

Institut für Bodenökologie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Charakterisierung von
mikrobiellen Gemeinschaften in oxischen und anoxischen Bodenöko-
systemen anhand von Phospholipid-Profilen**

Andreas Gattinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften (Dr.agr.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. I. Kögel-Knabner
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J.C. Munch
2. Univ.-Prof. Dr. W. Huber

Die Dissertation wurde am 23.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 22.02.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1. VORWORT	1
1.2. BIOMARKER ZUR BESCHREIBUNG DER STRUKTUR UND FUNKTION MIKROBIELLER GEMEINSCHAFTEN IN BODENÖKOSYSTEMEN	1
1.3. POSPHOLIPIDFETTSÄUREN (PLFA) ALS BIOMARKER FÜR MIKROBIELLE GEMEINSCHAFTEN IN BODENÖKOSYSTEMEN.....	3
1.4. PHOSPHOLIPID-ETHERLIPIDE (PLEL) ALS BIOMARKER FÜR ARCHAEENPOPULATIONEN.....	6
1.5. STRUKTUR UND FUNKTION MIKROBIELLER GEMEINSCHAFTEN IN NIEDERMOOR- ÖKOSYSTEMEN.....	12
1.6. ZIELSETZUNGEN.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. AUFSTELLUNG DER VERWENDETEN MIKROORGANISMENSTÄMME.....	15
2.2. BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN BODENÖKOSYSTEME.....	16
2.3. BESTIMMUNG ALLGEMEINER BODENPARAMETER	18
2.3.1. Bestimmung des Frischvolumens, der Dichte (feldfeucht), der Trockenraumdicke und des Porenvolumens	18
2.3.2. Bestimmung des gravimetrischen Wassergehalts, des Gehalts an Trockensubstanz, Berechnung des wassergefüllten Porenvolumens	19
2.3.3. Boden- und wasserchemische Parameter	20
2.4. BESTIMMUNG VON METHANFLUßRATEN IN BODENÖKOSYSTEMEN	20
2.5. CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHOLIPIDE IN MIKROBIELLEN REINKULTUREN UND BODENÖKOSYSTEMEN.....	21
2.5.1. Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	22
2.5.2. Lipidextraktion von Reinkulturen.....	22
2.5.3. Lipidextraktion von Umweltproben.....	23
2.5.4. Gewinnung der Phospholipide.....	24
2.5.5. Bestimmung der Phospholipidfettsäuren (PLFA).....	25
2.5.6. Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL).....	27

2.6. QUANTITATIVE, MOLEKULARBIOLOGISCHE BESTIMMUNGSMETHODEN VON MIKROBIELLEN POPULATIONEN (METHODENVERGLEICH ZU PLEL/PLFA)	34
2.6.1. Zellfixierung in Umweltproben.....	34
2.6.2. <i>In situ</i> -Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (FISH).....	35
2.6.3. Gesamtzellzahlbestimmung nach DAPI-Färbung	36
2.6.4. Bestimmung relativer Populationsanteile nach <i>in situ</i> -Hybridisierung und DAPI-Färbung.....	38
2.6.5. Mikroskopische Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen.....	38
2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	39
2.7.1. Mittelwertvergleiche	39
2.7.2. Hauptkomponentenanalyse	40
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
3.1. METHODISCHE ASPEKTE.....	41
3.1.1. Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL).....	41
3.1.2. Quantitative Bestimmung von PLEL und PLFA in ausgewählten mikrobiellen Reinkulturen.....	67
3.1.3. Konsequenzen für die Untersuchungen von Bodenökosystemen.....	80
3.2. CHARAKTERISIERUNG VON MIKROBIELLEN GEMEINSCHAFTEN IN ENTWÄSSERTEN (OXISCHEN) UND WIEDERVERNÄßTEN (ANOXISCHEN) NIEDERMOORÖKOSYSTEMEN	84
3.2.1. Kenndaten der Bodenökosysteme	84
3.2.2. Betrachtung von Gesamtpopulationen auf der Basis von Phospholipid-Profilen.....	87
3.2.3. Charakterisierung von mikrobiellen Populationen mit molekularbiologischen Methoden....	95
3.2.4. Vergleich der mit FISH/DAPI und mit PLEL/PLFA ermittelten Zellzahlen.....	100
3.2.5. Charakterisierung von methanogenen und methanotrophen Mikroorganismen mittels spezifischer PLEL- und PLFA-Biomarker.....	103
4 ÜBERGREIFENDE DISKUSSION.....	117
4.1. METHODISCHE ASPEKTE ZUR BESTIMMUNG VON PHOSPHOLIPID-ETHERLIPIDEN (PLEL) UND PHOSPHOLIPIDFETTSÄUREN (PLFA)	117
4.2. MIKROBIELLE GEMEINSCHAFTEN IN OXISCHEN UND ANOXISCHEN BODENÖKOSYSTEMEN ...	121
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	127
SUMMARY.....	132
6 LITERATUR	136

Abkürzungsverzeichnis

Auflistung häufig verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amu	atomic mass units
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
CREN	<i>Crenarchaeota</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	et alteri
EURY	<i>Euryarchaeota</i>
FAME	Fettsäuremethylester (engl.: Fatty acid methylester)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FS	Frischsubstanz
g	Gramm, Fallbeschleunigung
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie oder Gaschromatograph/Massenspektrometer
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IS	Interner Standard
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie oder Flüssigkeitschromatograph/Massenspektrometer
<i>M</i>	Molarität
n	Stichprobenumfang
n.d.	nicht detektierbar
PL	Phospholipid
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principal component analysis)
PLFA	Phospholipidfettsäuren (engl.: Phospholipid fatty acids; s. auch Tab. 1)
PLEL	Phospholipid-Etherlipide (s. auch Tab. 18)
PV	Porenvolumen
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic acid)
r	ribosomal
SPE	Festphasenextraktion (engl.: Solid phase extraction)
Tab.	Tabelle
TIC	Totalionenchromatogramm
TS	Trockensubstanz
WFPS	wassergefülltes Porenvolumen (engl.: Water filled pore space)

*„Wüßte ich genau, wie dieses Blatt aus seinem Zweige kam,
schwieg ich auf ewige Zeit still, denn ich wüßte genug.“*

Hugo von Hoffmannsthal

1 Einleitung

1.1. Vorwort

Bodenmikroorganismen sind nicht nur für die Produktivität und Stabilität von land- und forstwirtschaftlich geprägten Landnutzungssystemen bedeutsam, sondern sie erfüllen darüberhinaus wichtige Funktionen in den globalen Stoffkreisläufen. Daher ist es für das Verständnis terrestrischer Systeme von großer Notwendigkeit, die an den Stoffkreisläufen beteiligten Organismen zu identifizieren und den Beitrag einzelner Arten bzw. Gruppen zu messen. Dies erlangt besondere Wichtigkeit vor dem Hintergrund von politisch oder wirtschaftlich bedingten Landnutzungsänderungen, Schadstoffeinträgen und „globalem Wandel“.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erweiterung von Lipid-Biomarker Methoden zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften einerseits und mit der Anwendung des erweiterten Methodenspektrums auf bodenökologische Fragestellungen andererseits. Dabei werden oxische und anoxische Horizonte in Moorökosystemen betrachtet, um den Einfluß der Wiedervernässung auf mikrobielle Gemeinschaften bei der Rekultivierung von degradierten Niedermooren zu untersuchen.

1.2. Biomarker zur Beschreibung der Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften in Bodenökosystemen

Das heutige Wissen zur Physiologie der verschiedenen Bodenmikroorganismen beruht zum überwiegenden Teil auf Laborstudien mit Reinkulturen. Beschreibungen ihrer verschiedenen biochemischen Charakteristika füllen mehrbändige Werke, wie “The Prokaryotes” (Balows *et al.*, 1992). Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, daß wir in der Regel auf die Frage, welche Mikroorganismen in bestimmten Habitaten in welchem Maße zu den gemessenen Stoffflüssen oder Leistungen beitragen, keine oder nur unvollständige Antworten haben. Für dieses Unwissen gibt es zwei Hauptursachen.

Zum einen konnten bisher, was die Struktur von mikrobiellen Gemeinschaften anbelangt, nur etwa 1% der in Böden vorkommenden Mikroorganismen kultiviert werden (Torsvik *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995), zum anderen liefern Laboruntersuchungen an Reinkulturen lediglich Einblicke in das häufig breite Potential der jeweils untersuchten Organismen. Physiologisches Potential ist natürlich nicht gleich der realisierten Funktion im Bodenökosystem.

Die Entwicklung von mikrobiellen Biomarkern hat in den letzten zehn Jahren zu einer verbesserten Verknüpfung von Struktur und Funktion von Mikroorganismengemeinschaften in Bodenökosystemen beigetragen (Boschker *et al.*, 1998; Van Elsas *et al.*, 1997; Schloter *et al.*, 1998). Unter dem Begriff "Biomarker" wird in diesem Zusammenhang jegliche biologische Komponente verstanden, die ein charakteristisches Merkmal einer bestimmten mikrobiellen Gemeinschaft anzeigt (Morgan und Winstanley, 1997). Als mikrobielle Biomarker werden in der Bodenökologie die biochemischen Bausteine von Zellen, wie z.B. DNA, RNA, Phospholipide und Quinone herangezogen.

Weite Verbreitung hat die Analyse des 16S rRNA Gens und die Bestimmung von Phospholipiden bei der Charakterisierung von Bodenmikroorganismen gefunden. Untersuchungen des 16S rRNA Gens (ca. 1500 Nukleotide) ermöglichen nach erfolgter Sequenzierung eine phylogenetische Charakterisierung von Bodenmikroorganismen. Darauf aufbauend können fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden (15-22 Basen) zur Detektion und Quantifizierung von spezifischen Mikroorganismen eingesetzt werden (Fluorescence *in situ* hybridization: FISH). Solche Zellen, welche die zur Sonde passenden 16S rRNA Regionen enthalten, werden durch die Hybridisierung farblich markiert, so daß neben der taxonomischen Identifizierung Morphologie und Lokalisierung der Zellen im Habitat festgestellt werden können (Hartmann *et al.*, 1997). Durch die Verknüpfung von FISH und Autoradiographie kann zudem die Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat in die Mikrobenzellen verfolgt werden (Lee *et al.*, 1999), womit auch der Frage nach der *in situ*-Funktion von mikrobiellen Populationen nachgegangen werden kann.

Ferner sind Phospholipide als wichtige Biomarker in der Bodenökologie anzusehen. Diese sind in ihrer Eigenschaft als Membranlipide Bestandteile aller lebenden Zellen, kommen nicht als Speicherlipide vor und unterliegen hohen metabolischen "turn-over" Raten. Sie sind zudem quantitativ extrahierbar und werden nach dem Zelltod rasch durch Phospholipasen abgebaut (Tunlid und White, 1992; White *et al.*, 1996).

1.3. Phospholipidfettsäuren (PLFA) als Biomarker für mikrobielle Gemeinschaften in Bodenökosystemen

Phospholipide sind nicht nur geeignete Biomarker für die Quantifizierung von lebender mikrobieller Biomasse in Sedimenten (White *et al.*, 1979), Komposten (Hellmann *et al.*, 1997; Gattinger *et al.*, 1997; Gattinger *et al.*, 2000) und Böden (Zelles *et al.*, 1992), sondern anhand der an das Glycerin-gerüst angehängten, taxonomisch bedeutsamen Phospholipidfettsäuren (PLFA; Abb. 1) können sie zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität in Bodenökosystemen herangezogen werden (Korner und Laczko, 1992; Tunlid und White, 1992; Zelles *et al.*, 1992; Zelles, 1999a).

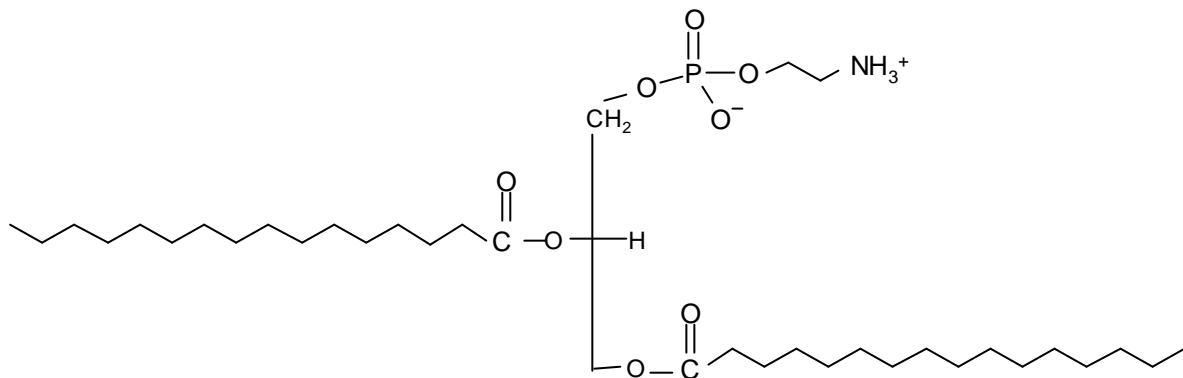


Abbildung 1: Darstellung eines C₁₆-C₁₆-Acylphospholipids (Dipalmitylphosphatidylethanolamin), charakteristisch für *Bacteria* und *Eucarya*

Dabei wird eine Klassifizierung von Bodenmikroorganismen dadurch erreicht, indem die abgetrennten Fettsäuren nach funktionellen Gruppen (Kettenstruktur, Sättigungsgrad und OH-Substitution) separiert werden (Zelles *et al.*, 1992; Zelles und Bai, 1993). Die phylogenetische Klassifizierung von Mikroorganismen gemäß ihrer "natürlichen" Verwandtschaftsbeziehung unterstützt die Vermutung, daß die Fettsäure-Synthesewege in taxonomisch verwandten Gruppen ähnlich sind. Folglich können Fettsäureprofile (= PLFA-Profile) von nicht kultivierten Mikroorganismen auf die ihrer kultivierten Verwandten zurückgeführt werden. In Tab. 1 sind die in Bodenökosystemen am häufigsten auftretenden PLFA und deren Indikatorfunktionen für die jeweiligen Organismen dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenstellung von Fettsäuren (Fraktionen sind fettgedruckt, Subfraktionen in Standard), deren Abkürzungen und ihre Indikatorfunktionen (nach Zelles, 1999a)

Abkürzung	Beschreibung der Fettsäure (FS)	Indikator für, isoliert aus
PLFA	Phospholipidfettsäuren	Mikrobielle Biomasse
EL-SATFA	Estergebundene gesättigte FS	<i>Bacteria, Eucarya</i>
-nor	Geradkettige FS	<i>Bacteria, Eucarya</i>
-bra	Methylverzweigte FS	Gram-positive Bakterien
-cy	Cyclopropylverzweigung	Gram-negative: <i>Rhodospirillum, Cromatium</i> Gram-positive: <i>Clostridium, Bifidobacterium</i>
EL-MUFA	Estergebundene einfach ungesättigte FS	
16:1 ω 6	Position der Doppelbindung	Typ I Methanotrophe
18:1 ω 8	Position der Doppelbindung	Typ II Methanotrophe
EL-PUFA	Estergebundene mehrfach ungesättigte FS	<i>Eucarya, Cyanobakterien</i>
EL-PLOH	Estergebundene Hydroxy-substituierte FS	
- α	Hydroxy-Substitution am C ₁ -Atom neben Carboxylende	<i>Pseudomonas, Gram-negative, Actinomycetales</i>
- β	Hydroxy-Substitution am C ₂ -Atom neben Carboxylende	<i>Mycobacterium</i>
- ω	Hydroxy-Substitution am endständigen C-Atom	Pilze
NEL-UNSA	Nicht-estergebundene gesättigte FS	<i>Clostridium, Eucarya</i>
NEL-UNOH	Nicht-estergebundene Hydroxy-substituierte FS	<i>Bacteroides/Flavobacterium</i>
- α	Hydroxy-Substitution am C ₁ -Atom neben Carboxylende	<i>Sphingomonas, Candida</i>
- β	Hydroxy-Substitution am C ₂ -Atom neben Carboxylende	<i>Bacteroides/Flavobacterium</i>
-myl	Mycolinsäure (β -Hydroxy, α -Verzweigung)	<i>Mycobacterium, Nocardia</i>

PLFA-Profile erweisen sich zwar als sehr nützlich beim Erstellen von "fingerprints" von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und beim Vergleich von Populationen, doch werden zur Interpretation jene Biomarker herangezogen, die in Reinkulturen bestimmt worden sind. Umgekehrt besteht das Problem, Beweise zu erbringen, daß eine einzelne Fettsäure ausschließlich in einer einzigen Gattung oder Art auftritt. So kommt die Fettsäure 16:1 ω 6 nach Ansicht von Bowman *et al.* (1991), Sundh *et al.* (1995) und Boon *et al.* (1996) nur in Methanotrophen des Typs I vor (s. Tab. 1). Aufgrund dieser Sachverhalte empfiehlt es sich eher, mehrere, zu funktionellen Gruppen zusammengefaßte Fettsäuren, für biologische Interpretation heranzuziehen.

Mit der PLFA-Methode werden nur Vertreter der Domänen *Bacteria* und *Eucarya* erfaßt, jedoch keine Organismen der Domäne *Archaea*, welche nach Liesack *et al.* (1997) ebenso zu typischen Bodenorganismen zählen (s. Abb. 2). Archaeen weisen im Glyceringerüst ihrer Phospholipide

Etherbindungen auf (→ PLEL) und können so biochemisch von Organismen der beiden anderen Domänen unterschieden werden. Allerdings weiß man nicht, ob *Archaeen*, zu denen auch die Methanogenen zählen, ähnlich wie andere anaerobe Organismen, wie z.B. Clostridien und Spingomonaden (Tabelle 1), nicht-estergebundene PLFA (NEL-PLFA) enthalten. Bei der Charakterisierung von Reinkulturen werden vorwiegend nur estergebundene Fettsäuren berücksichtigt (DSMZ, 1998; Zelles, 1999a; Zelles, 1999b).

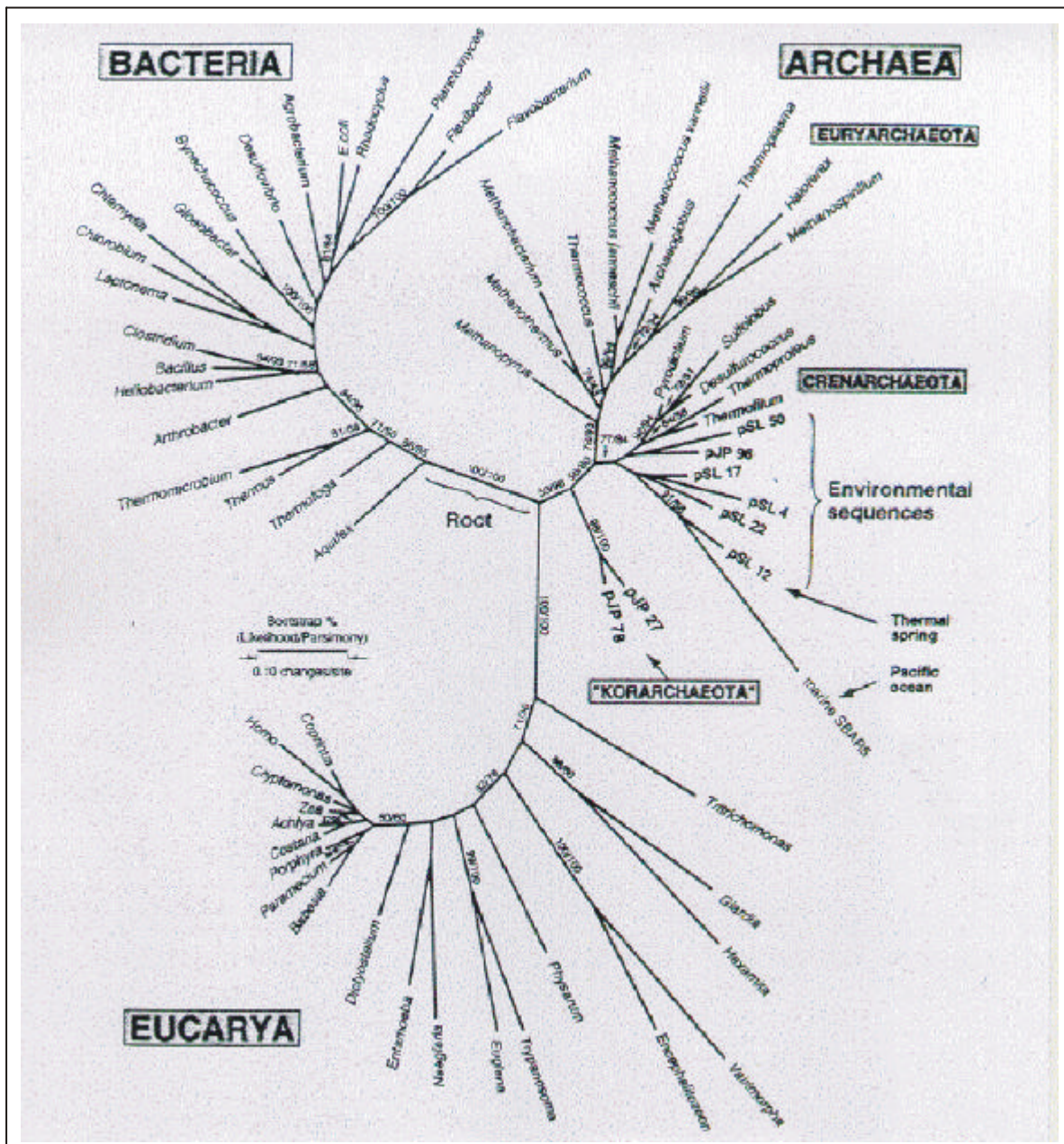


Abbildung 2: Universeller phylogenetischer Baum auf der Basis von rRNA-Sequenzanalysen, welcher die drei Domänen der Biosphäre *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* zeigt (Barns et al., 1996).

Neben der strukturellen Diversität eignen sich PLFA-Biomarker auch zur Beschreibung des physiologischen Status' von mikrobiellen Gemeinschaften. So können, bedingt durch Änderungen in der Membranfluidität, aus dem veränderten cis/trans-Verhältnis von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) oder aus dem Verhältnis SATFA-nor/SATFA-bra Störungen im physiologischen Zustand von Mikroorganismen abgeleitet werden, wie es in Untersuchungen zur Wirkung von Schwermetallen auf Bodenökosystemen Anwendung fand (Frostegård *et al.*, 1993; Mölter, 2000)

Wie die Arbeiten von Boschker *et al.* (1998) und Holmes *et al.* (1999) zeigen, eignen sich PLFA-Biomarkeranalysen außerdem für die Untersuchung des *in vitro*- als auch des *in situ*-Abbaus von ¹³C- bzw. ¹⁴C-markierten Substraten und Xenobiotika in der mikrobiellen Gemeinschaft von Böden und Sedimenten. So konnten Holmes *et al.* (1999) nach ¹⁴CH₄-Exposition von Waldbodensäulen die Methanoxidation einer bisher unbekanntenen Bakteriengruppe durch den Nachweis von ¹⁴C-PLFA belegen.

1.4. Phospholipid-Etherlipde (PLEL) als Biomarker für Archaeenpopulationen

Da die Kultivierung der Domäne *Archaea* bisher nur aus extremen Biotopen, wie heißen Quellen, permanent anoxischen oder salzgesättigten Habitaten gelang, wurde dieser Domäne die Eigenschaft zugeschrieben, nur äußerst "extreme" ökologische Nischen zu besetzen. Diese Auffassung gilt heute nicht mehr, da *Archaea* seit 1992 durch Anwendung des rRNA-Ansatzes unter Einsatz spezifischer 16S rRNA Primer in zahlreichen Habitaten, einschließlich Acker- und Waldböden (Ueda *et al.*, 1995; Buckley *et al.*, 1998; Jurgens *et al.*, 1997; Küper, 1998; Sandaa *et al.*, 1999), nachgewiesen werden konnten. Jedoch konnte man bis auf die Methanogenen, von keinem anderen Archaeum dessen *in situ*-Funktion in Kulturböden bestimmen.

Innerhalb der Domäne *Archaea* existieren zwei gut charakterisierte phylogenetische Gruppen, bzw. Reiche (engl.: kingdoms): die *Crenarchaeota* und die *Euryarchaeota* (Woese *et al.*, 1990). Innerhalb der *Crenarchaeota* herrscht ein einheitlicher Phänotyp vor. Kultivierte Vertreter sind thermophil bis hyperthermophil, wachsen meist anaerob und nutzen Schwefel als Energiequelle (z.B. *Sulfolobus*). Bei den *Euryarchaeota* sind dagegen mehrere Phänotypen bekannt. So gibt es die methanogenen (Ordnungen: *Methanococcales*, *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* und die Gattung *Methanopyrus*), die extrem halophilen, sowie die thermophilen, sulfatreduzierenden Organismen (*Thermoplasma*, *Archaeoglobus* und *Thermococcales*), wobei der jeweilige Phänotyp meist in phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen anzutreffen ist.

Es wurden zwar bereits die für Archaeen charakteristischen Phospholipid-Etherlipide (PLEL) in einigen bodenökologischen Arbeiten angewendet (Nichols *et al.*, 1987; Mancuso *et al.*, 1990; Boon *et al.*, 1996; Guezennec und Fiala-Medioni, 1996, Reichardt *et al.*, 1997; Wachinger *et al.*, 2000), doch konnte in diesen Untersuchungen nicht die mittels rRNA- und rDNA-Ansätzen gefundene Diversität von Archaeen reflektiert werden, da nur ein bis zwei PLEL-Biomarker verwendet wurden, die zudem zu den ubiquitären in der Domäne *Archaea* zählen.

Im Gegensatz zu den Membranlipiden der Domänen *Bacteria* und *Eucarya*, welche auf Esterbindungen basieren, gebildet durch Kondensation von Alkoholen und Fettsäuren, weisen die Lipide der *Archaea* Etherbindungen auf (De Rosa und Gambacorta, 1994). Während dieses Kriterium längst Einzug in die prokaryotische Systematik gehalten hat (Balows *et al.*, 1992; De Rosa und Gambacorta, 1994), wurden bisher nur wenige Schritte unternommen, diesen Ansatz zur Bestimmung von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden auf der Basis von Phospholipid-Analysen zu integrieren.

Die Kernlipide, welche aus der Abtrennung der polaren (Phospho-) Gruppe resultieren, besitzen ein Glyceringerüst, dessen Hydroxy-Gruppen in 2,3 Konfiguration (im Gegensatz zur konventionellen 1,2 Konfiguration der bakteriellen oder eukaryotischen Glycerophosphate; Jones *et al.*, 1987) mit zwei Isoprenoid-Kohlenwasserstoffen verbunden sind (s. Abb. 3-5).

Nach Nichols und Franzmann (1992), Kates *et al.* (1993), Koga *et al.* (1993), De Rosa und Gambacorta (1994), Koga *et al.* (1998) und Morii *et al.* (1998) sind die Strukturen A-I in Abb. 3 charakteristisch für *Euryarchaeota* und die Strukturen J-Q (Abb. 4 und 5), die ausschließlich zyklische Caldarchaeole (1-8 Cyclopentanringe) enthalten, charakteristisch für *Crenarchaeota*. Das Etherlipid A (C₂₀-C₂₀-Archaeol) wurde bisher in allen kultivierten *Euryarchaeota* nachgewiesen, während die Lipide F und G (C₂₀-C₂₅-Archaeol und C₂₅-C₂₅-Archaeol) nur in halophilen Organismen detektiert wurden (Kates *et al.*, 1993; De Rosa und Gambacorta, 1994). Charakteristisch für Methanogene, die ebenso wie die halophilen Archaeen ausschließlich der Gruppe der *Euryarchaeota* angehören (Woese *et al.*, 1990), sind die Archaeole B-E und die Caldarchaeole H und I (Abb. 3). Dabei ist anzumerken, daß Hydroxyarchaeole bislang nur in der Familie der mesophilen *Methanosarcinaceae* detektiert wurden (Koga *et al.*, 1993; De Rosa und Gambacorta, 1994) und makrozyklisches Archaeol (Struktur D) nur in den hyperthermophilen Organismen der Familie der *Methanococcaceae* (Koga *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 1998). Struktur I, ein "H-förmiges" Caldarchaeol, wurde bisher nur in dem hyperthermophilen *Methanothermobacter fervidus* nachgewiesen (Morii *et al.*, 1998).

Es ist davon auszugehen, daß es eine noch größere Vielfalt an PLEL-Strukturen in Archaeen gibt, als die hier dargestellte. So wiesen Mancuso *et al.* (1985) neben den C₂₀-Isoprenoiden in den PLEL

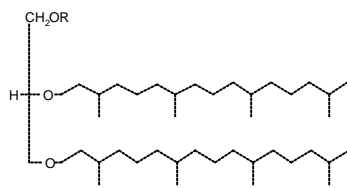
von methanogenen Reinkulturen geringe Konzentrationen an ethergebundenen C₁₅- und C₂₅-Isoprenoiden nach, und eine Untersuchung von Petroleum und Sedimenten deutet daraufhin, daß Archaeen möglicherweise einfach-verzweigte C₁₅- und zweifach-verzweigte C₃₀-Kohlenwasserstoffketten in ihren polaren Lipiden enthalten (Chappe *et al.*, 1982). Holzer *et al.* (1979) detektierten in der neutralen Lipidfraktion von Archaeen eine homologe Reihe von azyklischen Isoprenoiden mit Kettenlängen von 15 bis 30 C-Atomen, die aus den entsprechend langen Seitenketten der PLEL stammen könnten.

Auf Basis von 16S rDNA Klonsequenzen aus einer 74°C heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark, USA, wurde eine dritte phylogenetische Gruppe innerhalb der *Archaea* mit dem Namen *Korarchaeota* definiert (Barns *et al.*, 1994; Barns *et al.*, 1996), von der bislang noch keine kultivierten Organismen vorliegen und daher z. Zt. noch keine Aussagen über deren Membranlipide getroffen werden können.

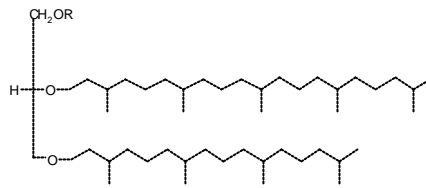
Es sind in der Vergangenheit mehrere auf HPLC basierende Methoden zum Nachweis von Isoprenoid-Etherlipiden in Umweltproben entwickelt worden (Nichols *et al.*, 1987; Ohtsubo *et al.*, 1993; Bai und Zelles, 1997), doch sind diese z.T. großen analytischen Problemen, bzw. Limitierungen ausgesetzt. Zum einen gibt es noch Schwierigkeiten bei der Stabilität der für die UV-Detektion benötigten Etherlipid-Derivate (Q. Y. Bai, persönliche Mitteilung), zum anderen werden für diese Methode die in den Abb. 3-5 aufgeführten Kernlipide als Referenz-, bzw. Standardsubstanzen benötigt, die bislang noch nicht kommerziell verfügbar sind.

Die Analyse der PLEL-Seitenketten ist zwar zeitlich aufwendiger (De Rosa und Gambacorta, 1994), jedoch können diese am selben GC/MS-System wie für die PLFA-Analyse untersucht werden. Einerseits kann die Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) weitgehend unabhängig von Referenzsubstanzen betrieben werden, andererseits sind die Isoprenoid-Kohlenwasserstoffe der PLEL als chemisch sehr stabile Substanzen zu betrachten (Holzer *et al.*, 1979; Langworthy, 1982). Zudem handelt es sich bei den Kohlenwasserstoffen um jene Stoffgruppe, die nach Mc Lafferty und Turecek (1993) am besten massenspektrometrisch charakterisiert ist.

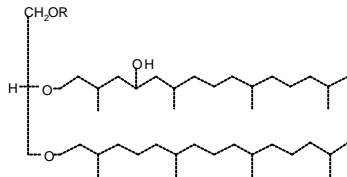
Phospholipid-Etherlipide, bestehend aus einfach-verzweigten und unverzweigten Alkan-Seitenketten wurden auch in hyperthermophilen Bakterien der Gattung *Thermotoga* (De Rosa *et al.*, 1988; De Rosa *et al.*, 1989) und *Aquifex* (Huber *et al.*, 1992) und in der Species *Thermodesulfobacterium commune* (Langworthy *et al.*, 1983) nachgewiesen. Diese Organismen repräsentieren innerhalb der Domäne *Bacteria* die nächsten Verwandten der Archaeen. (s. Abb. 2).



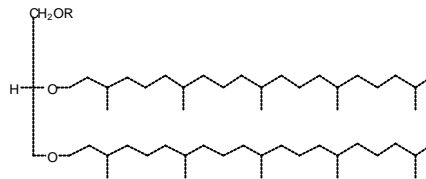
Struktur A: C₂₀-C₂₀-Archaeol (Diphytanylglycerol Diether)



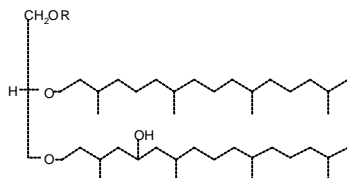
Struktur F: C₂₀-C₂₅-Archaeol (Phytanylsesterpanylglycerol Diether)



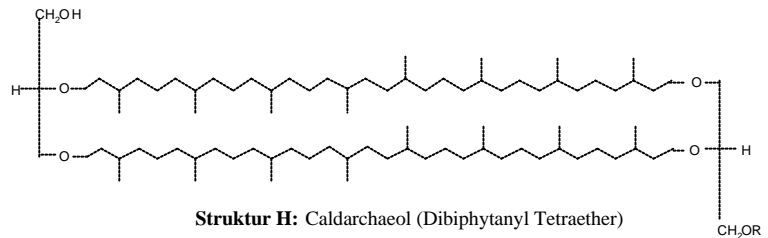
Struktur B: β-(sn-2) Hydroxyarchaeol



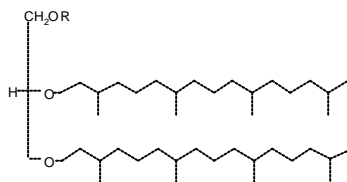
Struktur G: C₂₅-C₂₅-Archaeol (Disesterpanylglycerol Diether)



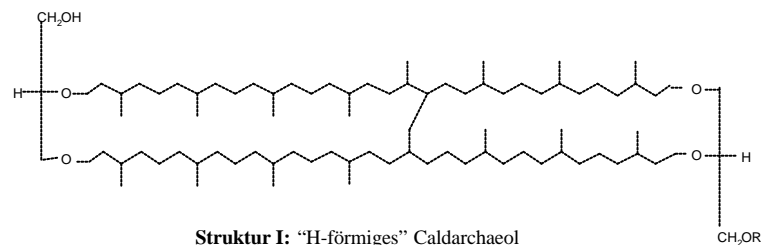
Struktur C: α-(sn-3) Hydroxyarchaeol



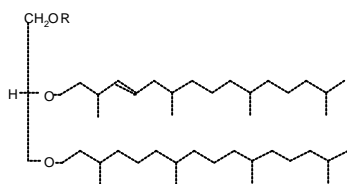
Struktur H: Caldarchaeol (Dibiphytanyl Tetraether)



Struktur D: makrozyklisches Archaeol

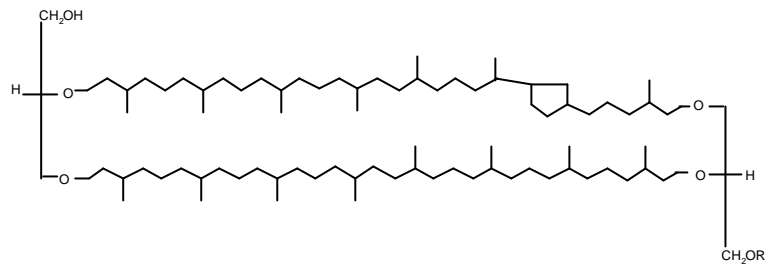


Struktur I: "H-förmiges" Caldarchaeol

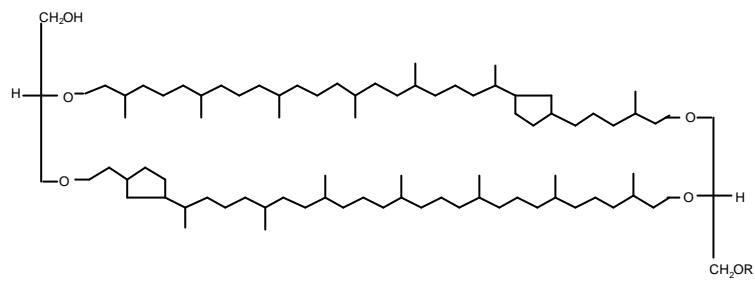


Struktur E: ungesättigtes C₂₀-C₂₀-Archaeol

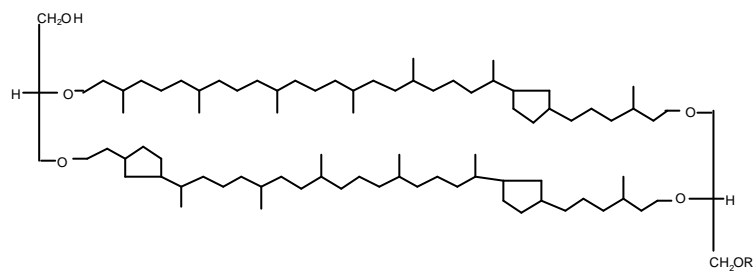
Abbildung 3: Kernlipide (Isoprenoid-Etherlipide) in *Euryarchaeota*



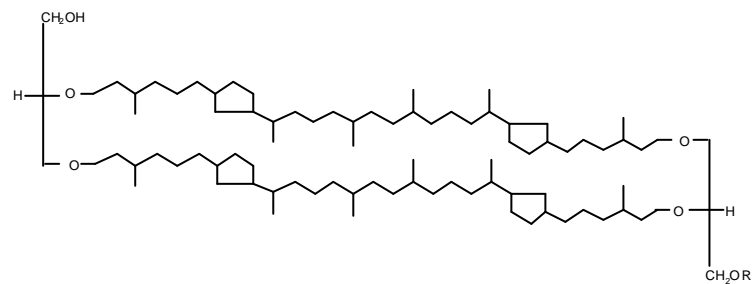
Struktur J: zyklisches Caldarchaeol (Caldarchaeol-1cy)



Struktur K



Struktur L



Struktur M

Abbildung 4: zyklische Kernlipide (Isoprenoid-Etherlipide) in *Crenarchaeota* mit 1-4 Cyclopentanringen

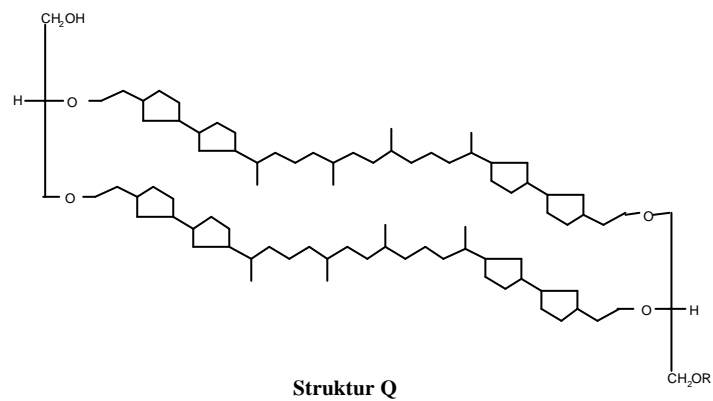
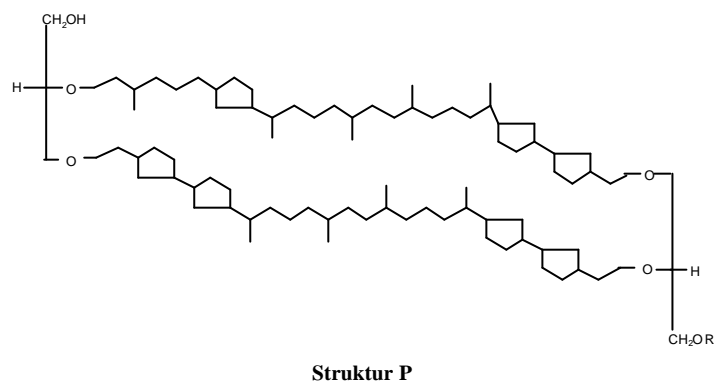
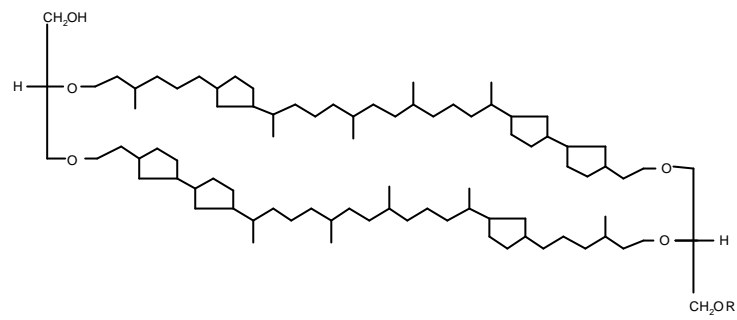
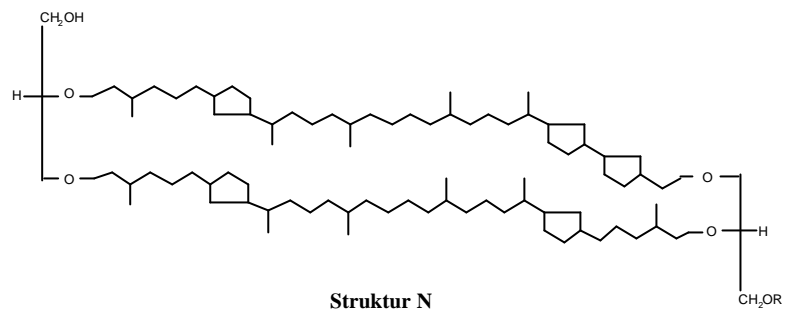


Abbildung 5: zyklische Kernlipide (Isoprenoid-Etherlipide) in *Crenarchaeota* mit 5-8 Cyclopentanringen

1.5. Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften in Niedermoorökosystemen

Moorökosysteme stehen in jüngster Zeit im Blickpunkt der biogeochemischen Forschung. Hauptgründe dafür sind, daß diese einen wichtigen Speicher im globalen Kohlenstoffvorrat darstellen und daß bodenmikrobiologische Prozesse zur Entstehung von klimaschädigendem Methan (CH₄) und Lachgas (N₂O) beitragen (Bridgham *et al.*, 1995; Gorham, 1991). Niedermoore machen in Deutschland den flächenmäßig überwiegenden Teil der Moorökosysteme aus (Pfadenhauer, 1997). Zur landwirtschaftlichen Nutzung wurden viele dieser Standorte in den letzten Jahrhunderten in Deutschland und in anderen Teilen Europas entwässert, wodurch sie sich zu bedeutenden Lachgasquellen und Methansenken entwickelt haben (Pfadenhauer, 1997). Aufgrund des wesentlich höheren Klimaerwärmungspotentials von Lachgas (GWP = 310) gegenüber Methan (GWP = 21; IPCC, 1996), wird den entwässerten Niedermooren ein größerer "global warming effect" zugesprochen als den nicht entwässerten Varianten (Wild *et al.*, 2000a). Außerdem ist mit der Entwässerung und der damit einhergehenden Durchlüftung des Bodenkörpers ein Torfschwund verbunden, was z.T. erhebliche Auswirkungen auf die Geomorphologie und dadurch auch auf die Grundwasserführung in den jeweiligen Regionen hat.

Bislang liegen keine umfassenden Informationen hinsichtlich der Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften in Niedermoorökosystemen vor. Aufgrund der gemessenen Methanproduktion und des Methanabbaus in den zwecks landwirtschaftlicher Nutzung entwässerten Niedermooren (Flessa *et al.*, 1998) ist jedoch mit einer aktiven Archaeenpopulation und einer aktiven Population von methanotrophen Bakterien zu rechnen. Bei den methano-trophen Bakterien handelt es sich um eine phylogenetisch diverse Gruppe (α -, β -, γ -Proteobakterien; Hanson und Hanson, 1996), die aufgrund verschiedener Stoffwechselwege und der Membranlipide in zwei Gruppen, bzw. Typen unterteilt werden. Typ I besitzt hauptsächlich C₁₆-, Typ II dagegen hauptsächlich C₁₈-PLFA (Bowman *et al.*, 1991; Bowman *et al.*, 1993; Hanson und Hanson, 1996).

Mit Hilfe einer erweiterten Phospholipid-Methodik könnten daher sowohl die methanproduzierenden *Archaea* als auch die methanotrophen Bakterien in Niedermooren erfaßt und in ihren Populationen genauer charakterisiert werden. Dieser Ansatz fand in der vorliegenden Arbeit Anwendung an Bodenproben aus dem Donaumoos bei Ingolstadt, wo seit 1998 im Rahmen eines Verbundvorhabens bodenökologische Parameter, wie z.B. Spurengasflüsse von entwässerten und wiedervernässten Moorökosystemen erfaßt werden. Neben der strukturellen Charakterisierung von mikrobiellen Ge-

meinschaften wurde der funktionelle Aspekt über die Spurengasmessungen und indirekt über oxische und anoxische Bodeneigenschaften integriert.

1.6. Zielsetzungen

Methodenentwicklung

In der vorliegenden Arbeit bestand die Zielsetzung für den Aspekt „Methodenentwicklung“ darin, das etablierte Verfahren der Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in Bodenökosystemen durch die Bestimmung von PLFA-Biomarker (nach Zelles und Bai, 1993) so zu erweitern, daß auch Organismen der Domäne *Archaea* auf Basis von Phospholipid-Etherlipiden erfaßt werden können.

Daraus leitete sich folgendes Ziel ab:

- * Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL) basierend auf der Analyse der ethergebundenen Kohlenwasserstoffe bzw. Isoprenoide:
 - Gewinnung von Ether(kern)lipiden aus Reinkulturen als Referenzsubstanzen
 - Trennung der Referenzlipide nach funktionellen Gruppen und Bestimmung ihrer Seitenketten
 - Qualitative Bestimmung von PLEL in Bodenextrakten
 - Anpassung der Methodik für quantitative Bestimmungen

Darauf aufbauend wurden folgende Fragestellungen verfolgt:

- * Quantitative Bestimmung von PLEL und PLFA in mikrobiellen Reinkulturen
 - Quantitativer Nachweis von i-PLEL (Isoprenoid Phospholipid-Etherlipide) und anderer PLEL-Verbindungen in Archaeen-Reinkulturen
 - Enthalten *Archaea* PLFA?
 - Konsequenz der Reinkulturuntersuchungen für ökosystemare Betrachtungen

Anwendung der erweiterten Phospholipid-Bestimmung

Im Rahmen der Betrachtungen von oxischen und anoxischen Horizonten in Niedermoorökosystemen wurde der Einfluß der Wiedervernässung auf Mikroorganismenpopulationen bei der Rekultivierung eines degradierten Niedermoores untersucht, wobei folgende Ziele im Mittelpunkt standen:

- * Erstellen von PLEL- und PLFA-Profilen zur Beurteilung der Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften
- * Bestimmung von Zellzahlen auf der Basis von PLEL/PLFA- und molekularbiologischen Markern, was auch als Methodenvergleich diente
- * Charakterisierung von methanogenen und methanotrophen Mikroorganismengemeinschaften

2 Material und Methoden

2.1. Aufstellung der verwendeten Mikroorganismenstämme

Folgende Bakterien- und Archaeenstämme wurden für die verschiedenen Lipiduntersuchungen verwendet:

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Reinkulturen

Arten	DSM-	Kennung**	Charakteristika***	Zellvermehrung
<i>Clostridium aceticum</i>	1496	CLA Bakterium	30°C; Schlamm; M. Braun; Medium 135	DSMZ, Braunschweig
<i>Clostridium butyricum</i>	10702	CLB Bakterium	30°C; Darmlumen Schwein; J.W. Howie; Medium 104	DSMZ, Braunschweig
<i>Holophaga foetida</i>	6591 ^T	HOP Bakterium	30°C; Frischwasser- Schlamm; anaerob; F. Bak; Medium 559	DSMZ, Braunschweig
<i>Halobacterium halobium</i>	670	HAB Archaeum	37°C; exakte Herkunft unbekannt; halophil; D. Keradjopoulos; Medium 97	M. Thomm, Kiel
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1053 ^T	MBT Archaeum	65°C, Kläranlage; J.G. Zeikus; Medium 119	M. Thomm, Kiel
<i>Methanococcoides burtonii</i>	6242	MCB Archaeum	20-23°C, aus 24 m Tiefe eines antarkt. Polarsees, P.D. Franzmann; Medium 280	DSMZ, Braunschweig
<i>Methanococcus jannaschii</i>	2661 ^T	MCJ Archaeum	75°C; heiße Tiefsee-Quelle, W.J. Jones; Medium 282	K.O. Stetter, Regensburg
<i>Methanopyrus kandleri</i>	6324 ^T	MPK Archaeum	98°C, geothermisch erhitztes Tiefsee-Sediment; R. Huber; Medium 511	R. Huber, Regensburg
<i>Methanosarcina barkeri</i>	804	MSB Archaeum	30-37°C, See-Schlamm, H. Hippe; Medium 120	DSMZ, Braunschweig
<i>Methanosarcina mazei</i>	1311	MSM Archaeum	30-37°C, anaerobes Sediment; J.G. Zeikus; Medium 120	DSMZ, Braunschweig
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	1232	MSV Archaeum	37°C, Rückstand eines Methan-Tanks; G.A. Zavarzin; Medium 120	DSMZ, Braunschweig
<i>Methanothermus fervidus</i>	2088 ^T	MTF Archaeum	85°C; heiße Solfatar-Quelle, K.O. Stetter; Medium 203	H. König, Mainz
Etherlipidextrakt von <i>Sulfolobus solfataricus</i>	5833	SUS Archaeum	85°C; Solfatar-Feld; A. Gambacorta; Medium 182	A. Gambacorta, Neapel

*Katalog-Nr. der DSMZ "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig", DSMZ (1998); **in dieser Arbeit verwendete Abkürzung zur Organismenbezeichnung; *** Charakteristika: Wachstumstemperatur; Habitat, aus dem der Stamm erstmals isoliert wurde; Person, die den Stamm bei der DSMZ hinterlegt hat; zur Anzucht verwendetes Medium nach DSMZ (1998)

^T: Typ-Stamm

2.2. Beschreibung der untersuchten Bodenökosysteme

Standort Donaumoos

Versuchsflächen

In Süddeutschlands größtem geschlossenem Niedermoorgebiet, dem Donaumoos bei Ingolstadt, wurden in der Gemarkung Rohrenfels 1998 drei Demonstrationsflächen (insges. 8 ha) angelegt und mit Rohrkolben (*Typha latifolia* und *Typha angustifolia*) bepflanzt. Die Flächen wurden mit nährstoffbelastetem Wasser aus Entwässerungsgräben beschickt. Die im Rahmen dieser Arbeit beprobten Becken wiesen eine Stauwasserhöhe von 40 cm (Becken 1) und 20 cm (Becken 2) auf. Die Flächengröße von Becken 1 betrug 2,2 und die von Becken 2 2,6 ha. Als Referenzfläche wurde eine ca. 4 × 8 m große Parzelle eingerichtet, deren Bewirtschaftung sich an der ortsüblichen Praxis orientierte. Diese Fläche ist so stark entwässert worden, daß der Grundwasserspiegel in den Sommermonaten bis zu 1,5 m unter der Oberfläche absinken konnte. Es handelte sich dabei um einen Terric Histosol, dessen Abbaugrad mit H9 klassifiziert wurde (Flessa *et al.*, 1998). Nach der *von Post-schen*-Bestimmungsskala bedeutet H1 sehr schwach und H10 sehr stark degradiert (Schachtschabel *et al.*, 1989). Die Torfdicke reichte von 0,8 bis 1,1 m. Der Boden wies einen $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$ -Wert von 6,6, einen C_{org} -Gehalt von 35,5%, einen N_{org} -Gehalt von 2,1% und ein C/N-Verhältnis von 13,0 auf (Wild *et al.*, 2000a).

In den drei Versuchsflächen wurden Meßstellen, bestehend aus jeweils acht Entnahmestellen (Bodenringe), drei davon pflanzenfrei, zur Erfassung klimarelevanter Spurengase eingerichtet.

Probenahme

Die Bodenbeprobungen fanden zeitgleich mit den Spurengasmessungen aller drei Flächen (Referenzfläche, Becken 1, Becken 2) im November 1998, im Februar 1999, im Mai 1999 und im September 1999 statt. Die Beprobung der Referenzfläche erfolgte in einem jeweils 4 × 4 m großen Flächenquadrat (Mischprobe aus 10 Einstichen, 0-10 cm Entnahmetiefe, Ø 3,5 cm Pürkhauer-Bohrstock; s. auch Abb. 6).

In den überfluteten Becken wurden entlang des Steges mit einem speziell angefertigten Bohrstock (Ø 2,4 cm) Proben aus dem Bodenhorizont 0-10 cm entnommen, in eine mit ca. 300 ml Beckenwasser gefüllte 1000-ml-Schottflasche getaucht und der entnommene Bohrkern mit einem integrierten Hubzylinder herausgepreßt. Dieser Hubzylinder läßt sich per Akku-Schrauber nach oben für die Einstel-

lung der Entnahmetiefe und nach unten für das Herausschieben des Bohrkerns bewegen. Nachdem jede der drei Schottflaschen mit 10 Bohrkernen und Beckenwasser bis zum Rand befüllt worden waren, erfolgte der Transport zum Labor.

Aus den selben Bereichen der beiden Becken wurden zusätzlich zur Bodenbeprobung Wasserproben im September 1999 entnommen und zwar mittels einer Plexiglasröhre ($\varnothing_{\text{innen}}$: 2,0 cm; $\varnothing_{\text{außen}}$: 2,5 cm; Länge: 60 cm), die senkrecht zur Oberfläche und ohne den Boden zu berühren in das Wasser getaucht und mit einem Gummistopfen an der Öffnung verschlossen wurde, welche aus dem Wasser ragte. Auf diese Weise konnte die Wassersäule ungestört in ihrer Horizontierung in eine 1000-ml-Flasche gefüllt werden. Von jedem Standort wurden 4×1000 ml Wasser entnommen und davon 200 ml direkt mit 600 ml PFA (Paraformaldehyd) für molekularbiologische Untersuchungen versetzt. Der Rest, aufbewahrt in einer Kühltasche, wurde zum Labor gebracht und dort bis zur Lipidanalyse bei 4°C gelagert.

