

**Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften  
beim methanogenen Abbau  
von Reisstroh im Boden**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Sabine Weber  
aus Nittenau

Marburg / Lahn (2000)

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden vom 01.12.1997 bis 30.11.2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg / Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2000

Ein Großteil der während der Dissertation erzielten Ergebnisse ist in folgender Publikation veröffentlicht:

Weber, S., S. Stubner und R. Conrad. 2000. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, in Druck.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	1
<b>Zusammenfassung</b>	2
<b>I) Einleitung</b>	4
1. Die Bedeutung von Methan als Treibhausgas und Quellen der Methanemission	4
2. Der Einfluß von organischem Material auf die Methanemission in Reisfeldern	5
3. Anaerober Abbau von Polysacchariden durch verschiedene physiologische Gruppen von Mikroorganismen	6
4. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung mikrobieller Populationen	8
5. Ziele dieser Arbeit	11
<b>II) Material und Methoden</b>	12
1. Materialien	12
1.1 Boden	12
1.2 Reisstroh	12
1.3 Referenzorganismen für "Ganz-Zell"- und "Northern-Blot"-Hybridisierung	13
1.3.1 Medien	13
1.3.2 Kultivierung und Präparation der Referenzorganismen	14
1.4 Chemikalien	15
1.5 Geräte	15
2. Ansätze zur Untersuchung strohabbauender Organismen	16
2.1 Ansätze in Plastikblumentöpfen	16
2.2 Ansätze in 150 ml Serumflaschen	17
3. Gaschromatographische Analyse von Methan und Kohlendioxid	17

<b>4. Präparation der Proben</b>	18
4.1 Erde	18
4.2 Stroh	18
4.3 "PBS-Zellextrakt"	19
<b>5. Extraktion der gesamten DNA</b>	19
<b>6. Extraktion der gesamten RNA</b>	21
<b>7. Agarosegelelektrophorese</b>	23
<b>8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	24
<b>9. Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)</b>	26
<b>10. Terminale-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP)</b>	28
<b>11. Klonierung</b>	29
<b>12. Sequenzanalyse der 16S rDNA-Fragmente</b>	32
12.1 Nicht-radioaktive, "zyklische" Sequenzierung	32
12.2 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen	34
<b>13. Quantifizierung bakterieller Zellen durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung</b>	35
13.1 Verwendete 16S rRNA-Sonden und deren Stringenzbedingungen	35
13.2 "Ganz-Zell"-Hybridisierung	37
13.3 Konfokale Laser-Rastermikroskopie	39
13.4 Quantifizierung	40
<b>14. Quantifizierung archaealer SSU rRNA mit "Northern-Blot"-Hybridisierung</b>	41
14.1 "Northern-Blot"-Hybridisierung	41
14.2 Quantifizierung der SSU rRNA	44
14.2.1 Quantifizierung der SSU rRNA der Referenzorganismen mit einem RNA-Standard	44
14.2.2 Quantifizierung der SSU rRNA der Umweltproben	46
<b>III) Ergebnisse</b>	48
<b>1. Anaerobe Besiedlung von Reisstroh durch <i>Bacteria</i></b>	48
1.1 Der Einfluß verschiedener Strohsorten und Inkubationsbedingungen auf die bakteriellen Populationen	48

1.2 Zeitlicher Verlauf der Besiedlung von Reisstroh durch <i>Bacteria</i>	50
1.3 Detektion der dominanten phylogenetischen Gruppen	52
1.3.1 Phylogenetische Zuordnung der DGGE Klone	54
1.3.2 Phylogenetische Zuordnung der Klone aus den Klonbibliotheken	56
1.4 Quantifizierung der dominanten phylogenetischen Gruppen durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung	58
1.4.1 Reduktion der Autofluoreszenz von Stroh- und Erdpartikeln	58
1.4.2 Anteil der dominanten phylogenetischen Gruppen an der Gesamtheit der aktiven bakteriellen Populationen	59
<b>2. Anaerobe Besiedlung von Reisstroh durch <i>Archaea</i></b>	<b>64</b>
2.1 Detektion der dominanten phylogenetischen Gruppen	64
2.2 Zeitlicher Verlauf der Besiedlung von Reisstroh durch <i>Archaea</i>	68
2.3 Quantifizierung der dominanten methanogenen Populationen durch "Northern-Blot"-Hybridisierung	71
<b>3. Anteil der bakteriellen und archaealen 16S rRNA an der Gesamtmenge der 16S rRNA</b>	<b>74</b>
<b>IV) Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>1. Limitierungen der verwendeten molekularbiologischen Methoden</b>	<b>76</b>
<b>2. Gemeinschaft der <i>Bacteria</i>, die am anoxischen Abbau von Reisstroh beteiligt ist</b>	<b>80</b>
<b>3. Gemeinschaft der <i>Archaea</i>, die am anoxischen Abbau von Reisstroh beteiligt ist</b>	<b>85</b>
<b>4. Anteil der <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i> an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft</b>	<b>90</b>
<b>5. Abschließende Betrachtung</b>	<b>91</b>
<b>V) Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>VI) Anhang</b>	<b>103</b>
Lebenslauf	103
Dank	104

## Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese
FISH	Fluoreszenz- <i>In-Situ</i> -Hybridisierung
MPN	“most-propable-number”
R-Wert	Korrelationskoeffizient
Tg	Teragramm ( $10^{12}$ Gramm)
TGGE	Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese
T-RFLP	Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

## Zusammenfassung

Reisstroh ist die Hauptkohlenstoffquelle für die Bildung von Methan in Reisfeldboden. Der anaerobe Abbau von Reisstroh wird von einer komplexen Lebensgemeinschaft, die aus *Bacteria* und *Archaea* besteht, ausgeführt. Am Ende der Abbauprozesse steht die Bildung des Treibhausgases Methan und seine Freisetzung in die Atmosphäre. Die Populationen, die an den Abbauprozessen beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit durch molekularbiologische Methoden untersucht. Dabei wurden die dominanten bakteriellen und archaealen phylogenetischen Gruppen durch Klonierung und Sequenzierung der 16S rRNA-Gene bestimmt und durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung beziehungsweise "Northern-Blot"-Hybridisierung quantifiziert. Veränderungen in der Populationsstruktur während einer 8-wöchigen Inkubationszeit wurden durch Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP) und Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) untersucht. Die bakterielle Gemeinschaft wurde von der Gattung *Clostridium* dominiert. Mit spezifischen 16S rRNA-Sonden konnten 55% der aktiven Bakterien verschiedenen Clustern dieser Gattung zugeordnet werden, hauptsächlich den Clustern I (24%), III (6%) und XIVa (24%). Andere phylogenetische Gruppen, die jedoch nur einen geringen Anteil an der Menge aktiver Bakterien hatten, waren das *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster des CFB-Phylums (5%),  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* (insgesamt 5%) und die Gattung *Bacillus* (1,3%). DGGE-Analysen zeigten auffällige Veränderungen der bakteriellen Populationsstruktur nur während der ersten 15 Tage der Inkubation, im weiteren Verlauf blieb das DGGE-Bandenmuster der 16S rDNA-Fragmente relativ konstant. Die Aktivität der Einzelzellen nahm während einer 1 bis 4-wöchigen Inkubationszeit von 61% auf 17% ab. Die archaeale Gemeinschaft wurde von "Rice-Cluster" I und *Methanobacteriales* dominiert. Mit "Northern-Blot"-Hybridisierungen konnten 1,9 - 14,1% der gesamten Menge detektierbarer 16S rRNA dem "Rice Cluster" I und 0,7 - 5,3% den *Methanobacteriales* zugeordnet werden. Andere Gruppen, wie die Gattungen *Methanosarcina*, *Methanosaeta* und *Methanogenium*-Verwandte, trugen mit je 0,2 - 3,1% zur gesamten Menge an detektierbarer 16S rRNA bei. Durch T-RFLP-Analysen konnte gezeigt werden, daß die Populationsstruktur der *Archaea* im Laufe der Zeit relativ konstant war. Die Menge an 16S rRNA nahm jedoch während der Inkubationszeit für alle getesteten Gruppen zu. Vergleicht man die prozentualen Anteile der *Bacteria* und *Archaea* an der gesamten Menge detektierbarer 16S rRNA am Stroh und in der Erde, in der das Stroh inkubiert wurde, so konnte am Stroh eine Zunahme der bakteriellen Populationen und in der Erde eine Zunahme der archaealen Populationen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, daß die mikrobielle Lebensgemeinschaft die am Abbau von Reisstroh beteiligt ist, hauptsächlich aus den Gattungen *Clostridium* (Cluster



I, III, XIVa), *Methanobacterium* und dem "Rice Cluster" I bestand und sich damit von der Lebensgemeinschaft in Reisfeldboden ohne Stroh deutlich unterschied. Die Entwicklung dieser Populationsstruktur erfolgte während der ersten 15 Tage der Inkubation und blieb im weiteren Verlauf relativ konstant.

## I) Einleitung

### 1. Die Bedeutung von Methan als Treibhausgas und Quellen der Methanemission

Der sogenannte Treibhauseffekt bezeichnet die globale Erwärmung der Erdatmosphäre durch Gase wie z. B. Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ), Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), Wasserdampf und Methan ( $\text{CH}_4$ ) (van Breemen und Feijtel, 1990). Diese Treibhausgase absorbieren Infrarotstrahlung und verhindern dadurch das Entweichen der Wärmestrahlung der Erde ins Weltall.  $\text{CH}_4$ , das neben  $\text{CO}_2$  das häufigste Treibhausgas ist, spielt dabei eine wichtige Rolle (Schütz *et al.*, 1990; Sass *et al.*, 1991; Yang and Chang, 1998). Zum einen hat  $\text{CH}_4$  eine ca. 30fach höhere spezifische Absorption im Infrarot-Bereich als  $\text{CO}_2$  (Neue, 1993; Mosier, 1998), zum anderen nimmt  $\text{CH}_4$  durch photochemische Abbauprozesse Einfluß auf andere klimarelevante Radikale, wie Ozon und Hydroxylradikale (Cicerone und Oremland 1988; Schütz *et al.*, 1989; IPCC, 1994). Die  $\text{CH}_4$ -Konzentration in der Erdatmosphäre liegt bei etwa 1,70 ppm<sub>v</sub> und steigt um ca. 0,8 - 1% pro Jahr an (Cicerone und Oremland, 1988; Matthews *et al.*, 1991; Schütz *et al.*, 1990; Mosier, 1998).

Die Hauptquellen für die Emission von Methan sind biogene Prozesse, wie sie in natürlichen Feuchtgebieten, z. B. Sümpfen, Mooren und Regenwäldern, in den Därmen von Wiederkäuern und Termiten und in der Erde von Reisfeldern stattfinden (Schütz *et al.*, 1990; Neue und Roger, 1994; Yang und Chang, 1998). Dabei wird die Netto-Freisetzung von Methan in die Atmosphäre durch die beiden Prozesse Methanproduktion und Methanoxidation bestimmt. Methan wird als Endprodukt einer anaeroben Abbaukette von organischem Material gebildet. Durch Diffusion gelangt es schließlich in oxische Bereiche, z. B. an die Bodenoberfläche, wo es zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden oder in die Atmosphäre entweichen kann (van Breemen und Feijtel, 1990; IPCC, 1994; Bosse und Frenzel, 1998). Auch abiogene Prozesse, wie z. B. die Verbrennung von Biomasse, tragen zur Erhöhung der Methanemission bei (Aselmann und Crutzen, 1989; Seiler, 1985; Schütz *et al.*, 1990). Die jährliche globale Methanemission liegt bei ca. 410 - 660 Teragramm (Tg) (Cicerone und Oremland, 1988; IPCC, 1994). Davon stammen ca. 80 bis 90% aus biogenen Quellen (Heyer, 1990; Yang und Chang, 1998). Besonders Reisfelder tragen mit ca. 60 - 110 Tg einen entscheidenden Teil dazu bei (Cicerone und Oremland, 1988; IPCC, 1994).

Die Methanemission aus Reisfeldern wird sich in Zukunft noch erhöhen, da Reis Hauptnahrungsmittel für über die Hälfte der Weltbevölkerung ist (Matthews *et al.*, 1991) und diese in den nächsten Jahren weiter ansteigen wird. Diese verstärkte Methanfreisetzung

trägt wiederum zur globalen Erderwärmung bei. Die weltweite Reisproduktion beträgt zur Zeit ca. 455 Millionen Tonnen (Neue und Roger, 1994). Davon werden in den Staaten des asiatischen Kontinents 90% produziert und auch konsumiert (Neue und Roger, 1994; Hossain, 1997). Andere Länder, wie Brasilien, USA und Ägypten, tragen im Vergleich zu Asien nur noch einen geringen Teil zur Weltproduktion von Reis bei (Matthews *et al.*, 1991; Neue und Roger, 1994).

Um die Ernährung der Weltbevölkerung zu sichern, ohne dabei den Treibhauseffekt zu verstärken, muß ein Weg gefunden werden, die Methanmenge, die durch den Reisanbau in die Atmosphäre entweicht, ohne Ertragsverluste zu verringern. Um diesem Ziel näher zu kommen, ist es wichtig, die Teilprozesse der Methanbildung inklusive der mikrobiologischen Aktivitäten zu verstehen.

## **2. Der Einfluß von organischem Material auf die Methanemission in Reisfeldern**

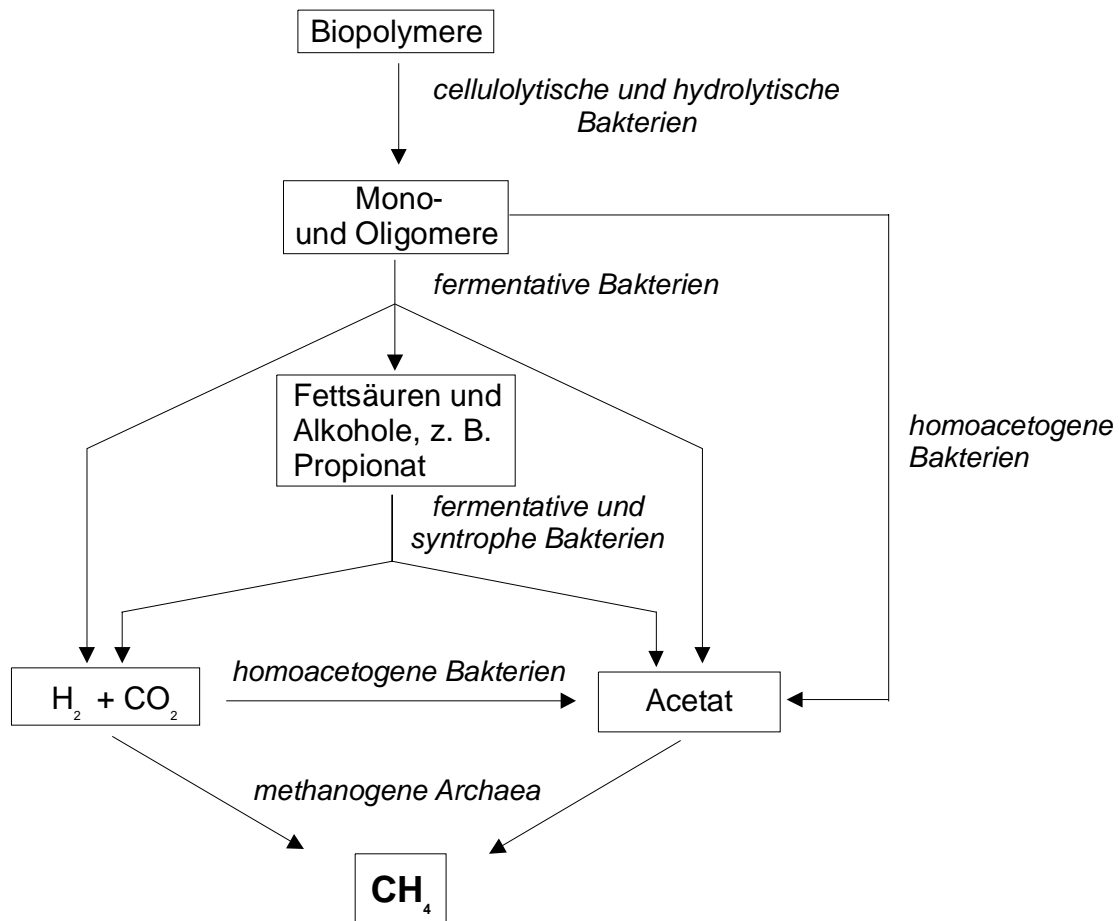
Beobachtet man die Methanemission eines Reisfeldes im Laufe einer Saison, so setzt diese ein, wenn die Felder geflutet sind und dadurch anoxische Bedingungen im Boden herrschen. Nachdem die Felder für die Ernte trocken gelegt werden und wieder Sauerstoff in den Boden eindringen kann, wird kein CH<sub>4</sub> mehr produziert (Sass *et al.*, 1991; Conrad, 1993). In der anoxischen Phase, in der Methan freigesetzt wird, lassen sich wiederum mindestens drei Maxima der Methanemission beobachten. Das erste Maximum tritt ca. eine Woche nach der Flutung der Felder auf und ist auf den Abbau des restlichen organischen Materials der letzten Saison zurückzuführen. Das zweite Maximum fällt in die Blütezeit der Reispflanzen und beruht unter anderem auf der Ausscheidung von organischen Exudaten durch die Wurzeln der Reispflanze. Das dritte Maximum tritt während der Reifezeit der Reiskörner auf, wenn erstes abgestorbenes, organisches Material der Reisswurzeln abgebaut werden kann (Sass *et al.*, 1991).

Die Emissionsraten von CH<sub>4</sub> hängen von vielen verschiedenen Umweltfaktoren ab, wie z. B. dem Bodentyp, der Bodentemperatur und der chemischen Düngung. Einer der Hauptfaktoren ist außerdem das organische Material, das im Boden vorhanden ist bzw. zugegeben wird (Schütz *et al.*, 1989; Sass *et al.*, 1991; Neue *et al.*, 1996; Yang und Chang, 1998). Reisstroh, das üblicherweise zur Düngung der Felder verwendet wird, ist auch die Hauptkohlenstoffquelle für die Bildung von CH<sub>4</sub>. 42% des Kohlenstoffs für die CH<sub>4</sub>-Produktion stammen aus Reisstroh, der restliche Kohlenstoff wird durch organisches Material im Boden (18-21%) und durch Ausscheidungen der Reisswurzeln (37-40%) zur Verfügung gestellt (Watanabe *et al.*, 1999). Der Einfluß von Reisstroh auf physiologische

Prozesse im Reisfeldboden und auf die mikrobiellen Populationen konnte schon durch verschiedene Experimente nachgewiesen werden. Glissmann und Conrad (2000) fanden, daß sich das Fermentationsmuster von Reisfeldboden durch die Zugaben von Reisstroh in der frühen Phase der Inkubation veränderte. Eine erhöhte Methanemissionsrate durch die Zugabe von Reisstroh konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Schütz *et al.*, 1989; Yagi und Minami, 1990; Chidthaisong *et al.*, 1996; Rath *et al.*, 1999; Glissmann und Conrad, 2000). Studien an japanischem Reisfeldboden haben z. B. gezeigt, daß sich die Methanemission um das 1,8 - 3,5 fache erhöhte, wenn dem Boden 6 - 9 t Reisstroh pro Hektar zugegeben wurden (Yagi und Minami, 1990). Auch die Gesamtmenge an Mikroorganismen stieg durch die Zugabe von Reisstroh, was durch die Bestimmung der Biomasse gezeigt werden konnte (Azmal *et al.*, 1997). Joulain *et al.*, (1997) fanden, daß auch die potentielle methanogene Aktivität während einer sechswöchigen Inkubationszeit in Reisfeldboden durch die Zugabe von Reisstroh anstieg. Einige Experimente beschäftigten sich mit dem zeitlichen Verlauf der Reisstrohbesiedelung. Kimura und Tun (1999) konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen eine verstärkte Kolonisierung von Reisstroh im Laufe einer Inkubation von ca. 5 Monaten feststellen.

### **3. Anaerober Abbau von Polysacchariden durch verschiedene physiologische Gruppen von Mikroorganismen**

Der Abbau von Polysacchariden kann in verschiedene Stufen eingeteilt werden, wobei die Produkte der Mikroorganismen einer Stufe von den Mikroorganismen der nächsten Stufe als Substrate verwendet werden. Als Endprodukt dieser mikrobiellen Lebensgemeinschaft wird CH<sub>4</sub> gebildet. Um organisches Material, z. B. Polysaccharide, abbauen zu können, ist eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft notwendig, die aus hydrolytischen, fermentativen, acetogenen und syntrophen Bakterien sowie Acetat und Wasserstoff verbrauchenden *Archaea* besteht (Stams, 1994; Neue und Roger, 1994). In Abbildung 1 ist der Abbauweg von Polymeren mit den jeweiligen physiologischen Gruppen schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Anaerober Abbau von Polymeren mit den physiologischen Gruppen, die an den jeweiligen Schritten beteiligt sind.

Die mikrobielle Lebensgemeinschaft, die am anoxischen Abbau von Polysacchariden in Reisfeldboden beteiligt ist, wurde bisher hauptsächlich durch MPN-Studien ("most-probable-number") und Anreicherungen untersucht (Chin *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1999a; Joulain *et al.*, 1998). Dabei wurden definierte Substraten wie Cellulose, Pektin, Xylan, Cellobiose, amorphe Cellulose und Filterpapier aus Cellulose oder Formiat, Methanol, Acetat und  $H_2/CO_2$  verwendet. Zusätzlich wurde DNA direkt aus anoxischem Reisfeldboden extrahiert und die Struktur der Lebensgemeinschaft mit molekularbiologischen Methoden untersucht (Hengstmann *et al.*, 1999; Grosskopf *et al.*, 1998a, b). Dem Boden wurde dabei kein zusätzliches Substrat, wie etwas Reisstroh, zugeführt. Diese Studien haben dabei gezeigt, daß die Gattung *Clostridium* beim anaeroben Abbau organischen Materials in Reisfeldboden ohne Stroh eine entscheidende Rolle spielt (Chin *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1999a; Hengstmann *et al.*, 1999). Weitere Isolate konnten verschiedenen phylogenetischen Gruppen, wie den  $\alpha$ -*Proteobacteria*, der CFB-Gruppe; der Gattungen *Verrucomicrobium* und den *Actinobacteria* zugeordnet werden (Chin *et al.*, 1999a). Für die Methanproduktion in Reisfeldboden konnten hauptsächlich die Gattungen *Methanobacterium*, *Methanosaeta* und *Methanosarcina* verantwortlich gemacht werden (Grosskopf *et al.*, 1998a, b; Joulain *et al.*,

1998). Zusätzlich wurden neue phylogenetische Gruppen innerhalb der methanogenen *Archaea* gefunden, von denen vermutet wird, daß sie ebenfalls an der Methanemission aus Reisfeldboden beteiligt sind (Grosskopf *et al.*, 1998b). Von diesen Gruppen, als "Rice Cluster" I und II bezeichnet, konnten bisher jedoch ausschließlich 16S rDNA Sequenzdaten gefunden werden. Reichhardt *et al.* (1997) untersuchten während einer Saison regelmäßig bepflanzte Reisfelder und fanden durch die Analyse gruppenspezifischer Lipide eine Zunahme einzelner Gruppen wie der Methanogenen und der fermentativen Clostridien. Die Gesamtmenge an mikrobieller Biomasse nahm jedoch nach der Blüte der Reispflanzen wieder ab.

Es ist wahrscheinlich, daß die Mikroorganismen, die definierte Substrate wie Cellulose, Pektin, Cellobiose, Xylan oder Acetat und  $H_2/CO_2$  verwerten können, auch am Abbau von Reisstroh beteiligt sind. Reisstroh ist jedoch ein sehr komplexes Substrat aus vielen verschiedenen Verbindungen. Die Hauptbestandteile des Reisstrohs sind Hemicellulosen (26 - 37%), Cellulose (38 - 41%), Lignin (15%) und wasserlösliche Polysaccharide (8%) (Watanabe *et al.*, 1993, Grant, 1998). Zusätzlich enthält Reisstroh noch anorganische Komponenten wie z. B. 16% Silikate (Han, 1975). Speziell für diese Komponente konnte ein Zusammenhang mit der Besiedlung des Strohs durch Mikroorganismen gezeigt werden. Bereiche, die einen hohen Silikatgehalt haben, sind resistenter gegen mikrobiellen Befall als solche, die frei von Silikaten sind (Bae *et al.*, 1997). Um die Populationen zu bestimmen, die tatsächlich am Abbau von Reisstroh beteiligt sind, ist es deshalb notwendig, Reisstroh als Ganzes zu untersuchen.

#### **4. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung mikrobieller Populationen**

Über 99% der Mikroorganismen, die in einem natürlichen Ökosystem vorkommen, sind mit den bekannten Methoden nicht kultivierbar (Amann *et al.*, 1995) und waren bisher auch nicht identifizierbar. Dieser limitierende Schritt kann durch kultivierungsunabhängige, molekularbiologische Methoden umgangen werden. So konnten z. B. der Gruppe *Holophaga* / *Acidobacterium* bisher 16S rDNA Daten aus 31 Voll- und ca. 50 Teilsequenzen zugeordnet werden. Nur einzelne Mitglieder dieser Gruppe, wie z. B. *Holophaga foetida* (Liesack *et al.*, 1994) und *Acidobacterium capsulatum* (Hiraishi *et al.*, 1995), konnten bisher isoliert werden. Teilt man die Gesamtheit der bisher bekannten Bakterien in 36 phylogenetische Gruppen ein, so lassen sich 13 von ihnen ausschließlich auf 16S rDNA-Daten zurückführen (Hugenholtz *et al.*, 1998a). Auch innerhalb der *Archaea* konnten neue phylogenetische Gruppen aufgrund von Sequenzdaten definiert werden (Grosskopf *et al.*, 1998b; Chin *et al.*,

1999b). Die "Rice Cluster" I, II, III und V fallen dabei in die Gruppe der *Euryarchaeota*, während die "Rice Cluster" IV und VI den *Crenarchaeota* zugeordnet werden (Grosskopf *et al.*, 1998b, Chin *et al.*, 1999b).

Zur Charakterisierung unbekannter Populationen können je nach Fragestellung verschiedene Techniken angewendet werden, die auf der Analyse der Nukleinsäuren basieren. Zum einen kann man über "genetische Fingerabdrücke" einen raschen Einblick in die Diversität der Populationen erhalten (DGGE, TGGE, T-RFLP), zum anderen kann man über vergleichende Sequenzanalysen eine exakte, phylogenetische Beziehung verschiedener Mikroorganismen herstellen. Schließlich kann man mittels Hybridisierung (FISH, "Northern-Blot") eine Quantifizierung der Populationen durchführen. Die DGGE- (Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese), TGGE- (Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese) (Muyzer *et al.*, 1993) und T-RFLP (Terminale-Restriktions-Fragmentlängen-Analyse)-Techniken (Liu *et al.*, 1997) ermöglichen einen raschen Einblick in die mikrobielle Diversität eines Ökosystems. Dazu wird die gesamte DNA der zu untersuchenden Populationen extrahiert und die 16S rRNA-Gene amplifiziert. Bei DGGE und TGGE werden die gleich großen Produkte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) anschließend aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten aufgetrennt. Jedes 16S rRNA-Gen bildet in dem Gel theoretisch eine einzelne Bande. Somit ist es möglich, durch das spezielle Bandenmuster der Populationen einen Überblick über deren Diversität sowie über strukturelle Veränderungen zu gewinnen, die z. B. im Laufe der Inkubationszeit auftreten können. Für T-RFLP wird das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym geschnitten und die fluoreszenzmarkierten, terminalen Fragmente nach ihren Längen aufgetrennt. Die Diversität der Lebensgemeinschaft wird durch das Muster an verschieden langen, terminalen Restriktionsfragmenten repräsentiert. Eine weiterführende Zuordnung der Banden und Restriktionsfragmente zu verschiedenen phylogenetischen Gruppen kann anschließend durch Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA durchgeführt werden. Verwendet man DGGE oder TGGE, können die erhaltenen Fragmente direkt aus dem Gel ausgestochen, amplifiziert, sequenziert und phylogenetisch zugeordnet oder durch die Hybridisierung des Gels mit gruppenspezifischen 16S rRNA-Sonden identifiziert werden. Bei T-RFLP ist diese direkte Analyse nicht möglich. Hier muß parallel zu der Fingerprintanalyse die 16S rDNA kloniert werden. Anschließend kann das Restriktionsmuster verschiedener Klone mit dem Muster der gesamten 16S rDNA verglichen werden und interessante Restriktionsfragmente können analysiert werden. Die bisher erwähnten Methoden geben einen Überblick über die Diversität der Populationen in einem bestimmten Habitat. Zusätzlich können Veränderungen dieser Populationsstrukturen aufgrund verschiedener Faktoren, wie jahreszeitliche Einflüsse, untersucht werden (Ferris and Ward, 1997). Lukow *et al.* (2000) untersuchten z. B die Auswirkung von transgenen und

nicht-transgenen Kartoffelpflanzen auf die mikrobiellen Populationen der verwendeten Erde durch T-RFLP Analysen und fand dabei statistisch signifikante Unterschiede.

Diese Methoden erlauben jedoch nur begrenzt eine quantitative Aussage über das Vorkommen verschiedener phylogenetischer Gruppen, da sie auf der Amplifikation der rRNA-Gene durch die PCR beruhen. Viele Untersuchungen haben sich inzwischen mit den PCR-bedingten Fehlern beschäftigt (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki und Giovannoni, 1996; von Witzingerode *et al.*, 1997; Head *et al.*, 1998), die zu einer verzerrten Sicht auf die Populationsstruktur führen können. Es ist z. B. bekannt, daß bei dieser Technik die Zielsequenzen unterschiedlich amplifiziert werden, so daß einige Gene im Vergleich zu anderen über- oder unterrepräsentiert werden können (Head *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann man mit Methoden, die auf der Untersuchung der DNA basieren, nur bedingt die Aktivität der Mikroorganismen bestimmen, da die DNA zwar den Genpool des Habitats widerspiegelt, jedoch nicht die Aktivität der Zellen. Somit werden auch inaktive Mikroorganismen detektiert, die sich in einem Ruhestadium befinden und keinen Einfluß auf Abbauprozesse innerhalb des Habitats nehmen.

Mit Methoden, die auf der Untersuchung der RNA basieren, ist dagegen die Detektion stoffwechselaktiver Mikroorganismen möglich, da die Menge an gebildeter ribosomaler RNA mit dem physiologischen Zustand der Zelle korreliert (Amann *et al.*, 1995). Je aktiver die Zelle ist, umso höher ist ihr Gehalt an ribosomaler RNA. Eine Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen ist ebenfalls möglich, da kein amplifizierender Zwischenschritt benötigt wird, der die tatsächliche Verteilung der phylogenetischen Gruppen verzerren könnte. Häufig verwendete Methoden, die auf der Untersuchung von RNA basieren, sind "Northern-Blot"-Hybridisierungen (Roller *et al.*, 1994; Raskin *et al.*, 1994) und Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierungen (FISH) (Manz *et al.*, 1999; Amann *et al.*, 1996; Assmus *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1994). Beide Methoden beruhen auf der Bindung von 16S rRNA Sonden an ribosomaler RNA. Für "Northern-Blot"-Hybridisierungen wird die gesamte RNA extrahiert und anschließend mit 16S rRNA Sonden hybridisiert. Für FISH werden die Zellen zum einen fixiert, um die Zellstruktur während der Hybridisierung zu erhalten, zum anderen wird die Zellhülle permeabilisiert, um sie durchlässig für die 16S rRNA Sonde zu machen. FISH bietet somit neben der Quantifizierung der RNA auch noch die Möglichkeit, Einzellzellen zu detektieren und zu lokalisieren.

Zur Analyse der Struktur einer Lebensgemeinschaft in einem neuen Habitat müssen zum einen Diversitätsstudien durchgeführt werden, zum anderen müssen quantitative Aussagen über aktive Populationen gemacht werden. Es ist somit sinnvoll, verschiedene der oben dargestellten Methoden zu verwenden.



## **5. Ziele dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die mikrobiellen Populationen, die am anaeroben Abbau von Reisstroh zu CH<sub>4</sub> beteiligt sind, zu untersuchen. Diese Arbeit steht dabei in Zusammenhang mit einer Studie, die sich mit den physiologischen Prozessen des anoxischen Strohabbaus beschäftigte (Glissmann und Conrad, 2000).

Für diese Arbeit wurden folgende Schwerpunkte festgelegt:

Die Diversität und Dynamik der mikrobiellen Populationen sollte während einer 8-wöchigen Inkubationszeit durch Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) und Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP) untersucht werden.

Die phylogenetische Einordnung dominanter Gruppen sollte durch Klonierung mit anschließender Sequenzierung erfolgen. Dazu wurden zum einen 16S rDNA Fragmente aus DGGE-Banden verwendet, zum anderen wurde die gesamte 16S rDNA von extrahierter DNA direkt kloniert.

Dominante aktive Gruppen sollten durch "Ganz-Zell"-Hybridisierungen oder "Northern-Blot"-Hybridisierungen nach einer Inkubationszeit von einer Woche oder vier Wochen quantifiziert werden.

## II) Material und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1 Boden

Der verwendete Boden stammte von Reisfeldern des Instituto Sperimentale della Cerealicoltura (ISC) aus Vercelli, Norditalien. Die charakteristischen Bodeneigenschaften wurden von Holzappel-Pschorn *et al.* (1986) beschrieben. Der Boden, der zuvor schon für Reismikrokosmen verwendet worden war, wurde getrocknet und mit einem "Backenbrecher" zerkleinert. Anschließend wurde der Boden auf eine Größe von 1 mm gesiebt und in lichtundurchlässigen Polyethylenwannen gelagert.

#### 1.2 Reisstroh

Das verwendete Reisstroh stammte von Reispflanzen (*Oryza sativa*, Typ *japonica*), die im Gewächshaus des Max-Planck-Institutes in Marburg gezüchtet wurden (Varietät "Roma"), oder von Reispflanzen, die in Vercelli gewachsen waren (Varietät "Koral"). Nach der Ernte wurde das Stroh getrocknet und bei RT gelagert. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde das Reisstroh in Blattstroh und Stielstroh unterteilt (Abbildung 2) und in getrennten Ansätzen inkubiert.



**Abbildung 2:** Morphologische Unterteilung von Reisstroh in Blatt- und Stielstroh (die Aufnahmen wurde von Kristin Glissmann zur Verfügung gestellt).

### 1.3 Referenzorganismen für "Ganz-Zell"- und "Northern-Blot"-Hybridisierung

#### 1.3.1 Medien

Die Medien wurden in Anlehnung an die Medienvorschläge der "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" GmbH (DSMZ), Braunschweig, hergestellt.

