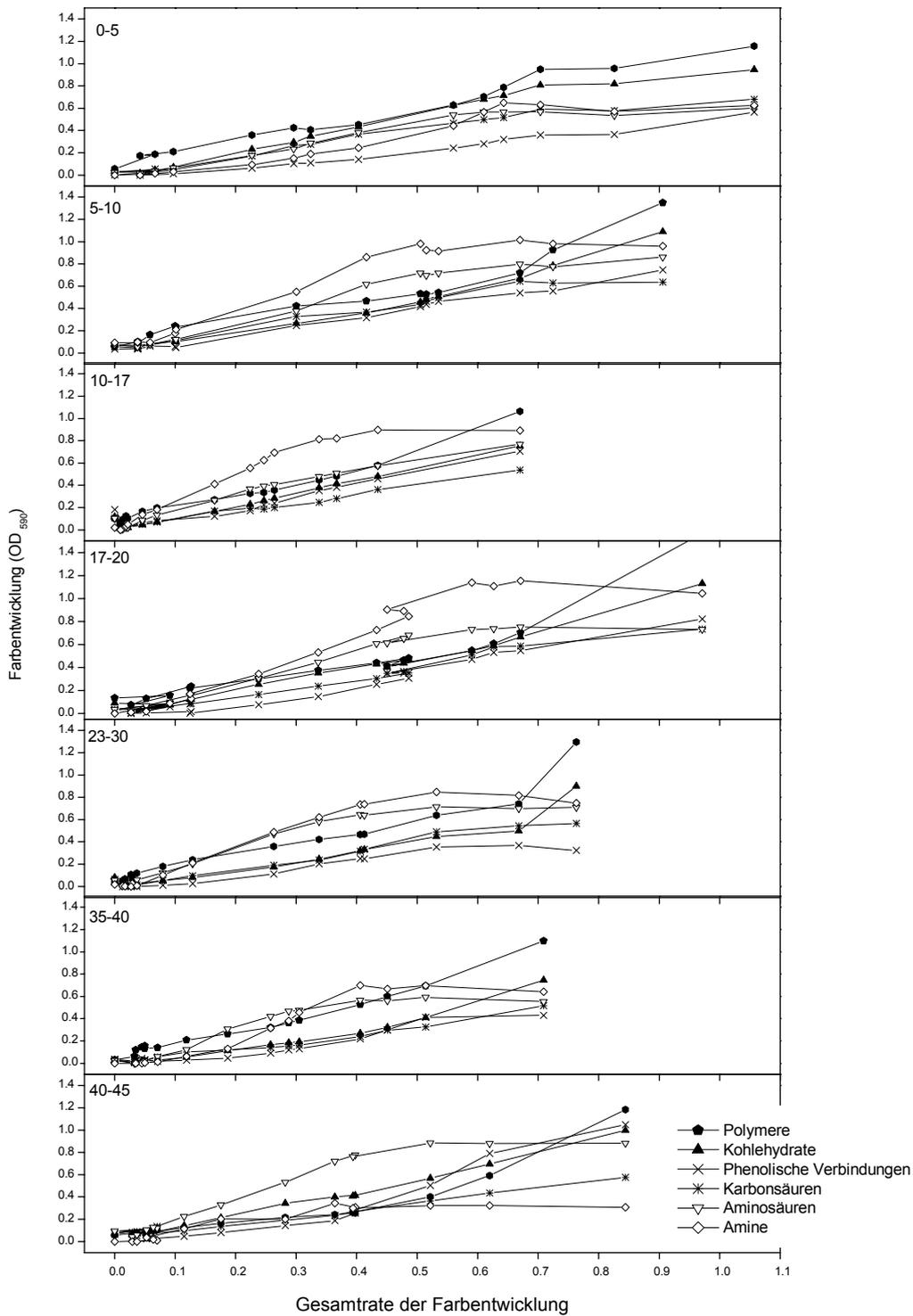


Abb. A 6: Umsatz der in 6 Substratklassen eingeteilten Substrate in den verschiedenen Bodentieffen. Anaerober Substratumsatz. Der Umsatz ist gegen die jeweilige Gesamtrate der Farbentwicklung aufgetragen.