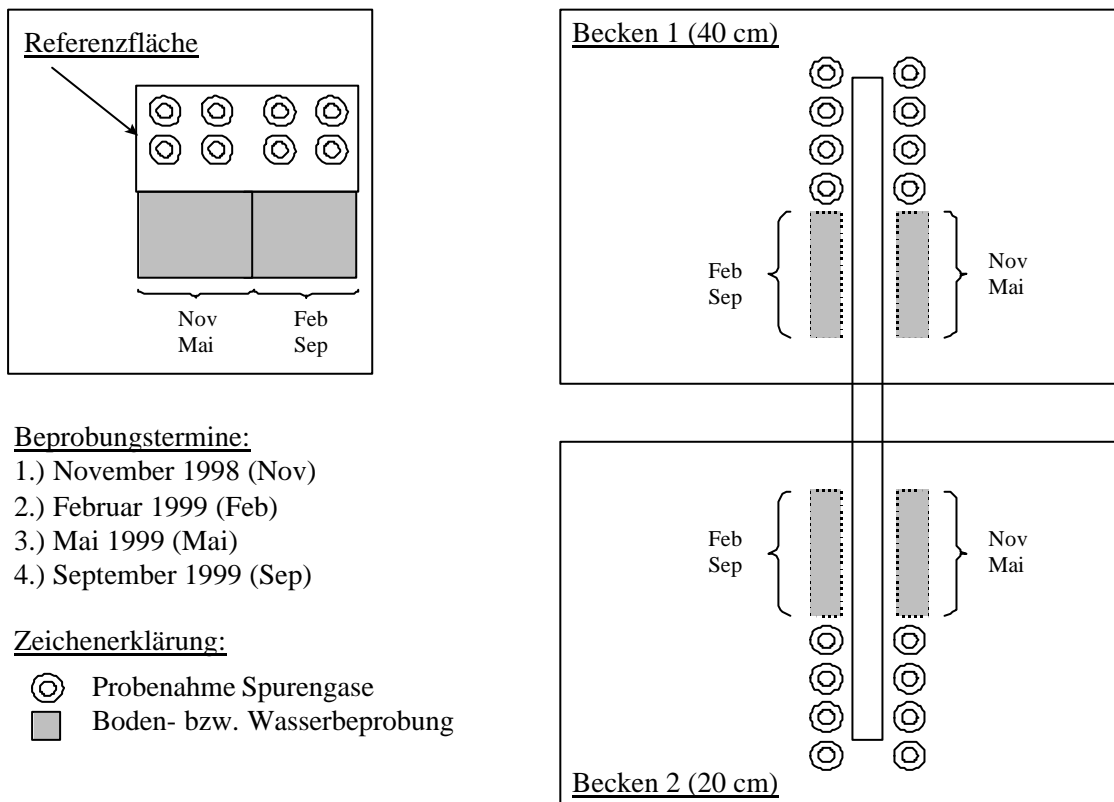


Abbildung 6: Skizze der beprobten Parzellen des Standorts Donaumoos

Probenvorbereitung

Die 10 Einstiche aus der Referenzfläche ergaben eine Mischprobe, die, nachdem Steine, grobes Wurzelmaterial und Grasbüschel entfernt worden waren, homogenisiert und in drei Portionen aufgeteilt wurde, so daß drei Wiederholungen für die Lipiduntersuchungen vorlagen. Die dafür nötige Extraktion erfolgte noch am selben Tag. Die Flaschen mit den Proben aus den überstauten Becken lagerten im Kühlraum bei 4°C für 20-24 h, um eine möglichst vollständige Sedimentation der Bodenpartikel zu erreichen. Nach dieser Zeit wurde die Wasserphase unter leichtem Vakuum vorsichtig abgenommen und verworfen, der Bodensatz von den jeweils drei zusammengehörenden Flaschen in einem 5000-ml-Meßbecher zu einer Mischprobe vereinigt und nach gründlicher Homogenisierung diese durch mehrminütiges Umrühren in drei Portionen aufgeteilt, so daß auch hier drei Wiederholungen für die Lipiduntersuchungen zur Verfügung standen.

2.3. Bestimmung allgemeiner Bodenparameter

2.3.1. Bestimmung des Frischvolumens, der Dichte (feldfeucht), der Trockenraumdichte und des Porenvolumens

Für die Bestimmung des Frischvolumens und der Trockenraumdichte der Referenzfläche wurden im Feld Stechzylinder mit einem Innendurchmesser von 8,1 cm und einer Höhe von 5 cm verwendet. Die Bestimmung der o.g. Parameter in den Proben aus Becken 1 und 2 erfolgte im Labor, nachdem die Wasserphase entfernt und die Mischprobe homogenisiert worden war.

$$\text{DFF} = \frac{B_f}{V}$$

DFF: Dichte des feldfeuchten Bodens [g cm⁻³]

B_f: Masse des feldfeuchten Bodens [g]

V: Volumen eines Stechzylinders [cm³], in der vorliegenden Arbeit 257,6 cm³

Die Proben wurden bei 105°C getrocknet und nach der Rückwaage die Trockenraumdicke (TRD) berechnet:

$$\text{TRD} = \frac{B_t}{V}$$

B_t: Masse des trockenen Bodens [g]

V: Volumen eines Stechzylinders [cm³], in der vorliegenden Arbeit 257,6 ml

Aus der Trockenraumdicke und der Festsubstanzdicke (FSD) leitet sich das Porenvolumen ab:

$$\text{PV} = (1 - [\text{TRD} \cdot \text{FSD}^{-1}]) \cdot 100$$

FSD (Niedermoortorf): 0,33 g cm⁻³ (Flessa *et al.*, 1998).

2.3.2. Bestimmung des gravimetrischen Wassergehalts, des Gehalts an Trockensubstanz, Berechnung des wassergefüllten Porenvolumens

Ca. 100 g feldfrischer Boden wurden für 24 h bei 105°C getrocknet und der Wasserverlust durch Rückwaage bestimmt. Daraus ließ sich der Gehalt an Trockensubstanz (TS in %) und der gravimetrische Wassergehalt (WG_{grav} in %) wie folgt ermitteln:

$$\text{TS} = \frac{(B_f - B_t)}{B_f \times 100}$$

$$\text{WG}_{\text{grav}} = \frac{(B_f - B_t)}{B_t \times 100}$$

B_f: Masse des feuchten Bodens

B_t: Masse des trockenen Bodens

Unter Berücksichtigung der Trockenraumdichte (TRD) berechnet sich der volumetrische Wassergehalt (WG_{vol} in %):

$$WG_{vol} = WG_{grav} \times TRD$$

Daraus ergibt sich das wassergefüllte Porenvolumen (WFPS in %):

$$WFPS = \frac{WG_{vol}}{PV \times 100}$$

PV: Porenvolumen [%]

2.3.3. Boden- und wasserchemische Parameter

Die Bestimmung des pH-Werts im Boden erfolgte unter Suspendierung in destilliertem Wasser bzw. in $CaCl_2$ -Lösung nach VDLUFA (1991).

Temperatur und Sauerstoffgehalt in der Wasserphase der überstauten Becken wurden mit einem Sauerstoffaschenmeßgerät Oxi 340-B (Wissenschaftlich-Technische Werksätten WTW, Weilheim) bestimmt.

Zudem wurde das ablaufende Wasser von Becken 1 und Becken 2 im Standort Donaumoos mittels Meßsonden hinsichtlich der Parameter pH, Leitfähigkeit, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt untersucht.

2.4. Bestimmung von Methanflußraten in Bodenökosystemen

Die Messung der Methanflußraten erfolgte mit Hilfe der *closed chamber*-Methode, wie in Hutchinson und Mosier (1981) beschrieben. Pro Parzelle wurden acht runde PVC-Ringe (\varnothing 1,13 m; Höhe 15 cm) 10 cm tief in den Boden eingelassen, auf die zur Spurengasmessung abgedunkelte PVC-Hauben (Höhe 45 cm) aufgesetzt und mit jenen fest verschlossen wurden. Während der Anreicherung zwischen 45 und 90 Minuten wurden der Haubenatmosphäre in periodischen Abständen fünf Gasproben entnommen. Die Entnahme erfolgte mittels Kanüle über transportable Vakuumpumpen (Lofffields Analytische Lösungen, Göttingen) in evakuierte 100 ml Gassammelgefäße. Die Methankonzentration in den Gasproben wurde im Labor mit einem Gaschromatographen (GC 14B, Shimadzu) ermittelt, dem ein automatisierter Probengeber vorgeschaltet war. Die gaschromatographi-

sche Trennung erfolgte über eine MILLIPORE Porapack-Q-Säule, gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Die Quantifizierung von CH_4 in Gasproben geschah nach Flessa *et al.* (1995).

2.5. Charakterisierung der Phospholipide in mikrobiellen Reinkulturen und Bodenökosystemen

Nach dem Erhalt der polaren Lipide, der sogenannten Phospholipide, wurde ein Aliquot der Fettsäure- (= PLFA) und das andere Aliquot der Etherlipid-Bestimmung (= PLEL), wie in Abb.7 dargestellt, unterzogen.

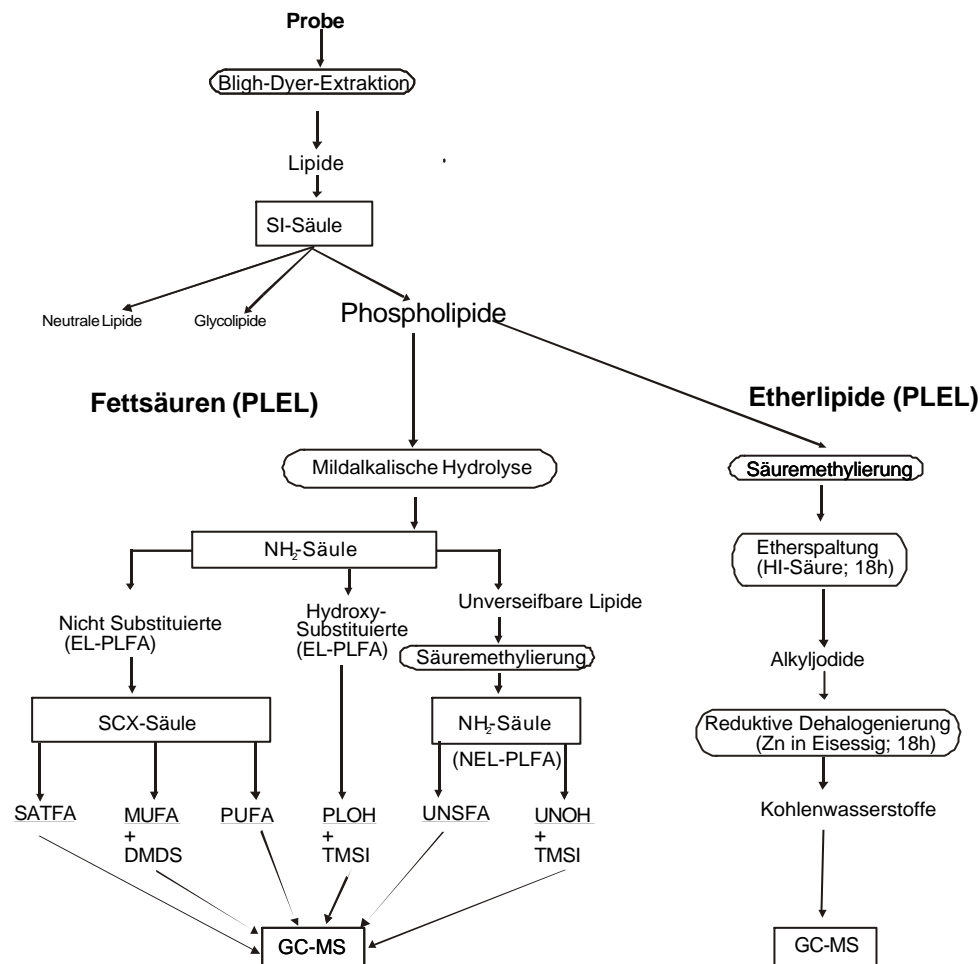


Abbildung 7: Erweiterte Phospholipid-Analytik von mikrobiellen Reinkulturen und Umweltproben.

Die verschiedenen Extraktions-, Separations- und Derivatisierungsschritte für die Analyse von Phospholipidfettsäuren (PLFA) und Phospholipid-Etherlipiden (PLEL) sind schematisch dargestellt.

2.5.1. Auflistung der verwendeten Chemikalien

Für die Lipidanalysen wurden folgende Chemikalien (ausschließlich Reinheitsgrad „zur Analyse“) und SPE-Säulen verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und SPE-Säulen

Chemikalien	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck	Natriumsulfat	Merck
Acetonitril	Riedel-de-Haen	Natriumthiosulfat	Merck
BSTFA	Sigma	Pyridin	Merck
Celite®	Merck	Petrolether (Siedebereich 60-80)	Merck
Chloroform	Merck	Salzsäure (37%)	Merck
Dichlormethan	Riedel-de-Haen	Silbernitrat	Merck
Diethylether	Merck	Toluol	Riedel-de-Haen
Dimethyldisulfid	Merck	Trimethylchlorsilan	Sigma
Essigsäure	Merck	Quarzsand	SIGMA
Ethylacetat	Merck	Zinkpulver	Merck
Hexamethyldisilasan	Sigma		
Hexan	Merck	Säulen für Festphasenextraktion (SPE):	
i-Octan	Merck	SI (Bond Elute®)	Varian
Jod (kristallin)	Merck	NH ₂ (Chromabond®)	Macherey-Nagel
Jodwasserstoff (57%)	Merck	SCX (Bond Elute®)	Varian
Kochsalz	Merck		
Kaliumhydroxid	Merck		
Methanol	Riedel-de-Haen		
Natriumcarbonat	Merck		

2.5.2. Lipidextraktion von Reinkulturen

Extraktion A (Collins et. al., 1980)

Diese Extraktion entspricht im wesentlichen, der von Collins et. al. (1980) speziell für die Extraktion von Lipiden aus gefriergetrockneten Zellen entwickelten Methode:

- 1) 100-200 mg gefriergetrocknete Zellen wurden in ein 50-ml-Zentrifugenglas eingewogen und zusammen mit 12,5 ml wässriger NaCl-Methanol-Lösung (10 ml 0,3%iger NaCl in H₂O (w/v), in 100 ml Methanol) für 1 min gerührt. Danach verweilte die Lösung zur Zelllysis für 7 min bei 100°C im Trockenschrank.
- 2) Nach dem Abkühlen wurden 4 ml 0,3%ige NaCl-Lösung und 6 ml CHCl₃ hinzugefügt.
- 3) Nach 2½-stündigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 U min⁻¹, um grobpartikuläre Zellwandbestandteile abzutrennen. Zur Extraktion wurden 10 ml eines Gemisches von CHCl₃-MeOH-wässrige NaCl-Lösung (0,3%) im Verhältnis 5:10:4 hinzugefügt und erneut für

15 min gerührt.

4) Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde die obere (wäßrige) Phase abgenommen und in einen 100-ml-Scheidetrichter pipettiert. Erneut kamen 10 ml CHCl_3 -Methanol-wäßrige NaCl-Lösung hinzu. Nach 15-minütigem Rühren und anschließender Zentrifugation wurde die obere Phase ebenfalls in den Scheidetrichter pipettiert.

5) Zu den beiden abgenommenen Phasen wurden 3,75 ml wäßrige NaCl-Lösung und 9 ml CHCl_3 hinzugefügt. Zur Extraktion wurde dieses Gemisch auf einem Horizontalschüttler für 1 h bei 225 U min^{-1} geschüttelt und anschließend 5 min zentrifugiert.

6) Die unteren Phasen aus den Arbeitsschritten 4) und 5) (nach 30-minütiger Phasentrennung) wurden über einem mit Na_2SO_4 befüllten Trichter getrocknet und in einem 100-ml-Spitzkolben aufzufangen.

Extraktion B (Bai und Zelles, 1997):

Diese Methode entspricht im wesentlichen dem Extraktionsprotokoll zur Bestimmung von PLFA in Bodenproben. Sie wurde in der Arbeit von Bai und Zelles (1997) für die Lipidextraktion aus Archaeenzellen "miniaturisiert".

100-200 mg gefriergetrocknete Zellen wurden zusammen mit einer definierten Menge Quarzsand (1,5-2,5 g) für 10 min in einer Retsch-Kugelmühle fein gemahlen und danach das erhaltene Biomasse-Quarzsand-Pulver quantitativ in einen 250-ml-Rundkolben gefüllt. Die Extraktion verlief analog wie für Boden beschrieben, außer, daß hierbei kleinere Volumina an Lösungsmittel zur Verwendung kamen, nämlich 50 ml $0,05 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösung (pH 7,4) sowie insgesamt 125 ml Chloroform, 125 ml Methanol und $62,5 \text{ ml H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

2.5.3. Lipidextraktion von Umweltproben

Bodenproben

In eine 1000-ml-Schottflasche wurde je eine 50 g Trockengewicht entsprechende, frische Bodenmenge eingewogen und 250 ml Methanol, 125 ml Chloroform sowie ca. 100 ml $0,05 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösung (pH 7,4) zugefügt. In Abhängigkeit vom Wassergehalt des Bodens ist die Menge an wäßriger Pufferlösung zu reduzieren, um ein exaktes Methanol:Chloroform:Puffer-Verhältnis von 2:1:0,8 zu erzielen. Die Flaschen wurden mit Teflonkappen verschlossen und 2 h liegend auf dem

Horizontalschüttler bei 250 U min^{-1} geschüttelt. Anschließend kamen weitere 125 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und 125 ml Chloroform hinzu, um ein für die Phasentrennung endgültiges Mischungsverhältnis von Methanol : Chloroform : Puffer + Wasser von 1:1:0,9 zu erreichen. Nach 20-24 h dauernder Phasentrennung wurde die obere Methanol-Wasser-Phase abgesaugt und verworfen und die untere Phase, die Chloroformphase, in einer Saugflasche über eine mit dem Inertpulver Celite[®] befüllten Trichternutsche abgenutscht. Nachdem sich im Filtrat die lipophile und lipophobe Phase deutlich voneinander getrennt hatten, wurde die untere Phase über einen Glasrichter, der mit Watte und wasserfreiem Natriumsulfat (um etwaiges Wasser zu binden) gefüllt war, in einen 250-ml-Rundkolben abgelassen und am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeengt und in einem Schraubdeckelgläschen bei -20°C bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt.

Gewässerproben

Zu einer Gewässerprobe von 200 ml wurden 30 ml Phosphatpuffer, 575 ml Methanol und 278,5 ml Chloroform hinzugefügt. Nach zweistündigem Schütteln kamen weitere 287,5 ml Chloroform hinzu. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß der Extraktion von Bodenproben.

2.5.4. Gewinnung der Phospholipide

Ein Aliquot des zuvor gewonnen Lipidextrakts wurde auf eine mit 1 Reservoirvolumen Chloroform vorkonditionierte SPE-SI-Säule (2 g Füllmaterial; 12 ml Reservoirvolumen) gegeben und die jeweiligen Fraktionen mit den Lösungsmitteln Chloroform, Aceton und Methanol eluiert. Die Separation erfolgte nach dem Schema in Tab. 4.

Tabelle 4: Vorgehensweise für die Lipidseparation mit der SPE-SI-Säule

Arbeitsschritt	Lösungsmittel	Reservoirvolumen	Eluierte Fraktion
Konditionierung	Chloroform	1	---
Probenauftrag	Probe gelöst in Chloroform	< 1	---
Elution	Chloroform	1	Neutrallipide
Elution	Aceton	1	Glycolipide
Elution	Methanol	4	Phospholipide

Die Fraktionen der Neutral- und der Glycolipide wurden verworfen, die Phospholipidfraktion in einem 100 ml Spitzkolben aufgefangen und bis nahe der Trockene eingedampft.

2.5.5. Bestimmung der Phospholipidfettsäuren (PLFA)

2.5.5.1. Separationsschritte und Derivatisierungsverfahren

Die PLFA-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Zelles und Bai (1993).

Nach der Entnahme eines Phospholipid-Aliquots wurde dieses anschließend einer alkalischen Methanolyse unterzogen, wodurch Esterbindungen im Phospholipidmolekül aufgespalten werden und freie Fettsäuremethylester (FAME) entstehen. Durch saure Methylierung erfolgte in einem zweiten Schritt die Freisetzung von nicht-estergebundenen Fettsäuren aus dem Phospholipid-Molekül.

Die verschiedenen Fettsäuremethylester wurden über mehrere Festphasenextraktionsschritte in funktionelle Gruppen getrennt, z.T. derivatisiert und mit einem GC/MS-System bestimmt. Die in Abb. 7 dargestellten Trennungsschritte und Derivatisierungsverfahren zum Erhalt der einzelnen PLFA-Fraktionen richteten sich nach Zelles und Bai (1993) unter Verwendung der in Tab. 3 aufgeführten SPE-Säulen und Chemikalien.

2.5.5.2. Fettsäurebestimmung mit GC/MS

Probenvorbereitung

Aus den nicht-derivatisierten Fraktionen SATFA, PUFA und UNSFA sowie aus den derivatisierten PLFA-Fraktionen PLOH, UNOH und MUFA wurden jeweils die Lösungsmittel unter dem Stickstoffstrom entfernt. In die jeweiligen Gläschen kamen 100 µl eines 0,36 nM Nonadecansäuremethylester-Standard (19:0 FAME in i-Octan gelöst) hinzu. Nach 1-minütigem Rühren auf dem Vortex-Mixer konnten die Proben in 100 µl GC-Mikrovials abgefüllt und auf das Probenkarusell vom GC/MS gestellt werden.

Betriebsbedingungen des GC/MS-Systems

Die Messungen wurden mit einem Gaschromatographen (HP 5890 series II GC), gekoppelt mit einem Massenspektrometer (5971A MSD) der Firma Hewlett Packard, durchgeführt. Die Injektion der Proben erfolgte dabei in eine Ultra 2 Kapillarsäule (HP 5: beschichtet mit 5% quervernetztem Diphenyl- und 95% Dimethylsiloxan) im "splitless" Modus. Als Trägergas diente Helium bei einer

konstanten Flußrate von 1,0 ml min⁻¹. Die Temperatur des Injektors betrug 250°C, die des Detektors 300°C. Das Temperaturprogramm der GC-Säule sah folgendermaßen aus: Nach der Injektion wurde die Anfangstemperatur von 80°C für 1,39 min gehalten, danach erfolgte eine Temperaturerhöhung mit einer Rate von 64°C min⁻¹ auf 136°C und eine weitere Temperaturerhöhung von 2,5°C min⁻¹ auf 290°C, die für 20 min konstant blieb. Das Temperaturprogramm erstreckte sich über eine Dauer von 83,86 min.

Die Ionisierung des Analyten erfolgte im HP 5971A MSD über Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Die Vervielfacherspannung (EMV) bewegte sich zwischen 1800 und 2000 V. In regelmäßigen Abständen wurde das Gerät mit Perfluorotributylamin (PFTBA) justiert (auto tuning). Für die PLFA-Analyse (= FAME-Analyse) wurde über die ganze Dauer des GC-Temperaturprogramms in dem Massenbereich zwischen 50 und 550 amu gescannt (SCAN-Modus), bei einer Rate von 1,5 Scans pro Sekunde und einem Schwellenwert von 250.

2.5.5.3. Computergestützte Auswertung von PLFA mit der HP ChemStation^o

Identifizierung und Quantifizierung von PLFA erfolgte automatisiert mit einem speziell dafür entwickelten Programm (GSF/SOLVIT), welches in die Hewlett Packard Software "ChemStation" integriert ist. Dieses Programm zieht zur Peak-Erkennung FAME-Spektren und Retentionszeit aus Vergleichsbibliotheken heran, die im Laufe der Zeit für alle 6 PLFA Fraktionen erstellt worden sind und noch immer ständig erweitert werden. Nach jedem Bibliotheksvergleich wird ein quantitativer Report erstellt, dem folgende Formeln zugrunde liegen:

$$\text{RF_Comp} = \frac{\text{Amt_Comp} \times \text{Area_IS}}{\text{Area_Comp} \times \text{Amt_IS}}$$

$$\text{RF_IS} = \frac{\text{Area_IS}}{\text{nMolIS_Vial}}$$

$$\text{nMol_gTS} = \frac{\text{Area_Comp} \times \text{RF_Comp}}{\text{RF_IS} \times \text{gTS_Vial}}$$

RF_Comp:	Responsefaktor der zu untersuchenden Substanz
Amt_Comp:	Menge der zu untersuchenden Substanz
Area_IS:	Fläche des internen Standards (Fortsetzung nächste Seite)
Area_Comp:	Fläche der zu untersuchenden Substanz
RF_IS:	Responsefaktor des internen Standards
nMolIS_Vial:	Konzentration des internen Standards im GC-Gläschen (vial)
nMol_gTS:	Konzentration der zu untersuchenden Substanz in nMol g ⁻¹ Trockensubstanz
gTS_Vial:	eingesetzte Trockensubstanz im GC-Gläschen

2.5.6. Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL)

2.5.6.1. Isolierung von PLEL aus Reinkulturen

Abtrennung der polaren Gruppe mittels alkalischer Hydrolyse

Da aufgrund der methodischen Herangehensweise die Struktur der Ether(kern)lipide und deren Seitenketten (s. Abb. 3-5) und nicht die chemische Zusammensetzung der polaren Gruppen der Phospholipide im Mittelpunkt des Interesses stehen, wurden letztere durch ein bestimmtes Verfahren vorher abgetrennt. Bai und Zelles (1997) empfehlen hierfür folgende alkalische Hydrolyse:

Ein Aliquot der Phospholipidfraktion wird in einem Aufschlußgefäß unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft und mit 1,5 M methanolischer Kalilauge bei 80°C für 3 h aufgeschlossen. Zu dem abgekühlten Hydrolysat werden 3 ml H₂O_{dest} hinzugefügt. Es wird 3 mal mit jeweils 4,0 ml Hexan für 1 min auf dem Vortex-Mixer extrahiert, wobei jeweils die obere Phase abgenommen und über waserfreiem Natriumsulfat getrocknet wird.

Abtrennung der polaren Gruppe mittels saurer Hydrolyse

Zur Bestimmung der Kernlipide von *Methanococoides burtonii* gelangte eine saure Hydrolyse zur Anwendung, die in Anlehnung an die Beschreibungen von Nichols und Franzmann (1992) und Bai und Zelles (1997) erfolgte. Dabei wurde ein Aliquot der Phospholipidfraktion in einem Aufschlußgefäß unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft und mit 1,5 ml Methanol:Chloroform:HCl (10:1:1, v/v/v) bei 60°C über Nacht (12-16 h) hydrolysiert. Am nächsten Tag erfolgte nach Abkühlung des Hydrolysats das Zusetzen von 2,0 ml NaCl-Lösung und das Durchmischen. Zur Extraktion der frei-

gesetzten Etherlipide wurden 5,0 ml Hexan zugefügt und eine Durchmischung für 1 min auf dem Vortex-Mixer durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 2000 U min^{-1} . Die obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und, wie zuvor bereits beschrieben, über einem mit Natriumsulfat befüllten Trichter getrocknet und in einem 50 ml Spitzkolben aufgefangen.

Isolierung von Archaeolen

Die Trennung der Kernlipide nach der alkalischen Hydrolyse erfolgte dünnschichtchromatographisch. Für die Separation von Archaeolen hat sich das 2-Kammer-Entwicklungsverfahren von Ross *et al.* (1985) bewährt. $4 \times 2,5 \mu\text{l}$ der aufkonzentrierten Kernlipid-Fraktion wurden am unteren Randbereich einer DC-Platte (Kieselgel 60F-254; Schichtdicke 0,25 cm; $5 \times 10 \text{ cm}$) in Form einer Bande aufgetragen. Die Trennung verlief in einer automatischen Entwicklungskammer, dem "Baron DC-Mat". Zuerst wurde die Kieselgel-Platte dem Laufmittel 1 ausgesetzt: Petrolether : Aceton (95:5; v/v), danach dem Laufmittel 2: Toluol : Aceton (97:3; v/v). Nach beendeter Entwicklung und Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Platte zur Sichtbarmachung der Banden in eine mit I_2 -Dampf angereicherte Glaskammer gestellt. Die Färbung erfolgte nach 5-10 min; anschließend die Markierung der Banden mit einem Bleistift.

Isolierung von Caldarchaeolen

Für die Trennung von Caldarchaeolen hat sich das Protokoll von Trincone *et al.* (1988) als vorteilhaft erwiesen. $4 \times 2,5 \mu\text{l}$ der aufkonzentrierten Kernlipid-Fraktion wurden dabei am unteren Randbereich einer DC-Platte (Kieselgel 60F-254; Schichtdicke 0,25 cm; $5 \times 10 \text{ cm}$) in Form einer Bande aufgetragen. Die Trennung erfolgte in dem automatischen Entwicklungssystem mit dem Laufmittel Hexan : Etylacetat (7:3; v/v). Nach dem Trocknen wurde die Platte zur Sichtbarmachung der Banden in eine mit I_2 -Dampf angereicherte Glaskammer gestellt.

2.5.6.2. Bestimmung der Isoprenoid-Ketten der isolierten PLEL

Prinzip

Die C-O-C-Bindung im Etherlipid-Molekül ist mit herkömmlichen Hydrolyse-Verfahren nicht aufzuspalten. Diese kann aber mit wässrigen Lösungen von BCl_3 (Bortrichlorid) oder HI (Jodwasserstoff)

gespalten werden (Langworthy, 1982). Die daraus entstehenden Alkylchloride, bzw. -jodide lassen sich direkt am GC bestimmen. Es empfiehlt sich aber eine weitere Derivatisierungsreaktion durchzuführen, da besonders Alkyldijodide und Alkyldichloride, bedingt durch die hohe Temperatur und den dadurch bedingten Verlust des Halogen-Rests, zu Derivaten mit instabilen Doppelbindungen reagieren. Dies wiederum führt zur Ausprägung von multiplen und breiten Peaks auf der GC-Säule (Langworthy, 1982). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Derivatisierungen durchgeführt, die zur Umwandlung des Alkylhalogenids zu dem korrespondierenden Kohlenwasserstoff führten, da diese Stoffgruppe am besten massenspektrometrisch charakterisiert ist (McLafferty und Turecek, 1993). Eine schematische Darstellung der Seitenkettenbestimmung zeigt Abb. 8.

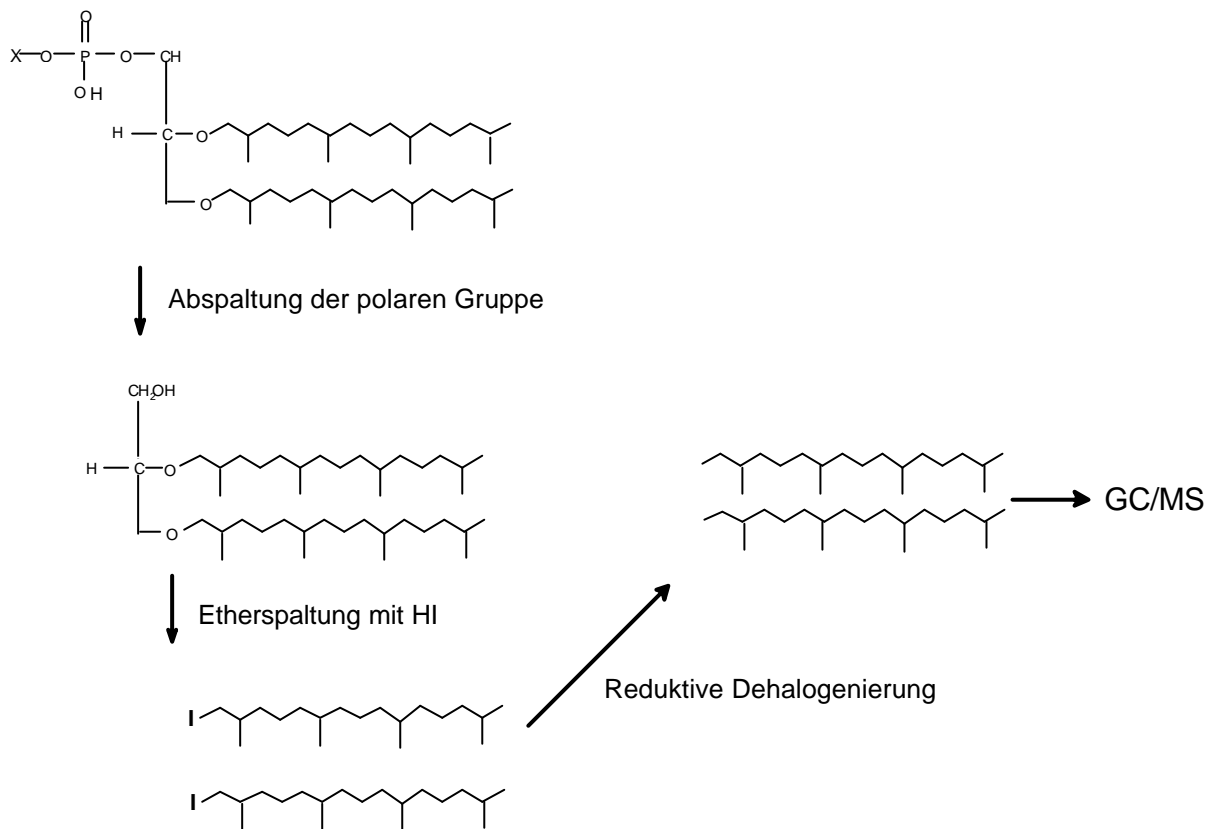


Abbildung 8: Darstellung der Seitenkettenbestimmung am Beispiel eines Archaeols

Spaltung der Etherbindung

In zahlreichen Experimenten hat sich folgende Arbeitsweise, basierend auf der Beschreibung von Kates *et al.* (1965), bewährt: Die Probelösung wurde in ein 50-ml-Aufschlußglas (mit Teflon-Schraubverschluß) pipettiert und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft.

Die Reaktion der Etherspaltung verlief nach Zugabe von 1,0 ml Jodwasserstoffsäure (57%) für 18 h bei 100°C im Trockenschrank. Nach dem Abkühlen erfolgte das Verdünnen des Reaktionsgemischs mit 4,0 ml H₂O und anschließend die Extraktion der Alkyljodide mit 3 × 5 ml *n*-Hexan. Die obere Phase (= Hexan-Phase) wurde abgenommen und in einen 100-ml-Scheidetrichter pipettiert, die vereinigten Extrakte mit 4 ml H₂O, 10 ml Na₂CO₃ (10%) und 10 ml Na₂S₂O₃ (50%) im Scheidetrichter gewaschen und nach 15 min die untere Phase abgenommen und verworfen. Die Hexan-Phase, welche die Alkyljodide enthält, wurde auf ein mit Na₂SO₄ befüllten Trichter zum Trocknen gegeben und in einem 50-ml-Spitzkolben aufgefangen und nach dem Einengen in ein Aufschlußglas für die reduktive Dehalogenierung abgefüllt.

Reduktive Dehalogenierung

Für die reduktive Dehalogenierung hat sich folgende Arbeitsweise, basierend auf der Methode von Panganamala *et al.* (1971) erfolgreich bewährt: Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden 100 mg Zn-Pulver und 2,0 ml Eisessig hinzugefügt. Die Reaktion fand bei 100°C für 18 h statt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 5 ml Na₂CO₃ (0,1 M) neutralisiert. Die Extraktion der Kohlenwasserstoffe erfolgte mit 3 × 7 ml *n*-Hexan. Die obere Phase (= Hexan-Phase) wurde nach 10-minütiger Zentrifugation (2000 U min⁻¹) abgenommen und in einen 100-ml-Scheidetrichter pipettiert, anschließend die vereinigten Extrakte mit 10 ml Na₂CO₃ (0,1 M) und 2 × 10 ml H₂O im Scheidetrichter gewaschen. Phasentrennung und Trocknung verliefen wie zuvor beschrieben. Der eingegangene Hexan-Extrakt stand danach für die Messung am GC/MS zur Verfügung.

Anpassen des GC/MS-Systems an die Isoprenoid-Analyse

Die Messungen wurden ebenso mit dem Gaschromatographen (HP 5890 series II GC), gekoppelt mit einem Massenspektrometer (5971A MSD), durchgeführt. Die Proben wurden dabei in eine Ultra 2 Kapillarsäule (HP 5: beschichtet mit 5% quervernetztem Diphenyl- und 95% Dimethylsiloxan) im "splitless" Modus injiziert. Als Trägergas diente Helium bei einer konstanten Flußrate von 0,8 ml min⁻¹. Die Temperatur des Injektors betrug 320°C, die des Detektors 300°C. Das Temperaturprogramm der GC-Säule sah folgendermaßen aus: Nach erfolgter Injektion wurde die Anfangstemperatur von 70°C für 2,0 min konstant gehalten, danach erfolgte eine Temperaturerhöhung von 20°C min⁻¹ auf 130°C, die für 2,0 min konstant blieb. Durch eine weitere Temperaturerhöhung von 4,0°C

min⁻¹ wurde die Säule auf die Endtemperatur von 320°C erhitzt, die für 20 min gehalten wurde. Das Temperaturprogramm erstreckte sich über eine Dauer von 74,50 min.

Die Ionisierung des Analyten erfolgte im HP 5971A MSD über Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Die Vervielfacherspannung (EMV) bewegte sich zwischen 1800 und 2000 V. Das Gerät wurde in regelmäßigen Abständen mit Perfluorotributylamin (PFTBA) justiert (auto tuning). Für die PLEL-Analyse wurde ein zeitabhängiges Scannen der einzelnen Massenbereiche durchgeführt, um eine möglichst präzise Acquisition zu erreichen. Von 10-29,9 min wurde der Massenbereich zwischen 50 und 350 amu (Schwellenwert 250; Scanrate 1,5 s⁻¹) untersucht, von 30,0-54,9 min war es der Bereich zwischen 50 und 550 amu (Schwellenwert 480; Scanrate 1,5 s⁻¹) und von 55,0 min bis zum Ende des GC-Laufs war es der Bereich zwischen 50 und 650 amu. (Schwellenwert 480; Scanrate 1,2 s⁻¹).

Für die Messung wurde den Probegläschen nach der reduktiven Dehalogenierung jeweils die Lösungsmittel unter dem Stickstoffstrom entfernt und anschließend 100 µl eines 0,36 nM Nonadecan-Standards (19:0 Alkan in i-Octan gelöst) hinzugefügt. Nach dem Überführen der Proben in 100 µl GC-Mikrovials erfolgte die Messung am GC/MS.

2.5.6.3. Quantifizierung von PLEL-Kohlenwasserstoffen mit GC/MS

Ermitteln von Responsefaktoren für quantitative Untersuchungen

Wie bereits bei der Quantifizierung der Phospholipidfettsäuren dargestellt, geht für jede zu untersuchende Substanz der sogenannte Responsefaktor mit in die Berechnungsformel der HP ChemStation ein. Während für die einzelnen Fettsäuren bereits Responsefaktoren experimentell, bzw. rechnerisch ermittelt wurden, sind diese noch für die PLEL-Seitenketten zu bestimmen. Dies erfolgte mit einer definierten Kohlenwasserstoffmischung (Promochem).

Quantifizierung der Etherspaltung und der reduktiven Dehalogenierung eines Phospholipid-Standards

Anhand eines PLEL-Standards (SIGMA P3777) wurde durch Verwendung von drei verschiedenen Konzentrationen die Ausbeute an ethergebundenen Kohlenwasserstoffen ermittelt, um bei ökosystemaren Betrachtungen von der Konzentration an PLEL-Kohlenwasserstoffen auf PLEL bzw. Zellzahl hochrechnen zu können.

2.5.6.4. Nachweis von Etherlipiden am GC/MS nach TMSI Derivatisierung

Die Bestimmung von Etherlipiden nach TMSI-Derivatisierung verlief in Anlehnung an Nichols und Franzmann (1992). Nach Entfernen des Lösungsmittels unter dem Stickstoff-Strom wurde dem Rückstand 0,5 ml TMSI-Reagenz hinzugefügt, welches aus Pyridin : BSTFA : Hexamethyldisilasan : Trimethylchlorsilan (0,2:1:2:1; v/v/v/v) bestand. Die Derivatisierungsreaktion fand bei 60°C für 15 min im Trockenschrank statt, anschließend die Messung, nachdem die Probe abgekühlt war.

Das Temperaturprogramm sah folgendermaßen aus: Nach der Injektion bei einer Anfangstemperatur von 70°C erfolgte nach 2,0 min eine Temperaturerhöhung von 20°C min⁻¹ auf 130°C, die für 2,0 min konstant blieb. Durch eine weitere Erhöhung von 10,0°C min⁻¹ wurde die Säule auf die Endtemperatur von 320°C erhitzt, die für 40 min konstant blieb. Das Temperaturprogramm erstreckte sich über eine Dauer von 66 min. Die Betriebsbedingungen des Massenspektrometers entsprachen weitgehend den Einstellungen für die PLEL-Seitenkettenanalyse. Wegen der höheren Masse des Analyten wurde durchweg der Massenbereich von 50-650 amu untersucht, bei einem Schwellenwert von 480 und einer Scanrate von 1,2 s⁻¹.

2.5.6.5. Trennung von Etherlipiden mittels SPE-Säulen

Dadurch, daß durch die Etherspaltung und reduktive Dehalogenierung sowohl aus Archaeol als auch aus Hydroxyarchaeol Phytan gebildet wird, läßt sich nicht unterscheiden, aus welchem Kernlipid dieser Biomarker stammt. Die Bildung von ungesättigtem C₂₀-Isoprenoid aus Hydroxyarchaeol ist unter diesen Bedingungen nicht quantitativ nachvollziehbar. Daher wurde versucht, die Kernlipide nach Abspaltung der polaren Gruppe voneinander zu trennen und dann die Reaktionen zur Seitenkettenbestimmung durchzuführen. In einigen vorangegangenen Studien konnten nämlich keine Hydroxyarchaeole nachgewiesen werden, da keine fraktionierte bzw. selektive Etherspaltung stattfand (u.a. De Rosa *et al.*, 1986; Pauly und van Vleet, 1986; Dickins und van Vleet, 1992).

Trennung von Archaeolen und Caldarchaeolen mit SPE-SI-Säulen

Die einzige in der Literatur beschriebene Säulentrennungsmethode ist die von De Rosa *et al.* (1986) unter Verwendung von gefüllten Silicagel-Säulen (SI) und eines Petrol-/Diethylether Gradienten. Diese Methode wurde für Lipidgemische auf der Basis von SPE-SI-Säulen angepaßt.

Trennung von Etherlipiden nach Unsättigungen mit der SPE-SCX Säule

Auch aus ungesättigtem C₂₀-C₂₀-Archaeol wird nach Etherspaltung/reduktiver Dehalogenierung das gleiche Isoprenoid wie aus gesättigtem C₂₀-C₂₀-Archaeol gewonnen (Nichols und Franzmann, 1992). Daher wurde zur Separation von gesättigten und ungesättigten Etherlipiden das Trennungsschema von Zelles und Bai (1993), basierend auf SPE-SCX-Säulen angewendet.

2.5.6.6. Charakterisierung von Etherlipiden mittels LC/MS

Während mit Etherspaltung/reduktiver Dehalogenierung und Messung am GC/MS die Seitenketten der Etherlipide festgestellt werden, liefert die LC/MS Aussagen über die Größe der Ausgangsmoleküle, sprich der Etherlipide. Die Messungen wurden mit einem Finnigan LCQ durchgeführt. Die Ionisierung des Analyten erfolgte dabei über "atmospheric pressure chemical ionisation" (APCI) im positiven Ionisationsmodus unter Berücksichtigung der folgenden Betriebsbedingungen (Tabelle 5), die sich in zahlreichen Experimenten bewährt haben:

Tabelle 5: Betriebsbedingungen des Massenspektrometers des LC/MS-Systems für die Detektion von Etherlipiden

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Capillary Temp (°C)	150.00	Octapole 2 Offset (V)	-5.50
APCI Vaporizer Temp (°C)	450.00	Interoctapole Lens Voltage (V)	-16.00
Source Voltage (kV)	8.00	Trap DC Offset Voltage (V)	-10.00
Source Current (µA)	5.00	Multiplier Voltage	0.00
Sheath Gas Flow ()	96.00	Maximum Ion Time (ms)	200.00
Aux Gas Flow ()	55.00	Ion Time (ms)	5.00
Capillary Voltage (V)	12.00	Data Type	Centroid
Tube Lens Offset (V)	45.00	Source Type	APCI
Octapole RF Amplifier (Vp-p)	610.00	Polarity	Positive
Octapole 1 Offset (V)	-3.00	Mass range (amu)	0.00-2000.00

Zur Trennung der Etherlipide wurde dem Massenspektrometer eine Silikagel-Säule (Merck 250-4; Länge 25 cm, Ø 4 mm) vorgeschaltet. Die Trennung beruhte auf einem Lösungsmittel-Gradienten

von Ethylacetat und Hexan und dauerte insgesamt 45 min. Das Trennungsschema ist in Tab. 6 dargestellt.

Tabelle 6: Trennungsschema für die Bestimmung von Etherlipiden am LC/MS

Zeit [min]	Ethylacetat	Hexan
0.00	90	10
25.00	50	50
35.00	50	50
40.00	90	10
45.00	90	10

2.6. Quantitative, molekularbiologische Bestimmungsmethoden von mikrobiellen Populationen (Methodenvergleich zu PLEL/PLFA)

2.6.1. Zellfixierung in Umweltproben

Um die Morphologie der Zielzellen zu erhalten, wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehydlösung auf schonende Weise durch Quervernetzung von Aminogruppen fixiert.

2.6.1.1. Paraformaldehydfixierung in überstauten Bodenproben

Nach dem Entfernen des Überstandes an Bodenwasser und nach durchgeführter Homogenisierung der Bodenprobe, wurden dieser 0,3 g entnommen und anschließend mit drei Teilen 4%-iger, frisch hergestellter, gekühlter Paraformaldehydlösung (PFA; Amann *et al.*, 1990a) vermischt. Dann erfolgte eine Inkubation von mindestens 1 h bei 4°C. Nach der Zentrifugation (12.000 × g, 5 min) wurde das Zellpellet mit 1,0 ml PBS-Puffer (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, erneut abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und für 30 s auf dem Vortex-Mixer vermischt und danach im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Ethanol_{abs} versetzt. Die Lagerungstemperatur der fixierten Zellen betrug -20°C.

2.6.1.2. Paraformaldehydfixierung in Wasserproben

Am Beprobungsort wurden drei Teile 4%iger, frisch hergestellter, gekühlter Paraformaldehydlösung (Amann *et al.*, 1990a) und ein Teil Probe gemischt und in einer Kühlbox zum Labor transportiert. Dort erfolgte die Inkubation von 8 ml Probe-PFA-Gemisch von mindestens 1 h bei 4°C. Nach der

Zentrifugation (12.000 x g, 5 min) wurde das Zellpellet mit 1 x PBS (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, erneut abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und 1:1 mit eiskaltem Ethanol_{abs} versetzt (Lagerungstemperatur -20°C).

2.6.2. *In situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden (FISH)

Hybridisierungsprozedur

Verwendete Lösungen:

NaCl-Stammlösung:

5 M NaCl

EDTA-Lösung:

0,5 M EDTA

pH 8,0

Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung):

10% SDS

sterilfiltriert

Tris-HCL-Lösung:

1 M Tris

pH 8,0 mit HCl konz.

Standard-Hybridisierungs- und Waschpuffer:

NaCl 0,9 M

Tris-HCl 20 mM

SDS 0,01 %

Durchführung:

Je nach benötigter Stringenz wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen Formamid (Merck, Darmstadt) die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers verändert, was auch die Zusammensetzung des Waschpuffers beeinflusste (Tab. 7). Für die beiden Sonden wurden 0 bzw. 40% Formamid im Hybridisierungspuffer verwendet (Tab. 8). Fixierte Zellen aus den Umweltproben wurden auf die Aussparungen des beschichteten Objektträgers pipettiert (je nach Zelldichte 1-30 µl) und bei 46°C getrocknet. Danach erfolgte die Dehydrierung und Nachfixierung der Zellen durch Eintauchen der Objektträger für jeweils 3 min in 50, 80 und 96%igem Ethanol (aufsteigende Ethanolreihe). Zur Hybridisierung wurde auf jedes Feld 8 µl Hybridisierungspuffer mit 1 µl des markierten Oligonukleotids (Konzentrationen 20-50 ng/µl) pipettiert und vermischt. Die Objektträger wurden in ein 50 ml Probengefäß (Greiner, Nürtingen, FRG), welches mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetem Zellstoff

versehen war, gelegt und gut verschlossen (feuchte Kammer). Die Inkubation der Objektträger fand für 1,5-2 h bei 46°C statt. Anschließend wurde der Objektträger sofort mit 1 ml 48°C warmen Waschpuffer abgespült und in ein mit Waschpuffer gleicher Temperatur gefülltes Probegefäß überführt. Danach erfolgte das Waschen des Objektträgers für 15 min bei 48°C, der sodann vorsichtig mit H₂O_{dest} gespült, abgeschüttelt und an der Luft getrocknet wurde. Der hybridisierte Objektträger stand danach für die Visualisierung und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale bereit.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungs- und Waschpuffers für Ganzzellhybridisierungen

% Formamid im Hybridisierungspuffer (Hybridisierung bei 46°C)	Waschpuffer (Waschung bei 48°C)	
	mM NaCl (im Waschpuffer)	µl 5 M NaCl auf 50 ml ^a
0	900	9000
40	56	460

^a ab 20 % Formamid im Hybridisierungspuffer: Zusatz von 5 mM Na₂EDTA zum Waschpuffer

Tabelle 8: Verwendete 16S rRNA gerichtete Oligonukleotidsonden

Sonde	Zielorganismen	rRNS, Bindungs- position ^a	[%] FA ^b <i>in situ</i>	Referenz
ARCH915	<i>Archaea</i>	16S, 915-934	40	Stahl und Amann, 1991
EUB338	<i>Bacteria</i>	16S, 338-355	0	Amann <i>et al.</i> , 1990b

^a Position bezogen auf die *E. coli*-Sequenz (Brosius *et al.*, 1981)

^b % FA: verwendete Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer für *in situ*-Einzelzellhybridisierungen

2.6.3. Gesamtzellzahlbestimmung nach DAPI-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bindet an DNS, bevorzugt an AT-reiche Regionen, und kann für die Visualisierung der Gesamtzellzahl verwendet werden (Porter und Feig, 1980). DAPI zeigt ein Anregungsoptimum bei 365 nm. Gefärbte Zellen erscheinen blau, während Bindung von DAPI an Poly-Anionen, wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führt.

Verwendete Lösungen und Materialien:

Isopore[®]-Polycarbonatfilter GTTP (Fa. Millipore), Ø 25mm, Porengröße 0,2 µm Nitrocellulose Stützfilter, Ø 25 mm, Porengröße 0,4 µm (Fa. Sartorius)

DAPI-Arbeitslösung:

1 µg/l DAPI (Sigma, Deisenhofen, FRG) in H₂O_{bidest} gelöst

Durchführung:

1-20 µl Zellsuspension (je nach Zelldichte der fixierten Umweltprobe) wurden in ein ERG (Eppendorf-Reaktionsgefäß) pipettiert und mit 100 µl H₂O_{bidest} und 50 µl DAPI-Arbeitslösung für 15-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und ein angefeuchteter Polycarbonatfilter luftblasenfrei mit der glänzenden Seite nach oben auf einen vorgelegten Nitrocellulose-Stützfilter (Porengröße 0,4 µm) in ein Vakuum-Filtrationsgerät aufgelegt. Nach dem Zusammenbau des vorher sterilisierten Vakuum-Filtrationsgerätes (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden 2 ml H₂O_{bidest} in die Filtrationseinheit vorlegt, die Probe zupipettiert und der Filter mit dem für das Probengefäß (ERG) verwendete H₂O_{bidest} nachgespült. Durch Anlegen eines Vakuums erfolgte nacheinander das Absaugen von jeweils 5 ml 50, 80 und 96%igem Ethanol (aufsteigende Ethanolreihe), um die Probe zu waschen bzw. zu dehydrieren. Der Polycarbonatfilter wurde mit einer sterilen Pinzette in eine Petrischale überführt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10 min getrocknet. Die Nullprobe wurde derselben Prozedur ohne Zellsuspensionszugabe unterzogen.

Mikroskopische Auswertung:

Der Polycarbonatfilter wurde in Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd., London, UK) eingebettet und bei 1000-facher Vergrößerung unter UV-Anregung mit Hilfe eines Zähllokulars (10x10 Teilfelder, Zeiss, Oberkochen) an einem Epifluoreszenzmikroskop (Filter 01, Axioplan, Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Eine statistische Beurteilung erforderte die Auszählung von mindestens 20 Feldern. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Gleichungen verwendet:

$$\text{Gesamtzellzahl ml}^{-3} = \frac{(\text{Gesamtzahl an gezählten Zellen in Probe}) - (\text{Zellzahl Nullprobe})}{\text{Zahl der ausgezählten Felder}} \times M \times V$$

$$M = \frac{\text{gesamte effektive Filterfläche}}{\text{Fläche des Gitternetzes}}$$

M: Mikroskopfaktor
 V: Verdünnungsfaktor

Der Mikroskopfaktor ist vom verwendeten Zähllokular abhängig und ist auf diesem vermerkt.

2.6.4. Bestimmung relativer Populationsanteile nach *in situ*-Hybridisierung und DAPI-

Färbung

Zur Bestimmung des Verhältnisses der fluoreszenzmarkierten Zellen zur Gesamtzellzahl erfolgte im Anschluß an die Einzelzellhybridisierung ein Nachfärben mit DAPI.

Verwendete Lösungen:

DAPI-Arbeitslösung

0,5-1 µg/ml DAPI in H₂O_{bidest}

Durchführung:

Nach beendeter Einzelzellhybridisierung wurde das Objektträgerfeld mit 10 µl DAPI-Arbeitslösung überschichtet, für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, der Objektträger mit H₂O_{dest} vorsichtig abgespült, im Dunkeln luftgetrocknet und in Citifluor eingebettet.

Mikroskopische Auswertung:

Die hybridisierten bzw. DAPI-gefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines Zähllokulars (Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Da die Fluoreszenzfarbstoffe unter UV-Licht schnell ausbleichen, wurden zuerst die spezifischen Hybridisierungen (TRITC- und FLUOS-markiert) und dann die DAPI-Färbung ausgewertet. Die Zählung basierte auf mindestens 20 zufällig ausgewählten Feldern.

2.6.5. Mikroskopische Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen

2.6.5.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Objektträger wurden zur Verringerung von Ausbleichungseffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., London, GB) eingebettet und bei Raumtemperatur im Dunkeln unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen) betrachtet.

Zwischen dem Phasenkontrastbild und den jeweiligen Epifluoreszenzbildern fand ein Vergleich statt, wobei Plan-Neofluar-Objektive mit 10-, 40- und 100-facher Vergrößerung Verwendung fanden.

2.6.5.2. Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

Alternativ zur Epifluoreszenzmikroskopie erfolgte die Auswertung der *in situ*-Hybridisierungen auch durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Objekte mit starker Autofluoreszenz bzw. mit großer räumlicher Ausdehnung können mit konventioneller Mikroskopie nicht adäquat dargestellt werden. So kann emittiertes Licht aus Brennebenen, die über oder unter der Fokusebene liegen, die Bildschärfe erheblich beeinflussen. Ein weiterer entscheidender Vorteil der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie ist, daß auch der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 visualisiert und detektiert werden kann. So ist die Auswertung von Hybridisierungen mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich.

Prinzip

Das Präparat wird punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt, wobei Laserlinien verschiedener Wellenlänge als Lichtquellen genutzt werden. Das zu untersuchende Objekt wird in zwei Raumrichtungen abgerastert, die von jedem Bildpunkt ausgesandte Fluoreszenz über Photomultiplier verstärkt und von einem Detektor als Helligkeitswert gemessen. Dabei ist im Lichtweg eine Lochblende ("pinhole") eingeschaltet, welche bewirkt, daß nur Licht aus einer definierten Brennebene detektiert, während alles Streulicht ausgeblendet wird. Durch wiederholtes Abrastern verschiedener Fokusebenen werden optische Schnitte durch ein Präparat gelegt, die zusammen die dreidimensionale Struktur des Präparats wiedergeben. Dabei steht die Bildinformation pixelweise in digitaler Form zur Verfügung, was eine anschließende Bildbearbeitung ermöglicht, sowie die Darstellung der räumlichen Information in Form von Projektionen, Schnitten oder farbcodierten Tiefenprofilen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein inverses konfokales Laserscanning-Mikroskop vom Typ Zeiss LSM 410 (Zeiss, Oberkochen) mit drei Laserlinien (488 nm, 543 nm und 633 nm) verwendet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software Zeiss LSM Version 3.54ß.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmpakets SPSS 10.0, einfache deskriptive Darstellungen mit dem Programm SigmaPlot 4.0.