##### Glukose-Hefe-Medium

Glukose	20	g l <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	10	g l <sup>-1</sup>

Das Medium wurde in 100 ml Serumflaschen abgefüllt (40ml/Flasche), anschließend ca. 10 min mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20) begast und die Gasphase ebenfalls durch N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ersetzt. Die Serumflaschen wurden mit Butylgummistopfen und Alukappen verschlossen und autoklaviert.

##### Flexibacter ruber-Medium

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1	g l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	0,1	g l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,1	g l <sup>-1</sup>
Na- Glycerophosphat	0,1	g l <sup>-1</sup>
Tris	1,0	g l <sup>-1</sup>
Casaminoacid	1,0	g l <sup>-1</sup>
Glukose	1,0	g l <sup>-1</sup>
Vitamin B12	1,0	µg l <sup>-1</sup>
Thiamin-HCl x 2H <sub>2</sub> O	1,0	mg l <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung SL10a	1,0	ml l <sup>-1</sup>

Die Komponenten wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und zu je 40 ml in 100 ml Schikane-Erlenmeyerkolben abgefüllt, die anschließend mit Alukappen abgedeckt und autoklaviert wurden. Vitamin B12, Thiamin-HCl x 2H<sub>2</sub>O und Glukose wurden aus sterilfiltrierten Stammlösungen bis zur gewünschten Endkonzentration zugegeben, sowie 1 ml der folgenden Spurenelementlösung:

Spurenelementlösung SL10a

FeCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	1000 mg l <sup>-1</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg l <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	80 mg l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	130 mg l <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2 mg l <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	24 mg l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	36 mg l <sup>-1</sup>

Die Salze wurden in 50 ml 2 M HCl gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Endkonzentration von HCl betrug 100 mM. Die Lösung wurde zu je 60 ml in Schraubdeckelflaschen abgefüllt.

**1.3.2 Kultivierung und Präparation der Referenzorganismen**

Alle Referenzorganismen, die als Positiv- und Negativkontrolle für die Bestimmung der Stringenz neuer 16S rRNA Sonden für "Ganz-Zell"-Hybridisierung verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Stämme wurden von der "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" GmbH (DSMZ), Braunschweig, bezogen. Stamm FCB 90-2 wurde von Dr. Kuk-Jeong Chin zur Verfügung gestellt. Stamm DSM 9560 wurde in einem *Flexibacter ruber*-Medium kultiviert, die restlichen vier Stämme in einem Glukose-Hefe-Medium. Für die Hybridisierungsexperimente wurde je 1 ml Kultur entnommen, die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g) pelletiert und anschließend in 1 ml Formaldehyd wie unter II 13.2 beschrieben fixiert.

Für RNA "Northern-Blot"-Hybridisierungen wurden folgende Referenzorganismen zur Quantifizierung von Umwelt-RNA (Kapitel II 14) mittels einer RNA-Eichkurve verwendet: *E. coli* (4 µg µl<sup>-1</sup>, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), *Methanobacterium bryantii*, *Methanosaeta concilii*, *Methanospirillum hungatii*, die von Dr. Johannes C. Scholten zur Verfügung gestellt wurden, und *Methanosarcina barkeri*, der von Jörn Meuer (Arbeitsgruppe Prof. Thauer) zur Verfügung gestellt wurde.

**Tabelle 1:** Referenzorganismen, die als Positiv- und Negativ-Kontrolle für die Stringenz-Bestimmung neuer 16S rRNA Sonden für "Ganz-Zell"-Hybridisierung verwendet wurden

Referenz-Organismus	Herkunft	16S rRNA Sonde <sup>a</sup>	Verwendung <sup>b</sup>
FCB90-2 Isolat aus Reisfeldboden <sup>c</sup>	Dr. K.J. Chin	Clost III (0)	+
<i>Flexibacter ruber</i>	DSM 9560	Clost III (1) / Clost IV (1)	-
<i>C. sporosphaeroides</i>	DSM 1294	Clost IV (0)	+
<i>C. celerecrescens</i>	DSM 5628	Clost XIVa (0) / Clost XIVa-amino (0)	+
		Clost XIVa-c (1)	-
<i>C. butyricum</i>	DSM 6566	Clost XIVa (1) / Clost XIVa-amino (1)	-
<i>C. polysaccharolyticum</i>	DSM 1801	Clost XIVa-c (0)	+

<sup>a</sup> In Klammern: Anzahl der Fehlpaarungen

<sup>b</sup> +/- : Positiv- / Negativkontrolle

<sup>c</sup> Chin *et al.*, 1999a

## 1.4 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, stammten die verwendeten Chemikalien in p. A. Qualität von folgenden Firmen:

Biozym, Hess. Oldendorf

Difco, Detroit, USA

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Merck, Darmstadt

MWG Biotech, Ebersberg

Promega, Mannheim

Roth, Karlsruhe

## 1.5 Geräte

Die verwendeten Geräte stammten von folgenden Firmen:

"Backenbrecher": Fa. Retsch, Dietz-Motoren GmbH & Co. KG, Dettingen und Teck

"Blotting-Apparatur": Bio-Dot<sup>®</sup> SF, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Elektrophoresekammer:	Dcode-System, Bio-Rad, München
Gaschromatograph:	Shimadzu GC-8A, Japan
Gefriertrocknungsanlage:	Modell Alpha 1-4, Christ, Osterode
Gradientenmischer:	Modell 383, Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen:	Hybaid, AGS, GmbH Heidelberg ("Ganz-Zell"-Hybridisierung), bzw. Biometra, Göttingen ("Northern-Blot"-Hybridisierung)
Laser-Rastermikroskop:	Leica DMR XE, Typ TCS NT, Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg
"PhosphorImager":	Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.
Sequenziergerät:	Model 373, DNA Sequencing System, PE Applied Biosystems, Weiterstadt
"Speed-Vac-Concentrator":	Novodirect GmbH, Kehl
"Stomacher":	Seward, London, UK
"Stratalinker <sup>®</sup> 2400":	Stratagene, La Jolla, California, USA
Video-Kamera:	Gel Print 2000i, BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, USA
Zellhomogenisator:	Biodismembrator S, B. Braun Biotech International, Melsungen

## **2. Ansätze zur Untersuchung strohabbauender Organismen**

### **2.1 Ansätze in Plastikblumentöpfen**

Für die spätere Probenaufbereitung des Stroh sollte dieses wieder dem Boden entnommen werden. Dazu wurden das Stroh in ca. 2 cm lange Stücke geschnitten und in Säckchen (Größe: ca. 6,5 x 6,5 cm) aus Gazestoff (Nytal P25, Fadenstärke 30 µm, Maschengröße 25 µm, Bückmann GmbH, Mönchengladbach) gegeben. Die Gazesäckchen wurden mit einem Polyamidfaden (Transfil 70, Amann Ackermann) genäht.

Um den Einfluß der Gazesäckchen auf die Besiedlung des Stroh durch Mikroorganismen zu testen, wurde folgender Ansatz gewählt: die Wasserabflusslöcher von lichtdichten Plastikblumentöpfen wurden mit Parafilm abgedichtet, die Töpfe mit ca. 200 g wasser-gesättigter Erde gefüllt und soviel deionisiertes Wasser zusätzlich in die Töpfe gegeben, daß der Wasserspiegel ca. 5 cm über der Erdoberfläche lag. In verschiedene Ansätze dieses Erd-Wasser-Gemisches wurde nun Stroh in unterschiedlicher Art tief hineingedrückt:

0,3 g Stroh wurde lose zugegeben.

0,3 g Stroh wurde zuvor in ein Gazesäckchen gegeben.

0,3 g Stroh wurde zusammen mit 1 g Erde in ein Gazesäckchen gegeben.

Die Ansätze wurden jeweils mit Stroh vom Stiel und vom Blatt hergestellt. Die Blumentöpfe wurden abgedunkelt und bei 25°C für 4 Wochen im Gewächshaus inkubiert.

## **2.2 Ansätze in 150 ml Serumflaschen**

Um zusätzlich gasförmige Produkte messen zu können, wurde für weiterführende Experimente in einem geschlossenen System gearbeitet. Dazu wurden 40 g Boden und 40 ml deionisiertes Wasser in einer 150 ml Serumflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) gemischt und 0,5 g der Stiel-Teile des Strohs, eingenäht in Gazesäckchen, zugegeben. Die Flaschen wurden mit einem Naturgummistopfen und Schraubverschluß verschlossen und die Gasphase mindestens 3 x gegen N<sub>2</sub> ausgetauscht. Die Flaschen wurden nochmals kräftig geschüttelt und anschließend in ruhendem Zustand 1 bis 10 Wochen bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

## **3. Gaschromatographische Analyse von Methan und Kohlendioxid**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> wurde ein Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Für die CO<sub>2</sub>-Detektion wurde nach der Trennsäule ein Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O Katalysator (Firma Chrompack) zur Reduzierung von CO und CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> eingesetzt. Die Detektionssignale wurden mit dem Integrationsprogramm "raytest Gina" (Version 2.1.) der Firma Nuclear Interfaces GmbH (Münster) ausgewertet. Das Probenvolumen betrug 200 µl.

Meßbedingungen:

Säule	Trennmaterial: Porapak QS, 80/100 mesh Länge: 2,0 m, Außendurchmesser: 0,3175 mm Temperatur: 40°C
Trärgas	Wasserstoff 5.0
Injektortemperatur	110°C

Katalysator	Material: $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	Trägermaterial: Chromosorb P 45/60 mesh
	Länge: 25 cm, Innendurchmesser: 2 mm
	Temperatur: 340°C
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
	Brenngas: FID-Mix (mit $\text{N}_2$ und $\text{O}_2$ ) und $\text{H}_2$
	Quenchgas: Stickstoff 5.0

Eine Einpunkt-Eichung erfolgte nach Feststellung der Linearität des Meßgeräts für das jeweilige Gas mit 1 ml eines Eichgases der Konzentration:  $\text{CH}_4$ : 994 ppm<sub>v</sub>,  $\text{CO}_2$ : 987 ppm<sub>v</sub> und  $\text{CO}$ : 1012 ppm<sub>v</sub>. Die Meßpräzision lag bei einer Standardabweichung von 2,5%.

#### 4. Präparation der Proben

Die Experimente wurden mit folgenden Proben durchgeführt:

##### 4.1 Erde

Erde, in der Stroh anaerob inkubiert worden war, wurde aus dem Inkubationsansatz in Serumflaschen (Kapitel II 2.2) entnommen und direkt für RNA-Extraktion (Kapitel II 6) eingesetzt.

##### 4.2 Stroh

#### Lösungen

##### **PBS ("phosphate buffered saline")**

NaCl	8,0 g l <sup>-1</sup>
KCl	0,2 g l <sup>-1</sup>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,44 g l <sup>-1</sup>
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,2 g l <sup>-1</sup>
pH 7,0	

Die Komponenten wurden zusammen in 1 l deionisiertem Wasser gelöst, die Lösung autoklaviert und bei RT gelagert.



### Durchführung

Stroh wurde anaerob in Serumflaschen (Kapitel II 2.2) inkubiert und anschließend von der Erde getrennt, indem es in PBS-Puffer gewaschen wurde. Die Gazesäckchen wurden dazu aus den Ansätzen herausgenommen, aufgeschnitten und das Stroh zweimal für ca. 3 min in sterilem PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde das gewaschene Stroh für RNA-Extraktion eingesetzt (Kapitel II 6).

### **4.3 "PBS-Zellextrakt"**

Stroh wurde anaerob in Bodenaufschlämmungen (Kapitel II 2.1 und II 2.2) inkubiert und von der Erde getrennt, indem es in PBS-Puffer gewaschen wurde. Stroh, das in Gazesäckchen eingenäht war, wurde dazu, wie in Kapitel II 4.2 beschrieben, gewaschen. Stroh, das lose in die Erde gegeben worden war, wurde von dieser getrennt, indem die Erde zuerst mit PBS aufgeschlämmt und anschließend über ein grobes Sieb (Maschengröße ca. 1 mm) abgetrennt wurde. Das Stroh in dem Sieb wurde noch zweimal für ca. 3 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Stroh mechanisch mit einem Stomacher behandelt, um die am Stroh sitzenden Populationen abzulösen (Engelen *et al.*, 1998). Dazu wurde das Stroh in sterile Einmaltüten (5-80 ml, LR Plast A/S, Glostrup, Dänemark) gegeben, mit 5 ml PBS versetzt und mit einem Stomacher bearbeitet (1 min im "High-Speed" Modus). Das PBS, das die abgelösten Zellen enthielt, wurde nun entnommen, in ein steriles Gefäß gegeben und durch frisches PBS ersetzt. Diese Behandlung wurde noch 2 mal wiederholt. Von dem gesammelten PBS (15 ml) wurden für die "Ganz-Zell"-Hybridisierung 200 µl abgenommen und fixiert (Kapitel II 13.2), für die DNA- und RNA-Extraktion wurde der Rest für 15 min bei 2500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird im weiteren Verlauf der Arbeit als "PBS-Zellextrakt" bezeichnet. Für die RNA-Extraktion wurde das "PBS-Zellextrakt" und das gestomacherte Stroh getrennt, für die DNA-Extraktion beides gemeinsam bei -20°C bis zur weiteren Behandlung eingefroren.

## **5. Extraktion der gesamten DNA**

Die Methode der DNA Extraktion erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Smalla *et al.* (1993). Für die DNA Extraktion wurden Proben verwendet, die wie in Kapitel II 4.3 beschrieben präpariert worden waren.

## Lösungen

### **Extraktionspuffer**

Tris-HCl, pH 8,0	0,1 M
EDTA	50 mM
NaCl	0,5 M
DTT	1,0 mM

Der Puffer wurde aus Stammlösungen hergestellt und auf ein Endvolumen von 10 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Tris-HCl-, EDTA- und NaCl-Stammlösungen wurden autoklaviert, die DTT-Stammlösung wurde sterilfiltriert. Die fertige Gebrauchslösung wurde bei RT gelagert.

### **TE-puffer (Tris / EDTA)**

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1,0 mM

Der Puffer wurde mit deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

## Durchführung

### Zellaufschluß

Die gefrorenen Proben aus der Stomacherbehandlung (Kapitel II 4.3) wurden über Nacht in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert, anschließend unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probenmenge betrug ca. 100 bis 200 mg. Den Proben wurde 1 ml Extraktionspuffer zugegeben und die Zellen durch einen dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus (-196°C / +65°C) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben zuerst mit 5 mg Lysozym inkubiert (2 h, 37°C) und dann mit 100 µg Proteinase K und 30 µl 20%igem SDS (Endkonzentration 1,7%, 1 h, 37°C) versetzt und gut gemischt.

### Chloroformextraktion

Nachdem die Zellen aufgeschlossen waren, wurden die Proteine mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:1) gefällt. Dazu wurde 1 ml der Mischung zu den Proben gegeben und diese 1 min sorgfältig per Hand geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min, 20000 x g) wurden die Phasen getrennt. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und die Prozedur noch mindestens 2 mal wiederholt. Die untere Phase wurde verworfen.

### Fällung der DNA

Der letzte Überstand, nach der Proteinfällung, wurde mit 2 Vol (Volumen) 96%igem Ethanol versetzt und 1,5 h bei RT inkubiert. Die DNA wurde anschließend abzentrifugiert (20 min, 20000 x g), der Überstand verworfen, das Pellet in einem Speed-Vac-Concentrator getrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert.

### Weitere Aufreinigung der DNA

Zu der gelösten DNA in TE-Puffer wurden 200 mg Cäsiumchlorid gegeben und 3 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 20000 x g) und der Überstand abgenommen. Die DNA im Überstand wurde nun mit 750 µl sterilem destilliertem Wasser versetzt, mit 600 µl Isopropanol für 1 h bei RT gefällt, abzentrifugiert (20 min, 20000 x g), das Pellet getrocknet (Speed-Vac-Concentrator) und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert. Weitere Verdünnungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

## **6. Extraktion der gesamten RNA**

Die Methode der RNA-Extraktion erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Lüdemann *et al.* (1999). Für die RNA-Extraktion wurden mehrere Proben aus dem Inkubationsansätzen in Serumflaschen (Kapitel II 2.2) entnommen:

- I) die Erde, in der das Stroh inkubiert wurde (Kapitel II 4.1)
- II) das inkubierte, gewaschene Stroh ohne Stomacherbehandlung (Kapitel II 4.2)
- III) das Zellpellet, das durch die Zentrifugation des PBS nach der Stomacherbehandlung erhalten wurde ("PBS-Zelleextrakt", Kapitel II 4.3)

### Lösungen

Die Puffer wurden in DEPC-Wasser angesetzt. Verwendete Glasgefäße wurden zuvor für 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen bei 4°C gelagert.

### **DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser (Sambrook *et al.*, 1989)**

Destilliertes Wasser wurde mit 0,1% DEPC [v/v] versetzt, für 4 h bei 37°C kräftig geschüttelt und anschließend autoklaviert.

**TPM-Puffer**

Tris-HCl, pH 7,5	50,0 mM
Polyvinylpyrrolidon 25	1,7% [w/v]
MgCl <sub>2</sub>	20,0 mM

**Lyse-Puffer**

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
H <sub>2</sub> O-gesättigtes Phenol	6% [v/v]

DurchführungZellaufschluß

0,5 - 1 g Probenmaterial wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 g hitzesterilisierten Glasperlen ( $\varnothing$  170-180  $\mu$ m, Braun Biotech International, Melsungen) und 700  $\mu$ l vorgekühltem (4°C) TPM-Puffer gegeben. Die Suspension wurde für 1 min bei 2400 UpM in einem Zellhomogenisator geschüttelt und anschließend bei 4°C zentrifugiert (10 min, 20000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet in 700  $\mu$ l Lyse-Puffer aufgenommen wurde und erneut im Zellhomogenisator geschüttelt wurde. Die Suspension wurde wieder zentrifugiert (4°C, 10 min, 20000 x g) und der Überstand dem ersten Überstand zugeführt.

Chloroformextraktion

Die vereinigten Überstände wurden nun nacheinander je einmal mit 700  $\mu$ l Wasser-gesättigtem Phenol (AppliChem, Darmstadt), 700  $\mu$ l Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) und 700  $\mu$ l Chloroform / Isoamylalkohol (25:1, v/v) versetzt und 1 min kräftig per Hand geschüttelt. Die Suspensionen wurden anschließend zentrifugiert (4°C, 3 min, 20000 x g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Fällung der RNA

Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol Natrium-Acetat (3 M) und 2,5 Vol Ethanol absolut nach einer Inkubation von 1-2 h bei -80°C ausgefällt und anschließend durch Zentrifugation (4°C, 20 min, 20000 x g) pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet (Speed-Vac-Concentrator) und in 100  $\mu$ l DNase- und RNase-freiem Wasser (Sigma-Wasser, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) resuspendiert.

Entfernung von co-extrahierter DNA

Das Volumen der RNA-Lösung wurde mit Sigma-Wasser auf 500  $\mu$ l aufgefüllt. Der Verdau der DNA wurde mit 0,1 Vol DNase 10 x Reaktionspuffer (RNAes-frei, Promega, Heidelberg)

und 5U RNase freier DNase (Promega, Heidelberg) für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol Chloroform / Isoamylalkohol (25:1) und kräftiges Schütteln für 1 min gestoppt. Die Fällung der RNA erfolgte wie oben beschrieben.

Sämtliche RNA-Proben wurden bei –80°C aufbewahrt.

#### Extraktion von RNA aus Reinkulturen für "Northern-Blot"-Hybridisierung

Je 20 ml der Reinkulturen (Kapitel II 1.3.2), bzw. 1000 ml für *Methanosarcina barkeri*, wurden abzentrifugiert (4°C, 10 min, 2500 x g) und das Zellpellet in 800 µl TPM-Puffer resuspendiert. Die RNA wurde anschließend wie oben beschrieben extrahiert.

## **7. Agarosegelelektrophorese**

### Lösungen

#### **50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, Sambrook *et al.*, 1989)**

Tris-HCl, pH 8,0	40 mM
Na-Acetat	8,3 mM
EDTA	0,38 mM

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,8 eingestellt. Der Puffer wurde in deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei RT gelagert.

#### **Auftragspuffer**

Saccharose	40,0 Vol
Bromphenolblau	0,25 Vol
Xylencyanol FF	0,25 Vol
Orange G2	0,25 Vol

### Durchführung

Ein Aliquot (3-5 µl) der Nukleinsäurelösung wurde mit 1 µl Auftragspuffer versetzt und auf einem 1%igem TAE-Agarosegel in 1 x TAE durch Gelelektrophorese bei 100 V für ca 1 h aufgetrennt. Als Größenstandard für extrahierte DNA wurde der "Smart-Ladder" (Eurogentech, Seraing, Belgien) benutzt. Die Fragmente wurden anschließend mit einer Ethidiumbromidlösung (0,001%) angefärbt, unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Video-Kamera aufgenommen.

## 8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Extrahierte DNA wurde mit der PCR amplifiziert, um anschließend qualitative Untersuchungen der Hauptpopulationen durchführen zu können, die sich während der Inkubationszeit von 10 Wochen an das Stroh angelagert hatten. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe der Klonierungen mit anschließender Sequenzierung (Kapitel II 11 und II 12) für *Bacteria* und *Archaea* und zusätzlich durch Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE, Kapitel II 9) für *Bacteria* und mit der terminalen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP, Liu *et al.*, 1997, Kapitel II 10) für *Archaea* durchgeführt werden. Die unterschiedlichen Methoden und die Amplifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen (*Archaea* und *Bacteria*) erforderten die Verwendung verschiedener Primer-Paare. Alle verwendeten Primer und Primer-Paare mit ihren Eigenschaften und Verwendungszwecken sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

**Tabelle 2:** Verwendete Primer für die Amplifikation der 16S rDNA von *Bacteria* und *Archaea*

Primer-bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Referenz
968f <sup>a</sup>	AACGCGAAGAACCTTAC	Engelen <i>et al.</i> , 1998
1401r	CGGTGTGTACAAGGCCCGGG-AACG	Engelen <i>et al.</i> , 1998
A109f	ACKGCTCAGTAACACGT	Großkopf <i>et al.</i> , 1998a
A934r <sup>b</sup>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Großkopf <i>et al.</i> , 1998a
9-27f	GAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Lane, 1991
1492-1512r	ACGG(T/C)TACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
M13f	GTTTTCCCAGTCACGAC	Promega (Mannheim)
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Promega (Mannheim)

<sup>a</sup> DNA, die für DGGE verwendet werden sollte, wurde mit dem Primer 968f-GC (Engelen *et al.*, 1998) amplifiziert. Der Sequenz des Primers 968f geht dabei folgende GC-Klammer voraus: CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGG

<sup>b</sup> DNA, die für T-RFLP verwendet werden sollte, wurde mit dem 5'-Carboxyfluorescein-markierten Primer A934r-FAM amplifiziert.

**Tabelle 3:** Annealingtemperaturen und Verwendungszwecke der Primer-Paare, die für die Amplifikation der 16S rDNA von *Bacteria* und *Archaea* verwendet wurden

Primer-Paare	Annealing-temperatur	Verwendungszweck der Primer-Paare
968f GC/1401r	60°C	Amplifikation bakterieller DNA für DGGE
968f/1401r	60°C	Amplifikation von DGGE-Klonen und Banden
A109f/A934r-FAM	52°C	Amplifikation archaealer DNA für T-RFLP
A109f/A934r	52°C	Amplifikation archaealer DNA
9-27f/1492-1512r	48°C	Amplifikation bakterielle DNA
M13f/M13r	55°C	Amplifikation klonierter 16S rRNA-Genfragmente

Durchführung

Sämtliche PCR-Ansätze zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der jeweilige PCR-Ansatz mit der Zugabe von destilliertem Wasser anstelle von DNA. Die Reaktionsmischung bestand aus 1 µl (ca. 5 - 25 ng) der jeweils zu amplifizierenden DNA, 10 µl 10 x Reaktionspuffer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 2,5 U *Taq*-Polymerase (AmpliTa<sup>q</sup>® DNA-Polymerase, PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 30 pmol eines Primers, 6 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 20 nmol eines jeden Desoxyribonukleotides (USB, Cleveland, Ohio) und wurde mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Amplifikationen wurden im GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystem, Weiterstadt) durchgeführt, wobei folgendes Temperaturprofil (Tabelle 4) verwendet wurde:

**Tabelle 4:** Temperaturprofil der Amplifikation von mikrobieller 16S rDNA

	Temperatur	Zeit	Funktion
	94°C	3:00 min.	Denaturierung der DNA
dieser Zyklus wurde 25-35 mal wiederholt	primerspezifisch	1:00 min.	Primer-Anlagerung (Annealing)
	72°C	2:00 min.	DNA-Synthese (Elongation)
	94°C	0:45 min.	Denaturierung der DNA
	primerspezifisch (Tabelle 3)	1:00 min.	Primer-Anlagerung
	72°C	7:00 min.	DNA-Synthese
	4°C	∞	Lagerung

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Produkts auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Kapitel II 7).

Aufreinigung der PCR-Produkte

Um einzelsträngige DNA zu entfernen, wurden die PCR-Produkte für die weiteren Analysen mittels DGGE (Kapitel II 9), T-RFLP (Kapitel II 10) und Sequenzierung (Kapitel II 12) über eine Glasmilch-Matrix ("Prep-A-Gene DNA Purification Kit", Biorad, München), oder eine Silika-Matrix ("Quiaquick Spin Columns", Quiagen, Hilden) jeweils nach Herstelleranweisung aufgereinigt.

## 9. Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Die Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (Muyzer *et al.*, 1993) ermöglicht es, komplexe Populationen aufgrund des unterschiedlichen GC-Gehalts der 16S rRNA-Gene verschiedener Mikroorganismen aufzutrennen. Der GC-Gehalt bestimmt dabei das Denaturierungsverhalten der 16S rDNA bei unterschiedlichen Harnstoff- und Formamidkonzentrationen. Die denaturierte DNA läuft aufgrund der veränderten Sekundärstruktur langsamer in Richtung des positiven Pols als nicht-denaturierte DNA, was zu einer Auftrennung im Spannungsfeld führt. Um zu verhindern, daß sich die beiden DNA-Stränge vollständig trennen und als Einzelstränge im Gel weiterlaufen, wurde die DNA zuvor mit einem Primer amplifiziert, dem eine GC-reiche Sequenz vorausgeht.

### Lösungen

#### **Polyacrylamid Stammlösung 20% denaturierend**

Acrylamid-Bisacrylamid [37,5:1]	15 ml
50 x TAE	1,0 ml
Formamid	8,0 ml
Harnstoff	8,4 g
Glycerin	2,0 ml

Die Bestandteile wurden in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

#### **Polyacrylamid Stammlösung 50% denaturierend**

Acrylamid-Bisacrylamid [37,5:1]	15 ml
50 x TAE	1,0 ml
Formamid	20 ml
Harnstoff	21 g
Glycerin	2,0 ml

Die Bestandteile wurden in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

#### **Fixierlösung :**

Ethanol	10 %
Essigsäure	0,5 %

#### **Färbelösung:**

Fixierlösung	300 ml
AgNO <sub>3</sub>	0,2 %

#### **Entwickler:**

NaOH-Lösung (3%)	300 ml
Formaldehydlösung	0,1 %



### **Konservierungslösung:**

Glycerinlösung (85%)	28,5 ml
Ethanol absolut	62,5 ml

ad. 250 ml deionisiertes Wasser

### **Sybr-Green-Gebrauchslösung**

Für die Herstellung der Sybr-Green-Gebrauchslösung wurde die Sybr-Green I Stammlösung (Biozym, Oldenburg) 1:10.000 in deionisiertem Wasser verdünnt.

### Durchführung

Für die Herstellung des Gels wurden jeweils 17 ml der beiden Polyacrylamid Stammlösungen filtriert (0,2 µm) und unter Vakuum 1 min entgast. Anschließend wurde die Polymerisation durch Zugabe von je 40 µl frisch angesetzter 10%iger Ammonium-Persulfat-Lösung und 15 µl TEMED (Bio-Rad, München) gestartet. Das Polyacrylamidgel, das einen denaturierenden Gradienten von 20 bis 50% aufwies, wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt und auf die hydrophile Seite einer GelBond-PAG-Folie (FMC Bioproducts, Rockland, Maine) gegossen. Das Gradientengel wurde über Nacht bei RT polymerisiert.

Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer in 0,5 x TAE (Kapitel II 7) bei 60°C und 150 V für 4,5 h durchgeführt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer (Kapitel II 7) gemischt und nach einem "Vorlauf" des Gels (bei 150 V für 30 min) aufgetragen.

Die DNA wurde durch Silberfärbung oder Sybr-Green-Färbung sichtbar gemacht.

### Silberfärbung

Das Gel wurde nach dem Hauptlauf aus der Apparatur genommen und in einer Plastikwanne auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Dazu wurde das Gel zuerst mit der Fixierlösung für 3 min bedeckt, anschließend für 10 bis 12 min mit der Färbelösung gefärbt und danach ca. 2 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Gel wurde nun für 15 bis 20 min entwickelt, nochmals 5 min fixiert und zur Haltbarmachung 7 min in eine Konservierungslösung gegeben. Nach der Konservierung wurde das Gel getrocknet und photographiert.

### Sybr-Green-Färbung

Die Färbung der DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff Sybr-Green (Molecular Probes, Eugene, Oreg. USA), der bei 497 nm angeregt werden kann, wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

50 ml der Sybr-Green-Gebrauchslösung wurden dazu direkt auf des Gel gegeben und dieses für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und das Gel kurz mit Wasser gespült. Die Detektion erfolgte mit dem Storm 860 PhosphorImager.

### Ausschneiden von DGGE-Banden aus den DGGE-Gelen

DGGE-Banden wurden mit Hilfe einer abgeschnittenen, sterilen 200 µl Spitze aus dem Gel ausgestochen und die DNA der Banden in 200 µl TE-Puffer gelöst (2 h bei RT). Die DNA der Banden wurde anschließend amplifiziert und kloniert. Die Lagerung der DNA bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -20°C.

## 10. T-RFLP

Um die Komplexität eines Habitats zu untersuchen, eignet sich auch die terminale Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(T-RFLP)-Analyse (Liu *et al.*, 1997). Das 16S rRNA-Gen wird dabei mit einem 5'-fluoreszierenden Primer durch PCR amplifiziert und anschließend mit einer Restriktionsendonuklease behandelt. Die entstehenden 16S rDNA Fragmente, deren Längen oft spezifisch für die Sequenzen verschiedener Mikroorganismen sind, werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

### Lösungen

#### **TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer**

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2,0 mM
pH 8,5	

Der Puffer wurde in deionisiertem Wasser hergestellt.

### Durchführung

Nach der Amplifikation der 16S rDNA mit dem Primerpaar 109f / 934r-FAM (Kapitel II 8) wurden die PCR-Produkte mit dem Enzym Taq1® (Promega, Heidelberg) behandelt, das spezifisch an der Erkennungssequenz T<sup>+</sup>CGA schneidet (Der Strich markiert die Schnittstelle). Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl, die sich aus 2 - 7 µl PCR-Produkt (50-200 ng), 1 µl Inkubationspuffer (Promega, Heidelberg), 10 U Restriktionsenzym und Sigma-Wasser (Sigma, Deisenhofen) zusammensetzten. Die Reaktion wurde für 3 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden 2,5 µl des Reaktionsansatzes mit 1,9 µl Formamid und 0,6 µl eines internen Längenstandards (GenScan 1000 Rox, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) gemischt, für 3 min bei 94°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Fragmente wurden auf einem 6%igem Polyacrylamidgel, das nach Herstelleranweisung hergestellt wurde (Handbuch: "Model 373 DNA Sequencing System", User's Manual, PE Applied Biosystems Weiterstadt), aufgetrennt. Die Elektrophorese im automatischen Sequenziergerät wurde für 6 h (2500 V, 40 mA) in 1 x TBE-Puffer durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware (GenScan Analysis Version 2.1, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Dabei wurden die Größen der detektierten Fragmente anhand des internen Längenstandards (von 22-928 Nukleotiden) ermittelt.

## **11. Klonierung**

Für die Klonierung der 16S rDNA-PCR-Fragmente wurde der "Topo TA Cloning Kit" oder der "Original TA Cloning Kit" (Invitrogen, Niederlande) verwendet. Der verwendete Vektor trägt dabei sowohl das Gen für Kanamycin-Resistenz als auch das Gen für die  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), was eine Blaufärbung des Mediums zur Folge hat. Bei korrekter Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor ist das Gen für die X-Gal Verwertung inaktiv, das für die Kanamycin-Resistenz bleibt jedoch unberührt. Weiße Kolonien auf LB-Platten mit Kanamycin werden somit von Zellen gebildet, die einen Vektor enthalten (Kanamycin-Resistenz), in den das PCR-Produkt erfolgreich integriert wurde (keine Verwertung von X-Gal).

Lösungen**Bestandteile der Kits:**

Original TA Cloning Kit	TOPO Cloning Kit
Vector: pCR 2.1 (linearisiert)	Vector pCR 2.1 TOPO (linearisiert), dem Vektor ist Topoisomerase beigemischt, die eine Ligaseaktivität besitzt
10 x Ligationspuffer	-----
T4 DNA Ligase	-----
<i>E. coli</i> : One Shot Cells (TOP 10F')	<i>E. coli</i> : One Shot Cells (TOP10)
SOC-Medium	SOC-Medium
$\beta$ -Mercaptoethanol	$\beta$ -Mercaptoethanol

**LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)**

Trypton	10 g l <sup>-1</sup>
Hefeextract	5 g l <sup>-1</sup>
NaCl	10 g l <sup>-1</sup>
Agar (für Platten)	15 g l <sup>-1</sup>
Kanamycin	5 µg ml <sup>-1</sup>
X-Gal	40 µg ml <sup>-1</sup>
pH 7,0	

Die Komponenten wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und anschließend entweder für die Herstellung von LB-Agarplatten oder als Flüssigmedium für die Herstellung von Glycerin-Stammkulturen verwendet.

**Kanamycin**

Es wurden 0,05 g Kanamycin in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und dem Medium nach dem Autoklavieren (auf 55°C abgekühlt) zugegeben.

**X-Gal-Lösung**

0,04 g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) wurden in 1 ml Dimethylformamid gelöst und ebenfalls nach dem Autoklavieren zu dem abgekühlten Medium gegeben. Die Lösung wurde nicht sterilfiltriert.