8.4 Statistik für die Auswertung des BIOLOG Versuchs

8.4.1 Statistik für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2

Tab. A 1: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse	Eigenwert	% Gesamt Varianz	Kum. Eigenwert	Kum. %
1	4,13	26,56	4,13	26,56
2	3,15	20,29	7,29	46,85
3	2,43	15,59	9,72	62,43
4	1,82	11,68	11,53	74,11
5	1,29	8,29	12,82	82,40
6	0,76	4,90	13,59	87,31
7	0,51	3,25	14,09	90,56
8	0,35	2,23	14,44	92,79
9	0,31	1,98	14,75	94,77
10	0,30	1,93	15,05	96,70
11	0,15	0,96	15,20	97,66
12	0,12	0,77	15,32	98,43
13	0,09	0,60	15,41	99,0302
14	0,06	0,37	15,47	99,40
15	0,05	0,31	15,52	99,71
16	0,02	0,12	15,54	99,83
17	0,01	0,08	15,55	99,91
18	0,01	0,05	15,56	99,97
19	0,01	0,03	15,56	100

Tab. A 2: Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse	Gült. N	Mittelw.	Median	Min.	Max.	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stdabw.	Schiefe
1	20	0	0,14	-4,61	4,26	-0,88	1,03	2,03	-0,22
2	20	0	-0,24	-2,88	5,01	-1,19	0,97	1,78	1,18
2 ^(*)	20	1,65	1,66	0,35	2,83	1,35	1,99	0,53	-0,12
3	20	0	-0,07	-3,28	3,19	-1,14	1,13	1,56	0,07
4	20	0	-0,07	-3,05	2,26	-0,73	0,96	1,35	-0,41

^(*) Nach Wurzeltransformation

Tab. A 3: Varianzanalyse der ersten 4 Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,2. *Markierte* Effekte lehnen die Nullhypothese der Varianzhomogenität ab (signifikant für $p < 0,05$).

Achse.	SQ Effekt	FG Effekt	MQ Effekt	SQ Fehler	FG Fehler	MQ Fehler	F	p
1	65,19	6	10,87	13,32	13	1,02	10,60	< 0,001
2	30,85	6	5,14	29,14	13	2,24	2,29	0,10
2 ^(*)	2,86	6	0,48	2,43	13	0,19	2,55	0,07
3	12,26	6	2,04	33,82	13	2,60	0,79	0,59
4	13,98	6	2,33	20,56	13	1,58	1,47	0,26

(*) Nach Wurzeltransformation

Tab. A 4: Ergebnisse des Scheffé-Tests auf Signifikanz, Aerober Umsatz bei AWCD 0,2. Die Nullhypothese der Mittelwerthomogenität wird für alle Effekte auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ erfüllt.

ACHSE 3						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	20-23	30-35
5-10	0,990					
10-17	0,98	1				
17-20	0,81	0,99	1			
20-23	1	0,99	0,97	0,80		
30-35	1	1	0,99	0,92	1	
35-40	0,99	1	1	0,99	0,99	1
ACHSE 4						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	20-23	30-35
5-10	0,38					
10-17	0,90	0,95				
17-20	0,73	1	1			
20-23	0,78	0,99	1	1		
30-35	0,99	0,90	1	1	0,99	
35-40	0,57	1	1	1	01	0,97

Tab. A 5: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Aerober Umsatz bei AWCD 0,2.

Substrat	Achse 1	Achse 2
D-Cellobiose	0,512	-0,398
N-Acetyl-D-Glucosamine	0,448	-0,136
beta-Methyl-D-Glucoside	0,442	-0,053
alpha-D-Lactose	0,284	-0,356
D-Xylose	0,177	-0,389
D-Mannitol	0,003	-0,054
L-Serine	0,711	-0,140
alpha-Cyclodextrin	0,623	-0,307
Glycogen	0,605	-0,226
4-Hydroxy Benzoic Acid	0,436	0,004
L-Threonine	0,407	-0,063
gamma-Hydroxybutyric Acid	0,355	-0,190
D,L-alpha-Glycerol-Phosphate	0,250	-0,017
L-Phenylalanine	0,225	0,219
Glycyl-L-Glutamic Acid	0,198	-0,375
2-Hydroxy Benzoic Acid	0,115	-0,492
Itaconic Acid	0,096	-0,158
L-Arginine	0,080	0,846
D-malic Acid	0,050	-0,387
alpha-Ketobutyric Acid	-0,036	-0,392
Phenylethylamine	-0,056	0,591
D-Galacturonic	-0,108	-0,011
Tween 40	-0,154	0,079
Glucose-1-Phosphate	-0,255	-0,204
Tween 80	-0,350	0,315
D-Glucosaminic Acid	-0,391	-0,110
D-Galactonic Acidgamma-Lactone	-0,521	0,556
Putrescine	-0,550	0,461
L-Asparagine	-0,646	-0,667
Pyruvic Acid Methyl Ester	-0,746	0,287
i-Erythrol	-0,109	-0,252

8.4.2 Statistik für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2

Tab. A 6: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse	Eigenwert	% Gesamt Varianz	Kumul. Eigenwert	Kumul. %
1	6,36	40,93	6,36	40,93
2	2,29	14,71	8,65	55,64
3	1,72	11,06	10,37	66,71
4	1,42	9,15	11,79	75,86
5	1,09	6,99	12,88	82,84
6	0,60	3,88	13,48	86,72
7	0,43	2,77	13,92	89,50
8	0,36	2,35	14,28	91,84
9	0,29	1,88	14,57	93,76
10	0,24	1,56	14,82	95,29
11	0,19	1,25	15,01	96,54
12	0,14	0,88	15,15	97,42
13	0,12	0,76	15,26	98,18
14	0,08	0,54	15,35	98,72
15	0,06	0,38	15,41	99,10
16	0,051	0,33	15,46	99,43
17	0,03	0,22	15,49	99,64
18	0,03	0,19	15,52	99,83
19	0,01	0,10	15,54	99,92
20	0,01	0,08	15,55	100

Tab. A 7: Deskriptive Statistik der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse	Gült. N	Mittelw.	Median	Min.	Max.	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stdabw.	Schiefe
1	21	0	-0,79	-3,67	4,92	-1,80	1,57	2,52	0,42
2	21	0	0,13	-3,65	2,38	-0,65	1,35	1,51	-0,68
3	21	0	-0,02	-2,42	2,90	-0,98	0,65	1,31	0,21
4	21	0	0,12	-2,82	2,06	-0,24	0,74	1,19	-0,68

Tab. A 8: Varianzanalyse der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,2. *Markierte* Effekte lehnen die Nullhypothese der Varianzhomogenität ab (signifikant für $p < 0,05$).

Hauptk.	SQ Effekt	FG Effekt	MQ Effekt	SQ Fehler	FG Fehler	MQ Fehler	F	p
1	115,87	6	19,31	11,42	14	0,82	23,67	< 0,001
2	35,49	6	5,91	10,257	14	0,73	8,07	< 0,001
3	13,63	6	2,27	20,77	14	1,48	1,53	0,24
4	14,02	6	2,34	14,43	14	1,03	2,27	0,10

Tab. A 9: Ergebnisse des Scheffé-Tests für den paarweisen Vergleich der anaerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,2. Die Nullhypothese der Mittelwerthomogenität wird für alle Effekte auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ erfüllt.

Achse 3						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	23-30	35-40
5-10	0,94					
10-17	0,85	1				
17-20	1	0,94	0,84			
23-30	1	0,99	0,94	01		
35-40	1	0,99	0,96	1	1	
40-45	0,98	0,53	0,38	0,98	0,93	0,90
Achse 4						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	23-30	35-40
5-10	0,34					
10-17	0,95	0,88				
17-20	0,63	1	0,99			
23-30	0,85	0,97	1	1		
35-40	0,79	0,98	1	1	1	
40-45	1	0,28	0,91	0,56	0,78	0,72

Tab. A 10: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Anaerober Umsatz bei AWCD 0,2.

Substrat	Achse1	Achse 2
N-Acetyl-D-Glucosamine	0,608	-0,708
Glucose-1-Phosphate	0,428	-0,453
D-Glucosaminic Acid	0,325	0,037
gamma-Hydroxybutyric Acid	0,315	0,231
2-Hydroxy Benzoic Acid	0,275	0,245
4-Hydroxy Benzoic Acid	0,130	0,265
D,L-alpha-Glycerol-Phosphate	0,007	0,252
D-malic Acid	0,768	0,107
D-Xylose	0,742	-0,064
alpha-Ketobutyric Acid	0,715	0,140
D-Cellobiose	0,587	0,142
Glycyl-L-Glutamic Acid	0,533	0,214
beta-Methyl-D-Glucoside	0,495	-0,676
L-Phenylalanine	0,420	-0,290
i-Erythrol	0,384	0,249
Itaconic Acid	0,335	-0,071
alpha-Cyclodextrin	0,296	-0,089
alpha-D-Lactose	0,280	0,269
L-Arginine	0,160	0,598
L-Threonine	0,156	-0,011
Glycogen	-0,144	0,536
Phenylethylamine	-0,219	0,183
L-Serine	-0,233	0,722
Putrescine	-0,624	-0,227
L-Asparagine	-0,945	-0,202
D-Galacturonic	-0,174	-0,154
D-Galactonic Acidgamma-Lactone	-0,179	0,165
D-Mannitol	-0,757	0,070

8.4.3 Statistik für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5

Tab. A 11: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5.

Achse	Eigenwert	% Gesamt Varianz	Kumul. Eigenwert	Kumul. %
1	2,66	30,52	2,66	30,52
2	2,18	24,98	4,84	55,50
3	1,43	16,35	6,27	71,85
4	0,64	7,33	6,91	79,18
5	0,52	5,93	7,42	85,11
6	0,27	3,08	7,69	88,19
7	0,23	2,62	7,92	90,81
8	0,19	2,17	8,11	92,99
9	0,17	1,98	8,28	94,97
10	0,13	1,52	8,41	96,49
11	0,09	1,07	8,51	97,55
12	0,07	0,83	8,58	98,39
13	0,05	0,62	8,63	99,01
14	0,04	0,42	8,67	99,42
15	0,03	0,29	8,70	99,72
16	0,01	0,17	8,71	99,89
17	0,004	0,06	8,72	99,94
18	0,003	0,04	8,72	99,99
19	0,001	0,01	8,72	100

Tab. A 12: Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5.

Achse.	Gült. N	Mittelw.	Median	Min.	Max.	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stdabw.	Schiefe
1	20	0	-0,78	-1,89	3,09	-1,21	0,74	1,63	0,89
2	20	0	-0,11	-2,18	4,56	-0,93	0,52	1,48	1,76
2 ^(*)	20	1,69	1,70	0,91	2,75	1,44	1,875	0,39	0,88
3	20	0	-0,11	-2,54	3,83	-0,59	0,40	1,19	1,36
3 ^(*)	20	1,70	1,70	0,68	2,61	1,55	1,84	0,35	-0,35
4	20	0	0,15	-2,10	1,02	-0,39	0,66	0,80	-1,03
4 ^(*)	20	9,61	9,90	0,81	16,12	6,81	13,37	4,28	-0,29

(*) Nach Wurzeltransformation

Tab. A 13: Varianzanalyse der ersten 4 Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse für den aeroben Umsatz bei AWCD 0,5. *Markierte* Effekte lehnen die Nullhypothese der Varianzhomogenität ab (signifikant für $p < 0,05$).

Achse.	SQ Effekt	FG Effekt	MQ Effekt	SQ Fehler	FG Fehler	MQ Fehler	F	p
1	47,08	6	7,85	3,50	13	0,27	29,13	< 0,001
2	35,93	6	5,99	5,46	13	0,42	14,25	< 0,001
2^{*)}	2,46	6	0,41	0,49	13	0,04	10,89	< 0,001
3	4,11	6	0,69	22,98	13	1,77	0,39	0,87
3 ^{*)}	0,29	6	0,05	2,09	13	0,16	0,30	0,93
4	7,33	6	1,22	4,81	13	0,37	3,30	< 0,05
4^{*)}	228,77	6	38,13	119,56	13	9,20	4,15	< 0,05

Tab. A 14: Ergebnisse der Signifikanztests für den paarweisen Vergleich der aerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,5. *Markierte* Differenzen sind signifikant für $p < 0,05$.