2.7.1. Mittelwertvergleiche

Die zu untersuchenden Parameter wurden mit dem *Kolmogorov-Smirnov*-Test auf Normalverteilung geprüft und gegebenenfalls log-transformiert. Die Ergebnisse sind, falls nicht anders angegeben, als arithmetische Mittel dreier Wiederholungen und ihrer Standardabweichungen dargestellt. Die

Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte durch Varianzanalyse, wobei das Signifikanzniveau mit $p \leq 0,05$ angesetzt wurde.

2.7.2. Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (= Principal Component Analysis: PCA) ist eine multivariate statistische Methode, um die Dimensionalität von Datensätzen vieler miteinander in Beziehung stehender Variablen zu reduzieren, wobei ein größtmöglicher Erhalt der systematischen Variation des Originaldatensatzes zugrunde gelegt wird (Backhaus *et al.*, 1989). Bei der Analyse werden die Ursprungsvariablen durch einige wenige principal-component Variablen (PC1, PC2, PC3, etc.) ersetzt. Diese PC sind miteinander nicht korreliert und so geordnet, daß PC1 den Großteil der Variation und PC2 die zweitgrößte Variation des Ursprungsdatensatzes enthält.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels PCA verschiedene Reinkulturen, Untersuchungspartikeln und Beprobungszeitpunkte hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in den Phospholipid-Profilen verglichen. Die Darstellung der Ergebnisse aus den Hauptkomponentenanalysen der log-transformierten Biomarkerkonzentrationen (Mol%) erfolgte in Form zweidimensionaler Komponentendiagramme.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1. Methodische Aspekte

3.1.1. Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL)

3.1.1.1. Nachweis von Etherlipiden in Reinkulturen

Da bis dato nur ein einziger PLEL-Standard kommerziell verfügbar war und Modellsubstanzen für die Methodenentwicklung als unerlässlich erschienen, wurden zuerst aus Reinkulturen verschiedene Kernlipide isoliert. Gefriergetrocknete Zellen von *Methanosarcina barkeri* (MSB, siehe Tab. 2) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MBT) wurden der Lipidextraktion unterzogen, wobei die beiden Extraktionsprotokolle A und B (s. Kap. 2.5.2.) Anwendung fanden.

Nachweis von Archaeol und Hydroxyarchaeol

Die Kernlipide, isoliert aus *Methanosarcina barkeri*, wurden nach der alkalischen Hydrolyse dünn-schichtchromatographisch getrennt; wobei Archaeol als Standard diente. Das Ergebnis der Trennung ist in Abb. 9 dargestellt. Daraus geht hervor, daß in beiden Extrakten aus *Methanosarcina barkerii* dieselben Banden erzielt wurden. Der qualitative Archaeol-Standard wies einen R_F -Wert von 0,47 auf, was in Einklang mit den Ergebnissen von Ferrante *et al.* (1988a) steht, so daß folglich die jeweilige Bande der Extrakte A und B als Archaeol bezeichnet werden kann. Für die Identifizierung der mittleren Banden (bei R_F -Wert 0,21) und der unteren, intensiv gefärbten Banden bei R_F -Wert 0,04 waren keine Standardsubstanzen verfügbar. Aufgrund von Literaturhinweisen (Ferrante *et al.*, 1988a und 1988b; Ekiel und Sprott, 1992) kann von der Bande bei R_F -Wert 0,21 von einem Hydrolyse-Artefakt und bei R_F -Wert 0,04 von β -Hydroxyarchaeol ausgegangen werden. Letzteres konnte mit FAB-MS ("fast atomic bombardement mass spectrometry") bestätigt werden. Dazu wurde im Bereich der markierten Banden die Silikagelbeschichtung mit einem Spatel abgekratzt und daraus mit 15 ml Chloroform : Methanol (2:1; v/v) durch 30-minütiges Schütteln die Kernlipide abgelöst.

Zur Identifizierung wurde die Probe in entsprechende Matrices umgelöst und mit FAB-MS am Institut für Organische Chemie der Universität Köln (Prof. H. Budzikiewicz) untersucht.

Wenngleich das Massenspektrum (Abb. 10), erhalten durch FAB-MS, hauptsächlich aus Matrix-Ionen besteht, treten die Fragmente $[M+H]^+$ (m/z 669), welches die Molekülmasse des Hydroxyar-

chaeols+H darstellt, und das Fragment $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 651) deutlich hervor. Außerdem ist ein weiteres Fragment bei m/z 373 festzustellen, bei dem es sich um den Verlust der Phytanylkette, also um einen Monoether handelt $(CH_2OH-CHOR-CH_2OH+H)^+$. Diese Fragmente belegen, daß die Bande bei R_F -Wert 0,04 eindeutig auf β -Hydroxyarchaeol zurückzuführen ist.

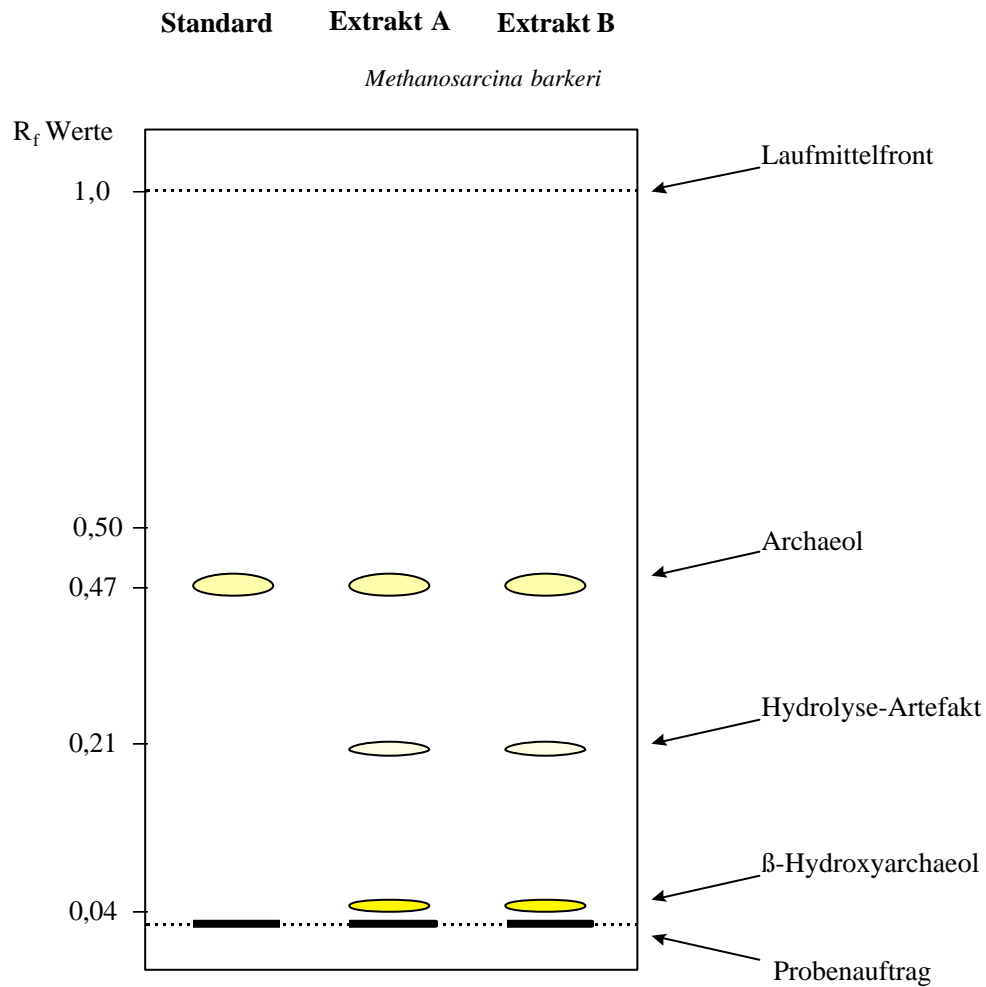


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Trennung von C_{20} - C_{20} -Archaeol und β -Hydroxyarchaeol aus PLEL aus *Methanosarcina barkeri*.

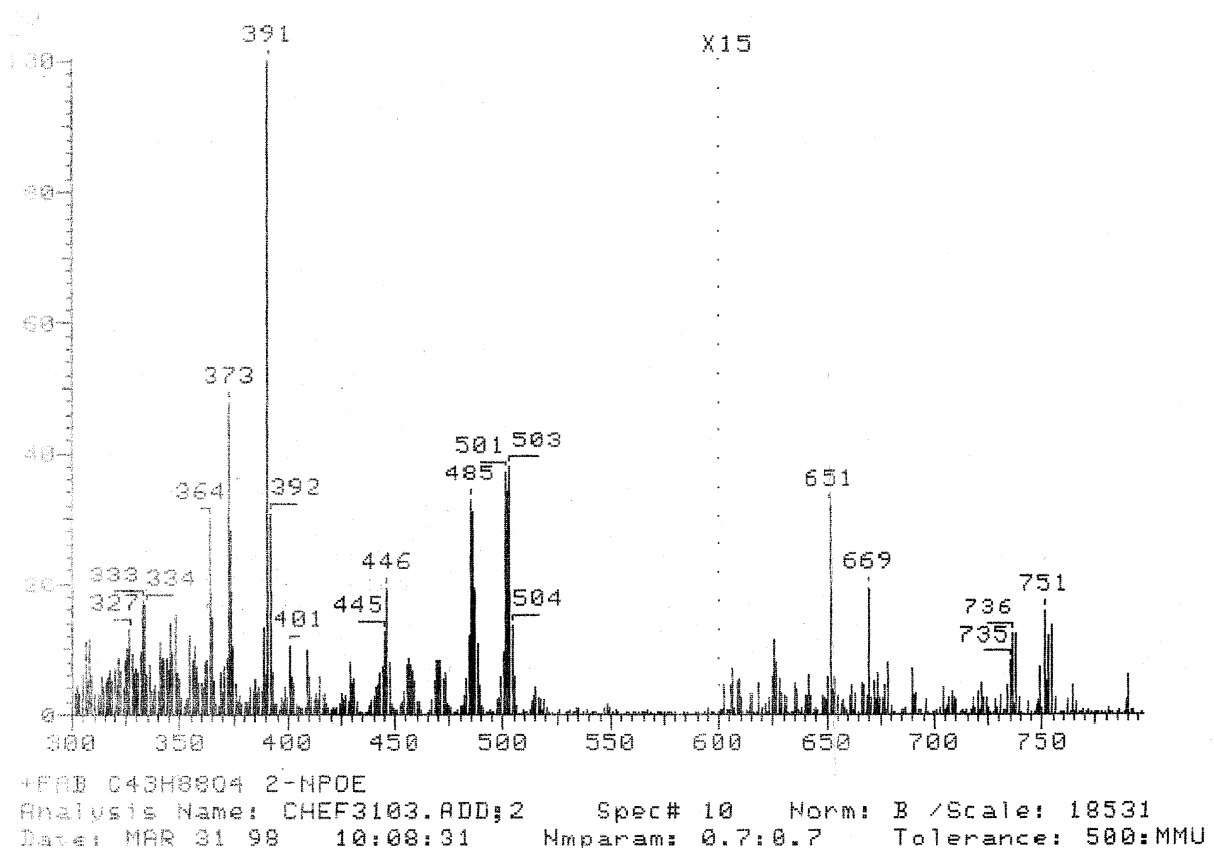


Abbildung 10: Massenspektrum von b-Hydroxyarchaeol erhalten durch FAB-MS

Nachweis von Caldarchaeolen

Die Kernlipide aus *Sulfolobus solfataricus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurden nach der alkalischen Hydrolyse dünn-schichtchromatographisch getrennt. Ebenso wurde ein von Frau Dr. Gambacorta (Neapel) hergestelltes Etherlipid-Gemisch, gewonnen aus *Sulfolobus solfataricus* (SUS), aufgetragen. Als Standard diente Archaeol. Die dünn-schichtchromatographische Trennung ist in Abb. 11 dargestellt.

Die Etherlipid-Fraktion aus *Sulfolobus solfataricus* wurde in insgesamt neun Banden aufgetrennt, was sich in Einklang mit den Ergebnissen von Trincone *et al.* (1988) befindet. Diese Banden können auf neun unterschiedliche Caldarchaeole zurückgeführt werden. Dabei scheint acyclisches Caldarchaeol aus der Gruppe der Caldarchaeole den größten R_F -Wert zu besitzen. Diese Bande wird auch von einem Etherlipid aus dem Extrakt A von *Methanobacterium thermoautotrophicum* eingenommen, während diese Bande im Extrakt B völlig fehlt. Außerdem weist die Archaeol-Bande im Extrakt B eine deutlich abgeschwächte Färbung als im Extrakt A auf. Dies deutet darauf hin, daß die

Extraktionsmethode B für die Lipidextraktion dieser Kultur eher ungeeignet zu sein scheint. Nach Langworthy *et al.* (1982) setzt sich die polare Lipidfraktion aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* aus 44,5% Archaeol und 55,5% Caldarchaeol zusammen. Die R_F -Werte der markierten Banden aus dem Dünnschichtchromatogramm in Abb. 11 stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Trincone *et al.* (1988). Jedoch standen für Caldarchaeole keine aufgereinigten Standardsubstanzen zur Verfügung, so daß für diese hier kein endgültiger Nachweis abgeleitet werden konnte.

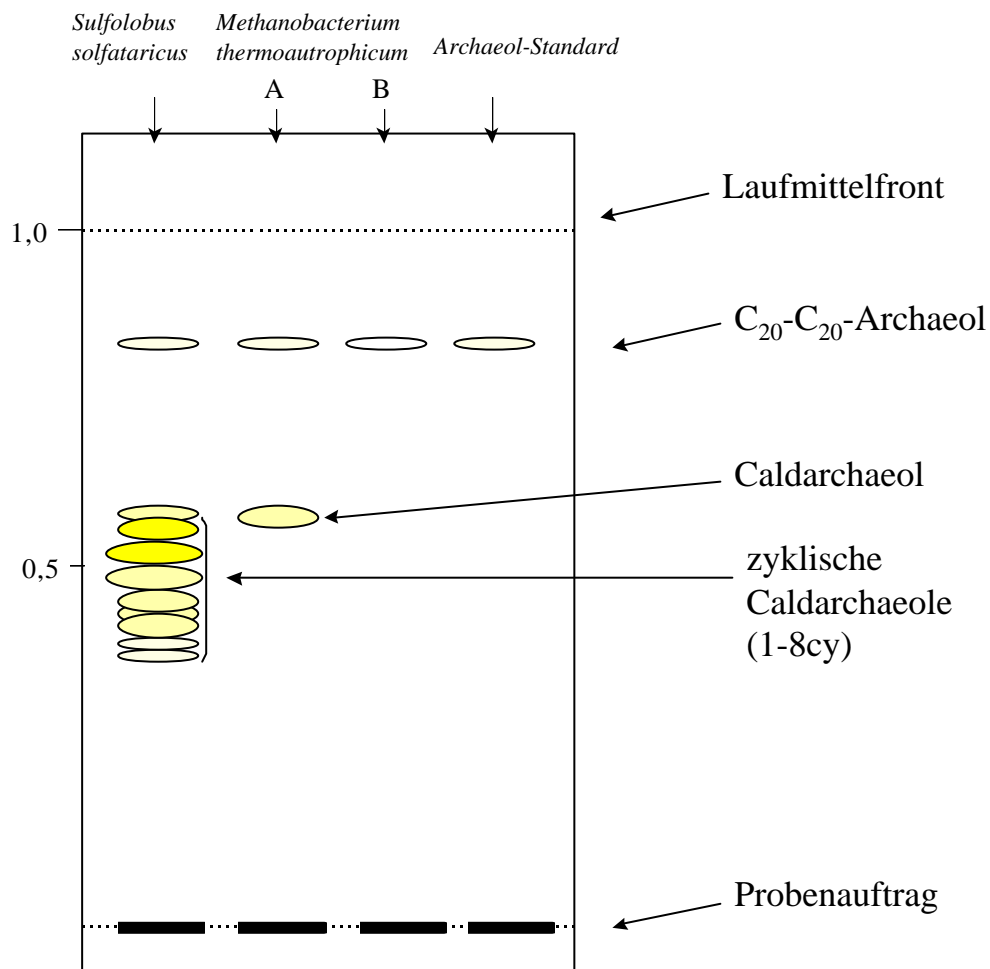


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Trennung von Caldarchaeolen aus *Sulfolobus solfataricus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum*

3.1.1.2. Bestimmung der Etherlipid-Seitenketten

Hierzu wurden die dünnschichtchromatographisch getrennten Etherlipide, wie bereits für β -Hydroxyarchaeol beschrieben, von dem DC-Plattenmaterial abgelöst und der Etherspaltung mit Jodwasserstoffsäure (HI) und der reduktiven Dehalogenierung unterzogen.

Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen

Die Analytik erfolgte mit dem Gaschromatograph HP 5890 GC, gekoppelt mit einem HP 5971A massenselektiven Detektor.

Archaeol lieferte den Isoprenoid-Kohlenwasserstoff Phytan (2,6,10,14 Tetramethylhexadecan), welches als i20:0 bezeichnet wird. Abb. 12 zeigt das Zerfallsspektrum, mit den charakteristischen Fragment-Ionen bei m/z 112/113, 126/127, 182/183, 196/197 und das Molekölion bei Masse 282.

Aus dem vermuteten Caldarchaeol aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde Biphytan (i40:0) freigesetzt. Abb. 13 zeigt das GC/MS Zerfallsspektrum, mit den charakteristischen Ionen bei 196/197, 266/267, 322/323, 392/393, 462/463. Das Molekölion bei m/z 562 wurde hierbei nicht erhalten.

Ebenso wurden aus den neun Caldarchaeolen aus *Sulfolobus solfataricus* durch Etherspaltung/reduktive Dehalogenierung die jeweiligen Biphytane abgespalten. Das Caldarchaeol mit 1 Cyclopentanring (i40:0-1cy) lieferte ein azyklisches Biphytan und ein zyklisches Biphytan (Abb. 14; Biphytan-1cy: m/z : 165/166/167, 194/195/196, 280/281, 392/393, 460/461).

Aus Caldarchaeol mit 8 Cyclopentanringen, welches den niedrigsten R_F -Wert im Dünnschichtchromatogramm aufwies, wurde ausschließlich Biphytan-4cy (i40:0-4cy) freigesetzt. In einer Probe, in der Eluate aller neun DC-Banden vereinigt waren, wurden insgesamt fünf Biphytane nachgewiesen, wie aus dem Totalionenchromatogramm in Abb. 15 hervorgeht.

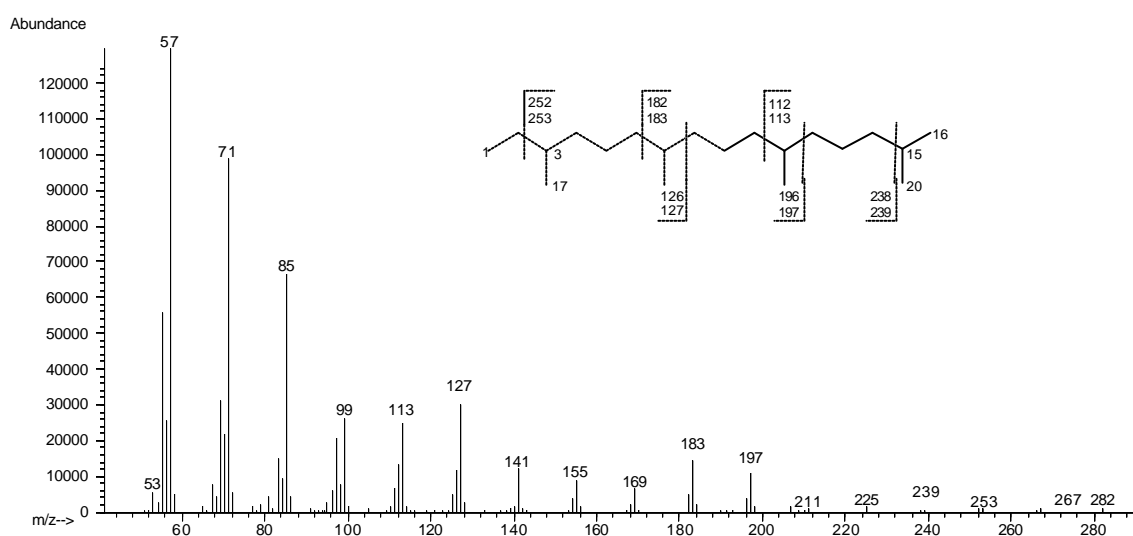


Abbildung 12: Massenspektrum von Phytan (C₂₀H₄₂)

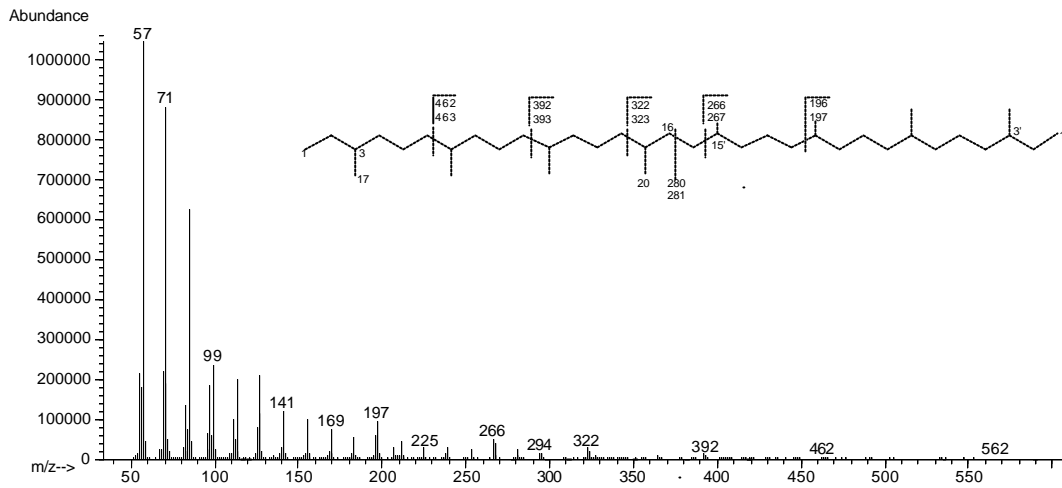


Abbildung 13: Massenspektrum von Biphytan (C₄₀H₈₂)

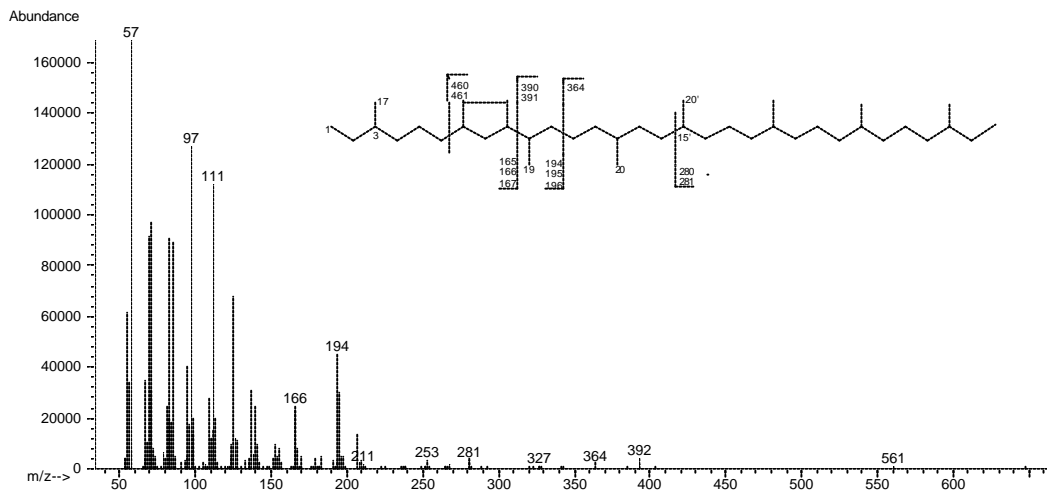


Abbildung 14: Massenspektrum von Biphytan-1cy (C₄₀H₈₀)

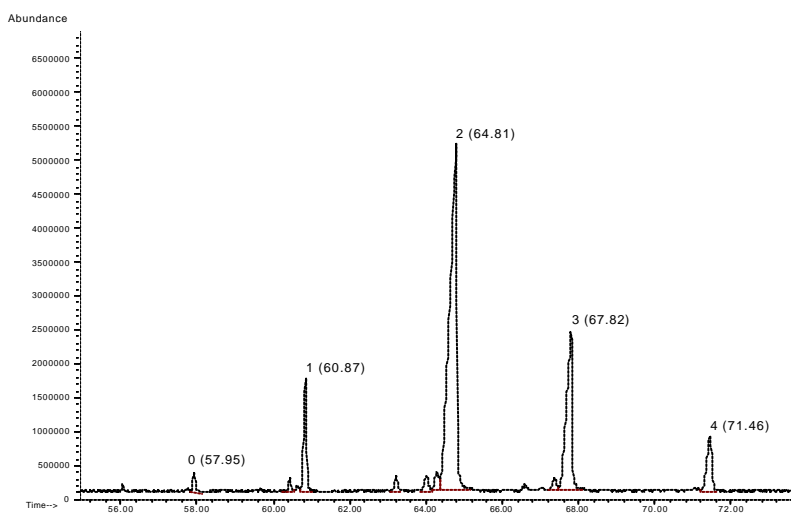


Abbildung 15: Totalionenchromatogramm (TIC) von azyklischen und zyklischen Biphytanen erhalten mit GC/MS.

Peak 0 in dem Totalionenchromatogramm in Abb. 15 ist auf azyklisches Biphytan (= i40:0), Peak 1 auf Biphytan mit einem Cyclopentanring (i40:0-1cy) und Peak 4 dementsprechend auf i40:0-4cy zurückzuführen. Alle Peaks konnten eindeutig anhand ihrer Fragmentationsmuster identifiziert werden. Insofern konnten die mittels Dünnschichtchromatographie (Abb. 11) getrennten Caldarchaeole indirekt über deren Isoprenoid-Seitenketten massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Aus β -Hydroxyarchaeol wurde Phytan erhalten, und in wesentlich geringeren Konzentrationen drei Peaks, die von ungesättigten Kohlenwasserstoffen zu stammen schienen. Jedoch konnte mittels Fragmentierung kein Unterschied zwischen den drei Peaks aufgezeigt werden. Das intensive Molekülion bei m/z 280 sowie die intensiv ausgeprägte Masse bei m/z 140 deuten auf ein C_{20} -Isoprenoid hin. Der Vergleich mit der NIST Spektrenbibliothek (Hewlett Packard, 1989) lieferte als "probability based match" mit einer Übereinstimmung von 90% das ungesättigte Isoprenoid 2,6,10,14-tetramethyl-, 2-Hexadecene (Abb. 16). Ebenso wurde diese Struktur als die "wahrscheinlichste" nach GC/MS-Untersuchungen von Prof. Budzikiewicz beschrieben.

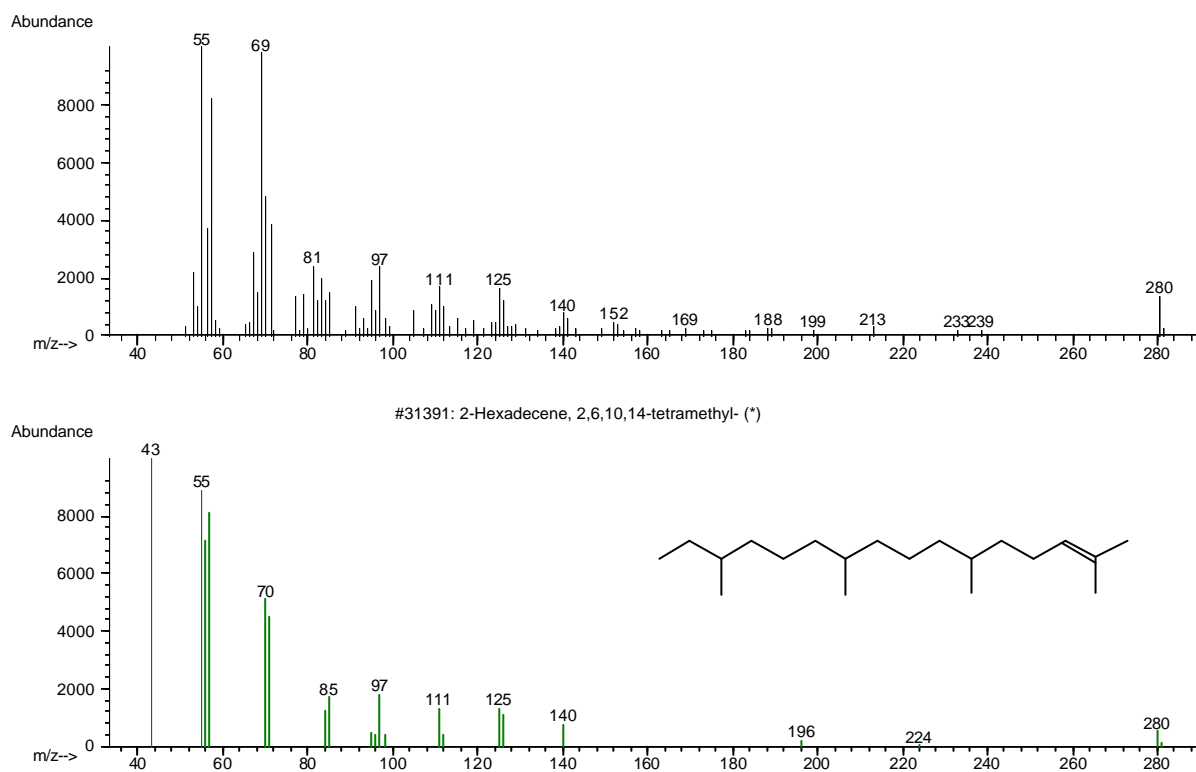


Abbildung 16: Massenspektrum von ungesättigtem C_{20} -Isoprenoid

Die Bildung dieses ungesättigten Isoprenoids läßt sich folgendermaßen erklären. Bei der starken Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure bei 100°C für 18 h wird offenbar die OH-Gruppe des Hydroxyarchaeols zerstört. Nach Ferrante *et al.* (1988b) entsteht bei der HI Spaltung von Hydroxyarchaeol 1 mol Phytanyljodid und 1 mol eines ungesättigten Phytanylderivats, das durch die nachgelagerte Reduktion nur teilweise zu Phytan hydriert wird.

3.1.1.3. Trennung der isolierten Etherlipide mit SPE-Säulen

Zuvor wurde gezeigt, daß Phytan (2,6,10,14 Tetramethylhexadecan) sowohl von Archaeol als auch von Hydroxyarchaeol durch die Etherspaltung freigesetzt wird. Um jedoch das mittels GC/MS bestimmte Isoprenoid exakt auf das Ausgangsetherlipid zurückführen zu können, wurde das Konzept der „selektiven Seitenkettenbestimmung“ von Phospholipid-Etherlipiden aufgestellt (Abb. 17), wobei die praktische Anwendbarkeit an Modellsubstanzen und Bodenextrakten zu untersuchen galt. Die selektive Seitenkettenbestimmung beinhaltet die Trennung von Etherlipiden nach funktionellen Gruppen und eine nachgelagerte Seitenkettenbestimmung der getrennten Substanzen bzw. Fraktionen. Dabei sollte die mit Dünnschichtchromatographie erreichte Trennung von Kernlipiden an die einfachere und schneller durchführbarere SPE-Säulentechnik angepaßt werden.

Trennung von Archaeolen und Caldarchaeolen aus einem Lipid-Gemisch

Im Rahmen dieses Experiments wurde eine Trennung in C₂₀-C₂₀-Archaeole, Hydroxyarchaeole und Caldarchaeole angestrebt. Die einzige in der Literatur beschriebene Säulentrennungsmethode ist die von De Rosa *et al.* (1986). Zu dieser Zeit war die Existenz von Hydroxyarchaeolen noch nicht bekannt und wurde in dem Trennungsprotokoll, das auf SI-Säulen basiert noch nicht berücksichtigt. Aus einem speziell dafür hergestellten Gemisch von C₂₀-C₂₀-Archaeol, β-Hydroxyarchaeol, Caldarchaeol und Caldarchaeol mit 1-8 Cyclopentanringen hat sich folgende Herangehensweise als erfolgreich herausgestellt (s. Tabelle 9): Eine Silicagel-Säule (Bond Elute[®], 3 ml) wurde für 30 min im Trockenschrank bei 60°C aktiviert. Nach dem Abkühlen wurde zuerst die Säule mit 1 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (85:15, v/v) konditioniert und danach der Etherlipid-Extrakt aufgetragen, der ebenfalls in Petrolether-Diethylether (85:15, v/v) gelöst war. Aus dieser Trennung resultierten zwei Fraktionen, dadurch, daß nacheinander verschiedene Petrolether-Diethylether-Gemische zur Elution verwendet wurden. Der Nachweis der Etherlipide in den jeweiligen Fraktionen erfolgte mittels den zuvor beschriebenen DC-Methoden.

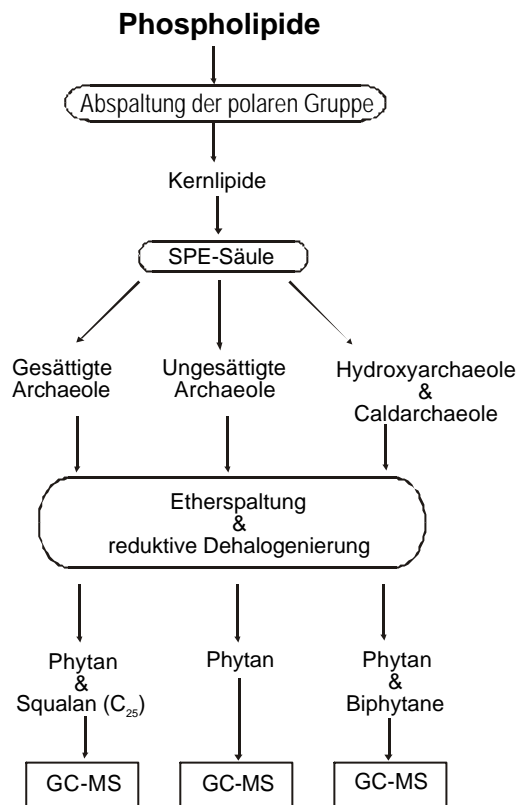


Abbildung 17: Schematische Darstellung der „selektiven Seitenkettenbestimmung“ von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL)

Tabelle 9: Elutionsschema für die Trennung von Etherlipiden in Reinkulturen

Arbeitsschritt	Elutionsmittel (Petrolether:Diethylether)	Reservoir- volumen	Eluierte Fraktion	Fraktion -Nr.
Konditionierung	85:15	1	---	---
Probenauftrag	Probe gelöst in Petrolether : Diethylether (85:15)	≤ 1	---	---
Elution	85:15	1	(C ₂₅ -C ₂₅ - Archaeole)*	1
Elution	6:4	1	C ₂₀ -C ₂₀ - Archaeole	1
Elution	1:1	1	---	---
Elution	4:6	1	Caldarchaeole, Hydroxyarchaeol	2
Elution	15:85	2	Caldarchaeole, Hydroxyarchaeol	2

* wurde nicht experimentell bestätigt, da dieses Etherlipid nicht zur Verfügung stand

Die erste Fraktion, in der sich Archaeole befanden, wurde mit 1 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (85:15, v/v) erhalten, welches nach De Rosa *et al.* (1986) C₂₅-C₂₅-Archaeole eluiert und mit 1 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (6:4, v/v), welches C₂₀-C₂₀-Archaeole desorbierte. Den Nachweis für C₂₅-C₂₅-Archaeole in *Methanosarcina barkeri*, wenn auch in niedrigen Konzentrationen, erbrachten bisher nur De Rosa *et al.* (1986). In dieser Arbeit wurden weder C₂₅-C₂₅-Archaeole für das Trennungsexperiment eingesetzt, noch konnten sie in *Methanosarcina barkeri* nachgewiesen werden. Die zweite Fraktion, welche Hydroxyarchaeole und Caldarchaeole enthielt, wurde folgendermaßen erhalten: 1 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (1:1, v/v); 1 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (4:6, v/v); 2 Reservoirvolumen Petrolether-Diethylether (15:85, v/v).

Charakterisierung von Etherlipiden aus *Methanococoides burtonii*

Bislang ist in der Literatur nur von einem einzigen methanogenen Archaeum die Rede, nämlich von *Methanococoides burtonii* (DSM 6242), welches nach Nichols und Franzmann (1992), neben dem herkömmlichen, gesättigten Phospholipid-Archaeol, ein C₂₀-C₂₀-Archaeol mit einfach ungesättigter Isoprenoid-Kette enthält. Von diesem Organismus wurden 20 mg gefriergetrocknetes Zellmaterial (mehr waren nicht erhältlich) der obigen Lipidextraktion A (Collins *et al.*, 1980) unterzogen. Die Kernlipide wurden nach saurer Hydrolyse der polaren Lipid-Fraktion (Nichols und Franzmann, 1992; siehe auch Kap. 2.5.6.1) erhalten, welche in Anlehnung an Nichols und Franzmann (1992) der TMSI-Derivatisierung unterzogen und mittels GC/MS nachgewiesen wurden.

Gesättigtes C₂₀-C₂₀-Archaeol wies eine Retentionzeit von 47,13 min (Peak 2) auf, ungesättigtes C₂₀-C₂₀ Archaeol konnte nach 49,80 min (Peak 3) nachgewiesen werden (Abb. 18). Die Fragment-Ionen dieser Peaks stimmten mit den Messungen von Nichols und Franzmann (1992) genau überein. Neben den Etherlipiden von *Methanococoides burtonii* wurde auch ein Aliquot des zuvor mittels DC hergestellten Caldarchaeol-Extrakts von *Sulfolobus solfataricus* mit TMSI derivatisiert und am GC/MS bestimmt. Jedoch konnten mit dieser Methode keine Caldarchaeole nachgewiesen werden, da deren Schmelzpunkte, aufgrund der hohen Molekülmassen von mehr als 1280 amu für das vorhandene GC/MS System zu hoch liegen. Daher erscheint diese Methode für Bodenuntersuchungen nicht geeignet zu sein.

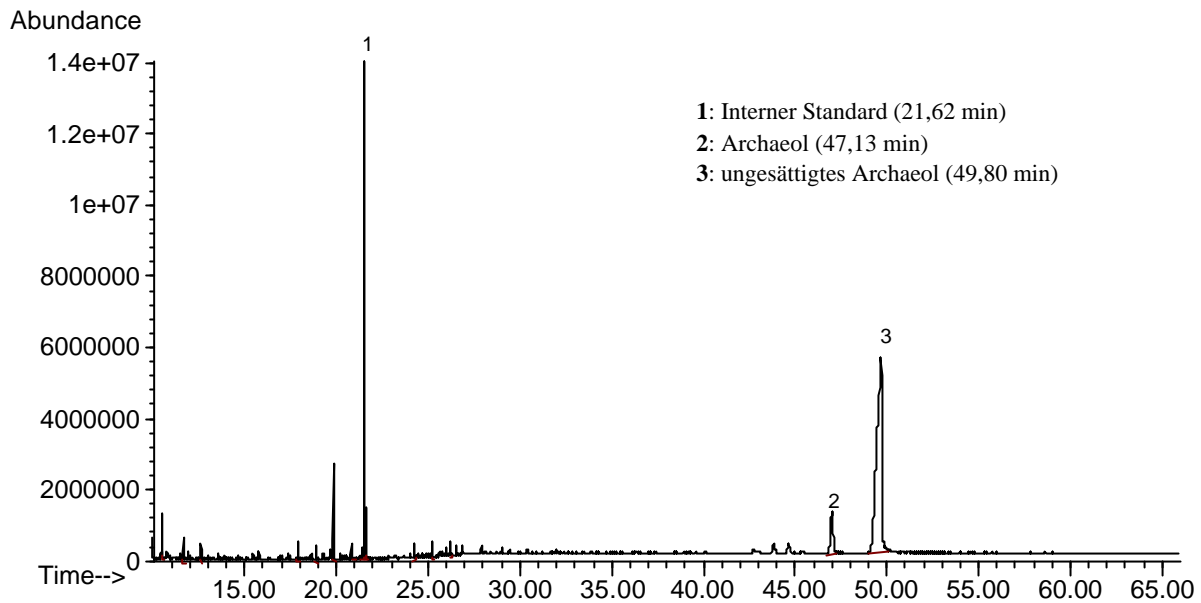


Abbildung 18: Totalionenchromatogramm (TIC) der TMSI-derivatisierten PLEL von *Methanococcoides burtonii*

Trennung von Etherlipiden nach Un sättigungen mit der SPE-SCX-Säule

Ein Aliquot der Kernlipide aus *Methanococcoides burtonii* wurde der SPE-SCX-Säulentrennung unterzogen. Für die Trennung von ungesättigtem und gesättigtem C₂₀-C₂₀-Archaeol wurde das Verfahren für die Trennung von gesättigten (SATFA), einfach ungesättigten (MUFA) und mehrfach ungesättigten (PUFA) Fettsäuren mit der SPE-SCX-Säule gemäß Zelles und Bai (1993) angewendet (Tab. 10). Die jeweiligen Fraktionen wurden nach TMSI-Derivatisierung am GC/MS untersucht. Demnach wurde gesättigtes C₂₀-C₂₀-Archaeol ausschließlich in einer einzigen Fraktion erhalten, wohingegen ungesättigtes Archaeol in geringer Konzentration in derselben Fraktion, als auch in jener erhalten wurde, in der normalerweise die mehrfach ungesättigten Fettsäuren eluieren. D.h., mit diesem Protokoll konnte keine Trennung dieser beiden Gruppen von Archaeolen erreicht werden.

Nach neueren Erkenntnissen von Summons et. al. (1998) und nach einer persönlichen Mitteilung von P. Nichols ist Peak 3 in Abb. 18 nicht auf ungesättigtes C₂₀-C₂₀-Archaeol zurückzuführen. Vielmehr handelt es sich dabei um ein Hydroxyarchaeol-Artefakt, nachdem durch saure Hydrolyse die polare Gruppe des PLEL abgespalten und das Kernlipid Hydroxyarchaeol in seiner Struktur verändert wurde. Dies sei auch der Fall bei dem vermeintlichen ungesättigtem C₂₀-C₂₀-Archaeol in *Halobacterium lacusprofundi* (Franzmann et al., 1988) und möglicherweise auch in *Haloferax mediterranei* (Moldoveanu et al., 1990), heißt es in einer persönlichen Mitteilung von P. Nichols. Aufgrund

dieser neuen strukturchemischen Untersuchungen kann gefolgert werden, daß *Methanococoides burtonii* kein ungesättigtes PLEL enthält, was auch von Koga *et al.* (1998) bestätigt wurde.

Bisher ist in keinem anderen Archaeum über die Existenz von ungesättigten PLEL berichtet worden. Dennoch ist es nicht auszuschließen, daß bisher nicht kultivierte Archaeen mit ungesättigten Etherlipiden in Böden vorkommen.

Tabelle 10: Schema zur Trennung von gesättigtem und ungesättigtem C₂₀-C₂₀-Archaeol aus *Methanococoides burtonii*

Arbeitsschritt	Lösungsmittel	Mischungsverhältnis (v/v)	Volumen	Eluierte Fraktion	Intensität
Konditionierung	AgNO ₃ in Acetonitril-Wasser gelöst	0,1 g AgNO ₃ in 1,5 ml Acetonitril:Wasser (10:1, v/v)	1	---	---
Konditionierung	Acetonitril	---	2	---	---
Konditionierung	Aceton	---	2	---	---
Konditionierung	Dichlormethan	---	4	---	---
Probenauftrag	Probe gelöst in Dichlormethan:Hexan (7:3)	---	< 1	---	---
Elution	Dichlormethan:Hexan	7:3	2	n.d.	---
Elution	Dichlormethan:Aceton	9:1	2	gesättigtes Archaeol unges. Archaeol	+++ +
Elution	Aceton:Acetonitril	9:1	4	unges. Archaeol	+

3.1.1.4. Qualitative Bestimmung von PLEL in Bodenextrakten

Bei der qualitativen Bestimmung von PLEL in Bodenextrakten ging es zum einen um die Anwendbarkeit der selektiven Seitenkettenbestimmung und zum anderen um den Erhalt von Referenzspektren, die so in den bisherigen Untersuchungen von Reinkulturen noch nicht erhalten werden konnten, bzw. auch anderweitig noch nicht in Reinkulturen nachgewiesen worden sind.

Mischextrakt für Testzwecke

Es wurde ein Mischextrakt aus zuvor gewonnenen Phospholipiden hergestellt. Diese Phospholipidextrakte stammten aus unterschiedlichen, vorwiegend anoxischen, stark humosen Bodenökosystemen, um eine möglichst große Bandbreite an Bodenarten bzw. -typen, Klimabedingungen, etc. abzudecken. Es wurde jene Menge Extrakt hergestellt, die einem Trockenboden von 368 g entsprach.

Die Anteile setzten sich folgendermaßen zusammen: 184 g bzw. 50% der Phospholipide stammten aus chinesischem Reisfeldboden (Bai *et al.*, 2000), 92 g bzw. 25% der Phospholipide kamen aus hydromorphen Böden (Niedermoor, Moorgley, Auengley) des Allgäus (Wachinger *et al.*, 2000) und weitere 92 g TS-Äquivalent Phospholipide aus der November-Probenahme des Standorts Donau-moos (Referenzfläche und überstaute Becken).

Abtrennung der polaren Gruppe

Wie bei den Reinkulturen wurde auch hier die polare Gruppe des Phospholipidmoleküls (Phosphorsäure, Phosphoethanolamin, Phosphoinositol, etc.) vor der Etherspaltung von dem Glycerin-Gerüst abgetrennt. Dies ist besonders in Proben vorteilhaft, deren Lipid-Zusammensetzung unbekannt ist und man sicherstellen will, daß die abgetrennten Kohlenwasserstoffe nur von den Seitenketten der Kernlipide stammen. Dadurch, daß in Vorversuchen die Hydrolyse mit 1 M KOH, wie zuvor an Reinkulturen erfolgreich angewendet, zu Problemen bei der Phasentrennung in Bodenextrakten aus organischen Böden führte, wurde stattdessen eine saure Hydrolyse durchgeführt, so wie sie zuvor bei der Gewinnung der Kernlipiden aus *Methanococcoides burtonii* angewendet wurde. Außerdem fand sie Verwendung in PLEL-Bestimmungen in Umweltproben (Bai und Zelles, 1997; Bai *et al.*, 2000).

SPE-Säulentrennung

Hierzu wurde das zuvor an Reinkulturen entwickelte Trennungsprotokoll verwendet (vgl. Tab. 9) und dazu ein Aliquot des Extrakts nach der sauren Hydrolyse auf die entsprechenden Säulen aufgetragen.

Tabelle 11: Elutionsschema für die Trennung von Etherlipiden aus Bodenextrakten

Arbeitsschritt	Elutionsmittel (Petrolether:Diethylether)	Reservoir- volumen	Eluierte Fraktion
Konditionierung	85:15	1	---
Probenauftrag	Probe gelöst in Petrolether : Diethylether (85:15)	≤ 1	---
Elution	85:15	1	Archaeol, Hydroxyarchaeol-Artefakt
Elution	6:4	1	Archaeol, Hydroxyarchaeol-Artefakt
Elution	1:1	1	---
Elution	4:6	1	Caldarchaeole
Elution	15:85	2	Caldarchaeole

Die eluierten Substanzen bzw. Fraktionen wurden durch Seitenkettenbestimmung bzw. nach TMSI-Derivatisierung am GC/MS identifiziert.

Demnach wurde, wie aus Tab. 11 hervorgeht, das Hydroxyarchaeol-Artefakt zusammen mit Archaeol eluiert. Gründe für die Koelution von Archaeol und dem Hydroxyarchaeol-Artefakt sind in der Verwendung des anderen Hydrolyseverfahren zu suchen: Wurde zuvor in Reinkulturen die polare Gruppe der PLEL durch 1 M KOH abgespalten, so mußte für Bodenextrakte, aufgrund der oben genannten Gründe, eine saure Hydrolyse angewendet werden, welche das Kernlipid Hydroxyarchaeol jedoch in der Gestalt veränderte (Hydroxyarchaeol-Artefakt), daß es an Polarität gegenüber dem C₂₀-C₂₀-Archaeol verlor und mit den gleichen Lösungsmitteln von der SI-Säule heruntergewaschen wurde.

Um eine exakte Trennung zwischen Hydroxyarchaeol und Archaeol auf der Basis einer Festphasenextraktion zu erreichen, ist es notwendig das Protokoll der sauren Hydrolyse zu optimieren. Einerseits muß dieses für stark humose Proben geeignet sein, und andererseits darf die OH-Gruppe des Hydroxyarchaeols dabei nicht zerstört werden. Das Konzept der selektiven Seitenkettenbestimmung von Phospholipid-Etherlipiden in Bodenextrakten (s. Abb. 17) ist aufgrund dieser Sachverhalte nicht weiter verfolgt worden.

Bestimmung der Etherlipid-Seitenketten

Ein Aliquot des Bodenextrakts entsprechend einer Bodeneinwaage von 31 g TS wurde nach der sauren Hydrolyse direkt der Etherspaltung und der reduktiven Dehalogenierung gemäß Kap. 2.5.6.2 unterzogen und am GC/MS gemessen. Als interner Standard wurde zuerst 100 µl 0,37 M Nonadecan (C₁₉-Alkan) eingesetzt. Dadurch, daß bei der Auswertung deutlich mehr von dieser Verbindung nachgewiesen wurde, als durch Zugabe des internen Standards enthalten sein durfte, konnte daraus geschlossen werden, daß Nonadecan aus Bodenlipiden stammte. Daher wurde im Anschluß das Experiment wiederholt und statt Nonadecan 100 µl 19:0 FAME (0,32 M) als interner Standard hinzugefügt.

Identifizierung der Kohlenwasserstoffe

Im Mittel der drei Versuchswiederholungen traten rund 150 Peaks im Totalionenchromatogramm auf. Mit Hilfe von Vergleichsspektren aus der Literatur (Gelpi *et al.*, 1969; Han und Calvin, 1969;

Spiteller und Spiteller, 1973) und der HP ChemStation kompatiblen Spektrenbibliothek NIST (Hewlett Packard, 1989) konnten insgesamt 63 aliphatische Kohlenwasserstoffe festgestellt werden. Diese wurden in die Spektrenbibliothek für ethergebundene Kohlenwasserstoffe eingetragen.

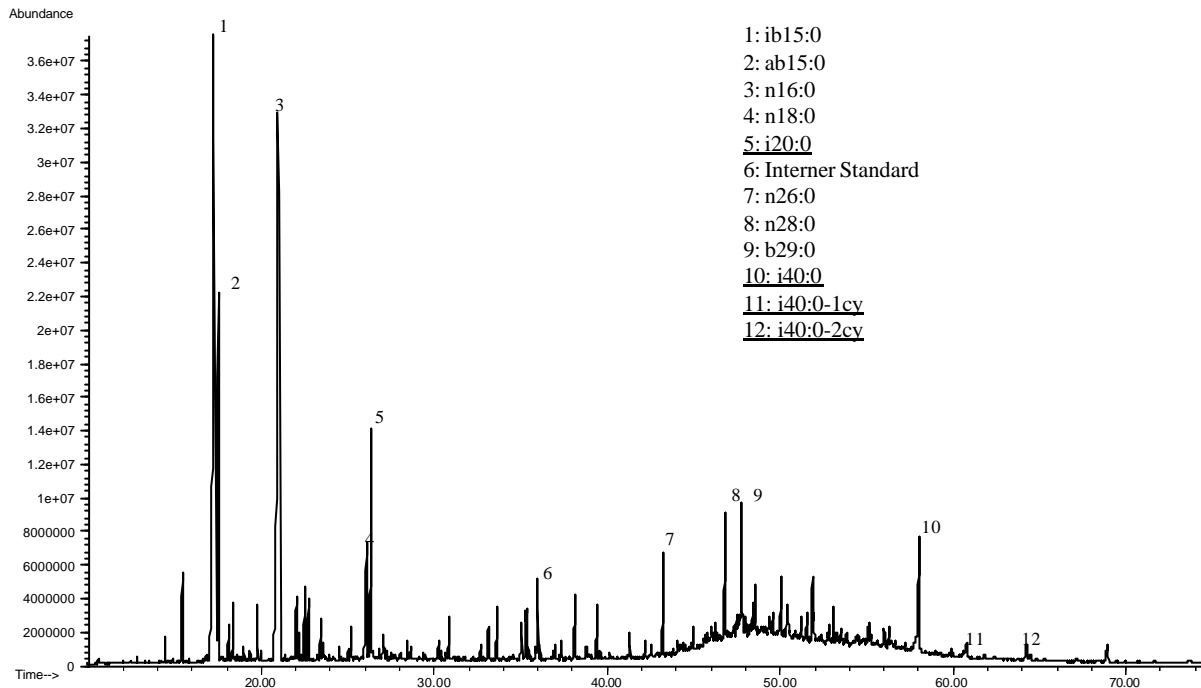


Abbildung 19: TIC von PLEL-Kohlenwasserstoffen aus dem Bodenmischextrakt

Es sind nicht die ethergebundenen Isoprenoide (i20:0, i40:0, i40:0-1cy, i40:0-2cy), welche die größten Peaks bildeten (Abb. 19), sondern einfach verzweigtes (iso-branched) Pentadecan (ib15:0) und *n*-Hexadecan (n16:0). Legt man für alle identifizierten aliphatischen Kohlenwasserstoffe den für *n*-Hexadecan ermittelten Response-Faktor von 2,447 zugrunde, so setzten sich die PLEL des Mischextrakts, wie in Abb. 20 dargestellt, zusammen.

Insgesamt wurden rund 208.000 nMol aliphatische Kohlenwasserstoffe pro kg TS gemessen, wovon die verzweigten und die geradkettigen mit 98.000 bzw. 78.000 nmol kg⁻¹ TS den größten Anteil ausmachten. Isoprenoid-verzweigte Verbindungen wurden in einer Konzentration von rund 17.000 nmol kg⁻¹ TS nachgewiesen. Neben den zuvor in Reinkulturen bestimmten isoprenoid-verzweigten Kohlenwasserstoffen konnte das C₁₉-Isoprenoid Pristan (i19:0), das C₂₅-Isoprenoid Squalan (i25:0) und eine unbekannte Verbindung detektiert werden, die dem Zerfallspektrum und der relativen Retentionszeit eines von Vink *et al.* (1998) nachgewiesenen 10-Ethyl-2,6,15,19-Tetramethylcosan (C₂₆-Isoprenoid: i26:0) stark ähnelte.