**Glycerin-Puffer**

Glycerinlösung (100%)	65 ml
MgSO <sub>4</sub> -Lösung (0,4 M)	25 ml
Tris-HCl-Lösung pH 8,0	2,5 ml
deionisiertes Wasser	7,5 ml

### Durchführung

Als Ausgangsmaterial wurde ein frisches PCR-Produkt verwendet, dessen DNA-Konzentration auf einem 1%igen Agarosegel bestimmt wurde (Kapitel II 7). Für die Ligation wurden zwischen 5 und 10 ng DNA eingesetzt. Die Klonierungen erfolgten jeweils nach den Originalprotokollen des Herstellers (Invitrogen). Bei Verwendung des "Original TA Cloning Kit" wurde die Ligation über Nacht bei 15°C durchgeführt. Anschließend wurden bereits kompetente *E. coli*-Zellen (Invitrogen, Niederlande) mit dem Vektor für 30 min auf Eis transformiert, mit 450 ml SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Für den "TOPO Cloning Kit" wurde der Ligationsansatz 5 min bei RT inkubiert. Die Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen wurde ebenfalls für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend in 250 ml SOC-Medium 1 h bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten mit Kanamycin und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Auswahl transformierter Zellen über eine Blau-Weiß-Färbung der Kolonien wurden positive Kolonien auf neue LB-Platten mit Kanamycin und X-Gal übertragen.

Für die weitere Analyse der klonierten 16S rRNA-Genfragmente wurde zuerst die gesamte DNA des Klons extrahiert. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher einen Teil der Kolonie in 100 µl TE-Puffer überführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 100°C inkubiert, die Zellbestandteile abzentrifugiert (5 min, 20000 x g) und der Überstand in ein frisches 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

Das klonierte Genfragment wurde nun mit Hilfe des vektorspezifischen Primer-Paars M13f / M13r (Tabellen 2, 3) für bakterielle 16S rDNA bzw. mit dem Primer-Paar 109f / 934r für archaeale SSU rDNA amplifiziert.

### Glycerin-Stammkulturen

Um Stammkulturen von Klonen anzulegen, wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* (800 µl LB-Flüssigmedium in einem 2 ml Reaktionsgefäß) mit 800 µl Glycerin-Puffer versetzt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 12 Sequenzanalyse der 16S rDNA-Fragmente

### 12.1 Nicht-radioaktive, "zyklische" Sequenzierung

Die nicht-radioaktive, zyklische Sequenzierung folgt dem Prinzip der "Kettenabbruch-Methode" (Sanger *et al.*, 1977). Der Kettenabbruch erfolgt dabei jeweils nach dem Einbau eines Didesoxyribonucleotides.

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des "ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit" mit AmpliTaq® DNA Polymerase FS (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach folgendem Temperaturprofil (Tabelle 5) durchgeführt:

**Tabelle 5:** Temperaturprofil der nicht-radioaktiven "zyklischen" Sequenzierung

	Temperatur	Zeit	Funktion
dieser Zyklus wurde 25 mal wiederholt	96°C	10 sec	Denaturierung der Ziel-DNA
	50°C	5 sec	Primer-Anlagerung
	60°C	4:00 min	DNA-Synthese
	4°C	∞	Lagerung

Der Reaktionsmix für die Sequenzierung wurde in einem Gesamt-volumen von 20 µl angesetzt und bestand aus der gereinigten DNA (ca. 50 ng), 6 pmol des Sequenzierungsprimers (Tabelle 6), 6 µl des "Terminator Ready Reaction Mix" und destilliertem Wasser, um auf das Endvolumen aufzufüllen. Der "Terminator Ready Reaction Mix" enthielt die nicht-radioaktiven Fluoreszenzfarbstoffe "A-Dye-", "C-Dye-", "G-Dye-", "T-Dye", welche an die Didesoxyribonukleotide (Terminatoren) dITP, dATP, dCTP, dTTP gekoppelt waren, außerdem Tris-HCl (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub>, thermostabile Phosphatase und AmpliTaq® DNA Polymerase FS. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen unterschiedliche Emissions-Maxima (zw. 535 nm und 605 nm) und können so gleichzeitig detektiert werden.

**Tabelle 6:** Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Sequenzierung von *Bacteria*- und *Archaea*-16S rDNA

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck <sup>a</sup>
A109f	Tabelle 2	<i>Archaea</i>
A934r	Tabelle 2	<i>Archaea</i>
9-27f	Tabelle 2	<i>Bacteria</i>
350f	TACGGGA(G/C)GCAGCAG	<i>Bacteria</i>
968f	Tabelle 2	<i>Bacteria</i> (DGGE) <sup>b</sup>
1401r	Tabelle 2	<i>Bacteria</i> (DGGE) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Verwendungszweck der Primer für die Sequenzierung der SSU ("small subunit") von *Archaea* oder der 16S rDNA von *Bacteria*.

<sup>b</sup> Die sequenzierten 16S rDNA-Fragmente stammten aus extrahierter DNA, die durch DGGE, wie unter Kapitel II 9 beschrieben, aufgetrennt wurde.

### Reinigung der Sequenzierungsprodukte

Vor der weiteren Analyse der Sequenzierungsprodukte wurden überschüssige Didesoxynukleotide, Desoxynukleotide und Primer entfernt. Dazu wurden die Sequenzierungsreaktionen mit 100 µl 100%igem Ethanol und 3 µl Na-Acetat (3 M, pH 4,8) gefällt, abzentrifugiert (20 min, 20000 x g) und anschließend das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 3 µl eines Gemisches aus Formamid und EDTA (25 mM, pH 8) im Verhältnis 4:1 (v/v) aufgenommen.

### Analyse der Sequenzierungsprodukte

Die Fragmentanalyse erfolgte durch Elektrophorese mit einer angegliederten Detektionseinheit (Model 373A DNA Sequencer, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die gereinigten Sequenzierungsprodukte wurden 3 min bei 100°C denaturiert und auf ein 5%iges Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug 14 h bei 2500 Volt, 40 mA und 27 W. Die Detektion erfolgte durch einen Argonlaser (Hauptemission bei 514 nm und 488 nm), der das Gel horizontal abtastete und somit die durch den Detektionsbereich wandernden, markierten DNA-Fragmente zur Sekundärstrahlung anregte. Die Strahlung wurde durch einen Photomultiplier erfaßt und durch ein computergestütztes Analyseprogramm (Apple Macintosh Modell Quadra, Data Analysis Version 1.2, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) in ein Gelbild umgesetzt. Das daraus erstellte Chromatogramm zeigte die Basensequenzen der Ziel-DNA. Die Durchführung dieser Schritte erfolgte in Anlehnung an die Herstelleranweisung.

## 12.2 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen

Eine genaue phylogenetische Einordnung der Sequenzdaten wurde computergestützt (SUN Ultra 1, Sun Microsystems, Grasbrunn) mit Hilfe der ARB-Software durchgeführt (Strunk und Ludwig, 1996). Die 16S rRNA-Gensequenzen wurden dabei mit einer ca. 8000 *Bacteria* und 176 *Archaea*-Referenzsequenzen umfassenden Datenbank (Maidak *et al.*, 1996) verglichen, die durch Sequenzen von Chin *et al.*, 1998, Chin *et al.*, 1999a und Hengstmann *et al.*, 1999 ergänzt worden war. Zusätzlich wurden die erhaltenen Sequenzdaten mit den Sequenzen der EMBL-Datenbank (Baker *et al.*, 2000) durch die Funktion WU-Blast verglichen und verwandte Sequenzen ebenfalls in die bestehende Datenbank eingebracht. Die Zuordnung der Sequenzen zu phylogenetischen Gruppen erfolgte anhand der Primär- und der Sekundärstruktur. Dazu wurden die jeweils homologen Nukleotidpositionen in Spalten angeordnet ("Alignment"). Dieser Vergleich der zu analysierenden Sequenzen mit den Referenzsequenzen ermöglicht eine weitgehend korrekte Zuordnung in den hypervariablen Regionen der 16S rRNA-Gene (Gutell *et al.*, 1994). Der automatische Sequenzvergleich wurde überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

Phylogenetische Bäume wurden nun mit Hilfe der ARB-Software und unter Verwendung verschiedener Methoden rekonstruiert.

- "Maximum-Parsimony"-Methode (Fitsch, 1971): Diese Methode berechnet phylogenetische Distanzen auf der Basis der geringstmöglichen Anzahl an Ereignissen, die zu den Unterschieden in den zu untersuchenden Sequenzen geführt haben. D. h. die zu analysierenden Sequenzen werden derjenigen Sequenz aus der Referenzdatenbank zugeordnet, zu der die geringste Anzahl an Nukleotidaustauschen berechnet werden konnte. Diese Berechnung ermöglicht nur eine näherungsweise Zuordnung in einem phylogenetischen Baum.
- "Distanze-Matrix"-Methode: Dieses Verfahren beruht auf dem paarweisen Sequenzvergleich der zu analysierenden Sequenzen, aus dem die evolutionären Distanzen berechnet werden können. Dabei wurde ein Algorithmus verwendet, der vorkommende Transitionen und Transversionen nach dem "Ein-Parameter-Modell" berücksichtigt (Jukes und Cantor, 1969). Ein weiterer Korrekturfaktor berücksichtigt multiple Nukleotidsubstitutionen auf einer Position (Jukes und Cantor, 1969). Diese Werte wurden mit der "Neighbor-Joining"-Methode (Saitou und Nei, 1987) in einen phylogenetischen Stammbaum umgesetzt.



## Quantifizierung bakterieller Zellen durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung

### **13.1 Verwendete 16S rRNA-Sonden und deren Stringenzbedingungen**

Die Quantifizierung der bakteriellen Populationen, die das Reisstroh besiedeln, wurde durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung mit verschiedenen 16S rRNA Sonden durchgeführt. Für die Gattung *Clostridium* wurden insgesamt fünf neue 16S rRNA Sonden entwickelt, die verschiedene Cluster der Clostridien detektieren. Alle verwendeten Sonden (Tabelle 7) wurden mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein, TexasRed, Cy3 oder CY5 gekoppelt (Biometra, Göttingen bzw. MWG, Ebersberg).

#### Entwicklung neuer Sonden für die Gattung Clostridium

Für die Entwicklung neuer Sonden wurde das Programm PROBE-DESIGN verwendet, welches Teil des ARB-Programmpakets (Strunk und Ludwig, 1996) ist. Dieses Programm vergleicht 16S rRNA Sequenzen und listet Sequenzbereiche mit gleicher Nukleotidabfolge auf. Die verwendeten Sequenzen wurden zum einen direkt der bestehenden Datenbank (Maidak *et al.*, 1996) entnommen. Zum anderen wurde diese durch Isolat- und Klonsequenzen der Gattung *Clostridium* ergänzt, die von Chin *et al.* (1999a) und Hengstmann *et al.* (1999) beschrieben wurden und durch Klonsequenzen, die im Laufe dieser Arbeit erhalten wurden.

Die Stringenz von 16S rRNA Sonden kann durch die Formamid-Konzentration des Hybridisierungspuffers und die NaCl-Konzentration der Waschlösung eingestellt werden. Dabei bewirkt eine Erhöhung der Formamid-Konzentration auch eine Erhöhung der Stringenz, während eine Erhöhung der NaCl-Konzentration die Stringenz der Sonde senkt. Für neu entwickelte 16S rRNA Sonden musste der Stringenzbereich zuerst bestimmt werden. Diese Stringenzbestimmung erfolgte nach der Methode, die von Manz *et al.* (1992) beschrieben wurde. Dazu wurden Formamid-Konzentrationen von 0% - 50% an Referenzstämmen (Tabelle 1) getestet. Die höchste Formamid-Konzentration, mit der ein positives Signal der Positivkontrolle und kein Signal der Negativkontrolle erzielt werden konnte, wurde für weitere Hybridisierungsexperimente verwendet. In folgender Tabelle (Tabelle 7) sind alle verwendeten 16S rRNA Sonden, deren Sequenzen und Hybridisierungsbedingungen aufgelistet.

**Tabelle 7:** Beschreibung der verwendeten 16S rRNA-Sonden für "Ganz-Zell"-Hybridisierung und deren Hybridisierungsbedingungen

Sonde <sup>a</sup>	Spezifität	Sondensequenzen (5' - 3')	FA [%] <sup>b</sup>	Referenz
S-D-Bact-0338-a-A-18 (Eub338)	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGG AGT	0	Amann <i>et al.</i> , 1990b
S-Sc-aProt-0019-a-A-17 (Alpha1b)	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	CGTTCGYTCTGAGCC AG	20	Manz <i>et al.</i> , 1992
L-Sc-bProt-1027-a-A-17 <sup>c</sup> (Beta42a)	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGT TT	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
L-Sc-gProt-1027-a-A-17 (Gam42a)	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGT TT	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
S-P-CyFla-0319-a-A-18 (CF319a)	Cytophaga-Flavobacterium Cluster des <i>CFB</i> -Phylums	TGGTCCGTGTCTCAG TAC	35	Manz <i>et al.</i> , 1996
L-P-Grps-1901-a-A-18 (HGC69a)	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt	TATAGTTACCACCGC GT	25	Roller <i>et al.</i> , 1994
S-P-Lgc-0354-a-A-18 (LGC354A) S-P-Lgc-0354-b-A-18 (LGC354B) S-P-Lgc-0354-c-A-18 (LGC354C)	Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt	TGGAAGATTCCCTAC TGC CGGAAGATTCCCTAC TGC CCGAAGATTCCCTAC TGC	20	Meier <i>et al.</i> , 1999
S*-Srb-0385-a-A-18 (SRB385)	$\delta$ - <i>Proteobacteria</i>	CGGCGTCGCTGCGT CAGG	35	Amann <i>et al.</i> , 1990a
S-P-VM-0338-a-A-18 <sup>d</sup> (VM338)	<i>Verrucomicrobia</i>	TGCTGCCACCCGTAG GTG	50	Stubner, persönliche Mitteilung
S-S-Irog1-0353-a-A-18 (IRog1) S-S-Irog2-0728-a-A-17 (IRog2)	16S rDNA-Sequenzen des <i>Acidobacterium-Holophaga</i> -Phylums	AAGGCGGCATCCTGG ACC/ GCAGTGGGGAATTGT TC	35	Ludwig <i>et al.</i> , 1997
S-G-ClostI-0696-a-A-20 (Clost I)	106 Sequenzen des Cluster I, 2 Sequenzen des Clusters II der Clostridien	TTCTTCTAATCTCTA CGCA	30	Küsel <i>et al.</i> , 1999
S-G-ClostIII-0140-a-A-18 (Clost III)	7 Sequenzen des Clusters III der Clostridien, Stämme FCB90-1, FCB90-2, FCB45 und RCel1 aus Reisfeldboden <sup>e</sup>	CCTGTGTTATCCCC TGT	30	Diese Arbeit
S-G-ClostIV-0565-a-A-15 (Clost IV)	Cluster IV der Clostridien, einige Mitglieder der Gattungen <i>Eubacterium</i> , <i>Rhodothermus</i> und <i>Chlorobium</i>	GCACCCTTTACACCC	30	Diese Arbeit
S-G-ClostXIVa-0129-a-A-15 (Clost XIVa)	25 Isolate des Clusters XIVa des Genus <i>Clostridium</i>	CTGTATGAGGCAGGT	30	Diese Arbeit
S-S-ClostXIVa/c-0138-a-A-20 (ClostXIVa-c)	16S rDNA Klonsequenzen, die phylogenetisch innerhalb dem Cluster XIVa liegen, aber nicht mit der Sonde Clost XIVa detektierbar sind, drei Isolate des Clusters XIVa der Clostridien.	CAGCTGTTATCCCC TGAT	40	Diese Arbeit
S-S-Clost XIVa/amino-0183-a-A-15 (ClostXIVa-amino)	3 Isolate des Clusters XIVa der Clostridien	GTACCATGCGGCACT	40	Diese Arbeit

<sup>a</sup> Nomenklatur der Sonden nach Alm *et al.*, 1996. Bindungsstelle der 16S rRNA Sonde nach *E coli*-Nummerierung (Brosius *et al.*, 1981)

<sup>b</sup> Prozent Formamid (FA, v/v) des Hybridisierungspuffers für "Ganz-Zell"-Hybridisierung

<sup>c</sup> Da sich die Zielsequenzen der Sonden Bet42a und Gam42a nur durch eine einzige Position unterscheiden, wurde die jeweils andere Sonde in äquimolaren Mengen unmarkiert zugegeben.

<sup>d</sup> Diese Sonde ist equivalent zur Sonde Eub338-III, die kürzlich von Daims *et al.* (1999) beschrieben wurde, jedoch um eine Position verschoben.

<sup>e</sup> Chin *et al.*, 1998, Chin *et al.*, 1999a

### 13.2 "Ganz-Zell"-Hybridisierung

Die Methode der "Ganz-Zell"-Hybridisierung erlaubt eine Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen in Bezug auf die Gesamtheit an Zellen eines Habitats ohne vorherige Amplifikation durch PCR. Dabei wird die Zellhülle durch eine Entwässerung mit Ethanol permeabel für die fluoreszenzmarkierten 16S rRNA-Sonden gemacht. Anschließend stellt eine Fixierung mit Formaldehyd sicher, daß bei der Hybridisierung die Zellstruktur intakt bleibt, so daß Einzelzellen gezählt und somit quantifiziert werden können. In komplexen Habitaten stellt die Autofluoreszenz der Umgebung oft ein Problem dar. Diese Autofluoreszenz kann durch eine Behandlung mit Toluidinblau (Smith and McCully, 1978) und durch die Verwendung eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (cLSM) reduziert werden.

#### Lösungen

##### **Formaldehyd für die Fixierung**

0,4 g Paraformaldehyd wurden in 10 ml PBS 1 h bei 65°C gelöst und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel). Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

##### **Ethanol für die Entwässerung**

50%, 80% und 96%ige Lösungen wurden in deionisiertem Wasser hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

##### **Prähybridisierungslösung**

Tris	2,4 g l <sup>-1</sup>
SDS	2,0 g l <sup>-1</sup>
Na <sub>3</sub> EDTA	2,0 g l <sup>-1</sup>
pH 7,4	

Die Bestandteile wurden in 1 l deionisiertem Wasser gelöst und die Lösung unsteril in Aliquots zu je 40 ml bei -20°C gelagert.

##### **Hybridisierungslösung**

Die Hybridisierungslösung wurde jeweils aus 800 µl der frisch aufgetauten Prähybridisierungslösung hergestellt, indem zu dieser 200 µl einer 4,5 M NaCl-Stammlösung gegeben wurde (Endkonzentration 0,9 M). Diese Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und anschließend mit Formamid bis zur gewünschten Konzentration versetzt (Tabelle 7).

### **Waschlösung**

Die Waschlösung wurde hergestellt, indem der Prähybridisierungslösung NaCl (Stammlösung: 4,5 M) zugegeben wurde. Die NaCl-Endkonzentrationen richteten sich nach der Formamidkonzentration: 980, 220, 150, 100, 60, 40 und 10 mM NaCl für jeweils 0, 20, 25, 30, 35, 40 und 50% Formamid.

### **TE-Puffer (Tris-EDTA)**

Tris-HCl	10 mM
Na <sub>3</sub> EDTA	1,0 mM
pH 8,0	

Die Bestandteile wurden in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der Puffer wurde bei 4° C gelagert.

### **DAPI**

Für die DAPI-Stammlösung wurden 3,5 mg 4'6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) in 10 ml destilliertem Wasser gelöst, portioniert und bei -20°C eingefroren. Die DAPI-Gebrauchslösung wurde frisch durch eine 1:500 Verdünnung der DAPI-Stammlösung in PBS (Kapitel II 4.2) hergestellt.

### Durchführung

#### Fixierung

Nach der Stomacherbehandlung des Strohs (Kapitel II 4.3) wurden 200 µl des gesammelten PBS abgenommen und mit 3 Vol Formaldehyd für 1 h bei RT fixiert. Das Pellet wurde anschließend 2 mal mit 1 ml PBS gewaschen.

#### Reduktion der Autofluoreszenz

Zur Reduktion der Autofluoreszenz von Erd- und Strohpartikeln wurde das Pellet mit einer Toluidinblaulösung (1 h, 0,01% in PBS [w/v], Smith and McCully, 1978) inkubiert und anschließend mindestens 3 mal mit PBS gewaschen. Die Lagerung bis zur weiteren Behandlung erfolgte bei -20°C in PBS / Ethanol (1:2 [v/v]).

#### Entwässerung

Die Proben wurden auf Teflon-beschichtete Glas-Objektträger (MAGV, Rabenau-Londorf) aufgetropft, die jeweils in 8 Felder aufgeteilt waren. Die Objektträger waren zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt worden. Pro Feld wurde 1 µl der Zellsuspension aufgetropft und über Nacht bei RT getrocknet. Die trockenen Präparate wurden anschließend über eine Ethanolreihe (50%, 80%, 96%) für je 3 min entwässert.

### Lysozymbehandlung

Um die Permeabilität der Zellwand Gram-positiver Bakterien für die 16S rRNA-Sonden zu erhöhen, schloß sich bei manchen Proben eine Lysozymbehandlung an. Dazu wurden pro Feld 10 µl Lysozymlösung (0,1% in TE-Puffer [w/v]) aufgetropft und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und die Präparate nochmals über eine Ethanolreihe entwässert.

### Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden pro Feld 8 µl vorgewärmte Hybridisierungslösung (46°C) aufgetropft und 1 µl einer Sondenstammlösung (8 pmol / µl) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen (HYBAID, AGS GmbH, Heidelberg) in einer äquilibrierten Kammer mit Wasser-gesättigter Atmosphäre (2,5 h, 46°C).

### Waschschritte

Die Objektträger wurden anschließend mit vorgewärmter Waschlösung (48°C) abgespült und nochmals 20 min mit Waschlösung bei 48°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Objektträger wurden noch ein drittes Mal mit Waschlösung gründlich gespült und an der Luft getrocknet.

### DAPI-Färbung

Die Zellen der trockenen Präparate wurden nun mit DAPI gegengefärbt. Dazu wurden die Felder mit der DAPI-Gebrauchslösung bedeckt (ca. 10 µl), 15 min bei RT inkubiert, anschließend gründlich mit deionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die trockenen Präparate wurden vor dem Mikroskopieren (Kapitel II 13.3) mit dem Ausbleichschutz Citifluor AF1 (gelöst in Glycerin / PBS, UKG, Chemical Laboratory, Universität Canterbury, England) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

## **13.3 Konfokale Laser-Rastermikroskopie**

Die Verwendung eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (cLSM) ermöglicht es, eng zusammenliegende Strukturen aufzulösen, indem mit Hilfe eines Laserstrahls optische Schnitte durch Zellen und Gewebe erstellt werden. Strahlung von außerhalb der Fokusebene wird dabei durch eine Detektionsblende unterdrückt. Die Verwendung eines cLSM eignet sich besonders für komplexe Habitate, um dort häufig auftretende Autofluoreszenzen von z.B. Erd- und Strohpartikeln zu reduzieren. Durch die verbesserte Auflösung können Einzelzellen auch in Zellkolonien dargestellt werden und deren Phylogenie durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung und FISH bestimmt werden.

Das verwendete Mikroskop war ein Leica DMR XE, Typ TCS NT Mikroskop mit einem PL-Fluotar-Objektiv 63 x / 1.32 (Ölimmersion). Die Detektion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte bei den entsprechenden Wellenlängen und Einstellungen des Mikroskops wie in Tabelle 8 aufgelistet. Die Bildauswertung wurde mit dem Programm Leica TCS NT, Version 1.5.451 (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg) durchgeführt.

**Tabelle 8:** Eigenschaften der für die konfokale Laser-Rastermikroskopie verwendeten Farbstoffe und den entsprechenden Einstellungen am Mikroskop

Farbstoffe	DAPI	Fluoreszein	TexasRed und Cy3	Cy5
<b>Anregungs-Wellenlänge</b>	345 nm	488 nm	568 nm	647 nm
<b>Laser</b>	ArUV <sup>a</sup>	ArKr <sup>b</sup>	ArKr	ArKr
<b>Filter</b>	BP <sup>c</sup> 440/40	BP 530/30	BP 600/30	LP <sup>d</sup> 665

<sup>a</sup> ArUv: Argon/UV-Laser

<sup>c</sup> BP: Bandpaßfilter

<sup>b</sup> ArKr: Argon/Krypton-Laser

<sup>d</sup> LP: Langpaßfilter

### 13.4 Quantifizierung

Mit der "Ganz-Zell"-Hybridisierung sollte zum einen die Anzahl aktiver Bakterien in Bezug auf die Gesamtheit aller Bakterien bestimmt werden. Zum anderen sollte der prozentuale Anteil dominanter, phylogenetischer Gruppen in Korrelation zur Gesamtheit der aktiven Bakterien festgestellt werden.

Um die Aktivität zu bestimmen, wurde die 16S rRNA-Sonde Eub338, die nahezu alle aktiven bakteriellen Zellen (d.h. Zellen mit einem erhöhten Ribosomengehalt) detektiert, gemeinsam mit dem Farbstoff DAPI eingesetzt, der aktive und inaktive Zellen markiert. Das Verhältnis der gezählten Zellen (bei ca. 16000 DAPI gefärbte Zellen) stellte den prozentualen Anteil an aktiven Zellen dar.

Um den Anteil wichtiger, phylogenetischer Gruppen der aktiven Bakterien festzustellen, wurden jeweils mindestens zwei 16S rRNA-Sonden (Eub338 und mindestens eine gruppenspezifische Sonde) und der Farbstoff DAPI eingesetzt. Dabei wurde jede Probe in zwei Parallelen hybridisiert und das Experiment mindestens einmal wiederholt. Insgesamt wurden pro gruppenspezifischer 16S rRNA-Sonde mindestens 1000 DAPI-markierte Zellen gezählt. Das Verhältnis von Eub338-markierten Zellen zu Zellen, die mit einer gruppenspezifischen Sonde detektiert wurden, stellte den prozentualen Anteil der jeweiligen phylogenetischen Gruppe dar.

## 14. Quantifizierung archaealer SSU rRNA mit "Northern-Blot"-Hybridisierung

Die RNA "Northern-Blot"-Hybridisierung ermöglicht wie die "Ganz-Zell"-Hybridisierung eine Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen in Bezug auf die Gesamtpopulation in einem Habitat. Diese Methode beruht auf der Extraktion der gesamten RNA der Populationen, die anschließend mit gruppenspezifischen Sonden hybridisiert wird. Die hier verwendeten Digoxigenin (Dig)-markierten Oligonukleotidsonden stellen eine Alternative zu radioaktiv markierten Sonden dar. Das Dig-Molekül wird anschließend durch einen spezifischen Antikörper detektiert, an den wiederum an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch ein Substrat, das von diesem Enzym verwertet wird, kann die Reaktion schließlich sichtbar gemacht werden.

### 14.1 "Northern-Blot"-Hybridisierung

#### Lösungen

##### Hybridisierungspuffer

SSC	5 x
N-Lauroylsarcosin	0,1 %
SDS	0,02 %
Blockierungs-Lösung	1,0 %

Für die Einzelkomponenten wurden Stammlösungen in deionisiertem Wasser hergestellt, die entweder autoklaviert (SSC, Blockierungs-Lösung) oder sterilfiltriert (N-Lauroylsarcosin, SDS) und anschließend in einer sterilen Flasche gemischt wurden. Der Hybridisierungspuffer wurde bei 4°C gelagert.

##### 20 x SSC

NaCl	3,0 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7,9	

Die Lösung wurde in deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**Waschpuffer (Puffer 1 + Tween20)**

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
pH 7,5	

Die Lösung wurde in deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Vor Verwendung wurden noch 0,3% Tween20 zugegeben.

**Blockierungslösung**

Das von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim gelieferte Blocking-Reagenz wurde in Puffer 1 (ohne Tween20) auf einem Heizblock bis zu einer Endkonzentration von 10% [w/v] gelöst, anschließend autoklaviert und bei 4°C gelagert. Diese Stammlösung wurde vor dem Gebrauch in Puffer 1 bis zu einer Endkonzentration von 1% verdünnt.

**Äquilibrierungspuffer**

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
pH 9,5	

Der Puffer wurde in deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 9:** Beschreibung der verwendeten 16S rRNA-Sonden für "Northern-Blot"-Hybridisierung, deren Stringenzbedingungen und verwendete Referenzorganismen

Sonde <sup>a</sup>	Spezifität	Sondensequenzen (5'-3')	Referenz-Organismus <sup>b</sup>	Stringente Wasch-Temperatur (T <sub>m</sub> -Wert)	Referenz
S*-Univ-1392-a-A-15 (Univ1392)	alle Mikroorganismen	ACGGGCGGTGTGTRC	<i>E. coli</i>	40°C	Stahl <i>et al.</i> 1988
S-D-Bact-0338-a-A-18 (Eub338)	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCCTAGG AGT	<i>E. coli</i>	55°C	Amann <i>et al.</i> , 1990b
S-D-Arc-0915-a-A-20 (Arch915)	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATT CCT	<i>Methanobacterium bryantii</i>	56°C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
S-F-Mbac-0310-a-A-22 (MB310)	<i>Methanobacteriales</i>	CTTGTCTCAGGTTCCATCTC CG	<i>Methanobacterium bryantii</i>	57°C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
S-F-Msae-0825-a-A-23 (MX825)	<i>Methanosaeta</i>	TCGCACCGTGGCCGACACC TAGC	<i>Methanosaeta concilii</i>	59°C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
S-G-Msar-0821-a-A-24 (MS821)	<i>Methanosarcina</i>	CGCCATGCCTGACACCTAGC GAGC	<i>Methanosarcina barkeri</i>	60°C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
S*-Mgen-1200-a-A-21 (MG1200)	<i>Methanogenium-Verwandte</i>	CGGATAATTCTTGGCATG CTG	<i>Methanospirillum hungatii</i>	53°C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
RCI	"Rice Cluster" I	Daten wurden noch nicht veröffentlicht		60°C	Lüders, persönliche Mitteilung

<sup>a</sup> Nomenklatur der Sonden (außer RCI) nach Alm *et al.*, 1996. Bindungsstelle der 16S rRNA Sonde nach *E. coli*-Nummerierung (Brosius *et al.*, 1981)

<sup>b</sup> die aufgelisteten Referenzorganismen wurden zur Erstellung einer Eichgerade für die jeweilige Sonde verwendet.



### Durchführung

#### Denaturierung

Aus der Stammlösung der extrahierten RNA (Kapitel II 6) wurden verschiedene Verdünnungsstufen mit destilliertem RNase freiem Wasser hergestellt. Jede Verdünnung wurde mit 1 Vol 20 x SSC / Formaldehyd (37%) im Verhältnis 3 Vol 20 x SSC + 2 Vol Formaldehyd versetzt und für 15 min bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis gestellt.

#### Transfer der RNA und Immobilisierung

Die RNA wurde mittels einer "Blotting-Apparatur" auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Buckinghamshire, UK) transferiert und anschließend durch UV-Behandlung mit einem "Stratalinker<sup>®</sup> 2400" auf der Membran immobilisiert (zweimal mit je 1200 µJ x 100).

#### Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Membranen wurden nun in Rollflaschen (Ochs, Bovenden-Lengborn) überführt und für 1 bis 2 h bei 40°C mit 10 ml Hybridisierungspuffer in einem Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen) vorinkubiert. Die Hybridisierung wurde in 3 ml Hybridisierungspuffer für mindestens 14 h durchgeführt, wobei eine spezifische Sonde (Tabelle 9) in der Konzentration 30 pmol/ml zugegeben wurde.

#### Waschschritte

Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden wurden mit zwei weniger spezifischen (50 ml 1 x SSC mit 0,1% SDS, 40°C, 30 min) und einem spezifischen Waschschritt (50 ml 1 x SSC mit 1% SDS, 30 min) entfernt. Dabei wurde der spezifische Waschschritt bei dem sondenspezifischen  $T_m$ -Wert (Tabelle 9) durchgeführt.

#### Antikörperreaktion

Unspezifische Bindungen des Anti-Dig-Antikörpers ( $F_{ab}$ -Fragment, Boehringer Mannheim, Mannheim) wurden durch eine 30 minütige Vorinkubation mit Blockierungslösung unterbunden. Die Antikörperreaktion wurde für 30 min bei RT in 5 ml Blockierungslösung (Antikörper-Verdünnung 1:1000) durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen 2 x in je 20 ml Waschpuffer (15 min, RT) gewaschen und bis zur Detektion der Hybridisierungssignale in Äquilibriumlösung aufbewahrt.

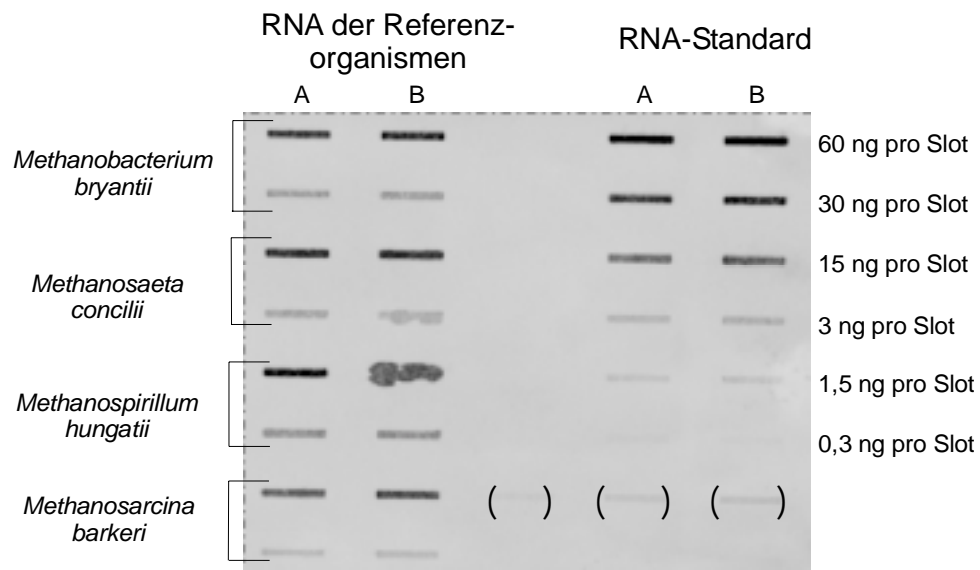
### Substratreaktion und Signaldetektion

Die Membranen wurden 1 bis 2 min mit dem Substrat ECF (Diethanolamin, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Buckinghamshire, UK) inkubiert, das bei 570 nm detektiert werden kann. Die Signaldetektion erfolgte mit dem Strom 860 PhosphorImager.