Achse 3 (Scheffe-Test)						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	20-23	30-35
5-10	0,94					
10-17	0,99	1				
17-20	1	1	1			
20-23	0,98	1	1	1		
30-35	1	1	1	1	1	
35-40	0,99	1	1	1	1	1
Achse 4 (Fisher-LSD-Test)						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	20-23	30-35
5-10	0,39					
10-17	0,65	0,69				
17-20	0,06	< 0,01	< 0,05			
20-23	0,21	< 0,05	0,10	0,47		
30-35	0,41	0,95	0,68	< 0,05	0,06	
35-40	< 0,05	0,20	0,10	< 0,001	< 0,01	0,27

Tab. A 15: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Aerober Umsatz bei AWCD 0,5.

Substrat	Achse 1	Achse 2
alpha-Cyclodextrin	0,939	-0,177
D-Cellulose	0,897	-0,385
Glycogen	0,753	-0,434
alpha-D-Lactose	0,607	-0,440
D-Xylose	0,488	-0,430
2-Hydroxy Benzoic Acid	0,451	0,100
Pyruvic Acid Methyl Ester	0,445	0,373
D-malic Acid	0,394	-0,405
Tween 80	0,310	0,584
i-Erythrol	0,239	-0,165
D-Glucosaminic Acid	0,226	0,704
D,L-alpha-Glycerol-Phosphate	0,216	-0,386
Tween 40	0,155	0,568
alpha-Ketobutyric Acid	0,153	0,145
Itaconic Acid	0,049	-0,495
D-Galacturonic	0,039	0,829
L-Phenylalanine	0,028	-0,014
4-Hydroxy Benzoic Acid	0,002	-0,060
beta-Methyl-D-Glucoside	-0,001	-0,679
L-Threonine	-0,028	-0,209
gamma-Hydroxybutyric Acid	-0,078	-0,304
D-Galactonic Acidgamma-Lactone	-0,079	0,518
Glycyl-L-Glutamic Acid	-0,163	-0,164
Glucose-1-Phosphate	-0,219	0,219
L-Serine	-0,267	0,388
N-Acetyl-D-Glucosamine	-0,319	-0,294
L-Asparagine	-0,327	0,837
Putrescine	-0,338	0,605
D-Mannitol	-0,670	0,345
Phenylethylamine	-0,722	-0,432
L-Arginine	-0,730	-0,562

8.4.4 Statistik für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5

Tab. A 16: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5.

Hauptk.	Eigenwert	% Gesamt Varianz	Kumul. Eigenwert	Kumul. %
1	1,63	31,44	1,63	31,44
2	0,87	16,78	2,50	48,22
3	0,58	11,11	3,08	59,33
4	0,43	8,28	3,51	67,61
5	0,37	7,17	3,88	74,78
6	0,25	4,86	4,13	79,64
7	0,22	4,23	4,35	83,87
8	0,17	3,24	4,52	87,11
9	0,14	2,77	4,66	89,89
10	0,12	2,23	4,78	92,11
11	0,11	2,09	4,88	94,21
12	0,08	1,50	4,96	95,71
13	0,06	1,18	5,02	96,89
14	0,06	1,11	5,08	98,00
15	0,04	0,72	5,12	98,72
16	0,03	0,57	5,15	99,29
17	0,02	0,29	5,16	99,58
18	0,02	0,18	5,17	99,76
19	0,01	0,16	5,18	99,96
20	0,004	0,08	5,18	100

Tab. A 17: Deskriptive Statistik der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5.

Achse	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stdabw.	Schiefe
1	21	0	-0,33	-1,33	2,90	-0,69	0,06	1,28	1,37
1 ^(*)	21	1,35	1,29	0,81	2,21	1,14	1,44	0,42	0,82
2	21	0	0,43	-1,84	1,31	-0,52	0,72	0,93	-0,60
3	21	0	0,03	-1,40	1,12	-0,64	0,57	0,76	-0,30
4	21	0	0,21	-1,60	1,13	-0,39	0,37	0,66	-0,75
5	21	0	-0,12	-0,94	1,01	-0,51	0,55	0,61	0,17

(*) Nach Wurzeltransformation

Tab. A 18: Varianzanalyse der ersten 5 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den anaeroben Umsatz bei AWCD 0,5. *Markierte* Effekte lehnen die Nullhypothese der Varianzhomogenität ab (signifikant für $p < 0,05$).

Achse	SQ Effekt	FG Effekt	MQ Effekt	SQ Fehler	FG Fehler	MQ Fehler	F	p
1	31,54	6	5,26	1,06	14	0,08	69,20	< 0,001
1 ⁽¹⁾	3,30	6	0,55	0,19	14	0,01	40,48	< 0,001
2	15,62	6	2,60	1,78	14	0,13	20,51	< 0,01
3	8,36	6	1,39	3,15	14	0,23	6,19	< 0,01
4	6,03	6	1,00	2,56	14	0,18	5,49	< 0,01
5	2,52	6	0,42	4,92	14	0,35	1,20	0,36

⁽¹⁾ Nach Wurzeltransformation

Tab. A 19: Ergebnisse des Fisher LSD Tests für den paarweisen Vergleich der anaerob inkubierten Horizonte bei AWCD 0,5. *Markierte* Differenzen sind signifikant für $p < 0,05$.

Achse 3						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	23-30	35-40
5-10	< 0,05					
10-17	< 0,05	0,81				
17-20	0,33	< 0,01	< 0,01			
23-30	< 0,05	0,87	0,69	< 0,01		
35-40	0,15	< 0,01	< 0,01	0,62	< 0,01	
40-45	0,42	< 0,01	< 0,01	0,87	< 0,01	0,51
Achse 4						
Tiefe unter GOF (cm)	0-5	5-10	10-17	17-20	23-30	35-40
5-10	0,16					
10-17	< 0,01	0,10				
17-20	< 0,05	0,40	0,40			
23-30	0,13	< 0,01	< 0,001	< 0,01		
35-40	0,90	0,13	< 0,01	< 0,05	0,17	
40-45	0,98	0,16	< 0,01	< 0,05	0,14	0,92

Tab. A 20: Eigenvektorkomponenten der verschiedenen Substrate die zur Unterscheidung des Substratumsatzes der verschiedenen Bodentiefen auf den Achsen 1 und 2 beitragen. Anaerober Umsatz bei AWCD 0,5.

Substrate	Achse 1	Achse2
beta-Methyl-D-Glucoside	0,823	-0,267
N-Acetyl-D-Glucosamine	0,767	0,019
D-Galactonic Acidgamma-Lactone	0,726	0,025
Glucose-1-Phosphate	0,649	-0,353
D-malic Acid	0,600	-0,070
alpha-Ketobutyric Acid	0,508	0,047
D-Galacturonic	0,462	0,478
Pyruvic Acid Methyl Ester	0,383	0,487
gamma-Hydroxybutyric Acid	0,383	0,630
L-Threonine	0,345	0,041
Itaconic Acid	0,295	-0,394
L-Phenylalanine	0,245	0,306
alpha-Cyclodextrin	0,196	-0,723
i-Erythrol	0,088	0,253
L-Serine	0,011	0,489
Tween 40	0,003	0,283
Glycogen	0,003	-0,644
alpha-D-Lactose	-0,134	-0,762
L-Arginine	-0,200	0,342
D-Xylose	-0,256	-0,672
L-Asparagine	-0,267	0,174
4-Hydroxy Benzoic Acid	-0,276	0,304
D-Cellobiose	-0,292	-0,460
D,L-alpha-Glycerol-Phosphate	-0,299	0,383
Putrescine	-0,346	0,619
Glycyl-L-Glutamic Acid	-0,375	0,292
2-Hydroxy Benzoic Acid	-0,376	-0,505
Phenylethylamine	-0,684	0,445
D-Mannitol	-0,746	0,318
D-Glucosaminic Acid	-0,801	-0,299
Tween 80	-0,845	-0,319