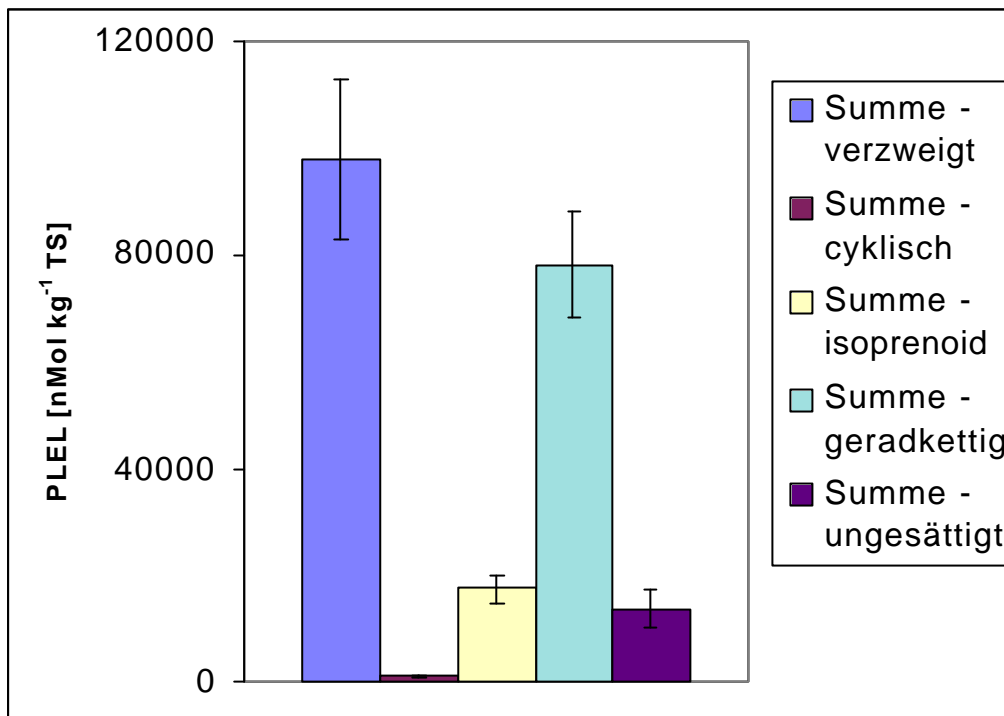


Abbildung 20: Zusammensetzung der PLEL des Testbodens

Untersuchungen der polaren Lipidfraktion

Es stellt sich nun die Frage, woher diese aliphatischen Kohlenwasserstoffe kommen, die neben den Isoprenoiden bei der PLEL-Seitenkettenbestimmung (Abb. 19 und Abb. 20) auftraten. Daher wurde die polare Lipid- sprich, die Phospholipidfraktion des Mischextrakts untersucht, ob:

- A) Spuren von freien, nicht gebundenen Kohlenwasserstoffe in ihr enthalten sind
- B) leicht hydrolysierbare Phospholipide Verbindungen freisetzen, die nach reduktiver Dehalogenierung mit Zn/Eisessig zu aliphatischen Kohlenwasserstoffen reagieren.

Zusätzlich wurde untersucht, ob

- C) ein Phospholipid Standard, basierend auf Esterbindungen und
- D) ein Gemisch aus freien Fettsäuremethylestern (FAME) bei der PLEL-Seitenkettenbestimmung aliphatische Kohlenwasserstoffe liefern.

Vorgehensweise

- A) Ein Aliquot der Phospholipidfraktion des "Mischextrakts für Testzwecke", wurde entsprechend 5 g TS direkt in den GC/MS injiziert.

B) Ein Aliquot des Phospholipidextrakts entsprechend 10 g TS wurde zuerst der sauren Hydrolyse und danach der reduktiven Dehalogenierung unterzogen und entsprechend am GC/MS gemessen.

C) 25 mg 1,2 Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SIGMA P9671) wurden in 5 ml Methanol gelöst, davon 50 µl zur Untersuchung entnommen.

D) Es wurden jeweils 50 µl der folgenden FAME-Standardlösungen (SIGMA) entnommen und zusammen in ein Aufschlußglas pipettiert: 16:0 (5 mg/ml in Hexan), 18:0 (5 mg/ml in Hexan), 16:1,c9 (5 mg/ml in *i*-Octan), 18:1,c11 (5 mg/ml in *i*-Octan).

Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Extrakte aus C) und D) der Etherspaltung und der reduktiven Dehalogenierung unterzogen.

Alle Untersuchungen erfolgten jeweils in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Ergebnisse

Weder bei Untersuchung A) noch bei Untersuchung B) konnten aliphatische Kohlenwasserstoffe über die Spektrenbibliothek für PLEL-Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. Untersuchung A) ergab im Mittel von drei Wiederholungen lediglich Spuren von *n*-Hexadecan (Abb. 21: Peak bei 20,66 min), die jedoch, aufgrund der geringen Konzentration, höchstwahrscheinlich auf Kontamination zurückzuführen sind.

Bei Untersuchung B) wurden im Mittel von drei Wiederholungen rund 150 Peaks registriert (Abb. 22). Die Auswertung der Spektren ergab, daß die Mehrzahl dieser Peaks, so zum Beispiel der Peak bei 28,85 min (Abb. 23), auf nicht-hydroxysubstituierte Fettsäuremethylester (= UNSFA) zurückzuführen sind. D.h., daß nach der sauren Hydrolyse hydroxy- und nicht-hydroxysubstituierte FAME freigesetzt und durch die Reaktion mit Zn und Eisessig zur niedrigsten Oxidationsstufe hydriert bzw. reduziert wurden.

Aus den Untersuchungen A) und B) kann also gefolgert werden, daß die mit der PLEL-Seitenkettenbestimmung erfaßten Kohlenwasserstoffe nicht von freien Kohlenwasserstoffen aus der Phospholipidfraktion des Bodenextraktes stammen. Außerdem werden die durch saure Hydrolyse freigesetzten Seitenketten durch anschließende Reduktion bzw. Hydrierung nicht zu Kohlenwasserstoffen, sondern vorwiegend zu Fettsäuren umgewandelt.

Weder nach Untersuchung des Extrakts aus C) noch des Extrakts aus D) konnten aliphatische Kohlenwasserstoffe mit der Spektrenbibliothek für PLEL-Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. Die in beiden Chromatogrammen (Abb. 24 und Abb. 25) detektierten Substanzen sind auf nicht-aliphatische Verunreinigungen (z.B. Phthalate) zurückzuführen. Es ist zu vermuten, daß Fettsäuren

bereits durch die Einwirkung von Jodwasserstoffsäure bei 100°C zerstört werden. Aus diesen beiden Untersuchungen kann also gefolgert werden, daß weder aus Acylphospholipiden noch aus freien FAME durch Etherspaltung und Reduktion Kohlenwasserstoffe entstehen.

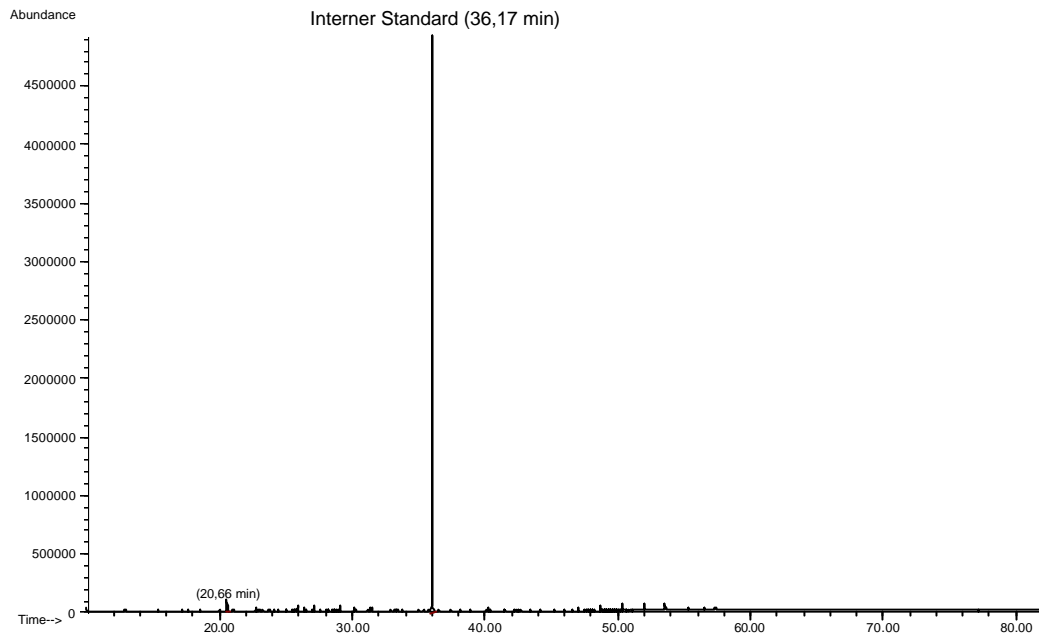


Abbildung 21: Totalionenchromatogramm (TIC) der Phospholipidfraktion aus dem Bodenmischextrakt

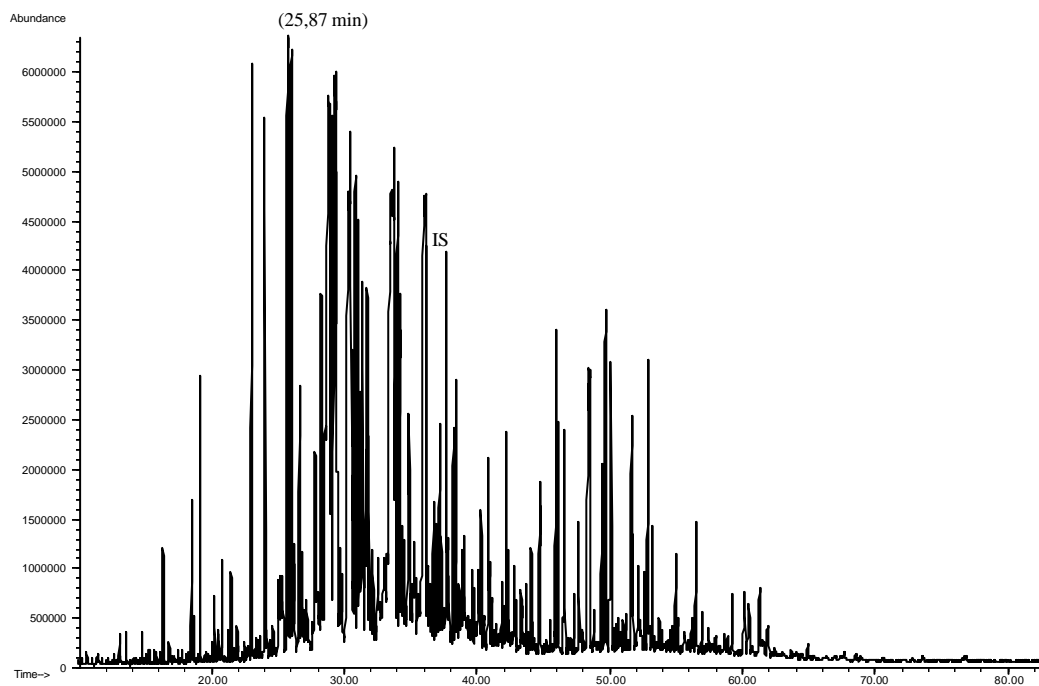


Abbildung 22: TIC des Bodenmischextrakts nach saurer Hydrolyse und reduktiver Dehalogenierung.
IS = Interner Standard

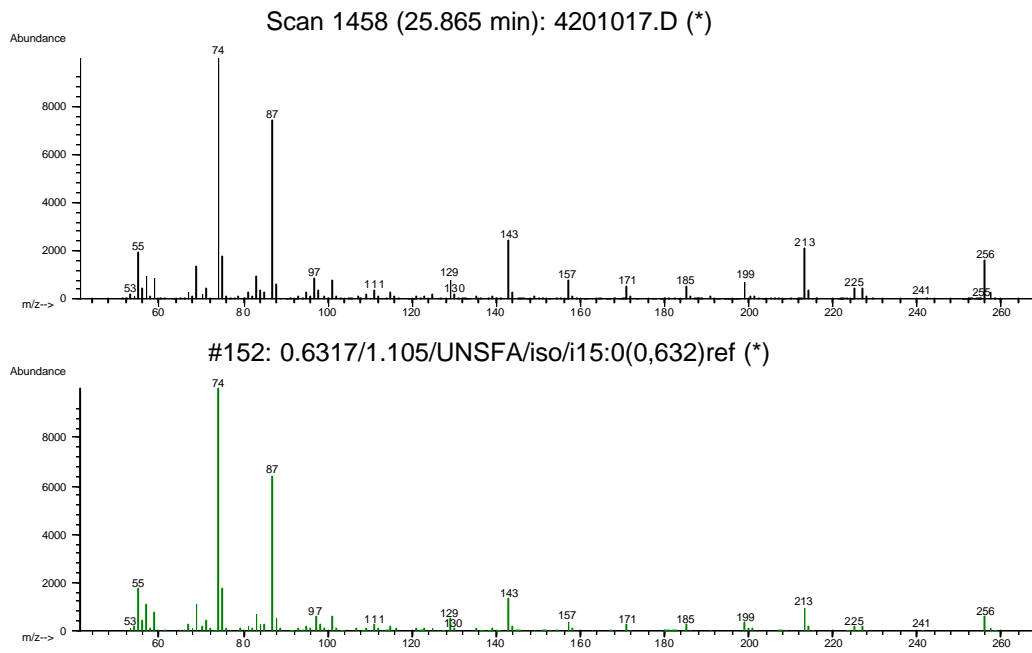


Abbildung 23: Massenspektrum von gesättigtem i15:0 Fettsäuremethylester

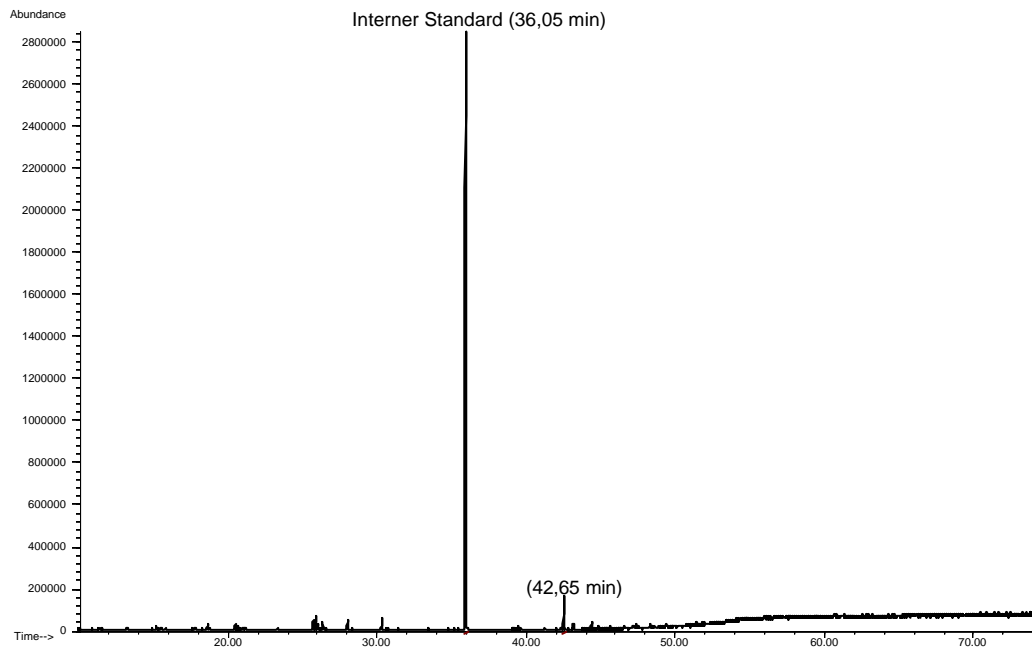


Abbildung 24: TIC von 1,2 Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine nach Etherspaltung und reduktiver Dehalogenierung

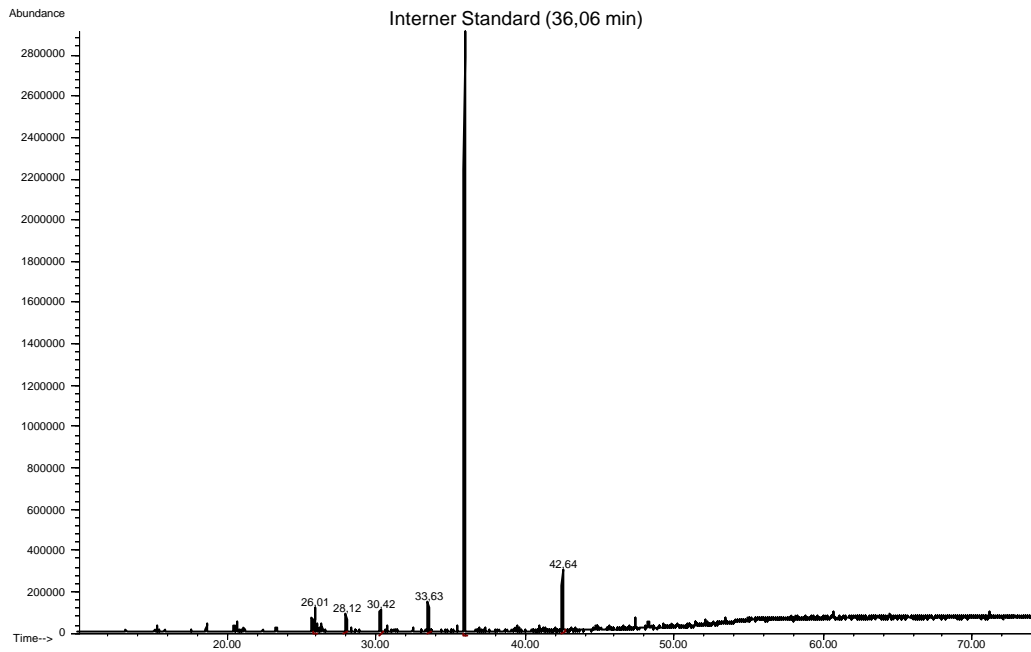


Abbildung 25: TIC eines FAME-Gemisches nach Etherspaltung und reduktiver Dehalogenierung

Charakterisierung der Kernlipide mittels LC/MS

Während mit Etherspaltung/reduktiver Dehalogenierung und Messung am GC/MS die Seitenketten der Etherlipide nachgewiesen werden, liefert die Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) Aussagen über die Größe der Ausgangsmoleküle, sprich der Kernlipide. Die schonende Ionisierung ermöglicht die Bestimmung der Molekülmasse.

Ein Aliquot des Bodenextrakts (= 15 g TS) wurde nach der sauren Hydrolyse mittels Hamilton-Spritze in die HPLC-Säule des Finnigan LCQ injiziert und anschließend der Bodenextrakt in ca. 80 Peaks getrennt (Abb. 26), von denen 10 durch zusätzliche Ionisation (ms^2 oder MS/MS), bzw. durch den Vergleich mit aufgereinigten Etherlipiden aus *Methanosarcina barkeri* und *Sulfolobus solfataricus* identifiziert werden konnten. Nach 5,85 min (s. Abb. 26) konnte ein C_{15} -Hydroxymonoether (Hydroxypentadecylglycerol, s. Tab. 12) nachgewiesen werden. Die aus der zweifachen Ionisation erhaltenen Fragmente und die korrespondierenden Molekülstrukturen sind in Abb. 27 dargestellt. Nach 6,52 min wurde ein C_{16} -Diether nachgewiesen, dessen Identität neben der Fragmentation durch den Vergleich mit einem C_{16} -Diether-Standard belegt werden konnte.

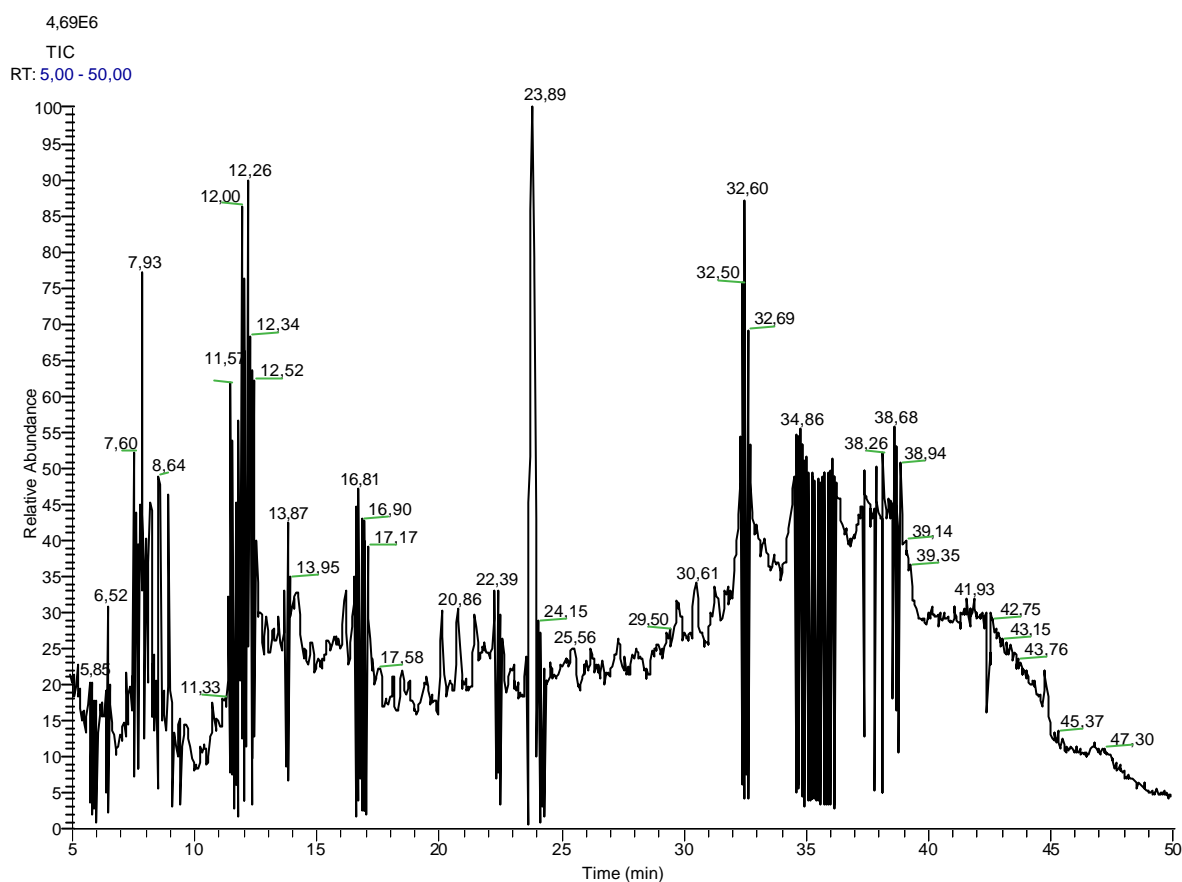


Abbildung 26: Auftrennung der PLEL-Kernlipide aus dem Bodenmischextrakt mittels LC/MS

C_{20} - C_{20} -Archaeol eluierte nach 11,57 min und konnte durch das Monoether-Fragment (Abb.28) eindeutig identifiziert werden. Caldarchaeole (azyklische + zyklische) eluierten nach 23,89 min lieferten allerdings nach zweifacher Anregung (ms^2) keine Ionenfragmente (Tab. 12). Die Molekülionen und auch die Retentionszeiten der jeweiligen Verbindungen wurden durch den Vergleich von Caldarchaeolen aus *Sulfolobus solfataricus* bestimmt, so daß eine Identifizierung gewährleistet war.

Mit der LC/MS-Bestimmung konnten einige Strukturen identifiziert werden (Tab. 12), die nach Etherspaltung im TIC der GC/MS-Analyse signifikante Peaks von C_{15} -, C_{16} -, C_{25} -, C_{30} -Seitenketten, sowie von Isoprenoiden mit den Kettenlängen C_{20} und C_{40} hervorbrachten. Aufgrund fehlender Fragmentationen bzw. fehlender Standardsubstanzen konnte hier nicht gezeigt werden, ob es sich bei den Seitenketten mit den Kettenlängen C_{15} -, C_{25} und C_{30} um n -Alkane oder einfachverzweigte Kohlenwasserstoffe handelte. Diese kommen als potentielle Seitenketten der in vergleichsweise hohen Konzentrationen auftretenden ib15:0 (iso-branched), ab15:0 (anteiso-branched), n16:0, n25:0 und n30:0 Kohlenwasserstoffe im TIC in Abb. 19 in Frage. Es bleibt offen, aus welchen Molekülstrukturen z.B. die Kohlenwasserstoffe n18:0, n26:0 und n28:0 stammen. Eine weiter-

führende LC/MS/MS-Untersuchung mit einem noch präziser abgestimmten HPLC-Trennungprotokoll könnte in diesem Zusammenhang weitere, bislang noch nicht in Bodenextrakten detektierte Etherlipide zum Vorschein bringen.

Tabelle 12: Darstellung der über LC/MS bzw. LC/MS/MS identifizierten Etherlipide

Peak (min)	Chemische Struktur	m/z [M+H]	Fragmentation durch "Full ms ² " (m/z)	Länge der Seitenkette	Relative Intensität
5,85	Hydroxypentadecylglycerol	321	285, 303	C ₁₅	20
6,52	Dihexadecylglycerol	541	317	C ₁₆	31
11,57	Archaeol	653	373	C ₂₀	61
12,52	Pentacosanyltricosanyl-glycerol	863	---	C ₂₅ & C ₃₀	64
23,89	Caldarchoel	1301	---	C ₄₀	81
23,95	Caldarchoel-1cy	1299	---	C ₄₀	9
24,04	Caldarchoel-2cy	1297	---	C ₄₀	8
24,19	Caldarchoel-3cy	1295	---	C ₄₀	28
24,24	Caldarchoel-4cy	1293	---	C ₄₀	18
24,29	Caldarchoel-5cy	1291	---	C ₄₀	7

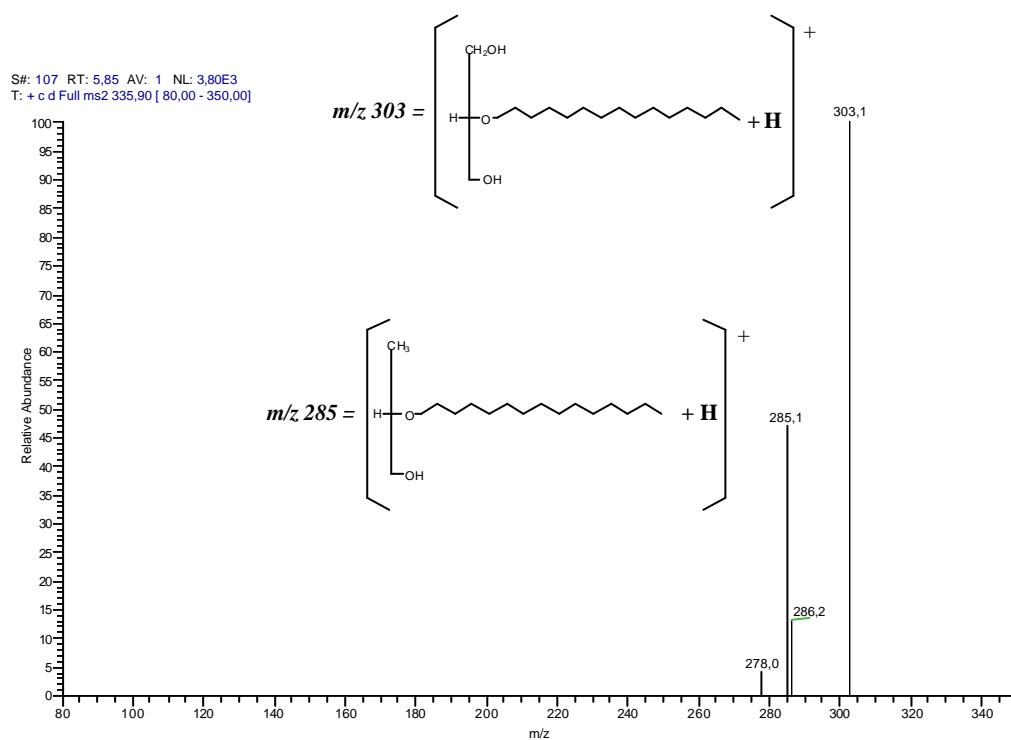


Abbildung 27: Fragmentation eines C₁₅-Hydroxymonoethers. Fragment m/z 303 wurde nach Abspaltung von H₂O von der Alkylkette des „Moleküliions+H“ (M+H)⁺ erhalten. Fragment m/z 285 entstand nach Abspaltung von H₂O vom Glyceringerüst des Fragments m/z 303

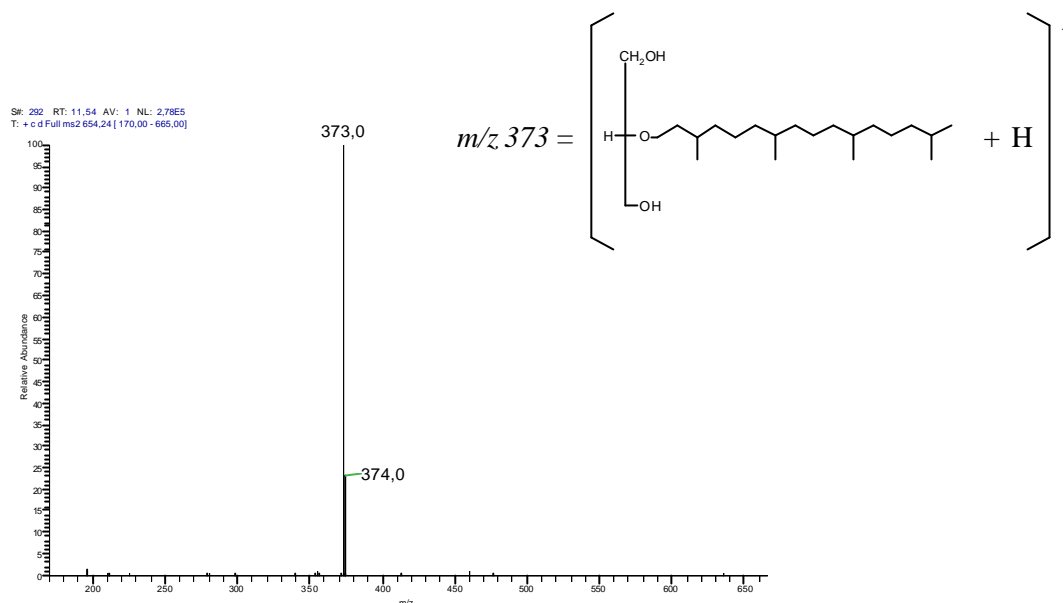


Abbildung 28: Fragmentation von Archaeol. Fragment $m/z\ 373$ stellt ein Monoether dar, entstanden nach Abspaltung der Phytanylkette von C_{20} - C_{20} -Archaeol

3.1.1.5. Quantifizierung der aus den Phospholipid-Etherlipiden freigesetzten Kohlenwasserstoffe

Ermittlung von Responsefaktoren

Aus einer definierten Mischung an aliphatischen Kohlenwasserstoffen (New Jersey TRPH Mix, Promochem) mit geradzahigen Kohlenwasserstoffketten von C_{12} bis C_{40} sowie den beiden Isoprenoiden Pristan und Phytan (i19:0 und i20:0) wurden Responsefaktoren experimentell ermittelt und dabei zu den drei New Jersey TRPH-Replikaten jeweils 100 μl 19:0 FAME pipettiert. Um sowohl die Streuung, verursacht durch das Pipettieren als auch verursacht durch das GC/MS System zu minimieren, wurde jedes der drei Untersuchungsgläschen dreimal am GC/MS gemessen, anschließend die ermittelten Responsefaktoren für die jeweiligen Substanzen in die Spektrenbibliothek aufgenommen (Tab. 13).

Jeder neue Eintrag in die Spektrenbibliothek, unabhängig davon, ob diese Substanz aus Reinkulturen oder aus Bodenproben stammte, bekam einer der obigen Faktoren zugeordnet. Dabei wurde der Faktor jener Kohlenwasserstoffkette aus Tab. 13 ausgewählt, deren relative Retentionszeit der neu aufzunehmenden Substanz am Nächsten stand.

Tabelle 13: Ermittelte Responsefaktoren für die Quantifizierung der PLEL-Seitenkettenbestimmung

Substanz	Molmasse [g]	Einwaage [ng 100µl ⁻¹]	Konzentration [nMol 100 µl ⁻¹]	Responsefaktor	SD [%]
19:0 FAME	312	10000,00	32,05	1,000	0,00
n12:0 ^a	170	19900,08	117,06	3,050	3,65
n14:0	198	19820,16	100,10	2,529	2,52
n16:0	226	19780,20	87,52	2,407	3,21
n17:0	240	19989,34	83,29	2,214	2,70
i19:0 ^b	268	19938,92	74,40	1,858	4,00
n18:0	254	20039,84	78,90	1,837	1,71
i20:0	282	19730,81	69,97	1,564	1,95
n20:0	282	20039,94	71,06	1,808	1,40
n22:0	310	19837,90	63,99	1,663	0,76
n24:0	338	19601,68	57,99	1,629	0,10
n26:0	366	20019,88	54,70	1,613	0,99
n28:0	394	19467,90	49,41	1,517	1,07
n30:0	422	19929,28	47,23	1,572	0,48
n32:0	450	19596,22	43,55	1,578	1,60
n34:0	478	18624,69	38,96	1,833	0,04
n36:0	506	20815,40	41,14	2,429	0,22
n38:0	534	18825,40	35,25	3,017	0,06
n40:0	562	20018,73	35,62	4,092	2,54

^a n12:0 bedeutet: n-Alkan mit C₁₂-Kette ohne Doppelbindung

^b i19:0 bedeutet: Isoprenoid-Kohlenwasserstoff mit C₁₉-Kette ohne Doppelbindung

Bestimmung der Ausbeute bei der PLEL-Seitenkettenbestimmung

Wird die PLEL-Methode zur Abschätzung der Populationsgröße von Archaeen im Ökosystem angewendet, so ist die Ausbeute der PLEL-Seitenkettenbestimmung von großer Bedeutung.

Vorgehensweise

Hierzu wurde eine Stammlösung von 1,2 Di-*O*-hexadecyl-rac-glycero-3-phosphocholine (SIGMA P3777) hergestellt ($c=1\text{mg ml}^{-1}$ in Chloroform). Die beiden ethergebundenen Seitenketten dieses Phospholipids bestehen aus *n*-Hexadecan (n16:0, bzw. C₁₆H₃₄). Folgende Konzentrationsstufen wurden in dreifacher Wiederholung angesetzt:

- 1) 100 μl Stammlösung entsprechend 284 nMol Hexadecan
- 2) 200 μl Stammlösung entsprechend 568 nMol Hexadecan
- 3) 500 μl Stammlösung entsprechend 1420 nMol Hexadecan

Diese Untersuchungslösungen wurden der Etherspaltung und der reduktiven Dehalogenierung unterzogen. Die Quantifizierung an freigesetztem Hexadecan erfolgte mittels GC/MS unter Verwendung von 19:0 FAME als internen Standard und dem zuvor ermittelten Responsefaktor von 2,407.

Ergebnisse

Aus Konzentrationsstufe 1) wurden durchschnittlich 211,6 nMol Hexadecan erhalten (= 74,5% Ausbeute), aus Konzentrationsstufe 2) durchschnittlich 398,7 nMol (= 70,2% Ausbeute) und aus Stufe 3) konnten durchschnittlich 870,5 nMol Hexadecan, entsprechend einer Ausbeute von 61,3%, nachgewiesen werden (Abb. 29).

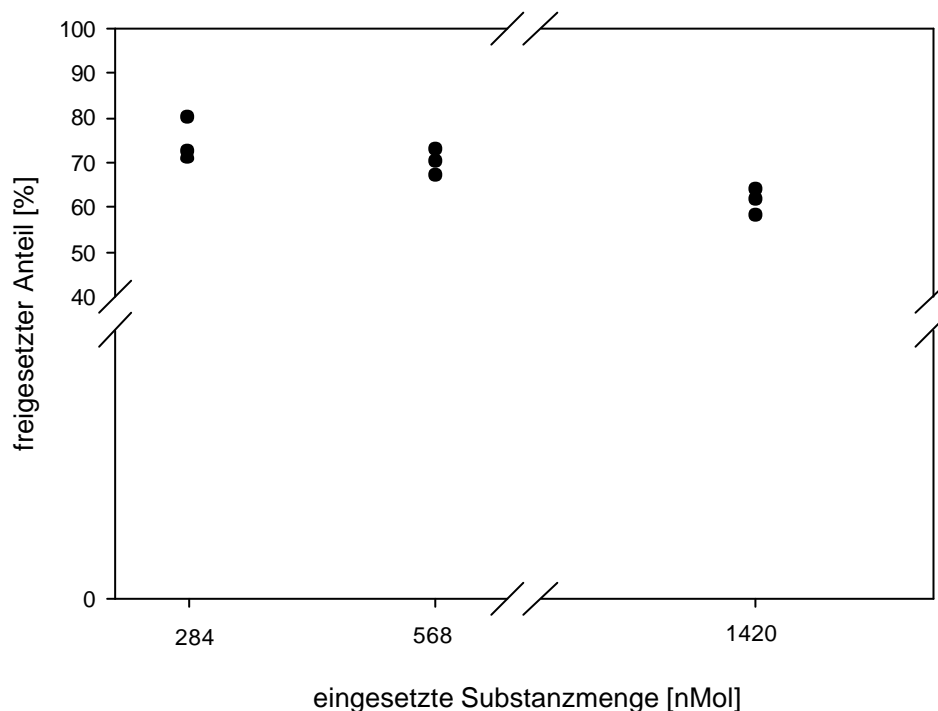


Abbildung 29: Ausbeute an freigesetztem Hexadecan nach Etherspaltung/reduktiver Dehalogenierung

Es zeigte sich, daß sich die Ausbeute mit zunehmender Konzentration an PLEL-Standard verringerte. Als Gründe dafür können genannt werden: a) Die nachlassende Effizienz der Etherspaltung und / oder der reduktiven Dehalogenierung und b) einen sich mit zunehmender Konzentration an Hexade-

can ändernden Responsefaktor bei der GC/MS-Analyse. Daß gemäß Ursache a) bei einer PLEL-Konzentration von 1420 nMol Hexadecan-Äquivalenten nicht mehr genügend Etherbindungen gespalten wurden, bzw. nicht genügend Alkyljodide reduziert werden konnten, ist eher unwahrscheinlich. In den beiden Originalarbeiten, auf welchen die PLEL-Seitenkettenbestimmung beruht, wurde für eine wesentlich größere Einwaage an Etherlipiden nur ein Drittel bzw. die Hälfte an Reagenzien eingesetzt (s. Kates *et al.*, 1965 und Panganamala *et al.*, 1971). Außerdem wurde im vorliegenden Experiment kein Hexadecyljodid nachgewiesen, was einen unvollständigen Reaktionsverlauf ausschließen läßt. Schomburg (1987) empfiehlt für gaschromatographische Untersuchungen bei der Verwendung der "internen-Standard-Methode" eine Substanz aus der gleichen chemischen Stoffgruppe als internen Standard heranzuziehen, um etwaige Unregelmäßigkeiten bei den Signalausprägungen durch die GC-, bzw. GC/MS-Analyse zu minimieren. Das würde bedeuten, daß n19:0 Alkan dem hierbei verwendeten 19:0 FAME vorzuziehen ist. Jedoch wurden im Testbodenextrakt in Kap. 3.1.1.4 auch signifikante Mengen an ethergebundenem n19:0 Alkan nachgewiesen, was wiederum zu Fehlern bei der Quantifizierung führt, wenn die gleiche Substanz auch als IS hinzugegeben wird. Mori und Koga (1993) erzielten mit einer anderen PLEL-Bestimmungsmethode (Etherspaltung mit HI und Reduktion mit LiAlH_4) bei *Methanobacterium thermoautotrophicum* eine Ausbeute an ethergebundenen Isoprenoiden von durchschnittlich 80,5%, allerdings wurden in dieser Arbeit keine verschiedenen Konzentrationsstufen an PLEL verglichen. Es ist in diesem Zusammenhang nicht auszuschließen, daß die Konzentrationsstufen 2) und 3) in der vorliegenden Arbeit sich am Rande, bzw. außerhalb der, für das Meßsystem zugrunde liegenden Linearität zwischen Konzentration und Signalausprägung befanden und dies die Ursache für die geringeren Ausbeuten bei den Konzentrationsstufen 2) und 3) im vorliegenden Experiment darstellte.

In Kap. 3.1.1.4 wurden ethergebundene Isoprenoide in einer Konzentration von rund $17,3 \text{ nMol g}^{-1}$ TS Boden bestimmt. Das bedeutet, daß bei der eingesetzten Bodeneinwaage von 31 g TS 536,3 nMol Isoprenoide erhalten wurden. Diese Substanzmenge befindet sich in dem Bereich, in dem, nach Abb. 29, die Ausbeute an freigesetzten Kohlenwasserstoffketten zwischen 75 und 70% variierte.

Um in den nachfolgenden Untersuchungen eine hohe Ausbeute, bzw. eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der PLEL-Bestimmung zu gewährleisten, wurden immer die gleichen Mengen an TS-Äquivalenten für die Untersuchungen von Reinkulturen ($\approx 25 \text{ mg}$) und Bodenproben ($\approx 12,5 \text{ g}$) eingesetzt.

Computer gestützte Auswertung mit der HP ChemStation

Identifizierung und Quantifizierung von PLEL-Kohlenwasserstoffen wurden mit dem gleichen Softwarepaket wie für die Bestimmung der PLFA ausgewertet. Dieses Programm zieht zur Peak-Erkennung Kohlenwasserstoff-Spektren und Retentionszeit aus der Vergleichsbibliothek "alk320" heran, die aus Standardsubstanzen, Reinkulturen und Bodenextrakten gewonnenen Einträgen besteht und je nach Situation präzisiert und erweitert werden kann.

3.1.2. Quantitative Bestimmung von PLEL und PLFA in ausgewählten mikrobiellen Reinkulturen

Das Ziel dieses Ansatzes bestand darin von einer Auswahl von Reinkulturen quantitative Lipid-Profile zu erstellen.

Einerseits sollten in diesem Zusammenhang Archaeen auf ihre quantitative PLEL-Zusammensetzung untersucht werden, um daraus etwaige Faktoren für die Umrechnung von Zellzahlen abzuleiten. Andererseits sollte die Eignung der neu entwickelten Bestimmungsmethode von PLEL-Biomarker und die etablierte Methode der PLFA-Bestimmung zur taxonomischen Differenzierung von mikrobiellen Gemeinschaften untersucht werden, bevor diese Methoden bei der Untersuchung von Bodenökosystemen Anwendung finden.

3.1.2.1. PLEL-Zusammensetzung

Die Untersuchungen basierten auf insgesamt neun Archaeen, wobei es sich um acht Organismen der Gruppe *Euryarchaeota* und bei *Sulfolobus solfataricus* (SUS) um einen Vertreter der *Crenarchaeota* handelte. Die Lipide von vier Archaeen wurden sowohl nach der Methode von Collins (1980; Extraktion A) als auch nach Bai und Zelles (1997; Extraktion B) extrahiert (s. Kap. 2.5.2). Tabelle 14A zeigt die Zusammensetzung an ethergebundenen Isoprenoiden in den jeweiligen Organismen.

Tabelle 14A: i-PLEL-Zusammensetzung [$\mu\text{Mol g}^{-1}$ TS] in ausgewählten Archaeen (jeweils $n = 3$)

Biomarker	Euryarchaeota										Crenarchaeota
	<i>M.coccus jannaschii</i> MCJ A B	<i>Halobacterium halobium</i> HAB A B	<i>M.sarcina mazel</i> MSM A B	<i>M.thermus fervidus</i> MTF A B	<i>M.bacterium therm.</i> MBT A	<i>M.pyrus kandleri</i> MPK A	<i>M.sarcina vacuolata</i> MSV B	<i>M.sarcina barkerii</i> MSB B	<i>Sulfolobus solfataricus</i> SUS C ²		
i15:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
i20:0	3,22 ^a	4,00 ^b	3,71 ^a	1,98 ^b	10,94	5,39	5,22	4,69	0,69%	n.d.	
i25:0	n.d.	0,14 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	0,09	n.d.	n.d.	
i40:0	8,24 ^a	10,96 ^b	n.d.	0,24 ^b	11,61	0,77	n.d.	n.d.	0,96%	n.d.	
i40:0-1cy	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	n.d.	n.d.	7,70%	n.d.	
i40:0-2cy	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	62,17%	n.d.	
i40:0-3cy	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,87%	n.d.	
i40:0-4cy	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,60%	n.d.	
i20:1	n.d.	0,55 ^a	0,44 ^b	n.d.	0,18	0,52	1,89	1,86	n.d.	n.d.	
Isoprenoide	11,46 ^a	14,96 ^b	4,15 ^a	2,22 ^b	22,76	8,03	7,19	6,64	100%	n.d.	
in PLEL	5,73 ^a	7,48 ^b	2,08 ^a	1,11 ^b	11,38	4,02	3,60	3,32	---	n.d.	

Unterschiedliche Buchstaben indizieren unterschiedliches Signifikanzniveau zwischen der Extraktion A und B ($p \leq 0,05$); n.d.: nicht detektierbar

¹ Extraktion A nach Collins (1980) Extraktion B nach Bai und Zelles (1997)

² Von diesem Organismus lag nur ein qualitativer Etherlipid-Standard vor. Extraktion C nach De Rosa et al. (1983). Daher sind die Konzentrationen der detektierten PLEL-Isoprenoide hier in mol% angegeben.

i15:0 bedeutet: Isoprenoid-Kohlenwasserstoff mit C₁₅-Kette ohne Doppelbindung; i40:0-1cy bedeutet: Isoprenoid-Kohlenwasserstoff mit C₄₀-Kette ohne Doppelbindung mit einem Cyclopentanring; i20:1: Isoprenoid-Kohlenwasserstoff mit C₂₀-Kette mit einer Doppelbindung

Tabelle 14B: Vergleich der Konzentrationen an i-PLEL nach Extraktion A und B (Unterschiede sind statistisch signifikant ; $p \leq 0,05$)

	Konzentrationsvergleich
i20:0	A = B
i25:0	A > B
i40:0	A = B
i20:1	A < B
Isoprenoide	A (6,99) = B (6,46)
in PLEL	A (3,50) = B (3,23)

Die Standardabweichungen der einzelnen ethergebundenen Isoprenoide lagen in dem Bereich von 0-10% (Daten nicht dargestellt). Es ist vorab anzumerken, daß ausschließlich isoprenoid-verzweigte Kohlenwasserstoffe, d.h. weder *n*- noch einfach-verzweigte Alkane oder Alkene in den Reinkulturen nachgewiesen wurden. Außerdem fällt auf, daß die Ketten der gefundenen Methanogen-Isoprenoide hauptsächlich aus C₂₀ und C₄₀ aufgebaut waren, in zwei Fällen zusätzlich aus C₂₅ und in einem Fall auch aus Spuren von C₁₅ bestanden. Die geringe Variabilität an Alkylketten in den PLEL von Archaeen und Spuren von C₁₅- und C₂₅-Isoprenoiden in Methanogenen deckt sich mit den Ergebnissen von Mancuso *et al.* (1985), welche die PLEL-Zusammensetzung in 25 Methanogenen untersuchten. Abweichend von anderen Studien ist die Tatsache, daß ungesättigte i20:1 Isoprenoide (Artefakte aus der Spaltung von Hydroxyarchaeol) in *Halobacterium halobium*, *Methanobacterium thermoautorophicum* und *Methanopyrus kandleri* auftreten, wenngleich in deutlich niedrigeren Konzentrationen als in den drei Vertretern der *Methanosarcinaceae*, für die Hydroxyarchaeole charakteristisch sind (De Rosa und Gambacorta, 1994).

Abweichend von den Untersuchungen von Hafenbradl *et al.* (1996) wurden in MPK neben Archaeol, die Seitenketten von azyklischen und zyklischen Caldarchaeolen als auch Hydroxyarchaeol nachgewiesen. Diese Abweichungen können durch die unterschiedlichen Extraktionsverfahren verursacht worden sein, da Hafenbradl *et al.* (1996) die polaren Lipide aus *Methanopyrus kandleri* nach der Methode von Nishihara und Koga (1987) unter Verwendung von Trichloressigsäure gewonnen haben.

Die Zusammensetzung der PLEL in *Sulfolobus solfataricus* entsprach den Untersuchungen von De Rosa *et al.* (1983) und zeichnete sich durch einen hohen Anteil von zyklischen Biphytanen aus, die insgesamt 98,4% der PLEL-Isoprenoide einnahmen.

Aus der Konzentration der PLEL-Isoprenoide läßt sich die Konzentration an Archaeolen und Caldarchaeolen ausgedrückt in PLEL berechnen. Da 1 Mol PLEL 2 Mol PLEL-Isoprenoide enthalten, ist die PLEL-Konzentration halb so groß, wie die der jeweiligen PLEL-Isoprenoide.

Obwohl es innerhalb der vier für den Extraktionsvergleich herangezogenen Archaeen signifikante Unterschiede in der PLEL-Konzentration gab (Tabelle 14B), wirkte sich dies in der Gesamtbetrachtung nicht aus. Werden die Lipide nach Methode A extrahiert, so ergab sich mit einem durchschnittlichen PLEL-Gehalt von 3,5 µMol g⁻¹ TS (Median 3,6) kein statistischer Unterschied zur Methode B, nach welcher ein durchschnittlicher Wert von 3,3 µMol g⁻¹ TS erhalten wurde (Median 2,7). Auffallend ist, daß mit Extraktionsmethode B aus *Halobacterium* und

Methanosarcina mazei signifikant mehr i20:1 Isoprenoide, sprich Hydroxyarchole nachgewiesen wurden.

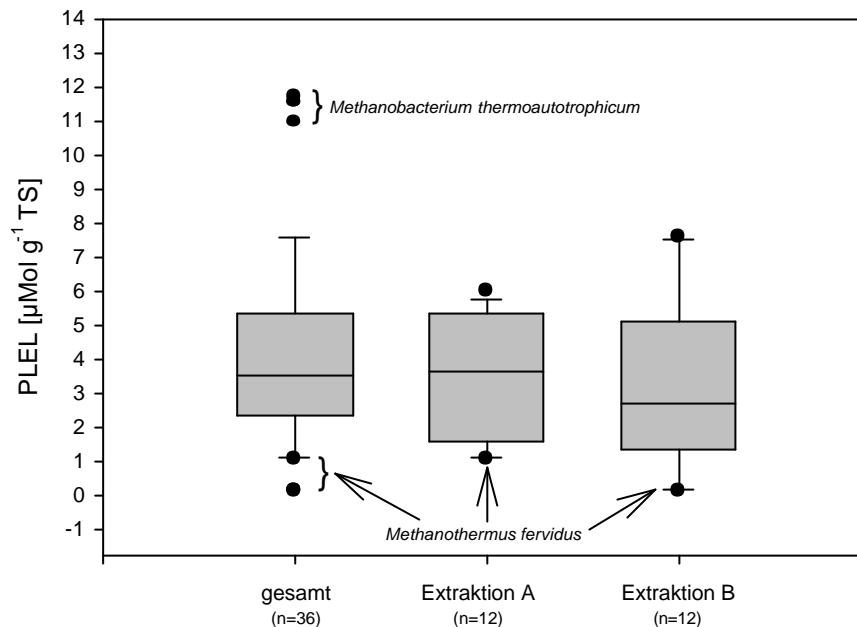


Abbildung 30: Bandbreite der ermittelten PLEL-Konzentrationen in mikrobiellen Reinkulturen

Aus Abb. 30 wird die Bandbreite, bzw. die Streuung der ermittelten PLEL-Werte sichtbar. In dieser Box-Plot Darstellung wird die Bandbreite der PLEL-Konzentrationen nach unten von *Methanothermus fervidus* und nach oben von *Methanobacterium thermoautotrophicum* begrenzt. Die hierbei ermittelten, auffällig niedrigen PLEL-Konzentrationen in *Methanothermus fervidus* können damit erklärt werden, daß am vorhandenen GC/MS-System nur ein Teil der Seitenketten erfaßt wurden. Nach Morii *et al.* (1998) setzen sich die PLEL dieses Archaeums hauptsächlich aus Cald-archaeolen zusammen, deren C₄₀-Seitenketten über eine C-C-Bindung miteinander verbunden sind und ein sogenanntes H-förmiges, C₈₀-Isoprenoid ausbilden, welches aufgrund seiner Molekülgröße (m/z 1122) mit dem vorhandenen GC/MS System nicht zu bestimmen ist (s. auch Abb. 3, Struktur I).

Es werden zwar Einflüsse der Lipidextraktion auf die Streuung der Einzelwerte bzw. auf die Mediane sichtbar, doch wirkten sich diese, wie bereits erwähnt, nicht in einem signifikanten Unterschied zwischen den PLEL-Gehalten der beiden Extraktionsmethoden A und B aus. In den insgesamt 12 Extrakten wurde eine durchschnittliche PLEL-Konzentration von rund 4,1 µMol g⁻¹ gefriergetrocknetes

Zellmaterial (Median: 3,5 $\mu\text{Mol g}^{-1}$) festgestellt. Nichols *et al.* (1987) ermittelten in methanogenen Reinkulturen, die sich sowohl in Herkunft und Kultivierungsbedingungen als auch in der Zusammensetzung an Archaeolen und Caldarchaeolen unterschieden, eine durchschnittliche PLEL-Konzentration von 2,5 $\mu\text{Mol g}^{-1}$ TS. Betrachtet man die Unterschiede der verwendeten Bestimmungsmethoden (Bestimmung der PLEL-Seitenketten mittels GC/MS in der vorliegenden Arbeit versus Bestimmung der PLEL mittels HPLC), so gelangen beide Untersuchungen zu vergleichbaren PLEL-Konzentrationen.

3.1.2.2. PLEL- und PLFA-Zusammensetzung in Bakterien und Archaeen

In 11 Reinkulturen, darunter drei Bakterien- und acht Archaeenstämmen, wurde neben der Zusammensetzung an PLEL auch die der PLFA untersucht. Zusätzlich diente ein für die Anzucht vieler Reinkulturen verwendeter Hefeextrakt (Difco®) als Kontrolle. In Tab. 15 ist die PLFA-Zusammensetzung der untersuchten Organismen dargestellt.

Dies ist die erste Untersuchung, in der PLFA in Archaeen systematisch untersucht worden sind. Jones und Holzer (1991) fanden freie Fettsäuren in der neutralen Lipid-Fraktion von *Methanosphaera stadtmanae* und Q. I. Bai (unveröffentlichte Ergebnisse) detektierte EL- und NEL-PLFA in *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Halobacterium halobium*, was den Ausschlag dafür gab, in einer größeren Anzahl von Archaeen PLFA zu bestimmen. Die Standardabweichungen der einzelnen Fettsäuren lagen in dem Bereich von 0-10% (Daten nicht dargestellt). Es hierbei anzumerken, daß der Hefeextrakt im unsterilen Zustand der Lipiduntersuchung unterzogen wurde.