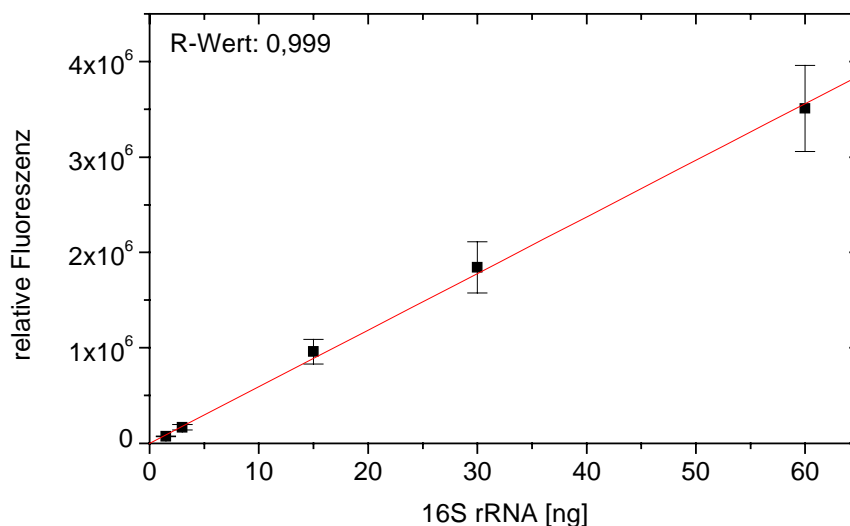
## **14.2 Quantifizierung der SSU rRNA**

### **14.2.1 Quantifizierung der SSU rRNA der Referenzorganismen mit einem RNA-Standard**

In dieser Arbeit sollten verschiedene phylogenetische Gruppen mit spezifischen 16S rRNA-Sonden quantifiziert werden (Tabelle 9). Für die unterschiedlichen Gruppen wurden dazu verschiedene Referenzorganismen (Kapitel II 1.3.2 und Tabelle 9) benötigt, mit denen eine Eichgerade erstellt werden konnte. Der Gehalt an SSU rRNA der Referenzorganismen wurde zuvor anhand eines RNA-Standards (*E. coli*-Standard, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durch "Northern-Blot"-Hybridisierung bestimmt. Auf einer Nylonmembran wurden dazu zum einen jeweils zwei Verdünnungsstufen der RNA verschiedener Referenzorganismen aufgetragen. Zum anderen wurden parallel dazu verschiedene Verdünnungen des RNA-Standards aufgetragen, aus denen anschließend eine Eichgerade berechnet wurde (Abbildungen 3, 4). Die Ausgangskonzentration dieses Standards betrug  $4 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  (Roche Diagnostics GmbH). Die Eichgerade des RNA-Standards umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,3 - 60 ng (Abbildung 4). Die Analyse und Quantifizierung der Hybridisierungs-Signale erfolgte mit dem Programm ImageQuant® (Molecular Dynamics). Das Hintergrundsignal wurde mit der Funktion "Local Average" korrigiert.



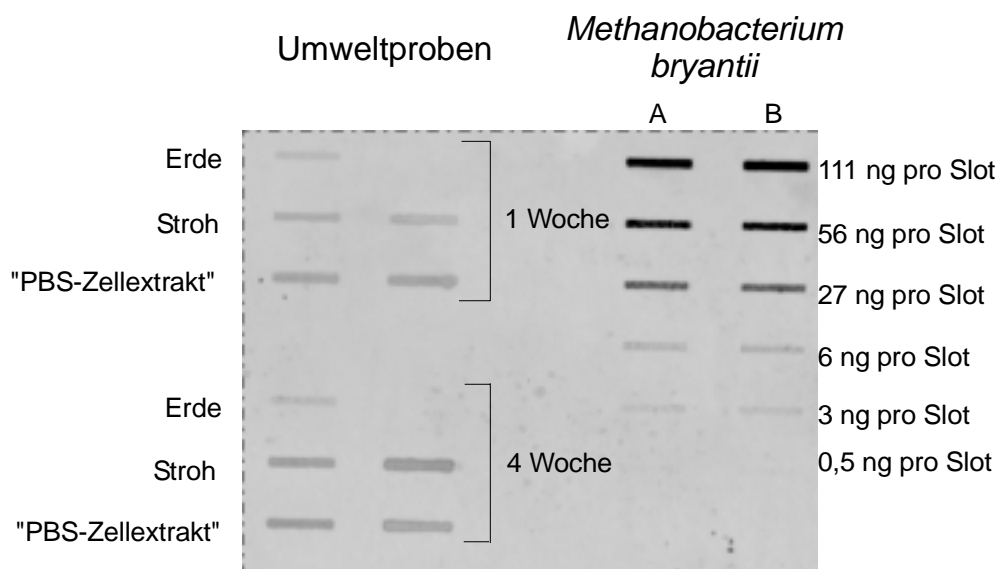
**Abbildung 3:** Quantifizierung des 16S rRNA-Gehalts der verwendeten Referenzorganismen, mit Hilfe eines RNA-Standards (*E. coli*) und der Sonde Univ1392. Die RNA der Referenzorganismen wurde dazu jeweils in folgenden zwei Verdünnungsstufen aufgetragen: *Methanobacterium bryantii*: 1:160 und 1:840, *Methanosaeta concilii*: 1:270 und 1:1400, *Methanospirillum hungatii*: 1:150 und 1:750, *Methanosarcina barkeri* 1:130 und 1:660. Die Höhe der Verdünnung wurde aufgrund der Signalstärke der unverdünnten RNA auf einem Agarosegel abgeschätzt. Alle RNA-Konzentrationen wurden in zwei parallelen Serien (A und B) bestimmt. Die Signale in Klammern sind unabhängige Proben, die nichts mit der hier gezeigten Quantifizierung zu tun haben.



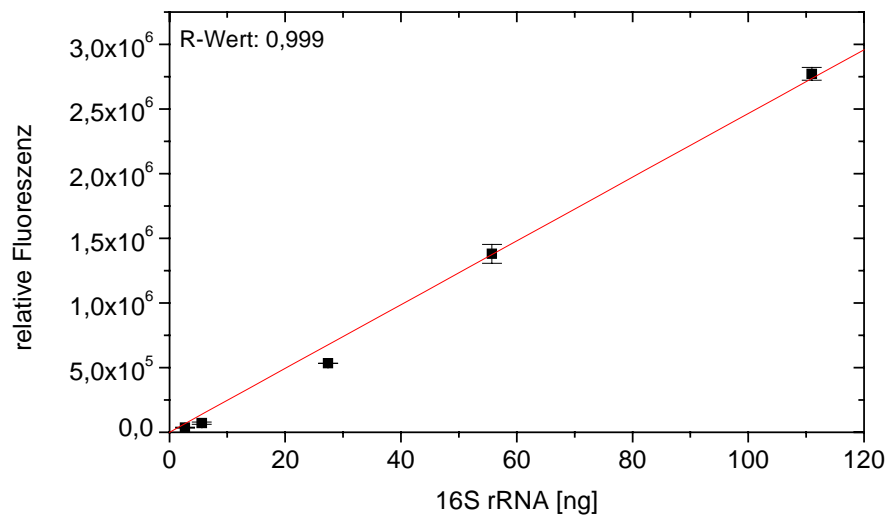
**Abbildung 4:** Eichgerade des RNA-Standards (*E. coli*) zur Quantifizierung der verwendeten Referenzorganismen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 2$ ).

### 14.2.2 Quantifizierung der SSU rRNA der Umweltproben

Die Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen der mikrobiellen Gesamtpopulationen erfolgte anhand der Referenzorganismen (Tabelle 9), deren 16S rRNA-Gehalt, wie in Kapitel 14.2.1 beschrieben, bestimmt wurde. Parallel zu den Umweltproben wurden auf jeder Nylonmembran verschiedenen RNA-Mengen eines Referenzorganismus aufgetragen und daraus eine Eichgerade erstellt. Diese Eichgeraden umfaßten für die Sonden Univ1392 und Eub338 einen Bereich von ca. 0,3 - 150 ng, für die *Archaea*-Sonden einen Bereich von ca. 0,3-110 ng. In den Abbildungen 5 und 6 ist die Bestimmung des Gehalts an *Methanobacteriales*-16S rRNA der Proben Erde, Stroh und "PBS-Zellextrakt" (Kapitel II 4.1, 4.2, 4.3) als Beispiel dargestellt. Die Proben wurden dafür jeweils eine Woche und vier Wochen anaerob inkubiert. Für Stroh und den "PBS-Zellextrakt" wurden jeweils zwei verschiedene Verdünnungsstufen der RNA nebeneinander aufgetragen.



**Abbildung 5:** Bestimmung des Gehalts an *Methanobacteriales*-16S rRNA der Proben Erde, Stroh und "PBS-Zellextrakt", die für eine und vier Wochen anaerob inkubiert wurden, anhand des Referenzorganismus *Methanobacterium bryantii* und mit der SSU rRNA-Sonde MB 310. Die Umwelt-RNA wurde dazu in folgenden Verdünnungen aufgetragen: Erde: 1:4, Stroh und PBS-Zellextrakt: je 1:12 (linkes Signal) und 1:6 (rechtes Signal) Der Referenzorganismus wurde in zwei parallelen Serien (A und B) aufgetragen.



**Abbildung 6:** Eichgerade des Referenzorganismus *Methanobacterium bryantii* zur Quantifizierung der *Methanobacteriales*-16S rRNA der Proben Erde, Stroh und "PBS-Zellextrakt" (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 2$ ).

### III) Ergebnisse

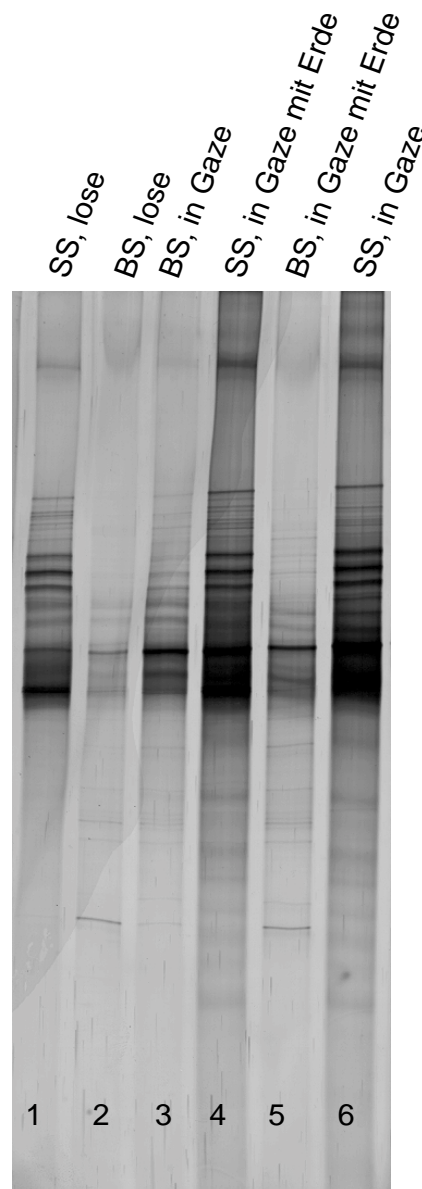
#### 1. Anaerobe Besiedlung von Reisstroh durch *Bacteria*

##### **1.1 Der Einfluß verschiedener Strohsorten und Inkubationsbedingungen auf die bakteriellen Populationen**

Der Einfluß der Gazesäckchen, in die das Reisstroh eingenäht wurde, und der verschiedenen Strohsorten (Stiel und Blatt) auf die bakteriellen Populationen sollte unter möglichst natürlichen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde das Stroh 4 Wochen anoxisch in Bodenaufschlämmungen in Plastikblumentöpfen (Kapitel II 2.1) inkubiert. Anschließend wurde die gesamte DNA extrahiert (Kapitel II 5), mit dem Primerpaar 968f-GC, 1401r amplifiziert (Kapitel II 8) und durch Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) (Kapitel II 9) aufgetrennt. Dadurch entstand ein charakteristisches Bandenmuster der 16S rDNA-Fragmente, das im weiteren Verlauf des Textes nur noch als DGGE-Muster bezeichnet wird.

Vergleicht man die DGGE-Muster, die von den 16S rDNA-Fragmenten von Stielstroh und Blattstroh unter gleichen Inkubationsbedingungen gebildet wurden (Abbildung 7: Spuren 1/2, 3/6 und 4/5), kann man deutliche Unterschiede in der Anzahl der Banden feststellen. Vor allem im oberen Bereich des Gels weisen die Spuren des Stielstrohs ein vielfältiges Muster mit deutlich sichtbaren Banden auf, während in den Spuren des Blattstrohs nahezu keine Banden zu erkennen sind.

Ein Vergleich der verschiedenen Inkubationsbedingungen der Strohsorten zeigt hingegen keine signifikanten Unterschiede in den DGGE-Mustern. Sowohl für Stielstroh (Abbildung 7, Spuren 1, 4, 6) als auch für Blattstroh (Abbildung 7, Spuren 2, 3, 5) bleibt die Anzahl der deutlich sichtbaren Banden unter allen drei Inkubationsbedingungen nahezu gleich.



**Abbildung 7:** Vergleich der DGGE-Muster von Blattstroh (BS) und Stielstroh (SS) unter verschiedenen Inkubationsbedingungen:

- lose in die Erde gegeben (lose, Spuren 1, 2)
- in Gazesäckchen eingenäht (in Gaze, Spuren 3, 6)
- in Gazesäckchen eingenäht, in die zusätzlich noch Erde gegeben wurde (in Gaze mit Erde, Spuren 4, 5)

Zahlen am unteren Rand des Gels bezeichnen die einzelnen Spuren.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Verwendung der Gazesäckchen keinen Einfluß auf die bakteriellen Populationen hatte, die sich am Stroh ansiedelten. Am Stielstroh siedelte sich jedoch eine komplexere bakterielle Gemeinschaft an als am Blattstroh. Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Experimente Stielstroh verwendet, das in Gazesäckchen eingenäht wurde und in Serumflaschen anaerob inkubiert wurde (Kapitel II 2.2).

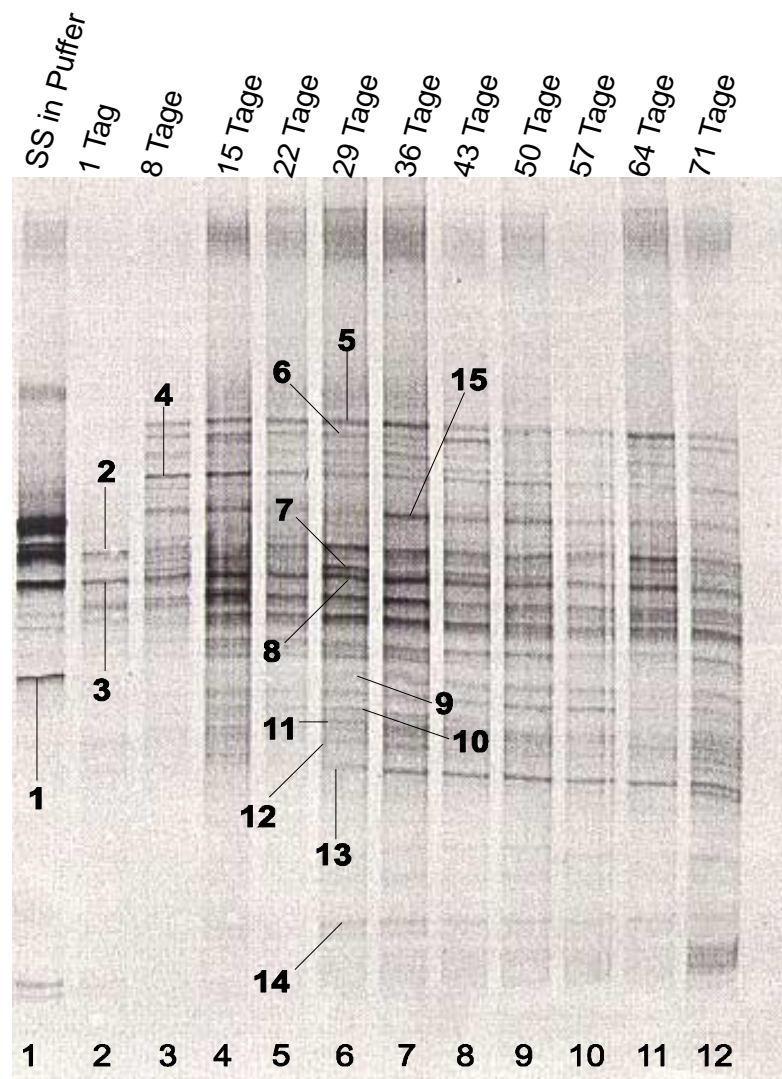
## 1.2 Zeitlicher Verlauf der Besiedlung von Reisstroh durch *Bacteria*

Zur Erstellung eines Zeitprofils der Besiedlung von Reisstroh durch Bakterien wurde Stielstroh anoxisch in Erde über einen Zeitraum von 71 Tagen in Serumflaschen inkubiert. Am ersten Tag der Inkubation und im weiteren Verlauf wurde jede Woche die gesamte DNA einer Strohprobe extrahiert und amplifiziert. Zusätzlich wurde Stielstroh in Phosphatpuffer, ohne die Zugabe von Erde, inkubiert und nach einer Inkubationszeit von 8 Wochen ebenso behandelt. Die 16S rDNA-Fragmente aller Proben wurden gemeinsam auf einem DGGE-Gel aufgetrennt (Abbildung 8).

Vergleicht man die DGGE-Muster des Stielstrohs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in Boden, so fand man die auffälligsten Unterschiede zwischen den Tagen 1 ("1-Tag-Stroh"), 8 ("8-Tage-Stroh") und 15 ("15-Tage-Stroh"). Das Muster der Probe "1-Tag-Stroh" weist nur sehr wenige, deutliche Banden in der Mitte des Gels auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Probe "8-Tage-Stroh" ein auffälliges Bandenmuster im oberen Bereich des Gels und die Probe "15-Tage-Stroh" sowohl im oberen als auch im unteren Bereich des Gels. Die DGGE-Muster von länger inkubiertem Stroh (Tag 15 - 71) erscheinen hingegen sehr ähnlich und nur vereinzelt sind Unterschiede bezüglich einiger Banden zu erkennen. So ist zum Beispiel Bande 13 erst ab Tag 29 zu sehen.

Vergleicht man das DGGE-Muster des Strohs, das in Puffer inkubiert worden war (Spur 1), mit den restlichen DGGE-Mustern von Stroh, das in Erde inkubiert worden war (Spuren 2 - 12), so sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Stroh, das in Puffer inkubiert worden war, weist viel weniger Banden auf als die Proben "8-Tage-Stroh" und "15-Tage-Stroh", jedoch etwas mehr Banden als die Probe "1 Tage-Stroh".





**Abbildung 8:** DGGE-Muster der 16S rDNA der Bakterien, die Stielstroh (SS) besiedeln, das über einen Zeitraum von 71 Tagen in anoxischen Bodenaufschlammungen (Spuren 2 - 12), oder für mindestens 8 Wochen anoxisch in Phosphatpuffer, ohne die Zugabe von Erde, inkubiert worden war (Spur 1). Banden, die mit Zahlen markiert sind, wurden aus dem Gel ausgestochen und die 16S rDNA-Fragmente wurden sequenziert. Die Zahlen am unteren Rand des Gels bezeichnen die einzelnen Spuren.

Aus den Ergebnissen kann man folgern, daß sich am Stroh, das in Erde inkubiert worden war, innerhalb von 15 Tagen eine komplexe bakterielle Gemeinschaft ausbildete, deren Zusammensetzung im weiteren Verlauf der Inkubation relativ konstant blieb. Das Stroh war bereits vor der Inkubation von einigen Populationen besiedelt, was sich deutlich durch die Inkubation des Strohs ohne Erde in Puffer zeigte. Die Anzahl der Populationen war allerdings geringer als an Stroh, das in Erde inkubiert worden war.

### 1.3 Detektion der dominanten phylogenetischen Gruppen

Um ein möglichst breites Spektrum dominanter phylogenetischer Gruppen zu detektieren, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden aus dem DGGE-Gel, das den zeitlichen Verlauf der Besiedelung von Stroh durch Bakterien darstellt (Abbildung 8), 15 Banden ausgestochen (Banden 1 - 15). Die DNA dieser Banden wurde reamplifiziert und kloniert. Anschließend wurden aus den Klonbibliotheken Klone zufällig ausgewählt und deren Laufverhalten in einem DGGE-Gel mit dem Laufverhalten der Originalproben verglichen. Nur diejenigen Klone wurden sequenziert (RSD-Klone), deren Banden im DGGE-Gel die gleichen Positionen einnahmen wie die Originalbanden.

Im zweiten Ansatz wurde die gesamte 16S rDNA von Bakterien extrahiert, die sich an Stroh ansiedelten, das einen Tag (RSa-Klonbibliothek) oder vier Wochen (RSb-Klonbibliothek) anoxisch in Serumflaschen inkubiert worden war. Von jeder Klonbibliothek wurden 20 Klone zufällig ausgesucht und das Laufverhalten der Klone auf einem DGGE-Gel verglichen. Anschließend wurden insgesamt 16 Klone sequenziert, die ein unterschiedliches Laufverhalten aufwiesen. Sieben Klone stammten dabei von Stroh, das einen Tag inkubiert worden war (RSa-Klone), und neun Klone von Stroh, das 4 Wochen inkubiert worden war (RSb-Klone). In Tabelle 10 sind die phylogenetischen Zugehörigkeiten aller Klonsequenzen aus beiden Ansätzen mit ihren Ähnlichkeitswerten aufgelistet.

**Tabelle 10:** Phylogenetische Einordnung sämtlicher bakterieller Klonsequenzen und deren Ähnlichkeitswerte zu den am nächsten verwandten Isolaten und Klonen. Alle Klonsequenzen stammten von DNA, die von anoxisch inkubiertem Reisstroh extrahiert wurde.

Bezeichnung der Klon <sup>a</sup>	nahester Verwandte	Ähnlichkeitswerte <sup>b</sup> (%)
RSD1	<i>C. sporosphaeroides</i>	93
RSD2, RSD3, RSD6	<i>C. acetobutylicum</i>	98
RSD4	<i>C. aminovalericum</i> XB90 <sup>c</sup>	95 92
RSD5	FCB 90-1/2 <sup>c</sup> <i>C. papyrosolvens</i>	93 93
RSD7	<i>C. populeti</i> XB90	93 90
RSD8	<i>Bacillus sp.</i> <sup>d</sup> <i>Fluoribacter bozemanii</i>	80 77
RSD9	<i>C. botulinum</i>	89
RSD10	BSV40 <sup>e</sup> <i>Chlorobium tepidum</i>	95 81
RSD11, RSD13	UA3 <sup>f</sup> <i>Acidobacterium capsulatum</i>	83 82
RSD12, RSD14	OPB54 (OP12) <sup>g</sup> BSV81 <sup>e</sup>	85 95
RSD15	<i>Fluoribacter bozemanii</i>	77
RSa17	<i>C. quinii</i>	99
RSa20, RSa35	" <i>Bacillus pseudomegaterium</i> "	97
RSa31	<i>Burkholderia sp.</i> <i>Nitrosospira sp.</i>	87 88
RSa32	<i>C. populeti</i> XB90 <sup>c</sup>	91 92
RSa40	" <i>C. favosporum</i> "	99
RSa48	<i>C. acetobutylicum</i>	98
RSb3, RSb8	<i>C. quinii</i>	92
RSb6, RSb24	<i>C. acetobutylicum</i>	98
RSb12	SB90 <sup>c</sup> <i>C. acetobutylicum</i>	91 90
RSb16	<i>C. magnum</i>	98
RSb33	<i>C. scatologenes</i>	92
RSb40	<i>C. populeti</i> XB90 <sup>c</sup>	93 94
RSb47	<i>C. sacheroperbutyl-aceticum</i>	99

<sup>a</sup> RSD = "Reisstroh-DGGE", die extrahierte DNA wurde durch DGGE aufgetrennt, 15 Banden ausgestochen, und sequenziert. RSa/b= "Reisstroh, 1 Woche/4 Wochen Inkubationszeit", die extrahierte DNA, wurde amplifiziert und direkt nach der Amplifikation nahezu komplett kloniert

<sup>b</sup> Ähnlichkeitswerte wurden durch "Distanz Matrix"-Analysen erstellt

<sup>c</sup> Chin *et al.*, 1999a

<sup>d</sup> AB030930, unveröffentlicht (EMBL Datenbank, Baker *et al.*, 2000)

<sup>e</sup> Hengstmann *et al.*, 1999

<sup>f</sup> Radajewski *et al.*, 2000

<sup>g</sup> Hugenholtz *et al.*, 1998b

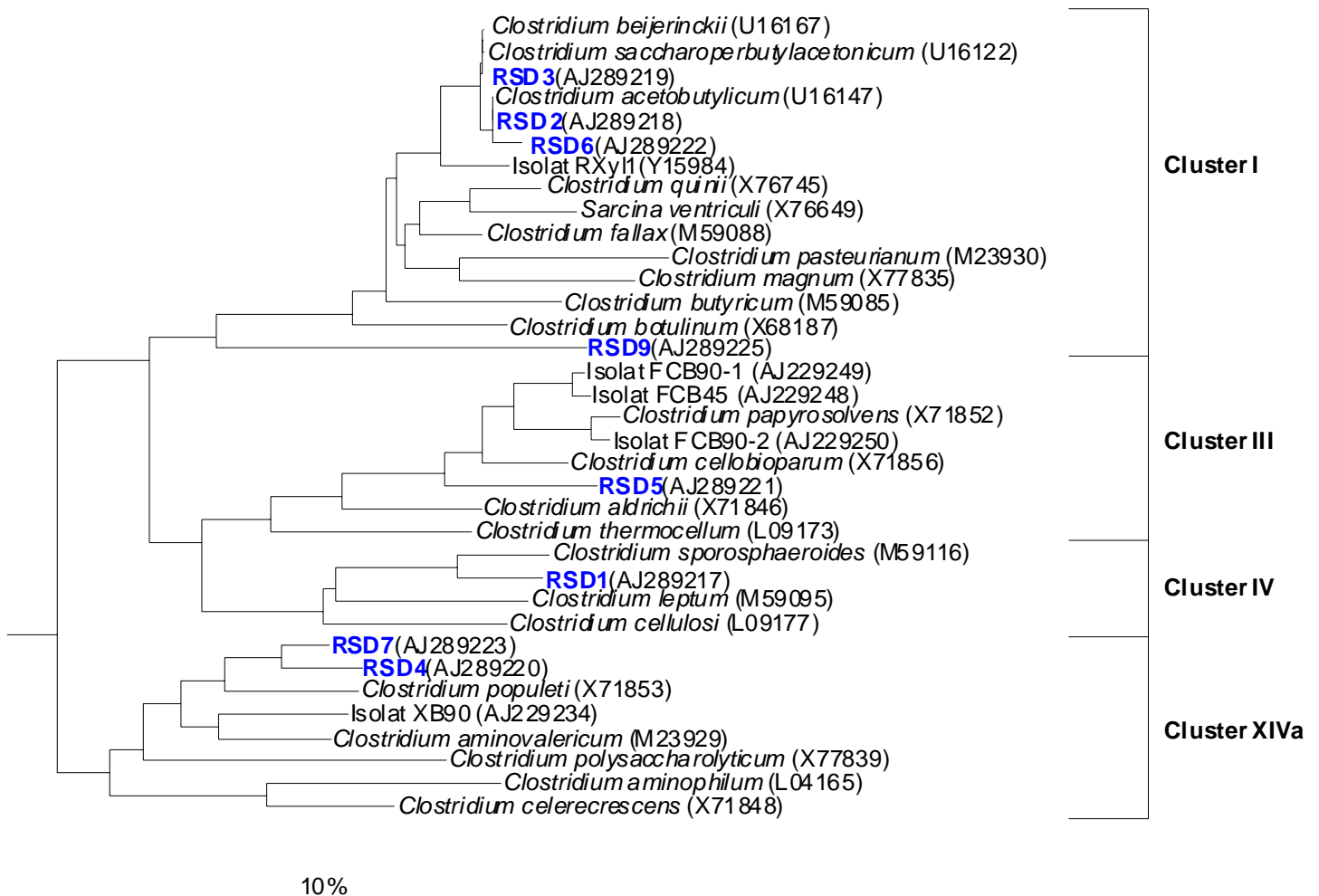
### 1.3.1 Phylogenetische Zuordnung der DGGE-Klone

Die Sequenzen der 16S rDNA-Fragmente von 15 Banden aus dem DGGE-Gel (Abbildung 8) wurden phylogenetisch zugeordnet. Dabei waren 8 dieser 15 Sequenzen mit Mitgliedern der Gattung *Clostridium* verwandt. Der phylogenetische Baum in Abbildung 9 zeigt die Position der RSD-Klonsequenzen innerhalb der Gattung *Clostridium*. Drei Sequenzen zeigten einen hohen Verwandtschaftsgrad zu Klonsequenzen, die von DNA aus Reisfeldboden erhalten wurden (Hengstmann *et al.*, 1999). Zwei Sequenzen konnten einem Klon zugeordnet werden, der zur Gattung *Acidobacterium* gehört (Radajewski *et al.*, 2000) und zwei weitere Sequenzen zeigten geringe Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Bacillus* und *Fluoribacter*.

Die 16S rDNA Sequenzen der Klone RSD2, 3, 6 und 9 fielen in das Cluster I der Clostridien (Collins *et al.*, 1994). Dabei zeigten vor allem die Klone 2, 3 und 6 eine hohe Ähnlichkeit untereinander (Ähnlichkeitswerte > 99%) und zu dem Isolat *C. acetobutylicum* (Ähnlichkeitswert: 98%). Die Sequenz des Klons RSD9 fand ihren nächsten Verwandten in dem Isolat *C. botulinum*, das ebenfalls ein Mitglied des Clusters I der Clostridien ist. Die Ähnlichkeit war aber mit 89% deutlich geringer als bei den anderen Klonsequenzen. Die 16S rDNA Sequenzen der Klone RSD1 und RSD5 konnten jeweils den Clustern IV und III zugeordnet werden. Für beide Klone waren die Ähnlichkeitswerte zu den nächsten Verwandten mit 93% relativ gering. RSD5 zeigte jedoch vergleichbare Werte zu den Isolaten FCB90-1 und FCB90-2, die aus Reisfeldboden stammten (Chin *et al.*, 1999a, Hengstmann *et al.*, 1999). Die Klone RSD4 und RSD7 konnten dem Cluster XIVa der Clostridien zugeordnet werden. Beide Klone zeigten mit 92% bzw. 90% geringe Ähnlichkeiten zu dem Isolat XB90, das ebenfalls aus Reisfeldboden stammte (Chin *et al.*, 1999a, Hengstmann *et al.*, 1999). Die Ähnlichkeit der Klone untereinander war mit 96% relativ hoch.

Sieben Klonsequenzen konnten nicht der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden. Ihre phylogenetischen Zuordnungen inklusive den Ähnlichkeitswerten sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die 16S rDNA Sequenzen der Klone RSD10, und RSD12 und 14 zeigten relativ hohe Ähnlichkeitswerte von 95% zu den Klonsequenzen BSV40 und BSV81 (Hengstmann *et al.*, 1999), die von DNA aus Reisfeldboden stammten (Ähnlichkeitswerte: 95%). Die Ähnlichkeitswerte zu der Gattung *Chlorobium* bzw. zu der "candidate division" OP12 (Hugenholz *et al.* 1998a, b) waren dagegen mit 81% und 85% gering.

Die Klone RSD8 und 15 zeigten geringe Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Bacillus* und *Fluoribacter* (Ähnlichkeitswerte: 77% und 80%). Ebenso waren die Ähnlichkeiten für die Klone RSD11 und 13 zur Gattung *Acidobacterium* sehr gering (Ähnlichkeitswert: 82%).

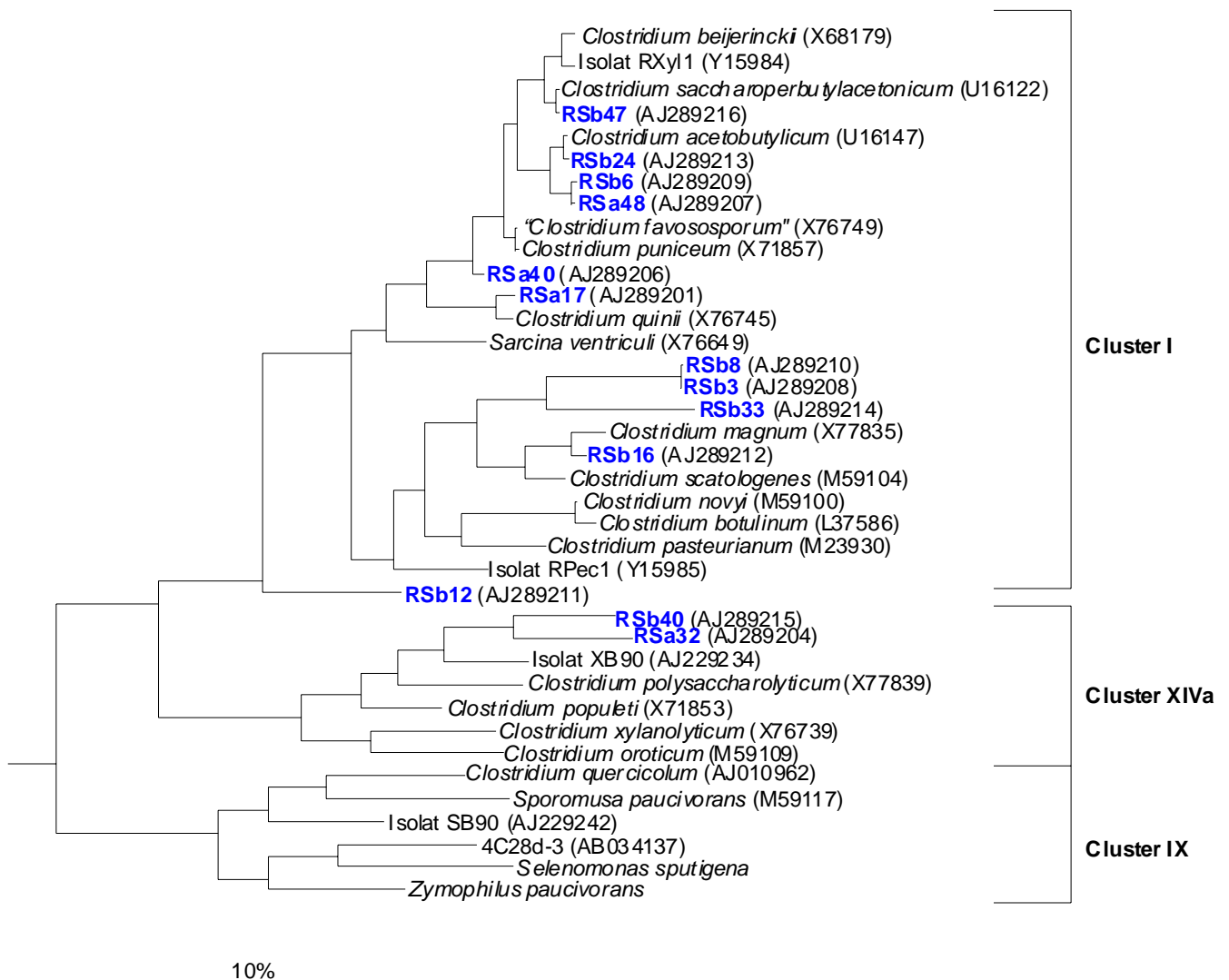


**Abbildung 9:** Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rDNA-Klonsequenzen, die von extrahierter DNA der ausgestochenen DGGE-Banden stammten (RSD: "Reis-Stroh-DGGE"). Der Baum zeigt die Verwandtschaft der Klonsequenzen zu Mitgliedern verschiedener Cluster der Gattung *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). Die phylogenetische Analyse bezog sich auf den DNA-Abschnitt zwischen Position 1022 und 1357 (Brosius *et al.*, 1978). Zur Rekonstruktion des Baums wurde die "Neighbor-joining"-Methode verwendet. Mutationsraten wurden mit dem "Jukes-Cantor" Modell (Jukes und Cantor, 1969) korrigiert. Hochvariable Regionen wurden mit einem Filter für die Gattung *Clostridium* und einem Invarianzkriterium von 50% in die Berechnung einbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch. Um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen wurde die 16S rRNA Sequenz von *Bacillus subtilis* verwendet. Sequenzen, die für die Konstruktion des Baumes verwendet wurden, sind unter den in Klammern stehenden "accession numbers" in der EMBL Datenbank (Baker *et al.* 2000) erhältlich.