8.4.5 Statistik für den Vergleich des aeroben und anaeroben Umsatzes bei 0,2

Tab. A 21: Eigenwerte der Kovarianzmatrix und Statistiken der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse.	Eigenwert	% Gesamt Varianz	Kumul. Eigenwert	Kumul. %
1	5,40	32,32	5,40	32,32
2	3,25	19,45	8,64	51,764
3	2,11	12,62	10,75	64,38
4	1,38	8,28	12,13	72,66
5	1,21	7,26	13,35	79,92
6	0,91	5,43	14,25	85,35
7	0,51	3,08	14,77	88,43
8	0,34	2,07	15,11	90,50
9	0,32	1,94	15,44	92,43
10	0,31	1,88	15,75	94,32
11	0,23	1,39	15,98	95,71
12	0,17	1,02	16,15	96,73
13	0,12	0,74	16,28	97,47
14	0,11	0,66	16,39	98,14
15	0,09	0,55	16,48	98,69
16	0,06	0,37	16,54	99,06
17	0,06	0,34	16,60	99,40
18	0,04	0,22	16,64	99,62
19	0,03	0,20	16,67	99,81
20	0,01	0,09	16,68	99,90
21	0,01	0,05	16,69	99,96
22	0,004	0,03	16,70	99,99
23	0,002	0,01	16,70	100

Tab. A 22: Deskriptive Statistik der ersten 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.

Achse	Gült, N	Mittelw.	Median	Min.	Max.	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stdabw.	Schiefe
1	24	0	-0,03	-3,87	4,38	-1,90	1,55	2,32	0,03
2	24	0	-0,03	-3,43	3,40	-1,34	1,16	1,80	0,04
3	24	0	0,35	-2,74	2,32	-1,19	1,12	1,45	-0,43
4	24	0	0,14	-2,86	1,69	-0,77	0,82	1,18	-0,82

Tab. A 23: Varianzanalyse der 4 Achsen der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2. *Markierte* Effekte lehnen die Nullhypothese der Varianzhomogenität signifikant für $p < 0,05$ ab.

Achse	SQ Effekt	FG Effekt	MQ Effekt	SQ Fehler	FG Fehler	MQ Fehler	F	p
1	99,21	7	14,17	24,91	16	1,56	9,10	< 0,001
2	62,51	7	8,93	12,18	16	0,76	11,73	< 0,001
3	41,90	7	5,99	6,56	16	0,41	14,60	< 0,001
4	6,47	7	0,92	25,35	16	1,58	0,58	0,76

Tab. A 24: Substrate und ihre Eigenvektorkomponente für die zweite Achse der Hauptkomponentenanalyse für den Vergleich zwischen aerobem und anaerobem Umsatz bei AWCD 0,2.

Substrat	Achse 2
Pyruvic Acid Methyl Ester	0,581
Putrescine	0,472
Glucose-1-Phosphate	0,440
Tween 80	0,430
N-Acetyl-D-Glucosamine	0,414
Itaconic Acid	0,404
beta-Methyl-D-Glucoside	0,380
D-malic Acid	0,370
Tween 40	0,243
D,L-alpha-Glycerol-Phosphate	0,228
D-Galactonic Acidgamma-Lactone	0,191
L-Phenylalanine	0,189
L-Asparagine	0,127
D-Mannitol	0,087
Glycyl-L-Glutamic Acid	0,085
i-Erythrol	0,076
alpha-Ketobutyric Acid	0,023
D-Galacturonic	-0,156
4-Hydroxy Benzoic Acid	-0,215
D-Xylose	-0,268
L-Arginine	-0,309
Phenylethylamine	-0,310
2-Hydroxy Benzoic Acid	-0,349
alpha-D-Lactose	-0,350
L-Threonine	-0,383
D-Glucosaminic Acid	-0,396
Glycogen	-0,423
gamma-Hydroxybutyric Acid	-0,453
alpha-Cyclodextrin	-0,558
D-Cellulbiose	-0,661
L-Serine	-0,928