Wenngleich, wie aus Tab. 15 hervorgeht, die drei untersuchten Bakterien (*Clostridium butyricum*, *Clostridium aceticum* und *Holophaga foetida*) wesentlich höhere Konzentrationen an PLFA als die untersuchten Archaeen aufwiesen, so konnten auch in letztgenannten signifikante PLFA-Konzentrationen festgestellt werden. Während der Anteil an ester gebundenen Fettsäuren (EL-PLFA) in den beiden Clostridien-Stämmen mit 82,48 bzw. 89,21% überwog (Tab. 16), waren deren Konzentrationen in der Archaeen-Membran wesentlich niedriger. Der Anteil an EL-PLFA erstreckte sich in den acht Archaeen von 4,79 in *Halobacterium halobium* (HAB) bis 14,49% in *Methanococcus jannaschii* (MCJ).

Tabelle 15: PLFA-Zusammensetzung [Mol%] in ausgewählten Reinkulturen (jeweils n=2)

PLFA	Kontrolle		Bacteria						Archaea					
	HEF ^a	B	CLA	CLB	HOP	HAB	MTF ^b	MCJ	MSM	MSV	MSB	MBT	MPK	
SATFA-bra	6,36		1,25	10,49	0,02	0,00	0,00	0,04	2,61	0,00	0,00	0,00	0,00	
SATFA-nor	14,60		32,51	43,41	9,20	2,71	3,05	8,65	4,78	5,34	3,85	7,45	6,72	
SATFA-total	20,95		33,76	53,90	9,22	2,71	3,05	8,69	7,39	5,34	3,85	7,45	6,73	
MUFA-16:1	25,37		34,89	11,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
MUFA-18:1	39,05		1,27	21,34	0,00	0,00	0,00	0,00	2,87	0,00	0,00	0,00	0,00	
MUFA-total	66,64		47,08	34,58	0,00	0,00	0,00	0,00	2,87	0,00	0,00	0,00	0,00	
PUFA-total	0,97		0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,59	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	
PLOH- α	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	
PLOH- β	0,00		0,12	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
PLOH- ω	0,24		0,40	0,16	2,11	0,00	0,37	1,66	0,14	2,51	0,18	1,95	2,75	
PLOH-myl	0,04		0,09	0,03	0,00	0,24	0,27	0,24	0,51	0,00	0,30	0,31	0,37	
PLOH- ω	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
PLOH-total	1,09		1,64	0,63	6,91	2,08	3,32	5,21	2,46	5,69	2,25	7,00	7,63	
EL-PLFA	89,65		82,48	89,21	16,14	4,79	6,37	14,49	13,00	11,03	6,10	14,46	14,36	
UNSFA-bra	0,40		0,00	0,00	1,23	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,51	0,78	0,00	
UNSFA-cy	0,00		0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
bra + cy	0,40		0,00	0,20	1,23	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,51	0,78	0,00	
UNSFA-nor	5,04		13,03	6,93	59,98	67,81	67,72	65,14	61,27	62,48	66,76	66,51	58,06	
UNSFA-uns	2,14		2,04	2,47	7,71	19,24	15,66	12,29	16,60	14,02	15,68	11,26	10,83	
UNSFA-total	7,82		15,07	9,60	68,92	87,05	83,94	77,43	77,87	76,50	82,95	78,55	68,89	
UNOH- α	1,28		0,85	0,36	3,80	3,81	2,38	2,60	3,31	3,53	4,10	1,50	5,59	
UNOH- β	0,22		0,04	0,17	0,21	0,11	0,01	0,18	0,15	0,48	0,19	0,28	0,03	
UNOH- ω	0,27		0,37	0,25	1,91	1,38	1,22	1,80	1,64	2,31	2,13	1,95	3,26	
UNOH-myl	0,07		0,00	0,00	0,41	0,67	0,39	0,00	0,57	0,65	0,67	0,00	0,90	
UNOH- ω	0,16		0,25	0,08	2,03	0,97	1,51	0,43	1,32	0,58	1,02	0,26	0,78	
UNOH-total	2,53		2,45	1,19	14,94	8,16	9,69	8,08	9,13	12,47	10,95	7,00	16,75	
NEL-PLFA	10,35		17,52	10,79	83,86	95,21	93,63	85,51	87,00	88,97	93,90	85,54	85,64	
PLFA-total	100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

^a Hefe-Extrakt wurde nicht-steril eingesetzt^b MTF wurde ohne jegliches organisches Substrat angezogen

Tabelle 16: PLEL- und PLFA-Zusammensetzung in ausgewählten Reinkulturen [$\mu\text{mol g}^{-1}$ TS]

Biomarker	Kontrolle		Bacteria						Archaea					
	HEF B	HEF B	CLA	CLB	HOP	HAB	MTF*	MCJ	MSM	MSV	MSB	MBT	MPK	
			B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	
PLEL														
	p-PLEL	n.d.	0,925	0,561	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	i-PLEL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,358	0,266	14,957	5,288	6,910	22,723	8,460	
PLFA	SATFA	0,014	17,439	12,481	11,5	0,069	0,065	0,280	0,213	0,145	0,125	0,216	0,116	
	PUFA	< 0,001	n.d.	0,025	n.d.	n.d.	n.d.	0,018	0,008	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	PLOH	< 0,001	0,851	0,145	0,87	0,053	0,071	0,166	0,071	0,154	0,073	0,202	0,132	
	MUFA	0,043	23,980	8,008	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,085	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Summe	0,058	42,290	20,658	2,02	0,122	0,136	0,464	0,377	0,299	0,197	0,418	0,248	
	UNOH	0,002	1,263	0,276	1,87	0,207	0,211	0,262	0,263	0,338	0,349	0,202	0,290	
NEL-PLFA	UNSA	0,005	7,914	2,225	8,62	2,210	1,807	2,540	2,250	2,075	2,668	2,278	1,192	
	Summe	0,007	9,177	2,501	10,49	2,417	2,018	2,802	2,513	2,414	3,017	2,480	1,481	
	EL+NEL	0,065	51,467	23,159	12,51	2,539	2,151	3,266	2,890	2,713	3,214	2,898	1,730	
PL	PLEL+PLFA	0,065	52,392	23,720	12,51	7,897	2,417	18,223	8,138	9,903	9,857	25,652	9,756	
	% PL	0	1,77	2,37	0	67,85	11,00	82,08	64,49	72,60	67,39	88,70	82,27	
	EL-PLFA	89,65	80,72	87,09	16,14	1,54	5,61	2,55	4,64	3,02	2,00	1,63	2,54	
	NEL-PLFA	10,35	17,52	10,54	83,86	30,61	83,38	15,38	30,88	24,37	30,61	9,67	15,18	

Die PLFA-Zusammensetzung von *Holophaga foetida* (HOP) unterschied sich deutlich von den beiden anderen Vertretern der Domäne *Bacteria*. Während in diesen der Anteil an EL-PLFA überwog und zudem p-PLEL nachgewiesen werden konnten (Tab. 16), dominierten NEL-PLFA in HOP. Außerdem konnte in diesem Organismus keine PLEL-Verbindung detektiert werden.

Die absoluten Konzentrationen an EL-PLFA (Tab. 16) variierten in den untersuchten Archaeen zwischen $0,122 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS in *Halobacterium halobium* (HAB) und $0,464$ in *Methanococcus jannaschii* (MCJ). Die Bandbreite der NEL-PLFA Werte erstreckte sich in den Archaeen-Zellen von $1,481 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS in *Methanopyrus kandleri* (MPK) bis $3,017$ in *Methanosarcina barkeri* (MSB). Von den PLFA in den hier aufgeführten *Archaea* dominierten die nicht-ester-gebundenen Fettsäuren (NEL-PLFA), deren relative Konzentrationen von $85,51$ in *Methanococcus jannaschii* (MCJ) bis $95,21\%$ in *Halobacterium halobium* (HAB) variierten (Tab. 15). Den größten Anteil innerhalb der Gruppe der NEL-PLFA wurde von den geradkettigen, nicht-hydroxysubstituierten Fettsäuren (UNSFAnor) eingenommen. Innerhalb der Gruppe der EL-PLFA dominierten ebenso die geradkettigen Fettsäuren (SATFAnor).

Clostridien enthalten in ihren Membranlipiden besondere Phospholipid-Strukturen, sogenannte Plasmalogene, deren Glycerinmolekül über eine Esterbindung mit einer Fettsäure und mit einer Etherbindung mit einem ungesättigten Kohlenwasserstoff (C_{16} - oder C_{18} -Kette) verbunden ist (Thiele, 1979). Mit der PLEL-Seitenkettenbestimmung können diese zwar als Hexadecan bzw. Octadecan erfaßt werden (Bieniek, persönliche Mitteilung), jedoch liegen keine Informationen vor, wie hoch deren Ausbeute sich in bezug auf das Plasmalogen-Molekül verhält. Diese Etherlipid-Seitenketten wurden jedenfalls in den beiden Clostridien bestimmt und als p-PLEL bezeichnet. Aus der Addition der PLEL-Isoprenoide und der PLFA ergibt sich die Summe der Gesamtphospholipide (PL). Die beiden Clostridienstämme besaßen in der Zusammenstellung von Tab. 16 die höheren PL-Konzentrationen als die untersuchten Archaeen. Nach White *et al.*, (1979) enthalten Bakterien durchschnittlich $100 \mu\text{Mol PLFA g}^{-1}$ TS. Die relativ geringen PLFA-Konzentrationen in den beiden Clostridien lassen sich dadurch erklären, daß deren Membranlipide sich hauptsächlich aus Plasmalogenen zusammensetzen und 1 Mol dieser Plasmalogen-Phospholipide nur 1 Mol Fettsäuren enthalten, im Gegensatz zu den herkömmlichen Diacylphospholipiden (1 Mol Diacylphospholipide enthalten 2 Mol Fettsäuren; Thiele, 1979). Obwohl in den untersuchten Archaeen signifikante Konzentrationen an PLFA detektiert wurden, überwog, bis auf die Ausnahme in *Methanothermus fervidus* (MTF), der Anteil an PLEL in den Gesamtphospholipiden (PL), wie aus Tab. 16 zu ersehen. Auch hierbei könnte das mit der vorhandenen GC/MS nicht zu bestimmende C_{80} -

Isoprenoid in *Methanothermus fervidus*, zu dem von allen anderen Archaeen abweichenden PLEL/PLFA-Verhältnis beigetragen haben.

Da die NEL-PLFA in der routinemäßigen PLFA-Analytik von Reinkulturen kaum berücksichtigt werden, verwundert es nicht, daß die Existenz dieser Verbindungen in Archaeen erst jetzt und mit diesem methodischen Ansatz detektiert werden konnte.

3.1.2.3. Chemotaxonomische Unterscheidung von Mikroorganismenstämmen anhand von Phospholipid-Profilen

In der bakteriellen Taxonomie werden Lipid-Muster, bzw. -Profile neben der morphologischen und molekularbiologischen Charakterisierung, als wichtiges biochemisches Beschreibungsmerkmal von Mikroorganismen herangezogen. Dabei ergeben sich in der Regel gute Übereinstimmungen zwischen phänotypischen (Phospholipidfettsäuren, Gesamtlipid-Fettsäuren) und phylogenetischen (DNA, rRNA) Charakterisierungsmethoden (Guckert *et al.*, 1991; Kohring *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden nacheinander die zuvor in den Reinkulturen ermittelten und log-transformierten Konzentrationen [Mol%] der Phospholipid-Biomarker zwecks Ähnlichkeitsüberprüfungen einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen, um dadurch die taxonomische Bedeutung der PLEL- und PLFA-Biomarker zu untersuchen.

In dem Kompendendiagramm in Abb. 31 treten vier Gruppierungen bzw. Cluster deutlich hervor, die es ermöglichen die Organismen nach Clostridien (=Bakterien), thermophilen *Euryarchaeota*, mesophilen *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* zu gliedern. Dies ist ein Indiz dafür, daß die zugrundeliegenden Biomarker auf dieser Ebene zu taxonomischen Gruppierungen führen, die der von Woese *et al.* (1990) begründeten Phylogenie der Organismen entsprechen.

Die deutliche Separation des Clusters I von den Gruppierungen II, III und IV steht im Einklang mit den phylogenetischen Untersuchungen von Woese und Fox (1977) und Woese *et al.* (1990), die auf der Basis von rRNA-Sequenzen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen allen Lebewesen und die Unterteilung der belebten Welt in drei Primärzweige, bzw. in die drei Domänen *Eukarya*, *Bacteria* und *Archaea* begründeten. Die deutliche phänotypische Unterscheidung der *Bacteria*, hier repräsentiert durch Clostridien, von den *Archaea* ergibt sich aus dem Vorhandensein der p-PLEL und dem Fehlen der Archaeen-spezifischen i-PLEL (vgl. Tab. 16) in CLA und CLB.

Dadurch, daß der Organismus HOP als auch der Hefeextrakt (HEF) keine PLEL-Biomarker enthielten, war eine Gruppierung mittels Hauptkomponentenanalyse nicht möglich.

Die Archaeen konnten ihrerseits anhand ihrer PLEL-Profile in thermophile *Euryarchaeota* und in *Crenarchaeota* unterschieden werden, was sich in Übereinstimmung mit den phylogenetischen Untersuchungen von Barns *et al.* (1996) befindet. Diese Unterscheidung anhand der PLEL-Profile resultierte daraus, daß die Organismen der Gruppe II (thermophile *Euryarchaeota*) C₄₀-PLEL-Isoprenoide besaßen, die den Organismen der Gruppe III (mesophile *Euryarchaeota*) gänzlich fehlten, und die *Crenarchaeota* als einzige Organismen signifikante Konzentrationen an zyklischen Isoprenoiden aufwiesen (s. auch Tab. 14). Die deutliche Trennung von *Methanopyrus kandleri* (MPK) von den anderen Vertretern innerhalb der Gruppe II steht in Einklang mit den Untersuchungen von Huber *et al.* (1989), wonach sich dieses Archaeum auf der Basis von 16S rRNA Sequenzen am deutlichsten von allen anderen *Euryarchaeota* unterscheidet. Die phänotypische Separation von MPK innerhalb der Gruppe II ergab sich hierbei aus dem Vorhandensein von zyklischen Caldarchaeolen.

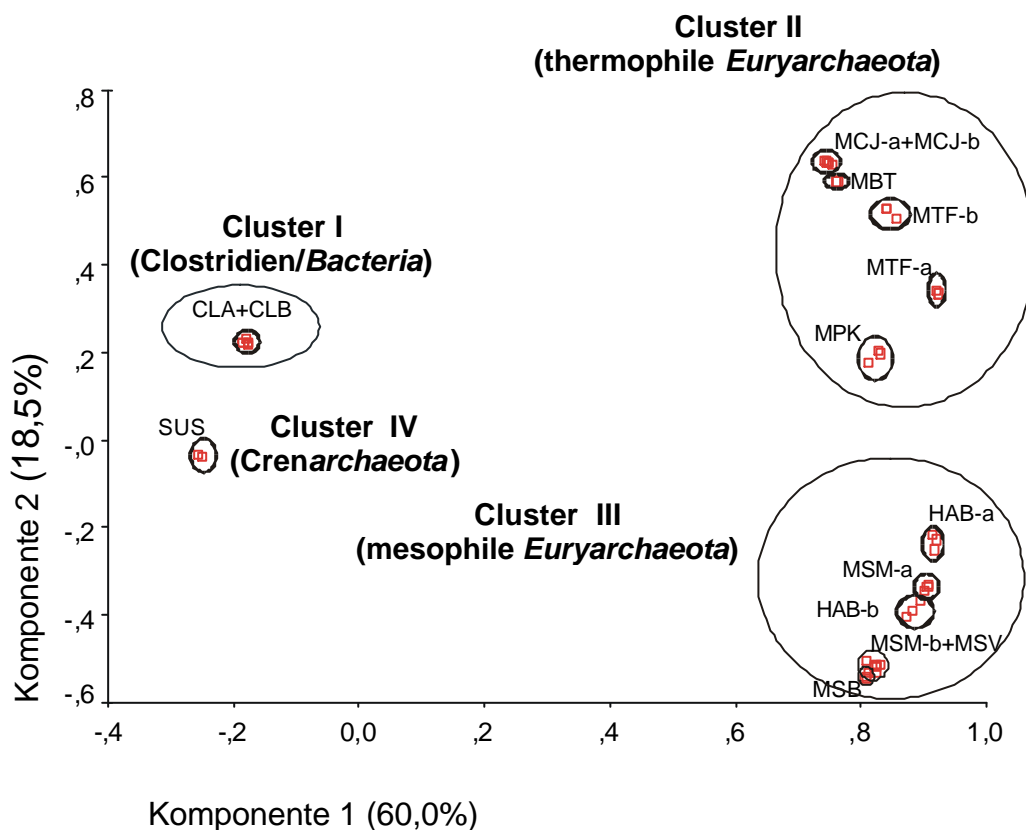


Abbildung 31: Hauptkomponentendiagramm der PLEL-Profile von *Clostridia* und *Archaea*. Komponente 1 erklärt 60,0% der Variation und Komponente 2 18,5% der Variation des Ursprungsdatensatzes. Kleinbuchstaben hinter der Organismenkennung kennzeichnen die Extraktionsmethode A oder B.

Sowohl in dem von Barns *et al.* (1996) verifizierten phylogenetischen Stammbaum als auch in der vorliegenden PLEL-Gruppierung, besitzen die Organismen der Gattung *Methanothermus* (MTF) die größte Verwandtschaft zu *Methanopyrus* (MPK), gefolgt von der Gattung *Methanobacterium* (MBT) und der Gattung *Methanococcus* (MCJ), wobei letztere in dieser Auswahl die geringste Ähnlichkeit aufweist.

Während die PLEL-Profile auf eine größere Verwandtschaft von MBT zu MCJ als zwischen MBT zu MTF hinwiesen, zeigen die phylogenetischen Untersuchungen von Barns *et al.* (1996) genau das Gegenteil. Diese Diskrepanz läßt sich folgendermaßen erklären. MCJ enthält neben herkömmlichem Archaeol und Caldarchaeol auch ein sogenanntes makrozyklisches Archaeol (Comita *et al.*, 1984), welches nach Etherspaltung und Zn-Reduktion Diphytan liefert, also ein C₄₀-Isoprenoid, das sich mittels GC/MS nicht von C₄₀-Biphytan unterscheiden läßt und dadurch Ähnlichkeit zu dem PLEL-Profil von MBT gewinnt (s. Tab. 14).

In der Gruppe III (mesophile *Euryarchaeota*), befanden sich die drei Vertreter aus der Familie der *Methanosarcinaceae* und der halophile Organismus *Halobacterium halobium* (HAB), welches in Einklang mit den taxonomischen Unterscheidungen von Woese *et al.* (1990) steht. Bis auf MSM-a bildeten die untersuchten Lipid-Extrakte der *Methanosarcinaceae* eine eigenständige Untergruppe innerhalb der Gruppe III, was sich mit der engen Verwandtschaft der drei *Methanosarcina*-Stämme deckte. Allerdings zeigte die Lokalisierung der PLEL-Profile des halophilen Archaeums, daß mit den zugrundeliegenden Biomarkern innerhalb der Gruppe der mesophilen *Euryarchaeota* keine ausgeprägte Trennung von methanogenen und halophilen Archaeen erreicht werden konnte. Dies wird besonders daran deutlich, daß HAB-b eine größere Ähnlichkeit zu MSM-a aufwies, als zu HAB-a. Diese Beispiel zeigt auch, daß die Wahl der Extraktionsmethode (A oder B) sich auf die PLEL-Zusammensetzung und damit auf die taxonomische Einordnung auswirken kann.

Ein etwas anderes Bild als Abb. 31 liefert das Komponentendiagramm in Abb. 32, welches die Gruppierung der PLFA-Profile von Reinkulturen darstellt. Dadurch, daß PLFA auch in der Kontrolle (HEF), wenngleich nur in niedrigen Konzentrationen festgestellt wurden, wurde HEF genauso wie HOP bei dieser Hauptkomponentenanalyse berücksichtigt; SUS dagegen nicht. HEF (Hefeextrakt→*Eucarya*) und CLA+CLB (Clostridien→*Bacteria*) unterschieden sich hinsichtlich ihrer PLFA-Profile deutlich von allen anderen Organismen (*Holophaga* und *Euryarchaeota*), welches sich mit den phylogenetischen Grundgearbeiten von Woese und Fox (1977) deckt.

Während sich die Archaeen in ihren PLEL-Profilen, wie in Abb. 31 dargestellt, eindeutig in mesophile und thermophile Organismen unterscheiden werden konnten, ist dies mit PLFA-Profilen nicht möglich (Abb. 32). Das PLFA-Profil von MPK, einem hyperthermophilen Archaeum, ähnelte eher den Profilen der mesophilen als denen der thermophilen *Euryarchaeota*. Umgekehrt, ähnelte das Profil von MSB, einem mesophilen Archaeum, eher den PLFA-Profilen der thermophilen als denen der mesophilen Archaeen. Es zeigen sich aber auch hier Übereinstimmungen mit den Untersuchungen von Barns *et al.* (1996), wonach *Methanopyrus* (MPK) einen isolierten Zweig hinsichtlich seines Genotyps im phylogenetischen Baum der *Euryarchaeota* darstellt.

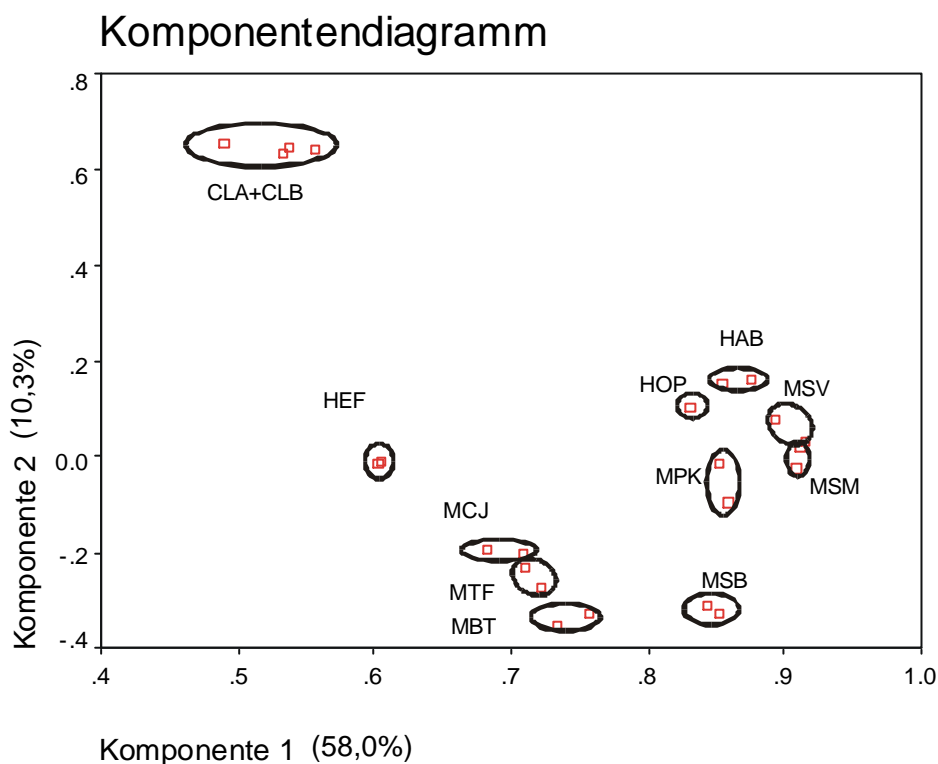


Abbildung 32: Hauptkomponentendiagramm der PLFA-Profile von ausgewählten Reinkulturen.

In Abb. 32 wird außerdem eine Ähnlichkeit zwischen der PLFA-Zusammensetzung von *Holophaga foetida* (HOP) und *Halobacterium halobium* (HAB) deutlich. Eine enge phylogenetische Beziehung besteht zwischen beiden jedoch nicht (G. Kirchhof, persönliche Mitteilung), obwohl das homoacetogene Bakterium *Holophaga foetida* (HOP), ein isoliertes Phylum innerhalb der *Bacteria* darstellt (Liesack *et al.*, 1994). Bei HAB dagegen handelt es sich um ein mesophiles, halophiles Archaeum der Gruppe *Euryarchaeota* (DSMZ, 1998; Woese *et al.*, 1990). Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, daß die Positionierung der Profile nur die Verwandtschaftsbeziehungen, der in dieser Hauptkomponentenanalyse betrachteten Organismen wiedergeben und daher deren

Verwandtschaft nur als relative und nicht als absolute Beziehung zu betrachten ist. Abschließend läßt sich aus dem Komponentendiagramm in Abb. 32 das Fazit ziehen, daß den zugrundeliegenden PLFA-Biomarkern taxonomische Bedeutung nicht nur bei der Unterscheidung zwischen *Archaea* und den beiden anderen Domänen zukommt, sondern auch bei Unterscheidungen von Organismen innerhalb der Domäne *Archaea*.

Wenn zu den PLFA-Profilen die PLEL-Profile hinzugezogen werden, wird erwartungsgemäß eine ausgeprägtere Differenzierung zwischen *Bacteria*, *Eucarya* und *Archaea* erreicht. Nach dem in Abb. 33 dargestellten Hauptkomponentendiagramm können folgende Gruppen auf Basis ihrer PLEL+PLFA-Biomarker zusammengefaßt werden: CLA+CLB (Clostridien), HEF (Hefeextrakt, *Eukarya*), HOP (*Holophaga*), HAB+MSV+MSM (mesophile Archaeen), MPK (*Methanopyrus kandleri*), MSB (*Methanosarcina barkeri*), MCJ+MTF+MBT (thermophile Archaeen).

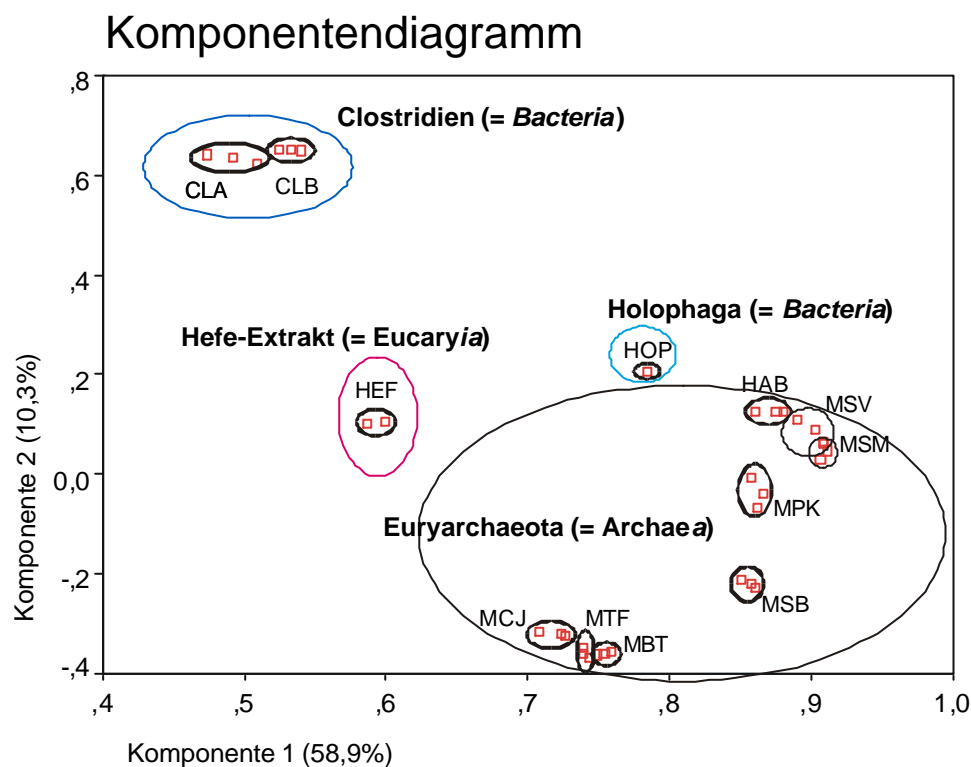


Abbildung 33: Hauptkomponentendiagramm der Phospholipid-Profile (PLEL+PLFA) von ausgewählten Reinkulturen

Auf der Basis von PLEL+PLFA-Profilen sind also keine deutlichen Unterscheidungen zwischen thermophilen und mesophilen *Euryarchaeota* zu erreichen. Jedoch stimmt die Positionierung der Profile innerhalb der Gruppe MCJ+MTF+MBT, nach der Hauptkomponentenanalyse von

PLEL+PLFA, im Gegensatz zu den Profil-Vergleichen in Abb. 31 und Abb. 32, am ehesten mit den von Barns *et al.* (1996) erwähnten phylogenetischen Positionierungen dieser drei Organismen überein.

3.1.3. Konsequenzen für die Untersuchungen von Bodenökosystemen

3.1.3.1. Taxonomische Bedeutung der PLEL-Biomarker

Obwohl PLFA-Profile zur taxonomischen Charakterisierung von Archaeen herangezogen werden können (s. Abb. 32), empfiehlt es sich für ökosystemare Anwendungen PLEL als Biomarker für Archaeen zubevorzugen. Durch Berücksichtigung der Etherbindung in den polaren Membranlipiden der methanogenen *Archaea*, wird nämlich eine schärfere Abgrenzung von anderen obligat anaeroben Organismen, wie z.B. *Holophaga foetida* erreicht, wie aus dem Vergleich der beiden Komponentendiagrammen in Abb. 32 und Abb. 33 hervorgeht.

Es können zwar die in dieser Arbeit untersuchten Archaeen anhand ihrer PLEL-Profile in vier Gruppen bzw. Cluster unterteilt werden, jedoch erfüllt diese Gruppierung keinen Absolutheitsanspruch, da nur ein Teil der kultivierten und nur ein Bruchteil der tatsächlich in Bodenökosystemen vorkommenden *Euryarchaeota* untersucht werden konnte. Es ist davon auszugehen, daß in das Cluster "thermophile *Euryarchaeota*" auch mesophile *Euryarchaeota* wie z.B. *Methanobacterium formicum*, *Methanospirillum hungatei* oder *Methanoculleus bourgense* fallen würden, da diese nach Koga *et al.* (1993) ebenso Archaeol und Caldarchaeol enthalten.

Es wird bereits an der kleinen Auswahl der analysierten *Euryarchaeota* deutlich, daß auf der Basis von PLEL keine deutliche Differenzierung zwischen methanogenen und halophilen Archaeen erreicht werden kann. Eine Differenzierung dieser beiden Organismengruppen in Bodenökosystemen auf der Basis von PLEL-Profilen erscheint daher als nicht möglich.

Angesichts dieser Sachverhalte erscheint es sinnvoll, eine Differenzierung von Archaeenpopulationen in Bodenökosystemen mittels PLEL-Biomarker auf der obersten taxonomischen Ebene innerhalb der Domäne *Archaea* durchzuführen. Demnach werden mit den PLEL-Isoprenoiden i15:0, i20:0, i25:0, i40:0, i20:1, die als EURY-PLEL bezeichnet werden, *Euryarchaeota* erfaßt. Die CREN-PLEL i40:0-1cy, i40:0-2cy, i40:0-3cy und i40:0-4cy charakterisieren *Crenarchaeota* (Tab. 17).

Obwohl, wie aus den Tabellen 14A und 17 hervorgeht, zyklische Biphytane in *Euryarchaeota* und Phytan und Biphytan in *Crenarchaeota* gefunden wurden, sind diese Überschneidungen für die Anwendung in Bodenökosystemen zu dem derzeitigen Stand der Wissenschaft zu vernachlässigen:

Zum einen handelt es sich bei dem Organismus MPK, um ein absolut hyperthermophiles Euryarchaeum (s. Tabelle 2), welches 16,8% zyklische Biphytane enthält und sich sowohl genetisch als auch physiologisch als extremer Vertreter der *Euryarchaeota* erweist (Huber *et al.*, 1989), dessen Existenz in Bodenhorizonten eher auszuschließen ist, zum anderen nehmen in dem untersuchten (hyperthermophilen) Crenarchaeum SUS Phytan und Biphytan insgesamt nur 1,6% der gesamten PLEL-Konzentration ein. Allerdings liegen bisher keine Hinweise vor, inwiefern die PLEL-Zusammensetzung von potentiellen Boden besiedelnden, nonthermophilen *Crenarchaeota* von den thermophilen *Crenarchaeota* abweicht. Es wurden zwar *Crenarchaeota* in mehreren Bodenökosystemen der gemäßigten Breiten nachgewiesen, darunter Wald- Acker- und Grünlandstandorte, (Ueda *et al.*, 1995; Bintrim *et al.*, 1997; Jurgens *et al.*, 1997; Sandaa *et al.*, 1999), doch konnte noch kein entsprechender nonthermophiler Organismus in Reinkultur gewonnen werden (DeLong *et al.*, 1998; R. Huber, persönliche Mitteilung).

Tabelle 16: Unterscheidung von Mikroorganismen anhand i-PLEL-Biomarker

i-PLEL	Archaea		Bacteria	Eucarya
	EURY-PLEL ^a	CREN-PLEL ^b		
i15:0	+	-	-	-
i20:0	+	(+)	-	-
i25:0	+	-	-	-
i40:0	+	(+)	-	-
i40:0-1cy	(+)	+	-	-
i40:0-2cy	(+)	+	-	-
i40:0-3cy	-	+	-	-
i40:0-4cy	-	+	-	-
i20:1	+	-	-	-

^a EURY-PLEL: PLEL, die charakteristisch für *Euryarchaeota* sind; ^b CREN-PLEL: PLEL, die charakteristisch für *Crenarchaeota* sind; Angaben in Klammern verweisen auf vergleichsweise niedrige Gehalte an den jeweiligen Biomarkern

Aus den PLEL-Untersuchungen von Bodenextrakten (s. Kap. 3.1.1.4) und Clostridienstämmen (Tab. 16) geht hervor, daß die ethergebundenen Kohlenwasserstoffe nicht nur aus Isoprenoiden (→ i-PLEL) bestehen, sondern auch aus anderen aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Es ist daher anzunehmen, daß neben den PLEL-Isoprenoiden auch andere PLEL-Seitenketten als Biomarker zu betrachten sind. Diese lassen sich zu vier taxonomisch relevanten Gruppen zusammenfassen (Tab. 18). Es ist hierbei anzumerken, daß n16:0 und n18:0 Seitenketten sowohl unter p-PLEL als auch unter x-PLEL subsummiert sind. In der vorliegenden Arbeit werden diese ausschließlich den p-PLEL zugeordnet.

Tabelle 17: Darstellung der verschiedenen PLEL-Gruppen und deren Vorkommen in mikrobiellen Struktureinheiten (Populationen)

Gruppe	Analysierte Seitenketten	Vorkommen
i-PLEL	<u>Isoprenoide</u> : i15:0, i20:0, i20:1, i25:0, i40:0, i40:0, i40:0-1cy, i40:0-2cy, i40:0-3cy, i40:0-4cy; (s. Tabelle 14)	Archaea (vorliegende Arbeit)
p-PLEL	n-Alkane: n16:0 und n18:0 (s. Tab. 16)	Clostridien (vorliegende Arbeit)
x-PLEL	<u>Einfach verzweigte Alkane und n-Alkane</u> : ib16:0, n16:0, ib17:0, ai17:0, i18:0, n18:0, i19:0, ai19:0	<i>Thermodesulfobacterium commune</i> (Langworthy <i>et al.</i> , 1983); <i>Thermotoga maritima</i> (De Rosa <i>et al.</i> , 1988; De Rosa <i>et al.</i> , 1989); <i>Aquifex pyrophilus</i> (Huber <i>et al.</i> , 1992)
y-PLEL	<u>Isoprenoide</u> : i19:0; i26:0 (mit einer Ethylverzweigung)	Bisher noch nicht in Reinkulturen nachgewiesen. Nach Vink <i>et al.</i> (1998) könnte i26:0 aus Archaeen stammen

3.1.3.2. Taxonomische Bedeutung der PLFA-Biomarker

Dadurch, daß es hinsichtlich der PLFA-Fraktionen zu mehreren Überschneidungen zwischen den Domänen *Bacteria*, *Eucarya* und *Archaea* kommt, lassen diese Biomarker im Vergleich zu den PLEL-Isoprenoiden nur eine "unschärfere" taxonomische Differenzierung zu. In Tab. 19 sind diese Merkmale zusammengestellt, die auf den vorliegenden Untersuchungen als auch auf den Arbeiten von Zelles (1997; 1999a und 1999b) basieren.

Tabelle 18: PLFA als Biomarker für Organismen der Domänen *Bacteria*, *Eucarya* und *Archaea*

PLFA	<i>Bacteria</i>	<i>Eucarya</i>	<i>Archaea</i>
SATFA	+	+	(+)
MUFA	+	+	(+)
PUFA	(+)	+	(+)
PLOH	+	(+)	(+)
UNOH	+	+	+
UNSFAs	+	+	+

Angaben in Klammern verweisen auf vergleichsweise niedrige Gehalte an den jeweiligen PLFA

Inwieweit sich einzelne Subgruppen diverser PLFA-Fraktionen, wie z.B. α -UNOH (charakteristisch für *Sphingomonas spp.* nach Balkwill *et al.*, 1997) oder sogar einzelne Fettsäuren, wie z.B. 18:2 ω 6

(nach Frostegård *et al.*, 1996 charakteristisch für Pilze) zum spezifischen Nachweis von Organismen auf dem Gattungs- oder Domänenniveau eignen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Zelles, 1999a). Präzisere Aussagen werden gewonnen, wenn möglichst viele, potentiell vorkommende PLFA einer Organismengruppe zur taxonomischen Differenzierung in komplexen Gemeinschaften bzw. Systemen herangezogen werden (Zelles, 1999a; 1999b).

3.1.3.3. Berechnung von Zellzahlen im Ökosystem auf der Basis von PLEL- und PLFA-Konzentrationen

Wie bereits erwähnt, wurde in den insgesamt 12 Lipidextrakten aus *Archaea* eine durchschnittliche PLEL-Konzentration von rund $4,1 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS (Median: $3,5 \mu\text{Mol g}^{-1}$) festgestellt. Jedoch kann aus diesen Daten nicht auf eine allgemeingültige, durchschnittliche PLEL-Konzentration in Archaeen geschlossen werden. Dafür wäre die Analyse einer größeren Anzahl von Archaeen-Reinkulturen nötig. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der von Nichols *et al.* (1987) ermittelte Wert von $2,5 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS zur Umrechnung von Biomarker-Konzentrationen in Archaeenzellzahlen benutzt. In der mikrobiellen Ökologie wurde dieser Faktor schon mehrfach eingesetzt (Nichols *et al.*, 1987; Mancuso *et al.*, 1990; Boon *et al.*, 1996; Guezennec und Fiala-Medioni, 1996, Bai *et al.*, 2000; Wachinger *et al.*, 2000), so daß bei dessen Verwendung eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen dieser Autoren gewährleistet ist.

Aufgrund der bereits dargestellten Sachverhalte läßt sich auf der Basis von PLFA-Biomarker nur eine vergleichsweise grobe Ermittlung von Zellzahlen realisieren. In den Arbeiten von White *et al.*, (1979) und Balkwill *et al.* (1988) wurde ausgehend von *E. coli* ein Wert von $100 \mu\text{Mol PLFA g}^{-1}$ TS Bakterien-Zellmaterial vorgeschlagen und ein Näherungswert ermittelt, wonach 1 g Bakterienbiomasse $5,9 \times 10^{12}$ Zellen entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar in den drei Bakterienstämmen eine durchschnittliche PLFA-Konzentration von $30 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS ermittelt, doch kann dieser Wert, aufgrund der niedrigen Anzahl von Proben, nicht für allgemeingültige Zellzahl-Bestimmungen empfohlen werden. In der Literatur wurde bisher nur von dem bereits erwähnten Umrechnungsfaktor von $100 \mu\text{Mol g}^{-1}$ TS berichtet, so daß dieser auch in dieser Arbeit zur Bestimmung von bakteriellen + eukaryotischen Zellen herangezogen wurde.

Folgende Umrechnungsformeln fanden Anwendung bei der Ermittlung von mikrobiellen Biomassen bzw. Zellzahlen:

$$\underline{\text{Euryarchaeota/Crenarchaeota}}: \text{Zellzahl} = \frac{C_{i\text{-PLEL}}}{2 \times 2,5 \times \text{DFF} \times (100 / \text{TS}_{\text{Gehalt}})} \quad 5,9 \times 10^{12}$$

$$\underline{\text{Bacteria +Eucarya}}: \text{Zellzahl} = \frac{C_{\text{PLFA}}}{100 \times \text{DFF} \times (100 / \text{TS}_{\text{Gehalt}})} \quad 5,9 \times 10^{12}$$

Zellzahl:	Zellzahl pro Volumen Frischsubstanz [cm^{-3}]
$C_{i\text{-PLEL}}$:	Konzentration i-PLEL [$\mu\text{Mol g}^{-1} \text{TS}$]
C_{PLFA} :	Konzentration PLFA [$\mu\text{Mol g}^{-1} \text{TS}$]
DFF:	Dichte des feldfeuchten Bodens [g cm^{-3}]
$\text{TS}_{\text{Gehalt}}$:	Trockensubstanzgehalt [%]

3.2. Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in entwässerten (oxischen) und wiedervernässten (anoxischen) Niedermoorökosystemen

3.2.1. Kenndaten der Bodenökosysteme

3.1.2.1. Allgemeine Charakterisierung der Beprobungshorizonte

Vom Versuchsstandort Donaumoos (s. Abb. 6) wurden zu vier verschiedenen Terminen Bodenproben entnommen. Die Referenzfläche (R) stellte eine entwässerte Grünlandfläche dar, die zu allen Beprobungsterminen in dem Beprobungshorizont einen Anteil an wassergesättigtem Porenvolumen $\text{WFPS} < 100\%$ aufwies (Tab. 20). Dieses Bodenökosystem wird als oxisch bezeichnet, da noch Luft bzw. O_2 führender Porenraum zur Verfügung stand.

Die Beprobungshorizonte in Becken 1 und 2 (B1 und B2) werden als anoxisch bezeichnet, da zu allen Beprobungsterminen das wassergefüllte Porenvolumen $\text{WFPS} > 100\%$ war, was durch den permanenten Wasserpegel von 40 bzw. 20 cm verursacht wurde. Am O_2 -Gehalt des Beckenwassers wird bereits ein Gradient der Anoxie zwischen B1 und B2 sichtbar. Dieser war in B2 immer höher als in B1, was auf einen höheren Anteil an anaeroben Prozessen in B2 schließen lässt.

Tabelle 19: Beschreibende Parameter der Versuchspartzen (Donaumoos)

	November 1998 (14.11.98)			Februar 1999 (25.02.99)			Mai 1999 (03.05.99)			September 1999 (16.09.99)		
	R	B1	B2	R	B1	B2	R	B1	B2	R	B1	B2
PV [%]	58,4	68,6	73,7	60,8	55,6	65,4	62,0	55,8	60,2	53,9	63,4	67,7
WFPS [%]	96,7	132,5	127,4	98,8	145,5	135,8	84,1	142,4	133,7	46,4	128,5	125,1
pH (im Boden) ^a	---	---	---	---	---	---	6,7/6,6	7,5/7,3	7,6/7,5	---	---	---
Wasserstand [cm]	-9	40	20	-6	40	20	-68	40	20	-117	40	20
Wassertemp. [°C] ^b	---	---	---	---	---	---	8,8	16,0	15,2	12,9	14,1	15,3
O ₂ -Gehalt [mg L ⁻¹] ^b	---	---	---	---	---	---	0,2	6,7	2,6	0,1	2,9	0,7
pH (im Wasser) ^c	---	7,30	7,57	---	7,74	7,92	---	7,47	7,56	---	7,29	7,60
Wassertemp. [°C] ^c	---	4,97	4,58	---	2,19	2,18	---	17,49	17,44	---	14,56	16,00
Leitfähigkeit (mS cm ⁻¹) ^c	---	0,97	0,81	---	0,77	0,77	---	0,92	0,88	---	0,92	0,78
O ₂ -Gehalt [mg L ⁻¹] ^c	---	11,21	9,81	---	18,14	17,08	---	5,06	4,99	---	2,31	2,92

^a pH Werte: pH_{H2O}/pH_{CaCl2}

^b Werte ermittelt mit Sauerstoffaschenmeßgerät Oxi 340-B; Temperatur und O₂-Gehalt wurden im Grundwasser der Referenzfläche bestimmt

^c Parameter (gemittelte Werte) wurden durch kontinuierliche Messungen an den Meßstationen erfaßt

Folgende Abkürzungen wurden im Verlauf der Arbeit zur vereinfachten Probenbezeichnung verwendet:

Tabelle 20: Bezeichnungen der Proben aus dem Versuchstandort Donaumoos

	Referenzfläche	Becken 1	Becken 2
November 1998	R-1	B1-1	B2-1
Februar 1999	R-2	B1-2	B2-2
Mai 1999	R-3	B1-3	B2-3
September 1999	R-4	B1-4	B2-4

Die Bezeichnungen der beiden Stauwasserproben, entnommen bei der September-Beprobung, lauteten W1 (Becken 1) und W2 (Becken 2).

3.1.2.2. Methanflußraten in den drei Untersuchungspartzen

Parallel zu den Beprobungen für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden Spurengasmessungen durchgeführt. Die Methanflußraten zu den vier Beprobungsterminen sind in Abb. 34 dargestellt.

Die geringsten Flußraten wies zu allen vier Beprobungsterminen mit durchschnittlich $-18,3 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ die Referenzfläche auf, die damit als Netto-Methansenke zu bezeichnen ist. Zum Beprobungstermin November emittierte diese Fläche Methan, was auf Wassersättigung in dem obersten Bodenho-

rizont zurückzuführen ist (vgl. Tab. 20). Aus den überfluteten Flächen wurden dagegen stets Methanemissionen festgestellt. Im Mittel der vier Beprobungen betrug die Emission im Becken 1 $80,7 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ und im Becken 2 $38.609 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$. Der pH-Wert der beiden überstauten Flächen befand sich in dem für die Methanproduktion günstigen Bereich von 7,0-7,5 (Conrad, 1996). Die geringsten Emissionen wurden zum Beprobungstermin Februar gemessen, was mit einer verringerten Mikrobenaktivität bei niedrigen Temperaturen und dem Vorhandensein einer Eisdecke in beiden Becken erklärt werden kann. Der Verlauf der Methanflußraten aus den beiden Becken wies bis auf die September-Beprobung große Ähnlichkeiten auf. Während die höchste Methanemission im Becken 1 bei der Mai-Beprobung festgestellt wurde, wurde der höchste Wert für das Becken 2 im September ermittelt. Auffallend ist, daß die Emissionen aus Becken 2 durchschnittlich 450 mal höher waren als die aus Becken 1. Die Methanaufnahme der Referenzfläche lag im gleichen Bereich, wie die von trockengelegten Mooren in Skandinavien (Martikainen *et al.*, 1995) Dagegen emittieren sowohl "permanent wetlands" (Wassertiefe bis 2,2 m) als auch "ephemeral wetlands" (Wassertiefe 0 bis > 2 m)" in Australien (Boon and Mitchell, 1995; Boon *et al.*, 1996) mehr Methan als Becken 1. Deren Methanflußraten bewegen sich in derselben Größenordnung wie die in Becken 2.

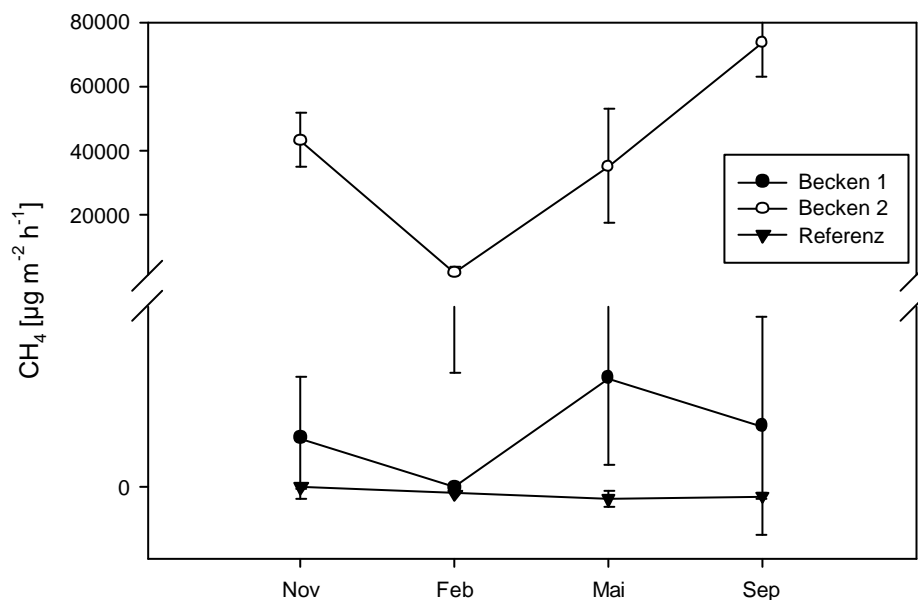


Abbildung 34: Methanflußraten in den 3 Parzellen des Standorts Donaumoos. Fehlerbalken symbolisieren Standardabweichungen.

Aufgrund der hohen Standardabweichungen lassen sich in Becken 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Emissionen zu kalten und warmen Jahreszeiten feststellen.

Die auffallend hohen Standardabweichungen bei einigen der ermittelten Methanflußraten ergeben sich aus der räumlichen Variabilität der Parzellen, die jedoch in Einklang mit den Variationsbereichen anderer Autoren ist (in Ambus und Christensen, 1995), jedoch führt dies dazu, daß in Becken 1 zwischen den Beprobungen keine statistisch absicherbare Unterschiede in den Methanemissionen vorlagen.

Es läßt sich zusammenfassen, daß die Methanflüsse der drei Parzellen jahreszeitlich bedingte Schwankungen zeigten, diese in vielen Fällen jedoch nicht statistisch signifikant waren. Ausgeprägtere Unterschiede liefert dagegen der Vergleich der durchschnittlichen Methanflußraten der drei Flächen: Referenzfläche \leq Becken 1 \ll Becken 2.

3.2.2. Betrachtung von Gesamtpopulationen auf der Basis von Phospholipid-Profilen

3.2.2.1. PLEL- und PLFA-Profile in den Untersuchungsparzellen

Gesamtbetrachtungen

Die Ergebnisse der Analyse der Phospholipidfettsäuren (PLFA) sowie der Phospholipid-Etherlipide (PLEL) sind in den Tabellen 22 bis 25 dargestellt. Um den Überblick zu erleichtern, wurden Fraktionen bzw. Gruppen von Fettsäuren und Etherlipide anhand ihrer chemischen Eigenschaften zusammengefaßt. Dabei stellen die Gesamtphospholipide (PL) die Summe aus PLFA und i-PLEL dar; die Addition von p-, x-, und y-PLEL ergibt pxy-PLEL. Die Anzahl der zu der jeweiligen Gruppe gehörenden Biomarker sind in der linken Spalte, die absoluten Konzentrationen sind jeweils in der mittleren Spalte und der relative Anteil der einzelnen Gruppen (in Mol%) an den Gesamtphospholipiden bzw. pxy-PLEL sind in der rechten Tabellenspalte aufgeführt. Die Standardabweichungen der einzelnen Fettsäuren und ethergebundenen Kohlenwasserstoffe lagen in dem Bereich von 0-30%, wobei Standardabweichungen $< 15\%$ typisch waren (Daten nicht dargestellt).

Die Anzahl an detektierten PLFA in den Bodenproben der drei Untersuchungsparzellen befindet sich in Einklang mit den Zahlen von Zelles (1999a), für ackerbaulich genutzte oxische und anoxische (Reis-) Böden. In den hiesigen Parzellen bewegte sich die Zahl an detektierten PLFA zwischen 336 in B1-3 und 415 in B2-1 und in den Wasserproben zwischen 74 in W1 und 104 in W2. Dabei wies in allen Proben die UNOH-Fraktion zahlenmäßig die meisten PLFA auf, während die wenigsten

PLFA in der PUFA-Fraktion detektiert wurden. Die höchsten Gesamtphospholipid-Konzentrationen (PL) wurden in den Proben der Referenzfläche festgestellt, während das Konzentrationsniveau in den beiden überstauten Flächen bis auf die November-Beprobung auf ähnlich niedrigerem Niveau war. Das deutet daraufhin, daß in den Proben der Referenzfläche mehr Mikroorganismen vorhanden waren, als in den überstauten Bodenhorizonten. Deutlich weniger PLFA wurden in den Stauwasserproben W1 (2,4 nMol cm⁻³) und W2 (3,2 nMol cm⁻³) bestimmt. Da sich einige PLFA in den Wasserproben nahe der Nachweisgrenze der PLFA-Bestimmung von 0,018 nMol g⁻¹ (Mölter, 2000) bewegten, sind die PLFA-Konzentrationen in Tab. 25 mit drei Dezimalstellen angegeben.

Die Dominanz der MUFA in den Proben der Referenzfläche, die darin einen Anteil zwischen 42,5 und 50,7 mol% einnahmen, ist nach Zelles (1999a) ein Charakteristikum für kultivierte, oxisch geprägte Bodenökosysteme, während in den beiden überstauten Becken, bis auf die November-Beprobung in Becken 1, die Fraktion der SATFA dominierten. In den Wasserproben dagegen überwiegen die nicht-estergebundenen NEL-PLFA, während MUFA nur weniger als 2% der totalen PLFA Konzentration einnahmen, was auf eine völlig andere Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft als in den Bodenproben schließen läßt.

Der in den B2-Proben deutlich höhere Anteil an NEL-PLFA gegenüber den Proben aus den beiden anderen Parzellen charakterisiert ein höheres Vorkommen von anaeroben Organismen in diesem Standort, welches auch durch die höchsten Methanflußraten bestätigt wird. Nach Zelles (1999a) kommen NEL-PLFA in erhöhtem Maße in verschiedenen anaeroben Bakterien vor, und wie aus Kap. 3.1.2 hervorgeht, kommen diese PLFA (UNOH und UNSFA) auch in methanogenen Archaeen vor.

Die Proben der Referenzfläche wiesen tendenziell die höchsten absoluten Konzentrationen an i-PLEL-Biomarkern auf, während in den B1- und B2-Proben diese Biomarker die höheren Anteile an den Gesamtphospholipiden zeigten.

Obwohl zwischen 120 und 160 ethergebundene Kohlenwasserstoffe in den verschiedenen Bodenproben des Standorts Donaumoos festgestellt wurden (s. auch Kap. 3.1.1.4), können nach dem derzeitigen Stand des Wissens, wie in den jeweiligen Tabellen dargestellt, nur 8-10 verschiedene Kohlenwasserstoffe zu den jeweiligen PLEL-Gruppen zugeordnet und für taxonomische Zwecke herangezogen werden. Die Proben der Referenzfläche wiesen dabei eine tendenziell höhere pxy-PLEL-Konzentration auf, als die Proben der beiden anderen Parzellen. In den Wasserproben konnten dagegen keine PLEL-Biomarker nachgewiesen werden.