### 1.3.2 Phylogenetische Zuordnung der Klone aus den Klonbibliotheken

Von den beiden Klonbibliotheken der direkt klonierten 16S rDNA wurden 16 Klone sequenziert, die eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität in einem DGGE-Gel aufwiesen. Dabei konnten 13 dieser Klone der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden. Die phylogenetischen Positionen der Klone innerhalb der Gattung *Clostridium* sind in Abbildung 10 dargestellt. Zwei Klone waren mit einem Isolat der Gattung *Bacillus* verwandt, ein Klon zeigte den höchsten Verwandtschaftsgrad zur Gattung *Nitrosospira*.

Von den 13 *Clostridium*-ähnlichen Klonen konnten 10 Sequenzen (RSa17, RSa40, RSa48 und RSb3, RSb6, RSb8, RSb16, RSb24, RSb33, RSb47) dem Cluster I der Clostridien zugeordnet werden. Die Klone RSa17, RSa40, RSa48, RSb6, RSb24, RSb16 und RSb47 wiesen dabei Ähnlichkeitswerte über 98% zu Mitgliedern dieses Clusters auf, während die Klone RSb3, RSb8 und RSb33 eine eigene Abzweigung innerhalb des Clusters bildeten. Der naheste Verwandte zu den Klonen RSb3 und RSb8 war *C. quinii*, und zu dem Klon RSb33 *C. scatologenes*, mit Ähnlichkeitswerten von jeweils 92%. Zwei der Klone (RSa32, RSb40) zeigten eine geringe Verwandtschaft (Ähnlichkeitswerte: 91-94%) zu Mitgliedern des Clusters XIVa der Clostridien. Sie bildeten ebenfalls eine eigene Abzweigung innerhalb dieses Clusters. Der Klon RSb12 konnte zwar der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden, jedoch keinem der verschiedenen Cluster. Er zeigte vergleichbare Ähnlichkeitswerte zu dem Isolat SB90 (91% Ähnlichkeit, Chin *et al.*, 1998), das aus Reisfeldboden stammte und dem Cluster IX zugeordnet wird, und zu dem Isolat *C. acetobutylicum* (90% Ähnlichkeit), das dem Cluster I der Clostridien zugeordnet wird. Nur drei Klone (RSa20, RSa31 und RSa35) konnten anderen Gattungen als den Clostridien zugeordnet werden (Tabelle 10). Die Klone RSa20 und RSa35 zeigten hohe Ähnlichkeiten (97%) zu *Bacillus pseudomegaterium*, der Klon RSa31 jedoch geringe Ähnlichkeit (88%) zu der Gattung *Nitrosospira*.



**Abbildung 10:** Phylogenetisches Dendrogramm der RSa- und RSb-Klone (Reis-Stroh, 1 Tag bzw. 4 Wochen inkubiert), die aus der direkten Klonierung der gesamten 16S rDNA stammten. Der Baum zeigt die Verwandtschaft der Klonsequenzen zu Mitgliedern verschiedener Cluster der Gattung *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). Die phylogenetische Analyse bezog sich ausschließlich auf den DNA-Abschnitt zwischen Position 94 und 757 (Brosius *et al.*, 1978). Zur Rekonstruktion des Baums wurde die "Neighbor-joining"-Methode verwendet. Mutationsraten wurden mit dem "Jukes-Cantor" Modell (Jukes und Cantor, 1969) korrigiert. Hochvariable Regionen wurden mit einem Filter für die Gattung *Clostridium* und einem Invarianzkriterium von 50% in die Berechnung einbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch. Um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen wurde die 16S rRNA Sequenz von *Bacillus subtilis* verwendet. Sequenzen, die für die Konstruktion des Baumes verwendet wurden, sind unter den in Klammern stehenden "accession numbers" in der EMBL Datenbank (Baker *et al.*, 2000) erhältlich.

## 1.4 Quantifizierung der dominanten phylogenetischen Gruppen durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung

### 1.4.1 Reduktion der Autofluoreszenz von Stroh- und Erdpartikeln

Um die phylogenetischen Gruppen, die das Stroh besiedelten, zu quantifizieren, wurden "Ganz-Zell"-Hybridisierungen mit verschiedenen gruppenspezifischen 16S rRNA-Sonden durchgeführt. Stroh und Erde besitzen allerdings jeweils eine starke Autofluoreszenz, die vor allem schwächere spezifische Hybridisierungssignale verdecken können. Die Quantifizierung der Populationen war dadurch nicht direkt am Stroh, also *In-Situ*, möglich, sondern erst nach einem Zwischenschritt, in dem die Bakterien von dem Stroh durch eine Stomacherbehandlung abgelöst wurden. Die Effizienz der Stomacherbehandlung wurde durch "Northern-Blot"-Hybridisierung getestet. Dazu wurde von Stroh, das für 8 oder 29 Tage inkubiert worden war, die RNA extrahiert und die 16S rRNA mit der Sonde Univ1392 quantifiziert (Stroh). Zusätzlich wurde Stroh mit der gleichen Inkubationszeit mit dem Stomacher behandelt und anschließend die RNA von dem behandelten Stroh extrahiert und die 16S rRNA quantifiziert (gestomachertes Stroh). Vergleicht man die 16S rRNA Werte der verschiedenen Proben, so kann man feststellen, daß sich nach 8 Tagen 93% der RNA vom Stroh ablösen ließen, nach 29 Tagen jedoch nur noch 81% (Tabelle 11).

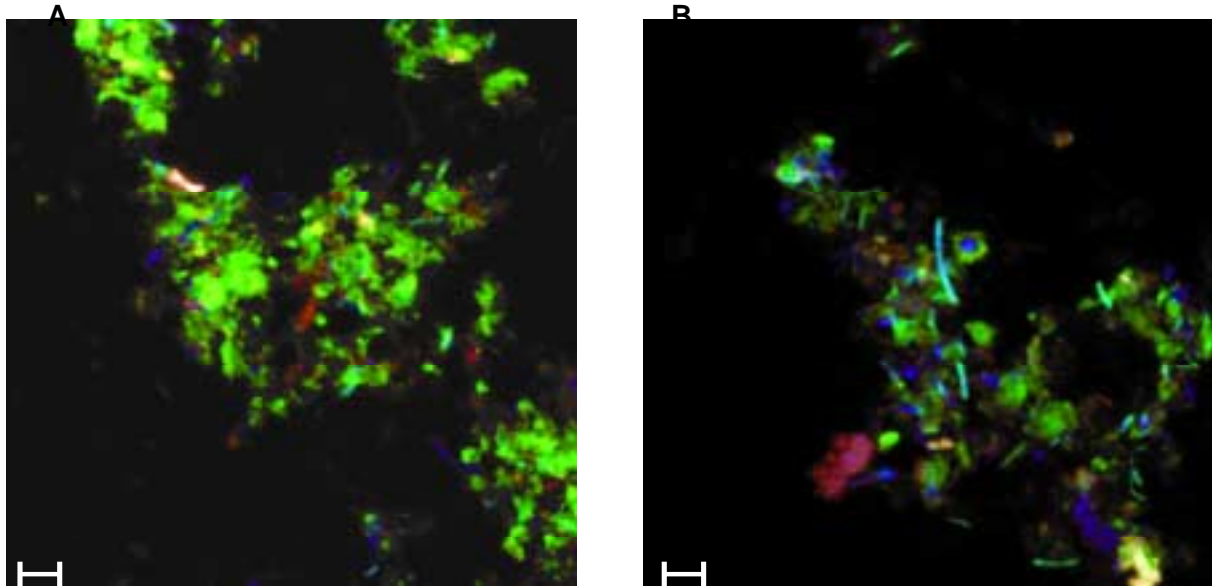
**Tabelle 11:** Vergleich des 16S RNA Gehalts von inkubiertem Stroh, mit dem 16S RNA Gehalts von inkubiertem, gestomachertem Stroh.

Inkubationszeit [d]	16S rRNA von Stroh [ng/g Feuchtgewicht]	16S rRNA von gestomachertem Stroh [ng/g Feuchtgewicht]	Anteil der 16S rRNA die vom Stroh abgelöst wurde [%]
8	2340	159	93
28	5700	1080	81

Der aus der Stomacherbehandlung resultierende "PBS-Zellextrakt" enthielt jedoch neben den Zellen immer noch kleinere Stroh- und Erdpartikel, die durch ihre Autofluoreszenz vor allem im grünen Kanal Zellen verdecken konnten. Diese Autofluoreszenz wurde durch eine Behandlung mit Toluidinblau (Smith und McCully, 1978) weiter reduziert. In Abbildung 11 sind zwei "PBS-Zellextrakt"-Präparate dargestellt. Dabei wurde das linke Präparat (A) nicht mit Toluidinblau behandelt, während das rechte Präparat (B) vor der Hybridisierung behandelt wurde.



Durch die Reduktion der Autofluoreszenz im rechten Präparat (B) ist es hier möglich, Einzelzellen zu zählen und somit die Populationen zu quantifizieren.



**Abbildung 11:** "Ganz-Zell"-Hybridisierung von fixierten Zellen, die durch eine Stomacherbehandlung von Stroh nach 8 Tagen Inkubation abgelöst wurden ("PBS-Zellextrakt"), ohne (A) und mit (B) der Behandlung der Probe mit Toluidinblau. Beide Proben wurden mit zwei 16S rDNA-Sonden hybridisiert: mit der Sonde Eub338, die spezifisch für die Domäne *Bacteria* ist und mit dem Farbstoff FITC (grün) markiert war, und mit der Sonde Clost I, die das Cluster I der Gattung *Clostridium* detektiert und mit dem Farbstoff DAPI (blau) markiert war.

#### 1.4.2 Anteil der dominanten phylogenetischen Gruppen an der Gesamtheit der aktiven bakteriellen Populationen

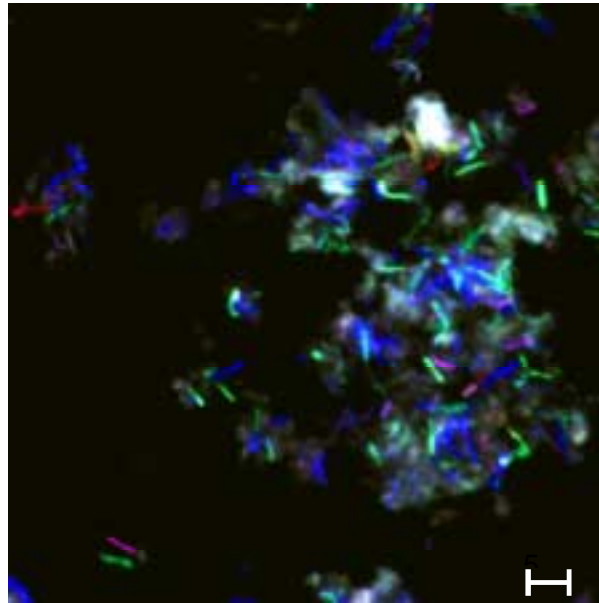
Die Quantifizierung der bakteriellen Populationen wurde an "PBS-Zellextrakt"-Präparaten durchgeführt, die zuvor mit Toluidinblau behandelt worden waren. Das Stroh für die Herstellung dieser Präparate war für 8 Tage oder für 4 Wochen anoxisch in Bodenaufschlämmungen in Serumflaschen inkubiert worden. Die gesamte Anzahl an Zellen (aktive und inaktive) wurde durch die Markierung mit DAPI bestimmt und der Gehalt an aktiven Zellen durch die Markierung mit der 16S rRNA-Sonde Eub338. In den Präparaten von Stroh, das für 8 Tage inkubiert wurde, konnten  $61 \pm 16\%$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n \geq 10$ ) aller Zellen mit der Eub338-Sonde detektiert werden, während dieser Wert in den Präparaten von 4 Wochen inkubiertem Stroh auf  $17 \pm 7\%$  zurückging. Eine Behandlung der Präparate mit Lysozym (Amann *et al.*, 1995) brachte dabei keine Verbesserung der Detektierbarkeit.

Die Zusammensetzung der aktiven Populationen wurde mit verschiedenen gruppenspezifischen 16S rRNA-Sonden (Tabelle 7) in Relation zu den aktiven Zellen (Sonde Eub338) bestimmt (Abbildung 12, 13). Für die Gattung *Clostridium* wurden insgesamt fünf 16S rRNA-Sonden eingesetzt. Davon wurden vier Sonden aufgrund der erhaltenen Sequenzen aus den Klonbibliotheken neu formuliert. Die Sonde Clost III wurde entwickelt, um die Reisfeldisolate FCB90-1, FCB90-2, FCB45 (Chin *et al.*, 1999a) und RCell1 (Chin *et al.*, 1998), die dem Cluster III zugeordnet werden, detektieren zu können (Abbildung 13). Diese Sonde wies außerdem keine Fehlpaarung zu 7 weiteren Sequenzen des Clusters III auf, die in der ARB-Datenbank (Maidak *et al.*, 1996) verfügbar waren. In Abbildung 13 ist eine "Ganz-Zell"-Hybridisierung zu sehen, bei der die Sonde Clost III (grün) gemeinsam mit den Sonden Clost I (rot) und Eub338 (blau) eingesetzt wurde. Mit der Sonde Clost IV konnte das Cluster IV nachgewiesen werden. Die Sonde zeigte zusätzlich Sequenzidentitäten zu einigen Bakterien der Gattungen *Eubacterium*, *Chlorobium* und *Rhodothermus*.

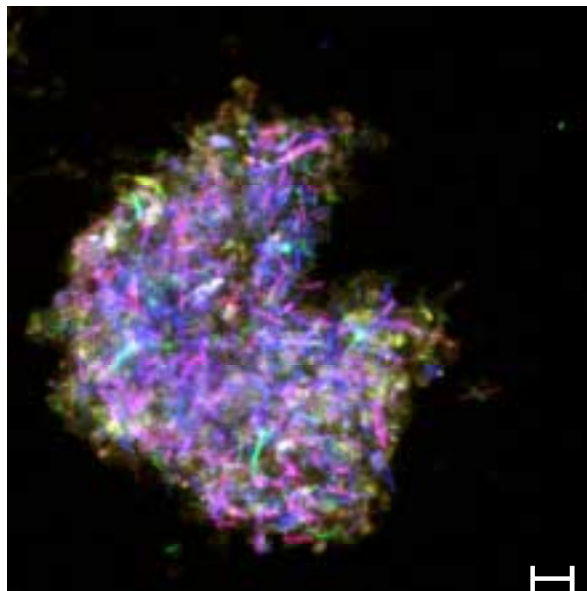
Für das Cluster XIVa der Clostridien wurden drei Sonden entwickelt, durch die eine Quantifizierung dieses Clusters inklusive der Klone RSa32 und RSb40 aus den Klonbibliotheken (Abbildung 10) möglich war (Abbildung 12). Die Detektionsbereiche dieser drei Sonden sind in Tabelle 12 dargestellt: die Detektionsbereiche der Sonden Clost XIVa-c und Clost XIVa-amino überlagern sich dabei bei dem Isolate *C. aminovalericum*.

**Tabelle 12:** Detektionsbereiche der 16S rRNA-Sonden, die für das Cluster XIVa entwickelt wurden.

16S rRNA Sonde	Detektionsbereich
Clost XIVa	25 Sequenzen des Clusters XIVa jedoch ohne die Klone RSa32 und RSb40
Clost XIVa-c	Klone RSa32 und RSb40 <i>C. polysaccharolyticum</i> , <i>C. herbivorans</i> , <i>C. aminovalericum</i>
Clost XIVa-amino	<i>C. aminovalericum</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. celerecrescens</i>



**Abbildung 12:** "Ganz-Zell"-Hybridisierung von fixierten Zellen, die durch eine Stomacherbehandlung von Stroh nach 8 Tagen Inkubation abgelöst wurden ("PBS-Zellextrakt"). Die Probe wurde mit drei 16S rRNA-Sonden gleichzeitig hybridisiert:  
 Eub338: Domäne *Bacteria* (CY5, blau)  
 ClostXIVa: Cluster XIVa der Clostridien (CY3, rot)  
 ClostXIVa-c: spezifisch für die Klonsequenzen RSa32 und RSb40 (FITC, grün)  
 Die Überlagerung der Sonden Eub338 und ClostXIVa ergibt eine rosafarbene, die Überlagerung der Sonden Eub338 und ClostXIV-c eine türkise Markierung der Zellen.

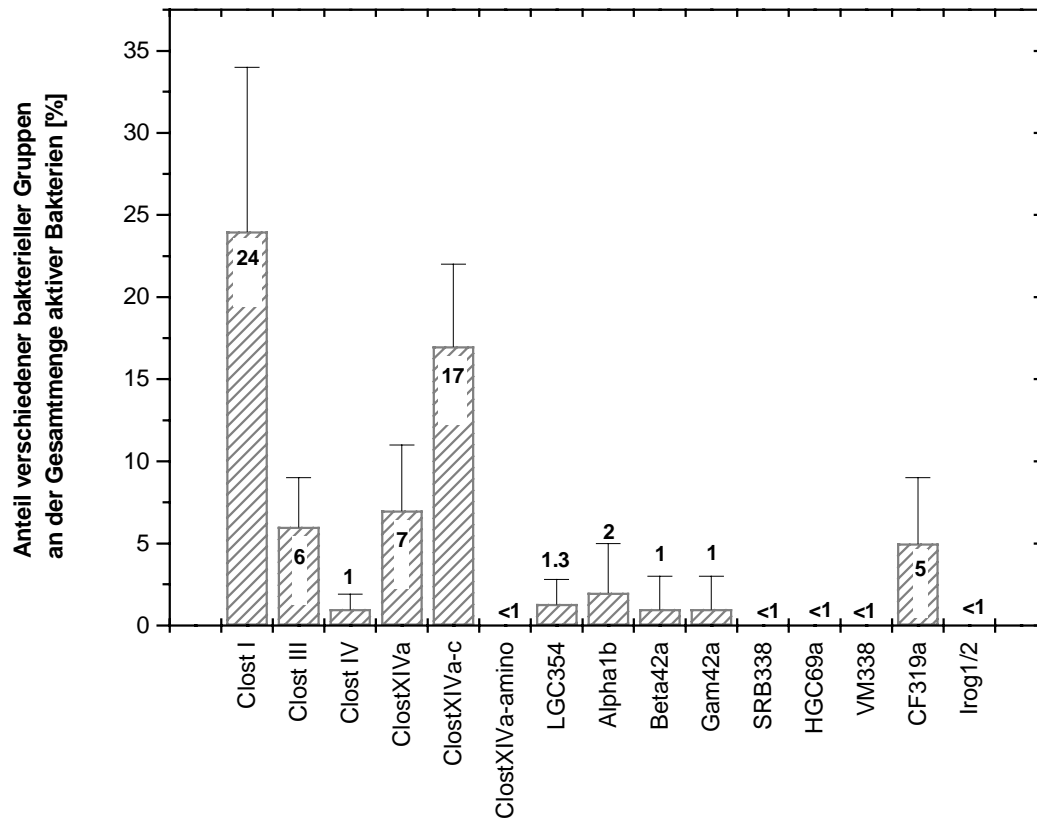


**Abbildung 13:** "Ganz-Zell"-Hybridisierung von fixierten Zellen, die durch eine Stomacherbehandlung von Stroh nach 8 Tagen Inkubation abgelöst wurden ("PBS-Zellextrakt"). Die Probe wurde mit drei 16S rRNA-Sonden gleichzeitig hybridisiert:  
 Eub338: Domäne *Bacteria* (CY5, blau)  
 Clost I: Cluster I der Clostridien (CY3, rot)  
 Clost III: Cluster III der Clostridien (FITC, grün).  
 Die Überlagerung der Sonden Eub338 und Clost I ergibt eine rosafarbene Markierung, die Überlagerung der Sonden Eub338 und Clost III eine türkise Markierung.

In den Proben aus Stroh, das 8 Tage inkubiert worden war, konnten folgende phylogenetische Gruppen detektiert und quantifiziert werden (Abbildung 14): Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt (Clostridien und Bacillen),  $\alpha$ -  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* und das *Cytophaga-Flavobacterium* Cluster des CFB-Phylums. Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt,  $\delta$ -*Proteobacteria*, die "Division" *Verrucomicrobium* und die *Holophaga-Acidobacterium*-Gruppe konnten jedoch nicht gefunden werden. Insgesamt wurden 61% aller aktiven Zellen mit den eingesetzten gruppenspezifischen Sonden näher bestimmt.

Besonders das Cluster I mit  $24 \pm 10\%$  und das Cluster XIVa der Clostridien waren sehr dominant. Der Anteil des Cluster XIVa setzte sich dabei aus der Summe der Anteile der beiden Sonden Clost XIVa ( $7 \pm 4\%$ ) und Clost XIVa-c ( $17 \pm 5\%$ ) zusammen. Mit der Sonde Clost XIVa-amino konnten weniger als 1% der aktiven Zellen detektiert werden. Dem Cluster III der Clostridien konnten  $6 \pm 3\%$  der aktiven Bakterien zugeordnet werden. Andere phylogenetische Gruppen trugen nur mit einem geringen Anteil zu den aktiven Bakterien bei. Dem *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster des CFB-Phylums konnten  $5 \pm 4\%$  zugeordnet werden, den  $\alpha$ -  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Proteobacteria* nur jeweils  $2 \pm 3$ ,  $1 \pm 2$  und  $1 \pm 2\%$  und der *Bacillus*-Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt ebenfalls nur  $1,3 \pm 1,5\%$ .

Da der prozentuale Anteil der detektierbaren Bakterien (Sonde Eub338) an der Gesamtzahl der Bakterien (DAPI-Färbung) in den Proben von Stroh, das 4 Wochen inkubiert worden war, sehr niedrig war, konnte eine genaue Quantifizierung der phylogenetischen Gruppen nicht durchgeführt werden. Der protentuale Anteil der meisten Gruppen an der Gesamtzahl aktiver Bakterien (Sonde Eub338) lag jedoch in der gleichen Größenordnung wie der prozentuale Anteil dieser Gruppen bei 8 Tage inkubiertem Stroh (Abbildung 14). Die Anteile des *Cytophaga-Flavobacterium*-Clusters, des Clusters I der Clostridien und der Klonsequenzen, die durch die Sonde XIVa-c detektiert wurden, sank jedoch deutlich (auf ca. 2%).

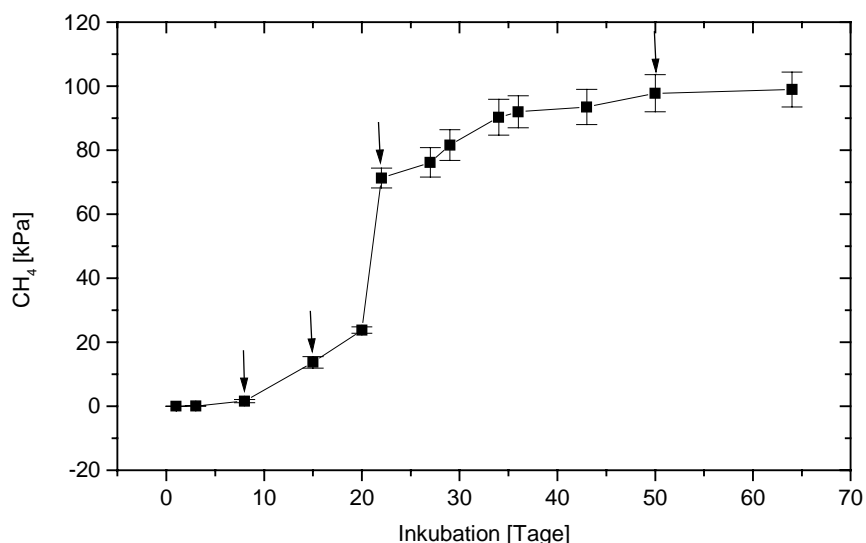


**Abbildung 14:** Prozentualer Anteil dominanter phylogenetischer Gruppen an der Gesamtzahl aktiver Zellen, die durch eine Stomacherbehandlung vom Stroh nach 8 Tagen Inkubation in anoxischer Erde abgelöst wurden. Quantifizierung mit gruppenspezifischen 16S rRNA-Sonden (Tabelle 7) bzw. mit der allgemeinen Sonde Eub338 von mindestens 600 Eub338-markierten Zellen in ca. 10 mikroskopischen Gesichtsfeldern (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 10$ ).

## 2. Anaerobe Besiedlung von Reisstroh durch *Archaea*

### 2.1 Detektion der dominanten phylogenetischen Gruppen

Anhand der Methanproduktion (Abbildung 15) in Ansätzen mit 40 g Boden und 0,5 g Stielstroh, die über einen Zeitraum von 64 Tagen gemessen wurde, wurden mehrere Zeitpunkte für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (mit Pfeilen in Abbildung 15 markiert). Der erste Zeitpunkt, an dem eine Probe für DNA-Extraktion entnommen wurde, war nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen, als die Methanemission gerade eingesetzt hatte. Eine weitere Probe wurde nach einer Inkubationszeit von 15 Tagen entnommen, in einer Phase, in der die Methanproduktion exponentiell zunahm. Als dritter Zeitpunkt wurde Tag 22 der Inkubation gewählt, als die exponentielle Phase gerade ihr Ende erreicht hatte. Die letzte Probe wurde nach 50 Tagen entnommen, als eine konstante Methanbildung erreicht war.



**Abbildung 15:** Zeitlicher Verlauf der Methanbildung [kPa] beim anoxischen Abbau von Stielstroh in Ansätzen mit 40 g Boden und 0,5 g Stroh. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die Populationen der *Archaea* durch Klonierung und Sequenzierung untersucht wurden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ ).

Von diesen Strohproben wurde die DNA extrahiert und die dominanten Populationen wurden anhand von Klonbibliotheken mit anschließender Sequenzierung bestimmt.

Die gesamte DNA von Strohproben, die 8 Tage (1 Woche), 15 Tage (2 Wochen), 22 Tage (3 Wochen) und 50 Tage (7 Wochen) inkubiert worden waren, wurde extrahiert, amplifiziert und kloniert. Zufällig ausgewählte Klone der verschiedenen Klonbibliotheken wurden anschließend sequenziert. Alle Klone mit ihren nächsten Verwandten und den durch "Distanz-Matrix"-Analyse ermittelten Ähnlichkeitswerten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13:** Phylogenetische Einordnung sämtlicher *Archaea*-Klonsequenzen und deren Ähnlichkeitswerte zu den am nächsten verwandten Isolaten und Klonen. Alle Klonsequenzen stammten von DNA, die von anoxisch inkubiertem Reisstroh extrahiert wurde.

Bezeichnung der Klone <sup>a</sup>	nahester Verwandte	Ähnlichkeitswerte <sup>b</sup> [%]
ARS1-c1, ARS1-c52, ARS1-c53, ARS1-c59, ARS1-c64, ARS1-c76, ARS1-c77, ARS2-c2, ARS2-c13, ARS2-c18, ARS2-c77, ARS3-c37, ARS3-c13, ARS3-c50, ARS7-c4, ARS7-c3	<i>Methanosarcina barkeri</i>	95-98
ARS1-c5, ARS1-c7, ARS1-c62, ARS2-c27, ARS2-c34, ARS2-c40, ARS2-c41, ARS2-c46, ARS2-c51, ARS2-c58, ARS2-c62, ARS2-c69, ARS2-c84, ARS3-c6, ARS3-c18, ARS3-c40, ARS3-c46, ARS3-c51, ARS3-c52, ARS3-c53, ARS3-c56, ARS3-c62, ARS3-c69, ARS3-c72, ARS3-c84, ARS3-c91, ARS3-c98, ARS7-c1, ARS7-c5, ARS7-c7, ARS7-c9, ARS7-c11, ARS7-c13, ARS7-c17, ARS7-c18	<i>Methanobacterium bryantii</i>	93-99
ARS1-c10, ARS1-c14, ARS1-c55, ARS1-c69	ABS 5 <sup>c</sup> ("Rice Cluster" I)	99
ARS1-c57	KBSCu1 <sup>d</sup> ( <i>Crenarchaeota</i> , "Rice Cluster" VI)	98
ARS1-c13	ABS 22 <sup>c</sup> <i>Plagyopyla nasuta</i> Symbiont	99 92

<sup>a</sup> ARS = "Archaea-Reisstroh", mit 1, 2, 3, 7= Inkubationszeit in Wochen.

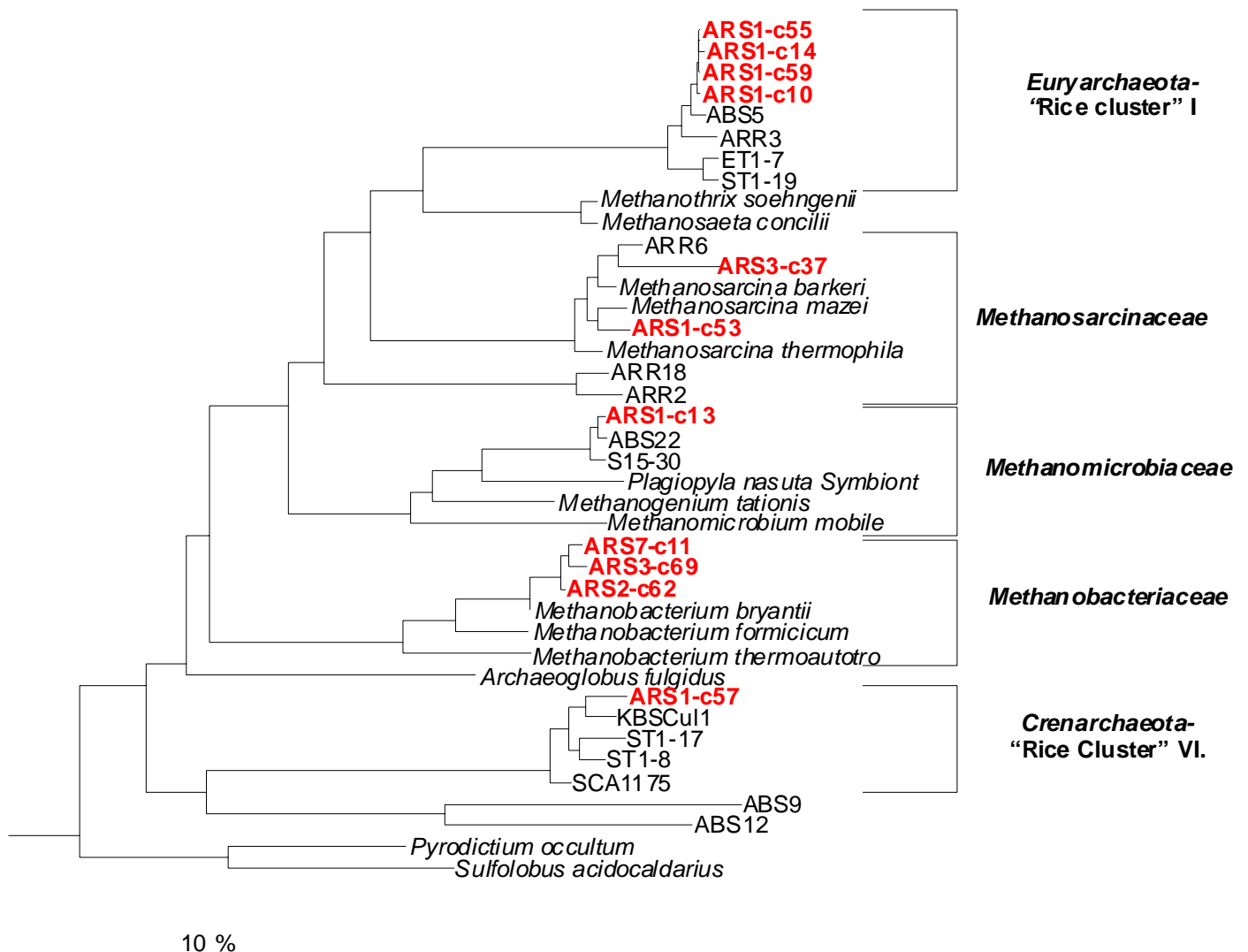
<sup>b</sup> Ähnlichkeitswerte wurden durch "Distanz Matrix"-Analysen erstellt

<sup>c</sup> Großkopf *et al.*, 1998b

<sup>d</sup> Buckley *et al.*, 1998

Insgesamt wurden 57 Klone sequenziert und phylogenetisch zugeordnet. Dabei konnten 35 Klonsequenzen der Gattung *Methanobacterium*, mit Ähnlichkeitswerten von 93 bis 99% zu *Methanobacterium bryantii*, zugeordnet werden. Weitere 16 Klonsequenzen fielen in die Gattung *Methanosarcina* und wiesen Ähnlichkeitswerte zwischen 95 und 98% zu *Methanosarcina barkeri* auf. Von den verbleibenden 7 Klonen zeigten die Klone ARS1-c10, ARS1-c14, ARS1-c55 und ARS1-c69 sehr hohe Ähnlichkeiten (99%) zu dem Klon ABS 5 (Großkopf *et al.*, 1998b), der von DNA aus Reisfeldboden stammte. Dieser Klon bildet zusammen mit weiteren beschriebenen Klonsequenzen (Großkopf *et al.*, 1998b, Chin *et al.*, 1999b) das neue "Rice Cluster" I der *Euryarchaeota*. Ein weiterer Klon (ARS1-c57) fiel ebenfalls in ein neu beschriebenes Cluster, und zwar in das "Rice Cluster" VI (Großkopf *et al.*, 1998b, Chin *et al.*, 1999b) der *Crenarchaeota*. Dabei fand sich der nahestete Verwandte in dem Klon KBSCu1 (Buckley *et al.*, 1998), der von DNA aus landwirtschaftlich genutzter Erde stammte. Der letzte Klon (ARS1-c13) zeigte nahe Verwandtschaft zu dem Klon ABS 22 (Großkopf *et al.*, 1998b), der wiederum von DNA von Reisfeldboden stammte. Beide Klone konnten phylogenetisch einem methanogenen Symbionten des anaeroben Ciliaten *Plagyopyla nasuta* zugeordnet werden (Ähnlichkeitswert: 99%). Eine genaue Analyse anhand eines phylogenetischen Baumes ist für einige repräsentative Klonsequenzen in Abbildung 16 dargestellt.





**Abbildung 16:** Phylogenetisches Dendrogramm der ARS ("Archaea-Reis-Stroh")-Klone, die aus der Klonierung der gesamten SSU rDNA der *Archaea* stammten. Der Baum zeigt die Verwandtschaft der Klonsequenzen zu Mitgliedern der Domäne *Archaea*. Mehrere Klon- und Isolatsequenzen, die von Großkopf *et al.*, 1998a, b (ABS und ARR-Sequenzen), Chin *et al.*, 1999b, Chin *et al.*, 1999c (ET-, ST- und S-Sequenzen) und Buckley *et al.*, 1998 (KBSCul1), Bintrim *et al.*, 1997 (SCA1175) beschrieben wurden, wurden der verwendeten Datenbank hinzugefügt. Die phylogenetische Analyse bezog sich ausschließlich auf den DNA-Abschnitt zwischen Position 165 und 865 (Brosius *et al.*, 1978). Zur Rekonstruktion des Baums wurde die "Neighbor-joining"-Methode verwendet. Mutationsraten wurden mit dem "Jukes-Cantor"-Modell (Jukes und Cantor, 1969) korrigiert. Für hochvariable Regionen wurde ein Invarianzkriterium von 50% festgelegt. Der Maßstab entspricht 10% Nukleotidaustausch. Um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen wurde die SSU rRNA Sequenz von *Aquifex pyrophilus* verwendet.

## 2.2 Zeitlicher Verlauf der Besiedlung von Reisstroh durch *Archaea*

Der zeitliche Verlauf der Besiedlung von anoxisch inkubiertem Reisstroh durch *Archaea* wurde durch terminale Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(T-RFLP)-Analysen (Liu *et al.*, 1997) auf Basis der SSU rDNA bestimmt. Dazu wurden Strohproben verwendet die 8, 15, 22, 36, 43, 50 und 57 Tage in Bodenaufschlämmungen inkubiert wurden. Die DNA dieser Proben wurde extrahiert und die SSU rRNA mit 35 PCR-Zyklen amplifiziert. Ramarishnan *et al.* (2000) konnten zeigen, daß das relative Verhältnis der einzelnen T-RFs zueinander in einem Bereich von 22 bis 44 PCR-Zyklen konstant ist. Die SSU rRNA wurde anschließend mit dem Enzym Taq I, einer Exonuklease, geschnitten. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde getestet, indem das prozentuale Verhältnis der einzelnen T-RF an der Gesamtfläche von zwei Umwelt-Proben (Probe 1 und 2) verglichen wurde, die unter den selben Bedingung für jeweils 57 Tage in getrennten Ansätzen inkubiert wurden und von denen parallel die DNA extrahiert wurde. Die Abweichungen der prozentualen Flächenbereiche der T-RFs lagen dabei zwischen 1 und 3% (Tabelle 14).

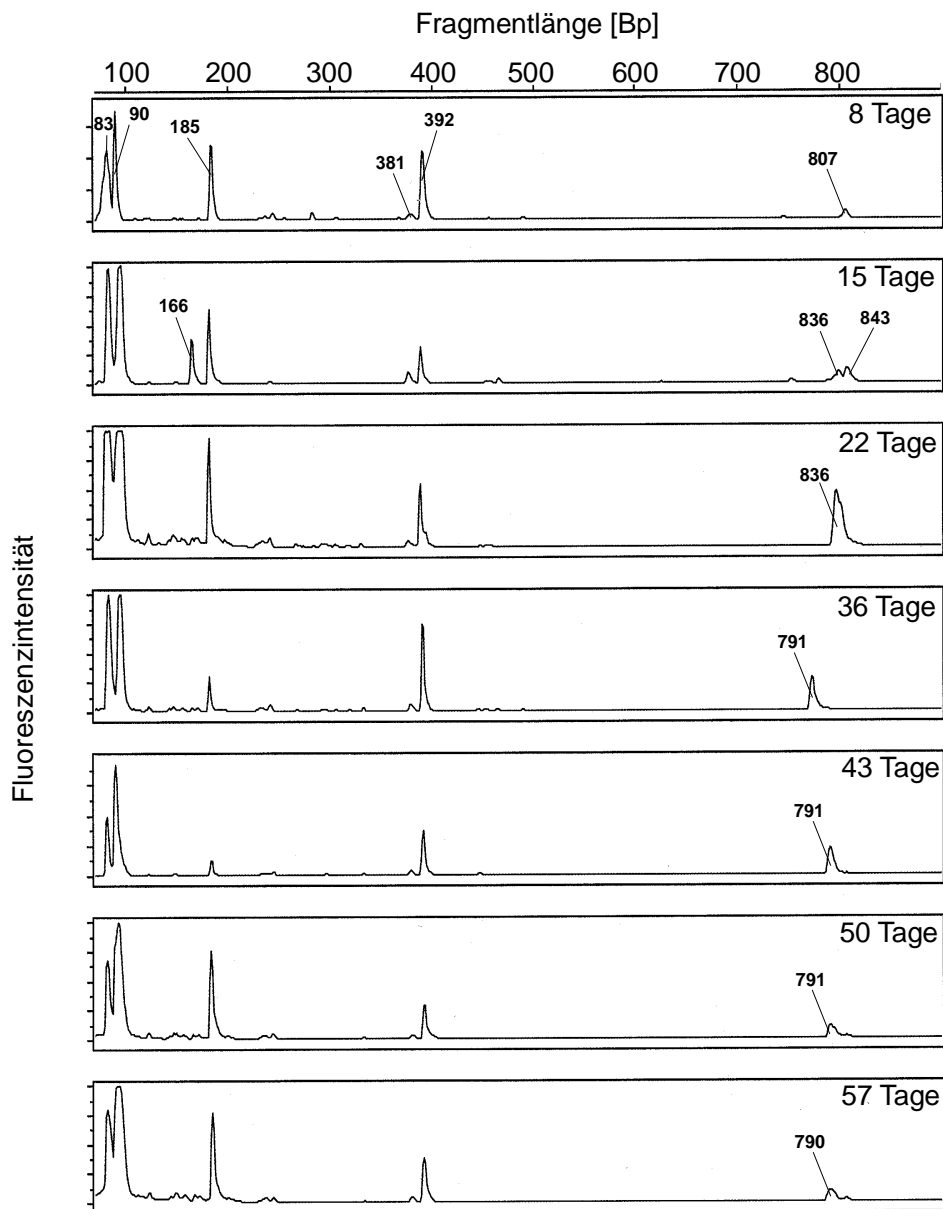
**Tabelle 14:** Vergleich der prozentualen Fläche der T-RFs zweier T-RFLP-Muster an der jeweiligen Gesamtfläche. Zwei Strohproben wurden dafür in getrennten Ansätzen für jeweils 57 Tage anoxisch in Bodenaufschlämmungen inkubiert und die DNA parallel extrahiert.

T-RF [bp]	Fläche [%] der einzelnen T-RFs	
	Probe 1	Probe 2
82 Bp	25	28
90 Bp	32	31
166 Bp	0	0
185 Bp	25	22
381 Bp	1	2
392 Bp	12	13
>700 Bp	4	5

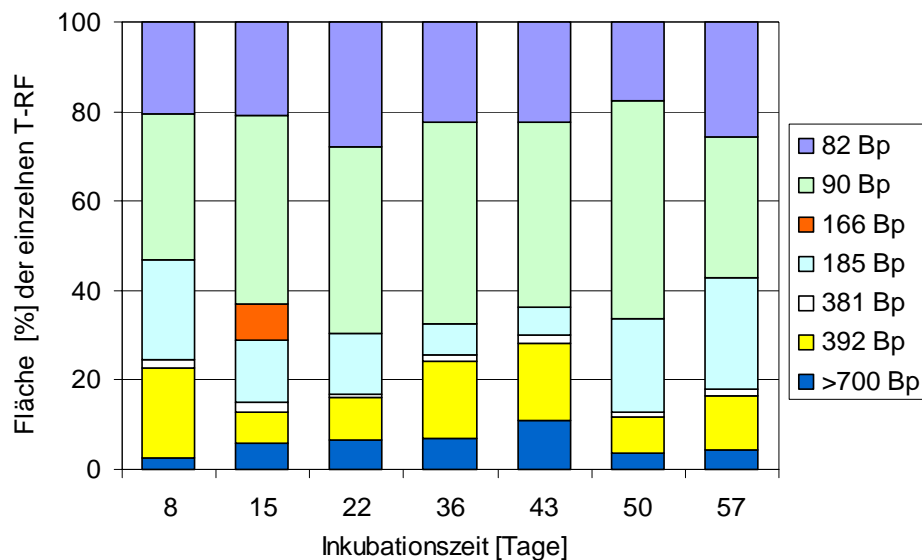
Vergleicht man die T-RFLP-Muster der verschiedenen Zeitpunkte (Abbildung 17), so fand man die T-RFs (terminale Restriktions-Fragmente) mit 83, 90, 185, 381 und 392 Bp (Basenpaare, "base pairs") in allen fünf Mustern wieder, wogegen das T-RF mit 166 Bp nur in der Probe von 15 Tage inkubiertem Stroh nachgewiesen werden konnte.

Durch die Bestimmung der T-RF der Klonsequenzen (Tabelle 13) konnten einige der T-RFs der Umwelt-DNA verschiedenen phylogenetischen Gruppen der *Archaea* zugeordnet werden. So wurde ein Klon (ARS1-c13) gefunden, der als nahesten Verwandten einen *Plagyopyla nasuta* Symbionten hatte und ein T-RF von 83 Bp aufwies. Klonsequenzen, die den Gattungen *Methanobacterium* bzw. *Methanosarcina* zugeordnet wurden (Tabelle 13), wiesen T-RFs mit 90 bzw. 185 Bp auf. Ein Klon (ARS1-c57), der dem "Rice Cluster" VI zugeordnet wurde, hatte ebenfalls ein T-RF mit 185 Bp. Klone, die phylogenetisch in das "Rice Cluster" I fielen, hatten die Schnittstelle für die Exonuklease bei 392 Bp. Die T-RFs mit 166 und 381 Bp konnten bisher keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden. In allen Proben konnten auch relativ lange Fragmente von 791 - 843 Bp gefunden werden (Abbildung 17). Es ist bekannt, daß das *Crenarchaeota*-"Rice-Cluster" IV (Chin *et al.*, 1999b) auch Fragmente mit einer Länge >700 Bp bildet. Auch SSU rRNA-Fragmente, die nach der Amplifikation mit dem Primerpaar 109f und 934r nicht durch das Enzym Taq I geschnitten wurden, weisen Fragmentlängen in diesem Bereich auf.

Betrachtet man den prozentualen Flächenanteil der einzelnen T-RF an der Gesamtfläche der Fragmente im Laufe der Inkubation, so war der Anteil der T-RFs mit 83 Bp (18 – 28%), 381 Bp (1 – 2%) und > 700 Bp (3 – 11%) zu allen Zeitpunkten relativ gleich (Abbildung 18). Das T-RF mit 90 Bp war in den Proben ab 15 Tage Inkubationszeit mit 32 – 49 % dominant. In der 8-Tage-Probe dagegen lag es mit 30% im gleichen Bereich wie das T-RF mit 392 Bp. Veränderungen der prozentualen Anteile während der Inkubationszeit waren hauptsächlich zwischen den T-RFs 185 Bp und 392 Bp zu erkennen. In den Proben mit Inkubationszeiten von 15, 22, 50 und 57 Tagen dominierte das T-RF mit 185 Bp (mit jeweils 14, 13, 21 und 25%) gegenüber dem T-RF mit 392 Bp (7, 9, 8 und 12%). In den Proben mit 36 und 43 Tagen Inkubationszeit dagegen war der Anteil des T-RFs mit 185 Bp (je 7 und 6%) kleiner als der T-RFs mit 392 Bp (17%). In der 8-Tage-Probe waren die beiden T-RFs mit 23 und 30% relativ gleich.



**Abbildung 17:** T-RFLP-Analysen der SSU rRNA der *Archaea*-Populationen, die am anoxischen Abbau von Reisstroh beteiligt sind, über einen Inkubationszeitraum von 8 - 57 Tagen. Im ersten T-RFLP-Muster von Stroh, das 8 Tage inkubiert worden war, sind die Längen der T-RFs in Basenpaaren [Bp] angegeben. In den restlichen Mustern wurden nur T-RFs gekennzeichnet, die von denen im ersten Muster abweichen.



**Abbildung 18:** Prozentualer Flächenanteil der einzelnen T-RFs an der Gesamtfläche der SSU rRNA, die durch T-RFLP-Analysen bestimmt wurde (Abbildung 17). Reisstroh wurde dazu anaerob für 8 - 57 Tage in Bodenaufschlämmungen inkubiert, die DNA extrahiert, mit *Archaea*-spezifischen Primern amplifiziert und mit dem Enzym Taq I geschnitten.

### 2.3 Quantifizierung der dominanten methanogenen Populationen durch "Northern-Blot"-Hybridisierung

Hybridisierungen der 16S rRNA von präparierten Zellen ("Ganz-Zell"-Hybridisierung, Kapitel III 1.4) mit 16S rRNA Sonden ließen sich gut für verschiedene Bakteriengruppen durchführen. Zur Quantifizierung der *Archaea* war diese Methode jedoch nicht geeignet, da nur sehr wenige Zellen in einem Präparat mit *Archaea*-spezifischen Sonden markiert werden konnten. Daher wurde zur quantitativen Untersuchung der *Archaea*-Populationen die gesamte RNA extrahiert und die archaeale SSU rRNA (small subunit) durch "Northern-Blot"-Hybridisierung quantifiziert. Die Experimente wurden mit folgenden Proben durchgeführt, die jeweils für eine Woche oder für vier Wochen anoxisch in Serumflaschen inkubiert worden waren:

- Stroh, das gemeinsam mit Erde inkubiert worden war (Stroh, Kapitel II 4.2);
- Erde, in der das Stroh inkubiert worden war (Erde, Kapitel II 4.1);
- "PBS-Zellextrakt" mit Zellen, die mechanisch von Stroh abgelöst wurden (Kapitel II 4.3).

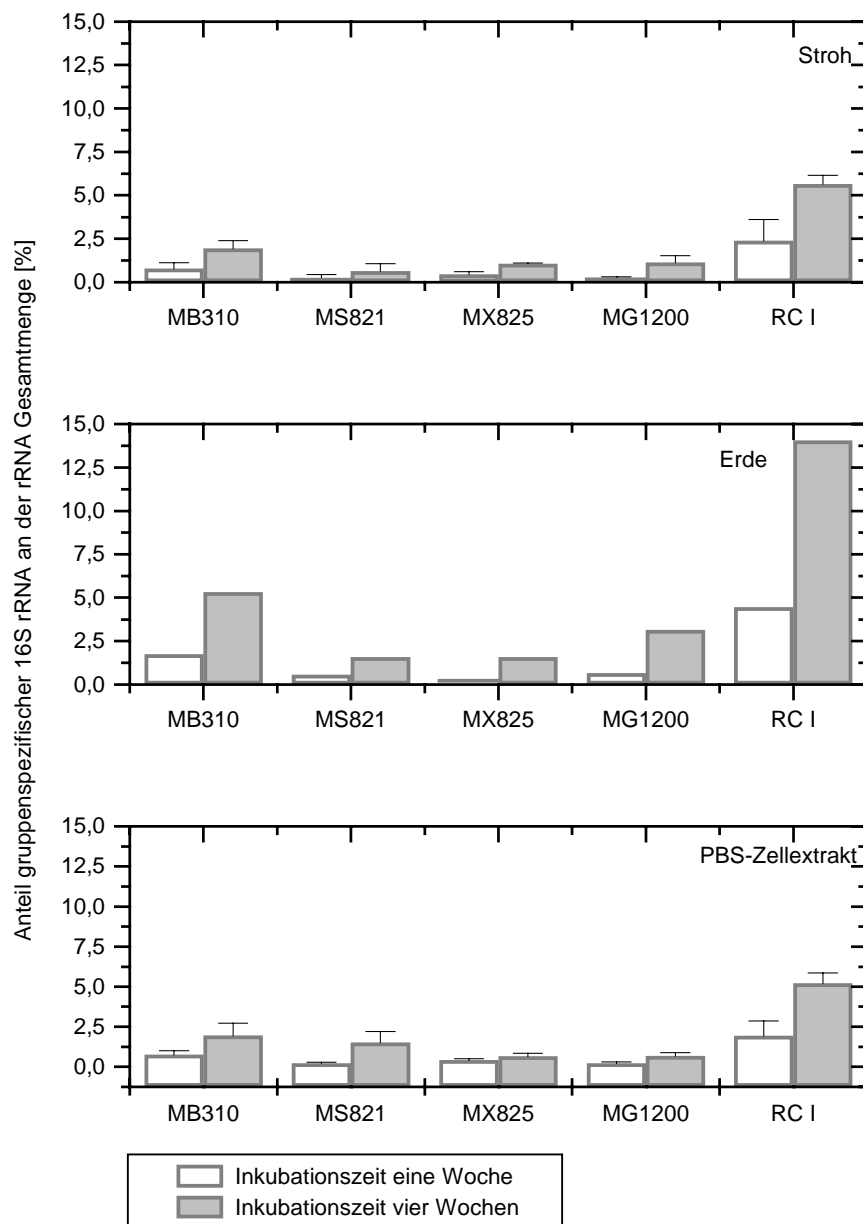
Für die Werte von Stroh und "PBS-Zellextrakt" gilt jeweils  $n=2$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Für Erde gilt  $n=1$ , da die RNA-Ausbeute der Erde sehr gering war, die

Quantifizierung aller Gruppen jedoch mit derselben RNA-Fraktion durchgeführt werden sollte.

Für alle drei Proben ließ sich eine prozentuale Zunahme aller getesteten *Archaea*-Gruppen während der Inkubationszeit von 4 Wochen feststellen, wobei in der Erdprobe die Anteile aller methanogenen Gruppen zu beiden Inkubationszeitpunkten größer waren, als in den beiden anderen Proben (Abbildung 19). Die Ordnung *Methanobacteriales* (Sonde MB310) und das "Rice Cluster" I (Sonde RCI) bildeten sowohl nach 1 Woche als auch nach 4 Wochen Inkubationszeit die Hauptgruppen der methanogenen *Archaea* (Abbildung 19). Die Anteile der *Methanobacteriales* bezogen auf die Gesamtmenge detektierter Mikroorganismen (Sonde Univ1392) nahm am Stroh von  $0,8 \pm 0,3\%$  auf  $1,9 \pm 0,5\%$  zu, in der Erde von  $1,7\%$  auf  $5,3\%$  und im "PBS-Zellextrakt" von  $0,7 \pm 0,2\%$  auf  $1,9 \pm 0,8\%$ . Die Anteile des "Rice Clusters" I erhöhte sich am Stroh von  $2,4 \pm 1,2\%$  auf  $5,6 \pm 0,5\%$ , in der Erde von  $4,4\%$  auf  $14,1\%$  und im "PBS-Zellextrakt" von  $1,9 \pm 0,9\%$  auf  $5,2 \pm 0,7\%$ .

Die drei weiteren getesteten Gruppen trugen geringfügig zu der Menge detektierter methanogener Gruppen bei, ihre Anteile an der Gesamtmenge detektierter rRNA stieg jedoch ebenfalls während der Inkubationszeit (Abbildung 19). Die Menge detektierter SSU rRNA der Gattung *Methanosarcina* (Sonde MS 821) stieg am Stroh von  $0,3 \pm 0,2\%$  auf  $0,6 \pm 0,4\%$ , in der Erde von  $0,5\%$  auf  $1,6\%$  und im "PBS-Zellextrakt" von  $0,2 \pm 0,1\%$  auf  $1,5 \pm 0,7\%$ . Der Anteil der Gattung *Methanosaeta* (Sonde MX825) stieg am Stroh von  $0,4 \pm 0,1\%$  auf  $1,1 \pm 0,04\%$ , in der Erde von  $0,4\%$  auf  $1,6\%$  und im "PBS-Zellextrakt" von  $0,4 \pm 0,1\%$  auf  $0,6 \pm 0,2\%$ . Zuletzt wurde noch der Anteil der Gattung *Methanogenium* und dessen Verwandte (Sonde MG1200) bestimmt. Dabei stiegen die Werte am Stroh von  $0,3 \pm 0,01\%$  auf  $1,1 \pm 0,4\%$ , in der Erde von  $0,6\%$  auf  $3,1\%$  und im "PBS-Zellextrakt" von  $0,2 \pm 0,1\%$  auf  $0,6 \pm 0,2\%$ .

Berechnet man den prozentualen Anteil aller getesteten methanogenen Gruppen an der Menge detektierbarer *Archaea* (Sonde Arc915), so konnten am Stroh nach 1 Woche Inkubationszeit 43% und nach 4 Wochen 42% näher bestimmt werden. In der Erde war dieser Anteil nahezu gleich, mit 45% nach 1 Woche und 46% nach 4 Wochen. Im "PBS-Zellextrakt" war er dagegen etwas niedriger, mit 38% nach 1 Woche und 37% nach 4 Wochen Inkubationszeit.



**Abbildung 19:** Prozentualer Anteil verschiedener methanogener Gruppen an der gesamten Menge detektierbarer rRNA. Die Signale folgender gruppenspezifischer SSU rRNA-Sonden wurden in Relation zu dem Signal der Sonde Univ1392 gesetzt, die *Bacteria* und *Archaea* detektiert: MB310 (*Methanobacteriales*), MS821 (*Methanosarcina*), MX825 (*Methanosaeta*), MG1200 (*Methanogenium*-Verwandte), RC I ("Rice Cluster" I). Für die Quantifizierung wurden verschiedene Proben aus dem Inkubationsansatz entnommen: Stroh, das anoxyisch in Bodenaufschlämmungen inkubiert worden war, Erde, in der Stroh inkubiert worden war, und der "PBS-Zellextrakt", der aus der Stomacherbehandlung des Strohs resultierte. Für Stroh und den "PBS-Zellextrakt" gilt  $n=2$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, für Erde  $n=1$ .

### 3. Anteil der bakteriellen und archaealen 16S rRNA an der Gesamtmenge der 16S rRNA

Mit "Northern-Blot"-Hybridisierungen konnten auch die Anteile von *Bacteria* und *Archaea* an den gesamten mikrobiellen Populationen bestimmt werden. Wie unter Kapitel III 2.3 beschrieben, wurden die Proben Stroh, Erde und "PBS-Zellextrakt" verwendet, die jeweils von Erde bzw. Stroh stammten, die für 1 Woche oder 4 Wochen inkubiert worden waren.

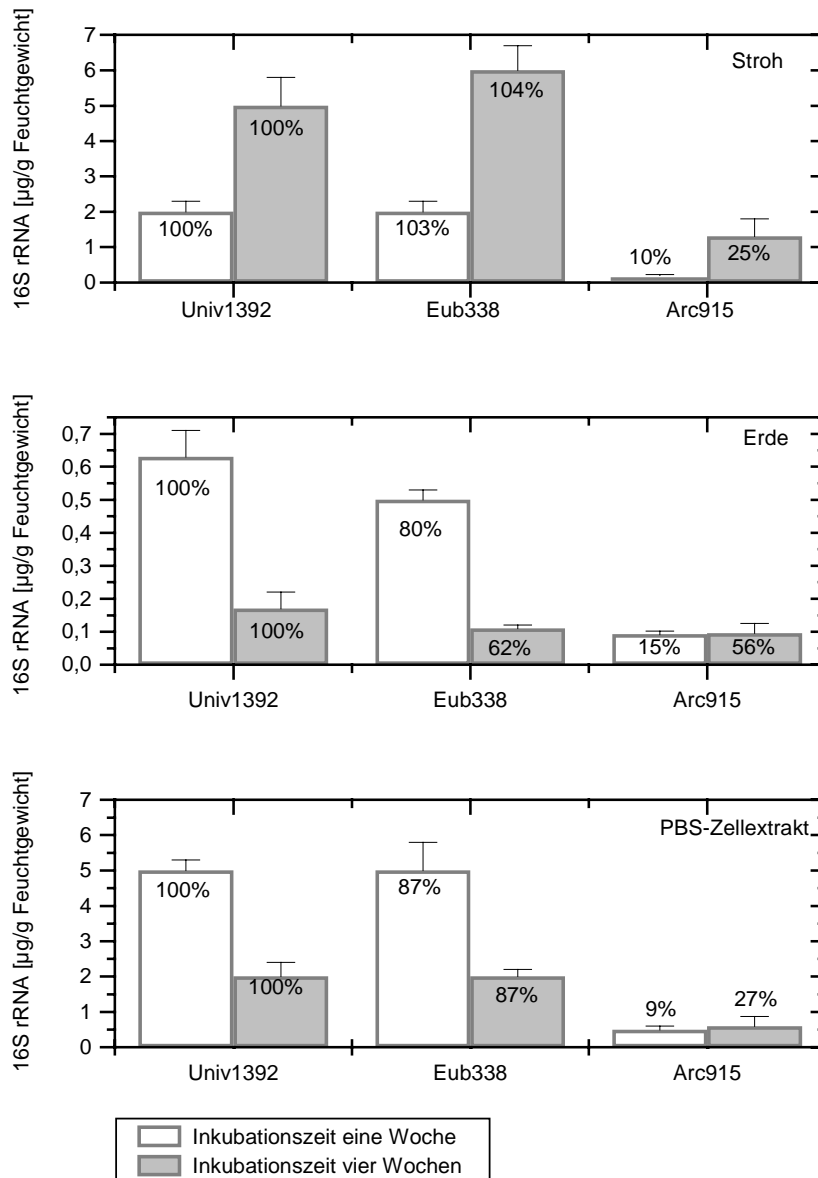
Vergleicht man die Anteile der *Bacteria* und *Archaea* an der gesamten Menge detektierter ribosomaler RNA (Univ1392), so läßt sich feststellen, daß die Bakterien zu beiden Inkubationszeiten und in allen Proben den größten Teil der Populationen bildeten (Abbildung 20). Am Stroh konnten für *Bacteria*  $103 \pm 16\%$  nach 1 Woche und  $104 \pm 13\%$  nach 4 Wochen Inkubationszeit detektiert werden. Die Werte für *Bacteria* in der Erdprobe lagen bei  $80 \pm 4\%$  für 1 Woche und  $62 \pm 8\%$  für 4 Wochen Inkubationszeit und für das "PBS-Zellextrakt" bei  $87 \pm 15\%$  für 1 Woche und  $87 \pm 7\%$  für 4 Wochen Inkubationszeit. Betrachtet man die Werte der *Archaea* so war vor allem auffällig, daß der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge der rRNA mit zunehmender Inkubationszeit stark anstieg (Abbildung 20). Vor allem in der Erde stieg der *Archaea*-Anteil von  $15 \pm 2\%$  nach einer Inkubationszeit von 1 Woche auf  $56 \pm 20\%$  nach 4 Wochen Inkubation. In den anderen beiden Proben war der Anstieg ebenfalls sehr deutlich. Am Stroh stieg der prozentuale Anteil der *Archaea* von  $10 \pm 1\%$  auf  $25 \pm 8\%$ , im "PBS-Zellextrakt" von  $9 \pm 2\%$  auf  $27 \pm 13\%$  während der vierwöchigen Inkubationszeit.

Vergleicht man die absoluten Werte der verschiedenen Gruppen zu beiden Inkubationszeitpunkten (Abbildung 20), so konnte man am Stroh eine deutliche Anreicherung der bakteriellen und archaealen 16S rRNA im Laufe der Inkubationszeit beobachten. Die Gesamtmenge an detektierter rRNA [ $\mu\text{g}$ ] pro g Feuchtgewicht (FG) stieg von  $2 \pm 0,3 \mu\text{g}$  um ca. 200% auf  $5 \pm 0,8 \mu\text{g}$ . Die Menge bakterieller 16S rRNA stieg dabei von  $2 \pm 0,3 \mu\text{g}$  auf  $6 \pm 0,7 \mu\text{g}$  (um ca. 200%) und die Menge archaealer SSU rRNA von  $0,2 \pm 0,02 \mu\text{g}$  auf  $1,3 \pm 0,5 \mu\text{g}$  (um ca. 550%) pro g Feuchtgewicht an.

In der Erdprobe dagegen nahm die Gesamtmenge an mikrobieller rRNA stark ab. Während nach 1 Woche  $0,63 \pm 0,08 \mu\text{g}$  pro g FG detektierbar waren, konnten nach 4 Wochen nur noch ca. 27% ( $0,17 \pm 0,05 \mu\text{g}$ ) nachgewiesen werden. Dabei nahm ausschließlich die Menge an bakterieller 16S rRNA von  $0,50 \pm 0,03 \mu\text{g}$  auf  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}$  pro g FG ab. Die Menge der SSU rRNA der *Archaea* blieb mit  $0,092 \pm 0,01 \mu\text{g}$  und  $0,095 \pm 0,03 \mu\text{g}$  pro g FG relativ konstant. Im "PBS-Zellextrakt" nahm ebenfalls die Gesamtmenge an mikrobieller rRNA pro g



FG ab (von  $5 \pm 0,3 \mu\text{g}$  auf  $2 \pm 0,4 \mu\text{g}$ ), sowie die Menge an bakterieller 16S rRNA (von  $5 \pm 0,8 \mu\text{g}$  auf  $2 \pm 0,2 \mu\text{g}$ ). Die Menge an archaealer SSU rRNA stieg dagegen leicht an (von  $0,49 \pm 0,11 \mu\text{g}$  auf  $0,59 \pm 0,28 \mu\text{g}$ ).



**Abbildung 20:** Gehalt an detektierter *Bacteria*-16S rRNA (Sonde Eub338) und *Archaea*-SSU rRNA (Sonde Arc915) in  $\mu\text{g}$  pro g Feuchtgewicht und in Prozent im Vergleich zur Gesamtmenge mikrobieller 16S rRNA (Sonde Univ1392). Für die Quantifizierung wurden verschiedene Proben aus dem Inkubationsansatz entnommen: Stroh, das anoxisch in Bodenaufschlämmungen inkubiert worden war, Erde, in der Stroh inkubiert worden war, und der "PBS-Zellextrakt", der aus der Stomacherbehandlung des Strohs gewonnen wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 2$ ).

## IV) Diskussion

Der vollständige anaerobe Abbau von Reisstroh ist eine Kette vieler Einzelprozesse, in die verschiedene physiologische Gruppen von Mikroorganismen involviert sind. Parallel zu einer prozeß-orientierten Studie (Glissmann und Conrad, 2000) wurde in dieser Arbeit die Struktur und Entwicklung der Lebensgemeinschaft untersucht, die anoxisch inkubiertes Reisstroh besiedelte.

### 1. Limitierungen der verwendeten molekularbiologischen

#### Methoden

Die Untersuchung der mikrobiellen Populationen erfolgte mit molekularbiologischen Methoden. Dazu wurde die gesamte DNA extrahiert und die 16S rDNA amplifiziert. Anschließend wurden die Fragmente kloniert und sequenziert oder durch Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) bzw. Terminale-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP) untersucht. Diese Methoden eignen sich gut, um einen Überblick über die Populationen zu erhalten und dominante Gruppen phylogenetisch einzuordnen. Sie garantieren jedoch nicht die Detektion aller phylogenetischen Gruppen und erlauben auch keine quantitativen Aussagen über dieselben. Die Extraktion der DNA hängt z. B. stark von dem verwendeten Extraktionsprotokoll ab (Frostegård *et al.*, 1999). Um die DNA zu erhalten, muß die Zellhülle möglichst aller Mikroorganismen zerstört werden. Der Aufbau der Zellhülle ist jedoch bei verschiedenen Organismengruppen sehr unterschiedlich. Gram-positive Bakterien, die einen dicken Mureinsacculus besitzen, benötigen eine viel rauere Behandlung, z. B. mit Ultraschall, als Gram-negative Bakterien, deren Zellwand nur aus 1 bis 2 Mureinschichten besteht. Die DNA von Zellen, die durch die Behandlung nicht lysieren, steht für weitere Analysen nicht zur Verfügung. Extreme Isolationsbedingungen führen dagegen bei vielen Gram-negativen Bakterien zu einer starken Fragmentierung der DNA, wodurch Artefakte während der Amplifikation der 16S rDNA entstehen können (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Eine komplexe Lebensgemeinschaft wie diejenige, die am anaeroben Abbau von organischem Material, z. B. Stroh, beteiligt ist, besteht jedoch aus vielen verschiedenen Populationen (Stams, 1994; Neue und Roger, 1994). Somit muß ein Weg gefunden werden, möglichst alle Zellen aufzuschließen, ohne die DNA zu sehr zu zerstören. Für die Extraktion der DNA von Reisstroh besiedelnden Populationen wurde ein Protokoll ausgewählt, das speziell für Bodenmikroorganismen entwickelt wurde (Smalla *et al.*, 1993). Dazu wurden lyophilisierte, gefrorene Zellen gemörsert und anschließend durch 3 Einfrier-Auftau-Zyklen aufgeschlossen. Die DNA Gram-positiver Bakterien sollte durch eine

Lysozymbehandlung zugänglich gemacht werden. Eine weitere Lysetechnik, die Behandlung der Zellen mit Ultraschall, wurde in dieser Arbeit nicht angewendet. Frostegård *et al.* (1999) testeten den Einfluß solch einer Behandlung auf die extrahierte DNA-Menge und fanden, daß sich diese nur bei einem von fünf getesteten Böden deutlich erhöhte.

Die Amplifizierung der 16S rDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) birgt weitere Fehler. Es ist z. B. bekannt, daß die Menge an produzierter 16S rDNA von verschiedenen Faktoren, wie z. B. der Genomgröße, der Anzahl der 16S rRNA-Gene einer Zelle, der Primerwahl und der Anzahl der Amplifikationszyklen abhängt (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki und Giovannoni, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997). Über den Einfluß verschiedener Klonierungsverfahren ist bisher wenig bekannt. Es wird jedoch als unwahrscheinlich angenommen, daß alle 16S rDNA Sequenzen mit der gleichen Effizienz in den Klonierungsvektor eingebaut werden (von Wintzingerode *et al.*, 1997; Lueders und Friedrich, 2000). Die Auswahl der Klone, die letztendlich in die Sequenzanalyse eingehen, erfolgt meist zufällig und beschränkt sich auf einen Teil aller erhaltenen Klone. In dieser Arbeit wurden für *Archaea* 57 Klone ausgewählt. Für *Bacteria* wurde zum einen die 16S rDNA von 15 DGGE-Banden phylogenetisch zugeordnet, zum anderen wurden 40 Klone der Klonbibliotheken weiter untersucht. Die Anzahl der Klone ist ausreichend, um die dominanten phylogenetischen Gruppen zu detektieren. Organismengruppen, die jedoch in sehr geringen Zellzahlen vertreten sind oder deren Sequenzen durch PCR und Klonierung unterrepräsentiert werden, sind unter Umständen mit diesen Methoden nicht nachweisbar. Durch die oben erwähnten möglichen Fehler kann es somit zu einem verzerrten Bild der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft kommen.

Die DGGE- und T-RFLP-Methoden eignen sich gut, um Veränderungen einer Populationsstruktur zu detektieren, die sich in einem veränderten DGGE-Bandenmuster bzw. einem unterschiedlichen Muster der terminalen Restriktionsfragmente (T-RF) zeigen (Engelen *et al.*, 1998; Lukow *et al.*, 2000). Die 16S rDNA-Fragmente verschiedener Mikroorganismen zeigen jedoch nicht immer ein unterschiedliches Laufverhalten in einem DGGE-Gel bzw. verschieden lange T-RFs. So kann man einer Bande bzw. einem T-RF nicht zwingenderweise nur eine 16S rDNA Sequenz zuordnen (Engelen *et al.*, 1998; Head *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1999b). Werden die Banden eines DGGE-Gels ausgestochen und die 16S rDNA-Fragmente direkt amplifiziert und sequenziert, so besteht die Gefahr, eine Mischung verschiedener 16S rDNA-Fragmente zu sequenzieren. Um diesen Fehler zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit die 16S rDNA-Fragmente der ausgestochenen Banden zuerst zwischenkloniert und anschließend die 16S rDNA der Klone sequenziert, die dasselbe Laufverhalten zeigten wie die 16S rDNA der Original-Banden. So konnte sichergestellt werden, daß die erhaltenen Sequenzen jeweils einer Population zugeordnet werden konnten. Bei der T-RFLP-Methode ist eine direkte Analyse der terminalen Fragmente nicht

möglich. Die T-RFs können verschiedenen Organismengruppen nur durch einen Vergleich der Schnittmuster der Umwelt-DNA mit dem Schnittmuster der Klonsequenzen zugeordnet werden, wobei die phylogenetische Position der Klonsequenzen bestimmt werden muß. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere nicht detektierbare Mikroorganismen das selbe T-RF besitzen.

Für eine quantitative Aussage ist es somit notwendig, direktere, PCR-unabhängige Methoden zu verwenden. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) und die "Northern-Blot"-Hybridisierung verwendet. Diese Methoden erfordern weder eine Amplifizierung noch eine Klonierung der 16S rDNA-Fragmente. Für "Northern-Blot"-Hybridisierung muß jedoch die gesamte RNA extrahiert werden, was wiederum die gleichen Fehlerquellen beinhalten kann wie die Extraktion der DNA. Für die Extraktion der RNA in dieser Arbeit wurde ein Protokoll von Lüdemann *et al.* (2000) verwendet, das speziell für Bodenmikroorganismen entwickelt worden ist. Die Zellen wurden dabei mechanisch mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator aufgeschlossen. Diese Behandlung wurde zweimal durchgeführt, wobei sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Behandlung der Überstand, der die Nukleinsäuren der lysierten Zellen enthält, entnommen wurde. Nukleinsäuren von leicht lysierenden Zellen wurden somit entfernt, bevor sie durch die weitere Behandlung zu stark fragmentierten, wogegen Nukleinsäuren von Zellen mit fester Zellwand eventuell nach der zweiten Homogenisierung für die anschließenden Analysen zugänglich wurden.

In dieser Arbeit sollte durch "Northern-Blot"-Hybridisierung der prozentuale Anteil verschiedener phylogenetischer Gruppen an der gesamten Menge der Mikroorganismen bestimmt werden. Die Quantifizierung erfolgte anhand der 16S rRNA-Eichgeraden einer Reinkultur der jeweils zu bestimmenden Organismengruppe. Der RNA-Gehalt der Reinkulturen wurde einheitlich, anhand eines *E.coli*-Standards mit bekannter RNA-Konzentration, durch "Northern-Blot"-Hybridisierungen mit einer universellen Sonde (Univ1392) bestimmt. Zur Quantifizierung der verschiedenen Gruppen mußten jedoch spezifische Sonden verwendet werden, was wiederum Auswirkungen auf das Hybridisierungssignal haben könnte. Für die Quantifizierung von *Bacteria* wurde *E. coli* als Standard verwendet, für *Archaea Methanobacterium bryantii*. Um zu überprüfen, ob sich die Signalintensität bei gleicher RNA-Konzentration der Reinkulturen durch die Hybridisierung mit den Sonden Eub338 und Arc915 unterscheidet, wurden die Steigungen der Eichgeraden verglichen. Diese waren nahezu identisch.

Für FISH ist die Permeabilisierung der Zellhüllen ein kritischer Schritt, womit der 16S rRNA-Sonde die Diffusion in die Zellen ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurden die Zellen dafür über eine Ethanolreihe entwässert. Um die Diffusion der Sonden in die Zellen Gram-positiver Bakterien zu verbessern, schlugen Amann *et al.* (1995) eine Lysozymbehandlung vor. Die

Mureinschicht wird dadurch enzymatisch gespalten und die 16S rRNA-Sonde kann in die Zellen hinein diffundieren. Diese Behandlung hatte jedoch keinen Einfluß auf die Reisstroh abbauenden Populationen. Der Anteil an detektierbaren aktiven Zellen war mit und ohne Lysozymbehandlung gleich. Sekiguchi *et al.* (1999) berichteten über einen zusätzlichen Einfrier-Auftau-Zyklus, der notwendig war, um Mitglieder der Gattung *Methanobacterium* detektieren zu können. Doch auch diese Methode brachte keine Verbesserung bei der Detektion von *Archaea*, die am Abbau von Reisstroh beteiligt sind.

Bei beiden Methoden, "Northern-Blot"-Hybridisierung und FISH, können die 16S rRNA-Moleküle mit gruppenspezifischen Sonden hybridisiert und detektiert werden. Bei "Northern-Blot"-Hybridisierungen läßt sich der Gehalt an RNA jedoch nicht mit einer bestimmten Zellzahl korrelieren (Amann *et al.*, 1998). Das Signal kann sich sowohl aus vielen Zellen mit geringen Aktivitäten als auch aus wenigen Zellen mit sehr hohen Aktivitäten zusammensetzen. Bei FISH hingegen werden nur Zellen detektiert, die einen Ribosomengehalt haben, der ein gewisses Detektionslimit überschreitet. Die Zellen können dann lokalisiert und gezählt werden. Der RNA-Gehalt korreliert dabei direkt mit dem physiologische Zustand der Zelle (Amann *et al.*, 1995). Oda *et al.* (2000) fanden, daß dabei weniger die Wachstumsraten der Zellen eine Rolle spielte, als vielmehr deren Versorgung mit Substraten. Zellen, die sich im Hungerzustand befanden, waren nach 20 Tagen nicht mehr detektierbar.

Während bei "Northern-Blot"-Hybridisierungen nur die reine extrahierte RNA untersucht wird, nimmt bei FISH auch das Habitat, in dem sich die Zellen befinden, Einfluß auf die Detektierbarkeit. Oft überdeckt eine starke Autofluoreszenz des Hintergrundes das spezifische Sondersignal und macht somit eine Detektion und Quantifizierung der Bakterien unmöglich (Amann *et al.*, 1995). In dieser Arbeit stellte vor allem die Autofluoreszenz des Strohs und der Erdpartikel ein Problem dar, das durch die Extraktion der Mikroorganismen vom Stroh mit einem Stomacher teilweise gelöst werden konnte. Die Zellen wurden in Puffer gesammelt und durch Zentrifugation aufkonzentriert ("PBS-Zellextrakt"). Die Effizienz der Stomacherbehandlung wurde mit "Northern-Blot"-Hybridisierungen getestet. Dazu wurde der RNA-Gehalt von inkubiertem Stroh vor der Stomacherbehandlung und der RNA-Gehalt von inkubiertem Stroh nach der Stomacherbehandlung bestimmt und daraus der Anteil an Zellen berechnet, der durch die Behandlung vom Stroh abgelöst werden konnte (Tabelle 11). Es zeigte sich, daß bei Stroh, das 1 Woche inkubiert worden war, ca. 90% und bei Stroh das 4 Wochen inkubiert worden war, ca. 80% der gesamten RNA nach der Stomacherbehandlung vom Stroh abgelöst waren und somit im "PBS-Zellextrakt" für die weiteren Untersuchungen ("Ganz-Zell"-Hybridisierung) zur Verfügung standen. Selbst nach der Extraktion war die Autofluoreszenz im "PBS-Zellextrakt" durch verbleibende Stroh- und Erdpartikel noch sehr intensiv, so daß eine zusätzliche Behandlung mit Toluidinblau (Smith

and McCully, 1978) angeschlossen wurde. Nach dieser Behandlung war die Autofluoreszenz soweit reduziert, daß auch Einzelzellen mit einem schwächeren Hybridisierungssignal detektiert werden konnten und somit eine Quantifizierung möglich war (Abbildung 11).

In dieser Arbeit wurden die oben beschriebenen Methoden kombiniert. Durch DGGE, T-RFLP und Sequenzierung konnten Veränderungen in der Populationsstruktur nachgewiesen und die dominanten, phylogenetischen Gruppen der Mikroorganismen detektiert werden, die am Abbau von Reisstroh beteiligt sind. Durch die erhaltenen Sequenzinformationen konnten außerdem neue 16S rRNA-Sonden entwickelt werden, die in Kombination mit bereits beschriebenen 16S rRNA-Sonden eine Quantifizierung der bakteriellen Populationen ermöglichte. Die archaealen Populationen wurden mit "Northern-Blot"-Hybridisierungen quantifiziert.

## **2. Gemeinschaft der *Bacteria*, die am anoxischen Abbau von Reisstroh beteiligt ist**

Alle verwendeten Methoden (DGGE, Klonierung, "Ganz-Zell"-Hybridisierung) zeigten, daß die Reisstroh abbauende bakterielle Lebensgemeinschaft hauptsächlich aus Mitgliedern der Gattung *Clostridium* bestand. Diese Gattung ist eine physiologisch sehr heterogene Gruppe, die aus anaeroben, Gram-positiven, stäbchenförmigen Bakterien besteht, die in der Lage sind, Endosporen zu bilden. Viele Schritte des komplexen Abbauprozesses von Stroh zu dem Endprodukt Methan können durch eine der vielen *Clostridium*-Arten ausgeführt werden. Basierend auf phylogenetischen Sequenzanalysen entwickelten Collins *et al.* (1994) eine Einteilung der Gattung *Clostridium* und verwandter Mikroorganismen in 19 taxonomische Cluster. Einige dieser Cluster können dabei auch durch bestimmte Stoffwechselwege charakterisiert werden, wie z. B. das Cluster VI der Clostridien, das aus homoacetogenen Bakterien besteht, oder das Cluster X, das aus saccharolytischen Mitgliedern gebildet wird.

Der erste Schritt in der Methanbildung aus Reisstroh ist die Hydrolyse der Biopolymere Hemicellulose, Cellulose und Lignin in ihre Monomere durch hydrolytische Enzyme, wie z. B. Cellulasen. Es ist bekannt, daß das Cluster III der Clostridien aus 8 Arten besteht, die solche Enzyme produzieren (Collins *et al.*, 1994). Lamed *et al.* (1993) konnten z. B. in *C. thermocellum* einen Multiproteinkomplex, das Cellulosom, nachweisen. Bayer *et al.* (1996) berichteten, daß es sich dabei um einen extrazellulären Enzymkomplex handelt, der sich an das Substrat binden und Cellulose abbauen kann. Sequenzdaten und Hybridisierungsexperimente in dieser Arbeit konnten zeigen, daß das Cluster III der Clostridien tatsächlich in den Abbauprozess von Reisstroh involviert ist. Mit der 16S rRNA-Sonde Clost III, die spezifisch für dieses Cluster ist, konnten mit "Ganz-Zell"-

Hybridisierungen 6% aller aktiven Bakterien detektiert werden (Abbildung 13, 14). Das Stroh war dafür 8 Tage anoxisch in Bodenaufschlammungen inkubiert worden. Auch in anoxischen Reisfeldboden ist das Cluster III der Clostridien Bestandteil der bakteriellen Lebensgemeinschaft. Chin *et al.* (1998, 1999a) isolierten aus Reisfeldboden die Stämme RCell1, FCB45, FCB90-1 und FCB90-2 die dem Cluster III zugeordnet werden. Der erste Stamm wurde dabei aus Anreicherungskulturen mit Cellulose, die anderen drei aus MPN-Studien ("most-probable-number") mit Filterpapier aus Cellulose als Substrat gewonnen. Hengstmann *et al.* (1999) klonierten DNA, die aus Reisfeldboden extrahiert worden war und fanden 3 Klonsequenzen die zu Mitgliedern des Clusters III der Clostridien verwandt waren. Cellulolytische *Clostridium*-Arten gibt es auch in anderen Clustern der Clostridien. Das Cluster XIVa besteht größtenteils aus Arten, die Kohlenhydrate verwerten können. Einige davon sind auch in der Lage, Polysaccharide fermentativ abzubauen. *C. populeti* z. B. kann Cellulose, Hemicellulose und Pektin vergären (Hippe *et al.*, 1992). Der Stamm XB90, der aus Reisfeldboden isoliert wurde, kann Xylan, Pektin und andere Kohlenhydrate verwerten (Chin *et al.*, 1999a). Drei der Klone (RSD7, RSa32, RSb40), die in dieser Arbeit sequenziert wurden, waren zu *C. populeti* und dem Isolat XB90 verwandt (Tabelle 10). Auch von Hengstmann *et al.* (1999) wurden 3 Klonsequenzen bei der Analyse von Reisfeldboden-DNA gefunden, die eine sehr nahe Verwandtschaft zu dem Isolat XB90 aufwiesen (Ähnlichkeitswerte > 94%). Hybridisierungsexperimente mit drei 16S rRNA Sonden mit unterschiedlichen Spezifitäten für das Cluster XIVa ergaben einen hohen prozentualen Anteil (24%) dieses Clusters an allen aktiven Bakterien (Abbildung 12, 14). Die Annahme liegt deshalb nahe, daß Mitglieder dieses Clusters aktiv in den anaeroben Abbauprozess der Kohlenhydrate involviert sind, die bei anaeroben Abbau von Reisstroh freigesetzt werden. Bei der Untersuchung der Kontrollprobe, in der Stroh nur in Puffer inkubiert worden war, wurde ein Klon detektiert, der zu dem Cluster IV der Clostridien gehörte. Dieses Cluster besteht aus den 3 Isolaten *C. leptum*, *C. cellulosi* und *C. sporosphaeroides* (Collins *et al.*, 1994). Von diesen Isolaten kann *C. cellulosi* ebenfalls Cellulose hydrolysieren (Rainey *et al.*, 1993). Mit einer spezifischen Sonde für diese Cluster konnte jedoch nur 1% aller Bakterien detektiert werden. Auch in den anderen Proben, in denen Stroh in Erde inkubiert worden war, konnte dieses Cluster nicht nachgewiesen werden. Es ist somit anzunehmen, daß das Cluster IV beim anaeroben Abbau des Reisstrohs eine untergeordnete Rolle spielt.

Nach der Hydrolyse der Polysaccharide werden die Monomere vergoren. Glissmann und Conrad (2000) fanden, daß Reisstroh während der ersten 15 Tage der Inkubation hauptsächlich zu H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, Acetat, Propionat, Butyrat und Caproat abgebaut wurde. Im weiteren Verlauf der Inkubation waren Acetat und Propionat die Hauptprodukte der Fermentation. Die DGGE-Muster der 16S rRNA von DNA, die von unterschiedlich lange inkubiertem Reisstroh extrahiert wurde (Abbildung 8), zeigten ebenfalls die auffälligsten

Änderungen während der ersten 15 Tage der Inkubation. Im Gegensatz dazu bildete die 16S rDNA der bakteriellen Populationen von Tag 15 bis 71 ein sehr stabiles DGGE-Muster. Mögliche Kandidaten für die Fermentation der Produkte des Strohabbaus sind Mitglieder des Clusters I der Clostridien. Dieses Cluster ist physiologisch sehr heterogen und besteht aus saccharolytischen und proteolytischen Arten. Phylogenetisch ist dieses Cluster jedoch gut definiert mit Ähnlichkeitswerten über 90% (Collins *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnten 14 der sequenzierten Klone dem Cluster I der *Clostridien* zugeordnet werden (Tabelle 10, Abbildung 13, 14). 10 Klone hatten dabei Ähnlichkeitswerte über 98% zu beschriebenen Mitgliedern dieses Clusters, im Speziellen zu *C. quinii* (1 Klon, Svensson *et al.*, 1992), *C. acetobutylicum* (6 Klone, Kreis *et al.*, 1995), "*C. favosporum*" (1 Klon, Collins *et al.*, 1994), *C. magnum* (1 Klon, Schink, 1984) und *C. saccharoperbutylacetonicum* (1 Klon, Kreis *et al.*, 1995). Aufgrund der sehr hohen Ähnlichkeiten kann angenommen werden, daß die Klonsequenzen die jeweils verwandten *Clostridium*-Arten repräsentieren (Devereux *et al.*, 1990; Stackebrandt und Goebel, 1994) und denselben metabolischen Abbauweg ausüben. *C. quinii*, *C. acetobutylicum* und *C. magnum* vergären z. B. Kohlenhydrate zu verschiedenen Fettsäuren. Quantifizierungsexperimente zeigten ebenfalls, daß Clostridien des Cluster I mit 24% sehr aktiv am Abbauprozess von Reisstroh beteiligt waren (Abbildung 13, 14). Auch bei der Analyse von Reisfeldboden konnte das Cluster I der Clostridien nachgewiesen werden. Die Isolate VeCb10 aus MPN-Studien, mit Cellobiose als Substrat, und RPec1 aus Anreicherungskulturen, mit Pektin als Substrat, wurden diesem Cluster zugeordnet (Chin *et al.* 1998, 1999a). Zusätzlich zu den Isolaten wurden 8 Klone gefunden, die ebenfalls phylogenetisch in das Clusters I der Clostridien fielen (Hengstmann *et al.*, 1999). Außer den bisher erwähnten Gruppen der Clostridien konnte in Reisfeldboden noch das Cluster IX durch das MPN-Isolat SB90 (Chin *et al.*, 1999a), der Stamm DR1/8 aus Anreicherungskulturen (Rosencrantz *et al.*, 1999) und drei DNA-Klonsequenzen (Hengstmann *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Mitglieder dieses Clusters wurden bei der Untersuchung der Reisstroh abbauenden Populationen jedoch nicht gefunden.

Neben den Clostridien besteht auch die Gattung *Bacillus* aus Mitgliedern, die in der Lage sind, Zucker, organische Säuren und Alkohole zu verwerten. Viele Bacillen produzieren extrazelluläre Enzyme, die Kohlenhydrate hydrolysieren können. Im Allgemeinen sind die Mitglieder der Gattung *Bacillus* fakultativ aerob. Kürzlich wurde von Chin *et al.* (1999a) aus anoxischem Reisfeldboden ein Stamm isoliert (SB45), der der Gattung *Bacillus* zugeordnet wurde. Auch zahlreiche Klonsequenzen von DNA, die aus Reisfeldboden extrahiert wurde, konnten Mitgliedern der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden (Hengstmann *et al.*, 1999). Dies läßt vermuten, daß Bacillen ein wichtiger Bestandteil der Lebensgemeinschaft in Reisfeldboden sind. Zwei Klonsequenzen, die in dieser Arbeit erhalten wurden, konnten "*Bacillus pseudomegaterium*" zugeordnet werden (Tabelle 10). Der Anteil an detektierbaren



Bakterien mit der *Bacillus*-spezifischen 16S rRNA-Sonde war jedoch mit 1,3% relativ gering (Abbildung 14). Es wird somit vermutet, daß anaerobe Bacillen in diesem Habitat eine wesentlich geringere Rolle spielen als Clostridien.

Neben den Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* konnten nur sehr wenige andere phylogenetische Gruppen detektiert werden (Tabelle 10). 6 Klone hatten als nahesten Verwandte Mitglieder der Gattungen *Nitrosospira* ( $\beta$ -Proteobacteria), *Fluoribacter* ( $\gamma$ -Proteobacteria), *Chlorobium* (Grüne Schwefelbakterien) und *Acidobacterium* (*Holophaga-Acidobacterium*-Gruppe). Die Ähnlichkeitswerte waren jedoch mit 77 bis 88% sehr gering, so daß keine Vermutungen über phenotypische oder metabolische Eigenschaften angestellt werden können. Auch mit "Ganz-Zell"-Hybridisierungen konnten nur insgesamt 9% aller aktiven Bakterien anderen phylogenetischen Gruppen als den Bacillen und Clostridien zugeordnet werden (Abbildung 14). Dies waren hauptsächlich *Proteobacteria* ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria, insgesamt 4%) und das *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster des CFB-Phylums (5%). Klonsequenzen und Isolate der  $\alpha$ -Proteobacteria und des CFB-Phylums konnten auch bei der Untersuchung von Reisfeldboden gefunden werden, jedoch fehlten dort  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria und die Gattung *Acidobacterium* (Chin *et al.*, 1999a; Hengstmann *et al.*, 1999). Einige phylogenetische Gruppen, wie *Verrucomicrobium* und *Actinobacteria* konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, die wiederum in anoxischem Reisfeldboden vorhanden waren (Chin *et al.*, 1999a; Hengstmann *et al.*, 1999; Lüdemann *et al.*, 2000). Die bakterielle Lebensgemeinschaft, die Reisstroh besiedelt und abbaut, unterscheidet sich somit von der Lebensgemeinschaft in anoxischem Reisfeldboden. Dieses Ergebnis wird auch durch die Studie von Glissmann und Conrad (2000) bestätigt. Dabei wurden während der ersten 15 Tage der Inkubation qualitative Unterschiede in den Fermentationsmustern von Reisfeldboden gefunden, der mit und ohne Reisstroh inkubiert worden war. Auch in anderen Habitaten hat organisches Material einen Einfluß auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Populationen. Rossello-Mora *et al.* (1999) reicherten anoxische, marine Sedimente mit organischem Material (Cyanobakterien) an und fanden durch DGGE, FISH und Sequenzanalysen deutliche Unterschiede in den Lebensgemeinschaften.

Durch "Ganz-Zell"-Hybridisierungen der mikrobiellen Populationen, die sich an 8 Tage inkubiertem Reisstroh ansiedelten, konnten 61% aller Mikroorganismen (mit DAPI markiert) auch mit der bakteriellen 16S rRNA Sonde Eub338, die spezifisch aktive Bakterien detektiert, nachgewiesen werden. Dieser Wert sank auf 17% nach einer Inkubationszeit von 29 Tagen. Der prozentuale Anteil aktiver Bakterien ist stark von dem Habitat abhängig, in dem sich die Populationen ansiedeln. In verschiedenen Untersuchungen konnten sowohl höhere als auch niedrigere Werte gefunden werden (Zarda *et al.*, 1997; Amann *et al.*, 1998; Manz *et al.*, 1999; Rossello-Mora *et al.*, 1999). Rossello-Mora *et al.* (1999) untersuchten

z. B. anoxische, marine Sedimenten, die mit Biomasse angereichert und bei einer Temperatur von 24°C für 7 oder 13 Tage inkubiert wurden. Sie fanden dabei eine Abnahme der detektierbaren, aktiven Bakterien von 45 auf 36% während der Inkubationszeit. Manz *et al.* (1999) untersuchten Biofilme in natürlichem Flußwasser und konnten 79% der DAPI markierten Zellen mit der Sonde Eub338 nachweisen. Um die Detektion der aktiven Bakterien, die am Abbau von Reisstroh beteiligt sind, zu verbessern, wurde in dieser Arbeit eine Lysozymbehandlung durchgeführt. Damit sollte die Detektion Gram-positiver Bakterien, z. B. Clostridien, sichergestellt sein (Amann *et al.*, 1995). Diese Behandlung brachte jedoch keine Verbesserung. Die Behandlung der Proben mit Toluidinblau diente ebenfalls einer besseren Detektion der Bakterien, da ein Großteil der Autofluoreszenz der Erd- und Strohpartikel so reduziert werden konnte. Trotzdem ist anzunehmen, daß die restliche Autofluoreszenz spezifische, schwache Signale der Sonde Eub338 überdeckt. Es ist auch möglich, daß beim anaeroben Abbau von Reisstroh der Anteil aktiver Bakterien niedriger ist als z. B. in aquatischen Habitaten. Besonders nach längeren Inkubationszeiten könnte eine verminderte Substratzugänglichkeit dazu führen, daß die Aktivität der Bakterien geringer und dadurch das spezifische Sondersignal schwächer wird.

Mit FISH können Einzelzellen nur detektiert werden, wenn sie ausreichend Ribosomen enthalten (Amann *et al.*, 1995). Bei "Northern-Blot"-Analysen dagegen wird die SSU rRNA aller Zellen gemeinsam detektiert, so daß auch bei einem relativ niedrigen Ribosomengehalt der Einzelzellen die Summe der SSU rRNA der einzelnen Zellen über der Detektionsgrenze liegt. Der Prozentsatz an detektierbaren Zellen mit "Ganz-Zell"-Hybridisierung sank im Laufe der Inkubationszeit. Das heißt jedoch nicht, daß auch die Gesamtzellzahl abnahm. Kimura und Tun (1999) fanden mit elektronenmikroskopischen Methoden sogar eine Zunahme der Mikroorganismen, die sich an Reisstroh während der Inkubationszeit von ca. 4 Monaten ansiedelten. Auch "Northern-Blot"-Hybridisierungen zeigten, daß der Gehalt an SSU rRNA an Reisstroh im Laufe der Inkubation zunahm. Es ist somit anzunehmen, daß die Besiedlung von Reisstroh mit einer Vermehrung der Zellzahl einhergeht, die Aktivität der Einzelzellen jedoch gleichzeitig abnimmt, so daß sie unter der Detektionsgrenze für die "Ganz-Zell"-Hybridisierung liegt. Für die Abnahme der Aktivität im Laufe der Inkubationszeit spricht auch die Abnahme der freigesetzten reduzierten Zucker nach einer Inkubationszeit von 1 bis 11 Tagen, die nach einer Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol gemessen wurden (Glissmann, Dissertation 2000). Auch eine Substratlimitierung im Laufe der Inkubationszeit, zum Beispiel durch nicht-abbaubare Polysaccharide, kann zu einer Abnahme der Aktivität der Zellen führen und dadurch zu einer verminderten Detektierbarkeit der Zellen durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung.

Ungefähr 65% der aktiven Zellen, die mit der Sonde Eub338 detektiert wurden, konnten mit gruppenspezifischen 16S rRNA Sonden näher bestimmt werden. 35% der aktiven Bakterien

konnten keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden. Insgesamt wurden 15 verschiedene 16S rRNA-Sonden verwendet, um die Zusammensetzung der aktiven Bakterien zu charakterisieren. Diese Sonden decken jedoch nicht alle phylogenetischen Gruppen ab. Die Sonde CF319a detektiert z. B. nur das *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster des *CFB*-Phylums, jedoch nicht die *Bacteroides*. Auch die Gattung *Clostridium* ist durch die verwendeten Sonden nicht vollständig abgedeckt. Nur 4 der 19 Cluster der Clostridien konnten durch die vorhandenen Sonden teilweise detektiert werden. Es ist somit möglich, daß einige der aktiven Bakterien zur anderen Clustern der Gattung *Clostridium* gehören, jedoch nicht detektiert werden konnten. Die Reisstroh abbauenden Populationen könnten auch Bakterien enthalten, die "candidate-divisions" bilden (Hugenholz *et al.*, 1998a). Dieser Begriff bezeichnet neue, bisher unentdeckte oder unbeschriebene phylogenetische Gruppen, die nur aus Sequenzdaten bestehen. In Reisfeldboden wurden kürzlich 4 "candidate divisions" entdeckt (Derakshani und Liesack, zur Veröffentlichung eingereicht). Auch im Rhizosphärenboden von Rapspflanzen konnten 11 Klonsequenzen keiner bekannten, phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden (Macrae *et al.*, 2000). Solche neuen Gruppen sind nicht mit den 16S rRNA Sonden detektierbar, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der anaerobe Abbau von Reisstroh innerhalb der *Bacteria* durch die Gattung *Clostridium* dominiert wird, hauptsächlich von den Clustern I, III und XIVa. In anderen Habitaten dagegen können andere phylogenetische Gruppen dominant sein, wie z. B. das *CFB*-Phylum in anoxischen, marinen Sedimenten (Rossello-Mora *et al.*, 1999). Andere phylogenetische Gruppen, wie *Proteobacteria*, das *CFB*-Phylum und die Gattungen *Bacillus* konnten zwar nachgewiesen werden, scheinen jedoch keinen großen Einfluß auf die Abbauprozesse zu nehmen. Die bakterielle Lebensgemeinschaft, die Reisstroh abbaut, besiedelte dieses während der ersten 15 Tage der Inkubation. Unterschiede zur Lebensgemeinschaft in anoxischen Reisfeldboden ohne die Zugabe von Reisstroh konnten ebenfalls nachgewiesen werden.

### **3. Gemeinschaft der Archaea, die am anoxischen Abbau von Reisstroh beteiligt ist**

Die Endprodukte der bakteriellen Abbauege stellen die Substrate der methanogenen *Archaea* dar, die den letzten Schritt der anaeroben Abbaukette von Reisstroh, die Bildung von Methan, ausführen. Dabei unterscheidet man zwischen Gattungen, die ausschließlich Acetat verwerten, wie die Gattung *Methanosaeta*, solche, die H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> und Formiat zu Methan reduzieren, wie z. B. *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanogenium*,

Gattungen, die Methylkomponenten (z. B. Methanol) reduzieren, wie z. B. *Methanlobus* und *Methanococcoides*, und Generalisten, die aus Acetat,  $H_2/CO_2$  und Methylkomponenten Methan bilden können, wie z. B. die Gattung *Methanosarcina* (Garcia, 1990).

Die archaeale Lebensgemeinschaft wurde durch die Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP), durch Klonierung mit anschließender Sequenzierung und durch "Northern-Blot"-Hybridisierung untersucht. Dabei zeigten die T-RFLP-Muster der SSU rRNA über einen Inkubationszeitraum von 57 Tagen kaum Unterschiede bezüglich der detektierbaren terminalen Restriktionsfragmente (T-RF). Nur in dem Muster der SSU rRNA von Stroh, das 2 Wochen inkubiert worden war, konnte ein zusätzliches T-RF mit einer Länge von 166 bp detektiert werden (Abbildung 17). Dieses Fragment konnte bisher jedoch keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden. Der Vergleich der prozentualen Flächenanteile der einzelnen T-RFs an der Gesamtfläche zeigte ebenfalls nur leichte Veränderungen im Laufe der Inkubationszeit (Abbildung 18), wobei sich lediglich das Verhältnis der T-RFs mit 185 Bp und 392 Bp zueinander änderte. In den Proben mit Inkubationszeiten von 15, 22, 50 und 57 Tagen dominierte das T-RF mit 185 Bp während in den Proben mit 36 und 43 Tagen Inkubationszeit das T-RF mit 392 Bp den größeren Anteil an der Gesamtfläche hatte. Lueders und Friedrich (2000) untersuchten die Dynamik der archaealen Populationen in anoxischem Reisfeldboden und fanden, daß auch hier die T-RFLP Muster über einen Zeitraum von 17 Tagen relativ konstant blieben. Um die T-RFs der Umwelt-DNA phylogenetischen Gruppen zuordnen zu können, wurden parallel Klonbibliotheken angelegt. Von den 57 sequenzierten Klonen konnten 35 der Gattung *Methanobacterium*, 16 der Gattung *Methanosarcina*, 4 dem "Rice Cluster" I der *Euryarchaeota*, 1 Klon dem "Rice Cluster" VI der *Crenarchaeota* zugeordnet werden und 1 Klon war nahe verwandt zu einem Symbionten des anaeroben Ciliaten *Plagyopyla nasuta* (Tabelle 13, Abbildung 16). Die Längen der T-RFs dieser Gruppen wurden schon in anderen Arbeiten bestimmt (Chin *et al.*, 1999b; Lueders und Friedrich, 2000). Auch die in dieser Arbeit sequenzierten Klone wurden mit einem Restriktionsenzym geschnitten und die Längen der T-RFs bestimmt. Durch den Vergleich der T-RFs konnten die terminalen Restriktionsfragmente der Umwelt-DNA mit den Längen 90 Bp, 185 Bp und 392 Bp hauptsächlich den Gattungen *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und dem "Rice Cluster" I zugeordnet werden. Das T-RF mit 185 Bp der Umwelt-DNA konnte außerdem einem Klon zugeordnet werden der in das "Rice Cluster" VI fällt, und das T-RF mit 82 Bp konnte einem Klon zugeordnet werden, der als nächsten Verwandten einen *Plagyopyla nasuta*-Symbionten hatte (Tabelle 13).

Weitere phylogenetische Gruppen wie die Gattung *Methanosaeta* oder die "Rice Cluster" II-V konnten in den Klonbibliotheken nicht detektiert werden, obwohl sie in Reisfeldböden gefunden wurden (Großkopf *et al.*, 1998a; Chin *et al.*, 1999b; Lueders und

Friedrich, 2000). Mitglieder der *Methanosaetaceae* werden meist durch ein T-RF von 280 Bp repräsentiert (Chin *et al.*, 1999b; Lueders und Friedrich, 2000). Dieses terminale Restriktionsfragment konnte jedoch in den T-RFLP Mustern der Umwelt-DNA nicht gefunden werden (Abbildung 17). Somit ist anzunehmen, daß *Methanosaetaceae* beim anaeroben Abbau von Reisstroh keine wichtige Rolle spielen. Für einige der "Rice Cluster" II-V konnten in anderen Arbeiten T-RFs mit unterschiedlichen Längen gefunden werden (Chin *et al.*, 1999b; Lueders und Friedrich, 2000). So kann das "Rice Cluster" II durch 389 oder 489 Bp, das "Rice Cluster" III durch 375 Bp, das "Rice Cluster" IV durch 284 Bp, 389 Bp und mehr als 700 Bp und das "Rice Cluster" V durch 74, 88 oder 280 Bp repräsentiert werden (Chin *et al.*, 1999b; Lueders und Friedrich, 2000). Die Längen der terminalen Restriktionsfragmente verschiedener Mitglieder derselben phylogenetischen Gruppe können um einige Basen variieren. Mitglieder der Gattung *Methanobacterium* zum Beispiel können T-RFs von 88 und 91 Bp aufweisen (Fey und Conrad, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000). Somit ist es möglich, daß die T-RFs mit 83, 90, 185, 381, 392 und >700 Bp der Umwelt-DNA dieser Arbeit (Abbildung 17) noch Mitgliedern der *Methanomicrobiaceae* (83 Bp), und der "Rice Cluster" II (392 Bp), III (381 Bp), IV (> 700 Bp) und V (90 Bp) zugeordnet werden können. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß Mitglieder diese phylogenetischen Gruppen auch am anaeroben Abbau von Reisstroh beteiligt sind, obwohl sie in den Klonbibliotheken nicht nachweisbar waren.

Die Quantifizierung verschiedener methanogener Gruppen durch "Northern-Blot"-Hybridisierung zeigte, daß der SSU rRNA Gehalt aller Gruppen während der 4-wöchigen Inkubationszeit zunahm (Abbildung 19). Signifikante Verschiebung der Struktur konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Das "Rice Cluster" I (Sonde RC1) und die Gruppe der *Methanobacteriales* (Sonde MB310) waren zu beiden Inkubationszeitpunkten mit 1,9 bis 14,1% bzw. 0,7 bis 5,3% an der Gesamtmenge detektierbarer SSU rRNA dominant. Die Gattungen *Methanosarcina* (Sonde MS821), *Methanosaeta* (Sonde MX825) und *Methanogenium*-Verwandte (Sonde MG1200) waren ebenfalls nachweisbar, lagen jedoch mit 0,2 bis 3,1% deutlich unter den beiden anderen Gruppen.

Mit den verwendeten Sonden konnten zwischen 37 bzw. 46% der detektierten *Archaea* (Sonde Arc915) näher bestimmt werden. Die Differenz von 54 bzw. 63% könnte dadurch zu erklären sein, daß nicht die gesamte Domäne der *Archaea* mit den verwendeten Sonden abgedeckt wird. So fehlen weitere Gruppen wie z. B. die Gattungen *Methanococcus*, *Methanlobus*, *Methanohalobium*, die "Rice Cluster" II, III und V oder die *Crenarchaeota*, denen die "Rice Cluster" IV und VI zugeordnet werden. Buckley *et al.* (1998) konnten z. B. zeigen, das nicht-thermophile *Crenarchaeota* in kultivierten Feldeböden mit einem Anteil von ca. 1,4% zu den gesamten Mikroorganismen beitragen. Zusätzlich zu bereits bekannten

Gruppen können auch bisher unbekannte Gruppen an der Methanbildung aus Reisstroh beteiligt sein.

Vergleicht man die Ergebnisse der verschiedenen Methoden, so findet man in den Klonbibliotheken und den T-RFLP-Analysen eine Dominanz der Gattung *Methanobacterium* (Tabelle 13, Abbildungen 16, 17), während quantitative "Northern-Blot"-Hybridisierungen zeigten, daß das "Rice Cluster" I den größten Anteil der SSU rRNA bildete (Abbildung 19). Die beide ersten Methoden basieren auf der Amplifizierung der SSU rRNA durch PCR, "Northern-Blot"-Hybridisierungen dagegen nicht. Es ist somit möglich, daß die SSU rDNA-Fragmente von *Methanobacterium* bevorzugt gegenüber den SSU rDNA-Fragmenten des "Rice Clusters" I amplifiziert wurden und somit die Zusammensetzung der methanogenen Populationen in Richtung *Methanobacterium* verschoben wurde. Betrachtet man die Zusammensetzung der *Archaea* zu verschiedenen Zeitpunkten, so findet man in den Klonbibliotheken und mit T-RFLP-Analysen leichte Verschiebungen, während mit "Northern-Blot"-Hybridisierungen keine deutlichen Unterschiede innerhalb der Populationen erkennbar waren. In den Klonbibliotheken dominierte zu Beginn der Inkubation (ARS1-Klone) die Gattung *Methanosarcina* (Tabelle 13), während im weiteren Verlauf (ARS2, 3 und 7-Klone) die meisten sequenzierten Klone der Gattung *Methanobacterium* zugeordnet wurden. Die Anzahl der sequenzierten Klone pro Zeitpunkt ist jedoch nicht ausreichend, um quantitative Aussagen treffen zu können. Verzerrungen der Populationsstruktur können außerdem durch den notwendigen Klonierungs- und Amplifizierungsschritt verursacht werden. Der Amplifizierungsschritt ist auch für die Untersuchung der Lebensgemeinschaft durch T-RFLP notwendig, während bei "Northern-Blot"-Analysen die RNA direkt nach der Extraktion untersucht werden kann. Somit ist die Anzahl der Zwischenschritte und damit der möglichen Fehlerquellen bei "Northern-Blot"-Hybridisierungen am geringsten.

Die in dieser Arbeit detektierten methanogenen Gruppen sind an der Bildung von Methan aus  $H_2/CO_2$  und Acetat beteiligt. Dies sind die wichtigsten Endprodukte des bakteriellen Abbaus von Reisstroh, die als Substrat für die Methanogenen dienen können. Methanol oder Formiat konnten nach der Hemmung der Methanogenese nicht detektiert werden (Glissmann und Conrad, 2000). Die Ergebnisse der Klonbibliotheken und "Northern-Blot"-Hybridisierungen lassen vermuten, daß  $H_2/CO_2$  hauptsächlich durch die Familie *Methanobacteriales* und die Gattung *Methanosarcina* verwertet wurde. Auch in Untersuchungen der *Archaea*-Populationen in Reisfeldboden konnte durch Klonbibliotheken und T-RFLP-Analysen nachgewiesen werden, daß Mitglieder der *Methanosarcinaceae* einen wichtigen Teil der methanogenen Lebensgemeinschaft darstellen (Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000). *Methanobacteriales* konnten ebenfalls detektiert werden, der Anteil dieser Gruppe an den gesamten methanogenen Populationen war jedoch in Reisfeldboden viel geringer als beim anaeroben Abbau von Stroh, der in dieser Arbeit

untersucht wurde (Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000). Die Acetat-Konzentrationen erreichten beim Abbau von Reisstroh sehr hohe Werte. Das Maximum lag bei einer Inkubationszeit von 10 Tagen bei 23,6 mM (Glissmann und Conrad, 2000). Diese Konzentration kann von den *Methanosarcina*-Arten, deren Mindestkonzentrationen für Acetat zw. 0,19 und 1,18 mM Acetat pro Liter liegt (Jetten *et al.*, 1990) problemlos verwertet werden. Nach 28 Tagen konnten noch ca. 100 µM Acetat gemessen werden (Glissmann, Dissertation 2000). Dieser Wert liegt unter dem Schwellenwert der *Methanosarcina*-Arten, könnte aber von *Methanosaeta*-Arten verwertet werden. *Methanosaeta concilii* Stamm VeAc9 z. B hat einen Acetat-Schwellenwert <10µM (Großkopf *et al.*, 1998a). In dieser Arbeit konnte die Gattung *Methanosaeta* durch "Northern-Blot"-Hybridisierungen nachgewiesen werden (Abbildung 19). Mit der Sonde MX825 wurden zwischen 0,6 und 1,6% der gesamten mikrobiellen 16S rRNA dieser Gattung zugeordnet. Fey und Conrad (2000) konnten durch T-RFLP-Analysen zeigen, daß Mitglieder der *Methanosaetaceae* in Reisfeldboden sehr dominant sind. In den Klonbibliotheken, die in dieser Arbeit untersucht wurden, war *Methanosaeta* jedoch nicht vertreten und die T-RFLP Muster wiesen kein Fragment mit der spezifischen Länge für *Methanosaeta* auf. Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, daß *Methanosaeta* nicht unbedingt notwendig für die Methanbildung in anaeroben Habitaten ist. So spielte *Methanosaeta* keine Rolle bei der Methanbildung an Reiwurzeln (Großkopf *et al.*, 1998b). Auch in Anreicherungskulturen von Cellulose-abbauenden Mikroorganismen konnten in der Kultur, die bei 30°C inkubiert worden war, keine *Methanosaeta*-verwandten Klone nachgewiesen werden (Chin *et al.*, 1999c). Joulian *et al.* (1998) fanden in 13 verschiedenen Reisbodenproben *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanoculles*-verwandte Arten, jedoch keine *Archaea* mit enger Verwandtschaft zu *Methanosaeta*. Über die Physiologie der "Rice Cluster" I-VI ist nichts bekannt, da diese Gruppen bisher ausschließlich aus Sequenzdaten bestehen. Aufgrund der phylogenetischen Position der Sequenzen des "Rice Cluster" I kann jedoch vermutet werden, daß diese Organismengruppe zu den methanogenen *Archaea* gehört (Großkopf *et al.*, 1998b). Sowohl in den Untersuchungen der Lebensgemeinschaft des Reisfeldbodens (Fey und Conrad, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000; Lueders und Friedrich, 2000) als auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das "Rice Cluster" I ein wichtiger Bestandteil der untersuchten Populationen ist.

Für die Methanproduktion beim anaeroben Abbau von Reisstroh sind somit hauptsächlich die Gattungen *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und das "Rice Cluster" I verantwortlich. Quantitative Untersuchungen zeigten, daß das "Rice Cluster" I vor *Methanobacterium* auf RNA-Ebene den größten Anteil bildete. Andere Gattungen wie *Methanosaeta*, *Methanosarcina* und *Methanogenium*-Verwandte spielten eine untergeordnete Rolle. Die

Struktur der methanogenen Gemeinschaft blieb über einen Zeitraum von 7 Wochen konstant.

#### **4. Anteil der *Bacteria* und *Archaea* an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft**

Am vollständigen anaeroben Abbau von Reisstroh zu Methan sind *Bacteria* und *Archaea* beteiligt. Um den prozentualen Anteil dieser beiden Domänen an der gesamten mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu bestimmen, wurden "Northern-Blot"-Hybridisierungen durchgeführt. Die gesamte RNA wurde dazu von den Proben Stroh, Erde und "PBS-Zellextrakt" extrahiert, die jeweils für 1 Woche oder 4 Wochen anoxisch inkubiert worden waren. Anschließend wurde die RNA mit 16S rRNA-Sonden hybridisiert, die spezifisch für *Archaea* oder *Bacteria* sind, sowie mit einer universellen Sonde, die *Archaea* und *Bacteria* detektiert (Abbildung 20). Vergleicht man die absoluten Werte der detektierten ribosomalen RNA (Sonde Univ1392) zu verschiedenen Zeitpunkten, so kann man feststellen, daß am Stroh die Werte für die gesamte 16S rRNA zunehmen, während sie in der Erde und im "PBS-Zellextrakt" abnehmen (Abbildung 20). Die Zu- bzw. -Abnahme ist hauptsächlich auf die Veränderung der bakteriellen Populationen zurückzuführen (Abbildung 20). Parallel dazu wurde eine Aufteilung der physiologischen Prozesse auf unterschiedliche Kompartimente gefunden (Glissmann, Dissertation 2000). Die Fermentation fand dabei bevorzugt am Stroh statt, während Methan in der Erdfraktion gebildet wurde. Es ist somit anzunehmen, daß gärende Bakterien sich verstärkt am Stroh ansiedelten, um dort die vorhandenen Substrate direkt zu verwerten. Der "PBS-Zellextrakt" besteht aus Zellen, die vom Stroh abgelöst wurden, somit sollte in dieser Probe ebenfalls eine Zunahme der ribosomalen RNA im Laufe der Inkubationszeit erfolgen, die Werte nahmen jedoch deutlich ab. Durch den fortschreitenden Abbau des Strohs kommt es zu einer Veränderung der Oberfläche, wodurch Mikroorganismen leichter in das Stroh eindringen können. Die durchgeführte Stomacherbehandlung zur Ablösung der Organismen vom Stroh könnte ungeeignet sein, um solche Mikroorganismen, die in das Stroh eingedrungen sind, abzulösen. Murakami *et al.* (1990) konnte für Reiswurzeln zeigen, daß die Epidermisschicht der Wurzeln mit zunehmendem Alter lockerer wurde und Zellen in diese Schicht eindringen konnten. Auch "Northern-Blot"-Hybridisierungen zeigten, daß sich nach 4 Wochen nur noch ca. 80% der Zellen vom Stroh ablösen ließen, während es nach einer Woche noch ca. 90% waren (Tabelle 11).

In allen Proben und zu beiden Inkubationszeitpunkten war der prozentuale Anteil bakterieller 16S rRNA dominant (62 bis 104%) gegenüber archaealer SSU (small subunit) rRNA (9 bis



56%), nahm jedoch in der Erdprobe ab (von 80 auf 62%), während hier der Anteil an archaealer SSU rRNA deutlich zunahm (von 15 auf 56%). Eine Zunahme der *Archaea*-SSU rRNA konnte auch in den beiden anderen Proben festgestellt werden, der Anteil bakterieller 16S rRNA blieb jedoch hier konstant (Abbildung 20). Durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung mit *Archaea*-spezifischen 16S rRNA-Sonden konnten in dem "PBS-Zellextrakt" jedoch kaum positive Signale gefunden werden, ebenso fand die Methanbildung hauptsächlich in der Erdfraktion statt. Somit kann man vermuten, daß am Stroh methanogene Populationen vorhanden, diese jedoch nicht sehr aktiv sind. Die Anzahl der *Archaea* spiegelt nicht unbedingt ihre metabolische Aktivität wider. Joulian *et al.* (1997) fanden keinen Zusammenhang zwischen der potentiellen methanogenen Aktivität und der Dichte methanogener *Archaea*. Auch Mayer und Conrad (1990) berichteten, daß die Methanproduktion nicht durch die Anzahl der Methanogenen, sondern durch das verfügbare Substrat limitiert ist. Ein Substratlimitierung von hauptsächlich Acetat und Wasserstoff kann jedoch in dieser Arbeit nicht der Grund für die fehlende Methanproduktion am Stroh sein, da diese in ausreichenden Konzentrationen vorhanden waren (Glissmann, Dissertation 2000). Durch die Freisetzung großer Mengen dieser Zwischenprodukte, wie es am Reisstroh der Fall ist, könnte es jedoch zu einer lokalen Absenkung des pH-Wertes kommen. Da methanogene *Archaea* nur in einem engen, neutralen pH-Bereich aktiv sind (Garcia, 1990), könnte diese Senkung zu einer Abnahme der Aktivität der Zellen führen. Durch den daraus resultierenden geringen Ribosomengehalt wären die Zellen auch mit FISH nicht mehr detektierbar.

Durch "Northern-Blot"-Hybridisierung konnte die Dominanz der *Bacteria* gegenüber den *Archaea* gezeigt werden. Am Stroh findet dabei eine Zunahme des 16S rRNA-Gehalts beider Gruppen während der 4-wöchigen Inkubationszeit statt. Es konnte jedoch nur eine Aktivität der *Bacteria* nachgewiesen werden, *Archaea* scheinen am Stroh inaktiv zu sein. In der Erde nahm der Gehalt an *Bacteria* stark ab, während *Archaea* prozentual zunahm. Hier konnte auch methanogene Aktivität nachgewiesen werden.

## **5. Abschließende Betrachtung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft, die am Abbau von Reisstroh beteiligt ist, sowohl von der Lebensgemeinschaft in Reisfeldboden ohne die Zugabe von Substrat unterscheidet (Hengstmann *et al.*, 1999; Großkopf *et al.*, 1999a/b; Fey und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000), als auch von der Lebensgemeinschaft, die in Anreicherungskulturen und MPN-Studien mit Reisfeldboden gefunden wurde (Chin *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1999a/b). Am Abbau des organischen Materials in diesen Habitaten sind viele verschiedene phylogenetische Gruppen beteiligt:

hauptsächlich die Gattung *Clostridium*,  $\alpha$ -*Proteobacteria*, das *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes*-Phylum, die Gattung *Verrucomicrobium* und *Actinobacteria*. Beim anaeroben Abbau von Reisstroh dagegen konnte durch Klonbibliotheken und "Ganz-Zell"-Hybridisierungen gezeigt werden, daß die Gattung *Clostridium*, vor allem die Cluster I, III und XIVa, dominant ist und andere phylogenetische Gruppen, wie *Proteobacteria* und das *CFB-Phylum* eine untergeordnete Rolle spielen. Die *Archaea*-Populationen, die in Reisfeldboden gefunden wurden, sind hauptsächlich *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* und die "Rice Cluster" I-VI (Großkopf et al, 1999a/b; Lueders und Friedrich, 2000; Fey und Conrad, 2000; Ramakrishnan et al., 2000). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und das "Rice Cluster" I wichtige Bestandteile der methanogenen Lebensgemeinschaft sind. Die Gattung *Methanosaeta* dagegen war weder in Klonbibliotheken noch durch T-RFLP-Analysen nachzuweisen. Lediglich mit "Northern-Blot"-Hybridisierung konnte ein kleiner prozentualer Anteil der gesamten 16S rRNA dieser Gattung zugeordnet werden. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß *Methanosaeta* beim anaeroben Abbau von Reisstroh eine geringere Rolle spielt, als in Reisfeldboden ohne Stroh.

In dieser Arbeit wurde die bakterielle Lebensgemeinschaft über einen Zeitraum von ca. 10 Wochen, die archaeale über einen Zeitraum von ca. 8 Wochen untersucht. Das Trockengewicht von Stroh nahm während der ersten 30 Tage der Inkubation um 50% ab. Im weiteren Verlauf war diese Abnahme mit ca. 20% in 110 Tagen deutlich geringer (Glissmann, Dissertation 2000). Es ist somit möglich, daß weitere phylogenetische Gruppen bei längerer Inkubation detektierbar werden, die schwer abbaubare Bestandteile, wie zum Beispiel Lignin, verwerten können. Die bakteriellen Populationen wurden in dieser Arbeit durch "Ganz-Zell"-Hybridisierung, die archaealen Populationen durch "Northern-Blot"-Hybridisierungen quantifiziert. In einer parallelen Studie (Glissmann, Dissertation 2000) zeigte sich, daß die methanogenen und syntrophen Prozesse im Boden lokalisiert waren. Interessant wäre es nun mit FISH-Experimenten im Boden syntrophe und methanogene Mikroorganismen mit verschiedenen 16S rRNA Sonden zu detektieren und deren Lage zueinander zu bestimmen.

Die Untersuchung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft über einen längeren Zeitraum und die Detektion syntropher und methanogener Mikroorganismen durch FISH-Experimente würde eine sinnvolle Ergänzung zu den hier gezeigten Ergebnissen darstellen.

## V) Literaturverzeichnis

- Alm, E. W.; D. B. Oerther; N. Larsen, D. A. Stahl und L. Raskin.** 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3557-3559.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chrisholm, R. Devereux und 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 und 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 und K. H. Schleifer.**1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**:3496-3500.
- Amann. R., H. Lemmer, and M. Wagner.** 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:205-215.
- Aselmann, I. und P. J. Crutzen.** 1989. Freshwater wetlands: Global distribution of natural wetlands and rice paddies, their net primary productivity, seasonality and possible methane emission. *J. Atmos. Chem.* **8**:307-358.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J. R. Lawrence und A. Hartmann.** 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1013-1019.
- Azmal, A. K. M., T. Marumoto, H. Shindo und M. Nishiyama.** 1997. Changes in microbial biomass after continuous application of azolla and rice straw in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **43**: 811-818.
- Bae, H. D., T. A. McAllister, E. G. Kokko, F. L. Leggett, L. J. Yanke, K. D. Jakober, J. K. Ha, H. T. Shin und K. J. Cheng.** 1997. Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Animal Feed Science Technology* **65**: 165-181.

- Baker, W., A. van den Broek, E. Camon, P. Hingamp, P. Sterk, G. Stoesser und M. A. Tuli.** 2000. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucl. Acids Res.* **28**:19-23.
- Bayer, E. A., E. Morag, Y. Shoham, J. Tormo und R. Lamed.** 1996. The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In: *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*. Ed. Fletcher, M. Wiley-Liss, New York, Inc. pp. 155-182.
- Bintrim, S. B., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts und R. M. Goodman.** Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:277-282.
- Bosse, U. und P. Frenzel.** 1998. Methane emission from rice microcosms: the balance of production, accumulation and oxidation. *Biogeochemistry* **41**:199-214
- Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter und 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., J. R. Graber und T. M. Schmidt.** 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4333-4339.
- Chidthaisong, A., K. Inubushi, Y. Muramatsu und I. Watanabe.** 1996. Production potential and emission of methane in flooded rice soil microcosms after continuous application of straw. *Microbes and Environments.* **11**:73-78.
- Chin, K. J., F. A. Rainey, P. H. Janssen und R. Conrad.** 1998. Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:185-200.
- Chin, K.-J., D. Hahn, U. Hengstmann, W. Liesack und P. H. Janssen.** 1999a. Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** :5042-5049.
- Chin, K.-J., T. Lukow und R. Conrad.** 1999b. Effect of temperature on structure and funktion of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2341-2349.
- Chin, K.-J., T. Lukow, S. Stubner und R. Conrad.** 1999c. Strukture and funktion of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:313-326.
- Cicerone, R. J. und R. S. Oremland.** 1988. Biochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biochemical Cycles* **2**:299-327.

- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe und J. A. E. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.
- Conrad, R.** 1993. Mechanism controlling methane emission from wetland rice fields. In: *The Biogeochemistry of Global Change: Radiative Trace Gases.* (Oremland, R.S. Ed.), pp. 317-335. Chapman Hall, New York.
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K. H. Schleifer und M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434-444
- Devereux, R., S.-H. He, C. L. Doyle, S. Orkland, D. A. Stahl, J. LeGall und W. B. Whitman.** 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.* **172**:3609-3619.
- Engelen, B., K. Meinken, F. von Wintzingerode, H. Heuer, H.-P. Malkomes und H. Backhaus.** 1998. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2814-2821.
- Farrelly, V., F. A. Rainey und E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genom size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2798-2801.
- Ferris, M. J. und D. M. Ward.** 1997. Seasonal Distribution of Dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1375-1381.
- Fey, A. und R. Conrad.** 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4790-4797.
- Fitsch, W.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**:406-416.
- Frostegård, A., S. Courtois, V. Ramisse, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme und P. Simonet.** 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5409-5420.
- Garcia, J. L.** 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *Microbiol. Rev.* **87**:297-308.

- Glissmann, K. und R. Conrad.** 2000. Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:117-126.
- Glissmann, K.** 2000. Methanogene Zersetzung von Stroh in Reisfeldboden. Dissertation.
- Grant, R. F.** 1998. Simulation of methanogenesis in the mathematical model *ECOSYS*. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 883-896.
- Großkopf, R., P. H. Janssen und W. Liesack.** 1998a. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
- Großkopf, R., S. Stubner und W. Liesack.** 1998b. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.
- Gutell, R. R., N. Larsen und C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev.* **58**:10-26.
- Han, Y. W.** 1975. Microbial Fermentation of rice straw: nutritive composition and in vitro digestibility of the fermentation products. *Appl. Microbiol.* **29**:510-514.
- Head, I. M., J. R. Saunders und R. W. Pickup.** 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* **35**:1-21.
- Hengstmann, U., K. J. Chin, P. J. Janssen und W. Liesack.** 1999. Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5050-5058.
- Heyer, J.** 1990. Der Kreislauf des Methans. Akademie Verlag, Berlin, Deutschland.
- Hippe, H., J. R. Andreesen und G. Gottschalk.** 1992. The genus *Clostridium*-nonmedical. In: The prokaryotes, second edition. Ed.: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., New York, Springer, 1800-1866.
- Hiraishi, A., N. Kishimoto, Y. Kosako, N. Wakao und T. Tano.** 1995. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo-organotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 91-94.
- Holzappel-Pschorn, A., R. Conrad und W. Seiler.** 1986. Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant and Soil* **92**:223-233.

- Hossain, M.** 1997. Rice supply and demand in Asia: a socioeconomic and biophysical analysis. Ed. Teng, P. S., M. J. Kropff, H. F. M. ten Berge, J. B. Dent, F. P. Lansigan, and H. H. van Laar. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel und N. R. Pace.** 1998a. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4774.
- Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger und N. Pace.** 1998b. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**:366-376.
- IPCC 1994.** Intergovernmental Panel on Climate Change 1994. Radiative forcing of climate change and an evaluation of the IPCC IS92 emission scenarios. Ed. Houghton, J. T., L. G. Meira Filho, J. Bruce, Hoesung Lee, B. A. Callander, E. Haites, N. Harris, and K. Maskell. Cambridge, University Press.
- Jetten, M. S. M, A. J. M. Stams und A. J. B. Zehnder.** 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:339-344.
- Joulian, C., S. Escoffier, J. Le Mer, H.-U. Neue und P. A. Roger.** 1997. Populations and potential activities of methanogens and methanotrophs in rice fields: relations with soil properties. *Eur. J. Soil Biol.*: **33**: 105-116.
- Joulian, C., B. Ollivier, B. K. C. Patel und P. A. Roger.** 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:135-145.
- Jukes, T.H. und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Kimura, M. und C. C. Tun.** 1999. Microscopic observation of the decomposition process of leaf sheath of rice straw and colonizing microorganisms during the cultivation period of paddy rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**:427-437.
- Kreis, S., C. F. Bennett, V. K. Ward und D. T. Jones.** 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:693-705.
- Küsel, K., H. C. Pinkart, H. L. Drake und R. Devereux.** 1999. Acetogenic and Sulfate-Reducing-Bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5117-5123.
- Lamed R., E. Setter und E. A. Bayer.** 1983. Characterization of a cellulose-binding cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol* **156**:828-836.

- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y.
- Liesack, W., B. Friedhelm, J.-U. Kreft und E. Stackebrandt.** 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 162:85-90.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng und L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
- Lüdemann, H., I. Arth und W. Liesack.** 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:754-762.
- Ludwig, W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, R. Schulze, I. Huber, S. Spring, A. Hartmann und K. H. Schleifer.** 1997. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:181-190.
- Lueders, T. und M. Friedrich.** 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2732-2742.
- Lukow, T., P. F. Dunfield und W. Liesack.** 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:241-247.
- Macrae, A., D. L. Rimmer und A. G. O'Donnell.** 2000. Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA. *Antonie von Leeuwenhoek* **78**:13-21.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey und C. R. Woese.** 1996. The ribosomal database project (RDP). *Nucl. Acids Res.* **24**:82-85.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.



- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt und K. H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural Environ. Microbiol. **142**:1097-1106.
- Manz, W., K. Wendt-Potthoff, T. R. Neue, U. Szewzyk und J. R. Lawrence.** 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. Microb. Ecol. **37**:225-237.
- Matthews, E., I. Fung und J. Lerner.** 1991. Methane emission from rice cultivation: geographic and seasonal distribution of cultivated areas and emissions. Global Biochemical Cycles **5**:3-24.
- Mayer, H. P. und R. Conrad.** 1990. Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. FEMS Microbiol Ecol. **73**:103-112.
- Meier, H., R. Amann, W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1999. Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positiv bacteria with low DNA G+C content. System. Appl. Microbiol. **22**:186-196.
- Mosier, A. R.** 1998. Soil processes and global changes. Biol Fertil Soils **27**: 221-229.
- Murakami, H., M. Kimura und H. Wada.** 1990. Microbial colonization and decomposition processes in rice rhizoplane. Soil Sci. Plant Nutr. **36**:441-450.
- Muyzer, G., E. C. De Waal und A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**:695-700.
- Neue, H.-U.** 1993. Methane emission from rice fields. Wetland rice fields may make a major contribution to global warming. BioScience **43**:466-474.
- Neue, H.-U., P. A. Roger.** 1994. Potential of methane emission in major rice ecologies. In: Climate biosphere interaction: Biogenic Emissions and Environmental effects of climate change. Ed. Zepp, R. G. John Wiley and Sons, Inc.
- Neue, H.-U., R. Wassermann, R. S. Lantin, MA C. R. Alberto, J. B. Aduna und A. M. Javellana.** 1996. Factors affecting methane emission from rice fields. Atmospheric Environment **30**:1751-1754.

- Oda, Y., S.-J. Slagman, W. G. Meijer, L. J. Forney und J. C. Gottschal.** 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridisation of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:205-213.
- Radajewski S., P. Ineson, N. R. Parekh und J. C. Murrell.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Rainey F. A., N. L. Ward, H. W. Morgan, R. Toalster und E. Stackebrandt.** 1993. Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* **175**:4772-4779.
- Ramakrishnan, B., T. Lueders, R. Conrad und M. Friedrich.** 2000. Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **32**:261-270.
- Raskin L., L. K. Poulsen, D. R. Noguera, B. E. Rittmann und D. A. Stahl.** 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1241-1248.
- Rath, A. K., S. R. Mohanty, S. Mishra, S. Kumaraswamy, B. Ramakrishnan und N. Sethunathan.** 1999. Methane production in unamended and rice-straw-amended soil at different moisture levels. *Biol. Fertil. Soil* **28**:145-149.
- Reichardt, W., G. Mascarina, B. Padre und J. Doll.** 1997. Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:233-238.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA targeted oligonucleotides. *Microbiology-UK* **140**:2849-2858
- Rosencrantz, D., F. A. Rainey und P. H. Janssen.** 1999. Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3526-3533.
- Rossello-Mora, R., B. Thamdrup, H. Schäfer, R. Weller und R. Amann.** 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Appl. Microbiol.* **22**:237-248..
- Saitou, N. und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467.
- Sass, R. L., F. M. Fisher, P. A. Harcombe und F. T. Turner.** 1991. Mitigation of methane emissions from rice fields: possible adverse effects of incorporated rice straw. Global Biochemical Cycles **5**: 275-287.
- Schink, B.** 1984. *Clostridium magnum* sp. nov., a non-autotrophic homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol **137**:250-255.
- Schütz, H., A. Holzapfel-Pschorn, R. Conrad, H. Rennenberg und W. Seiler.** 1989. A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. J. Geophys. Res. **94**:16405-16416.
- Schütz, H., W. Seiler und H. Rennenberg.** 1990. In: Soils and the greenhouse effect. Ed. Bouwman A. F. John Wiley & Sohn, New York, **269-285**
- Seiler, W.** 1985. Increase of atmospheric methane: causes and impact in the environment. In: WMO special environmental report No. 16. Ed. World Meteorological Organisation, WMO, Geneva, WMO No. **647**:177-203.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi und H. Harada.** 1999. Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1280-1288.
- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca-Hagler, A. Wolters und J. D. van Elsas.** 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. J. Appl. Bacteriol. **74**:78-85.
- Smith, M. M. und M. E. McCully.** 1978. Enhancing aniline blue fluorescent staining of cell wall structures. Stain Technol. **53**:79-85.
- Stackebrandt, E. und B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J Syst. Bacteriol. **44**:846-849.
- Stahl, D. A., B. Fletsher, H. R. Mansfield und L. Montgomery.** 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1079-1084.
- Stams, A. J. M.** 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie von Leeuwenhoek **66**:271-294.

- Strunk, O. und W. Ludwig.** [Online]. ARB: a software environment for sequence data [<http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>]. Technische Universität München.
- Suzuki, M. T. und S. J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.
- Svensson, B. H., H.-C. Dubourguier, G. Prensier und A. J. B. Zehnder.** 1992. *Clostridium quinii* sp. nov., a new saccharolytic anaerobic bacterium isolated from granular sludge. *Arch. Microbiol.* **157**:97-103.
- van Breemen, N. und T. C. J Feijtel.** 1990. Soil processes and properties involved in the production of greenhouse gases, with special relevance to soil taxonomic systems. In: *Soils and the greenhouse effect*. Ed. Bouwman A. F. John Wiley & Sohn, New York, **195-224**.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi und K. H. Schleifer.** 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:792-800.
- Watanabe, A., K. Katoh und M. Kimura.** 1993. Effect of rice straw application on CH<sub>4</sub> emission from paddy fields, II, contribution of organic constituents in rice straw. *Soil Sci. Plant Nutr.* **39**: 707-712.
- Watanabe, A., T. Takeda und M. Kimura.** 1999. Evaluation of origins of CH<sub>4</sub> carbon emitted from rice paddies. *J. Geophysical Research* **104**:23,623-23,629.
- Yagi, K. und K. Minami.** 1990. Effect of organic matter application on methane emission from some japanese paddy fields. *Soil Sci. Plant Nutr.* **36**: 599-610.
- Yang, S.-S. und H.-L. Chang.** 1998. Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **69**:69-80.
- Zarda, B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R. I. Amann und J. Zeyer.** 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch Microbiol* **168**:185-192.

## **Lebenslauf**

### Zur Person

Name: Sabine Weber  
Adresse: Kiefernweg 3  
35043 Marburg  
geboren am: 28.07.1972 in Nittenau  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1978 - 1982 Grund- und Hauptschule Nittenau  
1982 - 1992 Regental - Gymnasium Nittenau  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1992 - 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Regensburg  
Diplomarbeit: am Lehrstuhl für Mikrobiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. K. O. Stetter, mit dem Thema: "Immunlokalisation von Proteinkomplexen und Enzymen an den hyperthermophilen Archaeen *Pyrodictium abyssi* und *Methanopyrus kandleri*."

### Promotion

1997 - 2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. R. Conrad, mit dem Thema: "Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden"

## Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Conrad für die Betreuung dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Buckel möchte ich danken, daß er das zweite Gutachten verfaßt hat.

Vielen Dank an Kristin Gleißmann, für die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre und die netten Diskussionen über Reisstroh, Methanproduktion und viele andere wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Dinge.

Recht herzlich möchte ich mich bei Dr. Kuk-Jeong Chin und Dr. Hans Scholten bedanken, die mir einige ihrer Isolate und Reinkulturen überlassen haben.

Tillmann Lüders danke ich, daß er mir die Sonde RC I zur Verfügung gestellt hat.

Vielen Danke an Kristin, Kuk-Jeong, Hans-Peter und Melanie, die diese Arbeit geduldig auf "Herz und Nieren" geprüft haben und mir immer und bei allen Entscheidungen mit Rat und Tat zu Seite standen.

Vielen Danke auch an Reinhard Rachel, der, trotz der großen Entfernung, immer gerne mit mir über meine Arbeit diskutiert hat und bemüht war, auch noch die letzten Tipp- und Kommafehler zu entdecken.

Meinen Eltern möchte ich besonders für die jahrelange Unterstützung danken, die es mir ermöglicht hat zu studieren und hier in Marburg zu promovieren.

Last but not least möchte ich meinem Hans-Werner danken, durch den die einst fremde Stadt Marburg meine zweite Heimat wurde.

## Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation:

“Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden”

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszweck gedient.

Marburg, den