Tabelle 21: Phospholipid-Zusammensetzung in den Proben aus der Referenzfläche (Donauermoos)

	Referenzfläche											
	November 1998 R-1			Februar 1999 R-2			Mai 1999 R-3			September 1999 R-4		
	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%
SATFA	65	98,9	34,9	76	112,5	36,6	72	85,4	39,4	54	130,9	39,0
MUFA	43	137,7	48,6	38	155,8	50,7	31	92,0	42,5	40	140,1	41,8
PUFA	24	6,0	2,1	26	10,7	3,5	24	7,0	3,2	22	6,5	1,9
PLOH	92	7,9	2,8	66	2,7	0,9	67	4,6	2,1	80	8,3	2,5
EL-	224	250,5	88,3	206	281,7	91,7	194	188,9	87,3	196	285,8	85,3
UNOH	99	14,2	5,0	115	7,2	2,3	98	7,5	3,4	112	18,9	5,7
UNSFAs	52	14,5	5,1	73	12,7	4,1	68	16,5	7,6	67	24,3	7,2
NEL-	151	28,8	10,1	188	19,9	6,5	166	23,9	11,0	179	43,3	12,9
PLFA total	375	279,3	98,5	394	301,7	98,2	360	212,8	98,3	375	329,1	98,2
EURY-	7	2,4	0,8	5	3,1	1,0	5	2,4	1,1	5	3,2	0,9
CREN-	2	1,9	0,7	2	2,3	0,7	2	1,2	0,6	2	3,0	0,9
i-PLEL	9	4,3	1,5	7	5,4	1,8	7	3,6	1,7	7	6,2	1,8
PL	384	283,6	100,0	401	307,1	100,0	367	216,5	100,0	382	335,3	100,0
p-PLEL	2	8,6	74,7	2	13,6	70,8	2	10,6	76,5	2	18,2	68,1
x-PLEL	6	2,5	21,6	7	4,8	24,9	7	2,9	20,5	5	7,2	26,9
y-PLEL	1	0,4	3,7	1	0,8	4,3	1	0,4	2,9	1	1,3	5,0
pxy-PLEL	9	11,5	100,0	10	19,2	100,0	8	13,9	100,0	8	26,8	100,0

n: Anzahl Biomarker; Konz.: Konzentration in nMol cm⁻³ FS

Tabelle 22: Phospholipid-Zusammensetzung in den Proben aus Becken 1 (Donauermoos)

	Becken 1											
	November 1998 B1-1			Februar 1999 B1-2			Mai 1999 B1-3			September 1999 B1-4		
	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%
SATFA	72	87,4	36,9	69	84,1	45,0	70	71,6	47,1	71	63,0	38,4
MUFA	40	112,3	47,3	33	74,4	39,8	40	56,9	37,4	34	57,0	34,8
PUFA	19	3,6	1,5	17	2,8	1,5	19	3,0	2,0	19	2,4	1,5
PLOH	84	6,5	2,8	69	1,4	0,8	56	3,2	2,1	85	4,8	2,9
EL-	215	209,9	88,5	188	162,6	87,0	185	134,7	88,6	209	127,2	77,6
UNOH	118	11,0	4,6	106	6,6	3,5	84	4,6	3,0	131	12,6	7,7
UNSFAs	66	13,3	5,6	71	13,3	7,1	67	9,8	6,5	72	20,5	12,5
NEL-	184	24,3	10,3	177	19,9	10,7	151	14,4	9,5	203	33,1	20,2
PLFA total	399	234,2	98,7	365	182,5	97,6	336	149,2	98,1	412	160,3	97,7
EURY-	7	2,0	0,8	6	3,1	1,7	5	2,5	1,7	4	2,8	1,7
CREN-	2	1,1	0,5	2	1,3	0,7	2	0,4	0,2	2	0,9	0,5
i-PLEL	9	3,1	1,3	8	4,4	2,4	7	2,9	1,9	6	3,7	2,3
PL	408	237,3	100,0	373	186,9	100,0	343	152,0	100,0	418	164,0	100,0
p-PLEL	2	9,6	81,1	2	5,1	75,9	2	7,8	76,6	2	15,0	73,1
x-PLEL	6	1,7	14,8	7	1,2	17,7	5	1,9	18,6	5	4,2	20,5
y-PLEL	1	0,5	4,1	1	0,4	6,4	1	0,5	4,8	1	1,3	6,4
pxy-PLEL	9	11,8	100,0	10	6,7	100,0	8	10,1	100,0	8	20,5	100,0

Tabelle 23: Phospholipid-Zusammensetzung in den Proben aus Becken 2 (Donauermoos)

	Becken 2											
	November 1998			Februar 1999			Mai 1999			September 1999		
	B2-1			B2-2			B2-3			B2-4		
	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%
SATFA	63	63,6	42,1	64	67,9	46,5	71	75,0	44,7	74	59,3	39,7
MUFA	41	50,2	33,3	35	45,8	31,3	34	58,0	34,5	35	48,9	32,8
PUFA	22	6,2	4,1	22	2,6	1,8	17	2,6	1,5	23	2,2	1,5
PLOH	94	4,6	3,0	69	3,1	2,1	75	3,8	2,2	69	3,9	2,6
EL-	220	124,6	82,6	190	119,4	81,7	197	139,3	82,9	201	114,3	76,5
UNOH	120	8,3	5,5	118	6,7	4,6	113	8,6	5,1	108	12,5	8,4
UNSFAs	75	12,5	8,3	68	13,8	9,4	71	16,5	9,8	73	18,6	12,5
NEL-	195	20,8	13,8	186	20,5	14,1	184	25,1	14,9	181	31,1	20,8
PLFA total	415	145,4	96,4	376	140,0	95,7	381	164,5	97,9	382	145,3	97,3
EURY-	5	4,1	2,7	5	4,4	3,0	5	2,9	1,7	3	2,9	1,9
CREN-	2	1,3	0,9	2	1,8	1,2	2	0,7	0,4	2	1,1	0,7
i-PLEL	7	5,5	3,6	9	6,2	4,3	7	3,5	2,1	5	4,0	2,7
PL	422	150,9	100,0	385	146,2	100,0	388	168,0	100,0	387	149,3	100,0
p-PLEL	2	12,4	73,4	2	8,9	65,6	2	9,4	75,3	2	17,3	72,3
x-PLEL	6	3,5	20,6	7	3,7	27,4	5	2,5	19,9	5	5,2	21,8
y-PLEL	1	1,0	6,0	1	0,9	7,0	1	0,6	4,7	1	1,4	5,9
pxy-PLEL	9	17,0	100,0	10	13,5	100,0	8	12,5	100,0	8	23,9	100,0

Tabelle 24: Phospholipid-Zusammensetzung in den Stauwasserproben (Donauermoos)

	Stauwasserproben (Sep. 1999)					
	W 1			W 2		
	n	Konz.	mol%	n	Konz.	mol%
SATFA	7	0,359	15,0	23	0,642	20,0
MUFA	2	0,023	1,0	2	0,051	1,6
PUFA	4	0,030	1,3	2	0,022	0,7
PLOH	10	0,078	3,3	18	0,138	4,3
EL-	23	0,490	20,5	45	0,853	26,7
UNOH	28	0,251	10,6	37	0,281	8,8
UNSFAs	23	1,611	68,8	22	2,045	64,6
NEL-	51	1,861	79,5	59	2,325	73,3
PLFA total	74	2,351	100,0	104	3,178	100,0
PLEL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

In den Bodenproben nahmen die p-PLEL Verbindungen den größten Anteil an der totalen pxy-PLEL-Konzentration ein. Es wurden zwar p-PLEL, wenn auch in niedrigen Konzentrationen, in Clostridienstämmen nachgewiesen (s. Tab. 16), doch liegen keine Angaben über deren durchschnitt-

lichen Gehalte in einer größeren Auswahl von Clostridien und anderer Plasmalogen-haltigen Mikroorganismen vor. Daher können keine Aussagen getroffen werden, ob eine absolute Konzentration an p-PLEL von $18,2 \text{ nMol cm}^{-3}$ FS in der Probe R-4 gegenüber einer i-PLEL-Konzentration von $7,6 \text{ nMol cm}^{-3}$ FS mit einem größeren Vorkommen von *Clostridia* gegenüber *Archaea* einhergeht.

Zwischen 14,8 in B1-2 und 26,9 in R-4 bewegten sich die prozentualen Anteile der x-PLEL, woraus gefolgert werden kann, daß diese Biomarker in signifikantem Maße in Moorökosystemen auftreten und zudem berechtigte Gründe zur Annahme bestehen, daß in diesen Bodenhorizonten jene Bakterien vorkommen, welche phylogenetisch den Organismen *Thermodesulfobacterium commune*, *Thermotoga* und *Aquifex* sehr nahe stehen. Bisher wurden solche PLEL-Verbindungen nur in den genannten Organismen nachgewiesen, die ausschließlich thermophile bzw. hyperthermophile Wachstumsbedingungen aufweisen (Langworthy *et al.*, 1983; De Rosa *et al.*, 1988; De Rosa *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 1992).

Vergleich von mikrobiellen Populationen

Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die log-transformierten Werte der einzelnen PLFA- bzw. i-PLEL-Biomarker (in Mol%) der Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Der Datensatz umfaßte insgesamt 702 Einträge an PLFA- und i-PLEL-Biomarkern.

Aus Abb. 35 geht hervor, daß nicht nur Unterschiede in der Phospholipid-Zusammensetzung in den Proben aus den verschiedenen Parzellen bestehen, sondern auch Unterschiede, bedingt durch die verschiedenen Probenahmezeitpunkte. In PCA I, wo die Biomarker-Daten aller Proben berücksichtigt wurden, setzen sich die Profile der beiden Gewässerproben W1 und W2 deutlich von den Bodenproben ab. Bei den letztgenannten ist eine deutliche Separation der Profile aus der September-Beprobung von allen anderen Phospholipid-Profilen zu erkennen, die aus den Proben R-2 und aus Proben des Cluster X stammten. In einer zweiten Hauptkomponentenanalyse (PCA II) wurden die letztgenannten Lipid-Profile (R-2 und Cluster X) genauer betrachtet, wobei eine Separation in „Referenzfläche“ und „Becken 1 & 2“ sichtbar wurde.

Zur Interpretation der unterschiedlichen mikrobiellen Populationen werden die Daten aus den Tabellen 22-25 herangezogen: Die stark abweichende Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den beiden Gewässerproben ist auf den vergleichsweise niedrigen Anteil an EL-PLFA bzw. auf den relativ hohen Anteil an NEL-PLFA zurückzuführen. Hinter dem hohen Anteil an NEL-PLFA können

sich anaerobe Bakterien und eukaryotische Mikroorganismen, wie Algen, Pilze und Protozoen verbergen (s. Tab. 1).

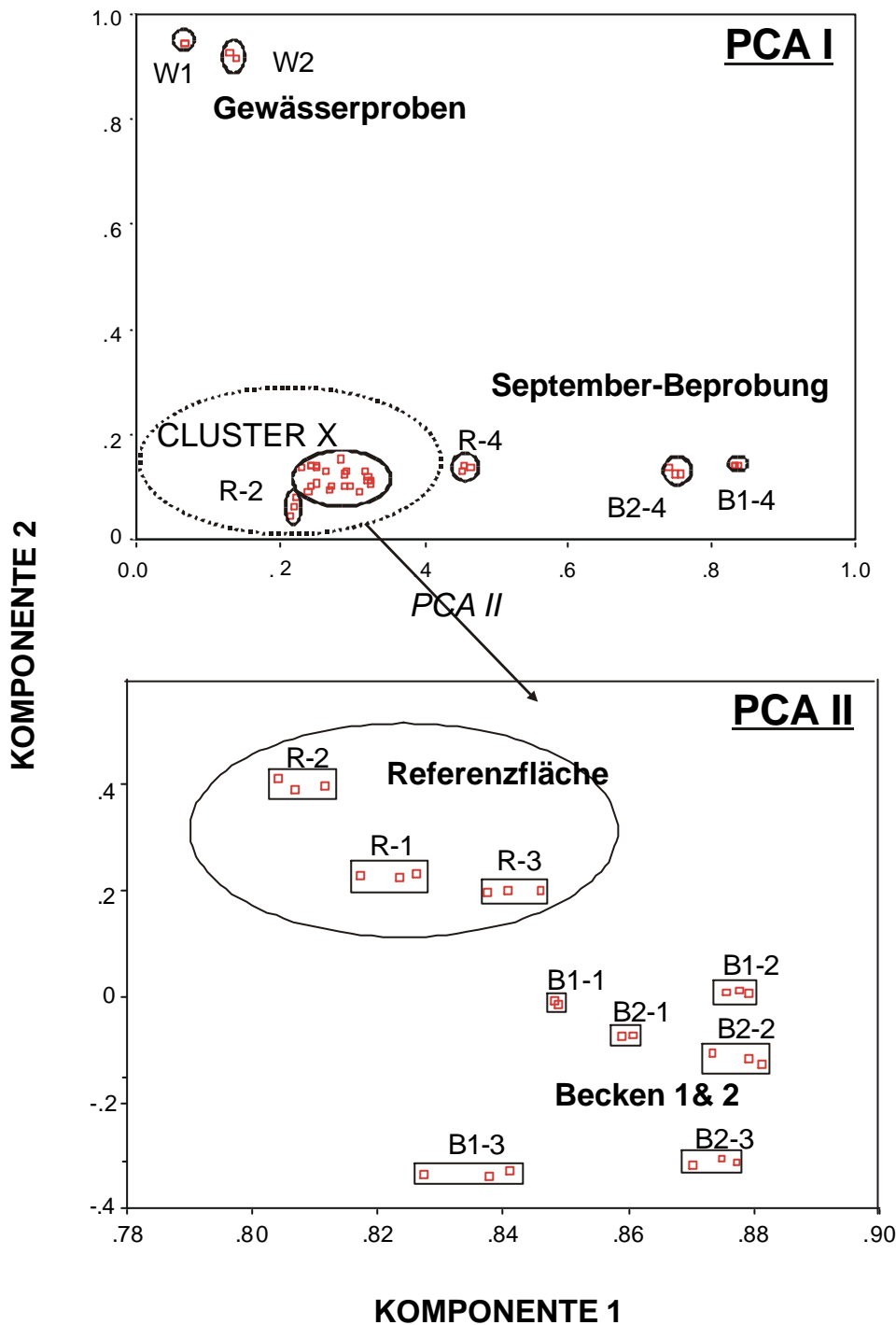


Abbildung 35: Hauptkomponentendiagramm der Phospholipid-Zusammensetzung in den verschiedenen Proben aus dem Standort Donaumoos

Die Lipid-Profile in den Proben R-4, B1-4 und B2-4 unterscheiden sich von denen aus allen anderen Bodenproben durch den vergleichsweise hohen Anteil an NEL-PLFA, bzw. den relativ geringen

Anteil an EL-PLFA. Innerhalb dieser Profilgruppe weisen B1-4 und B2-4 aus den anoxischen Horizonten die größte Ähnlichkeit auf. Die Population dieser beiden Proben zeichnet sich durch einen ähnlich hohen Anteil an Archaeen aus, was aus den i-PLEL-Konzentrationen von 2,3% in B1-4, bzw. 2,7% in B2-4 hervorgeht. In R-4 wurden dagegen nur 1,8% i-PLEL festgestellt und eine niedrigere Konzentration an UNOH-Biomarker, die ebenso auf einen geringeren Anteil an Archaeen hindeutet. Die Proben aus dem Cluster „Referenzfläche“ (PCA II) weisen einen höheren Anteil an SATFA, MUFA und einen tendenziell höheren Anteil an PUFA auf, als die Proben aus Becken 1 und 2. MUFA sind charakteristisch für Gram-negative Bakterien, PUFA für Eukaryoten, insbesondere Pilze (s. Tabelle 1). Innerhalb der Gruppe „Becken 1 & 2“ weisen die Lipidprofile aus der November- und Februar-Beprobung die größte Ähnlichkeit zueinander auf, während sich die Proben aus der Mai-Beprobung (B1-3 und B2-3) von diesen stärker unterscheiden. Letztere zeichnen sich durch eine erhöhte i-PLEL-Konzentration in B1-3 und durch einen erhöhten Anteil an NEL-PLFA in Becken 2 aus.

3.2.2.2. Bestimmung von Zellzahlen auf der Basis von PLEL/PLFA-Konzentrationen

Mit Hilfe der in Kap. 3.1.3.3 erstellten Umrechnungsformeln wurden ausgehend von i-PLEL- und PLFA-Konzentrationen mikrobielle Zellzahlen ermittelt. Die Werte für die gesamte Mikroorganismengemeinschaft ergaben sich demnach aus der Summe der Teilpopulationen (Tab. 26). Die Gesamtzellzahlen (*Archaea+Bacteria+Eucarya*) erstreckten sich von $0,14 \times 10^9$ in W1 bis $26,7 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$ FS in R-4 und befanden sich damit in einem Bereich, den Boon *et al.* (1996) durch Phospholipid-Analysen für zwei australische Feuchtgebiete ermittelt hatten. Die höchsten Gesamtzellzahlen wurden in den Proben der Referenzfläche festgestellt, während in den beiden überstauten Becken keine signifikanten Unterschiede vorlagen. In der Referenzfläche war zur September-Beprobung die Mikroflora bzw. die mikrobielle Biomasse am größten. In den Proben aus den beiden überstauten Becken dagegen wurde im November (B1), bzw. Februar (B2) die größte Gesamtzellzahl ermittelt. Die signifikant höchsten Zellzahlen an *Bacteria+Eucarya* wurden in den Proben der Referenzfläche festgestellt, wohingegen die überstauten Parzellen keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen dieser Organismen aufwiesen.

Tabelle 26: Zellzahlen [$\times 10^9 \text{ cm}^{-3}$ FSJ] in den Donaumoosproben ausgehend von i-PLFEL- und PLFA-Konzentrationen

	Mittelwerte																
	R-1	R-2	R-3	R-4	B1-1	B1-2	B1-3	B1-4	B2-1	B2-2	B2-3	B2-4	W1	W2	R	B1	B2
Archaea	5,03	6,36	4,58	7,32	3,62	5,24	3,40	4,09	6,47	7,29	4,17	4,68	n.d.	n.d.	5,9 ^a	4,1 ^a	5,7 ^a
Eury-	2,75	3,69	2,86	3,76	2,34	3,65	2,97	3,05	4,88	5,19	3,36	3,38	n.d.	n.d.	3,3 ^a	3,0 ^a	4,2 ^a
Cren-	2,28	2,66	1,42	3,56	1,28	1,59	0,44	1,04	1,59	2,10	0,81	1,30	n.d.	n.d.	2,5 ^b	1,1 ^a	1,5 ^a
Bac + Euc	16,5	17,8	12,6	19,4	13,8	10,8	8,80	9,46	8,58	8,26	9,70	8,58	0,14 ^a	0,19 ^b	16,6 ^b	10,8 ^a	8,8 ^a
Arch+Bac+Euc	21,5	24,2	17,1	26,7	17,4	16,0	12,2	13,6	15,0	15,5	13,9	13,3	0,14 ^a	0,19 ^b	22,4 ^b	14,8 ^a	14,4 ^a
% Archaea	23,4	26,3	26,7	27,4	20,8	32,7	27,9	30,2	43,0	46,9	30,1	35,3	---	---	26,0 ^a	28,0 ^a	38,8 ^b
% Euryarchaeota	12,8	15,3	16,7	14,1	13,4	22,8	24,3	22,5	32,4	33,4	24,2	25,5	---	---	14,7 ^a	20,8 ^a	29,0 ^b
% Crenarchaeota	10,6	11,0	8,3	13,3	7,4	9,9	3,6	7,7	10,6	13,5	5,8	9,8	---	---	10,8 ^a	7,2 ^a	9,9 ^a

Unterschiedliche Buchstaben indizieren unterschiedliches Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$)

Die Archaeenzellzahlen erstreckten sich von $3,4 \times 10^9$ in B1-3 bis $7,3 \times 10^9$ cm⁻³ FS in R-4. Diese Zahlen bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie jene, ermittelt in australischen Feuchtgebieten (Boon *et al.*, 1996) und in chinesischen Reisböden (Bai *et al.*, 2000). Die drei Flächen im Donaumoos unterschieden sich zwar nicht in der Archaeen-Gesamtzellzahl, jedoch wies das Becken 2 mit 38,8% den signifikant höchsten Anteil von Archaeen an der gesamten mikrobiellen Zellzahl im Vergleich zu den beiden anderen Parzellen auf. Es wurden in den Proben des Becken 2 mit $4,2 \times 10^9$ cm⁻³ FS die höchsten Zellzahlen an *Euryarchaeota* nachgewiesen werden, jedoch unterschieden sich diese nicht signifikant von den Proben der beiden anderen Parzellen. Es konnte in den B2-Proben mit 29,0% der höchste Anteil an *Euryarchaeota* in der mikrobiellen Biomasse festgestellt werden, was auch die signifikant höchsten Methanflußraten in Becken 2 erklärt. Die meisten *Crenarchaeota*-Zellen wurden mit $2,5 \times 10^9$ cm⁻³ FS in den Proben der Referenzfläche gemessen, signifikant niedrigere Abundanzen wiesen dagegen die Proben aus den überstauten Becken auf. Während in diesen Proben 2-3 mal mehr *Euryarchaeota* als *Crenarchaeota* vorhanden waren, konnten in den Proben der Referenzfläche nahezu gleiche Abundanzen beider Organismengruppen nachgewiesen werden, was auf eine abweichende Archaeenpopulation im Vergleich zu B1 und B2 hindeutet und auch den vorwiegend oxischen Charakter dieser Fläche widerspiegelt. Auch Bai *et al.* (2000) bestimmten mehr *Crenarchaeota* in entwässerten als in überstauten Parzellen eines Reisstandortes. In den beiden Gewässerproben W1 und W2 konnten nur Zellzahlen an *Bacteria*+*Eucarya* ermittelt werden. Dabei wies die Probe W2 mit $0,19 \times 10^9$ signifikant mehr Zellen als die Probe W1 auf ($0,14 \times 10^9$ cm⁻³ Wasser). Dies steht im Zusammenhang mit den makroskopisch sichtbaren Algenansammlungen, die im Becken 2 ausgeprägter waren als im Becken 1.

3.2.3. Charakterisierung von mikrobiellen Populationen mit molekularbiologischen Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bodenproben aus dem Becken 1 und 2 aus der Mai-Beprobung sowie Boden- und Wasserproben derselben Flächen aus der September-Beprobung molekularbiologischen Untersuchungen unterzogen. Gesamtzellzahlen wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI, Bakterienzellen mit der 16S rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonde EUB338 und Archaeenpopulationen mit der Oligonukleotidsonde ARCH915 ermittelt (s. Tab. 8).

3.1.2.1. *In situ*-Detektion mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

In Abb. 36 sind repräsentativ für die *in situ*-Detektion von Mikroorganismen in den beprobten Bodenhorizonten DAPI-gefärbte Zellen und solche, die mit der Sonde EUB338 reagierten, dargestellt. Bereits aus dem qualitativen Vergleich der Aufnahmen A und B wird ersichtlich, daß nicht alle DAPI-markierte Zellen (blaue Färbung) Bakterien (rote Färbung) sind. Einige dieser blau gefärbten Zellen reagierten auch mit der ARCH915-Sonde und konnten entsprechend als *Archaea* identifiziert werden. Andere dagegen blieben undedektiert. Es ist unklar, um welche Organismen es sich handelt, die weder mit EUB338 noch mit der Sonde ARCH915 reagierten. Neef *et al.* (1998) fanden heraus, daß z.B. *Verrucomicrobia* und *Planctomyces*, beides Vertreter der Domäne *Bacteria*, nicht mit der Sonde EUB338 hybridisierten.

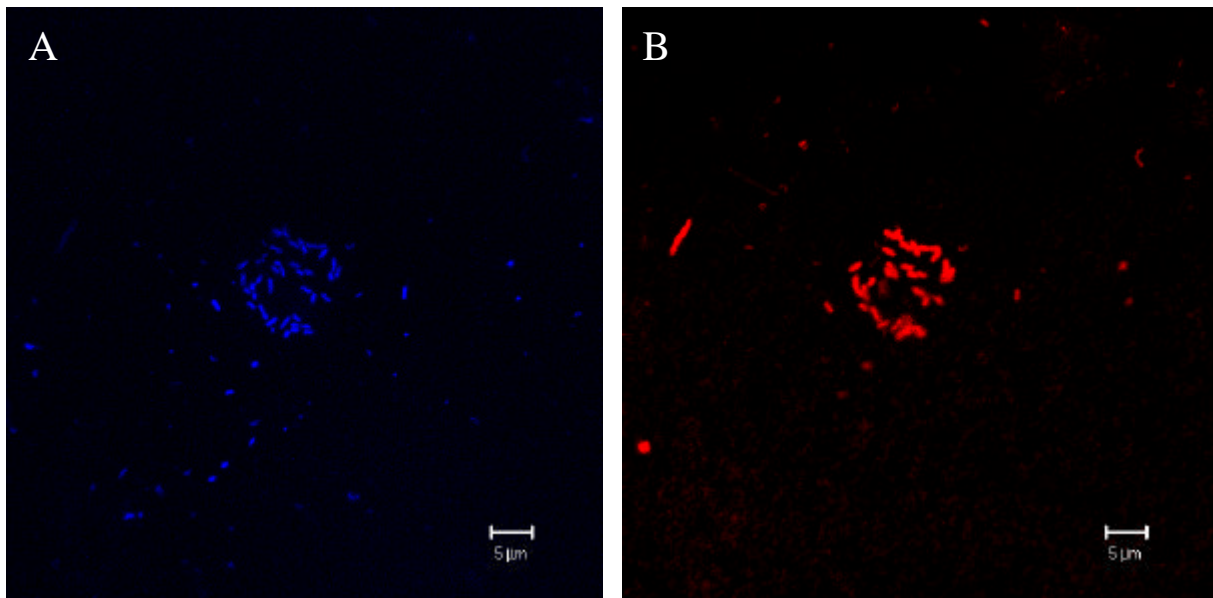


Abbildung 36: *In situ* Detektion von Mikroorganismen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in Bodenproben des Becken 2 (Donaumoos, Mai 1999) visualisiert mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (blau: DAPI; rot: cy3 gekoppelt mit der Sonde EUB338). Aufnahmen A und B zeigen denselben Bildausschnitt.

In Abb. 37 sind repräsentativ für die *in situ*-Detektion von Mikroorganismen in den Wasserproben DAPI-gefärbte Zellen und solche, die mit der Sonde EUB338 hybridisierten, dargestellt. Aus dem qualitativen Vergleich der Aufnahmen B und D fällt auf, daß Aufnahme D (Becken 2) deutlich weniger Hintergrundfärbung (roter Schleier) zeigt, als Aufnahme B (Becken 1) und dadurch auf ein höheres Signal/Hintergrund-Verhältnis in der Gewässerprobe aus Becken 2 schließen läßt. Ein höheres Signal/Hintergrund-Verhältnis läßt auf eine höhere Zellaktivität in der Wasserphase des Becken 2 als

in Becken 1 schließen (M. Stoffels, persönliche Mitteilung). Außerdem unterscheiden sich die Zellen der beiden Becken in ihrer Morphologie. So weisen Aufnahme C und D eine Vielzahl von U-förmigen Mikroorganismen auf, die auf ein mögliches Vorkommen von Corynebakterien im Becken 2 hinweisen (M. Stoffels, persönliche Mitteilung). Die Mikroorganismen in Becken 1 setzen sich dagegen hauptsächlich aus stäbchenförmigen Zellen zusammen. Stark ausgeprägte U-förmige Zellen wie in den Aufnahmen C und D konnten weder in den Aufnahmen A und B noch in anderen mikroskopischen Bildausschnitten (nicht abgebildet) aus dem Becken 1 detektiert werden.

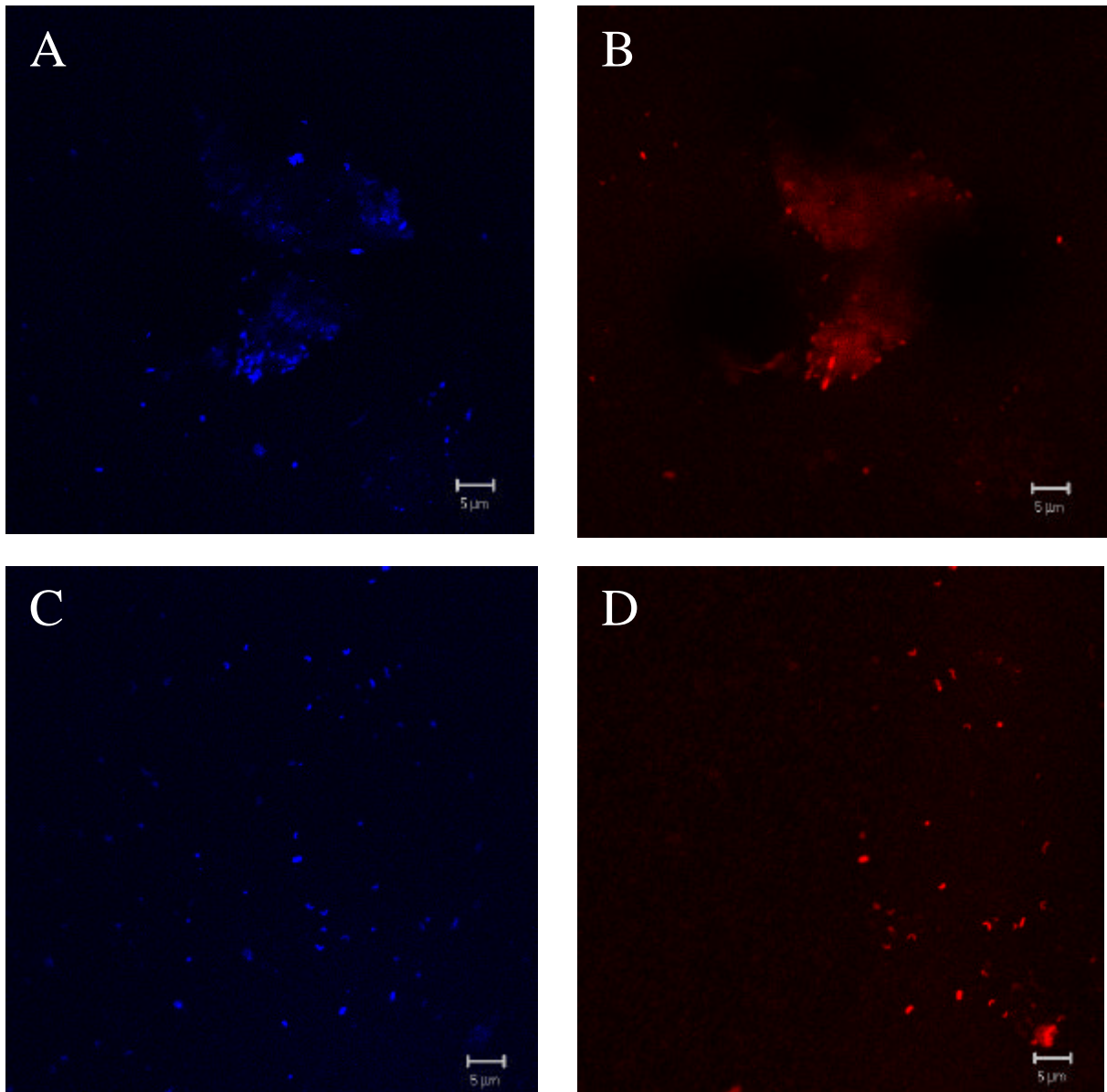


Abbildung 37: *In situ*-Detektion von Mikroorganismen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in Gewässerproben der Becken 1 und 2 (Donaumoos, September 1999) visualisiert mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (blau: DAPI; rot: cy3 gekoppelt mit der Sonde EUB338). Aufnahmen A und B (Becken 1) und Aufnahmen C und D (Becken 2) zeigen jeweils denselben Bildausschnitt.

3.1.2.2. *Quantitative Bestimmung von mikrobiellen Populationen nach DAPI-Färbung und in situ-Hybridisierung (FISH) mittels Epifluoreszenzmikroskopie*

Die mittels DAPI und FISH bestimmten Zellzahlen in den Boden- und Wasserproben der beiden überstauten Becken sind in Abb. 38 dargestellt.

Dabei nahmen die mit ARCH915 markierten Zellen (*Archaea*) einen Bereich von $7,3 \times 10^6$ bis $6,6 \times 10^7$ Zellen pro cm^3 Boden/Wasser ein, während die EUB338 markierten Organismen in Abundanz von $3,2 \times 10^6$ bis $4,1 \times 10^9$ Zellen pro cm^3 Boden/Wasser auftraten. Es ist hierbei anzumerken, daß bei der September-Beprobung die Abundanz der Archaeen im Becken 2, aufgrund sehr niedriger Zellzahlen nicht genau ermittelt werden konnte. Daher wurde deren Anteil lediglich mit $< 0,1\%$ der vorhandenen Mikroorganismengemeinschaft oder mit $< 7,3 \times 10^6$ Zellen pro cm^3 FS angegeben (Tab. 27). Dies kam dadurch zustande, daß bei der mikroskopischen Auswertung der B2-Probe nur in 7 von den 20 ausgezählten Bildausschnitten überhaupt Archaeen detektiert werden konnten. Eine gleichmäßigere Verteilung (in 17 von 20 ausgewählten Bildausschnitten wurden Archaeen detektiert) und dadurch auch entsprechend höhere Zellzahlen wurden in der Bodenprobe aus dem Becken 1 nachgewiesen.

Keine Archaeen konnten in den beiden Gewässerproben aus Becken 1 und 2 detektiert werden. In den Bodenhorizonten der beiden Becken war die Bakterienpopulation um den Faktor 10^2 größer als die der Archaeen, wie aus Tab. 27 hervorgeht. Diese Populationsverhältnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Wachinger *et al.* (2000). Sie detektierten in methanproduzierenden Moorgley-Zylindern bei anaerober Inkubation unter Verwendung des gleichen SONDENSATZES Archaeenzellzahlen von kleiner 10^7 bis $1,4 \times 10^7$ Zellen pro g FS (Boden) und Bakterienzellzahlen, die sich von $2,0$ bis $2,8 \times 10^9$ Zellen pro g FS (Boden) erstreckten. Während bei Wachinger *et al.* (2000) die Archaeenpopulation etwa 7% der Mikroorganismen in hoch produktiven Methan emittierenden Moorgley-Zylindern ausmachte, betrug deren Anteil in dem Bodenhorizont des "hoch produktiven" Becken 2 lediglich zwischen 0,1-0,5% der aktiven Mikroflora (Tab. 27). Die Archaeenpopulation im Becken 1 dagegen war bei der September-Beprobung deutlich größer als die im Becken 2, was sich im Widerspruch zu den signifikant höheren Methanemissionen aus dem Becken 2 befindet (s. Abb. 34). Gründe für diese widersprüchlichen Zellzahlen sind in der Art und Beschaffenheit der Probenmatrix zu suchen. Die FISH-Methode eignet sich vornehmlich für kleine Probenmengen, bzw -volumina mit hohen Zelldichten (Biofilme, Belebtschlamm-Proben, Sedimente). Die vereinigten Bohrkerne der beiden überstauten Becken, aus denen 0,3 ml Probe für

DAPI und FISH entnommen wurden, nahmen insgesamt ein Volumen zwischen 2000 und 3000 ml ein, so daß hohe Anforderungen an die Homogenisierung des Probenmaterials gestellt werden mußten. Obwohl durch ständiges Umrühren die Homogenität einer zähflüssigen Probe, wie die aus den beiden Becken wesentlich erhöht wird, ist nicht auszuschließen, daß bei einer Entnahme von 0,3 ml Probe „nicht-repräsentative“ Bodenkompimente zur Untersuchung gelangen. Dies könnte bei der Probe B2 im September 1999 der Fall gewesen sein. Da *Archaea*, wie mit FISH und DAPI ermittelt wurde, nicht zu den dominanten Organismen der beprobten Bodenhorizonte in den beiden Becken gehören (Abundanz <5%), kam es vor, daß einige der jeweils 20 ausgezählten und zufällig ausgewählten, untersuchten Feldern auf dem Objektträger, keine Archaeen-Zellen aufwiesen, andere dagegen 3, 4 oder 5 Zellen. Diese heterogene Verteilung erklärt auch die große Standardabweichung der Archaeenzellzahlen in Abb. 38. Deutlich geringere Schwankungen dagegen besaßen die Zellzahlen der Wasserproben, obwohl die Zelldichten mit 10^6 und 10^7 Zellen pro cm^3 denen der Archaeen aus B1 und B2 entsprachen und z.T. sogar kleiner waren. In den Wasserproben war offensichtlich eine gleichmäßigere Verteilung der untersuchten Organismen gewährleistet.

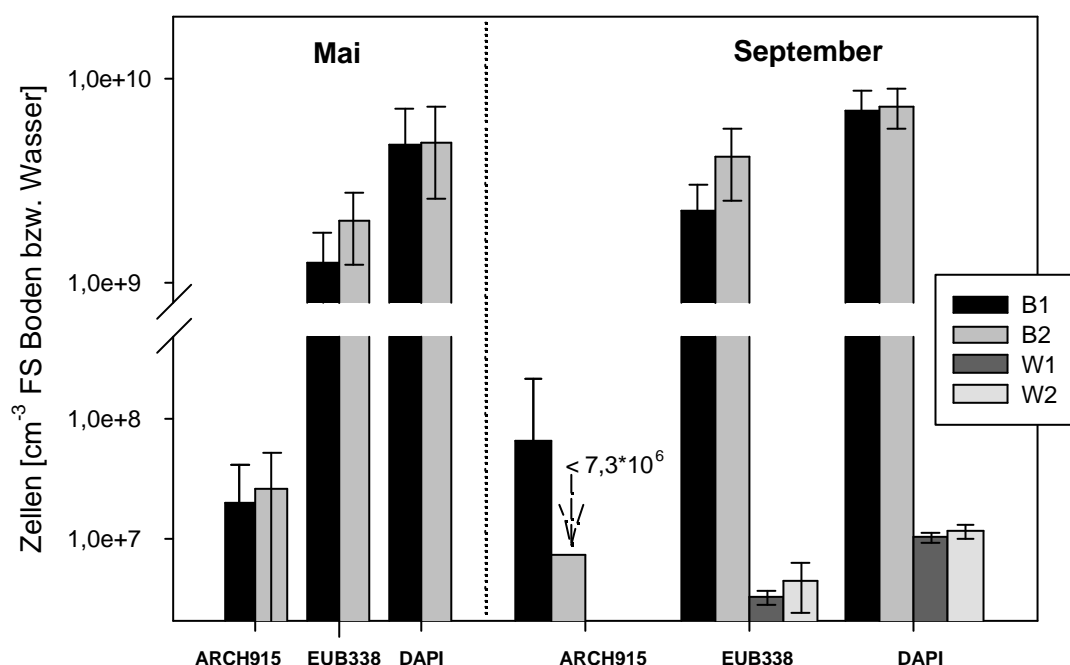


Abbildung 38: Zellzahlen in den Boden- und Wasserproben der beiden überstauten Becken (Donauermoos) nach Anwendung von molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen. Fehlerbalken symbolisieren Standardabweichungen.

Tabelle 26: Zellzahlen von *Archaea* (ARCH915) und *Eubacteria* (EUB338: *Bacteria*) in den jeweiligen Proben des Versuchsstandorts Donaumoos

	Mai 1999		September 1999			
	B1-3	B2-3	B1-4	B2-4	W1	W2
ARCH915	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$6,6 \times 10^7$	$<7,3 \times 10^6$	n.d.	n.d.
% v. DAPI	0,4	0,5	4,3	<0,1%	---	---
EUB338	$1,2 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$	$3,2 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
% v. DAPI	25,5	40,8	31,9	56,2	32,0	39,1
DAPI	$4,7 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$6,9 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
%	100	100	100	100	100	100

3.2.4. Vergleich der mit FISH/DAPI und mit PLEL/PLFA ermittelten Zellzahlen

Zum Vergleich der mittels molekularbiologischen (FISH/DAPI) und biochemischen (i-PLEL/PLFA) Methoden bestimmten Zellzahlen wurden folgende Parameter betrachtet:

- 1) **Archaea:** i-PLEL versus *in situ*-Hybridisierung (FISH) mit ARCH915
- 2) **Bacteria (+ Eucarya):** PLFA versus *in situ*-Hybridisierung (FISH) mit EUB338
- 3) **Gesamtzellzahl (Archaea+Bacteria+Eucarya):** Gesamtphospholipide (PL) versus DAPI

Qualitativer Vergleich

Aus Abb. 39 geht hervor, daß bei der Mai-Beprobung (A) die mit FISH/DAPI ermittelten Zellzahlen den gleichen Trend wiedergeben, wie die mit PLEL/PLFA bestimmten Abundanzen. So konnten sowohl mit PLEL/PLFA als auch mit FISH/DAPI höhere, jedoch nicht statistisch absicherbare, Zellzahlen in den B2-Proben als in den B1-Proben bei allen betrachteten mikrobiellen Populationen ermittelt werden.

Geringfügige Diskrepanzen zwischen den beiden Bestimmungsansätzen sind aus der Darstellung B bei der September-Beprobung zu entnehmen. So wurden in den B1-Proben geringfügig höhere Zellzahlen mit der PLFA und PLFA+PLEL Bestimmung ermittelt, während mit EUB338 und DAPI höhere Zellzahlen in den B2-Proben erzielt wurden. Jedoch lieferte kein Bestimmungsansatz signifikante Unterschiede in den Zellzahlen zwischen den Bodenproben aus Becken 1 und Becken 2. Da bei der September-Beprobung die Abundanz der Archaeen im Becken 2 aufgrund sehr niedriger und ungleich verteilter Zellen nicht genau ermittelt werden konnte, sind deren Abundanzen niedriger als im Becken 1 und konnten lediglich mit $< 7,3 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ FS angegeben werden. Mit der PLEL-

Bestimmung wurden dagegen in B2 geringfügig mehr Archaeen als in B1 ermittelt. In der Gewässerprobe W2 wurden mit der Phospholipid-Methodik signifikant höhere Zellzahlen als in W1 bestimmt. Dieser Trend spiegte sich auch in den FISH/DAPI-Analysen wider, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

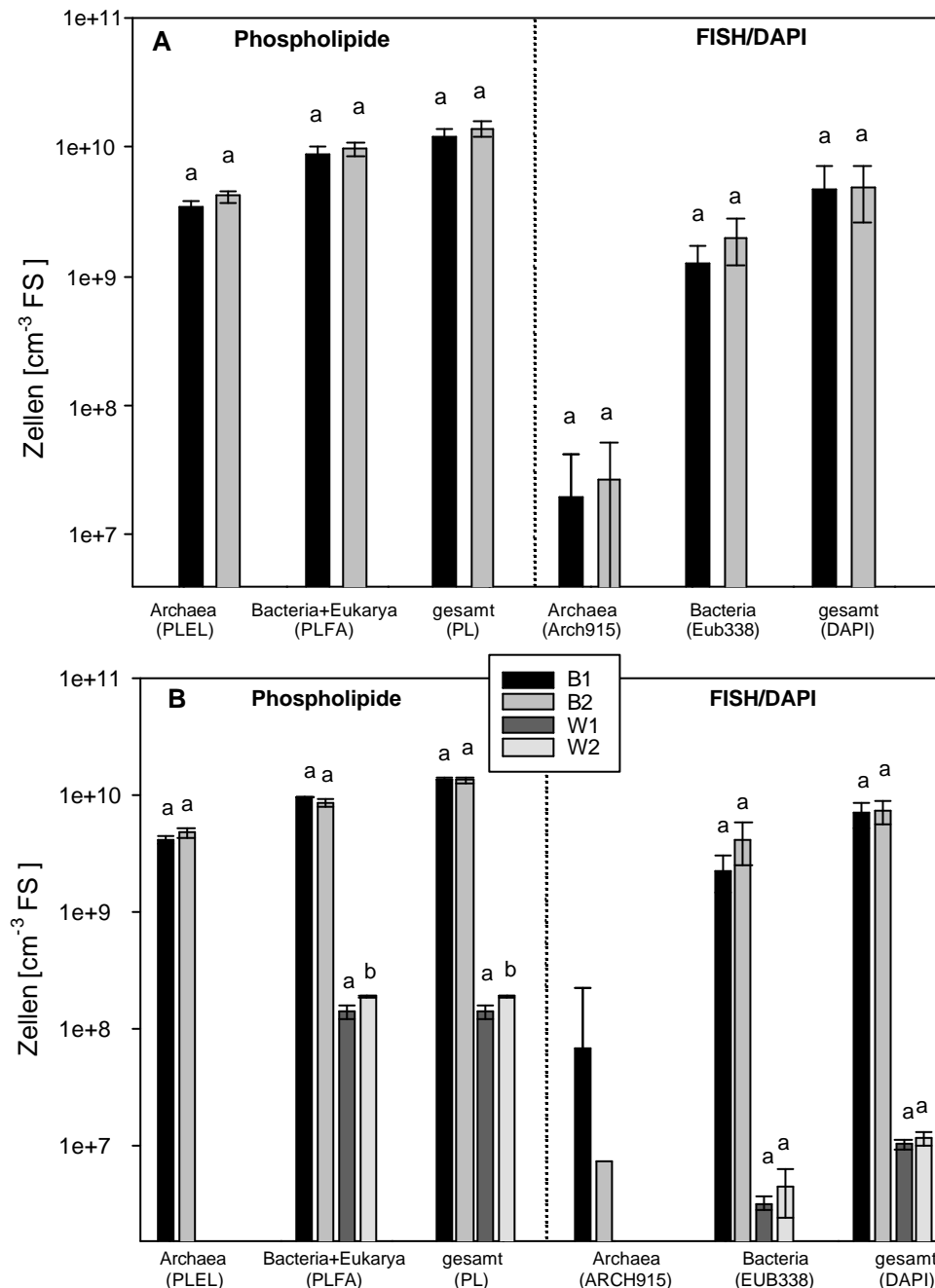


Abbildung 39: Vergleich zwischen Zellzahlen basierend auf Phospholipid-Biomarker und molekularbiologischen Methoden, untersucht in Boden- und Gewässerproben (Donaumörs) im Mai (A) und September 1999 (B). Unterschiedliche Buchstaben indizieren unterschiedliches Signifikanzniveau zwischen B1 und B2 und zwischen W1 und W2.

Quantitativer Vergleich

Bei der Betrachtung der Größenordnungen der mit PLEL/PLFA und mit FISH/DAPI ermittelten Zellzahlen fällt auf, daß aus den PLEL/PLFA-Analysen signifikant höhere Werte resultierten.

Während die Gesamtphospholipide (PL) und auch die PLFA um den Faktor 10 höhere Gesamtzellzahlen ergaben als die auf DAPI und EUB338 basierenden Werte, wurden ausgehend von i-PLEL-Konzentrationen etwa 100 mal mehr Archaeen detektiert, als mit der Oligonukleotidsonde ARCH915. Für diese Diskrepanzen können folgende Erklärungen angeführt werden:

- A) Für Phospholipid-Analysen wurden insgesamt 50 g TS-Äquivalente des frischen Bodenhomogenisates entnommen, während es bei FISH/DAPI weniger als 0,5 g waren, so daß sich für die FISH/DAPI-Methodik wesentlich höhere Anforderungen an die Homogenität der Proben ergaben. Es ist anzunehmen, daß sich diese Problematik nicht nur auf die absoluten Zellzahlen, sondern auch auf den Anteil von mikrobiellen Populationen auswirkte: So wurden in der Probe B1-4 ein Anteil von 30,4% Archaeen, basierend auf Phospholipiden bestimmt (Tab. 26), während mit dem FISH/DAPI-Ansatz nur 4,3% der totalen Mikrobenpopulation als Archaeen detektiert wurden (Tab. 27).
- B) Bei der Bestimmung von Archaeen mit der Sonde ARCH915 wurden nur jene Zellen ausgezählt, die auch eine blaue Färbung zeigten. Küper (1998) detektierte mittels rRNA-Sonden in Belebtschlammproben *Crenarchaeota*, die kaum, bzw. keinerlei DAPI-Färbung zeigten. Dies konnte auch von Bauer (1998) bei FISH-Analysen von Bodenproben bestätigt werden. Dies bedeutet, daß in der vorliegenden Arbeit die mit DAPI ermittelten Gesamtzellzahlen als zu niedrig betrachtet werden können, ebenso die mittels ARCH915 und EUB338 bestimmten Werte, da deren Quantifizierung sich nach den DAPI-Zellzahlen richtete.
- C) Nach Asakawa *et al.* (1998) werden mit der Phospholipid-Methode (i-PLEL und PLFA) zu hohe Zellzahlen bestimmt, da z. T. auch Phospholipide aus toten Zellen extrahiert werden. Im Widerspruch dazu steht die Feststellung von White *et al.* (1979), wonach in Flußsedimenten die Phosphatgruppe der Phospholipide innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach dem Zelltod abgespalten wird und das resultierende Kernlipid dadurch nicht mehr durch die Lipidextraktion als PLFA und i-PLEL erfaßt werden kann. Es bleibt jedoch die Frage, inwieweit Phospholipide, umgeben von Bodenpartikeln, in den betreffenden Niedermoorökosystemen nach dem Zelltod abgebaut werden.

Aus den o.g. Sachverhalten läßt sich das Fazit ziehen, daß i-PLEL/PLFA- und FISH/DAPI- Analysen bei der qualitativen Betrachtung zu weitgehend identischen Ergebnissen führen. Diskrepanzen beim quantitativen Vergleich der beiden Ansätze sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß FISH/DAPI- eher niedrige und PLEL/PLFA-Analysen eher zu hohe Zellzahlen hervorbringen.

3.2.5. Charakterisierung von methanogenen und methanotropen Mikroorganismen mittels spezifischer PLEL- und PLFA-Biomarker

Wie aus Kap. 3.1.2.3 hervorgeht, besitzen die PLEL-Profile von halophilen *Euryarchaeota* große Ähnlichkeiten mit denen von methanogenen *Euryarchaeota*. Da die Beprobungshorizonte im Donaumoos Bedingungen aufweisen, die eher methanogene als halophile Mikroorganismen fördern, ist davon auszugehen, daß durch den Nachweis von EURY-PLEL hauptsächlich Methanogene erfaßt werden.

Es lassen sich aus dem signifikant höheren Anteil an *Euryarchaeota*-Zellen in den B2-Proben zwar Erklärungen für die vergleichsweise hohen Methanemissionen des Becken 2 ableiten, jedoch lassen sich damit nicht die unterschiedlichen Methanflußraten des Becken 1 und der Referenzfläche erklären. Da entstehendes Methan durch methanotrophe Bakterien abgebaut wird, ist es notwendig diese Organismen in die Betrachtungen der mikrobiologischen Ursachen von Methanemissionen miteinzubeziehen.

Die für methanotrophe Bakterien charakteristischen PLFA, die als MOB-PLFA bezeichnet werden, sind in Tab. 28 aufgeführt. Deren Vorkommen wurde in Untersuchungen an methanotropen Rein-kulturen (Bowman *et al.*, 1991) und in Laborstudien an CH₄ abbauenden Bodensäulen (Nichols *et al.*, 1987; Boschker *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1999) belegt. In den Arbeiten von Boschker *et al.* (1998) und Holmes *et al.* (1999) konnte durch ¹³C- bzw. ¹⁴C-Markierung von CH₄ die Markierung in diversen PLFA wiedergefunden und somit ein funktioneller Zusammenhang zum Methanabbau gezeigt werden.

Da im Gegensatz zu den i-PLEL-Biomarkern den ausgewählten MOB-PLFA eine bedeutend niedrigere Spezifität zukommt, kann auf der Basis dieser PLFA keine Ermittlung von Methanotrophen-Zellzahlen erfolgen. Daher wird in diesem Kapitel eine Bilanzierung von Methanogenen- und Methanotrophenpopulationen nicht auf Basis von Zellzahlen, sondern auf Basis von PLEL/PLFA-Konzentrationen durchgeführt.

Tabelle 27: Zusammenstellung der für Methan oxidierende (methanotrophe) Bakterien charakteristischen Fettsäuren (MOB-PLFA)

Typ	MOB-PLFA	Fraktion	in Methanotrophen nachgewiesen ^b	Signalfettsäure ^a
I	14:0*	SATFA	B, C, D	-
I	i15:1	MUFA	A, D	-
I	a15:1	MUFA	D	-
I	16:0*	SATFA	B, C, D	-
I	16:1 ω 5*	MUFA	D, B, C, D	-
I	16:1 ω 6	MUFA	(C), D	-
I	16:1 ω 7	MUFA	D, B, C	-
I	16:1 ω 8	MUFA	B, (C)	+
I	16:1 ω 9*	MUFA	A, C	-
U ^c	16:1 ω 10*	MUFA	A	-
U	16:1 ω 11*	MUFA	A	-
U	i17:0*	SATFA	D	-
U	a17:0*	SATFA	D	-
U	17:1 ω 8	MUFA	D	-
U	i17:1 ω 9	MUFA	A	-
U	17:1 ω 9*	MUFA	A	-
II	18:1 ω 7	MUFA	B, C, D	-
II	18:1 ω 8	MUFA	B, (C), D	+
II	18:1 ω 9*	MUFA	A, B, D	-
II	18:1 ω 10*	MUFA	A	-
II	18:1 ω 11*	MUFA	A	-
II	18:1 ω 13*	MUFA	A, B	-
II	cy19:0*	SATFA	B	-

* sind in den Donaumoos-Flächen nachgewiesen worden

^a Signalfettsäuren sind bisher nur in diesen Organismen nachgewiesen worden

^b Referenzen zusammengestellt aus:

- A: Nichols *et al.* (1987)
- B: Bowman *et al.* (1991)
- C: Boschker *et al.* (1998)
- D: Holmes *et al.* (1999)

^c Die zum Typ bzw. zur Typ U (= unbekannt) gehörenden MOB-PLFA, wurden in nachweislich CH₄ abbauenden Habitaten, nicht jedoch in Reinkulturen bestimmt.

3.2.5.1. Zusammenhang zwischen Methanflußraten und PLEL/PLFA-Konzentrationen

Jahresgang der i-PLEL/MOB-PLFA-Konzentrationen und der Methangasflüsse

Es zeigt sich bereits in Abb. 34, daß die Methanflußraten, besonders in Becken 1 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Beprobungszeitpunkten aufwiesen. Daher soll in diesem Kapitel der jahreszeitliche Trend von Methanflußraten mit den PLEL/MOB-PLFA-Konzentrationen verglichen werden.

In der Darstellung A in Abb. 40 sind die Konzentrationen der für Archaeen charakteristischen PLEL-Isoprenoide der Referenzfläche aufgetragen; Darstellung B zeigt die Konzentrationen der MOB-PLFA sowie die Methanflußraten zu den jeweiligen Zeitpunkten. Der Verlauf der beiden i-

PLEL-Kurven spiegelt eine ausgeprägte Dynamik der Archaeenpopulation wieder. Die höchsten Konzentrationen wurden im September, die niedrigsten im November (EURY-PLEL), bzw. im Mai (CREN-PLEL) gemessen. Interessanterweise wurde die höchste Konzentration der EURY-PLEL, welche am ehesten die Methanogene charakterisieren, bei der September-Beprobung festgestellt, obwohl zu diesem Zeitpunkt der Anteil an wassergefülltem Porenvolumen (WFPS; vgl. Tab. 20) im Beprobungshorizont am niedrigsten war. Während den ersten drei Beprobungen verhalten sich EURY- und CREN-PLEL-Kurven nahezu parallel zueinander, was auf ähnliche Archaeenpopulationen schließen läßt. Zu dem Beprobungstermin im September jedoch nähern sich die Konzentrationen dieser beiden Marker einander an, was auf eine Verschiebung innerhalb der Archaeenpopulation im Vergleich zu den drei vorangegangenen Terminen deutet. Bis auf die November-Beprobung verlaufen die EURY-PLEL Konzentrationen und die Methanabbauraten (Darstellung B) parallel zueinander, was auf methanogene Populationen hindeutet, die aktiv die Methanflußraten in der vorwiegend oxisch geprägten Grünlandfläche beeinflussen.

Die Tatsache, daß methanogene Archaeen, also strikt anaerobe Organismen, in oxischen Bodenhorizonten vorkommen, ist nicht neu. So haben z.B. Peters und Conrad (1995) mittels MPN-Kultivierung Methanogene in einem Marburger Acker- (Dystric Cambisol) und Waldboden (Orthic Luvisol) nachgewiesen. Selbst in israelischen Wüstenböden wurden methanogene *Archaea* festgestellt (Q. Y. Bai, persönliche Mitteilung). Allerdings konnte in den genannten oxischen Bodenökosystemen noch nicht deren Methanproduktion *in situ* nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Arbeit kann nicht geklärt werden, inwieweit es sich um aktive, methanogene Organismen handelte, die als *Euryarchaeota* zu den Beprobungsterminen Mai und September in der Referenzfläche detektiert wurden, wo der Beprobungshorizont ein wassergefülltes Porenvolumen von 85, bzw. 46% aufwies.

Die totalen MOB-PLFA-Biomarker und die der Typ II Methanotrophen zeigten die größte Dynamik auf, wie aus Darstellung B in Abb. 40 hervorgeht. Der Verlauf der gemessenen Konzentrationen ist nahezu identisch. Bei allen Methanotrophen-Gruppen wurden die niedrigsten PLFA-Konzentrationen im Mai festgestellt. Interessanterweise wurden im kältesten Monat Februar hohe MOB-PLFA-Gehalte festgestellt.

Dadurch, daß in der Referenzfläche methanabbauende Prozesse dominierten, wurden die jeweiligen Methanflußraten (= Methanaufnahmeraten), zum besseren Vergleich zu den MOB-PLFA-Konzentrationen in der Grafik B aufgetragen. Bis auf die Mai-Beprobung verliefen die MOB-PLFA-Konzentrationen umgekehrt proportional zu den ermittelten Methanflußraten. Eine umgekehrt pro-

portionale Beziehung zwischen diesen beiden Parametern war auch theoretisch zu erwarten, d.h. eine hohe MOB-PLFA-Konzentration bzw. eine große Methanotrophenpopulation geht mit einer erhöhten Methanabbaurate, bzw einer erniedrigten Methanemission einher: Während die Methanemission von November bis Februar signifikant abnahm, stieg die Konzentration der totalen MOB-PLFA im gleichen Zeitraum an, allerdings war dieser Anstieg nicht signifikant. Bei Betrachtung der Standardabweichungen der Methanflußraten im Mai und September, lassen sich zwischen den Methanaufnahmeraten der Beprobungen Februar, Mai und September keine statistischen Unterschiede feststellen.

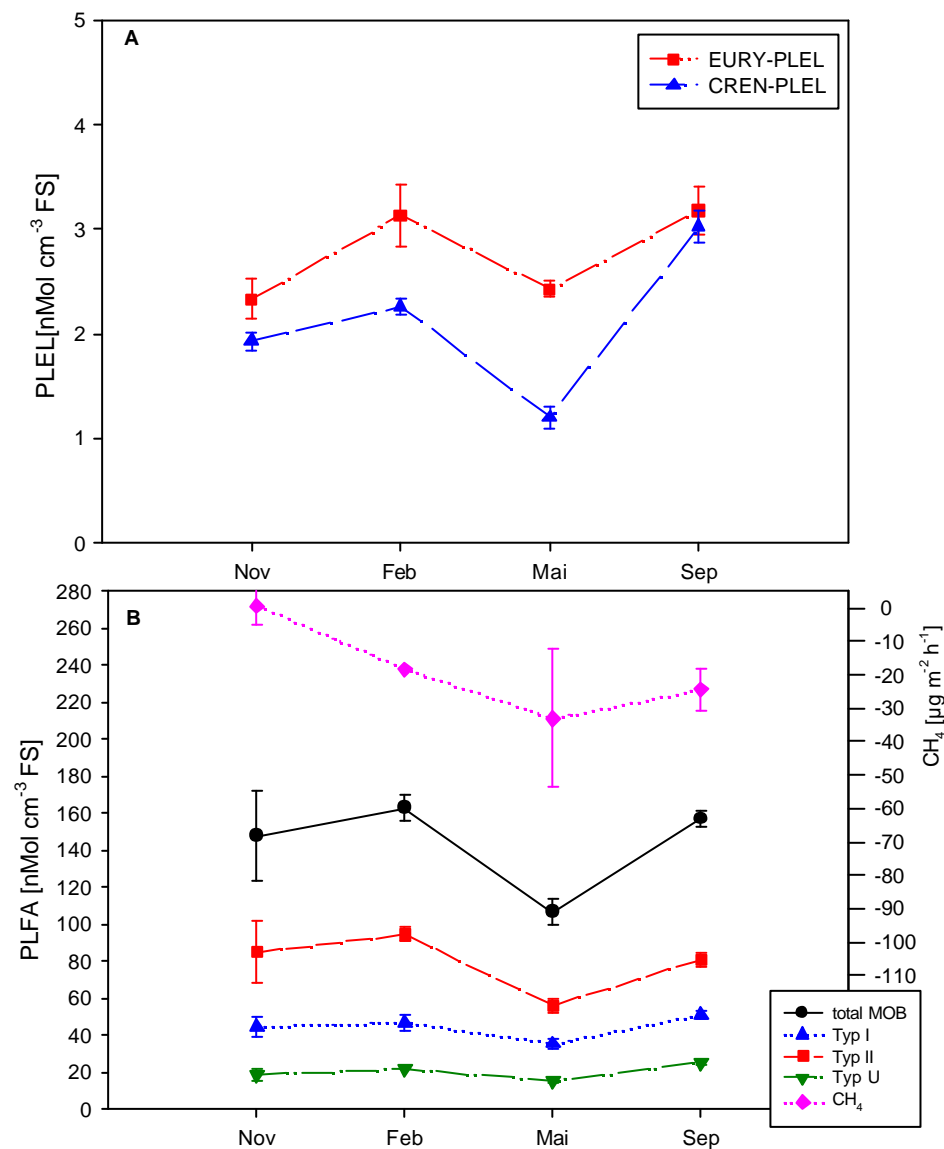


Abbildung 40: i-PLEL/MOB-PLFA-Konzentrationen versus Methanflußraten in der Referenzfläche (Donaumöos). Fehlerbalken symbolisieren Standardabweichungen.

Insofern entsprechen die statistisch gleichen MOB-PLFA Konzentrationen im Februar und September den korrespondierenden Methanflüssen. Lediglich die für den Beprobungszeitpunkt Mai ermittelte MOB-PLFA-Konzentration wich, da sie die signifikant niedrigste darstellte, von der umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen Methanflußraten und MOB-PLFA-Konzentrationen ab. Biomarker der Typ II Methanotrophen wiesen zu allen Terminen signifikant höhere Konzentrationen auf, als die Biomarker charakteristisch für Typ I und Typ U, wobei letztere die niedrigsten Konzentrationen zeigten.

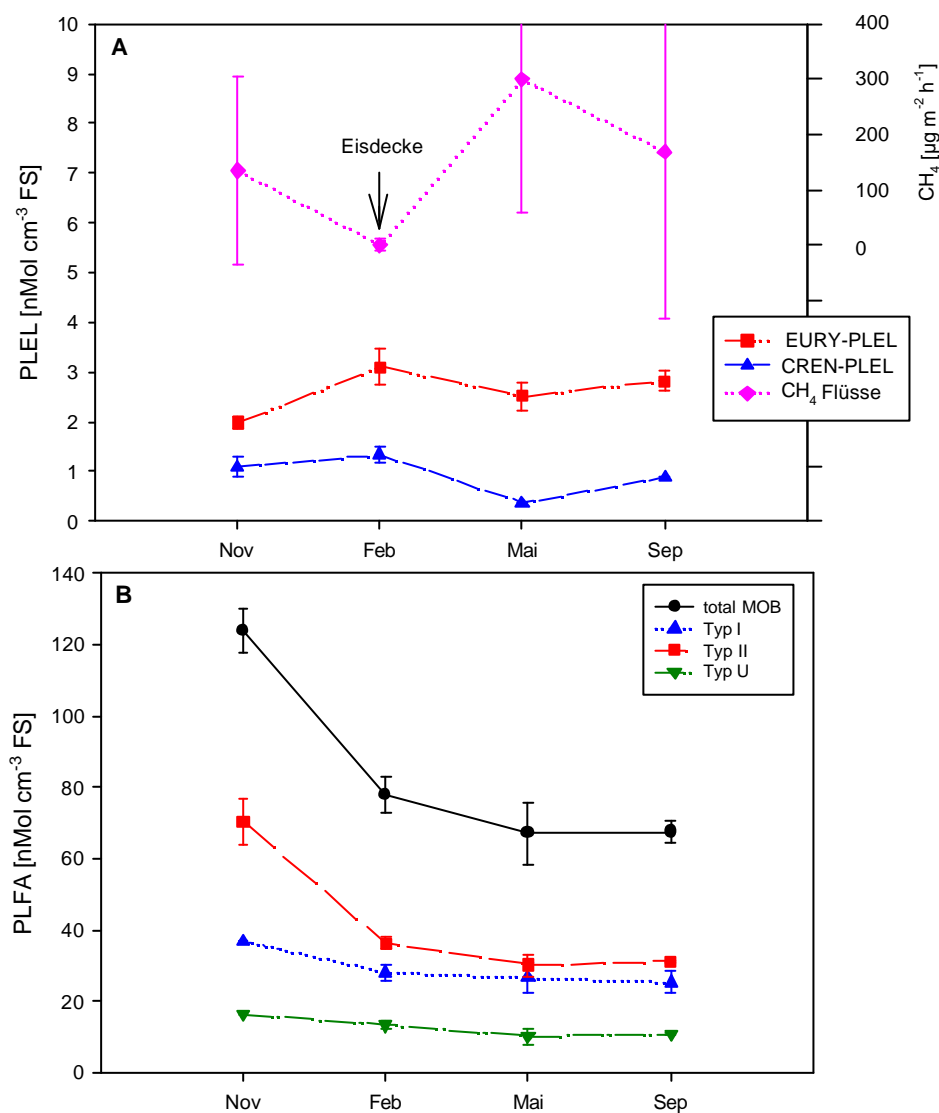


Abbildung 41: i-PLEL/PLFA-Konzentrationen versus Methanflußraten im Becken 1 (Donauums)

In Abb. 41 ist der Jahresgang der PLEL/MOB-PLFA-Konzentrationen im Vergleich zu den Methanflüssen im Becken 1 (40 cm Stauwasserhöhe) dargestellt. Die höchsten i-PLEL-Konzentrationen wurden im Februar gemessen, während zu diesem Termin die Methanflußrate mit durchschnittlich $-0,8 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ am niedrigsten war. Allerdings befand sich zu diesem Zeitpunkt eine Eisschicht auf der Wasseroberfläche, so daß eine Diffusionsbarriere für Methan vorhanden war, was zu einer erniedrigten Emission führte. Vergleiche zwischen den vier Spurengasmessungen im November und den Messungen zu den 6 eisfreien Tagen im Januar und Februar zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede (Wild *et al.*, 2000b). Für den Beprobungstermin Februar kann daher eine dem Monat November vergleichbare Methanfreisetzung aus dem überstauten Bodenkörper angenommen werden.

Bei der Betrachtung der EURY-PLEL, die am ehesten die Methanogene repräsentieren, lassen sich Zusammenhänge zu den Methanflüssen ableiten. Sowohl die Methanogen-Biomarker (EURY-PLEL) als auch die Methanflußraten ergaben zu den Beprobungen im Mai und September höhere Werte als zur November-Beprobung. Auffallend ist, daß im Februar die Population der *Crenarchaeota* als auch der *Euryarchaeota* am größten war, obwohl zu dieser Zeit eine bedeutend niedrigere Wassertemperatur als im Mai und September vorherrschte (Tab. 20). Die Existenz einer aktiven, methanproduzierenden *Euryarchaeota*-Population konnte selbst in den Sedimenten eines permanent eisbedeckten Sees in der Antarktis nachgewiesen werden (Mancuso *et al.*, 1990). Diese bestimmten sogar um den Faktor 10 höhere EURY-PLEL-Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit im Becken 1 zum Zeitpunkt der Februar-Beprobung. Die Untersuchungen von Mancuso *et al.* (1990) unterstützen daher die Vermutung, daß selbst bei niedrigen Temperaturen, wie zur Februarbeprobung, eine aktive Methanogen-Population im Becken 1 vorhanden war.

Während im Becken 1 die CREN-PLEL-Konzentration im Februar bedeutend höher war, als zu den Beprobungen im Mai und September, läßt sich dieses für die EURY-PLEL nicht feststellen. Die Populationsgröße der *Euryarchaeota* schien daher in dem gleichen Zeitraum nur geringfügig zu schwanken. Im Becken 1 lassen sich somit Veränderungen in der Archaeenpopulation während des Beprobungszeitraums ableiten.

In der Darstellung B der Abb. 41 sind entsprechend die MOB-PLFA-Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Trotz des stark anaeroben Milieus im Bodenkörper des Becken 1, traten die für methanotrophe (aerobe) Bakterien charakteristische PLFA, abgekürzt als MOB-PLFA auf. MOB-PLFA, wie z.B. 16:1 ω 5, 16:1 ω 6 und 18:1 ω 8 wurden auch in australischen Methan emittierenden „wetland sediments“ gefunden (Boon *et al.*, 1996).

Obwohl die Höhe des Wasserstands für eine grobe Unterteilung in oxische und anoxische Horizonte in Moorökosysteme herangezogen werden kann (Benstead und Lloyd, 1994; Whalen *et al.* 1996) können, bedingt durch den Sauerstoff-Transport der Gefäßpflanzen zu den Wurzeln, oxische Zonen unterhalb des Wasserspiegels entstehen (Armstrong and Armstrong, 1988). Umgekehrt können im Moorkörper anoxische Zonen in den vorwiegend oxischen Bodenhorizonten oberhalb des Wasserspiegels entstehen, wie es möglicherweise bei der November-Beprobung in der Referenzfläche gewesen sein konnte.

Im Jahresgang der Methanotrophen-Biomarker in Becken 1 fällt auf, daß die höchsten Werte im November festgestellt wurden und danach eine sukzessive Abnahme der totalen MOB-PLFA-Konzentrationen stattfand. Dies kann ein Indiz dafür sein, daß ein Rückgang der Methanotrophenpopulation erst ab einer gewissen Zeit nach der Wiederbefeuchtung stattfand. Die kontrollierte Wasserbeschickung begann am 23.06.98. Nach etwa 8 (Feb '99), 11 (Mai '99), oder 14 Monaten (Sep '99), waren die Konzentrationen an totalen und an Typ II MOB-PLFA signifikant niedriger als nach knapp 5 Monaten (Nov '98). Dieses Phänomen konnte in dieser starken Ausprägung weder in den Biomarkern des Typs I noch des Typs U nachgewiesen werden. Zu den Beprobungen von Februar bis September wurden dagegen nur geringfügige Schwankungen in den Biomarker-Konzentrationen festgestellt, so daß daraus nur schwach ausgeprägte Änderungen in der Methanotrophenpopulation abzuleiten sind.

In Abb. 42 ist der Jahresgang der i-PLEL/MOB-PLFA-Konzentrationen im Vergleich zu den Methanflüssen im Becken 2 (20 cm Stauwasserhöhe) dargestellt. Daraus geht hervor, daß die höchsten PLEL-Konzentrationen im Februar gemessen wurden, während zu diesem Termin die Methanemission mit durchschnittlich $2376 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ am niedrigsten war. Auch hier befand sich zu diesem Zeitpunkt eine Eisschicht auf der Wasserfläche, so daß durch diese Diffusionsbarriere die Methanemission aufgrund physikalischer Ursachen erniedrigt wurde. Vergleiche zwischen den vier Spurengasmessungen im November und den Messungen zu den 6 eisfreien Tagen im Januar und Februar zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede, so daß auch für den Zeitpunkt Februar eine dem Monat November vergleichbare Methanfreisetzung aus dem überstauten Bodenkörper angenommen werden kann (Wild *et al.*, 2000b). Betrachtet man die EURY-PLEL, die am ehesten die Methanogene repräsentieren, so lassen sich umgekehrt proportionale Beziehungen zu den Methanflüssen ableiten. Während die Methanemissionen zur September-Beprobung signifikant höher waren als im November und Februar, war umgekehrt die Konzentration an Methanogen-Biomarkern

im September signifikant niedriger als im November und Februar. Als Erklärung würde sich anbieten, daß bei niedrigen Umgebungstemperaturen, wie im November und Februar (s. Tab. 20) eine große *Euryarchaeota*-Population vorherrscht, deren Stoffwechsel wenig aktiv ist und entsprechend weniger Methan produziert. Bei erhöhten Temperaturen, in den Monaten Mai und September, hingegen, verkleinert sich die Archaeenpopulation, sie ist jedoch stoffwechselaktiver und produziert mehr Methan. Die Vermutung, daß Temperaturerhöhung eher zur Erhöhung der Einzelzell-Aktivität von Methanogenen als zu Zellvermehrung führt, wird auch von Boon *et al.* (1996) gestellt und befindet sich in Einklang mit dem beobachteten Effekt von Temperatur auf die Methanogenese *in vitro* (Boon und Mitchell, 1995).

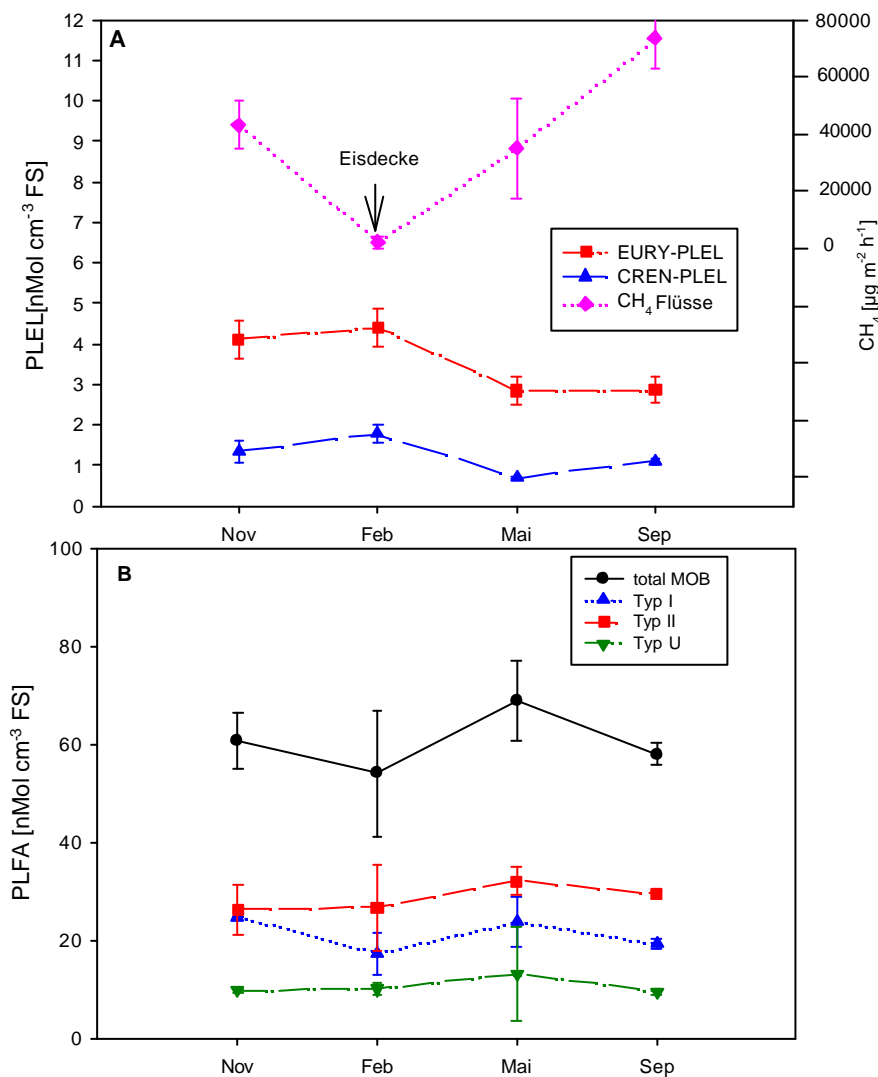


Abbildung 42: i-PLEL/PLFA-Konzentrationen versus Methanflußraten im Becken 2 (Donauamoos)

Aus den Konzentrationsänderungen der beiden i-PLEL-Biomarker läßt sich auch im Becken 2 eine Verschiebung innerhalb der Archaeenpopulation zwischen den Beprobungen im Mai und September ableiten, die jedoch im Vergleich zum Becken 1 (Abb. 41) abgeschwächer verlief.

In der Darstellung B von Abb. 42 sind die MOB-PLFA-Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Der Jahresgang der MOB-PLFA gestaltet sich in Becken 2 anders gegenüber jenem in Becken 1. Während in Becken 1 die totale MOB-PLFA-Konzentration von 124 nMol cm⁻³ FS bei der November-Beprobung sukzessiv auf einen Wert von 67 bei der Mai-, bzw. 68 nMol cm⁻³ FS bei der September-Beprobung zurückging, fluktuierte im Becken 2 die MOB-PLFA Konzentration zwischen den beiden Extrema von 54 bei der Februar- und 69 nMol cm⁻³ FS bei der Mai-Probenahme. Außerdem fällt auf, daß zwischen dem Verlauf der EURY-PLEL- und der totalen MOB-PLFA-Konzentrationen eine umgekehrt proportionale Beziehung besteht, während dieser Zusammenhang für das Becken 1 nicht formuliert werden kann. Änderungen in der Methanotrophenpopulation lassen sich auch im Becken 2 feststellen, wobei auch hier Organismen des Typs II zu dominieren schienen.

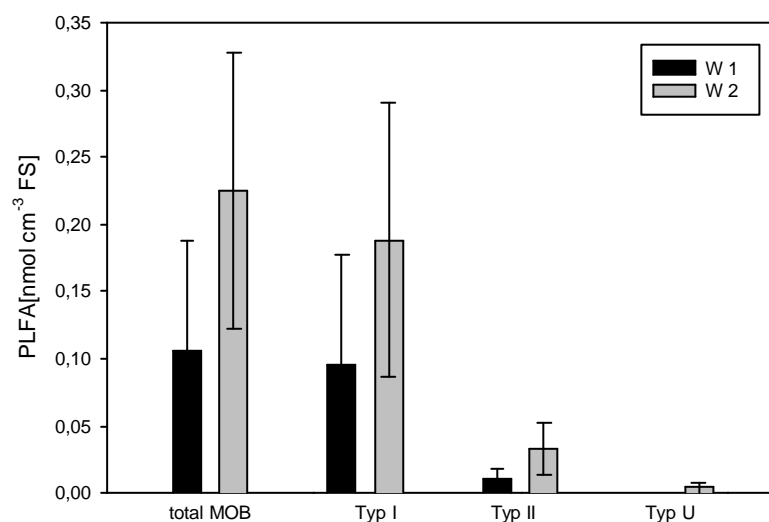


Abbildung 43: MOB-PLFA-Konzentrationen in den beiden Stauwasserproben des Versuchsstandorts Donau-moos (Sep. 1999)

Parallel zu den Bodenbeprobungen wurden im September auch Gewässerproben aus den beiden Becken entnommen. Die Ergebnisse der Biomarker-Untersuchungen sind in Abb. 43 aufgeführt.

Demnach konnten in keinem der beiden Wasserproben PLEL-Verbindungen nachgewiesen werden. Lediglich MOB-PLFA wurden bestimmt, deren Konzentrationen sich allerdings an der Nachweisgrenze bewegten und um den Faktor 20 kleiner waren, als die in den Bodenhorizonten detektierten MOB-PLFA. In W2 wurden zwar höhere Werte als in W1 nachgewiesen, jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant. Anders als in den Boden- wurde in den Wasserproben eine Dominanz von Methanotrophen des Typs I festgestellt, was sich in Einklang mit den Untersuchungen von Ross *et al.* (1997) befindet. Diese fanden im Bakterioplankton von australischen „freshwater wetlands“ signifikant mehr Typ I Methanotrophe als Organismen des Typs II.

Vergleich der Biomarker-Quotienten

Aus dem vorhergehenden Kapitel wird deutlich, daß der jahreszeitliche Verlauf der Methanflußraten in einigen Fällen nicht seine Entsprechung in den jeweiligen Biomarker-Konzentrationen findet. Diese Diskrepanzen sind z.T. physikalisch bedingt, wie z. B. durch die Eisdecke während der Februar-Beprobung. Aus der Gegenüberstellung von EURY-PLEL- und MOB-PLFA-Konzentrationen alleine lassen sich die Verläufe der Methanflußraten daher nur bedingt erklären. Legt man den Ansatz von White *et al.* (1979) und Balkwill *et al.* (1988) zugrunde, nach dem Mikroorganismen *in situ*, selbst unter sich ändernden Umweltbedingungen, gleiche Anteile an Phospholipid-Komponenten in ihrer Membran besitzen, so lassen sich aus dem Quotient von PLEL:PLFA die zu betrachtenden Proben, bzw. Standorte hinsichtlich ihres Besiedlungsgrades an methanogenen und methanotrophen Organismen vergleichen. In Abb. 44 sind der Besiedlungsgrad an methanogenen und methanotrophen Organismen, ausgedrückt als EURY-PLEL:MOB-PLFA und die jeweiligen Methanflüsse dargestellt.

Bis auf eine Ausnahme zur November-Beprobung sind die Quotienten EURY-PLEL:MOB-PLFA in den beiden überfluteten Becken zu den jeweiligen Terminen deutlich höher als in der Referenzfläche und verhalten sich gemäß der Reihung: Referenzfläche < Becken 1 < Becken 2, was sich im Einklang mit der Reihung der ermittelten Methanemissionen befindet. Die ungewöhnlich hohe MOB-PLFA-Konzentration in Becken 1 zur November-Probennahme (s. Abb. 42) dürfte wesentlich dazu beigetragen haben, daß sich zu diesem Zeitpunkt die Quotienten von Referenzfläche und Becken 1 decken, was seine Entsprechung in den statistisch gleichen Methanflußraten der beiden Flächen findet.

Nach (Wild *et al.*, 2000b) bestand in den beiden Becken kein signifikanter Unterschied zwischen den Methanemissionen an den drei eisfreien Tagen unmittelbar nach dem 25.02. (05.03., 15.03.,

22.03.) und den Beprobungen um den 03.05. (22.04., 03.05., 06.05.), daher können in beiden Becken für die Februar- und Mai-Beprobung statistisch gleiche Emissionen angenommen werden. Dies findet seine Entsprechung in den statistisch gleichen Biomarker-Quotienten im Becken 1 bei der Februar- und Mai-Beprobung. In Becken 2 dagegen fällt der Biomarker-Quotient der Mai-Beprobung deutlich gegenüber dem Wert aus der Februar-Beprobung ab. Gründe für dieses Phänomen können aus den vorhandenen Daten nicht abgeleitet werden.

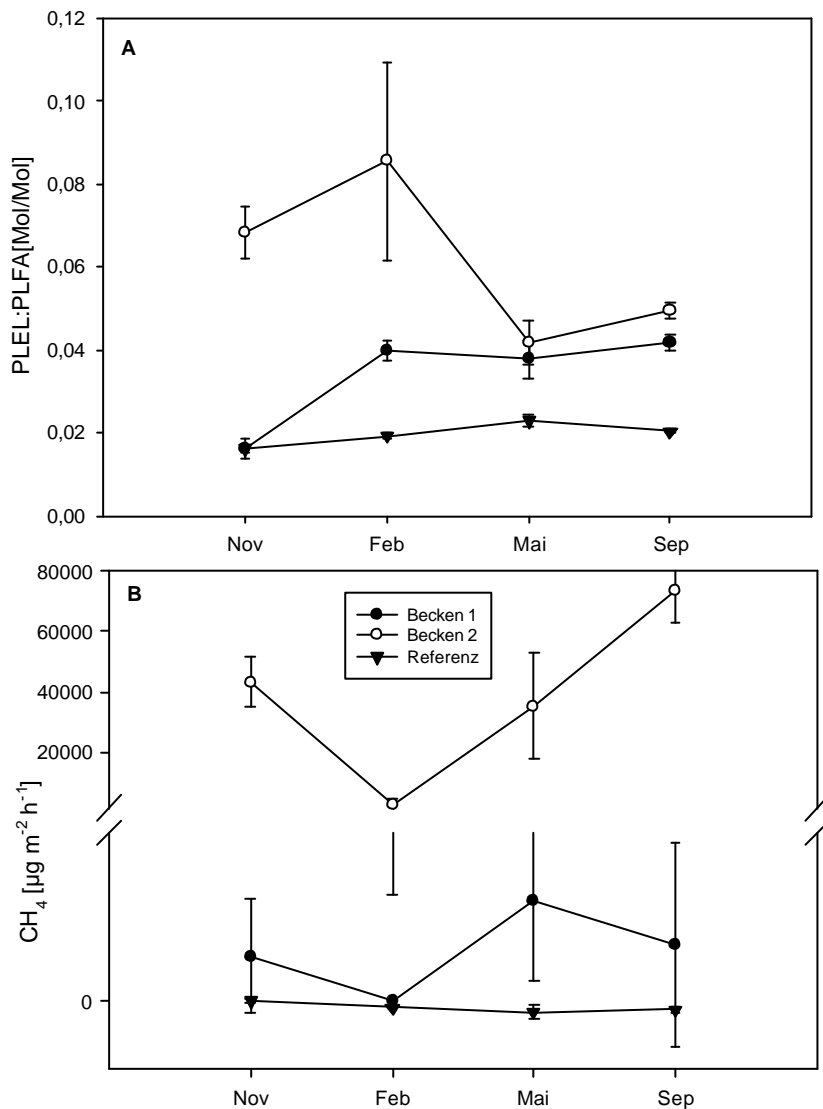


Abbildung 44: Vergleich zwischen dem EURY-PLEL:MOB-PLFA Biomarkerverhältnis und den Methanflüssen in den Parzellen des Untersuchungsstandorts Donaumoos

Es läßt sich aus dem Vergleich „Biomarker-Quotienten und Methanflußraten“ zusammenfassen, daß die jahreszeitlichen Schwankungen der Biomarker-Quotienten die der Methanflußraten nur bedingt

erklären, jedoch die Reihung der Biomarker-Quotienten (Referenzfläche < Becken 1 < Becken 2) der Reihung der Methanflußraten in den drei Parzellen entspricht.

3.2.5.2. Größe und Struktur von *Euryarchaeota*- und *Methanotrophen*populationen

Während in Kap. 3.2.2 Gesamtpopulationen in den verschiedenen Proben auf der Basis aller ermittelten PLFA- und i-PLEL-Biomarker miteinander verglichen wurden, geht es hierbei um die Betrachtung von Teilpopulationen, die direkt an den beobachteten Methanflußraten beteiligt sind.

Es ist anzunehmen, daß sowohl Populationsgröße als auch Populationsstruktur die Höhe der Methanflußraten der drei Bodenökosysteme beeinflusst. Es wurden zwar die höchste EURY-PLEL-Konzentration bzw. die meisten *Euryarchaeota* in den Bodenproben des Becken 2 nachgewiesen, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zu den Proben aus dem Becken 1 und der Referenzfläche (Tab. 29). Die Rangordnung der gemittelten EURY-PLEL-Konzentrationen, indikativ für die Größe der *Euryarchaeota*-Populationen in den drei Parzellen läßt sich folgendermaßen wiedergeben: $B1 \leq R \leq B2$.

Die signifikant höchsten Konzentrationen an den verschiedenen MOB-PLFA wurden in den Proben der Referenzfläche und die niedrigsten Werte in den Proben aus Becken 2 nachgewiesen. Die Rangordnung der gemittelten MOB-PLFA-Konzentrationen, indikativ für die Größe der Methanotrophenpopulation in den drei Parzellen, gestaltete sich wie folgt: $B2 \leq B1 < R$.

Die Zusammensetzung der Methanotrophenpopulation war in den beprobten Bodenhorizonten aller drei Untersuchungspartellen geprägt von der Dominanz von Typ II Methanotrophen, gefolgt von Organismen des Typs I und des Typs U.

Tabelle 28: Absolute [nMol cm⁻³ FS] und relative Konzentrationen von EURY-PLEL- und MOB-PLFA-Biomarker im Mittel von vier Beprobungsterminen (Donauermoos)

	Referenzfläche		Becken 1		Becken 2	
	Konz.	Mol%	Konz.	Mol%	Konz.	Mol%
EURY-PLEL total	2,8 ^a	100	2,6 ^a	100	3,6 ^a	100
MOB-PLFA total	143,5 ^b	100	84,2 ^a	100	60,3 ^a	100
Typ I	44,4 ^b	30,9	29,3 ^a	34,8	21,2 ^a	35,2
Typ II	79,0 ^b	55,1	42,1 ^a	50,0	28,6 ^a	47,4
Typ U	20,1 ^b	14,0	12,8 ^a	15,2	10,6 ^a	17,6

Unterschiedliche Buchstaben indizieren unterschiedliches Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$)

Aus den relativen Konzentrationen bzw. den Anteilen der MOB-PLFA Gruppen (in Mol%) an der totalen MOB-PLFA Konzentration läßt sich die Populationsstruktur in den Proben der drei Bodenökosysteme ableiten. Während die Biomarker der Typ II Methanotrophen in der Referenzfläche

einen Anteil an 55,1% einnahmen, lagen deren Anteile in den Proben des Becken 1 bei 50,0% und des Becken 2 bei 47,4%. Umgekehrt lagen die Konzentrationen der Typ I Biomarker in den Proben des Becken 2 bei 35,2%, im Becken 1 bei 34,8% und in der Referenzfläche bei 30,9%. Ebenso wiesen die Proben des Becken 2 die höchsten Konzentrationen an Typ U Biomarker auf (17,6%), gefolgt von den Proben des Becken 1 mit 15,2% und der Referenzfläche mit 14,0%. Diese unterschiedlichen MOB-PLFA-Profile deuten daraufhin, daß in den beprobten Bodenhorizonten der drei Parzellen unterschiedlich zusammengesetzte Methanotrophenpopulationen vorhanden waren.

Um etwaige Änderungen von *Euryarchaeota*-Populationen und deren Einfluß auf die Methanflußraten genauer abschätzen zu können, wurden die log-transformierten EURY-PLEL-Konzentrationen einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Dabei sollte auf Basis von Kovariationen von EURY-PLEL-Profilen sowie den dazugehörigen Bodeneigenschaften und Methanflußraten die *Euryarchaeota*-Populationen genauer charakterisiert werden. Abb. 45 zeigt das Hauptkomponentendiagramm der EURY-PLEL-Profile der verschiedenen Untersuchungsparzellen zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten. Diese lassen sich zu sechs Gruppen bzw. Cluster zusammenfassen: Cluster I setzt sich ausschließlich aus R-4 zusammen; Cluster II besteht aus R-2 und R-3, Cluster III ausschließlich aus B1-3; in Cluster IV sind ausschließlich B2-4 Profile enthalten; in Cluster V sind die EURY-PLEL Profile B2-1, B2-2, B2-3 und B1-1 und B1-2 zusammengefaßt und in Cluster VI die Profile R-1 und B1-4. Da EURY-PLEL-Profile die Zusammensetzung von *Euryarchaeota*-Populationen und damit auch die der Methanogene charakterisieren, lassen sich aus diesen Gruppierungen Erklärungsmuster für die Höhe der Methanflüsse zu den jeweiligen Beprobungen ableiten. Als wichtigsten Aspekt gilt herauszustellen, daß alle EURY-Profile aus der Referenzfläche, die mit signifikanten Methanabbauraten korrespondieren (Cluster I und II) sich deutlich von den Profilen der anderen Proben unterscheiden, die mit methanbildenden Prozessen in Verbindung stehen (Cluster III, IV, V und VI). Dadurch lassen sich die jeweiligen Cluster zu den übergeordneten Gruppen bzw. Merkmalen "Methanoxidation" und Methanproduktion" zuordnen.

Besonders stark weichen die Cluster I (Gruppe "Methanoxidation") und Cluster IV (Gruppe "Methanproduktion") von einander ab: Cluster I enthält ausschließlich R-4 Profile, die mit einem wassergefüllten Porenvolumen (WFPS) < 50% (Tabelle 19) und einer ausgeprägten Methanoxidation (Abb. 32) korrespondieren. Cluster IV setzt sich ausschließlich aus B2-4 Profilen zusammen, die mit der höchsten Methanemission und einem WFPS > 120% in Zusammenhang stehen. Diese beiden Profil-Gruppen nehmen einen großen Abstand zueinander ein, so daß sie aufgrund der mit den jewei-

ligen PLEL-Daten verknüpften Bodeneigenschaften als Antipoden betrachtet werden können. So ist die Population in R-4, welche stark von der Population in B2-4 abweicht, geprägt von “wenig produktiv” in Bezug auf die Methanogenese, während die Population in B2-4 “hoch produktive” Eigenschaften aufweist.

Auch innerhalb der beiden Gruppen “Methanoxidation” und “Methanproduktion” treten Unterschiede in den *Euryarchaeota*-Populationen auf. So besitzen z.B. Cluster III (EURY-PLEL-Profile aus B1-3) und Cluster V größere Ähnlichkeiten zum “hochproduktiven” Cluster IV als das Cluster VI, welches die Profile aus R-1 und B1-4 enthält.

Abschließend läßt sich aus den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse zusammenfassen, daß die Struktur der *Euryarchaeota*-Populationen mit den Methanemissionen in Beziehung zu stehen scheint. So unterscheiden sich *Euryarchaeota*-Populationen aus methanabbauenden Horizonten deutlich von denen aus methanproduzierenden Horizonten. Ferner werden auch Populationsunterschiede in den Proben innerhalb der Gruppen “Methanproduktion” und “Methanoxidation” deutlich.

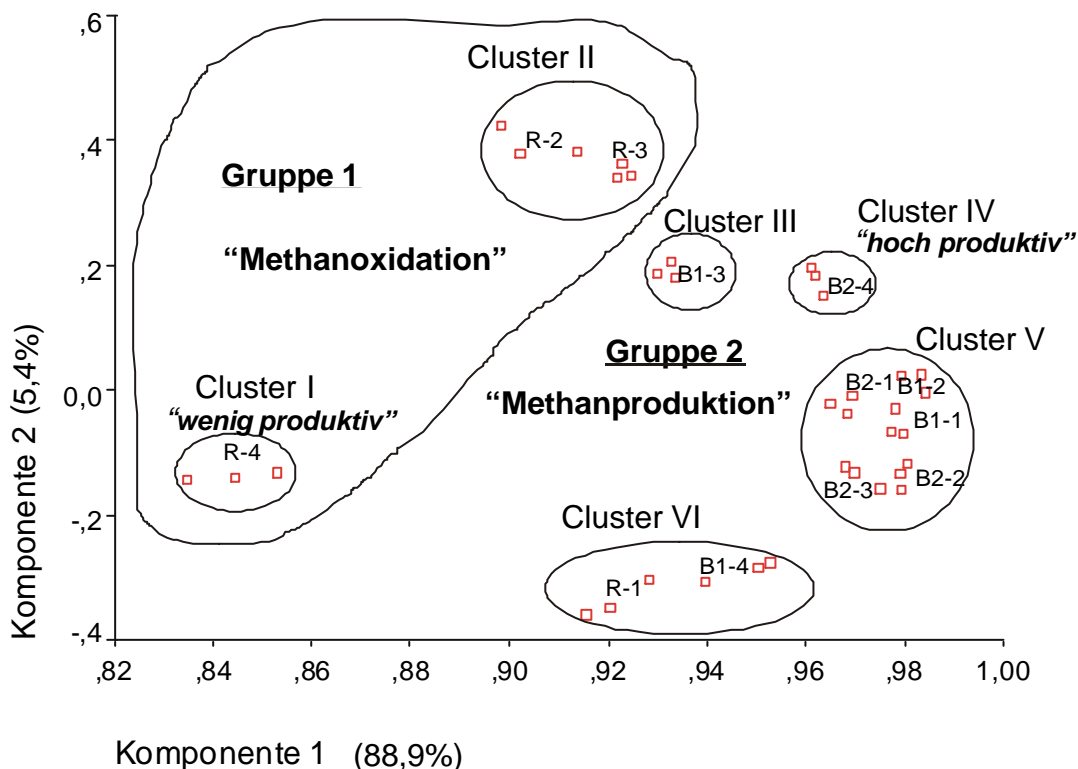


Abbildung 45: Hauptkomponentendiagramm der EURY-PLEL-Profile in den verschiedenen Bodenproben aus dem Standort Donaumoos

4 Übergreifende Diskussion

4.1. Methodische Aspekte zur Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL) und Phospholipidfettsäuren (PLFA)

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Bestimmungsmethode von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL) basiert auf der Erfassung der ethergebundenen PLEL-Seitenketten.

Obwohl die PLEL-Seitenkettenbestimmung relativ zeitaufwendig ist, ermöglicht diese mittels GC/MS die ganze Bandbreite der Isoprenoid-Seitenketten (i-PLEL) von C₁₅ bis C₄₀ in mikrobiellen Reinkulturen und Bodenproben abzudecken. Fritze *et al.* (1999) fanden lediglich eine einzige i-PLEL-Verbindung in Hochmoortorf und in der Mullaufgabe von finnischen Waldböden. Dieses Phänomen scheint hauptsächlich methodisch bedingt zu sein, da mittels konventioneller GC/MS nach TMSI-Derivatisierung, wie durch eigene Experimente bestätigt, Caldarchaeole wegen der hohen Schmelzpunkte nicht bestimmt, und somit auch keine *Crenarchaeota* nachgewiesen werden können.

Ein Nachteil der vorliegenden PLEL-Seitenkettenbestimmung liegt darin, daß die Herkunft vieler unverzweigter und einfach-verzweigter Kohlenwasserstoffe aus Bodenextrakten nicht zurückverfolgt werden kann, da deren Ausgangsmoleküle, bzw. Kernlipide nicht bekannt sind.

Hier bietet sich das Instrumentarium der Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie (LC/MS) als Alternative an, mit der nach entsprechender Trennung auf einer vorgeschalteten HPLC-Säule die Molekülmassen der Kernlipide bestimmt werden können. Allerdings reicht die Information der Molekülmasse zur Strukturaufklärung in den meisten Fällen nicht aus, besonders, wenn keine Referenzsubstanzen zur Bestimmung der Retentionszeit verfügbar sind und im MS/MS-Modus (= m/z^2) keine charakteristischen Fragmente erhalten werden können. Die Kernlipide der PLEL aus Archaeen und anderer Organismen unterscheiden sich hauptsächlich durch die aliphatischen Seitenketten. Aus diesen wiederum lassen sich bei der schonenden Ionisierung der APCI-LC/MS selbst im MS/MS-Modus nur bedingt Fragmente zur Strukturaufklärung erzielen. Hier könnte eine vorgeschaltete Trennung von Modellsubstanzen (Kernlipide aus *Archaea* und *Thermotoga*) auf SPE-Säulen in Verbindung mit einem noch präziser abgestimmten HPLC-Trennungsverfahren zu einer verbesserten Detektion führen, so daß es möglich erscheint, langfristig PLEL-Bestimmungen mittels LC/MS durchzuführen. Jedoch können mit LC/MS keine ¹³C/¹²C-Diskriminierungen in Lipiden untersucht werden, was sich jedoch mit der PLEL-Seitenkettenbestimmung am GC/MS oder am GC-

C-IRMS („Gaschromatography combustion isotope ratio mass spectrometry“) realisieren läßt (J. Oeßelmann/Finnigan-Thermoquest, persönliche Mitteilung).

In Experimenten mit Standardsubstanzen und Bodenextrakten konnte gezeigt werden, daß die bei der PLEL-Seitenkettenanalyse mittels GC/MS bestimmten Kohlenwasserstoffe ausschließlich aus schwer hydrolysierbaren Lipiden stammen. So ist es sehr wahrscheinlich, daß die neben den Isoprenoiden (i15:0, i20:0, i25:0, i40:0, i40:0-1cy, i40:0-2cy, i20:1) detektierten Kohlenwasserstoffe mit Kettenlängen von C₁₄ bis C₃₅ aus Etherlipiden stammen. Jedoch können bislang nur die Alkane ib16:0, n16:0, ib17:0, ai17:0, ib18:0, n18:0, ib19:0 und ai19:0 taxonomisch zugeordnet werden. Diese wurden in der Gruppe der x-PLEL zusammengefaßt und entsprachen den Seitenketten, die in verschiedenen hyperthermophilen Bakterien nachgewiesen wurden (Langworthy *et al.*, 1983; De Rosa *et al.*, 1988; De Rosa *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 1992). Mittels einem breit angelegten phylogenetischen Ansatz bestimmten Ueda *et al.* (1995) und Bornemann *et al.* (1996) mikrobielle Gemeinschaften in zwei verschiedenen Bodenökosystemen, ohne jedoch RNA-Sequenzen von Mikroorganismen zu detektieren, die mit x-PLEL-Biomarker in Verbindung gebracht werden könnten. Es ist dennoch nicht unwahrscheinlich, daß in weiteren Studien und bei verbesserter Methodik RNA-Sequenzen in Böden gefunden werden, die der Gattung *Thermotoga* oder *Aquifex* sehr nahe stehen. So war es z.B. der Fall bei den *Crenarchaeota*, von denen man anfangs glaubte, daß sie ausschließlich zu den hyperthermophilen Archaeen zählen.

Die von vielen Autoren beschriebene Bedeutung der i-PLEL für die Systematik der Prokaryoten konnte auch in dieser Arbeit exemplarisch an einigen Reinkulturen von Archaeen und Bakterien durch Hauptkomponentenanalyse von PLEL-Profilen bestätigt werden. Zu einem geringfügig unschärferen Ergebnis bei der multivariaten statistischen Analyse führte die Berücksichtigung von PLFA-Profilen. So konnten NEL-PLFA in erhöhten Anteilen in den verschiedenen Archaeen-Stämmen nachgewiesen werden, von deren Vorkommen in *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* in der Literatur bislang noch nicht berichtet wurde.

K.O. Stetter (Persönliche Mitteilung) vermutete, daß die nachgewiesenen Fettsäuren aus dem für die Anzucht verwendeten Kultursubstrat und nicht aus den Membranlipiden von Archaeen stammen. Diese Vermutung kann durch das Komponentendiagramm in Abb. 32 (S. 78) widerlegt werden, wonach das PLFA-Profil von *Methanothermus fervidus* (MTF), welcher nur auf mineralischem Medium gewachsen ist, große Ähnlichkeit zu den PLFA-Profilen der Organismen *Methanococcus jannaschii* (MCJ) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MBT) aufweist, welche auf

organischen Medien mit Hefeextrakt gewachsen sind. MCJ und MBT stellen in der Gruppe der 12 untersuchten Mikroorganismenstämme die nächsten phylogenetisch verwandten Arten zu MTF dar. Dieser Sachverhalt bekräftigt die Aussage, daß PLFA auch als Biomarker für Archaeen herangezogen werden können. Nichtsdestotrotz empfiehlt es sich, in einer Folgestudie ^{13}C -markiertes Substrat für die Anzucht des jeweiligen Untersuchungsorganismus einzusetzen und durch dessen Inkorporation in die Membranlipide die Bedeutung von NEL-PLFA in Archaeen zu untermauern. Zusätzlich könnten durch strukturelle Analysemethoden, wie NMR-Spektroskopie und/oder Massenspektrometrie, die Kernlipide, aus denen die NEL-PLFA hervorgehen, genauer charakterisiert werden. Es ist denkbar, daß die in den Archaeen nachgewiesenen NEL-PLFA, ähnlich wie die PLFA in *Sphingomonas* spp. (Balkwill *et al.*, 1997), über eine Amid-Bindung mit dem Phospholipidmolekül verbunden sind.

Die mit der PLEL-Seitenkettenanalyse ermittelten i-PELEL-Konzentrationen in Reinkulturen und Bodenextrakten stimmen mit denen in der Literatur erwähnten i-PELEL-Konzentrationen (Nichols *et al.*, 1987; Mancuso *et al.*, 1990; Bai *et al.*, 2000) sehr gut überein. Daraus kann geschlossen werden, daß die vorliegende PLEL-Bestimmungsmethode, bestehend aus naßchemischen Schritten (Extraktion, Separation, Hydrolyse, Etherspaltung und Derivatisierung), GC/MS-Analytik und der nachgelagerten Korrektur mit Hilfe von Responsefaktoren, den quantitativen Vergleichen mit anderen PLEL-Bestimmungsverfahren standhalten kann und damit wichtige Voraussetzungen für die quantitative Bestimmung von mikrobiellen Populationen in Bodenökosystemen erfüllt.

Durch den Vergleich der PLEL/PLFA-Methodik mit den molekularbiologischen FISH/DAPI-Analysen konnte eine weitgehende Übereinstimmung in qualitativer Hinsicht erreicht werden, jedoch hat es den Anschein, daß FISH/DAPI eher zu einer Unterschätzung, PLEL/PLFA-Analysen eher zu einer Überschätzung der Zellzahlen führen. Allerdings gibt es bislang keine geeigneteren Methoden für die Quantifizierung von mikrobiellen Populationen in Bodenhorizonten als die beiden genannten.

Ein wesentlicher Vorteil der erweiterten Phospholipid-Analytik (PLFA+PELEL) besteht darin, daß aus einem Ansatz, nämlich durch die Extraktion der Phospholipide und die Bestimmung ihrer Seitenketten, Biomarker aller drei Domänen und ihrer verschiedenen Taxa gewonnen werden können. Dabei wird der *in situ*-Zustand der Lipide lediglich durch die Hydrolyse der Bindungen bzw. durch die Derivatisierungsreaktionen verändert, was sich aber durch die Verwendung von Standardsubstanzen qualitativ und quantitativ überwachen läßt (White *et al.*, 1996). Für die Erstellung von genetischen „fingerprints“ auf Basis von rDNA- und rRNA-Profilen bedarf es dagegen die Zuhilfenahme

vieler spezifischer Primer, um all die Taxa abzudecken, die mit der erweiterten Phospholipid-Methodik erfaßt werden. Zudem werden die benötigten Primer und auch die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benötigte taq-Polymerase sozusagen *ex situ* hergestellt. Diese Hilfsmittel greifen wesentlich in die molekularbiologischen Untersuchungen ein. Da sich deren Wirkungsweisen nur bedingt überwachen lassen (M. Schloter, persönliche Mitteilung), kann es bei der Anwendung im Labor zu Artefakten und somit zur Bildung von DNA-, bzw. RNA-Profilen kommen, die nicht mehr dem *in situ*-Zustand einer mikrobiellen Gemeinschaft entsprechen (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Ebenso ist die FISH/DAPI-Methodik diversen Fehlerquellen, bzw. Unsicherheiten ausgesetzt. So können schwach ausgeprägte Signalintensitäten zu falschen Zellzahlen führen. Es können z.B. schnell wachsende Mikroorganismenkulturen Zellmembranen aufweisen, welche das zur Detektion nötige Eindringen der Oligonukleotidsonden erschweren. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „cell-wall limited probe accessibility“ bezeichnet (Amann *et al.*, 1995).

Für die „selektive Bestimmung der PLEL-Seitenketten“ (s. Abb. 17, S. 49) ist es notwendig, die Kernlipide zuvor nach funktionellen Gruppen zu trennen. Während es in Reinkulturen mittels SPE-Säulen gelang, Hydroxyarchaeol, welches charakteristisch für Methanogene ist, von anderen Etherlipiden zu trennen, war dies in Bodenextrakten nicht möglich. Hier bewirkte die zuvor durchgeführte saure Hydrolyse-Reaktion eine Veränderung der Molekülstruktur in der Gestalt, daß Hydroxyarchaeol nicht mehr von anderen Archaeolen zu trennen war. Um das Konzept der selektiven Bestimmung der PLEL-Seitenketten auch an stark humosen Bodenproben realisieren zu können, ist es notwendig, verschiedene, an Reinkulturen erprobte Verfahren zur Abspaltung der polaren Gruppen von Phospholipidmolekülen an Bodenextrakten zu testen. Dabei kommt den in Ferrante *et al.* (1988a), Sprott *et al.* (1990) und Ohtsubo *et al.* (1993) beschriebenen Hydrolyseverfahren große Bedeutung zu, da diese den Erhalt der säurelabilen OH-Gruppen der Hydroxyarchaeole weitgehend ermöglichen.

Nach einer persönlichen Mitteilung von P. Nichols handelte es sich bei allen bisher detektierten ungesättigten PLEL aus Archaeen um Artefakte, die durch die Degenerierung des Hydroxyarchaeols entstanden. Das ungesättigte C₂₀-C₂₀-Archaeol, welches in der neutralen Lipidfraktion in *Methanopyrus kandleri* nachgewiesen wurde (Hafenbradl *et al.*, 1993; Hafenbradl *et al.*, 1996) und daher nicht einer Hydrolyse zur Entfernung der polaren Gruppe unterzogen werden muß (Hafenbradl *et al.*, 1993), mag von dieser Behauptung ausgeschlossen sein. Aufbauend auf das beschriebene Trennungsverfahren mittels SPE-SCX-Säulen, könnte o.g. Lipid aus *Methanopyrus kandleri* als Mo-

dellsubstanz für die Trennung von gesättigten und ungesättigten Archaeolen für zukünftige Studien eingesetzt werden. Nach Amann *et al.* (1995) sind nur maximal 15%, meist aber nur weniger als 1% der Mikroorganismen eines Habitats mit bekannten Methoden kultivierbar. Demnach ist die Existenz von ungesättigten PLEL in *Archaea* nicht ausgeschlossen, und diese wiederum könnten in diversen Bodenökosystemen vorhanden sein. Deren Nachweis ist allerdings nur durch vorherige Trennung der Kernlipide in funktionelle Gruppen und der nachgelagerten Charakterisierung des Alkylrests zu erreichen, wie es das Konzept der selektiven PLEL-Seitenkettenbestimmung vorsieht.

4.2. Mikrobielle Gemeinschaften in oxischen und anoxischen Bodenökosystemen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Wiedervernässung eines degradierten Niedermoorstandorts auf die Populationen von Bodenmikroorganismen hinsichtlich folgender Aspekte untersucht:

- Mikrobielle Zellzahlen bzw. Biomassen wurden mittels PLEL/PLFA- und molekularbiologischen Analysen bestimmt.
- Basierend auf Gesamtphospholipid-Profilen erfolgte eine Beschreibung und ein Vergleich der Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften (Gesamtpopulationen) in den verschiedenen Proben.
- Außerdem wurden spezifische Biomarker zur Charakterisierung von methanogenen und methanotrophen Mikroorganismengemeinschaften herangezogen und zu einem funktionellen Parameter, nämlich der Methanflußrate, in Beziehung gesetzt.

Mikrobielle Zellzahlen

Die signifikant höchsten Gesamtzellzahlen (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) wurden in den Proben aus der oxisch geprägten Referenzfläche ermittelt, während die Proben aus den beiden anoxisch geprägten, überstauten Becken gleiche Gesamtzellzahlen aufwiesen. Dabei wurden in der Referenzfläche im September '99 und in den beiden überstauten Becken im November '98 die höchsten Abundanzen ermittelt. Mit 10^{10} Zellen cm^{-3} FS Boden bewegte sich die Gesamtzellzahl (\approx mikrobielle Biomasse) in den Bodenproben des Donaumooses in derselben Größenordnung wie die von aquatischen Sedimenten in australischen "wetlands" (Boon *et al.*, 1996) und in einem chinesischen Reisstandort (Bai *et al.*, 2000). Angaben über Gesamtzellzahlen in vergleichbaren Moorökosystemen lagen bis dato nicht vor.

In den Proben der Referenzfläche wurden signifikant höhere Zellzahlen an *Bacteria* und *Eucarya* ermittelt, als in den Proben aus anoxischen Horizonten. Eine Ursache dafür kann sein, daß die Referenzfläche mit einer dichten Grasnarbe bedeckt war und somit, trotz Entfernung von Pflanzenresten, stark belebter Rhizosphärenboden in die Proben gelangte. In den überstauten Becken war dagegen ausreichend Platz zwischen den Rohrkolbenpflanzen vorhanden, so daß es kein Problem war vegetationsfreie Bodenproben zu erhalten.

Aus der Betrachtung der Archaeenzellzahlen geht hervor, daß diese Domäne einen bedeutenden Anteil (R: 26,0%; B1: 28,0%; B2: 38,8% *Archaea*) an der mikrobiellen Biomasse in Moorökosystemen einnimmt. Bis auf methanogene *Euryarchaeota* kann dieser Domäne bislang noch keine Funktion in Bodenökosystemen zugewiesen werden (Conrad, 1996). In den Bodenproben der Referenzfläche wurden signifikant höhere Zellzahlen an *Crenarchaeota* nachgewiesen. Bestätigt durch die Ergebnisse von Bai *et al.* (2000) zeichnet sich ab, daß diese Organismen oxisch geprägte Bodenhorizonte bevorzugen, jedoch ist nicht bekannt, welche Funktionen sie in Bodenökosystemen überhaupt ausüben.

Hoefs *et al.* (1997) konnten mittels Isotopendiskriminierung nachweisen, daß Archaeen einen wesentlichen Beitrag beim Aufbau der "toten" organischen Substanz in marinen Sedimenten leisten. Deren Etherlipide, bzw. Kernlipide stellen nach Abspaltung der polaren Phosphatgruppe eine sehr stabile chemische Substanz dar und sind somit als Bestandteile der "Dauerhumus"-Fraktion einzuordnen. Daher besteht berechtigter Grund zur Annahme, daß die Akkumulation von organischer Substanz in Moorböden, wie z. B. das Donaumoos in direkter Verbindung mit der hohen Abundanz von Archaeen steht. Eine Untersuchung der Moorhumusfraktion auf Etherlipide unter Verwendung von Isotopentechniken könnte in diesem Zusammenhang genauere Aussagen bringen.

Betrachtung von Gesamtpopulationen

Aus der Hauptkomponentenanalyse geht hervor (Abb. 35, S. 92), daß jede der insgesamt 14 Umweltproben (12 Bodenproben, 2 Gewässerproben) ihre individuelle Phospholipid-Zusammensetzung besitzt und dadurch deutlich von allen anderen Proben differenziert werden kann. Aufgrund von Kovarianzen lassen sich 4 Gruppen, bzw. Cluster erkennen. Diese setzen sich zusammen aus 1) den Gewässerproben, 2) den Proben vom September '99, 3) den Proben aus der Referenzfläche (Nov., Feb., Mai) und 4) den Proben aus Becken 1 und 2 (Nov., Feb., Mai). Daraus wird deutlich, daß sowohl Oxie/Anoxie als auch Probenahmezeitpunkt (= Jahreszeit), Änderungen in der mikrobiellen

Gemeinschaft bewirkten. Außerdem ist den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse zu entnehmen, daß sich die Mikroorganismengemeinschaften nach 1 Jahr Wiedervernässung noch in der Sukzessionsphase befinden. Während bei den überstauten Bodenhorizonten die Proben der November- und Februar-Beprobung noch große Ähnlichkeiten in ihren mikrobiellen Populationen zeigten, trat mit der Mai-Beprobung eine zunehmende Änderung der Populationsstruktur auf, die im Monat September am stärksten ausgeprägt war. Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, daß bei der November- und Februar-Beprobung, die Wassertemperaturen gleichermaßen niedrig, und bei der Beprobung im Mai und September gleichermaßen hoch war.

Genauere Informationen hinsichtlich der zukünftigen Entwicklung der Mikroorganismengemeinschaften in den überstauten Becken könnten weitere jahreszeitliche Untersuchungen von PLEL- und PLFA-Biomarker liefern.

Wenngleich Änderungen in der Populationsstruktur durch die veränderten Phospholipid-Zusammensetzungen erklärt werden können, ist es schwierig, diese Unterschiede in mikrobiologischer Hinsicht zu interpretieren (Olsson und Alström, 2000). Es ist davon auszugehen, daß zwar jede Bakterien- bzw. Archaeenzelle ihr typisches Phospholipid-Profil (s. Zelles, 1999b) besitzt, doch gilt es als eher unwahrscheinlich, daß eine Fettsäure bzw. eine funktionelle Gruppe von Fettsäuren nur in einer einzigen Gattung/Familie von Mikroorganismen anzutreffen ist (Zelles, 1999a; Mölter, 2000). Es lassen sich jedoch konkretere Aussagen dadurch gewinnen, wenn die Veränderungen in den Phospholipid-Profilen mit bodenphysikalischen, bodenchemischen und weiteren bodenbiologischen Parametern verknüpft werden, um dadurch jene Organismengruppe zu identifizieren, deren Population sich vergrößert, bzw. verkleinert hat.

So unterscheiden sich die Lipid-Profile in den Proben R-4, B1-4 und B2-4 von denen aller anderen Bodenproben durch den vergleichsweise hohen Anteil an NEL-PLFA bzw. den relativ geringen Anteil an EL-PLFA. Da die Proben B1-4 und B2-4 aus anoxischen Horizonten stammen, ist davon auszugehen, daß die darin gemessenen NEL-PLFA gänzlich andere Organismen charakterisieren, als die in der Probe R-4, die einem oxisch geprägten, trockenen Bodenhorizont entnommen wurde. Steinberger *et al.* (1999) wiesen in israelischen Wüstenböden NEL-PLFA Gehalte von bis zu 40% nach. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß *Archaea* NEL-PLFA enthalten und daß die Probe R-4 die höchste Zellzahl an *Crenarchaeota* aufwies. Daraus läßt sich die Vermutung äußern, daß die erhöhten NEL-PLFA-Konzentrationen in der Probe R-4 auf aerobe Archaeen, einschließlich *Crenarchaeota*, zurückzuführen sind, die über besondere Strategien bei Wasserstreß

verfügen. Die NEL-PLFA in den Proben B1-4 und B2-4 dagegen charakterisieren vorwiegend anaerobe Organismen, wie z.B. methanogene *Archaea*.

Methanogene und methanotrophe Mikroorganismengemeinschaften

Aufgrund von eigenen Untersuchungen und durch den Vergleich mit anderen Arbeiten kommt EURY-PLEL als Biomarker für *Euryarchaeota* hohe Spezifität zu, jedoch gilt das wahrscheinlich nicht für alle PLFA, die zu den MOB-PLFA zusammengefaßt wurden (Tab. 28, S. 104). So ist nicht auszuschließen, daß die beiden SATFA n14:0 und n16:0 nur in einem relativ geringen Anteil in den Methanotrophen im Donaumoos vorlagen, da diese zu den ubiquitären PLFA zählen. Die von vielen Autoren als Signalfettsäuren für Methanotrophe beschriebenen 16:1 ω 6 und 18:1 ω 8 MUFA konnten in keiner der Donaumoos-Proben nachgewiesen werden. Während Sundh *et al.* (1995) und Sundh *et al.* (1997) in schwedischen Hochmoorökosystemen o.g. Signalfettsäuren in signifikanten Konzentrationen messen und diese zudem direkt in Beziehung zu den Methanabbauraten setzen konnten, wird in der jüngsten Arbeit von Sundh *et al.* (2000) die Spezifität von 16:1 ω 6 und 18:1 ω 8 für methanotrophe Bakterien in Frage gestellt. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, ebenso wie die Arbeiten von Zelles (1999a; 1999b), daß einzelne PLFA als Signalfettsäuren für die Charakterisierung von taxonomischen Gruppen eher ungeeignet sind. Daher wurde der Ansatz gewählt, möglichst viele PLFA auszuwählen, die aufgrund von Labor- und Freilandstudien potentielle MOB-PLFA darstellen. Die Bestimmung von Methanotrophenzellzahlen ist mit diesem Ansatz jedoch nicht realisierbar.

In den Ergebnissen zeigt sich aber, daß die ausgewählten MOB-PLFA mit methanoxidierenden Eigenschaften in enger Beziehung stehen. Dies wird einerseits dadurch belegt, daß die Proben aus der oxisch geprägten Referenzfläche die höchsten MOB-PLFA Konzentrationen aufwiesen, andererseits dominierten MOB-PLFA, charakteristisch für Typ II Methanotrophe, in allen Bodenproben, während in den beiden Wasserproben MOB-PLFA, charakteristisch für Typ I, am häufigsten waren. Nach Sundh *et al.* (1995) und Edwards *et al.* (1998) dominieren Typ II Methanotrophe in Moorökosystemen, während in aquatischen Habitaten, wie z.B. Seewasser (Hanson und Hanson, 1996; Ross *et al.*, 1997) und Seesedimenten (Boschker *et al.*, 1998) Organismen des Typs I vorherrschen.

Die geringen Konzentrationen von MOB-PLFA in den Stauwasserproben der beiden Becken deuten daraufhin, daß bei der September-Beprobung in der Wassersäule keine nennenswerten Methanotrophenpopulationen vorhanden waren. Dieses Phänomen wird noch durch die mikroskopischen

Aufnahmen nach der *in situ*-Hybridisierung gestützt, wonach in Becken 2 “U-förmige” Bakterien, die eher nach Corynebakterien aussahen, etwa die Hälfte der mit EUB338 markierten Bakterien ausmachten. Nach Ross *et al.* (1997) bestand das Bakterioplankton in der Wasserphase eines australischen Feuchtgebietes zu 10-46% aus methanotrophen Bakterien (ermittelt mit FISH), die in Zelldichten zwischen $0,6$ und $5,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ auftraten. In den beiden Donaumoos-Becken dagegen belief sich die gesamte Bakterienzellzahl nur zwischen $3,2$ und $4,3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (Tab. 27, S. 100). Genauere Aussagen über das Vorkommen von Methanotrophen und deren Beitrag zum Methanabbau im Stauwasser der Donaumoos-Parzellen können dadurch erhalten werden, indem neben Methanogasmessungen in der Wasserphase spezifische rRNA-gerichtete Sonden zur Detektion von Methanotrophen oder zur Detektion des für die Methanoxidation entscheidenden Enzyms Methanmonooxygenase zum Einsatz kommen.

Es ist in diesem Zusammenhang auch kritisch zu hinterfragen, ob durch die Beprobungstiefe von 0-10 cm die Funktionszone zur Untersuchung von Methanogenen/Methanotrophen in den drei Standorten ausreichend erfaßt wurde. Da der Vergleich von mikrobiellen Gemeinschaften (nicht nur Methanogene/Methanotrophe) in oxischen und anoxischen Bodenökosystemen zu unterschiedlichen Jahreszeiten im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand, wurde eine einheitliche Beprobungstiefe von 0-10 cm gewählt. Daß diese Beprobungstiefe auch zum Nachweis der *in situ*-Funktion von Methanogenen und Methanotrophen in Moorökosystemen geeignet ist, zeigen Untersuchungen von Krumholz *et al.* (1995). Diese lokalisierten in intakten Bodenprofilen eines kanadischen Hochmoorökosystems bei anaerober Inkubation (= anoxische Umgebung) die höchsten Methanproduktionsraten zwischen Bodentiefen von 25-30 cm, und bei aerober Inkubation (= oxische Umgebung) wurden die höchsten Methanabbauraten zwischen 4-9 cm unterhalb der Bodenoberfläche festgestellt.

Die Bestimmung von EURY-PLEL- und MOB-PLFA-Biomarkern in den drei Parzellen liefert Erklärungsmuster für deren Unterschiede in den Methanflußraten:

Referenzfläche < Becken 1 < Becken 2

Die Ergebnisse aus den einzelnen Betrachtungen können wie folgt für die Charakterisierung der Populationen an (methanogenen) *Euryarchaeota* und methanotrophen Bakterien in den drei Parzellen zusammengefaßt werden:

Referenzfläche: Gleich große *Euryarchaeota*-Population wie in Becken 1, deren strukturelle Zusammensetzung einen mehr oder weniger schwach ausgeprägten “methanogenen Charakter” zeigte. Größte Population an methanotrophen Bakterien.

Becken 1: Gleich große *Euryarchaeota*-Population wie in der Referenzfläche, deren strukturelle Zusammensetzung ausgeprägten "methanogenen" Charakter aufwies. Methanotrophpopulation war ähnlich groß wie in Becken 2, jedoch bedeutend kleiner als in der Referenzfläche.

Becken 2 Tendenziell größte *Euryarchaeota*-Population, deren strukturelle Zusammensetzung ausgeprägten bis stark ausgeprägten "methanogenen" Charakter zeigte. Methanotrophpopulation war ähnlich groß wie in Becken 1, jedoch bedeutend kleiner als in der Referenzfläche.

Aufgrund der obigen Sachverhalte liegt die Vermutung nahe, daß die quantifizierten EURY-PLEL-Biomarker methanogene und einen mehr oder weniger großer Anteil an nicht-methanogenen *Euryarchaeota* erfaßten. Es läßt sich jedoch nicht sagen, um welche Organismen es sich bei den nicht-methanogenen *Euryarchaeota* in den Bodenproben aus dem Donaumoos handelte und welche Rolle sie in den jeweiligen Bodenökosystemen übernehmen. Küper (1998) hat mittels 16S rDNA Sequenzierung in einem Ackerboden nicht-methanogene *Euryarchaeota* nachweisen können, die eine große Verwandtschaft zur *Thermoplasma*-Gruppe zeigten, von denen aber bislang nur thermophile Vertreter isoliert werden konnten.

Die Unterschiede in den *Euryarchaeota*-, bzw. Methanogenpopulationen in den beiden überstauten Becken wurde wahrscheinlich durch die unterschiedliche Verfügbarkeit von O₂/H₂ und gelösten organischen Substraten verursacht (s. Chin und Conrad, 1995). Zur genaueren Klärung bieten sich Messungen von ¹³C/¹²C-Fraktionierungen an. So könnte der Einbau von potentiellen Substraten, wie z.B. Essigsäure oder Methanol, in die Membranlipide von Methanogenen durch Ermittlung des ¹³C/¹²C-Verhältnisses von PLEL und PLFA untersucht werden, was auch gleichzeitig eine Bestimmung der *in situ*-Funktion von mikrobiellen Gemeinschaften darstellt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfaßt die Aspekte Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in oxischen und anoxischen Bodenökosystemen auf der Basis von Phospholipid-Profilen.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde das zur Charakterisierung von Bodenmikroorganismen bereits etablierte Methodenspektrum der Bestimmung von Phospholipidfettsäuren (PLFA) so erweitert, daß auf Basis von Phospholipid-Etherlipiden (PLEL) nun auch Organismen der Domäne *Archaea* erfaßt werden können.

Die Bestimmung der Phospholipid-Etherlipide basiert auf der Erfassung der ethergebundenen Seitenketten. Dabei wird nach Abspaltung der polaren Gruppe des Phospholipid-Moleküls das Kernlipid erhalten, aus dem durch Etherspaltung mit Jodwasserstoffsäure Alkyljodide freigesetzt werden, die in einer zweiten Reaktion, der sogenannten reduktiven Dehalogenierung (Zn in Eisessig), zu Kohlenwasserstoffe reagieren und somit geeignete Derivate für die GC/MS-Analyse darstellen. Durch verschiedene methodische Anpassungen ist es nun möglich, die ganze Bandbreite von ethergebundenen Isoprenoiden mit den Kettenlängen C₁₅ bis C₄₀ in Bodenextrakten sowohl qualitativ als auch quantitativ, zu bestimmen.

So wurde in einer Auswahl von acht gefriergetrockneten Archaeenstämmen unter Verwendung zweier verschiedener Lipidextraktionsprotokolle eine durchschnittliche PLEL-Konzentration von 4,1 µMol g⁻¹ gefriergetrocknetem Zellmaterial (Median: 3,5 µMol g⁻¹ TS) ermittelt, die mit der von Nichols *et al.* (1987) in 25 verschiedenen Archaeen bestimmten Durchschnittskonzentration vergleichbar ist. Ebenso konnte exemplarisch an einer Auswahl von Archaeen und Bakterien die von vielen Autoren beschriebene Bedeutung der PLEL für die Systematik der Prokaryoten mittels Hauptkomponentenanalyse von PLEL-Profilen bestätigt werden, wobei sich große Übereinstimmungen mit phylogenetischen Charakterisierungen von Archaeenpopulationen ergaben (u.a. Barns *et al.*, 1996). Auch basierend auf PLFA-Profilen zeigte sich eine taxonomische Differenzierung von Archaeenpopulationen, die sich in weitgehender Übereinstimmung mit phylogenetischen Untersuchungen befand. So ergab die erweiterte Phospholipid-Analytik (PLFA+PLEL), daß die untersuchten Archaeen neben den ethergebundenen Isoprenoiden in ihren Membranlipiden auch signifikante Konzentrationen von nicht-estergebundenen Fettsäuren (NEL-PLFA) aufwiesen, deren relative Konzentrationen in bezug auf Gesamtphospholipide zwischen 9,7 und 83,4% variierten.

Die chemische Beeinflussung der OH-Gruppe von Hydroxyarchaeolen bei der Etherspaltung und der reduktiven Dehalogenierung führte dazu, daß aus diesen die gleichen Seitenketten wie aus C₂₀-C₂₀-Archaeolen freigesetzt wurden, was einen Informationsverlust hinsichtlich der taxonomischen Aussagekraft bedeutete. Daher wurde versucht die Kernlipide vor der Seitenkettenbestimmung nach funktionellen Gruppen zu trennen (selektive Seitenkettenbestimmung). Während dies in Reinkulturen gelang, war es in Bodenextrakten nicht möglich, Kernlipide mittels Festphasenextraktion nach funktionellen Gruppen zu trennen. Hier zeigte sich Entwicklungsbedarf von Verfahren zur Abspaltung der polaren Gruppen von PLEL-Molekülen, wobei die Hydrolyseverfahren sowohl für stark humose Bodenproben, als auch zur Detektion von säurelabilen Hydroxyarchaeolen geeignet sein sollten.

Neben den ethergebundenen Isoprenoiden wurden auch unverzweigte und einfach-verzweigte Kohlenwasserstoffe mit Kettenlängen von C₁₄ bis C₃₅ in der Phospholipidfraktion von Bodenextrakten detektiert, die mittels LC/MS (Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie) z. T. auf Etherlipide zurückgeführt werden konnten, wie sie in thermophilen Bakterien der Gattungen *Thermotoga* und *Aquifex* vorliegen.

Bei der Anwendung der erweiterten Phospholipid-Methodik ging es darum, den Einfluß der Wiedervernässung auf die Populationen von Bodenmikroorganismen bei der Rekultivierung eines degradierten Niedermoor-Standorts (Donaumoos) zu untersuchen. Dazu fanden Bodenbeprobungen von oxisch und anoxisch geprägten Moorökosystemen im November 1998, Februar 1999, Mai 1999 und September 1999 auf dem Versuchsstandort Donaumoos zeitgleich mit den Methangasmessungen statt. Es handelte sich bei den beprobten anoxischen Bodenökosystemen um zwei Flächen, die seit Sommer 1998 mit nährstoffbelastetem Wasser aus Entwässerungsgräben beschickt und zu dieser Zeit auch mit Rohrkolben (*Typha latifolia* und *Typha angustifolia*) bepflanzt wurden. Die Stauwasserhöhe betrug in Becken 1 40 cm und in Becken 2 20 cm. Als Referenzfläche diente eine ca. 4 × 8 m große (nicht-vernäßte) Parzelle, die weitgehend oxischen Charakter zeigte und als Grünland genutzt wurde.

Die Phospholipid-Untersuchungen der drei Parzellen ergaben, daß *Archaea* wesentlich zur mikrobiellen Biomasse in den beprobten Moorökosystemen beitrugen. Ihr Anteil an der ermittelten Gesamtzellzahl betrug im Durchschnitt der drei Flächen 26,0-38,8%, wobei *Crenarchaeota* vermehrt in der oxisch geprägten Referenzfläche und *Euryarchaeota* vermehrt in den wiedervernäßten, anoxischen Horizonten der Becken 1 und 2 auftraten. Ein Methodenvergleich zeigte, daß Phospholipid-Biomarker weitgehend zu denselben Aussagen führten wie

molekularbiologische Methoden, basierend auf FISH/DAPI, wengleich die mittels Phospholipid-Biomarker bestimmten Zellzahlen um den Faktor 10-100 höher waren als die mittels fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden nach *in situ*-Hybridisierung (FISH) und DAPI-Färbung.

Die Hauptkomponentenanalyse von Gesamtphospholipid-Profilen (PLFA+PLEL) ergab, daß sowohl Probenahmezeitpunkt (= Jahreszeit), als auch Oxie/Anoxie zu strukturellen Veränderungen in den Gesamtpopulationen führten. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, daß sich die mikrobiellen Populationen in den beiden überstauten Becken nach 1 Jahr Wiedervernässung noch in der Sukzessionsphase befanden.

Während die Referenzfläche im Mittel der vier Beprobungen Methan aufnahm, emittierten die beiden anoxisch geprägten, wiedervernässten Parzellen Methan, wobei die signifikant höchsten Werte im Becken 2 festgestellt wurden. Die Unterschiede in den Methanflußraten zwischen den drei Flächen lassen sich dadurch erklären, daß die *Euryarchaeota*-Populationen in den beiden überstauten Becken ausgeprägten bis stark ausgeprägten methanogenen Charakter zeigten. Dabei wurden tendenziell größere *Euryarchaeota*-Populationen in den Proben aus Becken 2 als in Becken 1 festgestellt. Außerdem wiesen die Proben der Referenzfläche größere Populationen an methanotrophen (= methanabbauenden) Bakterien auf, die zudem anders zusammengesetzt waren als in den Proben der anoxisch geprägten Bodenhorizonte, wobei in Becken 1 eine tendenziell größere Methanotrophenpopulation als in Becken 2 festgestellt wurde.

Aus den Populationsuntersuchungen von methanogenen und methanotrophen Mikroorganismen, basierend auf PLEL/PLFA-Biomarker, lassen sich die jahreszeitlichen Schwankungen der Methanflußraten für die Referenzfläche und das Becken 1 weitgehend, und für das Becken 2 nur bedingt ableiten. Im Becken 2 zeigte sich, daß höhere Umgebungstemperaturen, wie es bei der Mai- und September-Beprobung der Fall war, eher zur Erhöhung der Einzelzellaktivität als zur Zellvermehrung von methanogenen *Euryarchaeota* führte.

Die Bestimmung von Phospholipid-Etherlipiden stellt eine wertvolle Ergänzung zu der in der Bodenökologie etablierten Bestimmungsmethode von Phospholipidfettsäuren dar. Die Kombination beider Nachweisverfahren vermittelt Einblicke in die quantitativen Unterschiede von mikrobiellen Populationen in Bodenökosystemen, während die genetischen „fingerprinting“-Methoden in der Lage sind, die qualitative Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften, z.T. bis auf Spezies- und Subspezies-Ebene, aufzulösen.

Mit der erweiterten Phospholipid-Analytik (PLFA+PLEL) sind nun Grundlagen geschaffen worden, um in situ-Funktionen von mikrobiellen Gemeinschaften in Bodenökosystemen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen durch den Nachweis des ^{14}C - oder ^{13}C -Einbaus in die jeweiligen Biomarker zu untersuchen.

Summary

The present thesis deals with development and application of methods for the characterisation of microbial communities in oxic and anoxic soil ecosystems which are based on phospholipid profiling. During methodological development, phospholipid fatty acid (PLFA) analysis, already established in microbial ecology, was extended by estimating phospholipid etherlipids (PLEL) characteristic of archaeal microorganisms.

Phospholipid etherlipid analysis is based on the estimation of ether-linked side chains. Therefore, the polar head group of the phospholipid molecule is removed to access the ether core lipid, releasing alkyl iodides after cleavage of the ether bonds with HI acid. During the subsequent reductive dehalogenation step (Zn in acetic acid), these alkyl iodides are transformed to their corresponding hydrocarbons considered to be the most appropriate derivatives for gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis. Following several methodological adaptations, it is now possible to estimate both qualitatively and quantitatively the entire range of ether-linked isoprenoids with chains varying from C₁₅ to C₄₀ in soil extracts.

Using eight selected freeze-dried archaeal monocultures, a mean PLEL concentration of 4,1 µMol g⁻¹ dried cell mass was estimated (Median: 3,5 µMol g⁻¹ dried cell mass), which was comparable to the average PLEL concentration estimated in 25 archaeal strains by Nichols et al. (1987). Furthermore, when lipid data was subjected to principal component analysis the significance of PLEL for prokaryotic systematics could be demonstrated in a selection of archaeal and bacterial monocultures. A discrimination of archaeal populations could be also performed based on PLFA profiles and which was in overall accordance with phylogenetic analyses. As revealed by extended phospholipid analysis (PLFA+PLEL), *Archaea* contained, apart from ether-linked isoprenoids, significant amounts of non-esterlinked fatty acids (NEL-PLFA) in their polar membrane lipids, accounting for 9,7 to 83,4% of total phospholipid side chains.

Chemical manipulation of the OH-group in hydroxyarchaeols during cleavage of the ether bonds and reductive dehalogenation caused the formation of identical chains as released from C₂₀-C₂₀-archaeols. This event also resulted in a loss of taxonomic information. Thus, an attempt was made to separate ether core lipids into functional groups prior to side chain analysis by solid phase extraction (selective side chain analysis). While this concept could be successfully applied on monocultures, it was impossible to separate soil core lipids into functional groups. This failure may have been due to

artefactual effects of inadequate hydrolyzation of the acid-labile hydroxyarchaeols from soils rich in humic substances. Future improvements are due in this respect.

Apart from ether-linked isoprenoids, straight-chain and monomethyl-branched hydrocarbons with chains ranging from C₁₄ to C₃₅ were also found in phospholipids from different soil types. Using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) some of these side chains could be traced back to etherlipids similar to these found in thermophilic bacteria of the genera *Aquifex* and *Thermotoga*. The extended phospholipid method was employed within an integrated research project aimed at creating a sustainable land use system for peat soils in the „Donaumörs“ region of Germany. Specifically, the influence of rewetting the heavily degraded peat soil on soil microorganisms was investigated using phospholipid profiling. Soil samples at a depth of 0-10 cm were taken from oxic and anoxic sites in November 1998, February 1999, May 1999 and September 1999, methane gas fluxes were also estimated at these time points. Since July 1998, the anoxic sites consisted of two basins planted with *Typha* sets, surrounded by a 1 m high dike and flooded with water from a slightly nutrient loaded draining ditch. The water levels in basin 1 and 2 were 40 and 20 cm, respectively. A nearby drained peat soil used as a grassland with significant oxic properties served as a reference plot and was investigated in the same manner.

Phospholipid analyses revealed that *Archaea* contributed significantly to the microbial biomass in peatland soils: 26,0-38,8% of the estimated total microbial cells could be allocated to organisms of the domain *Archaea*. While the percentage of organisms belonging to the archaeal kingdom *Euryarchaeota* was higher in anoxic than oxic sites, the abundance of *Crenarchaeota* was highest in oxic sites. Extended phospholipid analysis lead to similar results as fluorescent in situ hybridization and DAPI staining (FISH/DAPI), when both approaches were applied to the same soil samples. However, 10-100 magnitudes higher cell numbers were estimated using the phospholipid assay than with the FISH/DAPI approach.

Sampling date (= season) and oxic/anoxic properties yielded differences in the microbial community structure, as revealed by principal component analysis of the lipid biomarker data. Furthermore, it seems that microbial populations in the anoxic sites are still apparently in a phase of succession, even after one year of rewetting.

Differences in methane fluxes could be related to differences in the colonisation of methanogenic and methanotrophic microorganisms in the three sites. According to PLEL profiling, *Euryarchaeota* populations in anoxic sites showed distinct methanogenic properties. In addition, higher concentrati-

ons of PLFA characteristic for methanotrophic (= methane oxidising) microorganisms were found in the oxic reference plot.

The analysis of phospholipid etherlipids represents a useful extension of the phospholipid approach. Combining both PLFA and PLEL analyses allows for insights into the quantitative differences of soil microbial communities, whereas genetic fingerprinting methods provide detailed views of the qualitative composition at the species or even at subspecies level.

Moreover, the extended phospholipid analysis enables the study of *in situ* functions of microbial communities in soil ecosystems on different taxonomic levels using ^{14}C - or ^{13}C -labelling methods.

6 Literatur

- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olsen, S.W. Chisholm, R. Devereux and D.A. Stahl (1990a)** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl (1990b)** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.
- Amann, R.I., W. Ludwig and K.-H. Schleifer (1995)** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Ambus, P. and S. Christensen (1995)** Spatial and seasonal nitrous oxide and methane fluxes in Danish forest-, grassland- and agroecosystems. *J. Environ. Qual.* 24:993-1001.
- Armstrong, J. and W.A. Armstrong (1988)** *Phragmites australis* - a preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. *New Phytol.* 108:373-382.
- Asakawa, S., M. Akagawa-Matsushita, Y. Koga and K. Hayano (1998)** Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 30:299-303.
- Backhaus, K., B. Erichson, W. Plinke, C. Schuchard-Fischer and R. Weiber (1989)** *Multivariate Analysemethoden.* Springer-Verlag, Berlin.
- Bai, Q.Y. and L. Zelles (1997)** A method for determination of archaeal ether-linked glycerolipids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection as their 9-anthroyl derivatives. *Chemosphere* 35:263-274.
- Bai, Q., A. Gattinger and L. Zelles (2000)** Characterisation of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis. *Microbiol. Ecol.* 39:273-281.
- Balkwill, D.L., F.R. Leach, J.T. Wilson, J.F. McNabb and D.C. White (1988)** Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. *Microbiol. Ecol.* 16:73-84.

- Balkwill, D.L., G.R. Drake, R.H. Reeves, J.K. Fredrickson, D.C. White, D.B. Ringelberg, D.P. Chandler, M.F. Romine, D.W. Kennedy and C.M. Spadoni (1997)** Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. Int. J. Sys. Bacteriol. 47:191-201.
- Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (1992)** The Prokaryotes. Springer Verlag, New York, Second Edition.
- Barns, S.M., R.E. Fundyga, M.W. Jeffries and N.R. Pace (1994)** Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9188-9193.
- Barns, S.M., C.F. Delwiche, J.D. Palmer and N.R. Pace (1996)** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9188-9193.
- Bauer, S.H. (1998)** Untersuchungen zur bakteriellen Diversität in der Rhizosphäre von Raps und Mais. Dissertation, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Benstead, J. and D. Llyod (1994)** Direct mass spectrometric measurement of gases in peat cores. FEMS Microbiol. Ecol. 13:233-240.
- Bintrim, S.B., T.J. Donohue, J. Handelsman, G.P. Roberts and R.M. Goodman (1997)** Molecular phylogeny of archaea from soil. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:277-282.
- Boon, P.I. and A. Mitchell (1995)** Methanogenesis in the sediments of an Australian freshwater wetland: Comparison with aerobic decay, and factors controlling methanogenesis. FEMS Microbiol. Ecol. 18:175-190.
- Boon, P.I., P. Virtue and P.D. Nichols (1996)** Microbial consortia in wetland sediments: a biomarker analysis of the effects of hydrological regime, vegetation and season on benthic microbes. Mar. Freshwater Res. 47:27-41.
- Bornemann, J., P.W. Skroch, K.M. O'Sullivan, J.A. Paulus, N.G. Rumjanek, J.L. Jansen, J. Nienhuis and E.W. Triplett (1996)** Molecular diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62:1935-1943.

- Boschker, H.T.S., S.C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W.D. Graaf, R. Pel, R.J. Parkes and T.E. Cappenberg (1998)** Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature* 392:801-805.
- Bowman, J.P., J.H. Skeratt, P.D. Nichols and L.I. Sly (1991)** Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:15-22.
- Bowman, J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols and A.C. Hayward (1993)** Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 43:735-753.
- Bridgham, S.D., C.A. Johnston, J. Pastor and K. Updegraff (1995)** Potential feedbacks of northern wetlands on climate change. *Bioscience* 45:262-274.
- Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter and H.F. Noller (1981)** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
- Buckley, D.H. and J.R. Graber (1998)** Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4333-4339.
- Chappe, B., P. Albrecht and W. Michaelis (1982)** Polar lipids of archaeobacteria in sediments and petroleums. *Science* 217:65-66.
- Chin, K.-J. and R. Conrad (1995)** Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18:85-102.
- Collins, M.D., M. Goodfellow and D.E. Minnikin (1980)** Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 118:29-37.
- Comita, P.B., R.B. Gagosian, H. Pang and C.E. Costello (1984)** Structural elucidation of a unique macrocyclic membrane lipid from a new, extremely thermophilic, deep-sea hydrothermal vent archaeobacterium, *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* 259:15234-15241.
- Conrad, R. (1996)** Soil microbial processes involved in production and consumption of atmospheric trace gases. *Advances in Microbial Ecology* 14:207-250.

- DeLong, E.F., L.L. King, R. Massana, H. Cittone, A. Murray, C. Schleper and S.G. Wakeham (1998)** Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1133-1138.
- De Rosa, M., A. Gambacorta, B. Nicolaus, B. Chappe and P. Albrecht (1983)** Isoprenoid ethers, backbone of complex lipids of the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochim. Biophys. Acta* 753:249-256.
- De Rosa, M., A. Gambacorta, V. Lanzotti, A. Trincone, J.E. Harris and W.D. Grant (1986)** A range of ether core lipids from the methanogenic archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biochim. Biophys. Acta* 875:487-492.
- De Rosa, M., A. Gambacorta, R. Huber, V. Lanzotti, B. Nicolaus, K.O. Stetter and A. Trincone (1988)** Lipid structures in *Thermotoga maritima*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1300-1301.
- De Rosa, M., A. Gambacorta, R. Huber, V. Lanzotti, B. Nicolaus, K.O. Stetter and A. Trincone (1989)** Lipid structures in *Thermotoga maritima*. In M. S.D. Costa, J.C. Duarte and R.A.D. Williams (eds.), *Microbiology in extreme environments and its potential for biotechnology*. Elsevier Applied Science, London-New York, pp. 167-173.
- De Rosa, M. and A. Gambacorta (1994)** Archaeal Lipids. In M. Goodfellow and A.G. O'Donnell (eds.), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. John Wiley and Sons Ltd., pp. 197-309.
- Dickins, H.D. and E.S. van Vleet (1992)** Archaeobacterial activity in the Orca Basin determined by the isolation of characteristic isopranyl ether-linked lipids. *Deep-Sea Research* 39:521-536.
- DSMZ (1998)** Catalogue of Strains. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.
- Edwards, C., B.A. Hales, G.H. Hall, I.R. McDonald, J.C. Murrell, R. Pickup, D.A. Ritchie, J.R. Saunders, B.M. Simon and M. Upton (1998)** Microbiological processes in the terrestrial carbon cycle - methane cycling in peat. *Atmos. Environ.* 32:3247-3255.
- Ekiel, I. and G.D. Sprott (1992)** Identification of degradation artifacts formed upon treatment of hydroxydiether lipids from methanogenes with methanolic HCl. *Can. J. Microbiol.* 38:764-768.

- Elsas, J.D.v., J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (1997)** Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York.
- Ferrante, G., I. Ekiel, G.B. Patel and G.D. Sprott (1988a)** A novel core lipid isolated from the acetoclastic methanogen, *Methanotherix concilii* GP6. Biochim. Biophys. Acta 963:173-182.
- Ferrante, G., I. Ekiel, G.B. Patel and G.D. Sprott (1988b)** Structure of the major polar lipids isolated from the acetoclastic methanogen, *Methanotherix concilii* GP6. Biochim. Biophys. Acta 963:162-172.
- Flessa, H., P. Dörsch and F. Beese (1995)** Seasonal variation of N₂O and CH₄ fluxes in differently managed arable soils in Southern Germany. J. Geophys. Res. 100:23115-23124.
- Flessa, H., U. Wild, M. Klemisch and J. Pfadenhauer (1998)** Nitrous oxide and methane fluxes from organic soils under agriculture. Europ. J. Soil Sci. 49:327-335.
- Franzmann, P.D., E. Stackebrandt, K. Sanderson, J.K. Volkman, D.E. Cameron, P.L. Stevenson and T.A. McMeekin (1988)** *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. Syst. Appl. Microbiol. 11:20-27.
- Fritze, H., P. Tikka, T. Pennanen, A. Saano, G. Jurgens, M. Nilsson, I. Bergman and V. Kitunen (1999)** Detection of *archaeal* diether lipid by gas chromatography from humus and peat. Scandinavian Journal of Forest Research 14:545-551.
- Frostegård, A., A. Tunlid and E. Baath (1993)** Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Appl. Environ. Microbiol. 59:3605-3617.
- Frostegård, A. and E. Baath (1996)** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol. Fertil. Soils 22:59-65.
- Gattinger, A., C. Bruns and C. Schüller (1997)** Microbial biomass and activity in composts differing in type of input material and age. In: E.I. Stentiford (ed.) Proceedings: Organic Recovery and Biological Treatment into the next Millennium. Zebra Publishing, Manchester, pp. 289-293.
- Gattinger, A., C. Bruns and C. Schüller (2000)** Microbial characteristics in composts differing in input material and duration of storage. Submitted.
- Gelpi, E., D.W. Nooner and J. Oró (1969)** Isoprenoids and other hydrocarbons in terrestrial graphite. Geochim. Cosmochim. Acta 33:959-972.

- Gorham, E. (1991)** Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climate warming. *Ecol. Appl.* 1:182-195.
- Guckert, J.B., D.B. Ringelberg, D.C. White, R.S. Hanson and B.J. Bratina (1991)** Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137:2631-2641.
- Guezennec, J. and A. Fiala-Medioni (1996)** Bacterial abundance and diversity in the barbados trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19:83-93.
- Hafenbradl, D., M. Keller, R. Thiericke and K.O. Stetter (1993)** A novel unsaturated archaeal ether core lipid from the hyperthermophile *Methanopyrus kandleri*. *Sys. Appl. Microbiol.* 16:165-169.
- Hafenbradl, D., M. Keller and K.O. Stetter (1996)** Lipid analysis of *Methanopyrus kandleri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136:199-202.
- Han, J. and M. Calvin (1969)** Occurrence of C₂₂-C₂₅ isoprenoids in bell creek crude oil. *Geochim. Cosmochim. Acta* 33:733-742.
- Hanson, R.S. and T.E. Hanson (1996)** Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* 60:439-471.
- Hartmann, A., B. Assmus, G. Kirchhof and M. Schloter (1997)** Direct approaches for studying soil microbes. In J.D. v. Elsas, J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 279-309.
- Hellmann, B., L. Zelles, A. Palojarvi and Q. Bai (1997)** Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1011-1018.
- Hewlett Packard (1989)** NIST PBM Library, HP G1033A.
- Hoefs, M.J.L., S. Schouten, J.W.D. Leeuw, L.L. King, S.G. Wakeham and J.S.S. Damste (1997)** Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3090-3095.
- Holmes, A.J., P. Rosley, I.R. McDonald, N. Iversen, K. Henriksen and J.C. Murrell (1999)** Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3312-3318.

- Holzer, G., J. Oró and I.G. Tornabene (1979)** Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of neutral lipids from methanogenic and thermoacidophilic bacteria. *J. Chrom.* 186:795-809.
- Huber, R., M. Kurr, H.W. Jannasch and K.O. Stetter (1989)** A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature* 342:833-834.
- Huber, R., T. Willharm, D. Huber, A. Trincone, S. Burggraf, H. König, R. Rachel, I. Rockinger, H. Fricke and K.O. Stetter (1992)** *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 15:340-351.
- Hutchinson, G.L. and A.R. Mosier (1981)** Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide flux. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:311-316.
- IPCC (1996)** *Climate Change 1995 - The science of Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, W.J., D.P. Nagele and W.B. Whitman (1987)** Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* 51:135-177.
- Jones, W.J. and G.U. Holzer (1991)** The polar and neutral lipid composition of *Methanosphaera stadtmanae*. *Sys. Appl. Microbiol.* 14:130-134.
- Jurgens, G., K. Lindström and A. Saano (1997)** Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:803-805.
- Kates, M., L.S. Yengoyan and P.S. Sastry (1965)** A diether analog of phosphatidyl glycerophosphate in *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 98:252-268.
- Kates, M., D.J. Kushner and A.T. Matheson (1993)** *The Biochemistry of Archaea* (Archaeobacteria). Elsevier, Amsterdam.
- Koga, Y., M. Akagawa-Matsushita, M. Ogha and M. Nishihara (1993)** Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar ether lipids in methanogens. *Sys. Appl. Microbiol.* 16:342-351.
- Koga, Y., H. Morii, M. Akagawa-Matsushita and M. Ohga (1998)** Correlation of polar lipid composition with 16s rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipids component parts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62:230-236.

- Kohring, L.L., D.B. Ringelberg, R. Devereux, D.A. Stahl, M.C.W. Mittelman and D.C. White (1994)** Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 119:303-308.
- Korner, J. and E. Laczko (1992)** A new method for assessing soil microorganism diversity and evidence of vitamin deficiency in low diversity communities. Biol. Fertil. Soils 13:58-60.
- Krumholz, L.R., J.L. Hollenback, S.J. Roskes and D.B. Ringelberg (1995)** Methanogenesis and methanotrophy within a *Sphagnum* peatland. FEMS Microbiol. Ecol. 18:215-224.
- Küper, R. (1998)** Phylogenetische Untersuchungen an bisher nicht-kultivierten Archaeen aus gemäßigten Habitaten. Dissertation, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- Lafferty, F.W.M. and F. Turecek (1993)** Interpretation von Massenspektren. Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Langworthy, T.A. (1982)** Lipids of thermoplasma. Method. Enzymol. 88:396-406.
- Langworthy, T.A., T.G. Tornabene and G. Holzer (1982)** Lipids of archaebacteria. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C 3:228-244.
- Langworthy, T.A., G. Holzer, J.G. Zeikus and T.G. Tornabene (1983)** Iso- and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. Sys. Appl. Microbiol. 4:1-17.
- Lee, N., P.H. Nielsen, K.H. Andreasen, S. Juretschko, J.L. Nielsen, K.-H. Schleifer and M. Wagner (1999)** Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65:1289-1297.
- Liesack, W., F. Bak, J.-U. Kreft and E. Stackebrandt (1994)** *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. Arch. Microbiol. 162:85-90.

Liesack, W., P.H. Janssen, F.A. Rainey, N.L. Ward-Rainey and E. Stackebrandt (1997)

Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In J.D. v. Elsas, J.T. Trevors and E.M.H. Wellington (eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 375-439.

Mancuso, C.A., G. Odham, G. Westerdahl, J.N. Reeve and D.C. White (1985) C₁₅, C₂₀,

and C₂₅ isoprenoid homologues in glycerol diether phospholipids of methanogenic archaeobacteria. *J. Lipid Res.* 26:1120-1125.

Mancuso, C.A., P.D. Franzmann, H.R. Burton and P.D. Nichols (1990) Microbial community

structure and biomass estimates of a methanogenic antarctic lake ecosystem as determined by phospholipid analyses. *Microbiol. Ecol.* 19:73-95.

Martikainen, P.J., H. Nykänen, J. Alm and J. Silvola (1995) Changes in fluxes of carbon

dioxide, methane and nitrous oxide due to forest drainage of mire sites of different trophic. *Plant Soil* 168-169:571-577.

Moldoveanu, N., M. Kates, C.G. Montero and A. Ventosa (1990) Polar lipids of non-

alkaliphilic *Halococci*. *Biochim. Biophys. Acta* 1046:127-135.

Morgan, J.A.W. and C. Winstanley (1997) Microbial biomarkers. In J.D. v. Elsas, J.T. Trevors

and E.M.H. Wellington (eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 331-347.

Morii, H. and Y. Koga (1993) Tetraether type polar lipids increase after logarithmic growth phase

of *Methanobacterium thermoautotrophicum* in compensation for the decrease of diether lipids. *FEMS Microbiol. Lett.* 109:283-288.

Morii, H., T. Eguchi, M. Nishihara, K. Kakinuma, H. König and Y. Koga (1998) A novel

ether core lipid with H-shaped C₈₀-isoprenoid hydrocarbon chain from the hyperthermophilic methanogen *Methanothermus fervidus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1390:339-345.

Mölter, K. (2000) Strukturelle und ökophysiologische Charakterisierung von

Bodenmikroorganismenpopulationen in kupferbelasteten Agrarflächen anhand von Phospholipidfettsäure(PLFA-) Profilen. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau.

- Neef, A., R. Amann, H. Schlesner and K.-H. Schleifer (1998)** Monitoring a widespread bacterial group by *in situ* detection of Planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144:3257-3266.
- Nichols, P.D., C.A. Mancuso and D.C. White (1987)** Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model systems. *Org. Geochem.* 11:451-461.
- Nichols, P.D. and P.D. Franzmann (1992)** Unsaturated diether phospholipids in the antarctic methanogen *Methanococcoides burtonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:205-208.
- Nishihara, M. and Y. Koga (1987)** Extraction and composition of polar lipids from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*: effective extraction of tetraether lipids by an acidified solvent. *J. Biochem.* 101:997-1005.
- Ohtsubo, S., M. Kanno, H. Miyahara, S. Kohno, Y. Koga and I. Miura (1993)** A sensitive method for quantification of acetivlastic methanogens and estimation of total methanogenic cells in natural environments based on an analysis of ether-linked glycerolipids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12:39-50.
- Olsson, S. and S. Alström (2000)** Characterisation of bacteria in soils under barley monoculture and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* 32:1443-1451.
- Panganamala, R.v., C.F. Sievert and D.G. Cornwell (1971)** Quantitative estimation and identification of o-alkyl glycerols as alkyl iodides and their hydrocarbon derivatives. *Chem. Phys. Lipids* 7:336-344.
- Pauly, G.G. and E.S. van Vleet (1986)** Acyclic archaeobacterial ether lipids in swamp sediments. *Geochimica et Cosmochimica* 50:1117-1125.
- Peters, V. and R. Conrad (1995)** Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1673-1676.
- Pfadenhauer, J. (1997)** Vegetationsökologie - ein Skriptum. IHW-Verlag, Eching, 2. Auflage.
- Porter, K.G. and Y.S. Feig (1980)** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25:943-948.
- Reichardt, W., G. Mascarina, B. Padre and J. Doll (1997)** Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:233-238.

- Ross, H.N.M. and W.D. Grant (1985)** Lipids in archaeobacterial taxonomy. *In* M. Goodfellow and D.E. Minnikin (eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, London, pp. 289-300.
- Ross, J.L., P.I. Boon, P. Ford and B.T. Hart (1997)** Detection and quantification with 16S rRNA probes of planktonic methylotrophic bacteria in a floodplain lake. *Microbiol. Ecol.* 34:97-108.
- Sandaa, R.-A., O. Enger and V. Torsvik (1999)** Abundance and diversity of *Archaea* in heavy metal contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3293-3297.
- Schachtschabel, P., H.-P.-. Blume, G. Brümmer, K.-H. Hartge and U. Schwertmann (1989)** *Lehrbuch der Bodenkunde*. Enke, Stuttgart, 12. Auflage.
- Schlöter, M., L. Zelles, A. Hartmann and J.C. Munch (1998)** New quality of assessment of microbial diversity in arable soils using molecular and biochemical methods. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 161:425-431.
- Schomburg, G. (1987)** *Gaschromatographie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Spiteller, M. and G. Spiteller (1973)** *Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen*. Springer-Verlag, Wien, New York.
- Sprott, G.D., I. Ekiel and C. Dicaire (1990)** Novel, acid-labile, hydroxydiether lipid cores in methanogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* 265:13735-13740.
- Stahl, D.A. and R.I. Amann (1991)** Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics*. Wiley and Sons, Chichester, GB, pp. 205-248.
- Steinberger, Y., L. Zelles, Q.Y. Bai, M.v. Lützow and J.C. Munch (1999)** Phospholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climate transect in the Judean desert. *Biol. Fertil. Soils* 28:292-300.
- Summons, R.E., P.D. Franzmann and P.D. Nichols (1998)** Carbon isotopic fractionation associated with methylotrophic methanogenesis. *Org. Geochem.* 28:465-475.

- Sundh, I., P. Borga, M. Nilsson and B.H. Svensson (1995)** Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18:103-112.
- Sundh, I., M. Nilsson and P. Borga (1997)** Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1476-1482.
- Sundh, I., G. Börjesson and A. Tunlid (2000)** Methane oxidation and phospholipid fatty acid composition in a podzolic soil profile. *Soil Biol. Biochem.* 32:1025-1028.
- Thiele, O.W. (1979)** Lipide, Isoprenoide mit Steroiden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Torsvik, V., J. Goksoyr and F.L. Daae (1990)** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- Trincone, A., M. DeRosa, A. Gambacorta, V. Lanzotti, B. Nicolaus, J.E. Harris and W.D. Grant (1988)** A simple chromatographic procedure for the detection of cyclized archaeobacterial glycerol-bisdiphytanyl-glycerol tetraether core lipids. *J. Gen. Microbiol.* 134:3159-3163.
- Tunlid, A. and D.C. White (1992)** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. *In* G. Stotzky and J.M. Bollag (eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, pp. 229-262.
- Ueda, T., Y. Suga and T. Matsuguchi (1995)** Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Europ. J. Soil Sci.* 46:415-421.
- VDLUFA (1991)** Die Untersuchung von Böden. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 4. Auflage.
- Vink, A., S. Schouten, S. Sephton and J.S.S. Damsté (1998)** A newly discovered norisoprenoid, 2,6,15,19-tetramethylcosane, in cretaceous black shales. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62:965-970.
- Wachinger, G., S. Fiedler, K. Zepp, A. Gattinger, M. Sommer and K. Roth (2000)** High spatial variability of methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and archaeal populations. *Soil Biol. Biochem.* 32:1121-1130.

- Whalen, S.C., W.S. Reeburgh and C.E. Reimers (1996)** Control of tundra methane emission by microbial oxidation. In J.F. Reynolds and J.D. Tenhunen (eds.), Landscape function: implications for ecosystem response to disturbance, a case study in Arctic tundra. Springer-Verlag, Berlin, pp. 257-274.
- White, D.C., W.M. Davis, J.S. Nickels, J.D. King and R.J. Bobbie (1979)** Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia* 40:51-62.
- White, D.C., J.O. Stair and D.B. Ringelberg (1996)** Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Indust. Microbiol.* 17:185-196.
- Wild, U., T. Kamp, A. Lenz, S. Heinz and J. Pfadenhauer (2000a)** Cultivation of *Typha* spp. in constructed wetlands for peatland restoration. *Ecological Engineering*, in press.
- Wild, U., A. Lenz, T. Kamp, S. Heinz and J. Pfadenhauer (2000b)** Vegetation development, nutrient removal and trace gas fluxes in constructed *Typha* spp. wetlands. Submitted.
- Wintzingerode, F.v., U.B. Göbel and E. Stackebrandt (1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:213-229.
- Woese, C.R. and G.E. Fox (1977)** Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5088-5090.
- Woese, C.R., O. Kandler and M.L. Wheelis (1990)** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
- Zelles, L., Q.Y. Bai, T. Beck and F. Beese (1992)** Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:317-323.
- Zelles, L. and Q.Y. Bai (1993)** Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil. Biol. Biochem.* 25:130-134.
- Zelles, L. (1997)** Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35:275-294.
- Zelles, L. (1999a)** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29:111-129.

Zelles, L. (1999b) Identification of single cultured microorganisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere* 39:665-682.

Danksagung

Herrn Prof. J. C. Munch danke ich sehr herzlich für die Stellung des Themas, für die Unterstützung der Arbeit und sein uneingeschränktes Interesse am Fortgang der Untersuchungen.

Bei Herrn Dr. Laszlo Zelles möchte ich mich besonders für die umfassende Betreuung in Sachen Phospholipide bedanken, für die Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Freiraum, den er mir stets gewährte.

Frau Christine Kollerbauer, Florian Streit und Thomas Walter haben mir mit Rat und Tat bei den Lipidanalysen und weiteren technischen Angelegenheiten zur Seite gestanden.

Dr. Thomas Kamp sei herzlich gedankt für die fachliche Betreuung bei den Beprobungen im Donau- moos und die Unterstützung bei den Methangasmessungen.

Dr. Marion Stoffels und Andreas Günthner haben bei den molekurbioologischen Untersuchungen, bzw. bei der LC/MS-Analytik wertvolle Unterstützung geleistet.

Mein Dank gebührt außerdem all meinen Kolleginnen und Kollegen vom IBOe für die kamerad- schaftliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte meiner Partnerin Martha Sterniczky ganz, ganz herzlich danken, daß sie bereit war die Belastungen mitzutragen und mich durch ihre liebevolle Art unterstützte und durch ihre musika- lisch-künstlerische Betätigung einen wichtigen Gegenpol zu meinem naturwissenschaftlichem Stre- ben darstellte.

Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt meinen Eltern Josef und Marianne Gattinger und meinen Brüdern Frank und Stefan. Meine Eltern waren es, die mir die bäuerliche Denk- und Lebens- weise mit auf den Weg gegeben, meine Ausbildung und meinen Werdegang finanziell mitgetra- gen und mir Ihr offenes Wesen übertragen haben. Vielleicht wären die beiden einen ähnlichen Weg gegangen, wenn sie diese Möglichkeiten gehabt hätten.

Lebenslauf

Name: Andreas Gattinger
Geboren: 07.09.1965
Familienstand: Ledig

Ausbildung

1972-1977 Mittelpunktschule Goldener Grund in Selters-Niederselters (Grundschule)
1977-1982 Taunusschule Bad Camberg (Gesamtschule)
1985 Tilemannschule Limburg (Humanistisches Gymnasium), Abitur
1985-1986 Grundwehrdienst in Holzminden/Weser
1986-1989 Chemielaborantenausbildung bei den Unternehmen Fresenius AG und Hoechst AG

1989 Landwirtschaftliches Praktikum auf einer Schaf- und einer Milchvieh-Farm in Neuseeland für die Dauer von einem halben Jahr
1989-1994 Studium der Agrarwirtschaft an der Gesamthochschule Kassel-Witzenhausen
Integriertes Praktikum an der Bundesanstalt für Alpenländische Milchwirtschaft in Rotholz/Tirol; Studienschwerpunkt Ökologischer Landbau; Diplom
1995-1996 Aufbaustudiengang „Sustainable Agriculture“ an der University of Aberdeen/Scottish Agricultural College; Abschluß: Master of Science (MSc)

Beruflicher Werdegang

seit 1986 regelmäßige Mitarbeit auf dem elterlichen landwirtschaftlichen Betrieb; mehrere Einsätze als Betriebshelfer im Auftrag der Landwirtschaftlichen Alterskasse Hessen
1993 Erwerb der Ausbildungsberechtigung von landwirtschaftlichen Gehilfen
01/95-08/95 Werkvertrag am Fachgebiet Ökologischer Landbau der GH Kassel
03/97-05/00 Doktorand am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg
seit 11/00 Nachwuchswissenschaftler am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg