

**Charakterisierung der methanotrophen
Lebensgemeinschaften in Böden mit geringem
Methanangebot und der oligotrophen Adaption
methanotropher Bakterien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
vorgelegt von

Claudia Knief
aus Nordhorn

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2001 bis März 2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biogeochemie, in Marburg/Lahn unter der Leitung von Dr. Peter F. Dunfield durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Thauer

Tag der Disputation:

Teile der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Claudia Knief, André Lipski und Peter F. Dunfield (2003) Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6703 – 6714.

Weitere Teile werden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Claudia Knief, Steffen Kolb, Paul L. E. Bodelier, André Lipski und Peter F. Dunfield. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. (Einreichung geplant bei *Appl. Environ. Microbiol.*)

Claudia Knief, Ralf Conrad, Peter F. Dunfield und Amnat Chidthaisong. Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land use. (Einreichung geplant bei *FEMS Microbiol. Ecol.*)

Claudia Knief und Peter F. Dunfield. Response and adaptation of methanotrophic bacteria to low methane concentrations. (Einreichung geplant bei *Environ. Microbiol.*)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Methan als Spurengas in der Atmosphäre	1
1.2 Methan-oxidierende Bakterien	2
1.2.1 Aerobe methanotrophe Bakterien.....	2
1.2.2 Autotrophe Ammoniak-Oxidierer	5
1.2.3 Anaerobe methanotrophe Bakterien.....	6
1.3 Methanoxidation und -produktion in Böden.....	6
1.4 „Upland soils“ als Senke für atmosphärisches Methan.....	8
1.4.1 Wirkungsweise abiotischer und biotischer Faktoren auf die Methan-Aufnahmerate	8
1.4.2 Charakterisierung der Methan-Oxidationskinetik	10
1.5 Oxidation atmosphärischen Methans durch methanotrophe Bakterien	11
1.5.1 Methanoxidation durch <i>Methylocystis</i> sp. LR1	11
1.5.2 Mögliche Anpassungen hoch-affiner Methan-oxidierender Bakterien an niedrige Methan-Konzentrationen	12
1.6 Charakterisierung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in „upland soils“	16
1.6.1 Nachweis methanotropher Bakterien über proteinkodierende Gene.....	16
1.6.2 Nachweis physiologisch aktiver methanotropher Bakterien in „upland soils“	18
1.7 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Chemikalien und Gase	21
2.1.2 Probestandorte und Probenahme	21
2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Bodenproben.....	23
2.2.1 Bestimmung des pH-Wertes in Bodenproben.....	23
2.2.2 Ermittlung des Trockengewichtes der Bodenproben	23
2.2.3 Kolorimetrische Bestimmung des Ammonium-Gehaltes in Bodenproben	23
2.3 Bestimmung der Methan-Oxidationskinetik in Böden.....	24
2.3.1 Gaschromatographische Analytik zur Bestimmung der Methan-Mischungsverhältnisse.....	24
2.3.2 Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$, a_s^0 und $K_{m(\text{app})}$ in Bodenproben.....	24
2.3.3 Aufnahme der vollständigen Methan-Oxidationskinetik	26
2.3.4 Bestimmung der Methan-Mischungsverhältnisse im Boden.....	26
2.4 Molekularbiologische Analysen der Bodenproben	27
2.4.1 Extraktion der DNA aus Bodenproben	27

2.4.2	Modifikationen der Methode zur DNA-Extraktion.....	27
2.4.3	Reinigung und Konzentrierung der DNA-Extrakte.....	28
2.4.4	Amplifikation proteinkodierender Gene mittels PCR.....	28
2.4.5	Modifikationen der PCR zur Amplifikation proteinkodierender Gene.....	31
2.4.6	Auftrennung gemischter PCR-Produkte mittels DGGE.....	31
2.4.7	Amplifikation der Banden aus DGGE-Gelen.....	33
2.4.8	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	34
2.5	Phylogenetische Auswertung der DNA-Sequenzen	35
2.5.1	Phylogenetische Einordnung der Sequenzen proteinkodierender Gene.....	35
2.5.2	Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gene.....	37
2.6	Markierungsexperimente mit $^{13}\text{CH}_4$	37
2.6.1	Inkubation der terrestrischen Bodenproben mit $^{13}\text{CH}_4$	37
2.6.2	Inkubation der Bodenproben temporär gefluteter Standorte mit $^{13}\text{CH}_4$	38
2.6.3	Inkubation methanotropher Reinkulturen mit $^{13}\text{CH}_4$	38
2.6.4	Inkubation von Bodenproben mit $^{13}\text{CO}_2$	38
2.6.5	Gaschromatographische Bestimmung von CO_2 -Mischungsverhältnissen.....	39
2.6.6	Bestimmung des Isotopenverhältnisses von CO_2	39
2.6.7	Extraktion von Fettsäuren aus Bodenproben.....	40
2.6.8	Analyse der FAMES.....	41
2.6.9	Identifizierung der FAMES über GC-MS.....	42
2.6.10	Bestimmung der Isotopen-Verhältnisse der FAMES über GC-IRMS.....	43
2.6.11	Berechnung der ^{13}C -Inkorporation in Fettsäuren.....	43
2.7	Kultivierung methanotropher Bakterien.....	44
2.7.1	Methanotrophe Referenzstämme.....	44
2.7.2	Verwendete Medien zur Kultivierung methanotropher Bakterien.....	45
2.7.3	Stammerhalt methanotropher Bakterien.....	47
2.8	Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien aus Bodenproben	47
2.8.1	Auswahl der Bodenproben für Anreicherungsversuche.....	47
2.8.2	Anreicherungsstrategien.....	48
2.8.3	Isolierung methanotropher Bakterien.....	49
2.9	Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung methanotropher Bakterienisolate.....	50
2.9.1	DNA-Extraktion aus methanotrophen Reinkulturen.....	50
2.9.2	Amplifikation des 16S rRNA Gens und proteinkodierender Gene von methanotrophen Bakterien.....	51
2.10	Charakterisierung der Methanoxidation methanotropher Bakterien nach Wachstum in Gegenwart von 10 % Methan	52
2.10.1	Anzucht der Zellen mit 10 % Methan.....	52
2.10.2	Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$, a_s^0 und $K_{m(\text{app})}$	53
2.11	Bestimmung der Oxidationsleistung und Wachstumsfähigkeit methanotropher Bakterien unter niedrigen Methankonzentrationen.....	53
2.11.1	Anzucht der Zellen.....	53

2.11.2	Langzeit-Inkubation methanotropher Bakterien unter Methan-Mischungsverhältnissen von 1000, 100, 10 und 1,8 ppmv.....	54
2.12	Statistische Daten-Analysen.....	57
2.12.1	Korrespondenz-Analyse.....	57
2.12.2	Cluster-Analyse.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Diversität und Aktivität methanotropher Bakterien in diversen „upland soils“..	59
3.2	Atmosphärische Methanoxidation in temporär wassergesättigten „upland soils“ ..	89
3.3	Vergleich der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in tropischen Böden unterschiedlicher Landnutzung.....	116
3.4	Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien aus „upland soils“	134
3.5	Oligotrophe Adaption methanotropher Bakterien – Aktivität methanotropher Bakterien unter niedrigen Methankonzentrationen.....	138
4	Zusammenfassende Diskussion	165
4.1	Diversität methanotropher Bakterien in „upland soils“	165
4.1.1	Verbreitung bekannter Gattungen methanotropher Bakterien in „upland soils“.....	166
4.1.2	Verbreitung unbekannter Methan-oxidierender Bakterien.....	166
4.2	Nachweis physiologisch aktiver methanotropher Bakterien in „upland soils“...170	
4.3	Atmosphärische Methanoxidation durch kultivierte methanotrophe Bakterien	171
4.4	Oxidation atmosphärischen Methans als Resultat spezieller Adaptionen?.....	173
5	Literatur.....	175

Abkürzungsverzeichnis

a_s^0	spezifische Affinität
AmoA	Untereinheit der Ammonium-Monooxygenase
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
ECL	äquivalente Kettenlänge
FAME	Fettsäuremethylester
GC-FID	Gaschromatograph mit angeschlossenem Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph mit angeschlossenem massenselektiven Detektor
GC-IRMS	Gaschromatograph mit angeschlossenem Isotopen-Massenspektrometer
GC-Klammer	GC-reiche-Nukleotidsequenz am 5'-Ende eines Primers zur Amplifikation von PCR-Produkten für die DGGE-Analyse
gdw	Gramm Trockengewicht
GWC	gravimetrischer Wassergehalt
$K_{m(app)}$	apparente halbmaximale Sättigungskonstante
MB	methanotrophe Bakterien
MMO	Methan-Monooxygenase
MmoX	Untereinheit der löslichen Methan-Monooxygenase
MPN	„most probable number“
MxaF	Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLFA	Phospholipidfettsäuren
pMMO	membrangebundene (partikuläre) Methan-Monooxygenase
PmoA	Untereinheit der partikulären Methan-Monooxygenase
ppmv	Mischungsverhältnis: parts per million of volume
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
sMMO	lösliche (soluble) Methan-Monooxygenase
sp.	Art
spp.	Arten
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
USC α	upland soil cluster α
USC γ	upland soil cluster γ
V_{atm}	Oxidationsrate bei atmosphärischer Methan-Konzentration
$V_{max(app)}$	apparente maximale Oxidationsrate
v/v	Volumen pro Volumen

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der "Information for Authors" des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

Zusammenfassung

Methan (CH_4) ist ein Treibhausgas, dessen Mischungsverhältnis in der Atmosphäre derzeit bei 1,75 ppmv liegt. Im globalen Kreislauf des Methans spielen die „upland soils“ als Senke für atmosphärisches Methan eine bedeutende Rolle. Für die Umsetzung von Methan in den „upland soils“ sind methanotrophe Bakterien (MB) verantwortlich. Zu Beginn dieser Arbeit beschränkte sich das Wissen über die Zusammensetzung der Gilde der MB in „upland soils“ auf wenige, überwiegend saure Waldböden.

Deshalb wurde die Charakterisierung der Gilde der MB auf insgesamt 58 „upland soils“ unterschiedlicher Landnutzung und Bodenart ausgeweitet. Der Nachweis der MB erfolgte kultivierungs-unabhängig, basierend auf die Detektion des *pmoA*-Gens. In den untersuchten Böden wurden MB der bekannten Gattungen *Methylocaldum*, *Methylobacter*, *Methylosinus* und *Methylocystis* nachgewiesen. Darüber hinaus wurden *pmoA*-Gene detektiert, die auf verschiedene Taxa unkultivierter Organismen hinweisen. Weit verbreitet in sauren „upland soils“ sind die Sequenzen des „upland soil cluster α “ (USC α), die auch unter dem Namen „forest sequences“ bekannt sind und am nächsten verwandt sind zur PmoA-Sequenz von *Methylocapsa acidiphila*. Erstmals wurde eine zweite Gruppe von Sequenzen nachgewiesen, die als „upland soil cluster γ “ (USC γ) bezeichnet wurde. Sequenzen des USC γ sind entfernt verwandt zu den Sequenzen methanotropher Gammaproteobakterien und wurden ausschließlich in pH-neutralen Böden ($\text{pH} > 6$) nachgewiesen.

Diejenigen MB, die in „upland soils“ hauptverantwortlich für die atmosphärische Methan-Aufnahme sind, wurden in ausgewählten Bodenproben anhand markierter Phospholipid-Fettsäuren (PLFAs) identifiziert, welche nach Inkubation der Proben in Gegenwart von < 50 ppmv $^{13}\text{CH}_4$ erhalten worden waren. Markierte PLFAs (14:0, 16:1 ω 7c und 16:0), die charakteristisch für Typ I MB (methanotrophe Gammaproteobakterien) sind, wurden in Böden detektiert, in denen die methanotrophen Gammaproteobakterien ausschließlich von PmoA-Sequenzen des USC γ repräsentiert wurden. Die markierten PLFAs 16:0, i17:0 und 18:1 ω 7c deuteten auf physiologisch aktive Typ II MB (methanotrophe Alphaproteobakterien) in dem Boden hin, in dem einzig PmoA-Sequenzen des USC α nachgewiesen worden waren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sowohl die Organismen des USC α als auch die des USC γ an der atmosphärischen Methanoxidation beteiligt sind, allerdings in verschiedenen Böden.

Die Zusammensetzung der Gilde der MB und die Methanaufnahme-Rate eines Bodens werden durch die unterschiedliche Bodennutzung beeinflusst. Dieses trifft nicht nur für Böden der gemäßigten Breiten zu, sondern konnte exemplarisch auch für tropische „upland soils“ gezeigt werden. Die Methan-Aufnahmeraten der hier untersuchten tropischen Böden entsprachen den Raten, die in der Literatur für Böden gleichartiger Nutzung der gemäßigten Breiten angegeben werden. Die Aufnahmeraten unterschieden sich für die Böden unterschiedlicher Landnutzung: Wald > Wiederaufforstung > Ackerland. Die Zusammensetzung der Gilde der MB in den beiden Böden Baum-bestandener Standorte war ähnlicher zueinander als sie es zu der Gilde im Ackerboden war. Die Sequenzierung der *pmoA*-Gene bestätigte, was bereits bei der Analyse der „upland soils“ gemäßigter Breiten beobachtet worden war: die Sequenzen des USC α sind in Ackerböden nicht nachweisbar, obwohl sie im angrenzenden Waldboden detektiert werden können.

Auch die Methan-Verfügbarkeit im Boden wirkt sich auf die Zusammensetzung und Aktivität der Gilde der MB aus. Verschiedene Böden mit unterschiedlicher Ausprägung hydromorpher Merkmale, in denen aufgrund temporärer Flutung zeitweilig Methankonzentrationen oberhalb der atmosphärischen auftreten, wurden analysiert. Die Methan-Aufnahmerate der analysierten Böden unterschied sich nicht von der anderer „upland soils“, doch die apparenten K_m -Werte der Gleyböden waren mit 100 – 1.100 nM höher als die der „upland soils“ und niedriger als die Werte, die für die Methanoxidation an oxisch-anoxischen Grenzflächen methanogener Ökosysteme publiziert sind. Die nachgewiesenen *pmoA*-Sequenzen deuteten auf eine weite Verbreitung der Gattung *Methylocystis* und verschiedener unkultivierter potentiell methanotropher Bakterien in den analysierten Böden hin, darunter die Sequenzen des USC α . Der Beitrag der in den Gleyböden vorhandenen MB zur Methanoxidation hing von der Methanverfügbarkeit ab. Während die markierten PLFAs (16:0 und 18:1 ω 7c), die nach Inkubation unter Methan-Mischungsverhältnissen von etwa 30 ppmv erhalten worden waren, darauf hinweisen, dass Typ II MB (*Methylocystis* spp. und/oder USC α) unter atmosphärischen Bedingungen aktiv sind, erfolgte unter erhöhten Mischungsverhältnissen (500 ppmv) die Methan-Oxidation auch durch Typ I MB (Nachweis von markierten 16:1 PLFAs, 16:0 und 18:1 ω 7c).

Die Beteiligung bekannter Gattungen von MB an der atmosphärischen Methanoxidation in „upland soils“ konnte *in situ* bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MB der Gattungen *Methylocystis*, *Methylosinus* und *Methylocaldum* aus verschiedenen „upland soils“ isoliert und auf ihre Aktivität unter niedrigen Methan-Mischungsverhältnissen (\leq 1000 ppmv) hin geprüft. Bei Kultivierung in Gegenwart von 10 %

Methan unterschieden sich die kinetischen Parameter für die Methanoxidation ($V_{\max(\text{app})}$, $K_{m(\text{app})}$ und a_s^0) dieser Isolate nicht von denen ausgewählter methanotropher Referenzstämme. Dennoch zeigten die MB Unterschiede hinsichtlich der Aufrechterhaltung ihrer Aktivität in Gegenwart von ≤ 1000 ppmv Methan. Während die meisten Typ I MB nicht dazu in der Lage waren, ihre Aktivität unter Methan-Mischungsverhältnissen von ≤ 1000 ppmv aufrecht zu erhalten, waren mit Ausnahme von *Methylocapsa acidiphila* alle getesteten Typ II MB dazu in der Lage. Stämme der Gattung *Methylocystis* zeigten selbst bei Methan-Mischungsverhältnissen von 1.8 – 10 ppmv noch eine gleichbleibende Methan-Oxidationsaktivität über mehrere Wochen. Die unter atmosphärischen Bedingungen bestimmte Methan-Aufnahmerate von *Methylocystis* spp. war ausreichend hoch, um die Methan-Aufnahmeraten verschiedener „upland soils“ mit $1,4 - 349 \times 10^6$ Zellen pro Gramm trockenen Boden zu erklären.

Zusammenfassend lassen die hier präsentierten Ergebnisse den Schluss zu, dass sowohl kultivierte als auch verschiedene unkultivierte MB am Prozess der atmosphärischen Methanoxidation in „upland soils“ beteiligt sein können. In Waldböden und Wiesen, in denen häufig hohe Methan-Aufnahmeraten bestimmt werden, sind die Organismen des USC α und USC γ weit verbreitet und an der atmosphärischen Methan-Oxidation beteiligt. In landwirtschaftlich intensiv genutzten Böden, in denen MB bekannter Gattungen nachgewiesen wurden, nicht aber die unkultivierten MB des USC α und USC γ , wurden vergleichsweise niedrige Methan-Aufnahmeraten bestimmt. Die für *Methylocystis* spp. bestimmten atmosphärischen Methan-Oxidationsraten sind ausreichend hoch, um die Raten in solchen Böden zu erklären.

1 Einleitung

1.1 Methan als Spurengas in der Atmosphäre

Methan (CH_4) ist nach Kohlendioxid (CO_2) die am häufigsten in der Erdatmosphäre vorkommende Kohlenstoffverbindung. Es ist als Treibhausgas für das globale Klima von großer Bedeutung und spielt in der Atmosphärenchemie eine wesentliche Rolle (Rodhe 1990, Cicerone und Oremland 1988). Der Anteil des Methans in der Atmosphäre liegt derzeit bei etwa 1,75 ppmv (Dlugokencky 2003). Nach einer Studie von Etheridge *et al.* (1998) ist das Methan-Mischungsverhältnis seit Beginn des präindustriellen Zeitalters kontinuierlich angestiegen, ausgehend von etwa 0,7 ppmv. Untersuchungen an Eisbohrkernen haben gezeigt, dass 0,7 ppmv in den vorausgegangenen 420.000 Jahren nur während interglazialer Perioden geringfügig überschritten worden sind (Petit *et al.* 1999). Die höchsten Zuwachsraten während der letzten 300 Jahre wurden zu Ende der 70er Jahre und zu Beginn der 80er Jahre verzeichnet. In den darauffolgenden Jahren zeichnete sich ein Rückgang der Zuwachsrate ab (Steele *et al.* 1992, Dlugokencky *et al.* 1998) und seit 1999 hat sich das mittlere globale Methan-Mischungsverhältnis nicht verändert (Dlugokencky 2003). Ob es innerhalb der nächsten Jahre bei dieser Gleichgewichtseinstellung bleibt und somit ein weiterer Anstieg der Methan-Mischungsverhältnisse unterbleibt, ist jedoch fraglich (Dlugokencky 2003, Houghton *et al.* 2001, Nakicenovic *et al.* 2000).

Die Rate des Anstiegs der atmosphärischen Methankonzentration beruht auf einem geringfügigen Ungleichgewicht zwischen den Quellen und Senken für atmosphärisches Methan. Hochrechnungen aus dem Jahr 2001 gehen von einer Gesamtquellenstärke von 598 Tg a^{-1} aus, während durch die Senken 576 Tg a^{-1} umgesetzt werden. Bei einer Gesamtmenge von 4850 Tg CH_4 in der Atmosphäre resultiert aus dieser Umsatzrate eine 8,4-jährige Verweilzeit des Methans in der Atmosphäre (Houghton *et al.* 2001).

Zu den bedeutenden Quellen für atmosphärisches Methan zählen wassergesättigte Bodensysteme wie natürliche Feuchtgebiete und Reisfelder, Wiederkäuer und Termiten, Süßwasserökosysteme und Ozeane, Mülldeponien und Kläranlagen, die Biomasseverbrennung sowie die Freisetzung fossilen Methans beim Abbau von Steinkohle und bei der Förderung und Verteilung von Erdgas und Erdöl. Etwa 60 % der Methanemission wird auf menschliche Aktivitäten zurückgeführt (Houghton *et al.* 2001). Isotopenmessungen belegen, dass 70 – 90 % des in der Atmosphäre enthaltenden Methans aktuellen biogenen Ursprungs sind (Cicerone und Oremland 1998). Dieses Methan wird produziert von methanogenen

Archaea. Es entsteht als Endprodukt des anaeroben Abbaus organischen Materials und wird vorwiegend aus CO₂ und Wasserstoff oder Acetat gebildet (Conrad 1997).

Die dominierende Senke für atmosphärisches Methan mit einem Anteil von etwa 90 % ist der Abbau zu CO₂ und H₂O durch eine Kette verschiedener photochemischer Reaktionen, an deren Anfang die Reaktion von Methan mit Hydroxylradikalen als Schlüsselreaktion steht. Etwa gleich groß ist der Beitrag der beiden verbleibenden relevanten Senken. Ein Teil des Methans tritt in die Stratosphäre ein und wird dort ebenfalls durch chemische Reaktionen umgesetzt. Geschätzte 30 Tg Methan werden jährlich von Böden aufgenommen (Houghton *et al.* 2001, Smith *et al.* 2000). Der Verbrauch des atmosphärischen Methans in Böden ist ein ausschließlich biologischer Prozess. Verantwortlich dafür sind aerobe Methan-oxidierende Bodenbakterien (Bender und Conrad 1992, Bender und Conrad 1994a, Schnell und King 1995, Yavitt *et al.* 1990, Whalen und Reeburgh 1990).

1.2 Methan-oxidierende Bakterien

1.2.1 Aerobe methanotrophe Bakterien

Die aeroben methanotrophen Bakterien (MB) bilden eine Untergruppe der methylotrophen Bakterien. Methylotrophe Bakterien sind charakterisiert durch ihre physiologische Eigenschaft, reduzierte C₁-Verbindungen oder organische Verbindungen mit mehr C-Atomen aber ohne C-C-Bindungen als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen, z. B. Dimethylamin, Dimethylether, Dimethylsulfid, Dimethylsulfoxid, Methylformat, Trimethylamin und Dimethylcarbamat. Die MB grenzen sich von den übrigen methylotrophen Bakterien durch ihre Fähigkeit ab, mit Methan als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu leben. Neben Methan wachsen die meisten MB auch mit Methanol, wenige Arten nutzen darüber hinaus Methylamine, Formiat oder Formamid (Bowman *et al.* 1993).

Die MB wurden in fast allen aquatischen und terrestrischen Ökosystemen aus verschiedensten geographischen Gebieten der Erde nachgewiesen, sowohl in natürlichen als auch in anthropogen beeinflussten oder geschaffenen Habitaten (Hanson und Hanson 1996, Heyer *et al.* 1984). Eine besondere Bedeutung kommt den MB an Standorten zu, an denen Methan von anoxischen in oxische Bereiche der Biosphäre übertritt. Vor allem im Boden und in aquatischen Ökosystemen wirken die MB an dieser oxisch/anoxischen Grenzschicht als Barriere für den Übertritt des in den anoxischen Bereichen gebildeten Methans in die Atmosphäre (vgl. Kap. 1.3).

Die erste Beschreibung eines methanotrophen Bakteriums, *Methylomonas methanica* (damals *Bacillus methanicus*), erfolgte 1906 durch Söhngen. Zahlreiche weitere Isolate verschiedener Gattungen wurden seit den 70er Jahren isoliert und beschrieben (z. B. Bodrossy *et al.* 1997, Bowman *et al.* 1997, Bowman *et al.* 1995, Bowman *et al.* 1993, Dedysh *et al.* 2002, Dedysh *et al.* 2000, Heyer *et al.* 1984, Whittenbury *et al.* 1970, Wise *et al.* 2001). Derzeit unterscheidet man elf Gattungen methanotropher Bakterien. Zu den Gammaproteobakterien zählen *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylosphaera* und *Methylosarcina*. Die Gattungen *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* und *Methylocapsa* gehören den Alphaproteobakterien an. Die Stämme „*Methylothermus*“ sp. HB und „*Methylohalobium crimense*“ 10Ki repräsentieren zwei weitere potentielle Gattungen innerhalb der Gammaproteobakterien (Bodrossy *et al.* 1999, Heyer *et al.* 2004).

Nach einem von Whittenbury vorgeschlagenem Klassifikationssystem werden die Gattungen der MB in Typ I und Typ II unterteilt (Whittenbury *et al.* 1981). Basierend auf die 16S rRNA-Gensequenz entsprechen die methanotrophen Gammaproteobakterien dem Typ I, während die methanotrophen Alphaproteobakterien dem Typ II angehören. Die Gattungen *Methylococcus* und *Methylocaldum* werden teilweise als Typ X von den Typ I Organismen abgegrenzt (z. B. Bowman 2000, Green 1992, Hanson und Hanson 1996). Die Einordnung der MB in dieses System erfolgt anhand morphologischer, ultrastruktureller, physiologischer, biochemischer und phylogenetischer Merkmale. Wesentliche Merkmale zur Klassifizierung der MB als Typ I oder Typ II sind (Bowman 2000, Hanson und Hanson 1996):

- die Anordnung intracytoplasmatischer Membranen als Membranstapel im Zellinneren (Typ I) oder in paralleler Anordnung an der Zellperipherie (Typ II, mit Ausnahme von *Methylocella*)
- die Formaldehyd-Fixierung über den Ribulose-Monophosphat-Weg (Typ I) oder den Serin-Weg (Typ II und *Methylocaldum*, möglicherweise auch Vertreter der Gattung *Methylococcus*) (Bodrossy *et al.* 1997)
- die Fähigkeit zur Distickstoff-Fixierung (Typ II und *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosphaera* und *Methylococcus*)
- die dominierenden Phospholipid-Fettsäuren (PLFAs) 14:0, 16:0, 16:1 ω 8c, 16:1 ω 7c und 16:1 ω 5t (Typ I) sowie 18:1 ω 8c und 18:1 ω 7c (Typ II)

- der Besitz der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) (*Methylococcus*, *Methylocaldum* und *Methylocapsa*) (Baxter *et al.* 2002, NCBI Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/)
- die Fähigkeit zur Ausbildung von Exosporen (*Methylosinus*), Lipidcysten (*Methylocystis*) oder Cysten nach dem Azotobacter-Typ (*Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocaldum* und *Methylosarcina*) als Überdauerungsformen.

Die Einordnung der kürzlich beschriebenen Gattungen *Methylocapsa* und *Methylocella* zu den Typ II Organismen ist nur bedingt möglich. Vertreter der Gattung *Methylocella* weisen ein auf peripher angeordnete Vesikel reduziertes intracytoplasmatisches Membransystem auf (Dedysh *et al.* 2004a, Dedysh *et al.* 2000, Dunfield *et al.* 2003). Das Fettsäureprofil beider Gattungen enthält 18:1 ω 7c als Hauptfettsäure, wohingegen die für Typ II Organismen charakteristische Fettsäure 18:1 ω 8c nicht nachgewiesen wurde (Dedysh *et al.* 2004a). Die wesentlichen Merkmale, die zur Einteilung der MB als Typ I und Typ II dienen, scheinen mehr und mehr an Bedeutung zu verlieren, was nicht nur die neuartigen Charakteristika dieser beiden Gattungen belegen, sondern auch die Tatsache, dass bestimmte physiologische Leistungen wie die Fähigkeit zur Stickstoff-Fixierung oder die Verbreitung des Serin-Weges zur Formaldehyd-Fixierung nicht auf den einen oder anderen Typ beschränkt sind. Zudem existieren unkultivierte MB, die mangels Informationen nicht in dieses System eingeordnet werden können. Aus diesen Gründen werden die Bezeichnungen „Typ I“ und „Typ II“ in dieser Arbeit lediglich als Synonym für „methanotrophe Alphaproteobakterien“ und „methanotrophe Gammaproteobakterien“ verwendet, sollen jedoch nicht auf morphologische oder physiologische Charakteristika der Vertreter des einen oder anderen Typs hinweisen.

Ermöglicht wird die Methanoxidation durch den Besitz der Methan-Monooxygenase (MMO). Mit Ausnahme der Gattung *Methylocella* sind alle MB mit einer membran-gebundenen (partikulären) Methan-Monooxygenase (pMMO) ausgestattet. Das Gen für die cytosolische (lösliche) Methan-Monooxygenase (sMMO) oder das Enzym selbst wurde bei Arten aller Gattungen methanotropher Alphaproteobakterien und der Gattungen *Methylomonas*, *Methylococcus* und *Methylomicrobium* nachgewiesen (Dedysh *et al.* 2002, Dedysh *et al.* 2000, Fuse *et al.* 1998, Heyer *et al.* 2002, Shigematsu *et al.* 1999, Stainthorpe *et al.* 1990). Beide Enzyme katalysieren die Oxidation des Methans zu Methanol unter Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die benötigten Reduktionsäquivalente werden der pMMO über den Chinon/Semichinon/Cytochrom-bc₁-Komplex zur Verfügung gestellt (Zahn

et al. 2001, Zahn und DiSpirito 1996), während die sMMO $\text{NADH} + \text{H}^+$ als Cofaktor benötigt. Die sMMO wird bei niedrigem Kupfer/Biomasse-Verhältnis anstelle der pMMO exprimiert (Murrell *et al.* 2000). Die MB, die die sMMO exprimieren, weisen niedrigere Wachstumserträge auf. Begründet wurde dieses durch eine ungünstigere Energiebilanz, da für die Aktivierung des Substrates mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ ein Elektronen-Donator mit negativerem Redoxpotential bereitgestellt werden muss (Hanson und Hanson 1996, Mancinelli 1995).

Das entstandene Methanol wird im Periplasma mittels Methanol-Dehydrogenase zu Formaldehyd oxidiert. Die dabei freiwerdenden Reduktionsäquivalente werden über den Cofaktor Pyrroloquinolin Chinon (PQQ) und ein spezielles Cytochrom c der Atmungskette zugeführt (Goodwin und Anthony 1998).

Formaldehyd wird im Cytoplasma über den Serin-Weg oder den Ribulose-Monophosphat-Weg assimiliert oder über Formiat bis zum CO_2 oxidiert. Die Oxidation des Formiats katalysiert eine Formiat-Dehydrogenase, welche die freiwerdenden Reduktionsäquivalente auf NAD^+ überträgt. Für die rasche Umsetzung des toxischen Intermediats Formaldehyd zum Formiat stehen den MB verschiedene Wege zur Verfügung. Die Oxidation des Formaldehyds erfolgt über verschiedenartige Formaldehyd-Dehydrogenasen, die die Elektronen entweder auf NAD(P)^+ oder den Cytochrom- bc_1 -Komplex übertragen (Zahn *et al.* 2001). In fünf daraufhin getesteten MB wurde weiterhin ein Tetrahydromethanopterin (H_4MPT)-abhängiger Weg zur Umsetzung des Formaldehyds nachgewiesen (Vorholt *et al.* 1999). Die Bedeutung und das Zusammenspiel aller vorhandener Wege zur Eliminierung des Formaldehyds in einem Organismus, sei es zum Zweck der Assimilation, Dissimilation oder Detoxifikation, ist noch nicht geklärt (Vorholt 2002).

1.2.2 Autotrophe Ammoniak-Oxidierer

Zur Oxidation von Methan unter oxischen Bedingungen sind auch die Bakterien der Gattungen *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* (Betaproteobakterien) und *Nitrosococcus* (Gammaproteobakterien) in der Lage. Diese chemolithoautotrophen Ammoniak-Oxidierer gewinnen Energie durch die Oxidation von Ammoniak und assimilieren CO_2 über den Calvin-Zyklus. Die Oxidation von Methan erfolgt bei diesen Organismen durch eine unspezifische Nebenreaktion der Ammonium-Monooxygenase, einem zur pMMO homologen Enzym (Holmes *et al.* 1995). Die maximale Oxidationsrate der Ammoniak-Oxidierer für Methan ist jedoch 5-fach geringer als die der MB (Bedard und Knowles 1989). Dass Ammoniak-Oxidierer für die Oxidation von Methan in Ökosystemen oft von geringer Bedeutung sind,

wurde für verschiedene Systeme auf unterschiedliche Weise experimentell belegt (Bender und Conrad 1994a, Bodelier und Frenzel 1999, Bosse *et al.* 1993, Jiang und Bakken 1999, Kolb 2003).

1.2.3 Anaerobe methanotrophe Bakterien

In marinen Systemen wurde eine Oxidation von Methan unter anoxischen Bedingungen nachgewiesen (z. B. Barnes und Goldberg 1976, Reeburgh 1976). Der geschätzte Netto-Umsatz durch anaerobe Methanoxidation beläuft sich in marinen Sedimenten auf 75 – 320 Tg Methan pro Jahr (Valentine 2002). Die Fähigkeit der anaeroben Methanoxidation wurde für zwei phylogenetische Gruppen innerhalb der *Archaea* nachgewiesen, ANME-1 und ANME-2, welche mit den *Methanosarcinales* verwandt sind. Der Prozess der Methanoxidation ist an die Sulfat-Reduktion gekoppelt, was die Ausbildung von Konsortien zwischen den Organismen der ANME-Gruppen und den Sulfat-Reduzierern der Gattung *Desulfosarcina* und *Desulfococcus* erklärt (Orphan *et al.* 2001). Die Organismen der ANME-1 Gruppe scheinen auch ohne syntrophen Partner zur anaeroben Methanoxidation in der Lage zu sein (Orphan *et al.* 2002).

Die Methanoxidation erfolgt in den anaeroben Methan-Oxidierern offensichtlich in Form einer reversen Methanogenese. Dafür spricht der Nachweis einer Methyl-Coenzym M Reduktase (MCR) in natürlichen Anreicherungen von ANME-1 Organismen (Krüger *et al.* 2003). Über Fosmid-Genbanken wurden in Anreicherungen von ANME-1 und ANME-2 Organismen neben dem *mcrA*-Gen die Operone für weitere Enzyme der (reversen) Methanogenese nachgewiesen (Hallam *et al.* 2003).

1.3 Methanoxidation und -produktion in Böden

Als Senke für atmosphärisches Methan fungieren „upland soils“. „Upland soils“ sind charakterisiert als nicht-wassergesättigte, gut durchlüftete und überwiegend oxische Böden. Demgegenüber stehen die „wetland soils“ als wassergesättigte und somit anoxische Böden, die Methan emittieren (Conrad 1995). Das Ausmaß der Methanemission in den „wetland soils“ wird bestimmt durch die Zahl und Aktivität der methanogenen Bakterien in den anoxischen Bereichen und den MB, die in den oxisch/anoxischen Grenzschichten leben und zwischen 1 und 90 % des produzierten Methans direkt wieder oxidieren. Zahl und Aktivität der methanogenen und MB an einem Standort werden durch biotische und abiotische

Faktoren determiniert (Conrad 1989, Conrad 1997, Frenzel 2000, Reeburgh *et al.* 1993, Segers 1998).

Böden, deren Wasserhaushalt starken Schwankungen unterlegen ist, zeigen häufig einen Wechsel zwischen Methanemission und Methanaufnahme. So können Sümpfe, Moore und Tundraböden lokal und temporär begrenzt oxische Bedingungen aufweisen und als Netto-Senke für atmosphärisches Methan fungieren (Harriss *et al.* 1982, Klemedtsson und Klemedtsson 1997, MacDonald *et al.* 1996, Whalen 1990). Andererseits können „upland soils“ bei temporär auftretender Wassersättigung, beispielsweise nach starken Niederschlägen oder während der Schneeschmelze, Methan emittieren (Adamsen und King 1993, Castro *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Keller *et al.* 1993, MacDonald *et al.* 1996, Megraw und Knowles 1987, Mosier *et al.* 1993, Silver *et al.* 1999, Smith *et al.* 2000, Wang und Bettany 1995, Wang und Bettany 1997, Wickland *et al.* 1999, Yavitt *et al.* 1990). Auch in „upland soils“ mit einer Netto-Methanaufnahme wurde Methanproduktion nachgewiesen (Andersen *et al.* 1998, Bradford *et al.* 2001, Jensen und Olsen 1998).

In einigen oxischen Waldböden wurde die Methanogenese-Aktivität in der mit organischem Material angereicherten oberen Bodenschicht lokalisiert (Adamsen und King 1993, Amaral und Knowles 1997b, Saari *et al.* 1997, Sexstone und Mains 1990, Yavitt 1995). Methanogenese kann aber auch in tiefer liegenden staunassen Bodenhorizonten stattfinden (Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Klemedtsson und Klemedtsson 1997). Ferner werden anoxische Mikronischen als mögliche Orte für Methanogenese in oxischen Böden diskutiert (Andersen *et al.* 1998, Conrad 1995). Anhand von Reisfeldboden wurde exemplarisch gezeigt, dass kleinere Bodenaggregate (< 6 mm) Methan aus der Atmosphäre oxidieren, während größere Aggregate unter oxischen Bedingungen Methan emittierten (Jäckel *et al.* 2001).

Als Methanogene in oxischen Böden kommen enge Verwandte der bekannten methanogenen *Archaea* im Frage. Nach Inkubation oxischer Böden unter anoxischen Bedingungen konnte das Vorhandensein und die Aktivität methanogener *Archaea* der Gattung *Methanosarcina* und des „Rice cluster 1“ nachgewiesen werden (Nicol *et al.* 2003). Peters und Conrad (1995) reicherten methanogene Bakterien aus oxischen Böden an, die sie aufgrund der Morphologie der Gattung *Methanosarcina* zuordneten.

1.4 „Upland soils“ als Senke für atmosphärisches Methan

Die Funktion des Bodens als Senke für atmosphärisches Methan wurde in den 80er Jahren erkannt. Der Prozess wurde während einer Trockenperiode in einem Sumpfbereich nachgewiesen (Harriss *et al.* 1982). Daran schlossen sich weitere Studien an, in denen diverse „upland soils“ als Senken für atmosphärisches Methan erkannt wurden. Methanaufnahme wurde für unbewirtschaftete Böden (Wald, Wiese, Taiga, Savanne, Wüste) ebenso wie für landwirtschaftlich genutzte Flächen (Weide, Ackerboden) der gemäßigten, subtropischen und tropischen Klimazone nachgewiesen.

1.4.1 Wirkungsweise abiotischer und biotischer Faktoren auf die Methan-Aufnahmerate

Die Methan-Aufnahmerate liegt für die meisten Böden im Bereich von $0,5 - 200 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Smith *et al.* 2000). Sie hängt in großem Maße von der Landnutzung ab. So wurde bei der Umwandlung von Wald in Ackerland ein Rückgang der Methan-Aufnahmerate um 60 – 90 % beobachtet (Smith *et al.* 2000, Mosier *et al.* 1997, Willison *et al.* 1995). Die intensive landwirtschaftliche Nutzung der Böden weltweit hat die Methan-Aufnahmekapazität der „upland-soils“ in den letzten 150 Jahren um schätzungsweise 30 % verringert (Ojima *et al.* 1993). Die Regeneration der Methan-Oxidationsleistung eines Bodens nach Wiederaufforstung einer langjährig landwirtschaftlich genutzten Fläche erfolgt sehr langsam. Für Böden der gemäßigten Breite wurde eine Zunahme der Aktivität um das 2 bis 10-fache im Verlauf von 200 Jahren ermittelt (Smith *et al.* 2000).

Neben der Landnutzung haben weitere Parameter Einfluss auf die Methan-Aufnahmerate eines Bodens (zusammengefasst von Hanson und Hanson 1996, King 1997, Le Mer und Roger 2001). Dazu zählt die Diffusionsgeschwindigkeit der Gase im Boden, welche wiederum von Bodentextur und Wassergehalt abhängt (Adamsen und King 1993, Ball *et al.* 1997, Born *et al.* 1990, Dörr *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1995, Koschorreck und Conrad 1993, Striegel 1993). Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen haben insbesondere bei starken Schwankungen Einfluss auf die Aufnahmerate (Born *et al.* 1990, Crill *et al.* 1994, Dörr *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1993, Koschorreck und Conrad 1993, Steudler *et al.* 1989). Bei landwirtschaftlich genutzten Böden spielt darüber hinaus der Einsatz von Pestiziden und die mechanische Beanspruchung des Bodens eine Rolle (Boeckx *et al.* 1998, Hütsch 1998, Priemé und Ekkelund 2001, Syamsul Arif *et al.* 1996). Kürzlich wurde der Baumbestand

eines Systems als weiterer Faktor diskutiert, welcher die Methanaufnahme beeinflusst (Menyailo *et al.* 2003). Dieser Einfluss ist ein eher indirekter über die Auswirkungen der Vegetation auf den pH-Wert, den Wasserhaushalt, das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis oder den Gehalt an organischem Material eines Bodens.

Der Eintrag von Stickstoff kann eine Stimulierung oder Inhibierung der Methanoxidation zur Folge haben. Die Ursachen für die unterschiedliche Wirkungsweise sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Bodelier und Laanbroek 2004). Die Stimulation der Methanoxidation wurde zurückgeführt auf eine Aufhebung Stickstoff-limitierender Bedingungen im Boden (Bender und Conrad 1995, De Visscher *et al.* 1999, Papen *et al.* 2001), auf Veränderungen in der Zusammensetzung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien (De Visscher *et al.* 2001), auf eine Verbesserung der Nährstoff-Versorgung durch eine stärker entwickelte Vegetation (Veldkamp *et al.* 2001, Kruse und Iversen 1995, Rigler und Zechmeister-Boltenstern 1999) oder auf eine Stimulation der Ammoniak-oxidierenden Bakterien, woraus eine Erhöhung der Methan-Oxidationsrate resultiert (Cai und Mosier 2000, Chan und Parkin 2001). Bei der Inhibierung der Methanoxidation ist zwischen kurzfristigen und langfristigen Effekten zu unterscheiden. Langfristige Effekte resultieren aus Veränderungen sowohl auf Ökosystemebene als auch in der mikrobiellen Lebensgemeinschaft einschließlich der Gilde methanotropher Bakterien (Bodelier und Laanbroek 2004). Kurzfristige Effekte lassen sich durch die unterschiedliche Wirkungsweise von Stickstoff-Verbindungen auf die MB erklären. Ammoniak gilt als kompetitiver Inhibitor der MMO (Dunfield und Knowles 1995). Bei der Umsetzung von Ammoniak durch die MMO entstehen Hydroxylamin oder Nitrit. Beide Substanzen wirken toxisch auf MB und führen ebenfalls zu einer Inhibierung der Methanoxidation (Jollie und Lipscomb 1991, Schnell und King 1994). Nitrat wirkt lediglich in hohen Konzentrationen inhibierend (Adamsen und King 1993, Nesbit und Breitenbeck 1992), vermutlich durch die Wirkung als osmotischer Stressfaktor.

Die maximale Methan-Aufnahmerate ist meist im oberen mineralischen Horizont (A_h) des Bodens lokalisiert. Die Methankonzentration liegt in dieser Schicht schon deutlich unterhalb der atmosphärischen (Adamsen und King 1993, Bender und Conrad 1994b, Crill 1991, Czepiel *et al.* 1995, Henckel *et al.* 2000a, Koschorreck und Conrad 1993, Primé und Christensen 1997, Roslev *et al.* 1997, Schnell und King 1994, Whalen *et al.* 1992). Ursache für diese Lokalisierung ist die Hemmung methanotropher Bakterien in den oberen Bodenschichten durch verschiedene dort vorkommende Substanzen (Amaral und Knowles 1997a). Zu den potentiellen Inhibitoren zählen Ammonium (King und Schnell 1994, Schnell und King 1994, Primé und Christensen 1997), Monoterpene (Amaral und Knowles 1997a,

Amaral *et al.* 1998), Methionin und Ethylen (Chan und Parkin 2000, Jäckel 2001). Auch Acetat und Methanol führten zu einem temporären Einbruch der Methan-Oxidationsaktivität in Bodenproben (Benstead und King 1997). Weitere Ursache ist das in den oberen Bodenschichten stärker schwankende Wasserpotential, auf das MB empfindlich reagieren (Schnell und King 1996). Auch der verstärkte Prädationsdruck in den oberen Bodenschichten wird als mögliche Ursache angeführt (King 1997).

1.4.2 Charakterisierung der Methan-Oxidationskinetik

Eine detaillierte Analyse der „upland soils“ im Hinblick auf die Methan-Oxidationskinetik zeigte, dass diese Böden eine hoch-affine Aktivität aufweisen, charakterisiert durch apparente halbmaximale Sättigungskonstanten ($K_{m(\text{app})}$) im nanomolaren Bereich (Bender und Conrad 1992). Es wurden $K_{m(\text{app})}$ -Werte im Bereich von 10 – 280 nM und apparente maximale Oxidationsraten ($V_{\text{max}(\text{app})}$) von 0,5 – 150 nmol h⁻¹ gdw⁻¹ bestimmt (z. B. Bender und Conrad 1992, Bender und Conrad 1993, Benstead und King 1997, Czepiel *et al.* 1995, Dunfield und Knowles 1995, Gullledge und Schimel 1998, Whalen und Reeburgh 1996). Im Vergleich dazu zeigen Böden, die höheren Methankonzentrationen ausgesetzt sind, $K_{m(\text{app})}$ -Werte im mikromolaren Bereich und höhere $V_{\text{max}(\text{app})}$ -Werte. $K_{m(\text{app})}$ -Werte dieser Systeme liegen bei 1,7 – 11 µM und $V_{\text{max}(\text{app})}$ -Werte bei 0,27 – 3,7 µmol h⁻¹ gdw⁻¹ (z. B. Bender und Conrad 1992, Bender und Conrad 1993, Conrad 1996, Dunfield und Knowles 1995). Die $K_{m(\text{app})}$ -Werte liegen damit in der Größenordnung der Werte für MB, welche mit 0,8 – 2 µM angegeben werden (Joergensen und Degn 1993). In anderen Studien wurden höhere $K_{m(\text{app})}$ -Werte bis maximal 92 µM für MB bestimmt (e. g. Calhoun und King 1998, Carlsen *et al.* 1991, Joergensen und Degn 1987, Lontoh und Semrau 1998, Oldenhuis *et al.* 1991). Die hohen $K_{m(\text{app})}$ -Werte sind jedoch zumindest für Kulturen, die die pMMO exprimieren, umstritten, da bei der experimentellen Durchführung eine Diffusionslimitierung nicht in jedem Fall ausgeschlossen ist (Dunfield *et al.* 1999, Hanson und Hanson 1996, Joergensen und Degn 1983).

Bei der Inkubation von „upland soils“ unter Methan-Mischungsverhältnissen ≤ 170 ppmv kam es zu keiner Steigerung der hoch-affinen Aktivität. Durch Inkubation in Gegenwart von ≥ 1000 ppmv Methan wurde die Induktion einer niedrig-affinen Aktivität beobachtet, vermutlich verbunden mit dem Wachstum niedrig-affiner methanotropher Bakterien (Bender und Conrad 1995, Benstead und King 1997, Schnell und King 1995). Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass nach Vorinkubation der Böden zwei

verschiedene Gruppen Methan-oxidierender Bakterien aktiv waren, die eine Gruppe mit einer hohen Affinität zum Substrat und eine zweite Gruppe mit niedriger Affinität zu Methan. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete hoch-affine Methanoxidation bietet die Postulierung der Existenz unbekannter und bislang unkultivierter Methan-oxidierender Bakterien mit speziellen Anpassungen an das Überleben unter diesen Bedingungen (Amaral *et al.* 1998, Bender und Conrad 1992, King 1993, Roslev *et al.* 1997). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass MB bekannter Gattungen mit deutlich niedrigeren Methankonzentrationen überleben können, als bisher angenommen. Vertreter der Gattungen *Methylococcum*, *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis* und *Methylocella* wurden aus „upland soils“ angereichert oder isoliert (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield *et al.* 2003, Fjellbirkeland *et al.* 2001, Jensen *et al.* 1998a, Øvreås *et al.* 1998). Die Fähigkeit der Methanoxidation und des Wachstums dieser Isolate unter niedrigen Methankonzentrationen wurde jedoch nur für *Methylocystis* sp. LR1 und *Methylocella silvestris* BL2 geprüft (Dedysh *et al.* 2004b, Dunfield *et al.* 1999, Dunfield und Conrad 2000, Dunfield *et al.* 2003).

1.5 Oxidation atmosphärischen Methans durch methanotrophe Bakterien

1.5.1 Methanoxidation durch *Methylocystis* sp. LR1

Das Isolat *Methylocystis* sp. LR1 wurde unter Methan-Mischungsverhältnissen < 275 ppmv aus einem organischen Boden angereichert. Die $K_{m(\text{app})}$ -Werte für diese Anreicherungskultur lagen bei 56 bis 186 nM und stimmten überein mit den $K_{m(\text{app})}$ -Werten des Bodens, aus dem angereichert worden war. Somit kam *Methylocystis* sp. LR1 als Oxidierer des atmosphärischen Methans in diesem Boden in Frage (Dunfield *et al.* 1999). Der niedrigste gemessene $K_{m(\text{app})}$ dieser Kultur ist jedoch noch immer 19-fach höher als der niedrigste für „upland soils“ publizierte Wert (Knief *et al.* 2003).

Erfolgte das Wachstum von *Methylocystis* sp. LR1 in Gegenwart von 1 % Methan, lagen die $K_{m(\text{app})}$ -Werte bei 1,96 – 2,60 μM , also im Bereich der Werte für methanotrophe Reinkulturen. Der $K_{m(\text{app})}$ -Wert eines Isolates variiert somit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration über einen großen Bereich. Da der apparente K_m lediglich die Affinität einer Kultur zum Methan beschreibt und nicht die eines Enzyms, muß die nachgewiesene

Erniedrigung dieses Parameters nicht zwangsläufig das Resultat eines unter Methan-limitierenden Bedingungen exprimierten hoch-affinen Enzymsystems darstellen.

Die niedrigen $K_{m(\text{app})}$ -Werte sind verbunden mit entsprechend erniedrigten $V_{\text{max}(\text{app})}$ -Werten (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield und Conrad 2000). Die Erniedrigung beider Parameter wurde von den Autoren nicht als Resultat einer speziellen Anpassung an Methan-Limitation angesehen, sondern als Resultat dieser Methan-Limitation, da es unter diesen Bedingungen möglicherweise zu einer Limitation an Redoxäquivalenten kommt, welche für die Oxidation des Methans nötig sind. Dadurch wird die Geschwindigkeit, mit der die Methanoxidation erfolgt, nicht mehr bestimmt durch die Verfügbarkeit von Methan, sondern über die Verfügbarkeit des Cosubstrates. Die Folge ist eine Erniedrigung von $V_{\text{max}(\text{app})}$ und $K_{m(\text{app})}$. Die spezifische Affinität (a_s^0), welche sich als Quotient aus beiden Parametern berechnet, veränderte sich nicht oder nur geringfügig unter verschiedenen Inkubationsbedingungen (Dunfield und Conrad 2000). Diese Konstanz der spezifischen Affinität belegt, dass in *Methylocystis* sp. LR1 ein einziges Enzymsystem für die Methanoxidation unter verschiedenen Bedingungen verantwortlich sein kann und die hoch-affine Methanoxidation nicht zwangsläufig auf ein neuartiges Enzym mit hoher Affinität zu Methan zurückzuführen ist (Dunfield und Conrad 2000).

Eine Konstanz der spezifischen Affinität konnte auch in einigen vorinkubierten „upland soils“ beobachtet werden, während es in anderen Böden zu einer Erniedrigung der spezifischen Affinität bei niedrig-affiner Methanoxidation kam. Diese Beobachtung wurde als ein Hinweis dafür gesehen, dass die hoch-affine Methanoxidation in verschiedenen Böden über verschiedene Strategien realisiert ist und nicht zwangsläufig durch unbekannte hoch-affine Methan-Oxidierer erfolgen muss (Dunfield und Conrad 2000).

1.5.2 Mögliche Anpassungen hoch-affiner Methan-oxidierender Bakterien an niedrige Methan-Konzentrationen

Die physiologische Leistung der hoch-affinen Methan-oxidierenden Bakterien besteht in der Fähigkeit, von einem Substrat zu leben, welches in Konzentrationen von $\leq 2,5$ nM vorliegt. Dieser Wert entspricht der Methankonzentration in der Wasserphase eines „upland soils“ unter atmosphärischen Bedingungen. Zu berücksichtigen bleibt, dass dieser Wert von 2,5 nM nur in den obersten Bodenschichten vorliegt (Kap. 1.4.1) und auf ein derzeit deutlich erhöhtes Methan-Mischungsverhältnis der Atmosphäre zurückzuführen ist (Kap. 1.1).

Ein Überleben methanotropher Bakterien unter diesen Bedingungen erscheint unter thermodynamischen und kinetischen Gesichtspunkten möglich (Conrad 1999). Grundsätzlich muß die Oxidationsrate für Methan atmosphärischer Konzentration so hoch sein, dass der Erhaltungsstoffwechsel eines Organismus aufrecht erhalten werden kann. Eine ausreichend hohe Oxidationsrate steht in Zusammenhang mit einem entsprechend niedrigen $K_{m(\text{app})}$ (10 – 100 nM) oder hohen $V_{\text{max}(\text{app})}$ (10 mmol h⁻¹ gdw⁻¹ Zellen). Basierend auf Literaturangaben für diese Parameter kann sich rein rechnerisch in Gegenwart von 2,5 nM Methan eine methanotrophe Population von maximal $1,2 \times 10^7$ Zellen pro Gramm (Trockengewicht) Boden halten (Conrad 1999). Tatsächlich wurden in „upland soils“ $0,9 \times 10^5$ bis $1,0 \times 10^7$ Zellen methanotropher Bakterien pro Gramm Boden (Trockengewicht) bestimmt (Bender und Conrad 1992, Horz *et al.* 2002, Kolb 2003, Willison *et al.* 1997).

Nur wenige MB wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, unter derart niedrigen Methankonzentrationen ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Während *Methylosinus trichosporium* OB3b in Gegenwart von 100 – 1000 ppmv Methan nicht wuchs (Bender und Conrad 1995), wurde *Methylocystis* sp. LR1 erfolgreich unter Methan-Mischungsverhältnissen < 275 ppmv kultiviert (Dunfield *et al.* 1999). Kulturen von *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylomicrobium album* (damals *Methylobacter albus* bzw. *Methylomonas alba*), *Methylococcus capsulatus* Bath und *Methylomonas rubra* oxidierten zwar anfänglich atmosphärisches Methan, innerhalb von 70 Tagen kam es jedoch zu einem Verlust der Aktivität (King 1993, Roslev und King 1994). Die anfängliche Oxidationsrate von *Methylosinus trichosporium* OB3b und *Methylomicrobium album* bei Inkubation unter atmosphärischen Bedingungen war zudem so niedrig, dass $3,8 \times 10^8$ Zellen pro Gramm Boden nötig wären, um die im Boden gemessenen Aktivitäten zu erklären (Schnell und King 1995). Diese Zellzahlen stehen im Widerspruch mit den geschätzten und bestimmten Zellzahlen methanotropher Bakterien in „upland soils“ (siehe oben).

Grundsätzlich wurden verschiedene Anpassungen und Überlebensstrategien der hochaffinen Methan-oxidierenden Bakterien vorgeschlagen und diskutiert, welche das Überleben MB in oxischen Böden unter atmosphärischen Methankonzentrationen erklären.

Hypothese 1: Wachstum mit atmosphärischem Methan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle

Die Oxidation von atmosphärischem Methan wird von MB geleistet, die sich in Ihren physiologischen Eigenschaften deutlich von denen kultivierter methanotropher Bakterien

unterscheiden. Sie zeigen die für die hoch-affine Aktivität charakteristischen niedrigen $K_{m(\text{app})}$ - und $V_{\text{max}(\text{app})}$ -Werte und nutzen atmosphärisches Methan als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle (Bender und Conrad 1992, King 1996, Roslev *et al.* 1997).

Untermauert wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die Methan-oxidierende Aktivität in „upland soils“ nach Inkubation ohne Methan ($< 0,1$ ppmv) abnahm (Gulledge *et al.* 1998, Schnell und King 1995). Bei anschließender 16-tägiger Inkubation unter atmosphärischen Bedingungen konnte die ursprüngliche Aktivität nicht wiederhergestellt werden, woraus die Autoren schlossen, dass die Organismen nicht in der Lage waren, den Substratmangel zu überbrücken (Schnell und King 1995). Ferner wurde ein Verlust der erhöhten Methan-Oxidationsaktivität beobachtet, wenn zunächst mit 1000 ppmv und anschließend unter atmosphärischen Bedingungen inkubiert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass bei 1000 ppmv möglicherweise eine andere Population stimuliert wurde als diejenige, die unter atmosphärischen Bedingungen aktiv war (King 1996, Schnell und King 1995).

Hypothese 2: Oxidation von atmosphärischem Methan in Verbindung mit Cooxidation oder Cometabolismus zusätzlicher Substrate

Neben atmosphärischem Methan nutzen die Methan-Oxidierer möglicherweise weitere Substrate als Energiequelle oder Energie- und Kohlenstoffquelle (King 1993, Nesbit und Breitenbeck 1992, Roslev *et al.* 1997). Die Wachstumserträge von MB bei Wachstum mit Methan sind grundsätzlich NADH-limitiert, da ein großer Teil der Reduktionsäquivalente, welche bei der Oxidation des Methans zum CO_2 freigesetzt werden, für die anfängliche Oxidation des Methans durch die MMO aufgewendet werden müssen (Anthony 1982). Es wird vermutet, dass es bei Substratmangel zu einer Limitation an Reduktionsäquivalenten in der Zelle kommt (Benstead *et al.* 1998, Dunfield *et al.* 1999, Dunfield und Conrad 2000, Hanson und Hanson 1996, Jensen *et al.* 1998b). Durch Cooxidation zusätzlicher Substrate könnte der Mangel an Reduktionsäquivalenten kompensiert werden.

Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass sich die Methan-Oxidationsaktivität einiger Böden nicht änderte, unabhängig davon, ob die Böden zwischenzeitlich Methan-Mischungsverhältnissen von 160 – 1000 ppmv ausgesetzt worden waren oder ohne Methan inkubiert worden waren (Benstead und King 1997, Gulledge *et al.* 1998). Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Aktivität, das Wachstum und das Überleben der Methan-oxidierenden Bakterien nicht allein durch die Verfügbarkeit von Methan bestimmt

wird. Die ausbleibende Stimulation der Methanoxidation bei erhöhten Methan-Mischungsverhältnissen kann durch die Limitierung eines Co-Substrates erklärt werden. Ebenso kann der Erhalt der Methan-Oxidationsaktivität nach Inkubation ohne Methan auf die Nutzung eines zusätzlichen Substrates zurückgeführt werden.

Für einige Böden wurde eine Stimulierung der atmosphärischen Methanoxidation durch Methanol, Formiat oder Acetat beschrieben (Benstead *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998b, Øvreås *et al.* 1998, West und Schmidt 1999). Der stimulierenden Wirkung des Acetats kann eine Stimulation methanogener Organismen zugrunde liegen, wodurch den MB erhöhte Methankonzentrationen zur Verfügung standen (siehe Hypothese 3). Zahlreiche weitere Substrate wie z. B. Glukose, Stärke, Malat, Lactat, Ethanol und β -Hydroxybutyrat hatten in anderen Bodenproben keinen Einfluss auf die Aktivität der atmosphärischen Methanoxidation (Schnell und King 1995).

An Kulturen methanotropher Bakterien konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, atmosphärisches Methan über einen längeren Zeitraum (80 d) zu oxidieren, wenn ihnen zusätzlich Methanol oder Formiat als Substrat zur Verfügung steht (Benstead *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998b).

Die Nutzung zusätzlicher Substrate als Energie- und Kohlenstoffquelle kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Das belegen MB der Gattung *Methylocella*, die nicht nur Methan als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen, sondern auch Acetat, Pyruvat, Succinat, Malat und Ethanol (Dedysh *et al.* 2004b). Der aus einem „upland soil“ isolierte Stamm *Methylocella silvestris* BL2 ist jedoch nicht in der Lage, Methan atmosphärischer Konzentration zu oxidieren (Dunfield *et al.* 2003). Der Schwellenwert für die Methanoxidation konnte in Gegenwart von Acetat zwar gesenkt werden, jedoch nicht bis auf atmosphärische Konzentrationen.

Hypothese 3: Zusätzliche Substrat-Versorgung der methanotrophen Bakterien durch endogene Methanogenese

Die Versorgung der MB erfolgt im Boden mit Methan aus der Atmosphäre plus dem Methan, welches durch methanogene Prozesse im Boden gebildet werden kann (Kap. 1.3) (Benstead und King 1997).

Da die Methanogenese in oxischen Böden in der Regel temporären Schwankungen unterlegen ist, steht der Population der MB unter atmosphärischen Bedingungen gerade ausreichend Substrat für den Erhalt zur Verfügung, während Wachstum nur unter zeitweilig

erhöhten Methankonzentrationen erfolgen kann (Schnell und King 1995). Geht man von einer lokal begrenzt stattfindenden Methanogenese-Aktivität im Boden in anoxischen Mikronischen aus, so könnte man eine entsprechende räumliche Verteilung der MB an der Peripherie dieser anoxischen Mikronischen erwarten (Conrad 1995).

Die endogene Methanogenese liefert letztlich eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass die Methan-oxidierende Aktivität in Bodenproben nach Inkubation ohne atmosphärisches Methan unbeeinflusst war (Benstead und King 1997, Gullede *et al.* 1998). Die Methan-Oxidationsrate konnte in einem „upland soil“ nach Erhöhung des Wassergehaltes, der Gabe von Acetat oder von H_2/CO_2 bei gleichzeitiger O_2 -Limitation stimuliert werden. Die Stimulation dieses Prozesses setzte meist einige Tage später ein und wurde auf eine Stimulierung der Methanogenese in dem Boden zurückgeführt (West und Schmidt 1998, West und Schmidt 1999, West und Schmidt 2002).

1.6 Charakterisierung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in „upland soils“

Die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in Böden erfolgte in den letzten Jahren verstärkt durch kultivierungs-unabhängige Methoden. Diese Methoden beruhen auf dem Nachweis von Zellbestandteilen, welche aufgrund geringfügiger Unterschiede in ihrer Molekülstruktur oder Zusammensetzung eine Identifizierung einzelner Organismen oder Organismengruppen ermöglichen. In erster Linie werden Nukleinsäuren und Phospholipide als molekulare Marker verwendet (Liesack und Dunfield 2002, Zelles 1999). Da diese kultivierungs-unabhängigen Methoden die Möglichkeit bieten, die tatsächlich im Boden vorhandene methanotrophe Gilde zu beschreiben, tragen sie zur Beantwortung der Frage nach den für die atmosphärische Methanoxidation verantwortlichen Bakterien im Boden bei.

1.6.1 Nachweis methanotropher Bakterien über proteinkodierende Gene

Der Nachweis methanotropher Bakterien ist über das 16S rRNA-Gen oder über die proteinkodierenden Gene *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, und *nifH* möglich (Auman *et al.* 2001, McDonald und Murrell 1997a, McDonald und Murrell 1997b, Miguez *et al.* 1997). Die Detektion dieser Gene ist Bestandteil verschiedener molekularbiologischer Methoden zur qualitativen oder quantitativen Charakterisierung der (physiologisch aktiven) methanotrophen

Gilden (z. B. Bodrossy *et al.* 2003, Henckel *et al.* 1999, Horz *et al.* 2001, Kolb *et al.* 2003, Radajewski und Murrell 2002). Das *mmoX*-Gen, welches für die α -Untereinheit der Hydroxylase der sMMO codiert, und das *nifH*-Gen, welches für das Eisenprotein der Dinitrogenase codiert, ist nur in einigen Vertretern der MB vorhanden (vgl. Kap. 1.2.1). Das *mxoF*-Gen codiert für die α -Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase und ist neben den methanotrophen Bakterien in allen gram-negativen methylotrophen Bakterien nachweisbar. Wegen dieser Verbreitung der Gene in einem Teil der MB oder darüber hinaus sind diese Gene nur bedingt zur Charakterisierung der Gilde der MB einsetzbar.

Das *pmoA*-Gen, welches die β -Untereinheit der Hydroxylase der pMMO codiert, ist mit Ausnahme von *Methylocella* in allen Gattungen methanotropher Bakterien vorhanden. Wegen dieser Verbreitung wurde es häufig als phylogenetischer Marker zur Charakterisierung der methanotrophen Gilde in verschiedensten Ökosystemen herangezogen (z. B. Costello und Lidstrom 1999, Hoffmann *et al.* 2002, Holmes *et al.* 1999, Hutchens *et al.* 2004). Ferner entsprechen die phylogenetischen Zusammenhänge, die sich aufgrund der *pmoA*-Sequenzen ableiten lassen, weitestgehend denen 16S rRNA basierter Stammbäume (Heyer *et al.* 2002, Holmes *et al.* 1999, Kolb *et al.* 2003). Ausnahmen in dieser übereinstimmenden Phylogenie bilden einige Isolate methanotropher Alphaproteobakterien, deren *pmoA*-Sequenzen eine höhere Identität zu *amoA*-Sequenzen (Gen für die α -Untereinheit der Ammoniak-Monooxygenase) zeigen als zu *pmoA*-Sequenzen (Pacheco-Oliver 2002). Ferner wurde in einigen methanotrophen Alphaproteobakterien ein homologes *pmoA*-Gen (*pmoA2*) nachgewiesen, welches einen eigenen Abzweig in *pmoA*-basierten Stammbäumen bildet (Dunfield *et al.* 2002, Tchawa-Yimga *et al.* 2003).

Eine Charakterisierung der methanotrophen Gilde in „upland soils“ wurde in mehreren Studien unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt (Bourne *et al.* 2001, Fjellbirkeland *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). Die Charakterisierung beruhte in allen diesen Studien auf dem Nachweis und der phylogenetischen Analyse von *pmoA*-Genen, welche aus DNA-Extrakten der Bodenproben amplifiziert wurden. In den analysierten „upland soils“ wurden Sequenzen detektiert, die auf Vertreter der Gattungen *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, und *Methylococcus* hinweisen (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). Darüber hinaus wurden in einigen dieser Studien verschiedene neuartige *pmoA*-Sequenzen detektiert, die wegen der geringen Ähnlichkeit zu den Sequenzen bekannter MB auf unkultivierte Organismen hinweisen (Bourne *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.*

1999, Jensen *et al.* 2000). Eine weit verbreitete Gruppe von Sequenzen, die sogenannten „forest sequences“, werden im „upland soil cluster α “ (USC α) zusammengefasst (auch „forest cluster“ genannt). Die Sequenzen des USC α wurden überwiegend in Waldböden mit sauren pH-Werten nachgewiesen und sind der Sequenz der acidophilen Gattung *Methylocapsa* am nächsten verwandt. Der Begriff des „upland soil cluster α “ wurde im Rahmen dieser Arbeit eingeführt, um die Sequenzen dieser Gruppe von denen einer zweiten Gruppe namens „upland soil cluster γ “ (USC γ) abzugrenzen (Knief *et al.* 2003). Weitere neuartige *pmoA*-Sequenzen aus „upland soils“ nehmen in phylogenetischen Stammbäumen eine Position zwischen den *pmoA*- und *amoA*-Sequenzen ein (Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Reay *et al.* 2001).

1.6.2 Nachweis physiologisch aktiver methanotropher Bakterien in „upland soils“

Der Nachweis einer methanotrophen Gattung sagt nichts aus über den physiologischen Zustand und somit über die Aktivität eines Organismus im Boden. Zum Nachweis und zur Identifizierung der physiologisch aktiven methanotrophen Bakterien in „upland soils“ wurden in mehreren Studien Bodenproben in Gegenwart von ^{13}C - oder ^{14}C -markiertem Substrat inkubiert (Bull *et al.* 2000, Holmes *et al.* 1999, Roslev und Iversen 1999). Während der Inkubation wurde das Substrat von den stoffwechsel-aktiven Organismen assimiliert und oxidiert. Die Identifizierung der aktiven Zellen erfolgte nach der Inkubation anhand markierter Phospholipid-Fettsäuren (PLFAs). PLFAs eignen sich deshalb als Marker für stoffwechselaktive Organismen, da sie in physiologisch aktiven Zellen einem ständigen Umsatz unterliegen und in relativ konstanten Konzentrationen pro Zelle vorhanden sind (White 1988). MB können aufgrund ihrer ungewöhnlichen PLFAs (vgl. Kap. 1.2.1) leicht identifiziert und differenziert werden (Bowman *et al.* 1991, Guckert *et al.* 1991). Zur Differenzierung der Typ I MB dienen die Hauptfettsäuren der verschiedenen Gattungen. Zu diesen Hauptfettsäuren zählen 14:0, 16:0, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 5t und 16:1 ω 8c (Bowman 2000, Hanson und Hanson 1996). Innerhalb der Typ II MB können die Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* durch ihre Hauptfettsäure 18:1 ω 8c von den Gattungen *Methylocella* und *Methylocapsa* mit 18:1 ω 7c als Hauptfettsäure abgegrenzt werden (Bowman *et al.* 1993, Dedysh *et al.* 2004a).

In verschiedenen Waldböden wurden markierte C_{18} -Fettsäuren nachgewiesen, ein Hinweis auf aktive methanotrophe Alphaproteobakterien (Bull *et al.* 2000, Holmes *et al.*

1999, Roslev und Iversen 1999). In Kombination mit dem Nachweis der bis dahin unbekanntes *pmoA*-Sequenzen des USC α in den selben Böden wurde geschlussfolgert, dass unbekanntes unkultivierte MB für die atmosphärische Methanaufnahme in den Böden verantwortlich waren (Holmes *et al.* 1999). Ebenfalls markiert wurden C₁₇-Fettsäuren, die nur in wenigen MB in Spuren (<1%) vorhanden sind. Die Markierung dieser Fettsäuren fiel deutlich schwächer aus als die der C₁₈-Fettsäuren, war für die Autoren aber dennoch ein weiterer Hinweis auf die Aktivität unbekannter MB in diesen Böden (Holmes *et al.* 1999, Roslev und Iversen 1999).

1.7 Ziele der Arbeit

Das Besondere am Lebensraum „upland soil“ sind die extrem niedrigen Methankonzentrationen, die den Methan-oxidierenden Bakterien in diesen Systemen zur Verfügung stehen. Es gibt Hinweise darauf, dass unbekannte Methan-oxidierende Bakterien an der atmosphärischen Methanoxidation beteiligt sind (Holmes *et al.* 1999). Es wurden jedoch auch Vertreter der bekannten methanotrophen Gattungen in „upland soils“ nachgewiesen. Der Beitrag der nachgewiesenen MB zur Oxidation atmosphärischen Methans ist unbekannt. Versuche mit Reinkulturen weisen darauf hin, dass MB bekannter Gattungen in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen atmosphärisches Methan zu oxidieren (Benstead *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998b). Mit *Methylocystis* sp. LR1 wurde ein methanotrophes Bakterium isoliert, welches weitaus besser unter niedrigen Methankonzentrationen überlebt, als es zuvor durchgeführte Versuche mit MB annehmen ließen (Dunfield *et al.* 1999).

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich folgende Fragestellungen, die durch verschiedene molekularbiologische und mikrobiologische Versuchsansätze aufgeklärt werden sollten:

- Welche MB dominieren in „upland soils“, die sich bezüglich Herkunft, Bodenart, landwirtschaftlicher Nutzung und Pflanzenbewuchs unterscheiden?
- Welche biotischen oder abiotischen Faktoren korrelieren mit dem Vorkommen bestimmter MB in einem „upland soil“ und beeinflussen möglicherweise direkt oder indirekt die Zusammensetzung der methanotrophen Gilde? Hat die Zusammensetzung der methanotrophen Gilde einen Einfluss auf die Methan-Aufnahmerate eines Bodens?
- Welche der nachgewiesenen MB sind im Boden physiologisch aktiv und am Prozess der atmosphärischen Methanoxidation beteiligt? Welchen Beitrag leisten Bakterien der bekannten methanotrophen Gattungen zu diesem Prozess?
- Inwieweit sind Vertreter der bekannten methanotrophen Gattungen in der Lage, unter Methan-Mischungsverhältnissen < 1000 ppmv zu überleben? Existieren Unterschiede zwischen Isolaten aus „upland soils“ und solchen, die von Standorten mit höherer Methan-Verfügbarkeit isoliert wurden?

2 Material und Methoden

An dieser Stelle erfolgt die ausführliche Beschreibung aller verwendeten Materialien und Methoden. Die für die einzelnen Publikationen relevanten Methoden sind im Zusammenhang mit der jeweiligen Publikation nochmals zusammengestellt.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Gase

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (VWR International GmbH, Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Technische Gase lieferte die Messer-Griesheim GmbH (Krefeld). Chemikalien für die Molekularbiologie stammten von den Firmen BioRad (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Q-Biogene (Heidelberg), Applied Biosystems (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Pharmacia Biotech (Freiburg) und Amersham Biosciences (Freiburg). Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) angefordert.

2.1.2 Probestandorte und Probenahme

Die in den Studien analysierten Bodenproben wurden in verschiedenen Regionen Mitteleuropas und in Thailand genommen (Tab. 2.1). Im Rahmen des ersten Projektes wurden ausschließlich terrestrische Böden analysiert. Terrestrische Böden sind definiert als Bildungen außerhalb des Grundwasserbereiches. Die Probestandorte für diese erste Studie wurden ausgewählt unter dem Gesichtspunkt, verschiedene Bodenarten aus unterschiedlichen Regionen und mit unterschiedlicher Landnutzung zu erhalten. Die Festlegung der Probestandorte und damit verbunden die Bestimmung der Bodenart erfolgte anhand von Bodenkarten im Maßstab 1 : 25.000, sofern entsprechende Bodenkarten vorlagen.

In einer zweiten Studie wurden Böden mit hydromorphen Merkmalen analysiert. Diese Böden sind durch zeitweise Überflutung (terrestrische Böden) oder einen Grundwasserstand von weniger als 1,5 m unter der Oberfläche (semiterrestrische Böden) oder beides zusammen gekennzeichnet (Blume *et al.* 2002).

Die Proben einer dritten Studie entstammten einer Experimental-Station in Thailand.

Tabelle 2.1: Auflistung aller Probestandorte mit dem Datum der Probenahme. Angegeben ist außerdem die im weiteren Verlauf verwendete Abkürzung zur Identifizierung der Standorte. Diese Abkürzungen sind den Namen der Bodenproben vorangestellt.

Studie/Standort	Bundesland/Provinz, Land	Probenahme
Studie 1 und 4: Terrestrische Böden der gemäßigten Breiten		
Eiterfeld (E)	Hessen, Deutschland	3. Mai 2001/27. August 2002
Bad Bentheim (BB)	Niedersachsen, Deutschland	1. Juli 2001
Denekamp (BB)	Overijssel, Niederlande	1. Juli 2001
Marburg (M)	Hessen, Deutschland	2. Juli 2001/17. August 2002
Gerold (GE)	Bayern, Deutschland	13. Mai 2001
Welschnofen (WO)	Süd-Tirol, Italien	16. Juni 2001
Völser Aicha (VA)	Süd-Tirol, Italien	16. Juni 2001
Göttingen (G)	Niedersachsen, Deutschland	4. April 2002/27. August 2002
Würzburg (W)	Bayern, Deutschland	9. April 2002
Studie 2: Temporär geflutete Böden der gemäßigten Breiten		
Kitzingen (K)	Bayern, Deutschland	21. August 2003
Gießen (GI)	Hessen, Deutschland	25. Juli 2003
Lich (L)	Hessen, Deutschland	23. August 2003
Oppenrod (O)	Hessen, Deutschland	23. August 2003
Studie 3: Bodenproben aus tropischen Breitengraden		
Sakaerat Experimental Station, Reforestation Research and Training Station und angrenzendes Gebiet	Nakorn Ratchasima, Thailand	27. + 28. Juli 2003

Wurde Waldboden beprobt, wurde die aufliegende Humusschicht entfernt und die Probe dem oberen mineralischen Horizont entnommen (A_h). Bei Grün- und Ackerflächen wurde der Bewuchs entfernt und die Probe unterhalb 5 cm Bodentiefe der mineralischen Schicht (A_p) entnommen. Die Tiefe, bis zu der die Proben entnommen wurde, lag je nach Tiefgründigkeit des Bodens zwischen 10 und 25 cm. In der oberen mineralischen Bodenschicht wurde die höchste Methan-Oxidationsaktivität erwartet (vgl. Kap. 1.4.1).

Nach der Probenahme wurde der Boden auf eine Korngröße ≤ 3 mm gesiebt und für weitere Analysen in Kunststoffgefäßen aus Polyvinylchlorid bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurde ein Teil einer jeden Probe für molekularbiologische Analysen bei -20 °C eingefroren.

2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Bodenproben

2.2.1 Bestimmung des pH-Wertes in Bodenproben

15 g Boden wurde in 30 ml bidestilliertem Wasser gerührt, bis ein konstanter pH-Wert erreicht war, jedoch mindestens 5 min. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mittels pH-Meter (pH540 GLP, WTW, Weilheim). Es wurden jeweils zwei Bestimmungen pro Bodenprobe durchgeführt.

2.2.2 Ermittlung des Trockengewichtes der Bodenproben

10 – 20 g Boden wurde in Aluminiumschalen eingewogen und mindestens 24 h bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen der Proben im Exsikkator über Silicagel wurde das Trockengewicht ermittelt. Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgte für jeden Standort in Parallelen. Aus Feuchtgewicht (F_g) und Trockengewicht (T_g) des Bodens wurde der gravimetrische Wassergehalt (GWC) in Prozent berechnet (Gleichung 1).

$$GWC = \frac{(F_g - T_g)}{T_g} \times 100 \quad (1)$$

2.2.3 Kolorimetrische Bestimmung des Ammonium-Gehaltes in Bodenproben

Zur Ionenextraktion wurde 5 g Boden 1:10 (w/v) mit 1 M KCl-Lösung versetzt und auf einem Horizontalschüttler für 1 h geschüttelt (4 °C, 200 rpm). Nach Zentrifugation (10 min, 4500 × g) wurde der Überstand filtriert (Minisart SRP 15 mit PTFE-Membran und PP-Gehäuse, 0,2 µm, Satorius, Göttingen) und bei –20 °C eingefroren. Die Bestimmung des Ammoniumgehaltes der Filtrate erfolgte kolorimetrisch (Kandeler und Gerber, 1988). Die Extinktion wurde in einem Spektrophotometer (Unikon 30F, Spektrometer 930, Kontron-Instruments GmbH, Stuttgart) bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen.

2.3 Bestimmung der Methan-Oxidationskinetik in Böden

2.3.1 Gaschromatographische Analytik zur Bestimmung der Methan-Mischungsverhältnisse

Methan-Mischungsverhältnisse wurden mit einem SRI 8610C Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) (SRI Instruments, Torrance, CA, USA) bestimmt. Die Detektorsignale wurden mit dem Integrationsprogramm Peak simple (SRI Instruments) ausgewertet. Die Analysebedingungen waren wie folgt:

Säule:	1,8 m lang, 1/8" Durchmesser
	Trennmaterial: 80/100 Porapak Q mesh oder 80/100 Mole Sieve 5A
Gase:	Trägergas: Helium 5.0 (20 ml min ⁻¹)
	Brenngase: Wasserstoff 5.0 (25 ml min ⁻¹) synthetische Luft 5.0 (25 ml min ⁻¹) (20,5 % Sauerstoff 5.0, 79,5 % Stickstoff 5.0)
Temperaturen:	Ofen 100 °C
	Detektor 140 °C

Das eingespritzte Probenvolumen betrug 0,3 oder 0,5 ml, wenn die Gasprobe direkt auf die Säule gegeben wurde. Wurde die Probe über eine Probenschleife auf die Säule geladen, wurden 5 ml Gasprobe eingespritzt.

Es wurden je nach Meßbereich Einpunkt- oder Zweipunkt-Eichungen mit folgenden Eichgasen durchgeführt:

- 2 ppmv CH₄ 2.5 in N₂ 5.0
- 50 ppmv CH₄ 2.5 in N₂ 5.0
- je 1000 ppmv CH₄ 2.5, CO 1.8 und CO₂ 4.5 in N₂ 5.0

2.3.2 Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$, a_s^0 und $K_{m(\text{app})}$ in Bodenproben

10 g gesiebter Boden wurde in 120-ml-Flaschen bei 25 °C inkubiert. Die Flaschen wurden mit Butyl-Gummi-Septen gasdicht verschlossen. Je nach Aktivität wurde über einen Zeitraum von 2 – 25 Tagen das Methan-Mischungsverhältnis in der Gasphase bestimmt. Es wurden jeweils

Triplikate unter atmosphärischen Bedingungen und unter erhöhten Methan-Mischungsverhältnissen im Bereich von 100 – 700 ppmv inkubiert.

Die Berechnung der Stoffmenge aus den Methan-Mischungsverhältnissen erfolgte über das ideale Gasgesetz (Gleichung 2):

$$n = \frac{p \times V}{R \times T} \quad (2)$$

- n: Stoffmenge [mol]
- p: Partialdruck des Methans [kPa]
(1 ppmv = $1,013 \times 10^{-4}$ kPa bei 101,3 kPa Luftdruck)
- V: Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]
- R: ideale Gaskonstante ($8,3144 \text{ kPa l mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
- T: Temperatur [K]

Die Abnahme des Methans in Abhängigkeit von der Zeit erfolgte unter erhöhten Methan-Mischungsverhältnissen linear. Die sich aus diesem Zusammenhang ergebende Steigung wurde durch lineare Regression basierend auf 3 – 12 Messpunkte ermittelt (Excel 2000, Microsoft, CA, USA). Die negative Steigung entspricht der maximalen Methan-Oxidationsrate ($V_{\max(\text{app})}$).

Unter atmosphärischen Bedingungen erfolgte die Abnahme der Methankonzentration logarithmisch. Der durch 4 – 10 Messpunkte vorgegebene Kurvenverlauf wurde an folgende Gleichung (3) bestmöglich angepasst (Origin 6.1, Microcal Software, Inc. Northampton, ME, USA):

$$y = y_0 + A \times e^{-R_0 \times x} \quad (3)$$

Diese Gleichung beschreibt die Abnahme der Methankonzentration (y) in Abhängigkeit von der Zeit (x). Während y_0 den Schwellenwert angibt, bis zu dem Methan oxidiert wird, gibt A die Anfangskonzentration des Methans an. Die Geschwindigkeitskonstante R_0 bei dieser Reaktion erster Ordnung entspricht der spezifischen Affinität (a^0_s). Durch Multiplikation der spezifischen Affinität mit der atmosphärischen Methankonzentration wurde die atmosphärische Methan-Oxidationsrate (V_{atm}) berechnet.

Die halbmaximale Sättigungskonstante $K_{m(\text{app})}$ wurde berechnet über den Zusammenhang:

$$K_{m(\text{app})} = \frac{V_{\text{max}(\text{app})}}{a^0_s} \quad (4)$$

Für die Angabe des $K_{m(\text{app})}$ -Wertes als Mischungsverhältnis [ppmv] wurde das ideale Gasgesetz zugrunde gelegt. Alternativ wurde durch Multiplikation mit dem Ostwald-Koeffizienten (0,03395 bei 25 °C und 101,3 kPa, Wilhelm *et al.* 1977) der $K_{m(\text{app})}$ -Wert bezogen auf in Wasser gelöstes Methan bestimmt.

2.3.3 Aufnahme der vollständigen Methan-Oxidationskinetik

Je 5 ml Bodensuspension, bestehend aus zwei Volumen bidestilliertem Wasser pro Gramm Boden, wurde in 35-ml-Flaschen gefüllt. In den Flaschen wurden Methan-Mischungsverhältnisse zwischen 2 und 200 ppmv eingestellt. Für die Bodenproben der hydromophen Standorte (K M1b, L 61 und L 58) wurden Mischungsverhältnisse bis 2000 ppmv eingestellt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte auf einem horizontalen Schüttler bei 180 rpm und 25 °C. Basierend auf den Methanverbrauch (max. 33 %) innerhalb von 8 h bis maximal 48 h wurden die Methan-Oxidationsraten (V) von je zwei parallelen Ansätzen gemittelt. Diese Raten wurden jeweils gegen die Methan-Mischungsverhältnisse zum zeitlichen Mittelpunkt aufgetragen ($[S]$). Die erhaltenen Graphen ermöglichten die Bestimmung von $V_{\text{max}(\text{app})}$ und $K_{m(\text{app})}$ über die den hyperbolischen Kurvenverlauf beschreibende Gleichung (5):

$$V = \frac{V_{\text{max}(\text{app})} \times [S]}{K_{m(\text{app})} + [S]} \quad (5)$$

Multiplikation mit dem Ostwald-Koeffizienten ermöglichte die Angabe der $K_{m(\text{app})}$ -Werte bezogen auf das im Wasser gelöste Methan.

2.3.4 Bestimmung der Methan-Mischungsverhältnisse im Boden

Zur Bestimmung der Methan-Mischungsverhältnisse im Boden wurde ein 25 cm langes Metallrohr (1/8 Zoll Durchmesser, Wandstärke 0,56 mm) in den Boden getrieben. Aus 10 cm, 15 cm und 20 cm Tiefe wurden Gasproben in 10 ml-Einwegspritzen aufgezogen. Bis zur Analyse im Labor wurden die Spritzen mittels Dreiwegehahn gasdicht verschlossen.

2.4 Molekularbiologische Analysen der Bodenproben

2.4.1 Extraktion der DNA aus Bodenproben

Zur Extraktion der Gesamt-DNA aus den Böden wurde das Fast DNA[®] SPIN Kit (BIO 101, Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Die Extraktion erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift des Kits. 0,5 g Boden wurde zur Lysematrix in ein 2-ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäß gegeben (MULTIMIX 2 Tissue Matrix Tube) und mit 978 µl Natriumphosphat-Puffer und 122 µl MT-Puffer versetzt. Die Zellyse erfolgte in einer Zelmühle (FP 120 FastPrep, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA) bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$ für 45 s. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei $20.000 \times g$ und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit 250 µl PPS (Protein Precipitating Solution) versetzt. Dieses Gemisch wurde für 4 min bei $20.000 \times g$ zentrifugiert, um ausgefällte Proteine, Zellbestandteile und weitere Verunreinigungen abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml DNA Binding Matrix Suspension versetzt. Durch einmütiges Schütteln wurde die DNA an diese Matrix gebunden. Schrittweise wurde die DNA-haltige Matrix auf einen Filter geladen (jeweils Zentrifugation für 1 min bei $12.000 \times g$). Die aufgeladene Matrix wurde mit SEWS-M (Salt/Ethanol Wash Solution) gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Eine zweifache Elution der DNA erfolgte mit jeweils 100 µl DNase-freiem Wasser.

2.4.2 Modifikationen der Methode zur DNA-Extraktion

Im Verlauf der Arbeit wurde das Extraktions-Protokoll an mehreren Stellen modifiziert, um die Ausbeute und Reinheit der extrahierten DNA zu verbessern. Dieses modifizierte Protokoll wurde für die Analyse der Bodenproben temporär gefluteter Standorte und der Bodenproben aus Thailand eingesetzt.

Die Zellyse in der Zelmühle wurde zweifach bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$ für 45 s durchgeführt.

Nach dem Aufschluss der Zellen in den Bodenproben, der Zentrifugation und der Abnahme des Überstandes wurde das Bodenpellet in 500 µl Natriumphosphat-Puffer und 60 µl MT-Puffer resuspendiert und einem zweiten Lyseschritt in der Zelmühle unterzogen.

Um eine höhere Reinheit der DNA zu erhalten, wurde die an die Binding-Matrix gebundene DNA vierfach mit 5,5 M Guanidin-Isothiocyanat-Lösung gereinigt (modifiziert nach Yeates und Gillings 1998). Zunächst wurde die Matrix mit der DNA bei $12.000 \times g$ für

1 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix in jedem Waschschrift in 1 ml Guanidin-Isothiocyanat-Lösung resuspendiert. Der vierte Waschschrift erfolgte mit 600 µl Guanidin-Isothiocyanat-Lösung, um die Suspension in einem Schritt auf den Filter laden zu können.

2.4.3 Reinigung und Konzentrierung der DNA-Extrakte

Gemeinsam mit der DNA wurden Huminstoffe aus den Böden extrahiert. Diese verursachten eine Inhibierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Wilson 1997). Insbesondere in den sauren Waldböden und sandigen Böden war der Gehalt an Huminstoffen hoch. Die DNA-Extrakte waren nicht rein genug, um sie direkt in die PCR einzusetzen. Die Reinigung der DNA-Extrakte erfolgte mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) nach einer von Henckel *et al.* (2000a) etablierten Methode. Das PVPP wurde in 3 M HCl über Nacht gewaschen und in TE-Puffer wieder aufgenommen (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Chromatographiesäulchen (Micro Bio-Spin Chromatography Columns, Bio-Rad) wurden schrittweise mit der PVPP-TE-Suspension beladen (jeweils 1 min Zentrifugation, $375 \times g$) und die Matrix in den Säulchen getrocknet (2 min Zentrifugation, $375 \times g$). Nach dem Auftragen der DNA-Extrakte auf die Matrix wurde die DNA durch 2 min Zentrifugation eluiert, während die Huminstoffe in der PVPP-Matrix zurückgehalten wurden (Holben *et al.* 1988). Um den DNA-Verlust durch diesen Reinigungsprozess zu minimieren, wurde ein zweites Mal mit 150 µl TE-Puffer eluiert.

Zur Aufkonzentrierung und weiteren Reinigung der DNA wurden die gereinigten Extrakte einer Behandlung mit dem QIAquick PCR-Purification KitTM der Firma Quiagen (Hilden) unterzogen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl des Elutions-Puffers.

2.4.4 Amplifikation proteinkodierender Gene mittels PCR

Alle DNA-Extrakte aus Bodenproben wurden in die PCR eingesetzt, um Abschnitte der Gene *pmoA* und *mmoX* zu amplifizieren. Die Amplifikation des *pmoA*-Fragmentes erfolgte mit dem Primer A189 mit angehängter GC-Klammer (A189-GC1) (Henckel *et al.* 1999) in Kombination mit den Primern A682 und mb661 (Tab. 2.2). Der Nachweis des Gens *mmoX* erfolgte mit den Primern mmoXA166 und mmoXB1401 oder einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Primersystem, bestehend aus den Primern (mmoXf945-GC2) und mmoXB1401.

Der Primer mmoXf945 wurde entwickelt, um ein PCR-Produkt zu erhalten, welches die geeignete Länge für eine denaturierende Gradienten-Gelelektrophores (DGGE) besitzt (Kap. 2.4.6). Für die DGGE wurde dem Primer eine von Iwamoto *et al.* (2000) publizierte GC-Klammer angehängt.

Wurde mit keinem dieser Primersysteme ein PCR-Produkt erhalten, so wurde kontrolliert, ob eine Inhibierung der PCR durch zu hohe Hemmstoff-Konzentrationen im DNA-Extrakt vorlag. Bei starker Inhibierung sollte eine Amplifikation des 16S rRNA-Genabschnittes der *Bacteria* mit den Primern 533f und 907b (Tab. 2.2) ebenfalls ein negatives Ergebnis liefern.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Analyse von Bodenproben. Für die DGGE wurden die gekennzeichneten Primer (-GC) um die angegebene Sequenz der GC-Klammer am 5'-Ende verlängert.

Zielgen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Quelle
<i>pmoA</i>	A189(-GC1)	GGG GAC TGG GAC TTC TGG	Holmes <i>et al.</i> 1995
	A682	GAA SGC NGA GAA GAA SGC	Holmes <i>et al.</i> 1995
	mb661	CCG GMG CAA CGT CYT TAC C	Costello und Lidstrom 1999
	A650	ACG TCC TTA CCG AAG GT	Bourne <i>et al.</i> 2001
	New675r	CCY ACS ACA TCC TTA CCG AA	Kolb <i>et al.</i> 2003
<i>mmoX</i>	mmoXA166	ACC AAG GAR CAR TTC AAG	Auman <i>et al.</i> 2000
	mmoXB1401	TGG CAC TCR TAR CGC TC	Auman <i>et al.</i> 2000
	mmoXf945(-GC2)	TGG GGY GNA ATC TGG AT	Knief <i>et al.</i> 2004
16s RNA	533f	GTG CCA GCA GCC GCG GTA A	Weisburg <i>et al.</i> 1991
	907r	CCG TCA AAT TCC TTT GAG TTT	Weisburg <i>et al.</i> 1991
GC1	CCC CCC CCC CCC CGC CCC CCG CCC CCC GCC CCC GCC GCC C		Henckel <i>et al.</i> 1999
GC2	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G		Iwamoto <i>et al.</i> 2000
N = A/T/C/G; S = G/C; R = A/G; M = A/C; Y = C/T			

Die Zusammensetzung der 50- μ l-PCR-Ansätze war wie folgt:

25 μ l MasterAmpTM 2 \times PCR PreMix F

(100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 400 mM pro dNTP,
vierfach konzentrierter PCR-Enhancer)

(Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)

0,5 oder 1,0 μ M je Primer

1 U Taq DNA Polymerase (Q-Biogene)

1 μ l DNA-Extrakt

steriles Wasser (DNase-,RNase-frei; Q-Biogene) ad 50 μ l

Tabelle 2.3: PCR-Bedingungen zur Amplifikation verschiedener Gene zum Nachweis der MB.

Zielgen	Primerpaar	PCR-Temperaturprogramm	Zyklenzahl
<i>pmoA</i>	A189-GC1/A682	94 °C, 60s	35 ^{c, d}
	A189-GC1/mb661	62 – 55 °C ^b , 45s	
	A189/A682 ^a	72 °C, 60s	
	A189/mb661 ^a		
	A189/A650 ^a		
	A189/New675r	94 °C, 60s 73,8 – 66,8 °C ^b , 45s 72 °C, 60s	40
<i>mmoX</i>	mmoXA166/mmoXB1401	94 °C, 60s 55 °C, 90s 72 °C, 60s	35
		mmoXf945-GC2/mmoXB1401	
16S rRNA	533f/907r	94 °C, 30s 60 – 50 °C ^b , 30s 72 °C, 45s	35

^a Primer-Kombination diente der Amplifikation der DNA in ausgeschnittenen DGGE-Banden.

^b Touchdown-Verfahren: bei jedem Zyklus wurde die Annealing-Temperatur um 0,5 °C gesenkt, bis die untere Temperaturgrenze erreicht war. Diese Temperatur wurde bei den verbleibenden Zyklen angewandt.

^c Die Amplifikation des *pmoA*-Fragmentes mittels A189-GC1/mb661 erfolgte für die terrestrischen Böden in 30 Zyklen.

^d Die Amplifikation der DNA in ausgeschnittenen DGGE-Banden wurde in 25 Zyklen durchgeführt.

Die PCR wurde entweder im GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) oder im Primus 96 Cyclyer (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die PCR-Programme zur Amplifikation der verschiedenen Genabschnitte bestanden aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 – 5 min. Die Amplifikation erfolgte spezifisch für jedes Gen (Tab. 2.3). Der finale Elongationsschritt bei 72 °C wurde um 7 min verlängert, bevor die Ansätze auf 4 °C heruntergekühlt wurden.

Eine Kontrolle der PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. 5- μ l-Aliquots der PCR-Ansätze wurden mit Ladepuffer (Gel Loading Solution, Sigma-Aldrich) versetzt und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung (1 h, 100 V) wurden die Gele mit 10.000fach verdünntem Ethidiumbromid angefärbt. Das Ergebnis wurde mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Jet Imager, INTAS, Göttingen) festgehalten. Die korrekte Fragmentgröße wurde über einen auf das Gel mit aufgetragenen DNA-Marker (pBR 328 Mix I, Roth) kontrolliert.

2.4.5 Modifikationen der PCR zur Amplifikation proteinkodierender Gene

Unter den zuvor beschriebenen Bedingungen (Kap. 2.4.4) wurden aus den DNA-Extrakten der Bodenproben temporär gefluteter Standorte und der Bodenproben aus Thailand keine PCR-Produkte erhalten. Daher wurde die Zusammensetzung der 50- μ l-PCR-Ansätze zur Amplifikation von *pmoA* und *mmoX* folgendermaßen modifiziert:

- 5 μ l Accutaq-LA 10 \times Puffer (Sigma-Aldrich)
- 3,5 mM MgCl₂
- 25 μ g Rinder Serum Albumin (BSA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- 200 μ M pro dNTP (Promega)
- 1,0 μ M je Primer
- 2,5 U REDAccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich)
- 1 μ l DNA-Extrakt
- steriles Wasser ad 50 μ l

Neben der Modifikation der PCR-Ansätze wurde das PCR-Programm für beide *pmoA*-Primersysteme wegen des Auftretens unspezifischer Nebenprodukte verändert. Die Annealing-Temperatur wurde um 2 °C erhöht, resultierend in einem Touchdown von 64 °C auf 57 °C.

Ein zusätzliches Primersystem (Tab. 2.2) wurde eingesetzt, um speziell das Vorhandensein von *pmoA*-Sequenzen des USC α in den Proben K M1b, L 61 und L 58 nachzuweisen. Eine Kombination des Primers A189 mit dem spezifisch zur Detektion dieser Sequenz-Gruppe entwickelten Primer New675r (Kolb *et al.* 2003) wurde den in diesem Kapitel beschriebenen PCR-Ansätzen mit 4 mM MgCl₂ zugesetzt. Die PCR wurde unter den in Tabelle 2.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert.

2.4.6 Auftrennung gemischter PCR-Produkte mittels DGGE

Die Amplifikation eines Genabschnittes aus den DNA-Extrakten der Bodenproben resultierte in einem Gemisch verschiedener PCR-Produkte des Gens, basierend auf der Diversität der Zielorganismengruppe im Boden. Zur Auftrennung der verschiedenen PCR-Produkte wurde die „Fingerprinting“-Methode DGGE angewandt. Diese Technik ermöglicht die elektro-

phoretische Trennung kurzer Genabschnitte (bis ca. 600 bp) in einem denaturierendem Polyacrylamidgel mit linearem Harnstoff/Formamid-Gradienten. Resultierend aus den Sequenzunterschieden zeigen die verschiedenen PCR-Produkte unterschiedliches Schmelzverhalten. Die entstehenden Sekundärstrukturen bewirken eine unterschiedlich hohe elektrophoretische Mobilität der DNA-Stränge (Fischer und Lerman, 1983, Muyzer *et al.* 1993), was letztlich zur Auftrennung der PCR-Produkte und Bildung distinkter Banden führt. Das vollständige Denaturieren der doppelsträngigen DNA wird durch die an einen der Primer angehängte GC-Klammer verhindert (Tab. 2.2).

Die Auftrennung der *pmoA*-Fragmente mittels DGGE wurde durchgeführt in Anlehnung an Henckel *et al.* (1999). Sie erfolgte in 1 mm dicken Polyacrylamid-Gelen mit einem denaturierenden Gradienten von 35 – 80 % in 0,5× TAE-Puffer (Stocklösung: 50× TAE-Puffer, BioRad) im D GENE™ System (BioRad). Zur Herstellung der Gele wurde eine 0 % denaturierende und eine 80 % denaturierende Stocklösung verwendet:

0 % denaturierende Stocklösung:

6,5 % (w/v) Acrylamid:Bis Acrylamid (37,5:1) (BioRad)
0,5× TAE-Puffer (Stock: 50× TAE-Puffer, Bio-Rad)
bidestilliertes Wasser

80 % denaturierende Stocklösung:

6,5 % (w/v) Acrylamid:Bis Acrylamid (37,5:1) (BioRad)
0,5× TAE-Puffer (Stock: 50× TAE-Puffer, Bio-Rad)
5,6 M Harnstoff
32 % (v/v) Formamid, deionisiert
bidestilliertes Wasser

50× TAE-Puffer (Tris/Acetic Acid/EDTA Buffer) (BioRad):

2 M Tris
1 M Essigsäure
50 mM EDTA
pH 8,3

Pro Gel wurden je 10 ml einer 80 % und 35 % denaturierenden Lösung aus den Stocklösungen hergestellt. 7 ml der 0 % denaturierenden Lösung dienten zum Überschichten der

Gele. Zum Auslösen der Polymerisationsreaktion wurde jeder Lösung 50 µl 10%ige Ammonium-Persulfat-Lösung und 5 µl TEMED (BioRad) zugesetzt. Das Gießen der Gele erfolgte mit Hilfe eines Gradientenformers (Model 385, BioRad), gekoppelt an eine Minipuls 3 Peristaltikpumpe (Gilson International, Bad Camberg). Die Polymerisation der Gele erfolgte über Nacht. Zur leichteren Handhabung der Gele nach der Elektrophorese wurden diese auf GelBond PAG Folien (FMC, Bioproducts, Rockland, USA) gegossen.

20 – 40 µl PCR-Produkt wurden mit Ladepuffer versetzt und auf die Gele aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 180 V und 61 °C für 5 h. Zum Visualisieren der Banden wurden die Gele mit 50.000fach verdünntem Sybr-Green I (BMA, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) für 30 min angefärbt. Das Scannen der Gele erfolgte an einem Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Einzelne Banden wurden mittels steriler Kanülen über einem Durchlichtgerät (Dark Reader; Clare Chemical Research, Ross on Wye, UK) ausgeschnitten. Die Anregung des Farbstoffes erfolgt hierbei nicht im UV-Bereich sondern bei 497 nm. Dadurch wird eine Schädigung der DNA durch UV-Strahlung vermieden. Die ausgeschnittenen Gel-Fragmente wurden in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Während dieser Lagerung diffundierte die DNA aus den Gel-Fragmenten in den Puffer.

2.4.7 Amplifikation der Banden aus DGGE-Gelen

Die DNA der ausgeschnittenen DGGE-Banden wurde erneut in eine PCR eingesetzt, wie in Tab. 2.3 beschrieben. Ausreichend Matrizen-DNA war in 1 µl des DNA-haltigen TE-Puffers enthalten. PCR-Produkte von Banden, die im DGGE-Gel dicht beieinander gelegen hatten, wurden erneut auf ein DGGE-Gel aufgetragen, um zu bestätigen, dass das PCR-Produkt so sauber ausgeschnitten wurde, dass es einer einzelnen Bande entsprach.

Einige PCR-Produkte zeigten in den Agarose-Gelen neben der Bande des *pmoA*-PCR-Produktes eine oder mehrere zusätzliche Banden. Bei anderen PCR-Produkten stellte sich bei der Sequenzierung heraus, dass diese mehr als ein einen Sequenz-Typ enthielten. In diesen Fällen wurden eine oder mehrere der folgenden Prozeduren angewendet:

- Primer mb661 oder A650 (Tab. 2.2) wurden zur Amplifikation der DNA der DGGE-Bande eingesetzt (Tab. 2.3).
- Das gesamte PCR-Produkt wurde auf ein Agarose-Gel geladen. Nach Färbung des Gels mit SybrGreen und Visualisierung auf dem Durchlichtgerät wurde die Bande, die auf Höhe des *pmoA*-Produktes lag, ausgeschnitten und mittels Qiaquick Gel

Extraction KitTM (Qiagen) gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde direkt in die nachfolgende Sequenzierungs-Reaktion eingesetzt.

- Das PCR-Produkt wurde in einen pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert und dieser anschließend in *E. coli* transformiert. Hierzu wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) eingesetzt. 10 – 20 auf Selektiv-Platten erhaltene positive Klone wurden gepickt und direkt in eine PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit den Primern A189-GC und A682 (bzw. mb661) durchgeführt (Tab. 2.2). PCR-Produkte mit der korrekten Größe in Agarose-Gelen wurden erneut auf DGGE-Gele aufgetragen. Die Position der PCR-Produkte aus den Klonen wurde mit der Original-Bande verglichen. Im Verlauf der Arbeit wurde auf diesen Vergleich verzichtet, und zwei bis vier PCR-Produkte mit korrekter Größe im Agarose-Gel wurden für eine Sequenzierung aufgearbeitet.

2.4.8 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach dem Kettenabbruch-Prinzip (Sanger *et al.* 1977) unter Verwendung von vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotid-Triphosphaten. Die Sequenzier-Reaktion mit diesen Dye-Terminatoren wurde mit dem ABI PRISM[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Reaktion wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR-Purification KitTM gereinigt, und die Konzentration der gereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg). Die 10- μ l-Reaktionsansätze für die Sequenzier-Reaktion enthielten ca. 60 – 80 ng DNA, 5 pmol Primer, 3 μ l Terminator Ready Reaction Mix und steriles Wasser. Überschüssige Primer und Dye-Terminatoren wurden nach der PCR (94 C° für 3 min; 25 Zyklen: 96 °C für 10 s, 50 °C für 5 s und 60 °C für 4 min; 4 °C, ∞) mittels Microspin G-50 Chromatographiesäulen (Pharmacia Biotech) entfernt, die DNA unter Vakuum getrocknet und in 2 μ l Formamide Loading Dye (Amersham Biosciences) aufgenommen. Vor dem Beladen des Sequenziergels wurde die DNA für 3 min bei 90 °C denaturiert und bis zum Auftragen bei 4°C gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurde am ABI PRISM 377 DNA Sequenzierer (Perkin Elmer Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5 Phylogenetische Auswertung der DNA-Sequenzen

Alle DNA-Sequenz-Rohdaten wurden mit dem Programm SeqMan 4.05 der Lasergene-Software (DNASTAR, Madison, Wis, USA) einer Qualitätskontrolle unterzogen. Ferner wurden die Sequenzen solcher Gene zusammengesetzt, welche in beide Richtungen sequenziert worden waren oder aufgrund ihrer Länge abschnittsweise sequenziert werden mussten (Vollsequenzen des 16S rRNA-Gens, Kap. 2.9.2).

Die phylogenetische Einordnung von DNA- oder Proteinsequenzen diente der Identifizierung der Mikroorganismen, dessen Genabschnitte amplifiziert und sequenziert worden waren. Grundlage für eine derartige Einordnung war die vergleichende Sequenzanalyse. Sie erfolgte mit der ARB-Software (Version 2.5b) (<http://www.arb-home.de>, Strunk *et al.* 1998) und dem PHYLIP Software Paket (Version 3.6a2.1) (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>, Felsenstein 1993). In ARB wurden Datenbanken für die proteinkodierenden Gene *pmoA*, *mxoF* und *moxX* erstellt, die alle öffentlich verfügbaren Sequenzen enthielten (entnommen der öffentlichen Datenbank „Genbank“ des National Center of Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>; Stand: Dezember 2003). Die *pmoA*-Datenbank enthielt wegen der Sequenz-Homologie neben *pmoA*-Sequenzen auch ausgewählte *amoA*-Sequenzen. Zur Identifizierung methanotropher Isolate wurde eine 16S rRNA-Gen-Datenbank genutzt.

Die editierten DNA-Sequenzen wurden zunächst mit der in ARB enthaltenen FAST-Aligner Software (Version 1.03) gegen die Sequenzen in der Datenbank ausgerichtet, so dass homologe Nukleotidpositionen in Spalten untereinander standen. Das Ergebnis dieses automatischen Prozesses wurde bei Bedarf manuell korrigiert. Die DNA-Sequenzen proteinkodierender Gene wurden anschließend in Protein-Sequenzen übersetzt. Phylogenetische Stammbäume der proteinkodierenden Gene wurden anhand dieser abgeleiteten Aminosäuresequenzen berechnet, da der evolutionäre Selektionsdruck bei Proteinen auf der Aminosäuresequenz liegt.

2.5.1 Phylogenetische Einordnung der Sequenzen proteinkodierender Gene

Zur Identifikation der Protein-Sequenzen wurde zunächst ein Stammbaum aller in der Datenbank enthaltener Sequenzen berechnet. Die Berechnung basierte auf das Distanz-Matrix-Verfahren. Binäre Sequenzunterschiede waren Grundlage für die Erstellung einer Distanz-Matrix. Die Distanzwerte wurden auf Grundlage eines von Kimura *et al.* (1983)

entwickelten Evolutionsmodells in phylogenetische Distanzwerte umgerechnet. Diese phylogenetischen Werte dienten der Berechnung eines Stammbaumes nach der Neighbor-Joining Methode (Saitou und Nei 1987). In dem resultierenden Stammbaum spiegeln die horizontalen Zweiglängen die phylogenetischen Distanzen wider. Basierend auf die erhaltenen Stammbäume wurde eine Auswahl an Sequenzen getroffen, anhand derer die phylogenetische Einordnung der zu identifizierenden Sequenzen übersichtlich dargestellt wurde.

Neben der phylogenetischen Einordnung nach dem Distanz-Matrix Verfahren erfolgte die Berechnung phylogenetischer Stammbäume im Rahmen der ersten Studie auch über das Maximum Parsimony- und Maximum-Likelihood-Verfahren. Auf diese Weise wurde die Einordnung der neuartigen *pmoA*-Sequenzen des „Upland soil cluster γ “ (USC γ) abgesichert. Die resultierenden Stammbäume wurden verglichen und ein Konsensusbaum wurde erstellt, um die aus verschiedenen Algorithmen resultierenden phylogenetischen Zusammenhänge zusammenfassend darzustellen. Grundlage für den Konsensusbaum war ein über das Distanz-Matrix-Verfahren berechneter Stammbaum, in dem Übereinstimmungen und Unterschiede zu den anderen Stammbäumen kenntlich gemacht wurden. Das Maximum Parsimony-Verfahren versucht, die Verwandtschaft der Sequenzen über eine minimale Anzahl von Aminosäure-Austausche zu erklären. Der errechnete Stammbaum besitzt die geringstmögliche Gesamt-Zweiglänge (Fitch 1971). Berechnungen nach dem Maximum Likelihood-Verfahren resultieren in Stammbäumen, deren Topologie am wahrscheinlichsten die Evolution der Sequenzen erklärt. Bei der Berechnung können verschiedene Evolutionsmodelle zugrunde gelegt werden (Felsenstein 1981). Der Informationsgehalt der Aminosäure-Sequenzen wird bei diesem Verfahren am effizientesten genutzt.

Weitere im Rahmen dieser Arbeit dargestellte phylogenetische Stammbäume wurden mit dem Treepuzzle-Verfahren berechnet (Strimmer *et al.* 1996). Den Berechnungen wurde das Evolutionsmodell von Jones Taylor und Thornton (JTT) zugrunde gelegt (Jones *et al.* 1992). Bei dieser Berechnungsmethode werden zunächst Maximum-Likelihood Bäume aus je vier Sequenzen berechnet. Schrittweise werden dann weitere Sequenzen eingefügt. Dieses Verfahren wurde in 10.000 – 25.000 Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse aller Wiederholungen wurden in einem Konsensusbaum dargestellt. Knoten, die in weniger als 50 % der Bäume konstruiert werden, werden bei diesem Verfahren als Mehrfachverzweigungen dargestellt. Die Topologie dieses Konsensus-Baumes reflektierte die Topologie, die Bäume zeigten, welche über das Distanz-Matrix- und Maximum-Likelihood-Verfahren berechnet worden waren.

2.5.2 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gene

Basierend auf einem vorab gerechneten Stammbaum nach dem Distanz Matrix-Verfahren, welcher alle in der Datenbank vorhandenen vollständigen 16S rRNA-Gen-Sequenzen methanotropher Bakterien enthielt, wurde eine Auswahl an Sequenzen getroffen, anhand derer die phylogenetische Einordnung der zu identifizierenden Sequenzen dargestellt wurde. Die Berechnung dieses Stammbaumes erfolgte über das Treepuzzle-Verfahren unter Verwendung des HKY Evolutionsmodells von Hasegawa (Hasegawa *et al.* 1985). Für die Berechnung wurden nur die Nukleotid-Positionen berücksichtigt, die bei mehr als 50 % der betrachteten Sequenzen identisch waren. Durch Einsatz dieses Filters wurden die hochvariablen Regionen der 16S rRNA bei der Konstruktion des phylogenetischen Stammbaumes ausgeschlossen.

2.6 Markierungsexperimente mit $^{13}\text{CH}_4$

2.6.1 Inkubation der terrestrischen Bodenproben mit $^{13}\text{CH}_4$

Zur Inkubation der Bodenproben MF, G 15F, G 44F und E 5FB mit ^{13}C -markiertem Methan (99 %, Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA), wurde 25 g gesiebter Boden in 1000-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Die Kolben wurden mit Silikon-Septen und Schraubdeckel gasdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C über einen Zeitraum von 28 Tagen. Zu Versuchsbeginn wurde ein Methan-Mischungsverhältnis von 50 ppmv eingestellt. Die Abnahme des Methans wurde gaschromatographisch verfolgt. Das anfängliche Methan-Mischungsverhältnis von 50 ppmv wurde jedes Mal dann wieder eingestellt, wenn das Mischungsverhältnis unter 10 ppmv abgesunken war. Um zu verhindern, dass das während der Inkubation entstehende $^{13}\text{CO}_2$ von autotrophen Mikroorganismen inkorporiert wurde, wurde ein Reagenzglas mit 5 ml 5 M NaOH-Lösung mit in die Erlenmeyerkolben gegeben. Da nach zwei Wochen Inkubation dennoch ein geringer Anstieg (< 1 atom %) des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopen-Verhältnisses im CO_2 der Gasphase nachweisbar war (Analyse per Gaschromatograph-Isotopen-Massenspektrometer, GC-IRMS, Kap. 2.6.6), wurden die Kolben zu diesem Zeitpunkt mit Luft gespült und die NaOH-Lösung in den Reagenzgläsern erneuert. Für jede Bodenprobe wurden neben den Triplikaten mit $^{13}\text{CH}_4$ Triplikate mit unmarkiertem CH_4 analysiert.

2.6.2 Inkubation der Bodenproben temporär gefluteter Standorte mit $^{13}\text{CH}_4$

Zur ^{13}C -Markierung der Bodenproben K M1b, L 61 und L 58 von temporär gefluteten Standorten wurden die zuvor beschriebenen Inkubationsbedingungen modifiziert. Die eingesetzte Menge an gesiebt Boden wurde auf 15 g reduziert. Das Methan-Mischungsverhältnis lag während der 40-tägigen Inkubation zwischen 30 und 5 ppmv. Nur kurzzeitig lagen $^{13}\text{CH}_4$ -Mischungsverhältnisse bis 60 ppmv vor. Der Verbrauch dieser Überschüsse dauerte längstens 5 Tage. Anstatt Reagenzgläser mit NaOH-Lösung zuzugeben, um entstehendes $^{13}\text{CO}_2$ zu fixieren, wurde das Mischungsverhältnis des CO_2 auf etwa 2650 ppmv erhöht, um entstehendes $^{13}\text{CO}_2$ zu verdünnen. Ferner wurden die Kolben alle zwei Wochen mit Luft gespült. Pro Bodenprobe wurden jeweils Duplikate mit $^{13}\text{CH}_4$ und unmarkiertem CH_4 angesetzt. Neben den Ansätzen mit Methan-Mischungsverhältnissen unter 30 ppmv wurden Ansätze über einen Zeitraum von 5 Tagen inkubiert, die während der Inkubation Methan-Mischungsverhältnissen zwischen 570 und 430 ppmv $^{13}\text{CH}_4$ ausgesetzt waren.

2.6.3 Inkubation methanotropher Reinkulturen mit $^{13}\text{CH}_4$

Methanotrophe Reinkulturen wurden in Gegenwart von $^{13}\text{CH}_4$ inkubiert, um zu zeigen, dass MB ^{12}C und ^{13}C in gleicher Weise in die Fettsäuren der Phospholipide einbauen. Der Stamm *Methylosinus trichosporium* KS24b repräsentiert einen Vertreter der methanotrophen Alphaproteobakterien, während *Methylocaldum* sp. E10a den methanotrophen Gammaproteobakterien angehört. Die von der *pmoA*-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz beider Organismen ist identisch mit Sequenzen, die in den Proben der terrestrischen Böden nachgewiesen wurden. Die Anzucht der Organismen in 200 ml Medium 10 (Kap. 2.7.2) erfolgte in gasdichten 500-ml-Schraubflaschen mit Schikanen in Gegenwart von 19 % (v/v) CH_4 plus 1 % (v/v) $^{13}\text{CH}_4$ (markiert) oder mit 20 % (v/v) CH_4 (unmarkiert).

2.6.4 Inkubation von Bodenproben mit $^{13}\text{CO}_2$

Neben der Inkubation mit $^{13}\text{CH}_4$ wurden die Bodenproben MF und G 44F für 28 Tage mit $^{13}\text{CO}_2$ inkubiert. Den Inkubationsansätzen wurde soviel $^{13}\text{CO}_2$ zugegeben, dass das Mischungsverhältnis des $^{13}\text{CO}_2$ bei 225 ppmv lag. Das entsprach der Menge an $^{13}\text{CO}_2$, die entstanden wäre, wenn die gesamte Menge an $^{13}\text{CH}_4$, die während der Inkubation dem

aktivsten Boden zugesetzt worden war, zu $^{13}\text{CO}_2$ umgesetzt worden wäre. Das zugefügte $^{13}\text{CO}_2$ wurde aus 3 ml 0,33%iger $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ -Lösung ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$: 99,9 %, Cambridge Isotope Laboratories) durch Säurezugabe in einer mit einem Butyl-Gummi-Septum gasdicht verschlossenen 120-ml-Flasche freigesetzt und dann per Spritze den Inkubations-Ansätzen zugefügt. Die CO_2 -Mischungsverhältnisse wurden gaschromatographisch kontrolliert.

2.6.5 Gaschromatographische Bestimmung von CO_2 -Mischungsverhältnissen

CO_2 wurde über einen GC-8A GC-FID (Shimadzu, Kyoto, Japan) detektiert. Die Detektion des CO_2 erfolgte indirekt nach Umwandlung in CH_4 über einen Methanisator. Die Detektorsignale wurden über einen angeschlossenen C-R A6 Integrator (Shimadzu) analysiert. Die Analysebedingungen waren wie folgt:

Säule:	2 m lang, Durchmesser 1/8"
	Trennmaterial: Porapak QS 50/100 mesh
Methanisator:	Eigenbau
	20 cm Edelstahlsäule, Durchmesser 1/8"
	NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande)
Gase:	Trägergas: Wasserstoff 5.0
	Brenngase: Wasserstoff 5.0
	synthetische Luft 5.0
	(20,5 % Sauerstoff 5.0, 79,5 % Stickstoff 5.0)
	Quenchgas: Stickstoff 5.0
Temperaturen:	Ofen 40 °C
	Methanisator 350 °C
	Detektor 110 °C

Das eingespritzte Probenvolumen betrug 0,3 ml. Es wurde eine Einpunkt-Eichung mit dem Gasgemisch bestehend aus je 1000 ppmv CH_4 , CO und CO_2 in N_2 durchgeführt.

2.6.6 Bestimmung des Isotopenverhältnisses von CO_2

Zur Bestimmung des Isotopen-Verhältnisses von CO_2 wurde ein GC-IRMS der Firma Finnigan (Thermoquest, Bremen) eingesetzt. Das Gerät bestand aus einem Hewlett Packard

6890 Gaschromatographen, gekoppelt an einen Finnigan MAT delta plus Isotopen-Massenspektrometer. Die Analysebedingungen waren wie folgt:

Säule: Pora PLOT Q
Länge 27,5 m, Durchmesser 0,32 mm, Schichtdicke 10 µm
(Chrompack, Frankfurt)

Gase: Trägergas: Helium 5.0 (2,8 ml min⁻¹)

Temperaturen: Injektorblock 150 °C
Ofen 30 °C
Oxidations-Reaktor 940°C
Reduktions-Reaktor 650°C

Splitverhältnis: 10:1

Säulenvordruck: 82,7 kPa

Zur Analyse wurden 10 - 400 µl Probe injiziert. Die Messdaten wurden über die ISODAT™ Software (Finnigan, Bremen) ausgewertet. Die Angabe der Isotopenverhältnisse erfolgte gegen Vienna PeeDee Belemnite Carbonat über CO₂ 4.8 als Arbeitsstandard.

2.6.7 Extraktion von Fettsäuren aus Bodenproben

Die Extraktion und Aufarbeitung der Bodenproben zur Gewinnung von Fettsäuremethylestern (FAMES) wurde nach Knief *et al.* (2003) durchgeführt. Die Methode besteht im wesentlichen aus drei Schritten:

1. Extraktion der Lipide aus den Bodenproben, modifiziert nach Bligh und Dyer (1959),
2. chromatographische Auftrennung der Lipide zur Gewinnung der Phospholipide (Zelles und Bai 1993),
3. Überführung der Phospholipide in FAMES durch alkalische Methanolyse (White *et al.* 1979).

Die Extraktion der Lipide erfolgte mittels Chloroform aus 10 g Boden (Feuchtwicht). Der Boden wurde in 100-ml-Schraubdeckelflaschen eingewogen und mit 6 ml 50 mM Phosphatpuffer (8,7 g/l K₂HPO₄, pH 7,4 mit 1 N HCl eingestellt), 18 ml Methanol und 7,5 ml Chloroform versetzt. Nach 2-stündiger Extraktion auf einem Horizontal-Schüttler (250 rpm) wurde durch Zugabe von 7,5 ml Chloroform und 7,5 ml bidestilliertem Wasser eine

Phasentrennung ausgelöst. Zur vollständigen Trennung der organischen Phase von der wässrigen Phase wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die untere chloroformhaltige Phase, die die Lipide der Zellmembran enthielt, wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und über Na₂SO₄ entwässert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Lipide bei 4 °C gelagert.

Die chromatographische Auftrennung der Lipide in Neutrale Lipide, Glyko- und Phospholipide erfolgte über eine Silicagelsäule (CUSIL15Z: 0,5 g Sorbent, 10 ml Reservoir; ICT, Bad Homburg). Nach Equilibration der Säule mit 6 ml Chloroform wurde die im Rotationsverdampfer auf 1 ml eingeeengte Probe aufgetragen. Die Elution der einzelnen Lipidfraktionen erfolgte schrittweise mit 6 ml Chloroform, 6 ml Aceton und 15 ml Methanol. Die im Methanol enthaltene Phospholipidfraktion wurde bis zur Trockne eingeeengt, die Wiederaufnahme erfolgte in 1 ml Methanol/Toluol (1 : 1; v/v).

Die Umsetzung der Phospholipide zu FAMES erfolgte nach Zugabe von 1 ml frischer 0,2 N methanolischer KOH während 15-minütiger Inkubation bei 37 °C. Zur Neutralisation und Gewinnung der FAMES wurden 2 ml Hexan, 0,3 ml 1 M Essigsäure und 2 ml bidestilliertes Wasser zugegeben. Nach 5 min Überkopf-Schütteln wurde durch 3-minütige Zentrifugation (1000 × g) die Phasentrennung erreicht. Die Hexanphase mit den FAMES wurde in GC-Vials überführt und auf ca. 100 µl im Stickstoffstrom (N₂ 4.6) eingeeengt. Bis zur gaschromatographischen Analyse der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

Die Gewinnung der FAMES aus methanotrophen Reinkulturen erfolgte nach der gleichen Methode. Nach Anzucht der Stämme in Flüssigkultur wurden die Kulturen zentrifugiert (10.000 × g, 20 min) und zweifach mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in dem zur Fettsäureextraktion genutzten Phosphatpuffer resuspendiert.

2.6.8 Analyse der FAMES

Die Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung der FAMES erfolgte an einem Gaschromatographen mit Massenspektrometer (GC-MS). Zur Bestimmung der Position von Doppelbindungen in einfach ungesättigten Fettsäuren wurden die FAMES einer Dimethyldisulfid-Derivatisierung unterzogen (Nichols *et al.* 1986). Dabei reagieren die beiden C-Atome der Doppelbindung in einer Iod-katalysierten Reaktion mit dem Dimethyldisulfid unter Ausbildung von SCH₃-Gruppen. Die entstehenden FAME-Derivate

bilden bei der GC-MS-Analyse charakteristische Ionen-Fragmente, anhand derer auf die Position der Doppelbindung geschlossen werden kann.

Die Quantifizierung der Markierung erfolgte nach Analyse der FAMES an einem Gaschromatographen mit Isotopen-Massenspektrometer (GC-IRMS). Die Verwendung der gleichen Säule und eines ähnlichen Temperaturprogramms zur Auftrennung der FAMES bei beiden gaschromatographischen Analysen ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Markierung zu den per GC-MS identifizierten FAMES, da aus beiden Analysen gleichartige Chromatogramme resultierten.

2.6.9 Identifizierung der FAMES über GC-MS

Die Identifizierung der FAMES erfolgte an einem Hewlett Packard 5890 Serie II Gaschromatographen mit massenselektivem Detektor Typ 5972. Analysebedingungen:

Säule: HP-5MS, 5 % Phenyl Methyl Siloxan Kapillarsäule
Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 μm
Gase: Trägergas: Helium 5.0 (1,4 ml min⁻¹)
Temperaturen: Injektorblock 250 °C
Temperaturprogramm Ofen:
120 °C für 2 min
Temperaturanstieg von 5 °C min⁻¹ bis 240 °C
Temperaturanstieg von 15 °C min⁻¹ bis 280 °C
GC-MS Interface 280 °C
Säulenvordruck: 80 kPa
Splitverhältnis: 29,2:1

Für die Analyse der derivatisierten FAMES wurde die zu erreichende Endtemperatur des Ofens auf 340 °C eingestellt und die Temperatur des GC-MS Interface auf 300 °C heraufgesetzt. Das eingespritzte Probenvolumen lag bei 1 μl . Die Identifizierung der FAMES erfolgte zum einen über die Massenspektren, zum anderen anhand der Retentionszeiten, wie bei Lipski und Altendorf (1997) beschrieben.

2.6.10 Bestimmung der Isotopen-Verhältnisse der FAMES über GC-IRMS

Zur Bestimmung der Isotopen-Verhältnisse der FAMES wurde der in Kapitel 2.6.6 vorgestellte GC-IRMS eingesetzt. Zur Analyse wurden 1 – 2 µl Probe auf die Säule gegeben (splitlos). Analysebedingungen:

Säule: HP5, 5 % Phenyl Methyl Siloxan Kapillarsäule
Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm

Temperaturen: Injektorblock 300 °C

Temperaturprogramm Ofen:

60 °C für 1 min

Temperaturanstieg von 5 °C min⁻¹ bis 260 °C

Temperaturanstieg von 20 °C min⁻¹ bis 300 °C

300 °C, 5 min

Oxidations-Reaktor 940 °C

Reduktions-Reaktor 650 °C

Säulenvordruck: 82,7 kPa

2.6.11 Berechnung der ¹³C-Inkorporation in Fettsäuren

Die Angabe der Isotopie der FAMES erfolgte nach Analyse am GC-IRMS als δ¹³C-Wert [‰]. Dieser ist definiert über das Isotopenverhältnis einer Probe (R_{Probe}) zum Standard (R_{VPDB}) (Gleichung 6). Als Standard diente das Isotopenverhältnis des Vienna PeeDee Belemnite Carbonat, das mit $R_{\text{VPDB}} = 0,0112372$ angegeben ist.

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{VPDB}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (6)$$

Das Isotopenverhältnis R ist gegeben als:

$$R = \frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{12}\text{C}} \quad (7)$$

Aus den gegebenen δ¹³C-Werten der FAMES wurden zunächst die δ¹³C-Werte für die PLFAs berechnet. Die Isotopie der während der Veresterungsreaktion angehängten Methylgruppe

wurde über folgenden Zusammenhang herausgerechnet, wobei n die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül angibt (Gleichung 8, verändert nach Rieley 1994):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} = \frac{n_{\text{FAME}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - n_{\text{Methanol}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{Methanol}}}{n_{\text{PLFA}}} \quad (8)$$

Das Isotopenverhältnis des Methanols wurde experimentell bestimmt: $\delta^{13}\text{C}_{\text{Methanol}} = -37,78 \text{ ‰} \pm 0,02 \text{ ‰}$ (Standardfehler für $n=4$).

Aus den gegebenen Isotopenverhältnissen von ^{13}C -inkubierten und ^{12}C -inkubierten Proben wurden die Mengen an eingebautem ^{13}C für jede Fettsäure berechnet (I). Die Berechnung erfolgte über den relativen Anteil einer jeden Fettsäure (x), bezogen auf die Summe aller Fettsäuren (A_x) (Gleichung 9). Berechnet wurden die relativen Anteile anhand der Peakflächen der Chromatogramme nach Analyse am GC-MS.

$$I = (F_l - F_u) \times A_x \quad (9)$$

F gibt die ^{13}C -Fraktion der Fettsäuren in markierten (F_l) und unmarkierten (F_u) Ansätzen an (Gleichung 10). Sie wurde über das in Gleichung 7 definierte Isotopenverhältnis (R) berechnet:

$$F = \frac{^{13}\text{C}}{^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}} = \frac{R}{1 + R} \quad (10)$$

Die Isotopenverhältnisse (R) wurden aus den gegebenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten für jede Fettsäure über den in Gleichung 6 angegebenen Zusammenhang berechnet.

2.7 Kultivierung methanotropher Bakterien

2.7.1 Methanotrophe Referenzstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten methanotrophen Bakterienstämme wurden der Stammsammlung des MPI Marburg entnommen oder im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Die verwendeten Stämme, deren Herkunft und das Medium, auf dem kultiviert wurde, sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Der Erhalt der meisten Stämme erfolgte auf Mineralmedium mit

Ammonium (Medium 10) oder Nitrat (Medium 1a) als Stickstoffquelle auf Agarplatten. *Methylocapsa acidiphila* B2 wurde in Stickstoff-freiem Medium M2 in Flüssigkultur gehalten.

Tabelle 2.4: Herkunft und Erhalt methanotropher Referenzstämmen und Isolate.

Stamm	Herkunft	Medium
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath, NCIMB ¹ 11853	NCIMB	1a
<i>Methyломicrobium album</i> BG8, NCIMB 11123	NCIMB	1a
<i>Methylobacter luteus</i> , NCIMB 11914	NCIMB	1a
<i>Methylobacter</i> sp. 5FB ²	Isolat aus dieser Studie	10
<i>Methylocaldum</i> sp. E10a	Heyer <i>et al.</i> 2002	10
<i>Methylocaldum</i> sp. 5FB	Isolat aus dieser Studie	1a
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2 ^T , NCIMB 13765	Dedysh <i>et al.</i> 2000	M2
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b, NCIMB 11131	NCIMB	10
<i>Methylosinus trichosporium</i> KS24b	Heyer <i>et al.</i> 2002	10
<i>Methylosinus trichosporium</i> BF1	Isolat aus dieser Studie	10
<i>Methylocystis</i> sp. SC2	Heyer <i>et al.</i> 2002	10
<i>Methylocystis</i> sp. LR1	Dunfield <i>et al.</i> 1999	1a
<i>Methylocystis</i> sp. DWT	Isolat aus dieser Studie	10
<i>Methylocystis</i> sp. L6	Isolat aus dieser Studie	10
<i>Methylocystis</i> sp. 5FB1	Isolat aus dieser Studie	10
<i>Methylocystis</i> sp. 5FB2	Isolat aus dieser Studie	1a, 1:10-verdünnt

¹ National Collections of Industrial and Marine Bacteria.

² liegt nur als Anreicherungskultur vor.

2.7.2 Verwendete Medien zur Kultivierung methanotropher Bakterien

Medium 10 (Heyer *et al.* 1984)

NH ₄ Cl	0,5 g l ⁻¹
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g l ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	0,7 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,3 g l ⁻¹
CaCl ₂ × 6 H ₂ O	0,01 g l ⁻¹
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,005 g l ⁻¹
Spurenelement-Lösung 1	1 ml l ⁻¹
Bacto-Agar (Difco) (bei Bedarf)	15 g l ⁻¹
Wasser, voll entionisiert	1 l
pH-Wert 7,0	

Spurenelement-Lösung 1:

ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,44 g l ⁻¹
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,20 g l ⁻¹
MnSO ₄ × 2 H ₂ O	0,17 g l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,06 g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,10 g l ⁻¹
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,08 g l ⁻¹
Wasser, voll entionisiert	1 l

Medium 1a (verändert nach Leadbetter and Foster 1958)

NaNO ₃	1,0 g l ⁻¹
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g l ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	0,5 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,22 g l ⁻¹
CaCl ₂ × 6 H ₂ O	0,03 g l ⁻¹
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,002 g l ⁻¹
Spurenelement-Lösung 1	1 ml l ⁻¹
Bacto-Agar (Difco) (bei Bedarf)	15 g l ⁻¹
Wasser, voll entionisiert	1 l
pH-Wert 7,0	

Medium M2 (Dedysh *et al.* 2002)

Medium M2 ist das von Dedysh *et al.* (1998) beschriebene Medium M1 in 5facher Verdünnung. Auf Nitrat als Stickstoffquelle wurde verzichtet.

Medium M1:

KNO ₃ (bei Bedarf)	1 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,2 g l ⁻¹
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g l ⁻¹
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,02 g l ⁻¹
Spurenelement-Lösung 2	1 ml l ⁻¹
Wasser, voll entionisiert	1 l
pH-Wert 5,0	

Spurenelement-Lösung 2:

EDTA	5 g l ⁻¹
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2 g l ⁻¹
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,10 g l ⁻¹
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,03 g l ⁻¹
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,20 g l ⁻¹
CuCl ₂ × 5 H ₂ O	0,10 g l ⁻¹
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,02 g l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄	0,03 g l ⁻¹
Wasser, voll entionisiert	1 l

2.7.3 Stammerhalt methanotropher Bakterien

Für den Stammerhalt wurden die methanotrophen Bakterien auf Agarplatten in Exsikkatoren unter einer Atmosphäre von 20 % (v/v) CH₄ (Zugabe von CH₄ 4.5), 3 % (v/v) CO₂ (Zugabe von CO₂ 4.5) und 77 % (v/v) Luft bei 30 °C angezogen. Die Anzucht von *Methylocapsa acidiphila* B2 erfolgte in 20 ml Medium M2 in 120-ml-Kulturflaschen mit 20 % (v/v) Methan in der Luft. Methan wurde über eine Spritze mit Sterilfilter zugegeben. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 120 rpm und 25 °C. Alle Kulturen wurden zwei bis drei Wochen bei 25 °C bzw. 30 °C inkubiert und weitere zwei bis drei Wochen bei 4 °C unter atmosphärischen Bedingungen gelagert, bevor die Stämme erneut überimpft wurden.

2.8 Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien aus Bodenproben

2.8.1 Auswahl der Bodenproben für Anreicherungsversuche

Die Anreicherung methanotropher Bakterien erfolgte aus Bodenproben, die im Jahr 2001 entnommen worden waren. Die Auswahl der Böden wurde getroffen basierend auf der Aktivität der Böden und die Ergebnisse der molekularen Analysen. Einerseits wurden Böden mit vergleichsweise hoher Methan-Oxidationsrate ausgewählt, in denen *pmoA*-Sequenzen des USC α oder USC γ dominierten. Darüber hinaus wurden zwei Böden ausgewählt, in denen trotz nachgewiesener Methanaufnahme keine *pmoA*-Gene nachgewiesen werden konnten.

Boden E 20 zeigte keine Methanaufnahme, es wurden jedoch *pmoA*-Sequenzen nachgewiesen.

2.8.2 Anreicherungsstrategien

Die Anreicherung methanotropher Bakterien erfolgte in verschiedenen Flüssigmedien. Grundlage für die verwendeten Medien waren Medium 10 mit Ammonium als Stickstoffquelle und Medium 1a mit Nitrat als Stickstoffquelle (Kap. 2.7.2). Diese Medien wurden in ihrer Zusammensetzung unverändert und mit folgenden Modifikationen eingesetzt:

- Für die sauren Bodenproben VA DFT, MF und BB NH wurde der pH-Wert in den Medien auf 5,0 eingestellt. Diesen sauren Medien wurde kein Na_2HPO_4 zugegeben. Der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure eingestellt. Die Anreicherung aus pH-neutralen Böden erfolgte in Medien mit pH 7,0.
- Die Anreicherung erfolgte für alle Proben in Ammonium-haltigem Medium, Nitrat-haltigem Medium und Stickstoff-freiem Medium. Als Stickstoff-freies Medium wurde Medium 1a ohne Natriumnitrat eingesetzt. Das dadurch fehlende Natrium wurde durch Zugabe von $0,3 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$ kompensiert.
- Neben den unverdünnten Medien wurden 10fach verdünnte Medien eingesetzt.

Somit erfolgte für jede Bodenprobe eine Anreicherung in sechs verschiedenen Medien.

Für den ersten Anreicherungsschritt wurden Verdünnungsreihen in Reagenzgläsern angesetzt. Zur Suspendierung des Bodens wurde 5 g gesiebter Boden in 120-ml-Schraubflaschen gegeben, mit 45 ml des jeweiligen Mediums versetzt und 30 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt (4 °C, 200 rpm). Ausgehend von dieser Suspension wurde pro Medium je eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} erstellt. Die Inkubation dieser Verdünnungsreihen erfolgte in Exsikkatoren mit 20 % (v/v) Methan, 3 % (v/v) CO_2 und 77 % (v/v) Luft bei 30 °C. Nach 3 Wochen, 6 Wochen, 1 Jahr und 1 ½ Jahren Inkubation wurden die Röhrchen auf Wachstum kontrolliert. Von den Röhrchen, in denen Wachstum erkennbar war, wurde mit der Impföse Zellmaterial entnommen und zur weiteren Anreicherung und späteren Isolierung Methan-oxidierender Bakterien auf Agarplatten gleichen Mediums ausgestrichen.

Für die Proben MF, VA DFT, VA DWT und E 5FB wurde eine Voranreicherung MB direkt im Boden durchgeführt. Dazu wurde 25 g gesiebter Boden in 120-ml-Glasflaschen eingewogen, welche mit Butyl-Gummi-Septen gasdicht verschlossen wurden. Zunächst erfolgte die Inkubation in Gegenwart von 1000 ppmv Methan in Luft bei 25 °C. Der Methan-

verbrauch in den Ansätzen wurde gaschromatographisch verfolgt. Nach Verbrauch des Methans wurde das anfängliche Mischungsverhältnis wieder eingestellt. In regelmäßigen Abständen wurde die gesamte Gasphase ausgetauscht, um die Verfügbarkeit von Sauerstoff zu gewährleisten. Im Verlauf der Inkubation wurde das Methan-Mischungsverhältnis angehoben. Ab dem 54. Tag wurde ein Mischungsverhältnis von 2000 ppmv eingestellt und ab dem 79. Tag wurde auf 10.000 ppmv erhöht. Nach 286 Tagen Inkubation wurde die Gilde der MB erneut über den Nachweis von *pmoA*-Genen charakterisiert. Zur weiteren Anreicherung wurden nach etwa 300 Tagen Inkubation Bodenkrümel auf Agarplatten gegeben und bei 25 °C inkubiert. Genutzt wurde verdünntes Medium mit Ammonium oder Nitrat als Stickstoffquelle und pH 7,0. Nach 6-wöchiger Inkubation wurden verschiedenartige Kolonien ausgewählt und zur weiteren Isolierung überimpft. Alternativ wurde 5 g vorinkubierter Boden mit 100 ml 10fach verdünntem Medium 10 oder 1a versetzt und in 500-ml-Schraubdeckelflaschen mit Schikane in Gegenwart von 10 % (v/v) Methan in der Luft bei 120 rpm auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Die weitere Anreicherung erfolgte in 120-ml-Glasflaschen. Nach zwei Transfers wurde zur Isolierung methanotropher Bakterien Material auf Agarplatten mit entsprechendem Medium ausgestrichen.

In einem weiteren Versuch sollte das Wachstum der MB durch Zugabe verschiedener organischer Verbindungen stimuliert werden. Von den Bodenproben MF, VA DFT, VA DWT und E 5FB wurden Verdünnungsreihen in Medium 10 erstellt, wie zuvor beschrieben. Der pH-Wert des Mediums war auf den der jeweiligen Bodenprobe abgestimmt. Dem Medium wurde 1 g l⁻¹ NaNO₃ und 0.1 % Methanol, Acetat, Formiat, Aminosäure-Mix, Malz-Extrakt oder 1 % Bodenextrakt zugesetzt. Für die Bodenextrakte wurde 500 g Boden der jeweiligen Standorte in 500 ml voll entionisiertem Wasser suspendiert, für 1 h bei 4°C geschüttelt und anschließend sedimentiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert. Die Ansätze wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen mit Methan in der Gasphase inkubiert. Das Wachstum der MB wurde in diesen Ansätzen über die Detektion des *pmoA*-Gens nachgewiesen. Dazu wurde die DNA aus 0,5 ml Suspension extrahiert, wie im folgenden Kapitel (2.8.3) beschrieben, mit dem Wizard[®] DNA Clean up Kit (Promega) gereinigt. Die Amplifikation des *pmoA*-Gens erfolgte, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben.

2.8.3 Isolierung methanotropher Bakterien

Die Isolierung methanotropher Bakterien erfolgte ausschließlich auf Festmedien. Während der Isolation wurde ein Nachweis auf *pmoA* (Primer A189/A682) und *mmoX* (Primer

mmoXA166/mmoXB1401) durchgeführt, um nicht-MB frühzeitig aussortieren zu können. Für diesen Nachweis wurden mehrere gleichartige Kolonien von einer Platte genommen und in 20 µl TE-Puffer suspendiert. Nach 10-minütigem Aufkochen im Wasserbad wurden die Ansätze kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellbestandteile für 10 min bei $10.000 \times g$ sedimentiert. Vom DNA-haltigen Überstand wurden 10 µl abgenommen und für PCR-Ansätze zur Amplifikation der beiden Genabschnitte genutzt, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. War dieser Nachweis positiv, wurden wiederholt Einzelkolonien durch fraktionierte Ausstriche auf Agarplatten überimpft, bis alle Kolonien auf den Agarplatten nach stereomikroskopischer Kontrolle ein einheitliches Aussehen hatten. Die Reinheit der Kulturen wurde durch Phasenkontrast-Mikroskopie (Axiophot, Zeiss, Göttingen) beurteilt.

2.9 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung methanotropher Bakterienisolate

2.9.1 DNA-Extraktion aus methanotrophen Reinkulturen

Die DNA-Extraktion aus Reinkulturen erfolgte nach einem Protokoll von Henckel *et al.* (1999). Mit einer Impföse wurde Zellmaterial von einer Agarplatte abgenommen und mit 1 g hitzesterilisierten Zirconium/Silizium Kugeln (0,1 mm Durchmesser, Biospec Products Inc., Bartlesville, Ok, USA), 1000 µl Natriumphosphat-Puffer (120 mM, pH 8,0) und 260 µl Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 % SDS, 0,1 M NaCl in 0,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0) in 2-ml-Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel gegeben. Die Zelllyse erfolgte in der Zelmühle für 45 s bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,4 Volumenanteilen gekühlter 7,5 M Ammonium-Acetat-Lösung versetzt. Nach gründlichem Mischen und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden ausgefallene Proteine, Zellbestandteile und andere Verunreinigungen durch 3-minütige Zentrifugation bei $14.500 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die DNA mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol ausgefällt. Durch 45-minütige Zentrifugation bei $20.000 \times g$ wurde die DNA sedimentiert und anschließend mit 1 ml eisgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei $20.000 \times g$ wurde das Ethanol abgegossen und die DNA unter Vakuum getrocknet. Die Resuspendierung des DNA-Pellets erfolgte in 150 µl TE-Puffer (Kap. 2.4.3).

2.9.2 Amplifikation des 16S rRNA Gens und proteinkodierender Gene von methanotrophen Bakterien

Die phylogenetische Einordnung der methanotrophen Isolate erfolgte über das 16S rRNA-Gen. Ferner erfolgte ein Nachweis der Gene *pmoA*, *pmoA2*, *mxoF* und *mmoX*. Die erhaltenen Sequenzen dieser Gene wurden ebenfalls zur Berechnung phylogenetischer Stammbäume genutzt. Die Amplifikation der Gene, Sequenzierung und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.5 beschrieben. Neben den bereits in Tabelle 2.2 aufgeführten Primern zur Amplifikation von *pmoA* (A189/A682) und *mmoX* (mmoXA166/mmoX B1401) wurden die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primer zur Amplifikation von Ausschnitten der Gene *pmoA2*, *mxoF* und des 16s rRNA-Gens genutzt. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens wurde wegen der Länge des Gens zusätzlich mit den Primern 533f, 533b, 907f und 907b durchgeführt.

Tabelle 2.5: Auflistung von Primern, die zur Amplifikation verschiedener Gen-Abschnitte aus methanotrophen Reinkulturen genutzt wurden.

Zielgen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Quelle
<i>pmoA2</i>	A206f	GGN GAC TGG GAC TTC TGG ATC GAC TTC AAG GAT CG	Tchawa Yimga <i>et al.</i> 2003
	A703b	GAA SGC NGA GAA GAA SGC GGC GAC CGG AAC GAC GT	Tchawa Yimga <i>et al.</i> 2003
<i>mxoF</i>	mxo f1003	GCG GCA CCA ACT GGG GCT GGT	McDonald <i>et al.</i> 1997a
	mxo r1561	GGG CAG CAT GAA GGG CTC CC	McDonald <i>et al.</i> 1997a
16s rRNA	Eu 9f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	Weisburg <i>et al.</i> 1991
	533b ¹	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	Weisburg <i>et al.</i> 1991
	907f ¹	AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG	Weisburg <i>et al.</i> 1991
	Eu 1492b	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	Weisburg <i>et al.</i> 1991

N = A/T/C/G; S = G/C; R = A/G; M = A/C; Y = C/T; K = G/T

¹ Primer wurde nur für die Sequenzier-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Ansätze für die proteinkodierenden Gene wurden mit Premix F angesetzt, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Für die Amplifikation des 16s rRNA-Gens wurden anstelle von Premix F 5 µl 10× Incubation Mix T. Pol (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,1 % TritonX100, 0,2 mg ml⁻¹ BSA, pH 9,0; Q-Biogene), 3,5 mM MgCl₂ und 200 µM pro dNTP (Promega) eingesetzt. Die Primerkonzentration betrug für alle Ansätze 0,5 µM. Die spezifischen Temperaturprogramme der PCRs für die Amplifikation der verschiedenen Genabschnitte sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen zur Amplifikation verschiedener Gen-Abschnitte aus DNA-Extrakten methanotropher Reinkulturen.

Zielgen	Primerpaar	PCR-Temperaturprogramm	Zyklenzahl
<i>pmoA</i>	A189/A682	94 °C, 60s 62 – 55 °C ¹ , 45s 72 °C, 60s	30 oder 35
<i>PmoA2</i>	A206f/A703r	94 °C, 60s 66 °C, 60s 72 °C, 60s	34
<i>mxoF</i>	mxo f1003/mxo r1561	94 °C, 60s 55 °C, 30s 72 °C, 60s	35
<i>mmoX</i>	mmoXA166/mmoXB1401	94 °C, 60s 55 °C, 90s 72 °C, 60s	35
16S rRNA	9f/1492b	94 °C, 45s 48 °C, 60s 72 °C, 120s	30

¹ Touchdown-Verfahren: bei jedem Zyklus wurde die Annealing-Temperatur um 0,5 °C gesenkt, bis die untere Temperaturgrenze erreicht war. Diese Temperatur wurde bei den verbleibenden Zyklen angewandt.

2.10 Charakterisierung der Methanoxidation methanotropher Bakterien nach Wachstum in Gegenwart von 10 % Methan

2.10.1 Anzucht der Zellen mit 10 % Methan

Die Anzucht der MB erfolgte in 500-ml-Kulturflaschen mit Schikanen in 100 ml Medium 1a und mit 10 % (v/v) Methan in der Gasphase. Angeimpft wurde mit 5 ml einer gut bewachsenen Vorkultur, die nicht älter als 3 Tage war. Die Inkubation erfolgte auf einem Horizontalschüttler bei 180 rpm und 25 °C. Während der 2 Tage dauernden Inkubation wurde die Methankonzentration regelmäßig per Gaschromatographie kontrolliert, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten. Nach 1 – 1,5 Tagen Inkubation wurden die Kolben mit Druckluft gespült und es wurde erneut eine Methankonzentration von 10 % (v/v) eingestellt. Während der gesamten Inkubationsdauer sank das Methan-Mischungsverhältnis nicht unter 4000 ppmv. Die Anzucht von *Methylocapsa acidiphila* B2 erfolgte in Medium M2 über 8 Tage mit zweimaligem Austausch der Gasphase.

2.10.2 Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$, a_s^0 und $K_{m(\text{app})}$

Die Zellzahl der exponentiell wachsenden Kulturen wurde mittels Helber-Zählkammer bestimmt. Ausgehend von diesen Kulturen wurden Zellsuspensionen mit 5×10^7 Zellen ml^{-1} in 0,5 mM Phosphatpuffer (pH 6) hergestellt. Um weiteres Zellwachstum und Enzymproduktion zu verhindern, wurde den Suspensionen $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ Chloramphenicol zugesetzt. Jeweils 3 ml Suspension wurde in 28-ml-Reagenzgläser gegeben. In der Gasphase wurden Methan-Mischungsverhältnisse von 50 – 100 ppmv zur Bestimmung von a_s^0 und 0,5 % (v/v) zur Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$ eingestellt. Inkubiert wurden die Ansätze in horizontaler Position der Reagenzgläser auf einem Horizontalschüttler bei 250 rpm. Nach 30 bis 60 min Vorinkubation wurde die Abnahme des Methans in der Gasphase gaschromatographisch verfolgt. Um zu belegen, dass unter den gegebenen Bedingungen keine Diffusionslimitierung bei niedrigen Methan-Mischungsverhältnissen vorlag, wurden zusätzlich Ansätze mit doppelter Zellzahl pro ml unter 50 – 100 ppmv Methan in Luft inkubiert.

Die Berechnung von $V_{\max(\text{app})}$ und $K_{m(\text{app})}$ erfolgte in gleicher Weise wie für die Bodenproben (Kap. 2.3.2), jedoch in bezug auf die Zellzahl. Über die lineare Abnahme des Methans in Abhängigkeit von der Zeit bei 0,5 % Methan in der Gasphase erfolgte die Bestimmung von $V_{\max(\text{app})}$. Bei den Ansätzen mit weniger als 100 ppmv Methan erfolgte die Abnahme des Methans exponentiell in Abhängigkeit von der Zeit, worüber a_s^0 berechnet wurde.

2.11 Bestimmung der Oxidationsleistung und Wachstumsfähigkeit methanotropher Bakterien unter niedrigen Methankonzentrationen

2.11.1 Anzucht der Zellen

Es wurden Vorkulturen in Gegenwart von 20 % (v/v) Methan, 3 % (v/v) CO_2 und 77 % Luft in der Gasphase angezogen. Zu diesem Zweck wurde Zellmaterial von einer Agarplatte in 20 ml Medium 1a suspendiert. Die Inkubation erfolgte in 120-ml-Glasflaschen auf dem Horizontalschüttler bei 180 rpm und 25 °C. Die nach 3 bis 5 Tagen gewachsenen Zellen wurden nochmals in 20 ml Medium 1a überimpft, welches unter gleichen Bedingungen,

jedoch ohne Zugabe von CO₂ in die Gasphase, für 3 Tage inkubiert wurde. Mit diesen Zellen wurden die Inkubationsversuche unter niedrigen Methan-Mischungsverhältnissen angesetzt.

2.11.2 Langzeit-Inkubation methanotropher Bakterien unter Methan-Mischungsverhältnissen von 1000, 100, 10 und 1,8 ppmv

Verschiedene methanotrophe Stämme wurden mit 1000 ppmv Methan in der Gasphase inkubiert. Die Stämme, bei denen es unter diesen Bedingungen nicht zu einem Verlust der Aktivität kam, abgeleitet anhand der Veränderung der Methan-Oxidationsraten-Konstanten, wurden für den nächsten Versuch mit weniger Methan in der Gasphase eingesetzt. Die Methan-Mischungsverhältnisse wurden von 1000 ppmv ausgehend auf 100, 10 und schließlich 1,8 ppmv herabgesetzt. Es wurden für jeden Stamm so viele Versuchsreihen mit jeweils geringeren Methan-Mischungsverhältnissen durchgeführt, bis es zu einem Verlust der Aktivität kam. Die Versuchsreihen wurden jeweils mit Zellen aus frischen Vorkulturen gestartet. Die Inkubation methanotropher Stämme erfolgte in 10 ml Medium 1a in 120-ml-Schraubflaschen mit Schikanen auf einem Horizontalschüttler bei 250 rpm und 25 °C. Das Medium wurde so mit Vorkultur beimpft, dass zu Beginn der Inkubation eine Zellzahl von etwa 5×10^6 Zellen ml⁻¹ vorlag. Diese Zellzahl konnte gerade noch in einer Helber-Zählkammer ausgezählt werden, war aber schon so hoch, dass das Methan in der Gasphase in den Versuchsansätzen innerhalb weniger Stunden verbraucht war. Aus diesem Grund wurde eine Anlage gebaut, die es ermöglichte, die Gasphase in den Flaschen automatisch in regelmäßigen Abständen zu tauschen (Abb. 2.1 und Abb. 2.2). Als Gasreservoir dienten zwei 27 l Plastigas-Beutel (Roth, Karlsruhe), in denen die Methan-Mischungsverhältnisse eingestellt wurden. Der Gasfluss aus den Beuteln wurde über einen Verteilerrechen aus Glas (Ochs, Bovenden-Lenglern) aufgeteilt. Die Umwälzung erfolgte parallel über 5 Membranpumpen (FM1101 F, Fuergut, Aichstetten), gekoppelt an Durchflussmesser (0,2 – 2,0 l min⁻¹, Fuergut, Aichstetten). Von jeder Membranpumpe wurden zwei verschiedene Stämme parallel mit Gas versorgt. Es wurden für jeden Stamm zwei Ansätze unter gleichen Bedingungen inkubiert. Diese zwei Ansätze eines Stammes waren in Serie angeschlossen (Abb. 2.2). Um einen geschlossenen Kreislauf zu erhalten, wurden die einzelnen Gasströme gebündelt und in die Plastigas-Beutel zurückgeführt. Über eine Zeitschaltuhr mit 15-Minuten-Intervallen wurde der Betrieb der Anlage so gesteuert, dass die Gasphase in den Ansätzen je nach Aktivität der Proben 1-4 mal täglich ausgetauscht wurde. Die Gaszufuhr in die Kulturflaschen erfolgte über 10 cm lange, die Rückführung über 5 cm lange Metallrohre (1/8

Zoll Durchmesser, Wandstärke 0,56 mm), die in vorgestanzte Löcher durch das Butyl-Gummi-Septum gesteckt wurden. Um Sterilität zu gewährleisten, wurden die Septen mit den Metallrohren autoklaviert und durch sterilisierte Watte vom unsterilen Bereich des Systems abgetrennt. Die Watte diente gleichzeitig der Sterilisation des ein- und ausströmenden Gases. Der Gasaustausch über die Schläuche für Gaszufuhr und -abfuhr der einzelnen Flaschen konnte über 2-Wege-Hähne (Novo-Direkt, Kehl) unterbrochen werden, um Flaschen vom System abkoppeln zu können und Oxidationsraten für die einzelnen Ansätze direkt im System bestimmen zu können. Die Verbindung der einzelnen Bauteile erfolgte über Tygon- und Iso-Versinic-Schläuche.



Abbildung 2.1: Aufbau zur Inkubation methanotropher Bakterien unter niedrigen Methan-Mischungsverhältnissen. Die gewünschte Methankonzentration wurde in den Gasbeuteln eingestellt. Über Membranpumpen, die über eine Zeitschaltuhr regelmäßig aktiviert wurden, wurde die Gasphase der einzelnen Ansätze ausgetauscht. Der Gasfluss wurde über Durchflussmesser kontrolliert. Der Gasstrom wurde nach Durchströmen der Ansätze gebündelt und in die Beutel zurückgeführt.

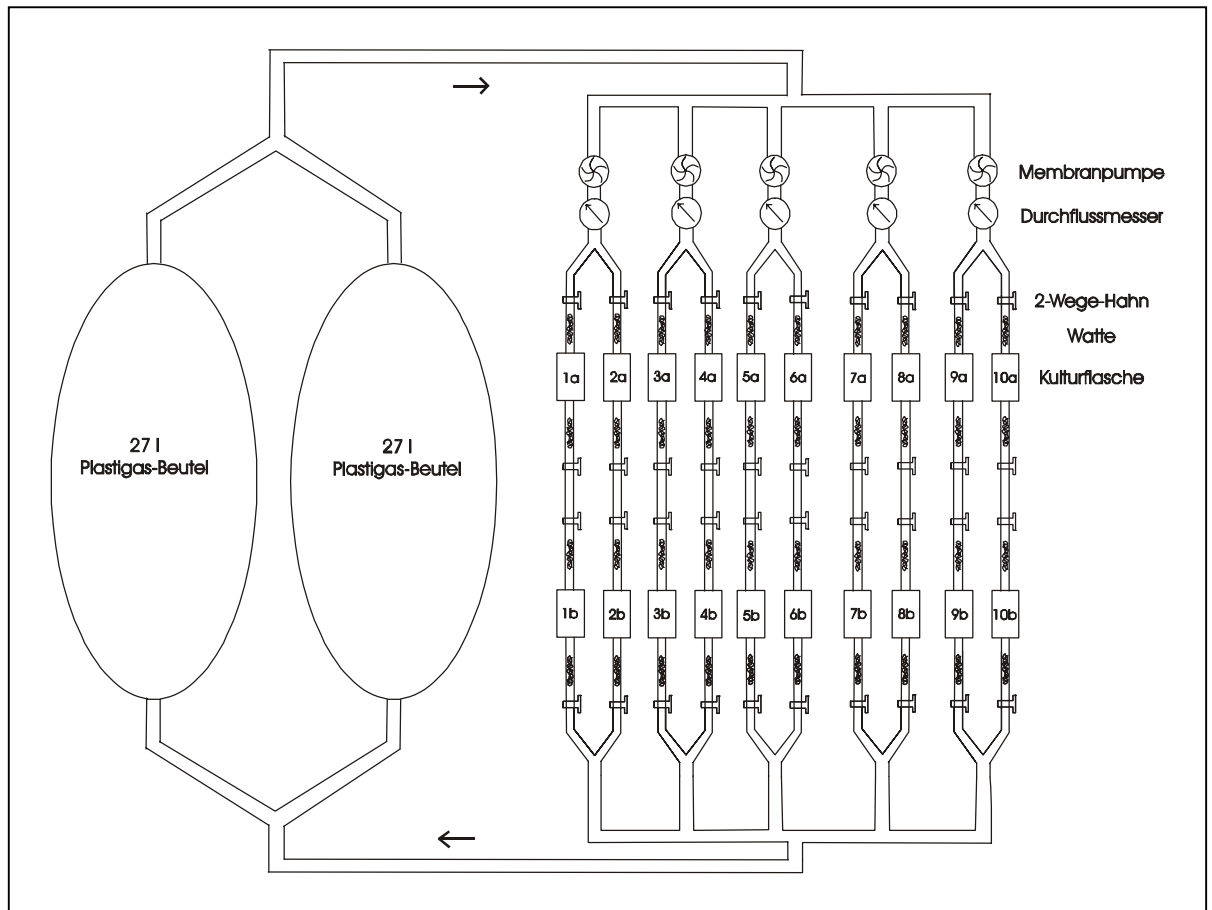


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Inkubation methanotropher Bakterien unter niedrigen Methankonzentrationen. Dargestellt ist der Kreislauf des Gases und die Anordnung der Kulturen 1 bis 10 im System.

Im Laufe des Versuches wurde die Anlage so modifiziert, dass zeitgleich Ansätze mit 1000 ppmv und 100 ppmv oder 100 ppmv und 10 ppmv Methan in der Gasphase inkubiert werden konnten. Für die Inkubation unter atmosphärischen Bedingungen mit 1,8 ppmv Methan wurde eine zweite Anlage nach gleichem Prinzip aufgebaut. Es wurde jedoch auf Plastikgas-Beutel als Gasreservoir verzichtet. Stattdessen wurden die Ansätze 3 mal täglich mit Frischluft gespült.

Einmal wöchentlich wurde die Oxidationsraten-Konstante in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Innerhalb von 8 – 50 Stunden wurden 3 – 6 Datenpunkte aufgenommen. Unter den gegebenen Bedingungen erfolgte die Methanabnahme exponentiell. Für die Auswertung wurden die Methan-Mischungsverhältnisse log-transformiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die resultierenden Datenpunkte wiesen einen linearen Zusammenhang auf. Über die Steigung wurde die Oxidationsraten-Konstante ermittelt.

Für wachsende Kulturen stieg die Oxidationsraten-Konstante im Verlauf der Inkubation exponentiell an, während sie für Kulturen, die ihren Stoffwechsel nicht aufrecht erhalten

konnten, logarithmisch abfiel. Dieser Zusammenhang war Grundlage zur Berechnung einer Rate, die den Anstieg oder Abfall der Aktivität im zeitlichen Verlauf quantitativ wiedergibt (μ_a). Der Verlauf der Oxidationsraten-Konstante in Abhängigkeit von der Zeit wurde über die in Gleichung 11 angegebene Formel beschrieben:

$$y = A \times e^{\mu_a \times x} \quad (11)$$

Die Anpassung der Daten an diese Formel erfolgte über Origin 6.1. In dieser Formel beschreibt y die Oxidationsraten-Konstante zum Zeitpunkt x . A gibt die Oxidationsraten-Konstante zum Zeitpunkt 0 an.

Zu Versuchsbeginn (t_0) und zum Ende der Inkubation (t) wurde die Zellzahl (N_0 bzw. N) mittels Helber-Zählkammer bestimmt, falls eine Zunahme der Methan-Oxidationsraten-Konstante auf Wachstum hindeutete. Basierend auf diesen Zellzahlen wurde die Teilungsrate (μ_c) berechnet (Gleichung 12):

$$\mu_c = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2(t - t_0)} \quad (12)$$

Darüber hinaus wurde nach der Inkubation für einige Kulturen nochmals die spezifische Affinität bestimmt, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.12 Statistische Daten-Analysen

2.12.1 Korrespondenz-Analyse

Um im Rahmen der ersten Studie mögliche Zusammenhänge hinsichtlich der Verbreitung MB in Verbindung mit bestimmten Bodenparametern, wie Ammonium-Gehalt und pH-Wert, oder der Methan-Oxidationsleistung, beschrieben über a^0_s , K_m und $V_{\max(\text{app})}$, erkennen zu können, wurden die Daten einer Korrespondenz-Analyse unterzogen. Zur Analyse wurde die Abwesenheit oder Anwesenheit eines Taxons in jeder Bodenprobe mit „0“ oder „1“ bewertet. Die Korrespondenz-Analyse ermöglicht die Reduktion eines multivariaten Datensatzes auf zwei Hauptkomponenten, die einen möglichst großen Anteil der Gesamtvariabilität erfassen (Legendre und Legendre 1998). Die Korrelation der ursprünglichen Variablen mit diesen Hauptkomponenten ermöglicht deren Interpretation. Der Grad der Unabhängigkeit von Reihen und Spalten, also beispielsweise die Korrelation des Vorkommens MB bestimmter Taxa in Böden mit bestimmten pH-Werten, wird über die Pearson- χ^2 -Statistik berechnet,

welche in euklidische Distanzen umgerechnet und einer Dimensionsreduktion unterzogen wird, so dass χ^2 letztlich durch die beiden Hauptachsen des Korrespondenz-Diagrammes erklärt wird.

Aus der Korrespondenz-Analyse offensichtliche Zusammenhänge wurden durch eine Kontingenz-Analyse bestätigt. Die relevanten Daten wurden in einer Vierfeldertafel zusammengestellt, um die Null-Hypothese „es besteht keine Korrelation zwischen dem Vorkommen eines betrachteten Taxons und dem betrachteten Parameter“ aufgrund des exakten Tests nach Fisher anzunehmen oder abzulehnen. Basierend auf die Bonferroni-Methode wurde die berechnete Wahrscheinlichkeit (P) für jedes Taxon korrigiert, um den Bezug der Signifikanzzahl (α) von der Analyse des jeweiligen Taxons auf den gesamten Datensätzen zu erweitern.

2.12.2 Cluster-Analyse

Um die Ähnlichkeit der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in den verschiedenen thailändischen Böden (Studie 3) miteinander vergleichen zu können, wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt, beruhend auf das DGGE-Bandenmuster. Die Analyse wurde mit SYSTAT Version 9.0 (SPSS Inc., Richmond, Calif, USA) durchgeführt. Die An- oder Abwesenheit von DGGE-Banden an einem Standort wurde zur Berechnung von Jaccard-Ähnlichkeits-Koeffizienten (S_j) nach der folgenden Formel herangezogen:

$$S_j = \frac{a}{a+b+c} \quad (13)$$

In dieser Formel gibt a die Anzahl der übereinstimmenden Merkmale an, in diesem Fall das Vorhandensein einer DGGE-Bande in beiden zu vergleichenden Böden, b und c stehen für die Anzahl von Banden, die nur in dem einen oder nur in dem anderen Boden nachgewiesen wurden. Zur graphischen Darstellung wurden die berechneten Koeffizienten in Euklidische Distanzen umgerechnet. Diese Distanzen werden durch die Zweiglängen des Stammbaumes wiedergegeben, während durch die Anordnung der Verzweigungen die Ähnlichkeit der Proben zueinander dargestellt wird.

3 Ergebnisse

3.1 Diversität und Aktivität methanotropher Bakterien in diversen „upland soils“

Zielsetzung: Um die verantwortlichen Methan-oxidierenden Bakterien in „upland soils“ zu identifizieren, erfolgte zunächst die Charakterisierung der Gilde der MB in verschiedensten „upland soils“. In den meisten der bis dahin durchgeführten Studien hatte sich diese Charakterisierung auf saure Waldböden beschränkt. Die Auswahl der Probestandorte für diese Studie erfolgte unter dem Gesichtspunkt, Proben von Standorten mit verschiedener Bodenart, landwirtschaftlicher Nutzung und unterschiedlichem Pflanzenbewuchs zu erhalten.

Auf diese Weise sollten mögliche Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien im Boden und der Methan-Aufnahmekapazität des Bodens sowie chemischen Bodenparametern, insbesondere dem pH-Wert des Bodens, erkannt werden. Die Einflüsse einiger Faktoren auf die Zusammensetzung der Gilde der MB in „upland soils“ sind erst kürzlich untersucht worden, z. B. in Studien über die Wirkung von Pestiziden (Seghers *et al.* 2003b), Stickstoff-Düngern (Seghers *et al.* 2003a) oder der Brandrodung (Jaatinen *et al.* 2004).

In einem weiteren Schritt wurde der Frage nach den physiologisch aktiven MB im Boden nachgegangen. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle in den Böden nachgewiesenen Mikroorganismen physiologisch aktiv sind und gleichermaßen am Prozess der atmosphärischen Methanoxidation beteiligt sind. Der überwiegende Anteil der MB ist zur Ausbildung von physiologisch inaktiven Überdauerungsformen in der Lage (Kap. 1.2.1). Daher wurden ausgewählte Bodenproben mit unterschiedlicher Zusammensetzung der methanotrophen Gilde mit $^{13}\text{CH}_4$ inkubiert, um aufgrund markierter PLFAs die MB im Boden zu identifizieren, die hauptverantwortlich sind für die atmosphärische Methanoxidation.

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse entstammen folgender Publikation:

Claudia Knief, André Lipski und Peter F. Dunfield (2003) Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6703 – 6714.

Abstract

Samples from diverse upland soils that oxidize atmospheric methane were characterized with regard to methane oxidation activity and the community composition of methanotrophic bacteria (MB). MB were identified on the basis of the detection and comparative sequence analysis of the *pmoA* gene, which encodes a subunit of particulate methane monooxygenase. MB commonly detected in soils were closely related to *Methylocaldum* spp., *Methylosinus* spp., *Methylocystis* spp., or the “forest sequence cluster” (USC α), which has previously been detected in upland soils and is related to *pmoA* sequences of type II MB (Alphaproteobacteria). As well, a novel group of sequences distantly related (< 75 % derived amino acid identity) to those of known type I MB (Gammaproteobacteria) was often detected. This novel “upland soil cluster γ ” (USC γ) was significantly more likely to be detected in soils with pH values greater than 6.0 than in more acidic soils. To identify active MB, four selected soils were incubated with $^{13}\text{CH}_4$ at low mixing ratios (< 50 ppmv), and extracted methylated phospholipid fatty acids (PLFAs) were analyzed by gas chromatography-online combustion isotope ratio mass spectrometry. Incorporation of ^{13}C into PLFAs characteristic for methanotrophic Gammaproteobacteria was observed in all soils in which USC γ sequences were detected, suggesting that the bacteria possessing these sequences were active methanotrophs. A pattern of labeled PLFAs typical for Alphaproteobacteria was obtained for a sample in which only USC α sequences were detected. The data indicate that different MB are present and active in different soils that oxidize atmospheric methane.

Introduction

Methane (CH₄) is present in the atmosphere at a mixing ratio of about 1.7 ppm of volume (ppmv). An estimated 30 Tg of CH₄ from the atmosphere year⁻¹ is oxidized by aerobic methanotrophic bacteria (MB) in upland soils, accounting for about 6 % of the global atmospheric CH₄ sink (Hanson and Hanson 1996, van Houghton *et al.* 2001). Bender and Conrad (1992) suggested that MB active in upland soils are specialized oligotrophs adapted to the trace level of atmospheric CH₄, and possess a methane monooxygenase (MMO) with a higher substrate affinity than that of cultivated MB. It was later demonstrated that the application of single-reactant Michaelis-Menten kinetics to MMO is not always appropriate and that the apparent affinity for CH₄ varies depending on cultivation conditions (Dunfield and Conrad 2000). Nevertheless, recent studies indicate that MB in at least some soils which oxidize atmospheric CH₄ are indeed taxonomically distinct from known MB (Holmes *et al.* 1999).

The 11 recognized genera of MB are divided into two groups, type I (further divided into type I and type X) and type II. These differ in phylogenetic affiliation (Gammaproteobacteria versus Alphaproteobacteria) and in diverse biochemical characteristics (Hanson and Hanson 1996). Identification of MB in soils is often performed by the cultivation-independent detection of a fragment of *pmoA*, a gene encoding the active-site subunit of particulate MMO (e.g. Henckel *et al.* 1999, Hoffmann *et al.* 2002, Horz *et al.* 2001, Kolb *et al.* 2003, McDonald and Murrell 1997b). This marker gene is present in all known MB with the exception of *Methylocella palustris* (Dedysh *et al.* 2000) and *Methylocella silvestris* (Dunfield *et al.* 2003). Sequence-based *pmoA* phylogeny correlates well with 16S rRNA-based phylogeny, so *pmoA* sequences can be assigned to specific genera or even species of MB (Heyer *et al.* 2002, Holmes *et al.* 1999, Kolb *et al.* 2003). The *pmoA* gene is therefore an excellent functional gene marker and has been widely used to characterize methanotrophic communities in soils, including upland soils that consume atmospheric methane (Bourne *et al.* 2001, Fjellbirkeland *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). In some of these soils, a novel sequence cluster usually called the “forest sequence cluster“ (here USC α) has been detected (Bourne *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000). The most closely related *pmoA* sequence from a pure culture is that of *Methylocapsa acidiphila*, a type II MB isolated from acidic peat (Dedysh *et al.* 2002). Besides this novel sequence cluster, *pmoA* sequences related to the genera *Methylocystis*, *Methylosinus*,

Methylomonas, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, and *Methylocaldum* have been detected in upland soils (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001).

The detection of a particular *pmoA* gene in a soil does not necessarily imply that the respective methanotroph is physiologically active in this soil. Thus, it remains unclear whether all of the genera of MB detected in upland soils are involved in the process of atmospheric methane oxidation. Holmes *et al.* (1999) combined *pmoA* analysis of soils with ¹⁴C-labeling of phospholipid fatty acids (PLFAs), which are useful biomarkers with which to distinguish different groups of MB (Bowman *et al.* 1991, Guckert *et al.* 1991). Soils were incubated with ¹⁴CH₄, and the resulting ¹⁴C-labeled PLFA profiles were similar but not identical to PLFA profiles of type II MB (Alphaproteobacteria). Only *pmoA* sequences of USC α were detected in these soil samples. On the basis of these combined results, the existence of a novel group of methanotrophic Alphaproteobacteria involved in atmospheric methane oxidation was postulated. Later work with ¹⁴CH₄ or ¹³CH₄ labeling of PLFAs has supported this hypothesis (Bull *et al.* 2000, Roslev and Iversen 1999). Soil pH values were reported in two of these studies, and all were acidic (pH \leq 5.2) (Holmes *et al.* 1999, Roslev and Iversen 1999). The close relationship of the novel *pmoA* sequences to that of the acidophile *Methylocapsa acidiphila* may indicate that the putative MB possessing these sequences are specialized acidophiles.

The influence of various physicochemical soil parameters (temperature, water content, pH, ammonium content, land use, fertilization, and texture) on methane oxidation activity in upland soils has been examined in several studies (LeMer and Roger 2001). The influence of these parameters on the composition of the methanotrophic community has only rarely been studied, e.g. the vertical distribution of MB in a soil (Henckel *et al.* 2000a) or the effects of land use (Reay *et al.* 2001). The aim of our study was to characterize MB communities and methane oxidation activity in diverse upland soils varying in pH, soil type, land use, and plant cover. To characterize the community of physiologically active MB, selected soil samples were incubated with ¹³CH₄, followed by extraction and analysis of PLFAs.

Materials and methods

Sampling sites and soil characteristics. Sampling sites were located near Eiterfeld, Bad Bentheim, Gerold, Marburg, Würzburg and Göttingen (Germany), near Welschnofen and Völser Aicha (Italy), and near Denekamp (The Netherlands) (Table 1). Soil samples were taken in May to July 2001 and in April 2002 from the upper mineral horizon (generally 5 to 20 cm from the soil surface). The soil types were determined by reference to soil maps (1 : 25,000). Further characterization of the soil samples included measurement of pH in water and ammonium concentration (Kandeler and Gerber 1988). Based on the initial results, sites E 5FB, G 15F, G 13FH, G 44F, G 44W and MF were selected for further analyses, and fresh samples of these soils were taken in July 2002.

Methane oxidation. Ten-gram amounts of sieved (< 3-mm mesh) soil were incubated at 25°C in 120-ml serum vials closed with butyl rubber septa. Triplicates for each sample were incubated under atmospheric CH₄ or under elevated CH₄ mixing ratios (100 to 400 ppmv). The decrease of CH₄ in the headspace was measured using an SRI 8610C gas chromatograph (SRI Instruments, Torrance, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (detector temperature, 140 °C; Porapak Q column, 6 feet long, 1/8 in. in diameter, 80/100 mesh [Supelco, Taufkirchen, Germany]; oven temperature, 100 °C). A linear decrease of CH₄ versus time was always observed in the elevated-CH₄ vials, and was used to estimate maximum apparent CH₄ oxidation rates ($V_{\max(\text{app})}$). Incubation under atmospheric CH₄ mixing ratios resulted in an exponential decrease of CH₄, from which the specific affinity a^0_s (first-order uptake rate constant) was calculated by using the least-squares iterative fitting procedure of Origin 6.1 (Microcal Software, Inc. Northampton, Maine). Incubation times varied depending on the activity of the sample and included 3 to 12 measurement points (elevated CH₄) or 4 to 10 measurement points (atmospheric CH₄).

Methane oxidation kinetics were determined more intensely in the fresh samples collected for the ¹³CH₄ labeling experiment. Vials (35 ml) were filled with 5 ml of soil slurry (2 volumes of distilled water per g of soil), injected with CH₄ mixing ratios of 2 to 150 ppmv (duplicates at each level), and incubated on a rotary shaker at 180 rpm and 25 °C. CH₄ oxidation rates were estimated by linear regression (maximum decline in CH₄ of 33%, maximum incubation time of 34 h), and plotted against the CH₄ concentration at the time midpoint. $V_{\max(\text{app})}$ and the apparent half-saturation constant ($K_{m(\text{app})}$) were estimated by least-squares fitting to a Michaelis-Menten hyperbolic model.

DNA extraction and PCR amplification. DNA was extracted from 0.5 g of soil (stored at - 20 °C immediately after sampling) using the Fast DNA SPIN Kit (BIO 101, La Jolla, CA, USA). To increase DNA recovery, the final elution of the DNA was performed twice with 100 µl of DNase-free water. Additional purification was achieved using polyvinylpolypyrrolidone as described by Henckel *et al.* (2000), again with twofold elution of the DNA with TE-buffer (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8). The DNA was finally purified and concentrated with a QIAquick PCR Purification KitTM (Qiagen, Hilden, Germany).

A partial fragment of *pmoA* was amplified with primers A189/A682 (Holmes *et al.* 1995) and A189/mb661 (Costello and Lidstrom 1999). For denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), a GC-clamp was attached to the 5' end of the A189 primer (Henckel *et al.* 1999). A touchdown PCR program (Henckel *et al.* 1999) with annealing temperatures decreasing from 62 to 55 °C was used with 30 cycles when primers A189 and A682 were used and 35 cycles when primers A189 and mb661 were used. A fragment of the *mmoX* gene encoding the active-site subunit of soluble MMO was amplified with primers described by Auman *et al.* (2000). The PCR program consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1.5 min and 72 °C for 1 min, with a final extension step of 72 °C for 7 min. Amplification of a gene fragment of the 16S rRNA was performed using primers UNI 533f and UNI 907r (Weisburg *et al.* 1991) as described previously (Henckel *et al.* 1999). All PCR mixtures contained each primer at 0.5 µM, 1× Premix F (Epicentre Technologies, Madison, Wis), 1 U of *Taq* DNA polymerase (Qbiogene, Heidelberg, Germany), and 1 µl of template DNA and were run on either a GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) or a Primus 96 Cycler (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

DGGE. For each sample, separation of the mixed *pmoA* products by DGGE was performed on PCR products of both primers A189 and A682 and primers A189 and mb661. DGGE was performed as described previously (Henckel *et al.* 1999) in a gradient of 35 – 80 % denaturant at 61 °C and 180 V for 5 h. Visible bands were excised and reamplified. PCR products of bands that migrated closely in DGGE gels were checked for purity in a second DGGE gel. Although reamplification of bands usually gave a single *pmoA* product to be sequenced, occasionally nonspecific products were also evident. Three procedures were used to remove these nonspecific products: (i) primer mb661 or A650 (Bourne *et al.* 2001), instead of A682, was used for reamplification of excised bands; (ii) the complete PCR product was loaded onto an agarose gel and the band with the expected size of *pmoA* was excised and purified with a

Qiaquick Gel Extraction KitTM (Qiagen); or (iii) PCR products were cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The *pmoA* products obtained from positive clones were verified by comparing their migration in DGGE to that of the original excised *pmoA* gene fragment.

Sequencing and phylogenetic analysis. PCR products from excised DGGE bands were purified with a QIAquick PCR Purification KitTM (Qiagen) and sequenced on an ABI 377 DNA sequencer using BigDye terminator chemistry as specified by the manufacturer (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Phylogenetic tree reconstructions based on deduced amino acid sequences of partial *pmoA* and *amoA* sequences were performed with the ARB software package (Strunk *et al.* 1998) and the PHYLIP software package version 3.6a2.1 (Felsenstein 1993). Original tree construction included sequences of all DGGE bands, all available *pmoA* sequences in the GenBank database (April 2003), and selected public-domain *amoA* sequences. A selection was then made of 28 representative sequences from this study plus 38 public-domain sequences.

Labeling experiments with [¹³C]-methane. Incubation of 25-g amounts of sieved soil under 50 ppmv of labeled ¹³CH₄ (99%; Cambridge Isotope Laboratories, Mass.) or unlabeled CH₄ in air was performed in 1,000-ml screw-cap flasks sealed gas tight with silicone septa. Incubation was performed at 25 °C for four weeks. Methane was measured at 1- to 5-day intervals (depending on the activity of the sample) by GC-FID and added again each time the mixing ratio fell below 10 ppmv. Control labeling experiments were also done with the MB strains *Methylosinus trichosporium* KS24b (Heyer *et al.* 2002) and *Methylocaldum* sp. E10a. The latter was isolated from site E 20 using methods described previously (Heyer *et al.* 2002). Its 16S rRNA sequence is 97.8 % identical to that of *Methylocaldum tepidum* LK6. Cultures were grown in liquid mineral salts medium A under an atmosphere containing 20 % (v/v) CH₄ (Heyer *et al.* 1984).

Care was taken to control for secondary labeling effects of ¹³CO₂ in soil incubations. Tubes containing 5 ml of 5 M NaOH solution were inserted into flasks to fix emerging ¹³CO₂. After two weeks of incubation, the ¹³C/¹²C-isotope ratio of CO₂ in the headspace of the flasks was measured with a Thermo Finnigan MAT Delta Plus isotope mass spectrometer (Thermoquest, Bremen, Germany) coupled to a Hewlett Packard (Waldbronn, Germany) 6890 gas chromatograph (detector temperature, 150 °C; Pora Plot Q column, 27.5 m by 0.32 mm [diameter] [Chrompack, Frankfurt, Germany]; oven temp. 25 °C) (GC-IRMS). This

measurement detected a slight increase in labeled $^{13}\text{CO}_2$ in the headspace of samples incubated with $^{13}\text{CH}_4$ (increase in label in $\text{CO}_2 < 1$ atom %). Therefore, the flasks were flushed well with air and the NaOH solution was replaced at this time. As a further control of secondary labeling effects, soil samples MF and G 44F were incubated with $^{13}\text{CO}_2$ instead of $^{13}\text{CH}_4$. $^{13}\text{CO}_2$ was released from a solution of $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (99.9 %; Cambridge Isotope Laboratories) and added via syringe to the incubation flasks. The final mixing ratio of 225 ppmv of $^{13}\text{CO}_2$ was verified by measurement with a GC-8A GC-FID (Shimadzu, Kyoto, Japan) (detector temp. 350°C ; 50/100 mesh Porapak QS column, 2 m long by $\times 1/8$ in. diameter [Alltech, Unterhaching, Germany]; oven temperature 40°C) equipped with a methanizer (NiCr-Ni-catalyst column; 20 cm long by $1/8$ in. in diameter [Chrompack]). The $^{13}\text{CO}_2$ added was equal to the total amount of $^{13}\text{CH}_4$ oxidized in the soil sample with the highest methane oxidation activity.

PLFA analysis. Lipids were extracted from 10 g of soil by a modified Bligh and Dyer method and fractionated on silica columns (CUSIL15Z; ICT, Bad Homburg, Germany). PLFAs were subjected to mild alkaline methanolysis as described previously (Knief *et al.* 2003). Cells from pure cultures were harvested by centrifugation ($10,000 \times g$, 20 min) and washed twice with 0.9 % NaCl solution before PLFA extraction.

Separation, identification, and quantification of fatty acid methyl esters (FAMES) were performed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) as described previously (Lipski and Altendorf 1997). The positions of double bonds and cyclopropyl groups were determined by analysis of dimethyl disulfide adducts (Nichols *et al.* 1986). Carbon isotope ratios of the individual FAMES were determined with the GC-IRMS system described above. The GC-IRMS apparatus was equipped with the same nonpolar column as was the GC-MS apparatus (5% phenyl methyl silicone capillary column, 30 m by 0.25 mm [diameter] [Hewlett Packard]), and the same temperature program was used to separate FAMES (0.5 min at 120°C , increase of 5°C min^{-1} to 240°C and finally 240°C for 2 min) in order to obtain similar PLFA profiles by both analyses. The injector temperature of the GC-MS was set to 250°C and a split ratio of 29.2 was used, while the injector temperature of the GC-IRMS system was set to 300°C and a splitless injection mode was used. To calculate isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) for the PLFAs, $\delta^{13}\text{C}$ values of the FAMES were corrected using a mass balance for the carbon atom of the methyl group that was added during methanolysis (Rieley 1994). For each PLFA, the incorporation of ^{13}C (I , expressed as micrograms of ^{13}C per gram of total PLFAs) was calculated as follows: $I = (F_l - F_u) \times (A_x)$, where A_x = peak area of PLFA_x divided by the

sum of the peak areas of all of the PLFAs. F is the fraction of ^{13}C in PLFA_x of samples incubated with ^{13}C (F_I) or samples incubated with ^{12}C (F_U) and was calculated as follows: $F = \frac{^{13}\text{C}}{^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}} = \frac{R}{R+1}$. The carbon isotope ratio (R) was derived from the measured $\delta^{13}\text{C}$ -values as follows: $R = (\delta^{13}\text{C}/1000 + 1) \times R_{\text{VPDB}}$, with $R_{\text{VPDB}} = 0.0112372$.

Nucleotide sequence accession numbers. Representative *pmoA* nucleotide sequences obtained during this study have been deposited in the GenBank, EMBL, and DDBJ nucleotide sequence databases under the accession numbers AJ579657 – AJ579676.

Results

Characterization of the sampling sites. Soil samples were taken from seven regions in Central Europe incorporating different soil types, land-uses, and plant covers (Table 1). Care was taken to select soil types of various pHs to test the hypothesis that USC α represents a specialized acidophile. Soil pH-values ranged from 3.9 to 8.0.

No soil showed a net CH₄ production, although a few had no measurable CH₄ uptake. The $V_{max(app)}$ values for methane oxidation at 25 °C ranged from < 0.01 up to 3.11 nmol of CH₄ g of dry weight⁻¹ h⁻¹. Specific affinity (a^0_s) reached values greater than 1 ml g of dry weight⁻¹ h⁻¹ in four forest soils and meadow soil sample G 44W. $K_{m(app)}$ values calculated from the data in Table 1 ranged from a CH₄ mixing ratio in air of 2 ppmv (BB WNW) to 196 ppmv (G 15W) (or 3 to 271 nM dissolved CH₄). A correlation between $V_{max(app)}$ and a^0_s was not observed, nor was there any significant correlation of these kinetic values with soil pH or ammonium or ammonia concentrations (data not shown).

Characterization of the MB community. The community of MB was characterized in 35 samples by cultivation-independent retrieval of partial *pmoA* genes, followed by comparative sequence analysis of derived amino acid sequences (PmoA). PCR amplification of *pmoA* from all samples was successful, with the exception of G BWN, G BF, and BB NH. Some of the sequences retrieved with the primers A189 and A682 were closely related to the *amoA* gene (encoding a subunit of ammonia monooxygenase) of ammonia-oxidizing *Betaproteobacteria* (Fig. 1 and Table 2). This was expected, as the primers A189 and A682 amplify both *pmoA* and *amoA* gene fragments, while A189f and mb661 is specific for *pmoA* (Costello and Lidstrom 1999, Holmes *et al.* 1995).

Table 1: Description of the sampling sites, soil pH, and kinetic values of methane oxidation. Kinetic values are: the maximum zero-order methane uptake $V_{\max(\text{app})}$ [$\text{nmol CH}_4 (\text{g dry wt})^{-1} \text{h}^{-1}$] the specific affinity a_s^0 [$\text{ml}_{(\text{gas})} (\text{g dry wt})^{-1} \text{h}^{-1}$]^a and the apparent Michaelis-Menten kinetic constant $K_{m(\text{app})}$ [ppmv CH_4], which was calculated from $V_{\max(\text{app})}/a_s^0$.

Soil sample	Position	Soil type, German classification (corresponding FAO soil group)	Land use/plant cover	pH	$V_{\max(\text{app})}$	a_s^0	$K_{m(\text{app})}$
Eiterfeld							
E 20	N 50°45.406' E 9°49.721'	Parabraunerde (Luvisol)	Farmland (wintergrain)	7.6	0.00	-	-
E 33a	N 50°45.252' E 9°48.678'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp.)	6.6	0.94	0.63	37
E 33b	N 50°45.243' E 9°48.675'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp.)	5.1	0.08	0.31	6
E L4	N 50°44.991' E 9°48.371'	Pararendzina (Leptosol)	Meadow, scattered with <i>Pinus sylvestris</i> , sampling point from meadow	5.7	0.25	0.50	12
E L4P	N 50°44.990' E 9°48.374'	Pararendzina (Leptosol)	Meadow, scattered with <i>Pinus sylvestris</i> , sampling point under <i>Pinus sylvestris</i>	5.9	0.13	0.37	9
E L5	N 50°45.034' E 9°48.496'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Prunus</i> sp.)	5.2	0.11	0.10	29
E L6	N 50°45.002' E 9°48.400'	Pararendzina (Leptosol)	Meadow	6.2	0.45	0.41	26
E W7	N 50°43.654' E 9°43.654'	Rendzina (Leptosol)	Meadow	7.2	0.01	-	-
E 5FB	N 50°43.461' E 9°47.118'	Rendzina (Leptosol)	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp., scattered <i>Pinus sylvestris</i>)	7.5	3.11	1.36	56
E 5FL	N 50°43.463' E 9°47.081'	Rendzina (Leptosol)	Mixed forest (<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Larix decidua</i> , scattered <i>Fagus sylvatica</i>)	6.2	0.48	0.10	114
E 26F	N 50°43.023' E 9°48.501'	Parabraunerde (Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp.)	4.9	0.07	0.08	21
E 26W	N 50°43.010' E 9°48.507'	Parabraunerde (Luvisol)	Pasture	5.9	0.24	0.08	78
E 26A	N 50°43.008' E 9°48.504'	Parabraunerde (Luvisol)	Farmland (wintergrain)	6.6	0.04	0.06	17
E 56A	N 50°42.971' E 9°45.506'	Pseudogley (Stagnic Gleysol)	Farmland (rape)	6.9	0.01	0.03	12
E 56W	N 50°42.971' E 9°45.506'	Pseudogley (Stagnic Gleysol)	Pasture	5.6	0.11	0.32	8
E 56F	N 50°42.960' E 9°45.423'	Pseudogley (Stagnic Gleysol)	Mixed forest (<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus rubra</i> , <i>Populus tremula</i>)	4.6	0.16	0.45	9

Soil sample	Position	Soil type, German classification (corresponding FAO soil group)	Land use/plant cover	pH	$V_{\max(\text{app})}$	α_s^0	$K_{m(\text{app})}$
Gerold							
GE BWN	N 47°28.950' E 11°11.967'	not determined	Meadow	5.8	0.51	0.67	18
GE BF	N 47°28.950' E 11°11.967'	not determined	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i>)	6.8	0.80	0.73	27
Welschnofen/Völser Aicha							
WO DFH	N 46°25.342' E 11°36.030'	not determined	Coniferous forest (<i>Picea abies</i> , <i>Pinus cembra</i> , <i>Larix europaea</i>)	5.6	1.55	1.74	22
VA DFT	N 46°29.204' E 11°29.324'	not determined	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i>)	4.4	1.11	6.41	4
VA DWT	N 6°29.294' E 11°29.318'	not determined	Meadow	6.8	0.77	0.64	30
Marburg							
MF	N 51°00.000' E 9°50.625'	Braunerde (Cambisol)	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus robur</i>)	4.0	1.26	5.08	6
Bad Bentheim/Denekamp							
BB NH	N 51°21.505' E 7°04.285'	Podsole (Podzol)	Heathland (<i>Calluna vulgaris</i>)	4.6	0.08	0.24	8
BB NNW	N 51°21.383' E 7°04.267'	Podsole (Podzol)	Coniferous forest (<i>Pinus sylvestris</i>)	4.3	0.06	0.32	4
BB WNW ^b	N 51°21.104' E 7°06.169'	Podsole (Podzol)	Coniferous forest (<i>Pinus sylvestris</i>)	3.9	0.01	0.16	2
BB WAS	N 51°21.004' E 7°06.190'	Podsole (Podzol)	Farmland (closure since ½ year)	5.6	0.25	0.11	58
Göttingen							
G 15F	N 51°33.974' E 10°0.657'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , scattered <i>Tilia platiphyllas</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i>)	7.7	0.95	0.39	60
G 15W	N 51°33.971' E 10°0.645'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Meadow	7.3	0.39	0.05	196
G 15A ^b	N 51°33.964' E 10°0.655'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Farmland (wintergrain)	7.8	0.05	0.03	38
G 13FH	N 51°31.096' E 10° 2.171'	Rendzina (Leptosol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Acer platanoides</i>)	7.1	0.93	0.23	100
G 44W	N 51°30.411' E 10° 1.154'	Rendzina (Leptosol)	Meadow	7.8	1.22	1.51	20

Soil sample	Position	Soil type, German classification (corresponding FAO soil group)	Land use/plant cover	pH	$V_{\max(\text{app})}$	a_s^0	$K_{m(\text{app})}$
G 44F	N 51°30.423' E 10° 1.167'	Rendzina (Leptosol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>)	8.0	2.39	1.00	58
Würzburg							
W B5FH	N 49°49.041' E 9°54.955'	Podsolige Braunerde (Cambisol)	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Carpinus betulus</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Larix decidua</i>)	6.3	0.44	0.33	33
W B5FP	N 49°48.960' E 9°54.804'	Podsolige Braunerde (Cambisol)	Mixed forest (<i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Pinus sylvestris</i>)	6.9	0.49	0.20	60
W Re4F	N 49°51.540' E 9°54.521'	Protorendzina (Leptosol)	Deciduous forest (<i>Carpinus betulus</i> , <i>Prunus</i> sp., <i>Quercus robur</i> , <i>Acer campestre</i>)	6.1	0.29	0.15	46
W Re1F	N 49°52.553' E 9°52.355'	Protorendzina (Leptosol)	Mixed forest (<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Acer campestre</i>)	7.6	0.37	0.15	58
W Re3W	N 49°52.234' E 9°51.684'	Mullartige Rendzina (Leptosol)	Meadow	7.8	0.74	0.34	53
Samples from July 2002							
E 5FB	N 50°43.461' E 9°47.118'	Rendzina (Leptosol)	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp., scattered <i>Pinus sylvestris</i>)	6.5	1.52	0.21	177
MF	N 51°00.000' E 9°50.625'	Braunerde (Cambisol)	Mixed forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus robur</i>)	4.3	2.62	1.58	40
G 15F	N 51°33.974' E 10°0.657'	Pseudogley Parabraunerde (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , scattered <i>Tilia platiphyllas</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i>)	7.9	0.78	1.53	13
G 13FH	N 51°31.096' E 10° 2.171'	Rendzina (Leptosol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Acer platanoides</i>)	6.8	0.80	-	-
G 44F	N 51°30.423' E 10° 1.167'	Rendzina (Leptosol)	Deciduous forest (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>)	7.9	1.80	1.02	43
G 44W	N 51°30.411' E 10° 1.154'	Rendzina (Leptosol)	Meadow	8.0	1.38	-	-

^a a_s^0 is a first-order rate constant. The unit ml does not refer to ml of CH₄, but rather indicates standardization to 1 ml of total gas volume (i.e. mol CH₄ [mol CH₄/ml_(gas)]⁻¹ [g dry wt]⁻¹ h⁻¹). To calculate rates of atmospheric methane uptake, multiply a_s^0 by the mixing ratio of methane in the atmosphere (1.7 ppmv CH₄ = 0.071 nmol CH₄ ml⁻¹).

^b sample was not analyzed by molecular methods.

Table 2: Methanotrophic community of different soil samples, based on the detection of the *pmoA* gene. See Table 1 for site descriptions.

	pH	PmoA					PmoA or AmoA	AmoA
		<i>Methylo-</i> <i>caldum</i>	<i>Methylo-</i> <i>sinus</i>	<i>Methylo-</i> <i>cystis</i>	USC α	USC γ	(unknown) ^a	(ammonia oxidizer)
E 20	7.6	+	+					+
E 33a	6.6		+	+	+			+
E 33b	5.1		+	+	+		A	+
E L4	5.7		+		+			
E L4P	5.9		+		+			+
E L5	5.2		+		+		A	
E L6	6.2		+		+	+		
E W7	7.2	+	+	+	+			+
E 5FB	7.5		+			+		
E 5FL	6.2		+			+		+
E 26F	4.9		+		+			
E 26W	5.9		+	+	+			+
E 26A	6.6		+				A	+
E 56A	6.9	+	+				A	+
E 56W	5.6		+	+	+			
E 56F	4.6		+	+	+		B	
GE BWN	5.8							
GE BF	6.8							
WO DFH	5.6				+			
VA DFT	4.4				+			
VA DWT	6.8			+		+		
MF	4.0				+			
BB NH	4.6							
BB NNW	4.3				+			
BB WAS	5.6							+
G 15F	7.7	+		+	+			
G 15W	7.3			+				
G 13FH	7.1				+	+		
G 44W	7.8	+						
G 44F	8.0			+				+
W B5FH	6.3				+	+		
W B5FP	6.9	+			+			
W Re4F	6.1	+		+	+			
W Re1F	7.6	+		+		+		
W Re3W	7.8	+				+		
Samples from July 2002:								
E 5FB	6.5				+	+	C	
MF	4.3				+			
G 15F	7.9		+		+	+		
G 13FH	6.8				+	+	B, C	+
G 44F	7.9		+	+	+	+		
G 44W	8.0		+		+	+		

^a A, B, and C indicate the affiliation of the detected sequences to different unknown clusters.

PmoA sequences closely related to those of the genera *Methylocaldum*, *Methylosinus*, and *Methylocystis* were detected in 70% of the soil samples analyzed (Table 2). *Methylocaldum*-like sequences were in three main groups: identical to those of *Methylocaldum szegediense*, closely related to *Methylocaldum tepidum* (> 99 % identity), and belonging to a novel branch with 94 to 95 % identity to known *Methylocaldum* strains. The last are represented by sequences G 15F-a and W Re3W-b (Fig. 1). All *Methylosinus*-like PmoA sequences fell clearly within the *Methylosinus trichosporium* cluster. *Methylocystis*-like sequences clustered into a group represented by many sequences in the GenBank database, including *Methylocystis* sp. strain SC2 and *Methylocystis* sp. strain LR1 (Fig. 1).

Many soil samples also contained sequences less closely related to those of cultivated MB species. USC α (Table 2 and Fig. 1), which has previously been detected in upland soils that consume atmospheric methane, was very common. Another cluster of sequences (upland soil cluster γ , USC γ) was distantly related to PmoA sequences of methanotrophic Gammaproteobacteria (Fig. 1). The highest identity values of USC γ amino acid sequences to those of cultivated MB were only 72 – 75 %, to *Methylocaldum* strains, *Methylococcus capsulatus*, and *Methylobacter* sp. strain LW14. In addition, soil samples E 33b, E L5, E 56A, and E 26A yielded PmoA sequences closely related to those of methanotrophic isolates K3-16 and K1-8, which were recently described by Pacheco-Oliver *et al.* (2002). Two further sequence types may represent either AmoA or PmoA: i) sequences from E 56F and G 13FH (2002) that were related to MR1 (Henckel *et al.* 2000a) and ii) sequences represented by E 5FB-f, which were detected in soil samples E 5FB and G 13FH, which were collected in 2002 (Table 2).

A fragment of the *mmoX* gene was not detected in any sample. Either MB possessing sMMO are uncommon in upland soils, or the PCR systems used to detect *mmoX* are not as sensitive as those for *pmoA*. Thus, no marker genes for methanotrophs were detected in the GE BWN, GE BF, and BB NH soil samples, although these soil samples exhibited methane oxidation activity (Table 1). A severe inhibition of the PCR assays of these three samples by coextracted inhibitory substances in the DNA extracts was unlikely, since PCR assays for the amplification of a partial 16S rRNA gene fragment were not inhibited (data not shown).

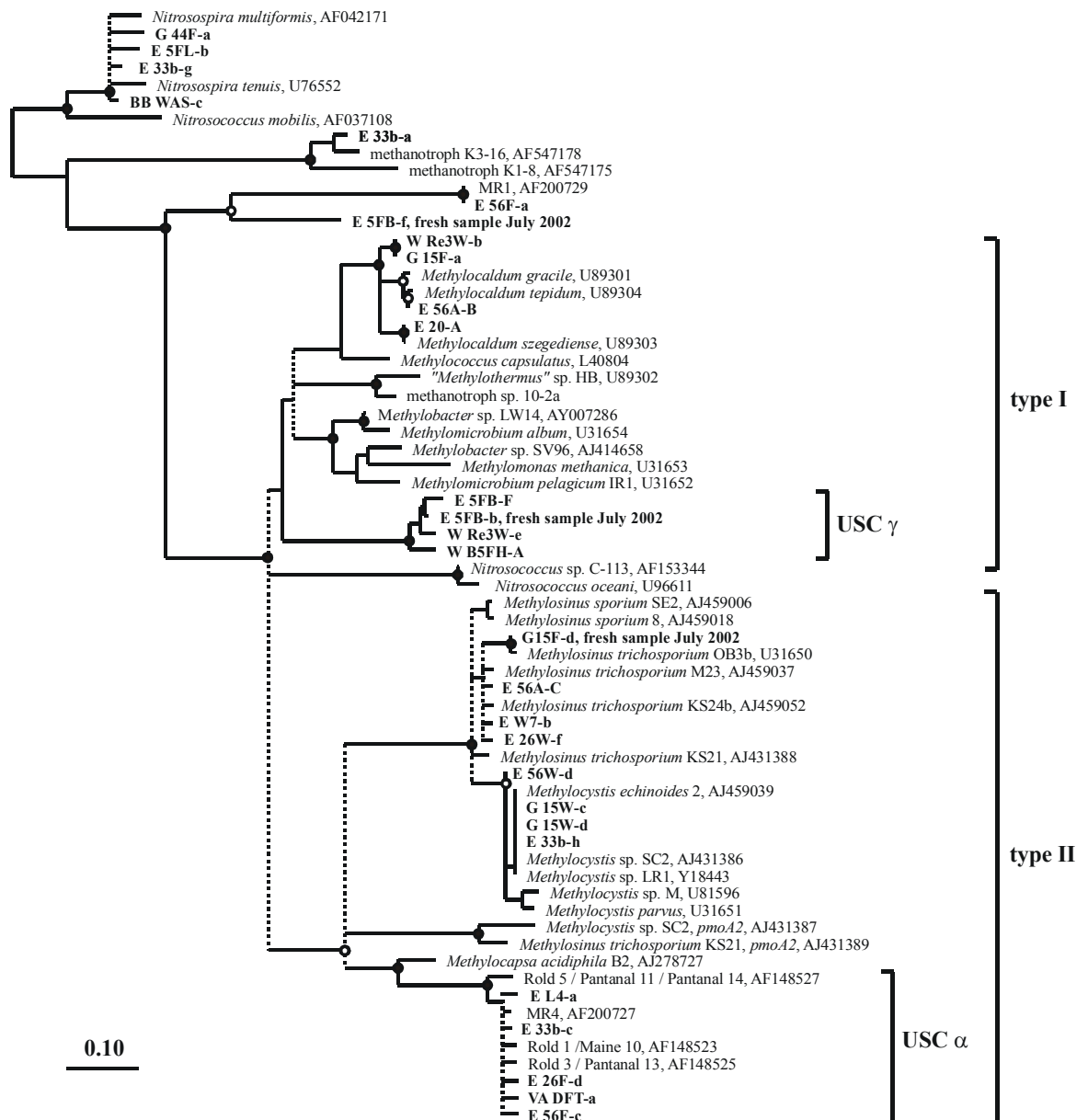


Figure 1: Consensus tree showing the relationship of the derived amino acid sequences of partial *pmoA* sequences retrieved from soils to public-domain PmoA and AmoA sequences. The base tree was constructed based on 141 amino acid residues using a neighbor-joining algorithm with a Kimura correction. Multifurcations indicate branch points where the topology of distance-matrix based neighbor-joining trees with Kimura or PAM correction, of a maximum-likelihood tree, and of a parsimony tree differed. These are indicated by dashed lines. Bootstrap values were calculated with the Phylip software package, based on 1000 data resamplings. Bootstrap values $\geq 90\%$ are indicated by black circles and values $\geq 80\%$ by white circles. The cluster of AmoA sequences was set as an outgroup. The bar represents 0.1 change per position.

Relationship between soil pH and MB community composition. To gain insight into the distribution of MB in upland soils in relation to soil characteristics, the MB community composition of the different soil samples was analyzed in comparison to methane oxidation

activity, land use, ammonium and ammonia concentrations, and pH values by correspondence analyses with SYSTAT version 10.2 (SPSS Inc., Richmond, Calif.). Only pH showed a clear and significant influence on the MB distribution, and only analyses for this factor are presented below.

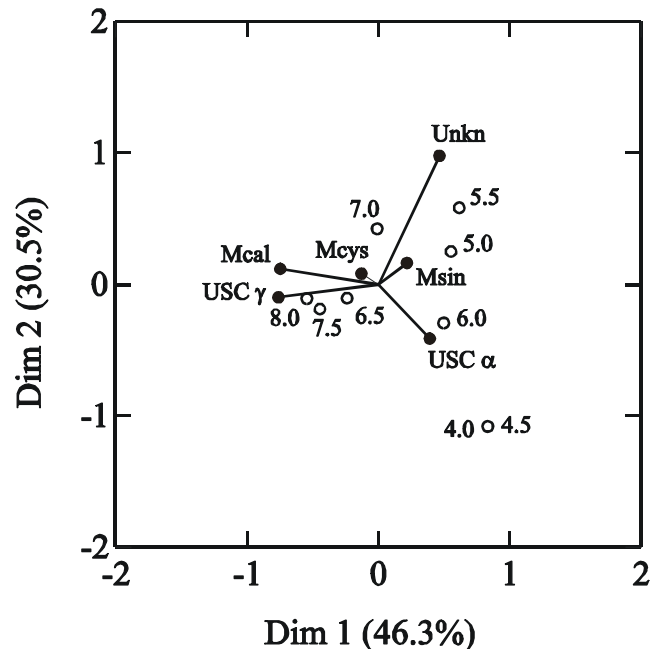


Figure 2: Correspondence plot showing the relationship between soil pH-value and the detection of the different *pmoA* sequences in 36 soil samples. The plot explains 76.8% of the variance among samples. The pH-values were classified into 9 groups and are represented by white circles in the plot. The different taxa are represented by black circles and are indicated as follows: Mcal – *Methylocaldum* spp., Mcys – *Methylocystis* spp., Msin – *Methylosinus* spp. and Unkn – for sequences of the unknown clusters that may represent either PmoA or AmoA.

The 36 soil samples from which *pmoA* products were retrieved (samples GE BWN, GE BF, BB NH, BB WNW, G 15A excluded) and atmospheric methane uptake was detectable (samples E 20 and E W7 excluded) were grouped to the closest 0.5 pH unit (i.e., 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 and 8) in order to improve the degrees of freedom in the correspondence analyses, and the correspondence of pH levels to the species groups in Table 2 was calculated (Fig. 2). The occurrence of *Methylocaldum* spp. and the USC γ strongly influenced the separation of samples with different pH values, such that the higher-pH soils corresponded well to the presence of these clusters. The significance of this trend in USC γ was confirmed with a contingency analysis. The null hypothesis that the USC γ sequences were equally distributed in high-pH versus low-pH soils (with the median soil pH

of 6 chosen as the separation point between high and low) was rejected (Fisher's exact test, $P \leq 0.001$), indicating that these sequences were significantly more likely to be detected in soils with pHs of > 6 . *Methylocystis* spp. occurred in soils with a broad pH range and had little value in sample differentiation. The presence of sequences of USC α and *Methylosinus* spp. was typical for acidic soils (Fig. 2). A contingency analysis on USC α as described above demonstrated that they were more likely to be detected in soils with pHs < 6 than in soils with pH > 6 (Fisher's exact test, $P = 0.025$), although they were also detected in some higher-pH soils (Table 2).

Statistical analysis with regard to land use or plant cover was not possible because of insufficient data. Nevertheless, it is remarkable that sequences of the USC α and USC γ were not detected in any of the four farmland soils analyzed but occurred in 30 of 34 grassland and forest soils. Sequences related to those of *Methylocaldum*, *Methylosinus*, and *Methylocystis* were detected in different soils, independent of land use and plant cover.

Labeling experiments with ^{13}C -methane. Growth in the presence of 1 % (v/v) labeled $^{13}\text{CH}_4$ plus 19 % unlabeled CH_4 in the gas headspace led to strong labeling (1,600 to 4,000 ‰) of all of the PLFAs in *M. trichosporium* KS24b and *Methylocaldum* sp. strain E10a (Fig. 3). Since the separation efficiency was better in GC-MS analysis than in GC-IRMS analysis, separate detection of 18:1 ω 8c and 18:1 ω 7c was possible, but the quantification of separate isotope ratios for these two PLFAs in *M. trichosporium* KS24b was problematic because the peaks were not baseline-separated in GC-IRMS analysis. Because of the similar labeling intensities of all of the PLFAs, the incorporation of label into the different PLFAs closely reflected the PLFA profiles of the two strains (Fig. 3). 16:1 ω 7c and 16:0 are the dominant PLFAs in *Methylocaldum* sp. E10a, while 18:1 ω 8c and 18:1 ω 7c are the main PLFAs of *Methylosinus trichosporium* KS24b.

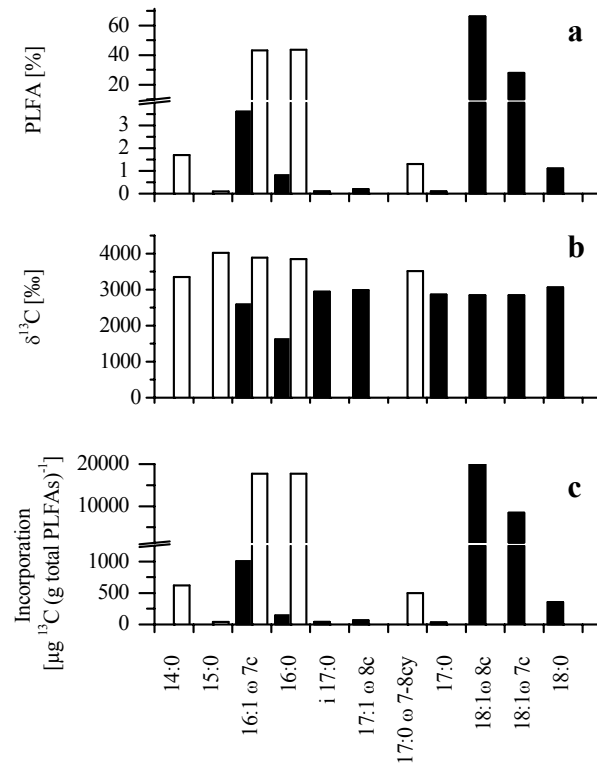


Figure 3: PLFA-profile and ^{13}C -labeling pattern of the PLFAs of *Methylosinus trichosporium* KS24b (filled bars) and *Methylocaldum* sp. E10a (open bars). The relative amount (a) and the $\delta^{13}\text{C}$ -values (b) of each PLFA were used to calculate ^{13}C incorporation into each PLFA relative to the total amount of PLFAs (c).

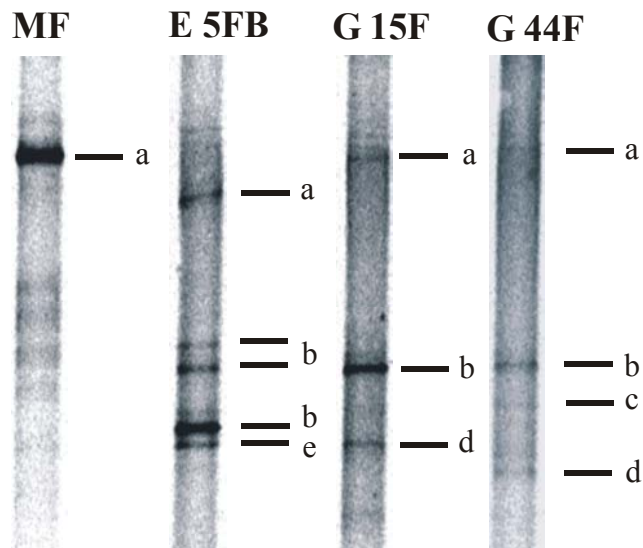


Figure 4: DGGE banding patterns of *pmoA* PCR products amplified with the primer set A189f/A682, from soil samples (July 2002) used in the $^{13}\text{CH}_4$ -labeling experiment. The bands were identified as follows: (a) USC α , (b) USC γ , (c) *Methylocystis* sp., (d) *Methylosinus* sp., and (e) unknown (PmoA/AmoA).

Fresh soil samples were taken in July 2002 from sampling sites that had shown high methane oxidation activity and contained sequences of USC γ , USC α or only *pmoA* sequences closely related to *pmoA* of cultivated MB. The MB communities in these samples were similar, but not identical, to those of the earlier samples (Table 2, Fig. 4). Either the USC γ or USC α sequences were detected in all of the fresh soil samples. In soil sample MF, only *pmoA* sequences of the USC α were detected. Soil samples E 5FB and G 15F showed intense DGGE bands for the USC γ in the DGGE gel, compared to the bands of the other detected taxa within the respective samples. Four samples were selected for the $^{13}\text{CH}_4$ -labeling experiment and a more extensive analysis of methane oxidation kinetics.

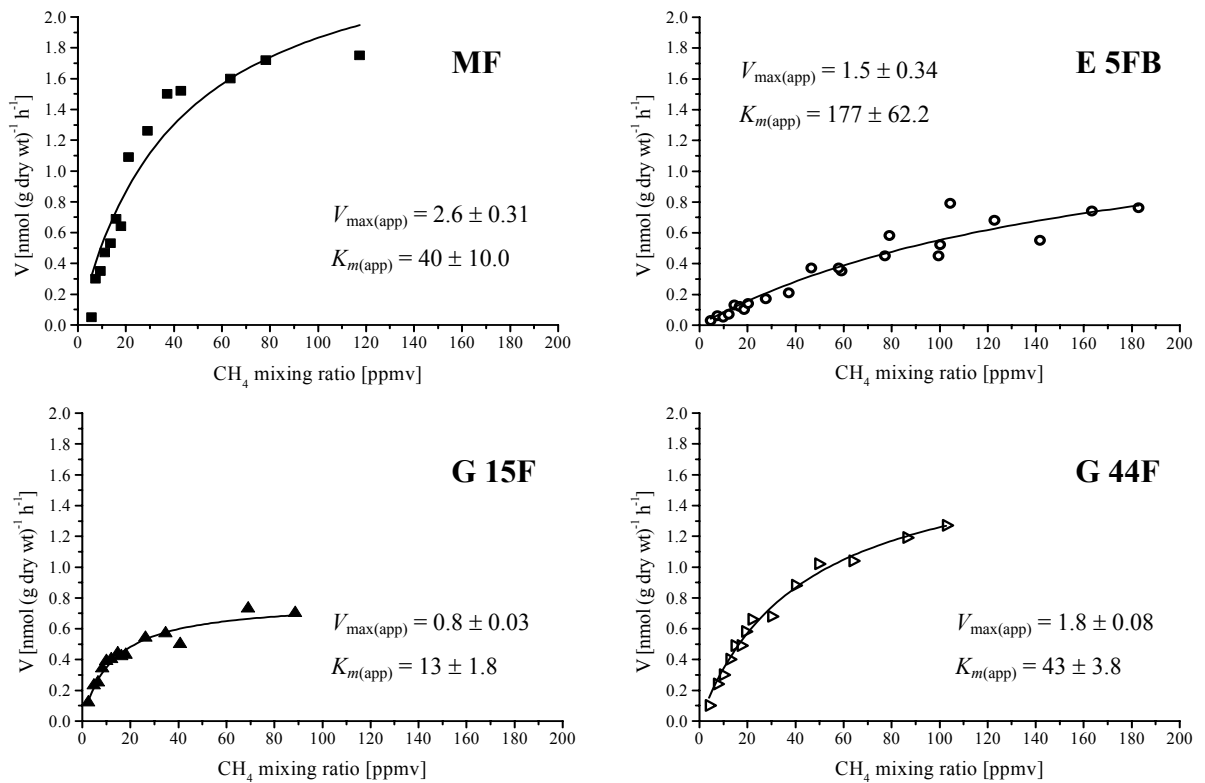


Figure 5: Methane oxidation kinetics of the soil samples used in the ^{13}C -labeling experiment. Data were fitted to the Michaelis-Menten hyperbolic curve to estimate $V_{\max(\text{app})}$ [$\text{nmol CH}_4 \text{ (g dry wt)}^{-1} \text{h}^{-1} \pm 1 \text{ SE of fitting}$] and $K_{m(\text{app})}$ [$\text{ppmv CH}_4 \pm 1 \text{ SE of fitting}$]. Each data point represents the mean of duplicate samples.

As shown in Figure 5, all four samples showed a typical Michaelis-Menten kinetic. The $K_{m(\text{app})}$ values between 13 and 177 ppmv of CH_4 (17 to 244 nM dissolved CH_4) were typical for the “high-affinity” uptake described by Bender and Conrad (1992), and no evidence of additional “low-affinity” activity was observed. The four soil samples were incubated under

$^{13}\text{CH}_4$ (or unlabeled CH_4) mixing ratios that varied during the incubations from about 10 to 50 ppmv. This value was chosen to be near the estimated $K_{m(\text{app})}$, or within the first-order range of methane uptake. Rate measurements excluded the possibility that shifts occurred within the active community of MB during the incubation. A shift could potentially be caused by induction of methane-oxidizing activity in resting cells or growth of MB. Methane oxidation rates did not increase during the incubation period of four weeks (data not shown), indicating that only the already active atmospheric methane oxidizers were labeled.

The total PLFA profiles were very similar in all soil of the soil samples. The profile of soil sample G 44F is shown as an example in Figure 6. Saturated and onefold-unsaturated PLFAs with 16 and 18 carbon atoms dominated the profiles.

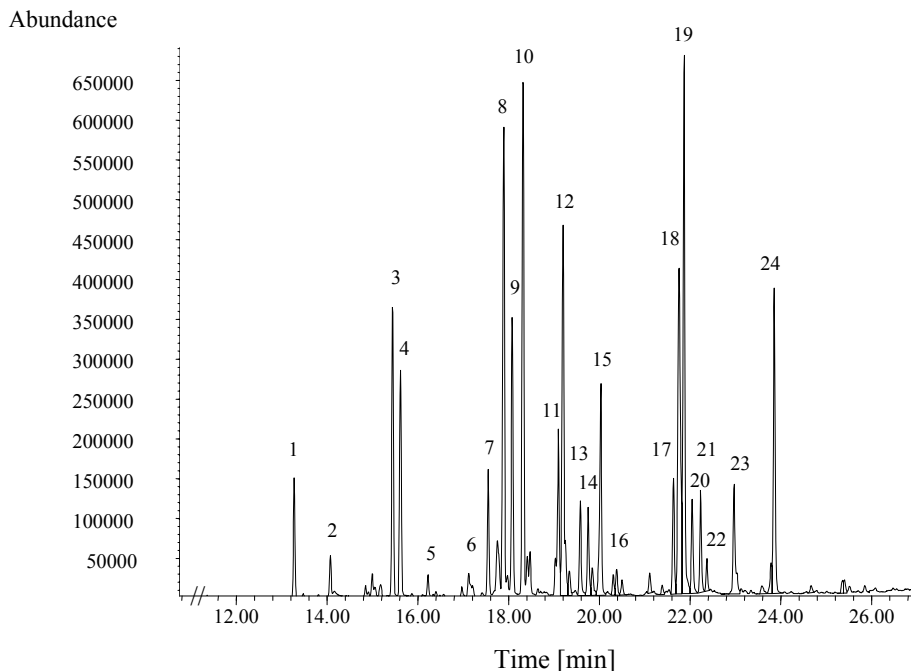


Figure 6: Partial gas chromatogram of methylated PLFAs detected by GC-MS of soil sample G 44F. Peak numbers indicate PLFAs as follows: (1) i14:0, (2) 14:0, (3) i15:0, (4) a15:0, (5) 15:0, (6) i16:1 ω 7c, (7) i16:0, (8) 16:1 ω 7c, (9) 16:1 ω 5c, (10) 16:0, (11) i17:1 ω 8c, (12) 16:0 10m, (13) i17:0, (14) a17:0, (15) 17:0 ω 7-8cy, (16) 17:0, (17) 18:2 ω 6,9c, (18) 18:1 ω 9c, (19) 18:1 ω 7c, (20) 18:1 ω 5c, (21) 18:0, (22) 18:1 ω 7c 11m, (23) 18:0 11m, and (24) 19:0 ω 7-8cy. Branched fatty acids are indicated by i (iso), a (anteiso), m (methyl) and cy (cyclo).

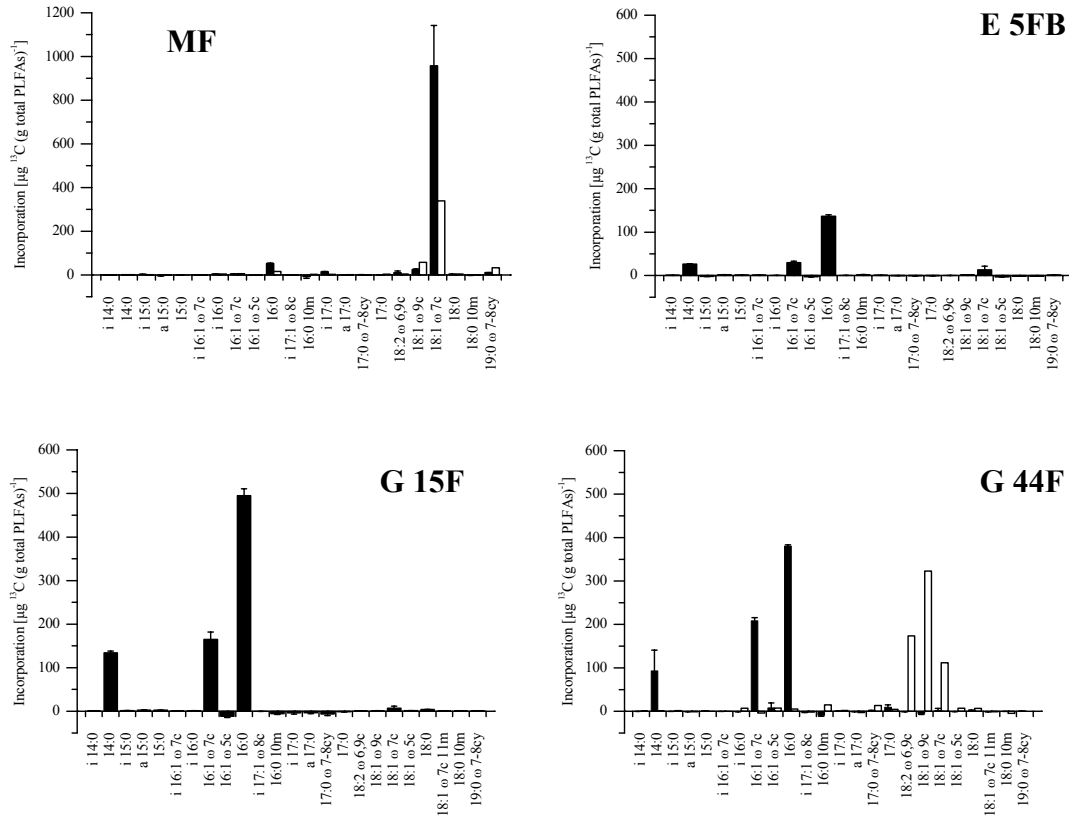


Figure 7: ^{13}C -labeling patterns of the PLFAs of soil samples incubated under 10-50 ppmv $^{13}\text{CH}_4$ (filled bars), or under 225 ppmv $^{13}\text{CO}_2$ (open bars). Incubation with $^{13}\text{CO}_2$ was only performed with samples MF and G 44F. For $^{13}\text{CH}_4$ -incubated samples, data are the mean of triplicates \pm 1 SEM.

In soil sample MF, incubation with $^{13}\text{CH}_4$ led to incorporation of ^{13}C into PLFAs 16:0, i17:0, and 18:1 ω 7c (Fig. 7). The incorporation of label into 16:0 and i17:0 was much weaker than that into 18:1 ω 7c. PLFA 18:1 ω 8c, typical of *Methylosinus* and *Methylocystis* spp., was below the detection limit of the GC-MS method used. The dimethyl disulfide derivatisation method used to confirm the positions of double bonds also failed to reveal detectable amounts of 18:1 ω 8c. The labeled profile in soil MF is most similar to that of type II MB of the genera *Methylocella* and *Methylocapsa*.

A ^{13}C labeling pattern more typical of type I MB was evident in soil samples E 5FB, G 44F, and G 15F. These profiles were dominated by PLFAs 14:0, 16:1 ω 7c and 16:0 (Fig. 7). The labeling intensity was stronger in PLFAs of soil samples G 44F and G 15F than in PLFAs of E 5FB, which is reasonable considering the relative rates of methane oxidation in these soil samples (Fig. 6).

An additional experiment was performed to exclude the possibility that secondary labeling effects were caused by $^{13}\text{CO}_2$ originating through $^{13}\text{CH}_4$ oxidation by methanotrophs.

Soil samples G 44F and MF were incubated with an amount of $^{13}\text{CO}_2$ equal to the total amount of $^{13}\text{CH}_4$ consumed in methane incubations. This led to labeling of 18:1 PLFAs in both samples, also of PLFA 19:0 ω 7-8cy in soil sample MF, and of 18:2 ω 6,9c in soil 44F (Fig. 7). Thus, soil sample G 44F showed different labeling patterns after $^{13}\text{CH}_4$ incubation than after $^{13}\text{CO}_2$ incubation. In soil sample MF, 18:1 ω 7c was labeled after incubation with both substrates. However, since the labeling was significantly lower after incubation with $^{13}\text{CO}_2$, the labeling of this PLFA after incubation with $^{13}\text{CH}_4$ was probably a direct labeling of MB and not the result of secondary effects.

Discussion

Upland soils are characterized by a high-affinity methane oxidation, with $K_{m(\text{app})}$ values for CH_4 in the nanomolar range (Bender and Conrad 1992). The $K_{m(\text{app})}$ values measured in the present work were all similar to values published previously for upland soils (7 to 200 ppmv of CH_4) (Bender and Conrad 1992, Benstead and King 1997, Conrad 1996, Dunfield *et al.* 1999, Gullledge and Schimel 1998), as were the $V_{\text{max}(\text{app})}$ values (Bender and Conrad 1992). Although there was considerable variability, all soils tested therefore showed kinetic properties typical of atmospheric methane oxidation. Atmospheric methane oxidation activity in upland soils is dependent on plant cover and land use, such that rates in woodland > rates in grassland > rates in farmland (Willison *et al.* 1995). Although not statistically tested, our data confirm this trend insofar as the highest a^0_s values (which represent the initial slope of the hyperbolic curve at low CH_4 mixing ratios) were observed in forest soils. Where several adjacent sampling sites with different land uses were analyzed, a^0_s decreased with increasing anthropogenic disturbance from woodland to pasture to cropland: specifically, in samples E 26F, E 26W and E 26A; E 56F, E 56W and E 56A; or G 15F, G 15W and G 15A (Table 1).

PmoA sequence analysis revealed that the soils contained MB closely related to cultivated species and also some only distantly related to known MB. We did not detect *pmoA* sequences related to those of the genera *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, and *Methylococcus*, which have been detected in forest soils from Denmark and the UK (Bourne *et al.* 2001, Reay *et al.* 2001), but we did commonly find *pmoA* sequences closely related to *Methylocaldum*, *Methylocystis* and *Methylosinus*. Sequences of the USC α were very common in our soils, as expected from previous studies (Bourne *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000). This cluster has been postulated to represent as yet uncultivated MB active at consuming atmospheric methane (Holmes *et al.* 1999). We also frequently detected *pmoA* sequences in a cluster (USC γ) that grouped most closely with sequences of type I MB but had only low identity values (< 75 %) with PmoA of cultivated species. A few other sequence types were detected, but only infrequently.

Sequences of USC α or USC γ have never been detected in wetland soils. The occurrence of these sequences seems to be restricted to upland soils that consume atmospheric methane. A correlation between the occurrence of these groups and the soil pH value was also evident from our data. The USC γ sequences were significantly more likely to be detected in soils with pH values of > 6.0 than in more acidic soils, whereas the opposite trend was evident for USC α . Different MB are known to have different pH optima (Dedysh *et al.* 2002, Hanson

and Hanson 1996), but pH can only be considered an indicator rather than a cause in this study. The neutral or alkaline soils studied were primarily Leptosols derived from calcareous substrate, and some chemical factor other than pH may be decisive in determining whether a particular MB group is present. Alternatively, secondary pH effects, for example, on micronutrient availability, may be critical.

The $^{13}\text{CH}_4$ labeling experiment was performed to identify the active MB in soils in which *pmoA* sequences of USC γ , of USC α , or of cultivated MB were detected. A CH_4 mixing ratio (10 to 50 ppmv) near the $K_{m(\text{app})}$ for methane oxidation of the soils was used for incubations. Control measurements ensured that only the already-active high-affinity population was labeled and that secondary labeling effects of $^{13}\text{CO}_2$ were minimal. In soil sample MF, labeling of PLFAs 16:0, i17:0, and 18:1 ω 7c was obtained after $^{13}\text{CH}_4$ incubation. PLFA 18:1 ω 7c is the main fatty acid of *M. acidiphila* and *Methylocella* spp. (Dedysh *et al.* 2002, Dunfield *et al.* 2003). PLFAs typical of type I MB (e.g., 14:0 and 16:1 ω 7c) or of other type II MB (e.g. 18:1 ω 8c) were not detectably labeled. A labeling pattern similar to that of soil sample MF was previously found in another upland soil (Bull *et al.* 2000), although a different branched 17:0 PLFA was labeled instead of i17:0. The fatty acid i17:0 has been found only in small amounts (< 0.6 %) in a few cultivated MB (Bowman *et al.* 1993, Dedysh *et al.* 2002), and the labeling of branched 17:0 PLFAs was previously interpreted to mean that active MB in soil are unusual compared to known species (Bull *et al.* 2000). This may also be the case in soil sample MF; however, such a conclusion is dangerous because i17:0 accounted for only a tiny percentage of the ^{13}C incorporated. PLFA-labeling profiles similar to that of soil sample MF were also obtained by incubation of six acidic upland soil samples under ^{14}C -labeled methane, followed by scintillation counting of fractionated FAMES (Holmes *et al.* 1999, Roslev and Iversen 1999). Although this fractionation procedure resulted in limited separation efficiency, one labeled PLFA in soil sample MF would fall within each of the labeled fractions described in these previous studies (Holmes *et al.* 1999, Roslev and Iversen 1999). The use of labeled PLFAs as chemotaxonomic marker molecules correlates well with the *pmoA* recovery in soil sample MF. The only *pmoA* sequences detected in soil sample MF belonged to USC α , a unique cluster of which the type II MB *M. acidiphila* is the closest relative. Taken together, these results strongly support the hypothesis of Holmes *et al.* (1999) that as-yet uncultivated methanotrophic Alphaproteobacteria possessing *pmoA* sequences of USC α are responsible for atmospheric methane oxidation in some upland soils.

On the other hand, the more neutral soil samples E 5FB, G 44F, and G 15F showed PLFA labeling patterns clearly distinct from that of soil sample MF. The combination of

labeled 14:0 and 16:1 ω 7c suggests that MB more closely related to cultivated type I MB were active in these soil samples. PLFA 16:1 ω 7c contributes 8 to 57 % of the total amount of PLFAs in all characterized type I MB but much less in type II MB (< 9 %) (Bowman *et al.* 1993, Nichols *et al.* 1985). Fatty acid 14:0 is abundant only in type I MB. It contributes up to 25 % of the total PLFA content of *Methylomonas* spp. and smaller amounts (1 to 10 %) to that of other type I MB (Bowman *et al.* 1997, Bowman *et al.* 1993). Only traces (< 0.1 %) have been found in *Methylosinus* spp. and *Methylocystis* spp. (Bowman *et al.* 1997, Nichols *et al.* 1985), and it is undetectable in *Methylocella* spp. and *M. acidiphila* (Dedysh *et al.* 2002, Dunfield *et al.* 2003).

At the very least, the labeling results indicate that different MB are active in different soils and include strains related to either type I (Gammaproteobacteria) or type II (Alphaproteobacteria) MB. The most likely explanation for the combined *pmoA* and PLFA data for the soil samples E 5FB, G 44F, and G 15F is that unknown methanotrophic Gammaproteobacteria possessing *pmoA* sequences of USC γ are the most active MB. This *pmoA* sequence type was detected in all three soils and was clearly the dominant *pmoA* product obtained from two. It was the only *pmoA* sequence detected that was closely related to *pmoA* sequences of type I MB, and it is therefore likely that the organisms containing these sequences were the same MB labeled with $^{13}\text{CH}_4$. However, it cannot be excluded that another type I MB that we did not detect was present and active. We have observed, for example, that *pmoA* genes of several *Methylobacter* strains are poorly amplified with the standard primer sets used here (data not shown). Sequences from USC α and sequences related to those of *Methylocystis* spp. and *Methylosinus* spp. were also detected in one or all of the E 5FB, G 44F, and G 15F soil samples, but labeled PLFAs 18:1 ω 8c and 18:1 ω 7c indicative of *Methylocystis* and *Methylosinus* spp. (Bowman *et al.* 1993, Nichols *et al.* 1985), and presumably also of USC α , were not found. This finding demonstrates that not all of the methanotrophs detectable in an upland soil sample are equally involved in the process of methane oxidation. USC γ was only detected in soils with pHs of > 6 and may therefore represent a neutrophilic or alkalophilic MB. This would explain why earlier experiments with acidic soils failed to show a PFLA-labeling pattern like that observed in the more neutral soils E 5FB, G 44F, and G 15F.

The comparison of the *pmoA* data and the PLFA patterns in this and earlier studies is based on the usefulness of both biomolecules as phylogenetic markers. Although *pmoA* is, for the most part, an excellent phylogenetic marker, two studies have demonstrated that some caution is necessary in the interpretation of *pmoA* sequences. The recently described

methanotrophic isolates K3-16 and K1-8 are related to *Methylosinus* and *Methylocystis* on the basis of 16S rRNA sequence comparison but only distantly related on the basis of *pmoA* sequence comparison (Pacheco-Oliver *et al.* 2002). As well, a second *pmoA*-like gene (*pmoA2*) has recently been found in some strains of *Methylosinus* and *Methylocystis*. These sequences have < 80 % identity to the previously known *pmoA* gene (*pmoA1*) sequences of the respective organisms (Dunfield *et al.* 2002). Together, these two studies indicate that a *pmoA*-based phylogeny does not perfectly reflect the 16S rRNA-based phylogenetic affiliation of MB and that novel clusters of *pmoA* sequences do not necessarily indicate that novel groups of uncultivated MB exist.

Nevertheless, we feel that the most likely explanation for our data is that *pmoA* sequences of the USC α and USC γ belong to unknown groups of MB active in upland soils. No other *pmoA* gene sequences were detected together with those of the USC α in soil samples MF, WO DFT, VA DFH, BB NNW, and G 13FH. The USC γ sequences were detected together with sequences of other genera; however, in the samples used for ^{13}C -labeling, none of the other MB detected would be expected to give a labeling profile typical of type I MB. Taken together, the data presented here indicate that different groups of MB are responsible for atmospheric methane uptake in different soils, and that the MB in neutral-to-alkaline Leptosols are most closely related to type I MB of the Gammaproteobacteria. Indirect evidence from other studies has suggested that MB closely related to cultivated species may also be active in certain upland soils (Dunfield *et al.* 1999, Horz *et al.* 2002), so in all, many diverse species of MB may be involved in the process of atmospheric methane oxidation.

References

- Auman, A. J., Stolyar, S., Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5259-5266.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1992. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 261-270.
- Benstead, J., and King, G. M.** 1997. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 333-340.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.
- Bowman, J. P., Skerratt, J. H., Nichols, P. D., and Sly, L. I.** 1991. Phospholipid fatty acid and liposaccharide fatty acid signature lipids in methane utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 15-22.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D., and Hayward, A. C.** 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the Group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 735-753.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., and Skerratt, J. H.** 1997. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology - UK* **143**: 1451-1459.
- Bull, I. D., Parekh, N. R., Hall, G. H., Ineson, P., and Evershed, R. P.** 2000. Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature* **405**: 175-178.
- Conrad, R.** 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609-640.
- Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Bares, A. M., Panikov, N. S., and Tiedje, J. M.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969.
- Dedysh, S. N., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Liesack, W., and Tiedje, J. M.** 2002. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 251-61.
- Dunfield, P. F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R., and Conrad, R.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1009-1014.
- Dunfield, P. F., and Conrad, R.** 2000. Starvation alters the apparent half-saturation constant for methane in the type II methanotroph *Methylocystis* strain LR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4136-4138.
- Dunfield, P. F., Tehawa Yimga, M., Dedysh, S. N., Berger, U., Liesack, W., and Heyer, J.** 2002. Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel *pmoA*-like gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 17-26.
- Dunfield, P. F., V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, and S. N. Dedysh.** 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1231-1239
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP: phylogeny inference package. University of Washington, Seattle.

- Fjellbirkeland, A., Torsvik, V., and Øvreås, L.** 2001. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxoF* and 16S rDNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 209-217.
- Guckert, J. B., Ringelberg, D. B., White, D. C., Hanson, R. S., and Bratina, B. J.** 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2631-2641.
- Gulledge, J., and Schimel, J. P.** 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH₄ oxidation in soil and mechanism of NH₄⁺ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4291-4298.
- Hanson, R. S., and Hanson, T. E.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- Henckel, T., Friedrich, M., and Conrad, R.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R.** 2000a. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1801-1808.
- Heyer, J., Malashenko, Y., Berger, U., and Budkova, E.** 1984. Verbreitung methanotropher Bakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 725-744.
- Heyer, J., Galchenko, V. F., and Dunfield, P. F.** 2002. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* **148**: 2831-46.
- Hoffmann, T., Horz, H. P., Kemnitz, D., and Conrad, R.** 2002. Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different rice field soils in China and the Philippines. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 267-274.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- Holmes, A. J., Roslev, P., McDonald, I. R., Iversen, N., Henriksen, K., and Murrell, J. C.** 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.
- Horz, H.-P., Yimiga, M. T., and Liesack, W.** 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4177-4185.
- Horz, H.-P., Raghubanshi, A. S., Heyer, J., Kammann, C., Conrad, R., and Dunfield, P. F.** 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 247-257.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., and Xiaosu, D.** 2001. IPCC Climate Change 2001: The scientific basis - contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Jensen, S., Holmes, A. J., Olsen, R. A., and Murrell, J. C.** 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**: 282-289.
- Kandeler, E., and Gerber, H.** 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* **6**: 68-72.
- Knief, C., Altendorf, K., and Lipski, A.** 2003. Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of ¹³C-labeled fatty acids. *Environ. Microbiol.* **5**: 1155-1167.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., and Conrad, R.** 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2423-9.
- Le Mer, J., and Roger, P.** 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 25-50.

- Lipski, A., and Altendorf, K.** 1997. Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 448-457.
- McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 1997b. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 205-210.
- Nichols, P. D., Smith, G. A., Antworth, C. P., Hanson, R. S., and White, D. C.** 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 327-335.
- Nichols, P. D., Guckert, J. B., and White, D. C.** 1986. Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulfide adducts. *J. Microbiol. Methods* **5**: 49-55.
- Pacheco-Oliver, M., McDonald, I. R., Groleau, D., Murrell, J. C., and Miguez, C. B.** 2002. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 313-9.
- Reay, D. S., Radajewski, S., Murrell, J. C., McNamara, N., and Nedwell, D. B.** 2001. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1613-1623.
- Rieley, G.** 1994. Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes. *Analyst* **119**: 915-919.
- Roslev, P., and Iversen, N.** 1999. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4064-4070.
- Steinkamp, R., Zimmer, W., and Papen, H.** 2001. Improved method for detection of methanotrophic bacteria in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* **42**: 316-322.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H.** 1998. ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Munich.
- Weisburg, W., Barns, G., Dale, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **2**: 697-903.
- Willison, T. W., Webster, C. P., Goulding, K. W. T., and Powlson, D. S.** 1995. Methane oxidation in temperate soils: effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere* **30**: 539-546.

3.2 Atmosphärische Methanoxidation in temporär wasser-gesättigten „upland soils“

Zielsetzung: Die Methanoxidation und die Gilde der Methan-oxidierenden Bakterien in Böden mit unterschiedlich stark ausgeprägten hydromorphen Merkmalen wurde im Rahmen einer zweiten Studie beschrieben. Die Identifizierung der physiologisch aktiven MB unter Methankonzentrationen < 570 ppmv erfolgte für eine Auswahl der Proben durch den Nachweis ^{13}C -markierter Fettsäuren nach Inkubation mit $^{13}\text{CH}_4$. Analysiert wurden Proben von temporär gefluteten Böden (Pseudogleye) und Proben von Böden mit einer reduzierenden Bodenschicht (Gleye). Mit der Höhe des Grundwasser-Standes bzw. der Ausdehnung der anoxischen Bereiche in diesen Böden variiert das Potential der Methanproduktion in diesen Böden. Die Analyse der Methan-Oxidationsrate und der Zusammensetzung der Gilde der MB in derartigen Böden war bislang erst Gegenstand einer einzigen Studie (Horz *et al.* 2002).

Anmerkung: die Identifizierung der FAMES per GC-MS in dieser Studie wurde von PD Dr. André Lipski an der Universität Osnabrück durchgeführt.

Die hier gezeigten Daten entstammen dem folgenden Manuskript (Einreichung geplant bei *Appl. Environ. Microbiol.*):

Claudia Knief, Steffen Kolb, Paul L.E. Bodelier, André Lipski und Peter F. Dunfield.
Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. (in preparation)

Anmerkung: Die gezeigten Ergebnisse geben den aktuellen Stand dieser Studie wider. Das Manuskript wird in folgenden Punkten ergänzt:

- Die verwendete unpolare Säule für die gaschromatographische Trennung der FAMES stieß bei der Trennung der einfach ungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren an ihre Grenzen. Da die für *Methylocystis* und *Methylosinus* charakteristische Fettsäure 18:1 ω 8c offensichtlich nur in sehr geringer Menge vorlag, erfolgte keine Trennung von den in großer Menge vorhandenen PLFAs 18:1 ω 9c und 18:1 ω 7c. Somit war diese Fettsäure und eine mögliche Markierung dieser Fettsäure nicht nachweisbar. Der Nachweis dieser Fettsäure ist nach Auftrennung der FAMES über eine polare Säule eher möglich, falls die Fettsäuren in ausreichender Menge im Extrakt vorhanden sind. Die Analyse der FAMES nach Auftrennung über eine derartige Säule (Typ: BPX-70) wird zur Zeit von Dr. Paul L. E. Bodelier durchgeführt.
- Eine Bestimmung der Anzahl verschiedenartiger *pmoA* Zielgene in den DNA-Extrakten der Böden K M1b, L 61 und L 58 steht noch aus. Diese Bestimmung der Zielgen-Anzahl erfolgt für die verschiedenen detektierten Taxa MB durch Real-time PCR und wird derzeit von Dr. Steffen Kolb durchgeführt. Durch diese Quantifizierung soll bestätigt werden, dass die Organismen des USC α im Vergleich zu *Methylocystis* den geringeren Anteil an der Gilde der MB in den Böden ausmachen.

Abstract

The methane oxidation kinetics and the community composition of methanotrophic bacteria (MB) were studied in hydromorphic upland soils (Gleysols and Gleyic Luvisols). All soils were subject to periodic flooding or to high water tables, but when sampled all had an oxic upper layer of > 20 cm and consumed atmospheric methane. Samples from Gleysols displayed $K_{m(\text{app})}$ values (100 – 1,101 nM) for methane oxidation that were intermediate to values measured in upland soils versus soils at the aerobic-anaerobic interfaces of methanogenic ecosystems. The community of MB was characterized by cultivation-independent retrieval of the *pmoA*-gene, which codes for the active site subunit of the particulate methane monooxygenase. *pmoA*-sequences of *Methylocystis* spp. were detected in most soil samples and sequences of *Methylobacter* spp. in a few soil samples. Seven further sequence types not closely related to sequences from cultivated MB were recovered, indicating that different uncultivated potential MB were also present. Among these were sequences that grouped phylogenetically within sequence clusters of methanotrophic Alphaproteobacteria (type II MB) or methanotrophic Gammaproteobacteria (type I MB). Two further sequence clusters fell between PmoA sequences of known MB and AmoA sequences (encoding a subunit of the ammonia monooxygenase) of ammonia-oxidizing bacteria. Three Gleysols were chosen for labeling experiments with ¹³C-labeled methane. Labeled phospholipid fatty acids (PLFAs) 16:0 and 18:1w7c were obtained after 6 weeks of incubation under mixing ratios of about 30 ppmv of methane. This indicated that the most active MB under low substrate concentrations probably belonged to the type II MB (Alphaproteobacteria). Incubation under 500 ppmv of methane for one week resulted in an additional labeling of 16:1 PLFAs, which indicated that type I MB were also active under these conditions. Thus, the members of the MB community that were active in these soils depended on the concentration of methane supplied to the soil. The MB responsible for atmospheric methane uptake most likely belonged to the type II group, while the type I MB only become active when methane is produced in the soil.

Introduction

Upland soils are defined as non-flooded, well-aerated soils that function as net sinks for atmospheric methane (CH₄). The present mixing ratio of this trace gas in the atmosphere is 1.75 ppmv (Dlugokencky 2003). The contribution of upland soils to the consumption of atmospheric methane amounts to an estimated 6 % of the total atmospheric sink, or 30 Tg of CH₄ year⁻¹ (Houghton *et al.* 2001). However, upland soils are not always net sinks for atmospheric methane. A periodic net methane emission has been reported for several upland soils (e. g. Adamsen and King 1993, Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Keller *et al.* 1993, Macdonald *et al.* 1996, Megraw and Knowles 1987, Silver *et al.* 1999, Wang and Bettany 1995, Wang and Bettany 1997, Wickland *et al.* 1999, Yavitt *et al.* 1990). In some of these soils, methane production was localized in the humus layer (e. g. Adamsen and King 1993, Amaral and Knowles 1997, Saari *et al.* 1997, Sexstone and Mains 1990, Yavitt 1995). In other upland soils, temporary methane production was localized in or above water-impermeable subsurface soil horizons, when the soils became anoxic due to water-saturation (e. g. Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Klemedtsson and Klemedtsson 1997). The methanotropic bacteria (MB), responsible for atmospheric methane uptake in upland soils, are generally assumed to depend on methane supply from the atmosphere for growth, but they may also grow on methane produced in anoxic microsites within well-aerated upland soils (Andersen *et al.* 1998, Conrad 1995). In periodically flooded upland soils, MB can profit from methane that is produced during flooding. The high water content of these soils leads to a limited gas diffusion from the atmosphere into the soil (Adamsen and King 1993, Born *et al.* 1990, Dörr *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1995, Koschorreck and Conrad 1993, Striegl 1993) and thereby to the formation of anoxic sites within the soil, which favour the activity of methanogenic *Archaea*.

Preliminary results indicate that the kinetic properties of methane uptake in periodically flooded upland soils may be different than in upland soils that are seldom water-saturated. The methane uptake of different upland soils has been characterized by $K_{m(\text{app})}$ values of 10 – 280 nM (e. g. Bender and Conrad 1992, Bender and Conrad 1993, Benstead and King 1997, Czepiel *et al.* 1995, Dunfield and Knowles 1995, Gulledge and Schimel 1998, Knief *et al.* 2003b, Whalen and Reeburgh 1996). Some $K_{m(\text{app})}$ values near the upper limit of this range originate from periodically flooded upland soils (Dunfield and Knowles 1995, Knief *et al.* 2003b). Even higher values up to 1.2 μM were measured for a wet meadow soil (Horz *et al.* 2002). This value is comparable to $K_{m(\text{app})}$ values reported for ecosystems with high methane

supply, and to values published for pure cultures of methanotrophs ($> 1 \mu\text{M}$) (e. g. Joergensen and Degn 1983, Megraw and Knowles 1987, Whalen and Reeburgh 1996, Whalen *et al.* 1990, Yavitt *et al.* 1990). However, $K_{m(\text{app})}$ values of some other upland soils that were also hydromorphic in character displayed $K_{m(\text{app})}$ values comparable to those of well-aerated and rarely flooded upland soils (Knief *et al.* 2003b).

Methanotrophic bacteria are widespread in upland soils, and at the oxic/anoxic interfaces of methanogenic environments, where they consume 1 – 90 % of the methane produced (Conrad 1997, Frenzel 2000, Segers 1998). The community composition of MB has been characterized in several different soils by cultivation-independent retrieval of a *pmoA* gene fragment. The *pmoA* gene codes for a subunit of the particulate methane monooxygenase (pMMO), an enzyme which is unique to MB. Such characterizations have indicated that strains of most recognized genera of MB are detectable in upland soils (e. g. Bourne *et al.* 2001, Knief *et al.* 2003b, Reay *et al.* 2001) along with uncultivated putative MB (e. g. Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003b, Reay *et al.* 2001). While uncultivated MB, represented especially frequently by *pmoA* sequences that group in two main clusters (upland soil cluster α [USC α] and upland soil cluster γ [USC γ]), are assumed to contribute to atmospheric methane oxidation, the contribution of cultivated MB to this process remains unclear.

A detailed analysis of the methanotrophic community composition in periodically flooded upland soils has been performed only once, for a wet meadow soil in which the sub-surface soil layer was water-saturated after precipitation events. *Methylocystis*, *Methylomicrobium*, and *Methylocapsa* were detected in this soil by cultivation-independent methods (Horz *et al.* 2002). Based on MPN counts it was assumed that *Methylocystis* was the most abundant member of the methane-oxidizing community. Calculations based on kinetic data suggested that this strain alone could account for the observed methane oxidation activity in the soil. These results indicate that the methane oxidation activity and the composition of the methanotrophic community of periodically flooded soils in general may be different than the communities in upland soils that are rarely water-saturated. Therefore, the methane oxidation activity, the community composition, and the activity of MB was studied in detail in different upland soils with hydromorphic characteristics.

Materials and Methods

Sampling sites and soil characteristics. Sampling sites were located in Germany near Kitzingen, Gießen, Lich and Oppenrod (Table 1). Soil samples were taken from 5 to 20 cm soil depth in July and August, 2003. The soil types were determined by reference to soil maps (1 : 25,000). Two soil samples were taken from a long-term Free-Air Carbon Dioxide Enrichment experiment (FACE) (Jäger *et al.* 2003) in Gießen. Sample G 56el was exposed to elevated CO₂ concentrations (20 % above ambient) and sample G 56am was exposed to ambient CO₂ concentrations. Further characterization of the soil samples included determination of the gravimetric water content (GWC) and the soil pH (15 g of soil in 30 ml of twice-distilled water).

In situ methane mixing ratios. Gas samples were taken from 10-, 15- and 20-cm soil depth via a stainless steel tube (1/8 in. [diameter], 0.56 cm wall thickness, 25 cm length) in 10-ml plastic syringes that were sealed with three-way stopcocks. Methane mixing ratios of these gas samples were determined in the laboratory with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) as described previously (Knief *et al.* 2003b).

Methane oxidation activity. Ten-gram amounts of sieved (< 3-mm mesh) soil were incubated at 25 °C in 120-ml serum vials closed with butyl rubber septa. Triplicates of each sample were incubated under atmospheric methane or under elevated methane mixing ratios (500 to 600 ppmv). The decrease of methane in the headspace was measured by gas chromatography. Incubation times varied between 2 to 5 days depending on the activity of the sample and included 5 to 6 measurement points. Incubation under elevated methane mixing ratios resulted in a linear decrease of methane, from which the maximum apparent methane oxidation rates ($V_{\max(\text{app})}$) were estimated. The pseudo first-order uptake rate constants (specific affinity, a_s^0) were calculated from the exponential decrease of methane versus time in samples incubated under atmospheric methane mixing ratios. Curves were fit using the least-squares iterative fitting procedure of Origin 6.1 (Microcal Software, Inc. Northampton, Maine). The apparent half saturation constant $K_{m(\text{app})}$ was calculated as $K_{m(\text{app})} = V_{\max(\text{app})}/a_s^0$. Multiplication of the $K_{m(\text{app})}$ by the Oswald coefficient for methane (0.03395 at 25°C; Wilhem *et al.* 1977) gave the methane concentration in soil water.

Since the methane uptake of soil samples K M1b, L 61, and L 58 still followed a pseudo first-order uptake kinetic under elevated methane mixing ratios, uptake rates were determined

at various methane mixing ratios of 1.7 to 2000 ppmv in 5-ml soil slurries as described previously (Knief *et al.* 2003b). Methane oxidation rates were estimated by linear regression and plotted against the methane concentration at the time midpoint. $V_{\max(\text{app})}$ and $K_{m(\text{app})}$ were estimated by least-squares fitting to a Michaelis-Menten hyperbolic model using Origin 6.1 for these soil samples.

DNA extraction. DNA was extracted from 0.5 g of soil (stored at -20 °C immediately after sampling) using the Fast DNA SPIN Kit (BIO 101, La Jolla, CA, USA), according to the manufacturer's instructions with modifications. Cell lysis was performed in a cell disruptor (FP 120 FastPrep, Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) at 6.5 m s^{-1} for $2 \times 45 \text{ s}$. After centrifugation ($20,000 \times g$, 10 min) the supernatant was collected and the pellet of soil and beads was resuspended in kit-supplied buffers for a second DNA extraction. Proteins and cell debris were precipitated as described by the manufacturer's instructions and 1 ml of Binding-Matrix was added to the supernatant. For purification, the matrix-bound DNA was washed three times with 1 ml of 5.5 M guanidine-isothiocyanate solution (modified after Yeates and Gillings 1998). After the last centrifugation step ($14,000 \times g$, 1 min) the supernatant was removed, the matrix-bound DNA was suspended in 0.6 ml of guanidine-isothiocyanate solution, and loaded onto the kit-supplied SPINTM filters. The final elution of the DNA from the filter was performed twice with 100 μl of DNase-free water to increase DNA recovery. Further purification of the DNA extracts was achieved using polyvinylpyrrolidone and a QIAquick PCR Purification KitTM (Qiagen, Hilden, Germany) (Knief *et al.* 2003b).

PCR amplification. A partial fragment of *pmoA* was PCR-amplified with primers A189 and A682 (Holmes *et al.* 1995) and primers A189 and mb661 (Costello and Lidstrom 1999). For denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), a GC-clamp was attached to the 5' end of the A189 primer (Henckel *et al.* 1999). A touchdown PCR program (Henckel *et al.* 1999) with annealing temperatures decreasing from 64 to 57 °C was used with 35 cycles. A fragment of the *mmoX* gene encoding the active-site subunit of soluble MMO was amplified with a newly designed forward primer mmoXf945 (5'-TGG GGY GNA ATC TGG AT-3') and the reverse primer mmoXB1401 of Auman *et al.* (2000). A GC-clamp of Iwamoto *et al.* (2000) was attached to the 5' end of primer mmoXf975. The PCR program consisted of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 63 – 56 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, with a final extension step of 72 °C for 7 min.

All PCR mixtures contained each primer at 1.0 μM , 5 μL of Accutaq-LA 10 \times Buffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 3.5 mM of MgCl_2 , 25 μg of BSA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 200 μM of each dNTP (Promega, Mannheim, Germany), 2.5 U of REDAccuTaq LA DNA polymerase (Sigma-Aldrich), 1 μl of template DNA, and sterile water to 50- μl (Q-Biogene, Heidelberg, Germany). PCR reactions were run on either a GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) or a Primus 96 Cycler (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

DGGE. Mixed *pmoA* PCR products were separated by DGGE and visible bands were excised and reamplified exactly as described previously (Knief *et al.* 2003b). PCR products from excised DGGE bands were purified and sequenced.

Phylogenetic sequence analysis. Phylogenetic tree reconstructions based on deduced amino acid sequences of partial *pmoA* and *amoA* sequences were performed with the ARB software package (Strunk *et al.* 1998). Original tree construction included sequences of all DGGE bands, all available *pmoA* sequences in the GenBank database (December 2003), and selected public-domain *amoA* sequences. A selection was then made of 23 representative sequences from this study plus 32 public-domain sequences.

Specific detection of USC α and real-time PCR. Primer A189 and New675r (Kolb *et al.* 2003) were used to specifically test for the presence of *pmoA* sequences of USC α in soil samples K M1b, L 61, and L 58. The USC α *pmoA*-gene fragments were amplified in PCR mixtures containing 4 mM of MgCl_2 . The PCR program of Henckel *et al.* (1999) was used, except that the annealing temperatures decreased from 73.8 to 66.8 $^\circ\text{C}$ and 40 cycles were applied.

Real-time PCR was performed to quantify the number of *pmoA*-genes of MB of USC α and *Methylocystis* spp. in triplicate soil DNA extracts. PCR conditions and primers for the specific amplification of these gene fragments (assays FOREST and TYPEII) were described by Kolb *et al.* (2003). Quantification of the target genes and data analysis was performed on an iCycler IQ thermocycler using the iCycler software (BioRad, Munich, Germany) (Kolb *et al.* 2003).

Labeling experiments with [^{13}C]-methane. Fifteen-gram amounts of sieved soil samples K M1b, L 61 and L 58 were incubated in the presence of labeled $^{13}\text{CH}_4$ (99 %; Cambridge

Isotope Laboratories, Mass.) or unlabeled CH₄ at 25 °C. Incubation was performed in 1,000-ml screw-cap flasks sealed gas tight with silicone septa. To minimize secondary labeling effects of ¹³CO₂ in soil incubations, the ¹²CO₂ mixing ratio in the flasks was increased to 2650 ppmv. Additionally, the flasks were flushed well with air every two weeks.

Duplicates of each soil sample were incubated for 6 weeks at mixing ratios of 5 – 30 ppmv of methane (low) or one week at 430 – 570 ppmv of methane (high). Soil samples incubated under low methane mixing ratios were exposed once to 60 ppmv of ¹³CH₄, but this excess methane was consumed within 5 days. Methane was measured at 1- to 4-day intervals in soil samples incubated under low methane mixing ratios and twice a day in soil samples incubated under high methane mixing ratios by GC-FID. The methane mixing ratio of 30 ppmv was adjusted each time the ratio fell below 5 ppmv of methane or after two weeks of incubation when the flasks were flushed with air.

PLFA analysis. Lipids were extracted from 10 g of soil by a modified Bligh and Dyer method and fractionated on silica columns. PLFAs were esterified by mild alkaline methanolysis (Knief *et al.* 2003a). Separation, identification, and quantification of the fatty acid methyl esters (FAMES) were performed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Carbon isotope ratios of the individual FAMES were determined by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS). Analysis conditions were described in detail before (Knief *et al.* 2003b). FAMES were separated on a nonpolar column (5 % phenyl methyl silicone capillary column). To archive a better resolution of onefold unsaturated C₁₆- and C₁₈-FAMES, analysis was additionally performed after separation of the FAMES on a polar column (BPX-70). The incorporation of ¹³C was calculated as microgram of incorporated ¹³C into each PLFA per gram of total PLFAs as described previously (Knief *et al.* 2003b).

Nucleotide sequence accession numbers. Representative *pmoA* nucleotide sequences obtained during this study have been deposited in the GenBank, EMBL, and DDBJ nucleotide sequence databases under the accession numbers XXXXXXXXX – XXXXXXXXX.

Results

Characterization of the sampling sites. Eleven gleyic soil samples were taken from six different regions in Germany as outlined in Table 1. The only exception was soil sample K M1c, which was a Cambisol located nearby sampling sites K M1a and K M1b. By classification these soils differed in water-table (Gleysols versus Gleyic Luvisols), organic matter content (umbric and mollic versus distric) and base saturation (mollic versus distric and umbric).

Table 1: Descriptions of sampling sites.

Sampling site (position) and soil sample	Soil type, German classification (corresponding FAO ^a soil group)	Land use and plant cover
Kitzingen 1 (49°46.15'N, 10°14.62'E)		
K M1a	Basenreicher Anmoor-Gley (Mollic Gleysol)	Deciduous forest (<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus incarna</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Carex</i> sp.)
K M1b	Basenreicher Anmoor-Gley (Mollic Gleysol)	Deciduous forest (<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus incarna</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Carex</i> sp.)
K M1c	Podsolige Braunerde (Cambisol)	Deciduous forest (<i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus incarna</i>)
Kitzingen 2 (49°46.079'N, 10°12.484'E)		
K G9	Basenarmer Pseudogley-Gley (Distic Gleysol)	Mixed forest (<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Betula</i> sp., <i>Tilia cordata</i> , <i>Carpinus betulus</i> , <i>Rubus fruticosus</i>)
Kitzingen 3 (49°45.704'N, 10°12.605'E)		
K G3	Basenreiche Gley-Braunerde (Gleyic Cambisol)	Deciduous forest (<i>Tilia cordata</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Crataegus</i> sp.)
Gießen (50°32'N, 8°41.3'E)		
G 56am	Gley (Distic Gleysol)	Meadow (<i>Arrhenatherum elatius</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Alopecurus pratensis</i> , <i>Galium mollugo</i> , <i>Sanguisorba officinalis</i> , <i>Plantago lanceolata</i>)
G 56el	Gley (Distic Gleysol)	Meadow (<i>Arrhenatherum elatius</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Alopecurus pratensis</i> , <i>Galium mollugo</i> , <i>Sanguisorba officinalis</i> , <i>Plantago lanceolata</i>)
Lich (50°31.07'N, 8°27.48'E)		
L 61	Naßgley (Distic Gleysol)	Deciduous forest (<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Carex</i> sp.)
L 58	Anmoor-Hanggley (Umbric Gleysol)	Deciduous forest (<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus incana</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Crataegus</i> sp.)
Oppenrod (50°34.97'N, 8°47.14'E)		
O 45F	Pseudogley (Gleyic Luvisol)	Deciduous forest (<i>Alnus glutinosa</i>)
O 45W	Pseudogley (Gleyic Luvisol)	Meadow ^b

^a FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

^b plant community was not characterized.

The soil profiles of sampling sites K M1a, K M1b, G 56am, G 56el, L 61, and L 58 was characterized by a reducing horizon 20– 100 cm below the soil surface and a high water table. *Alnus* spp. and *Carex* sp. were the dominating plant species at the forest sites, indicating the hydromorphic character of the sampling sites. The soil samples were taken in July and August 2003 after an unusually long dry period. The mean monthly precipitation in June, July, and August was 24 mm in each month, compared to a mean of 64 mm during the last 30 years. The mean temperature was also very high, at 22.0 °C, compared to a 30-year mean of 17.8 °C. Therefore, even the Gleysols had a well-aerated, oxic upper soil layer of at least 25 cm depth. The gravimetric water content of the soil samples was in a range of 3 – 68 % (Table 2). It was generally higher in the Gleysols than in Luvisols and the Cambisol. Methane is frequently produced in deep soil layers at the Gießen sampling site, and net methane emissions have been occasionally observed after heavy rainfall events (Kammann *et al.* 2001).

Table 2: pH, gravimetric water content, and kinetic values of methane oxidation of soil samples.

Soil sample	pH	Gravimetric water content [%]	Methane mixing ratio in soil ^a [ppmv]	V_{atm} [pmol CH ₄ g ⁻¹ h ⁻¹]	$V_{\text{max(app)}}$ [nmol CH ₄ g ⁻¹ h ⁻¹]	$K_{m(\text{app})}$ [nM]
K M1a	6.8	51	1.7 ± 0.3	29.0	3.79	328
K M1b	7.1	40	1.5 ± 0.1	42.3	14.8	539
K M1c	4.5	13	1.3 ± 0.2	24.1	0.26	26
K G9	4.3	3	1.16 ± 0.07	10.9	0.04	9.7
K G3	7.8	9	1.5 ± 0.1	13.8	0.17	31
G 56am	6.0	20	n. d.	17.1	0.68	100
G 56el	6.0	20	n. d.	23.1	1.00	108
L 61	5.5	68	1.3 ± 0.2	27.3	20.9	851
L 58	6.1	43	1.61 ± 0.07	39.3	33.3	1,101
O 45F	3.7	23	1.34 ± 0.05	5.3	0.04	19
O 45W	5.0	17	1.58 ± 0.08	34.7	2.31	167

^a values are the mean ± 1 standard deviation of three measurements in 10, 15, and 20 cm soil depth.

Atmospheric methane oxidation activity. *In situ* measurements of soil-matrix air demonstrated that methane was present at sub-atmospheric mixing ratios in the soil profile of all sampling sites, and hence that atmospheric methane uptake was proceeding at all sampling sites (Table 2). Consumption of atmospheric methane (V_{atm}) in sieved soil samples ranged from 5.3 – 42.3 pmol CH₄ of g dry weight⁻¹ h⁻¹. Since the methane uptake of soil samples K M1b, L 61, and L 58 still followed a pseudo first-order uptake kinetic under methane mixing ratios of 500 – 600 ppmv, methane oxidation kinetics were analyzed more intensely at

various methane mixing ratios up to 2000 ppmv in these soil samples (Fig. 1). $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ were calculated for these soil samples based on a Michaelis-Menten kinetic model. $V_{\text{max}(\text{app})}$ was between 14.8 – 33.3 nmol of CH₄ g of dry weight⁻¹ h⁻¹ in these three soils, while values of 0.04 – 3.79 nmol of CH₄ g of dry weight⁻¹ h⁻¹ were determined for the other soils. The $K_{m(\text{app})}$ was in a range of 9.7 – 1,166 nM of dissolved CH₄ in the soil water or 7.0 – 793 ppmv of methane for the different soil samples. $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ values were significantly increased in soils that had higher gravimetric water contents ($P < 0.02$).

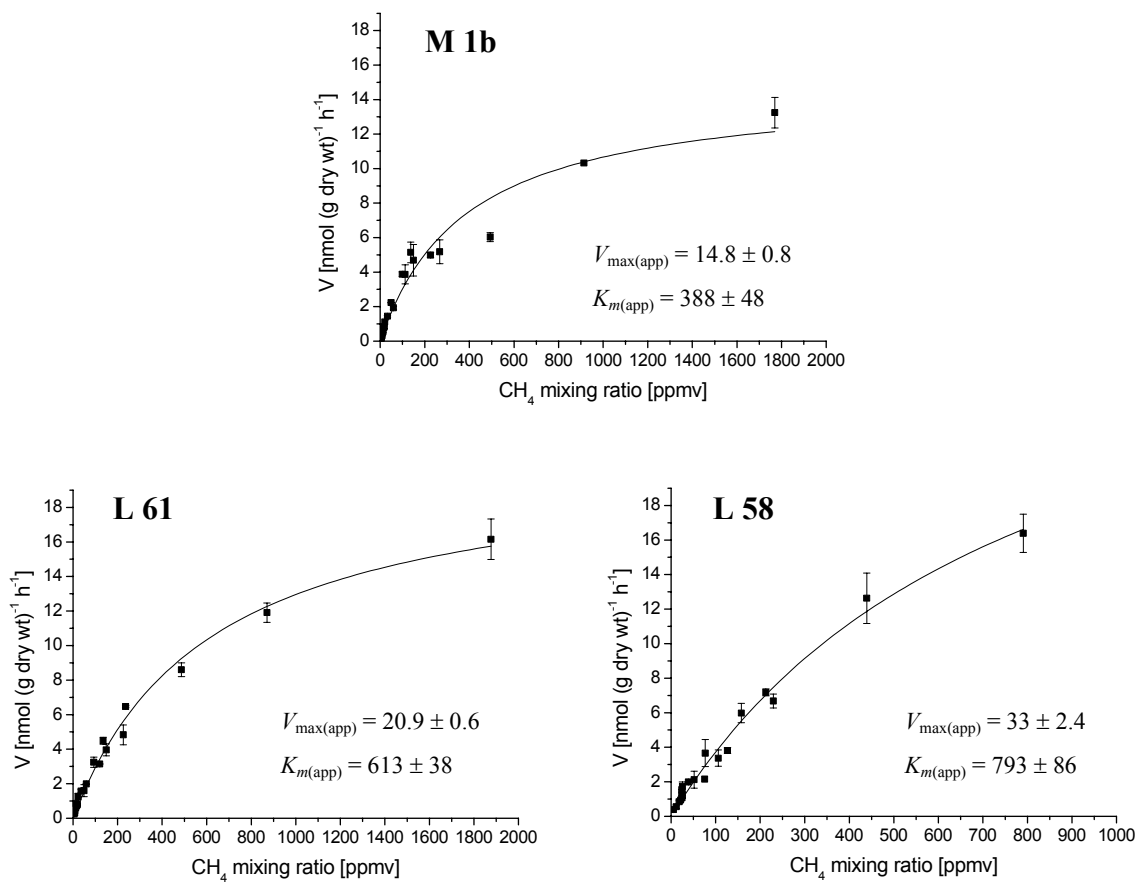


Figure 1: Methane uptake kinetics of the soil samples M1b, L61, and L58. Data were fitted to the Michaelis-Menten hyperbolic curve to estimate $V_{\text{max}(\text{app})}$ (nmol of CH₄ per gram of dry weight per hour ± 1 standard error of fitting) and $K_{m(\text{app})}$ (ppmv of CH₄ ± 1 standard error of fitting). Each data point represents the mean of duplicate samples ± 1 standard error.

Characterization of the community of methane-oxidizing bacteria. The community of MB was characterized based on comparative sequence analysis of *pmoA* gene fragments amplified from soil DNA extracts. The different *pmoA* PCR products were identified by their derived amino acid sequences, which were compared to public-domain PmoA and AmoA sequences. Two different backward primers (A682 and mb661) were combined in PCR assays with

primer A189 for the amplification of *pmoA* gene fragments from soil DNA extracts. Primers A189 and A682 were originally designed to amplify both *pmoA* and *amoA* genes (Holmes *et al.* 1995). In the present study *pmoA* gene fragments of type II MB were amplified with this primer set, but no gene fragments of type I MB. Further sequences of amplified genes were related to AmoA sequences or fell within two groups named “Cluster 1“ or “Cluster 2“ (Table 3). Sequences of these two clusters represent either AmoA or PmoA (Fig. 2). Primer mb661 is more specific for MB than is primer A682 (Costello and Lidstrom 1999). In addition to the *pmoA* gene fragments related to type II MB, *pmoA* gene fragments of several type I MB were amplified in PCR assays using primer combination A189/mb661 (Table 3).

Table 3: Methanotrophic community of different soil samples as revealed by *pmoA*-based cultivation-independent analysis. Primer A189 was used for PCR in combination with backward primer A682 (A) or mb661 (mb). Clusters are defined in Figure 2.

Sample	PmoA						PmoA/AmoA		AmoA	
	<i>Methylobacter</i>	Cluster 3	USC γ	<i>Methylocystis</i>	USC α	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 1	Cluster 2	Ammonia oxidizer
K M1a				A/mb				A	A	A
K M1b				A/mb				A	A	A
K M1c	mb	mb			A/mb	A	mb			A
K G9		mb			A					
K G3			mb	mb					A	
G 56am		mb		A/mb	A/mb					
G 56el	mb	mb		A	A		mb		A	
L 61				A/mb					A	A
L 58		mb		A/mb				A		A
O 45F		mb		A						A
O 45W				A/mb					A	



Figure 2: Phylogenetic relationship of representative PmoA sequences, retrieved from different soil samples, to public-domain PmoA and AmoA sequences. Tree construction with the treepuzzle algorithm and the Jones-Taylor-Thornton evolutionary model (Jones *et al.* 1992) was based on 136 derived amino acid residues. Black circles indicate branches that were recovered in 90 % of 25,000 reconstructed trees, white circles indicate branches with 80 % recovery. The cluster of AmoA sequences was set as outgroup. The bar represents 0.10 change per amino acid position.

The only sequences closely related ($\geq 98\%$) to cultivated genera of MB in the soil samples were those related to the PmoA sequences of *Methylobacter* and *Methylocystis*. *Methylobacter*-like sequences were detected in soil samples K M1c and G 56el. The identity of these PmoA sequences was 98 % to the sequence of *Methylobacter* sp. BB5.1. PmoA sequences related to *Methylocystis* were detected in all soil samples excepting two of the driest soil samples (K M1c and K G9).

PmoA-sequences of Cluster 3 represented an as-yet uncultivated group of type I MB. The two representative PmoA sequences of this cluster that are shown in the phylogenetic tree exhibited 90 % identity to PmoA sequences of the cultivated strains *Methylococcus capsulatus* and *Methylocaldum gracile*, and 93 – 95 % identity to PmoA sequences of different uncultivated bacteria (Fig. 2). Sequences of this cluster were detected at various sampling sites. USC α and USC γ sequences were not detected in soil samples that were characterized by high gravimetric water content (> 20 %), high $K_{m(\text{app})}$, and high $V_{\text{max}(\text{app})}$ values. Besides the known USC α sequences, USC α -related sequences (Cluster 5) were additionally detected in soil samples K M1c and G 56el. The identity of this novel sequence type was 83 – 87 % to the PmoA sequences of the uncultivated bacteria Rold 1/Maine 10 and Rold 3/Pantanal 13. In soil sample K M1c a sequence (K M1c-c) was detected that had an identity of 92 % to the sequence pmoA-MO3, representing an uncultivated bacterium in rice paddy soil (Henckel *et al.* 2000b). These two sequences, designated "Cluster 4", were distantly related to the PmoA sequence of *Methylocapsa acidiphila* B2 (76 and 80 % identity).

Two groups of sequences formed branches that were only distantly related to PmoA-sequences of MB and AmoA-sequences of ammonia-oxidizing bacteria (Fig. 2). Sequences of Cluster 1 were detected in some Gleysols. This cluster includes sequences of the methanotrophic strains K1-8 and K3-16, which are distantly related to methanotrophic Alphaproteobacteria on the 16S rRNA level (Pacheco-Oliver *et al.* 2002). Cluster 2 was formed from sequences that are related to the sequence of the uncultivated bacterium 5FB-f (Knief *et al.* 2003b). Sequences of Cluster 2 were detected in various soils. AmoA sequences from ammonia-oxidizing bacteria were also detectable in all soils with a gravimetric water content > 20 %. An *mmoX* gene fragment, coding for a subunit of the soluble methane mono-oxygenase, was not detected in the soil samples.

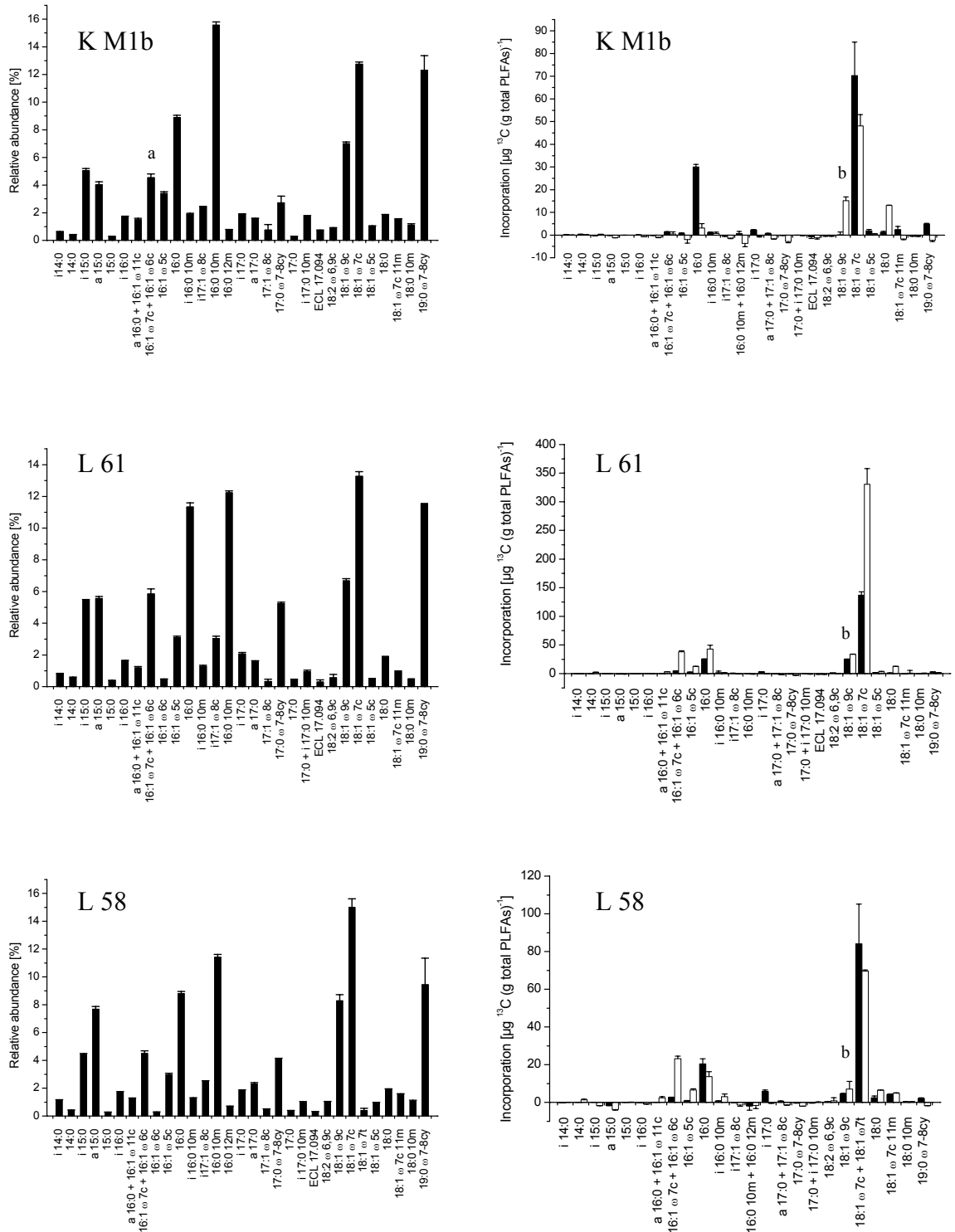


Figure 3: PLFA profiles (left panels) of soil samples K M1b, L 61, and L58. Data are means of 6 samples \pm 1 standard error of the mean. ^{13}C -incorporation (right panels) of the PLFAs of soil samples incubated under 30 – 5 ppmv of methane for six weeks (filled bars) or under 570 – 430 ppmv of methane for one week (open bars). Data for the labeling patterns are means of duplicate samples \pm 1 standard error of the mean.

^a only traces ($< 0.3\%$) of PLFA 16:1 ω 6c were detected

^b Labeling of the PLFA 18:1 ω 9c may (in part) be influenced by traces of labeled 18:1 ω 8c. The latter PLFA was not detected by analysis of the FAMES with the GC-MS system equipped with a nonpolar

column, but it was detected in the PLFA extracts of some soil samples by analysis with a GC-MS system equipped with a polar column (preliminary results Paul L. E. Bodelier).

Labeling experiments with ^{13}C -methane. The community of physiologically active MB was characterized in soil samples L 61, L 58, and K M1b, since these soils were characterized by the highest gravimetric water content, $K_{m(\text{app})}$, and $V_{\text{max}(\text{app})}$ (Table 2). PmoA-sequences of *Methylocystis* spp., Cluster 1, Cluster 2, and ammonia-oxidizing bacteria represented the putative methane-oxidizing bacteria in these soil samples (Table 3). The physiologically active MB were characterized by their labeled PLFAs, which were obtained after incubation of soil samples with $^{13}\text{CH}_4$ at low (six weeks incubation with $^{13}\text{CH}_4$ at mixing ratios of 5 – 30 ppmv) or high (one week incubation at 430 – 570 ppmv) methane mixing ratios. While the oxidation rates did not increase in the soil samples incubated under low methane mixing ratios, rates increased slightly in the samples incubated under high methane mixing ratios. The pattern of labeled PLFAs was very similar in all samples after 6 weeks of incubation under low methane mixing ratios. The PLFA 18:1 ω 7c, a dominant PLFA in all soil samples, was most intensively labeled (Fig. 3). PLFA 16:0, also one of the dominant PLFAs in soil, was labeled to a minor extent, especially in soil sample L61. One week of incubation under high methane mixing ratios led to an additional labeling of PLFA 16:1 ω 7c and/or 16:1 ω 6c in soil samples L 61 and L 58.

Specific detection of USC α sequences in soil samples K M1b, L 61, and L 58. The presence of organisms harbouring *pmoA* genes of USC α is a possible explanation for the obtained labeled PLFAs 18:1 ω 7c and 16:0 in all soil samples. Although not detected by DGGE analysis, the presence of these organisms could not be excluded. Therefore, a PCR assay specific for the detection of USC α (Kolb *et al.* 2003) was applied to more sensitively check for the presence of this PmoA sequence type. Sequence analysis of the PCR products obtained confirmed that USC α sequences were present in soil samples K M1b, L 61, and L 58.

Discussion

Gleysols are hydromorphic soils that are influenced by ground water close to the soil surface. Sampling sites that meet this definition are K M1a, K M1b, G 56am, G 56el, L 61, and L 58. Another soil type with hydromorphic characteristics is the Gleyic Luvisol. In this soil type, precipitation is accumulated due to a water-impermeable soil horizon. The accumulation of water is subjected to periodic variations, resulting in a temporary flooding of these soils. Sampling sites K G9, K G3, O 45F, and O 45W represent this soil type. The soil samples for this study were taken after a long dry period. Thus, all soils had a well aerated, oxic upper soil layer of at least 25 cm.

All soils functioned as net sinks for atmospheric methane, as indicated by sub-atmospheric *in situ* methane mixing ratios down to 20 cm soil depth and by potential atmospheric methane uptake rates of 5.3 – 42 pmol of CH₄ g of dry weight⁻¹ h⁻¹. Similar uptake rates were measured in several upland soils (Knief *et al.* 2003b). However, much higher uptake rates up to 752 pmol of CH₄ g of dry weight⁻¹ h⁻¹ have been published for upland soils (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003, Whalen and Reeburgh 1996). Despite similar uptake rates for atmospheric methane among the different soil samples, $V_{\max(\text{app})}$ and $K_{m(\text{app})}$ showed large variation. A relatively high $K_{m(\text{app})}$ was always associated with a relatively high $V_{\max(\text{app})}$ for a certain soil sample. A similar pattern of variation of both parameters was observed for the wet meadow near Giessen over time (= G 56am) (Horz *et al.* 2002).

The $K_{m(\text{app})}$ of methane oxidation in the Gleysols was in general > 100 nM, while values < 100 nM were measured in soil samples that were subject to periodic flooding. $K_{m(\text{app})}$ values above 100 nM have rarely been observed in upland soil samples. Values up to 282 nM were published for a few upland soils that were subject to periodic flooding (Knief *et al.* 2003b). For the wet meadow Gleysol near Giessen, values of 137 – 300 nM have been published (Horz *et al.* 2002). The $K_{m(\text{app})}$ of a periodically flooded humisol with high gravimetric water content (136 %) was in the range of 100 – 280 nM (Dunfield and Knowles 1995). However, in the present study, only the Gleysols showed $K_{m(\text{app})}$ values > 100 nM, whereas the $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\max(\text{app})}$ values of the soils that were only periodically flooded (K G9, K G3, O 45F, and O 45W) and of the upland soil sample K M1c were < 100 nM, in the range of values published for most upland soils (Bender and Conrad 1992, Bender and Conrad 1993, Benstead and King 1997, Czepiel *et al.* 1995, Gulledge and Schimel 1998, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003b). Probably, oxic conditions in the periodically flooded upland soils over

several months resulted in methane oxidation kinetics that were comparable to non-flooded upland soils. A more detailed study of methane fluxes within and after flooding events is necessary in these periodically flooded upland soils to more clearly demonstrate changes of the kinetic parameters, and whether changes are a response to increased methane availability.

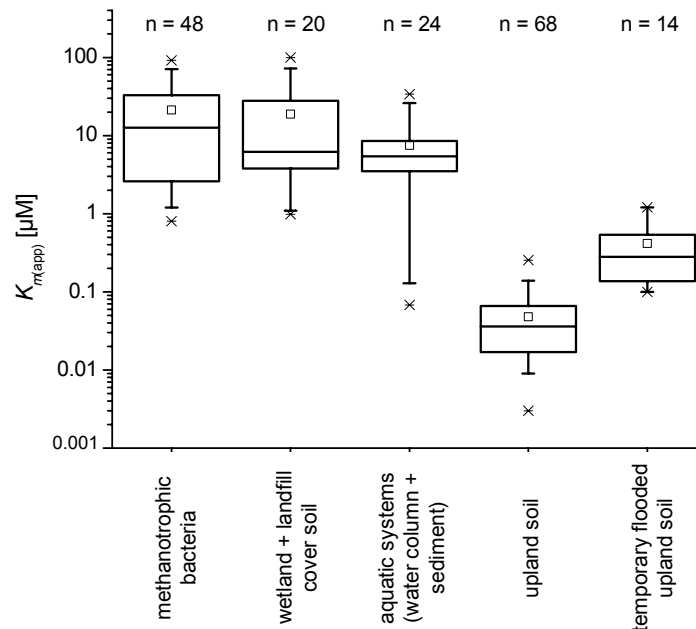


Figure 4: Box plot of $K_{m(app)}$ values measured in samples of different ecosystems and cultures of methanotrophic bacteria. The column of “wetland + landfill cover soil“ includes data of submerged soils e. g. rice paddies and peat. The upper and lower box lines represent the 25th and 75th percentile values (= 50 % of all values). The line in the box represents the 50th percentile (median) and the square symbol the mean. Error bars denote the 5th and 95th percentiles and asterisks the 0th and 100th percentiles. Data for the plot were taken from the literature and this study. Stagnic Luvisols from this study were placed into the upland soils, since the hydromorphic character of the sampling sites was not evident due to the preceding dry period. $K_{m(app)}$ values of methanotrophic bacteria were taken from studies in which cells were cultivated under high methane concentrations.

References for this plot: Bender and Conrad 1992, Bender and Conrad 1993, Benstead *et al.* 1998, Bogner *et al.* 1997, Bosse *et al.* 1993, Bradford *et al.* 2001, Buchholz *et al.* 1995, Bull *et al.* 2000, Calhoun and King 1998, Carlsen *et al.* 1991, Czepiel *et al.* 1995, De Visscher *et al.* 1999, De Visscher *et al.* 2001, Dedysh *et al.* 2001, Dunfield and Knowles 1995, Dunfield *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1999, Dunfield and Conrad 2000, Gebert *et al.* 2003, Gullledge and Schimel 1998, Holmes *et al.* 1999, Horz *et al.* 2002, Jäckel *et al.* 2001, Jensen *et al.* 2000, Joergensen and Degn 1983, Kalyuzhnaya *et al.* 1999, Kightley *et al.* 1995, King 1992, Knief *et al.* 2003b, Lontoh and Semrau 1998, Megraw and Knowles 1987, Oldenhuis *et al.* 1991, Roslev *et al.* 1997, Ward and Kilpatrick 1990, Whalen *et al.* 1990, Whalen and Reeburgh 1996.

Compared to $K_{m(app)}$ values published for different ecosystems and pure cultures of methanotrophs, the $K_{m(app)}$ of Gleysols and periodically flooded upland soils with high water contents take an intermediate position (Fig. 4). $K_{m(app)}$ values of a similar order of magnitude (68 – 462 nM) have been measured only in the water column of Saanich Inlet, where methane occurred at trace but super-ambient levels (≤ 30 nM) (Ward and Kilpatrick 1990), and for

cultures of *Methylocystis* sp. LR1 (56 – 336 nM), when these were incubated under low methane concentrations (< 380 nM) (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield and Conrad 2000).

Cultivation-independent molecular retrieval of PmoA sequences suggested that seven taxa of uncultivated putative MB and only two genera of cultivated MB were present in the soil samples. PmoA sequences of *Methylocystis* spp. were detected in most soil samples analyzed, but sequences of *Methylobacter* spp. only occasionally. The wide distribution of *Methylocystis* spp. is in accordance with the observation that strains of this genus grow at a wide range of methane mixing ratios down to less than 100 ppmv, while MB of several other genera do not (Knief and Dunfield 2004). Sequences of USC α and USC γ , which represent two clusters of uncultivated MB, were detected by DGGE analysis in nearly all soil samples with low gravimetric water content, but not in soil samples with high gravimetric water content (Gleysols). These two sequence clusters seem to occur only in upland soils, in which they most likely contribute to the consumption of atmospheric methane (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003b). A specific test for USC α revealed that these sequences were also present in Gleysols. However, they probably contributed to a minor part of the methanotrophic community in these soils, since they were not detected by DGGE, a method that is used to identify the dominating MB in soil samples (Heuer and Smalla 1997). (Quantification of the *pmoA* gene fragments of USC α and *Methylocystis* spp. by real-time PCR will be applied to further support the hypothesis that *Methylocystis* spp. dominate over those of USC α .)

Less information is available for the other clusters of PmoA sequences detected, which represent putative uncultivated MB. Cluster 4, related to *Methylocapsa*, includes sequence K M1c-c and pmoA-MO3. The latter appeared in rice field soil after incubation under 1 % of methane (Henckel *et al.* 2000b). Cluster 5 sequences were most closely related to USC α and the occurrence of these sequence types was restricted to soil samples K M1c and G 56el. The detection of sequences of Cluster 3 in most soil samples indicated a wide distribution of these uncultivated type I MB. Since Cluster 1 sequences are closely related to methanotrophic isolates obtained by Pacheco-Oliver (2002), they may represent MB. The identity of Cluster 2 sequences, which were detected in dry and wet soil samples, is unknown. These sequences may represent either MB or ammonia-oxidizing bacteria.

After 6 weeks of incubation under methane mixing ratios below 50 ppmv, labeled PLFAs 16:0 and 18:1 ω 7c were detected. 18:1 ω 7c was one of the dominant PLFAs in the soils and the PLFA with the highest ¹³C-incorporation. This PLFA is present in all type II MB (Bowman *et al.* 1993, Dedysh *et al.* 2004, Nichols *et al.* 1985) and probably also in the uncultivated MB represented by USC α (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003b). It also

contributes up to 26.5 % to the PLFA profile of *Methylomicrobium* spp. (Bowman *et al.* 1993). It is rather unlikely that *Methylomicrobium* spp. were responsible for the labeled PLFA, since additional characteristic PLFAs of this genus were not labeled and *pmoA* sequences of this genus were not detected. Instead, this PLFA indicates methane consumption by type II MB, probably *Methylocystis* spp. and/or organisms harbouring USC α sequences, since *pmoA* gene fragments of these MB were detected. (At the moment we cannot conclude whether *Methylocystis* spp. were active in the analyzed soil samples, because the PLFA 18:1 ω 8c was so-far not detected by GC-IRMS analysis. While the detection of labeled PLFA 18:1 ω 8c would indicate for active type II methanotrophs [*Methylocystis* spp. and possibly USC α], the detection of unlabeled PLFA would allow the further conclusion that *Methylocystis* spp. were not active in these soils, but MB of USC α .) It can also not be ruled out that label was incorporated by organisms represented by Cluster 1 or even Cluster 2 PmoA sequences. The PLFA profile of the cultivated MB of Cluster 1, which are distantly related to type II MB (Pacheco-Oliver *et al.* 2002), is probably similar to those of type II MB. The weak labeling of i17:0 in soil sample L 58 may be an indication for activity of USC α as previously suggested (Holmes *et al.* 1999, Roslev and Iversen 1999), but the labeling of this PLFA could also have been a secondary labeling effect.

After 1 week of incubation under higher methane mixing ratios, i17:0 was not labeled, although the total amount of incorporated ^{13}C into PLFAs of sample L 58 was almost equal to the amount of label incorporated under lower mixing ratios. The labeling intensities of 16:0 and 18:1 ω 7c were also less. Instead, labeled 16:1 PLFAs appeared in soil sample L 58 under high methane mixing ratios. Due to the resolution limitation of the method, it cannot be determined what combination of 16:1 ω 7c and 16:1 ω 6c was labeled, because a separate quantification of these PLFAs was not possible. In any case, both PLFAs are present in type I MB (Bowman *et al.* 1997, Bowman *et al.* 1993, Nichols *et al.* 1985). Labeled PLFAs typical for type I MB were also observed in soil sample L 61 under methane mixing ratios of about 500 ppmv, but not in sample K M1b. Detected *pmoA* gene fragments indicated that uncultivated type I MB, related to *Methylococcus* and *Methylocaldum*, were present in soil sample L 58. In soil sample L 61, *pmoA* sequences of type I MB were below the detection limit, although the labeling experiment suggests they were present and inducible under elevated methane mixing ratios. The labeling pattern of soil sample K M1b showed the least response of all soils to increasing methane mixing ratios. Labeling of 16:0 and 18:1 ω 7c was less than with low methane mixing ratios, while 18:0 and probably 18:1 ω 9c were labeled

(Fig. 3). Both PLFAs are present in *Methylococcus* spp., but further characteristic PLFAs of this genus were not labeled in the soil sample (Bowman *et al.* 1993).

It is obvious that the periodically flooded or hydromorphic upland soils studied consumed atmospheric methane under oxic conditions. Hydromorphic soils like Gleysols are known to be sources for atmospheric methane (Fiedler and Sommer 2000). However, *in situ* soil methane mixing ratios at the sampling sites did not indicate that net methane production occurred in the oxic upper 20 cm of the soils analyzed in our study.

Soil samples from Gleysols and Gleyic Luvisols showed clear differences in their methane oxidation kinetics. While the uptake rate of atmospheric methane was not influenced in these soils, $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ were higher in the Gleysols. $K_{m(\text{app})}$ values of these soils were higher than values for upland soils, but lower than values for ecosystems with high methane production such as wetlands, landfill cover soils or sediments. Thus, an intermediate methane supply compared to these systems would be a reasonable explanation for the $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ values. Gleysols offer good conditions for methanogenesis. This soil type is characterized by a reducing soil horizon due to shallow ground water and often by a high organic matter content, as in the Gleysols from sampling sites K M1a, K M1b, and L 58. Methanogenesis was not detectable in the upper, oxic layer of the analyzed Gleysols, but this process might have occurred in the deeper anoxic layers of these sampling sites, as has been shown in other cases (Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001). Gleyic Luvisols are only periodically water-saturated and methanogenesis will therefore be a periodic process. This may explain why $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ values were, after several months of unusually dry conditions, typical for aerobic upland soils.

Besides the known MB, several as-yet uncultivated MB are present in hydromorphic soils, and may contribute to methane oxidation. The taxa of MB that were active depended on the methane mixing ratio, as demonstrated by the different PLFA labeling patterns obtained under incubation with 30 ppmv or 500 ppmv $^{13}\text{CH}_4$ in soil samples L 61 and L 58. While cultivated and/or uncultivated type II MB were active at nearly ambient methane mixing ratios, the activity of type I MB was induced under elevated methane mixing ratios. These specific responses of MB to different methane mixing ratios may offer one explanation for the varying $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ values in soils with varying water contents. The decreasing $K_{m(\text{app})}$ and $V_{\text{max}(\text{app})}$ values of *Methylocystis* sp. LR1 under decreasing methane concentrations (Dunfield and Conrad 2000) offer another explanation, since *Methylocystis* spp. occurred widespread in the analyzed soil samples.

References

- Adamsen, A. P. S., and King, G. M.** 1993. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 495-490.
- Amaral, J. A., and Knowles, R.** 1997. Localization of methane consumption and nitrification activities in some boreal forest soils and the stability of methane consumption on storage and disturbance. *J. Geophys. Res.* **102**: 29255-29260.
- Andersen, B. L., Bidoglio, G., Leip, A., and Rembges, D.** 1998. A new method to study simultaneous methane oxidation and methane production in soils. *Global Biogeochem. Cycles* **12**: 587-594.
- Auman, A. J., Stolyar, S., Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5259-5266.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1992. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 261-270.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1993. Kinetics of methane oxidation in oxic soils. *Chemosphere* **26**: 687-696.
- Benstead, J., and King, G. M.** 1997. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 333-340.
- Benstead, J., King, G. M., and Williams, H. G.** 1998. Methanol promotes atmospheric methane oxidation by methanotrophic cultures and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1091-1098.
- Bogner, J. E., Spokas, K. A., and Burton, E. A.** 1997. Kinetics of methane oxidation in a landfill cover soil: temporal variations, a whole-landfill oxidation experiment, and modeling of net CH₄ emissions. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 2504-2514.
- Born, M., Dörr, H., and Ingeborg, L.** 1990. Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. *Tellus B* **42**: 2-8.
- Bosse, U., Frenzel, P., and Conrad, R.** 1993. Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 123-134.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D., and Hayward, A. C.** 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the Group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 735-753.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., and Skerratt, J. H.** 1997. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology - UK* **143**: 1451-1459.
- Bradford, M. A., Ineson, P., Wookey, P. A., and Lappin-Scott, H. M.** 2001. Role of CH₄ oxidation, production and transport in forest soil CH₄ flux. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1625-1631.
- Buchholz, L. A., Valklump, J., Collins, M. L. P., Brantner, C. A., and Remsen, C. C.** 1995. Activity of methanotrophic bacteria in Green Bay sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**: 1-8.
- Bull, I. D., Parekh, N. R., Hall, G. H., Ineson, P., and Evershed, R. P.** 2000. Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature* **405**: 175-178.
- Calhoun, A., and King, G. M.** 1997. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3051-3058.

- Carlsen, H. N., Joergensen, L., and Degn, H.** 1991. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 124-127.
- Conrad, R.** 1995. Soil microbial processes involved in production and consumption of atmospheric trace gases. *Adv. Microb. Ecol.* **14**: 207-250.
- Conrad, R.** 1997. Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere. In: Helas, G, Slanina, J and Steinbrecher, R, eds. Amsterdam: SBP Academic Publ. 27-44.
- Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Czepiel, P. M., Crill, P. M., and Harriss, R. C.** 1995. Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soils. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **100**: 9359-9364.
- De Visscher, A., Thomas, D., Boeckx, P., and Van Cleemput, O.** 1999. Methane oxidation in simulated landfill cover soil environments. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 1854-1859.
- De Visscher, A., Schippers, M., and Van Cleemput, O.** 2001. Short-term kinetic response of enhanced methane oxidation in landfill cover soils to environmental factors. *Biol. Fertil. Soils* **33**: 231-237.
- Dedysh, S. N., Horz, H.-P., Dunfield, P. F., and Liesack, W.** 2001. A novel *pmoA* lineage represented by the acidophilic methanotrophic bacterium *Methylocapsa acidophila* B2. *Arch. Microbiol.* **177**: 117-121.
- Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., and Zavarzin, G. A.** 2004. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 151-156.
- Dlugokencky, E. J., Houweling, S., Bruhwiler, L., Masarie, K. A., Lang, P. M., Miller, J. B., and Tans, P. P.** 2003. Atmospheric methane levels off: Temporary pause or a new steady-state? *Geophys. Res. Lett.* **30**: 1-4.
- Dörr, H., Katruff, L., and Levin, I.** 1993. Soil texture parameterization of the methane uptake in aerated soils. *Chemosphere* **26**: 697-713.
- Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., and Moore, T. R.** 1993. Methane production and consumption in temperate and sub-arctic peat soils - response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 321-326.
- Dunfield, P. F., and Knowles, R.** 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3129-3135.
- Dunfield, P. F., Topp, E., Archambault, C., and Knowles, R.** 1995. Effect of nitrogen fertilizers and moisture content on CH₄ and N₂ fluxes in a humisol: measurements in the field and intact soil cores. *Biogeochem.* **29**: 199-222.
- Dunfield, P. F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R., and Conrad, R.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1009-1014.
- Dunfield, P. F., and Conrad, R.** 2000. Starvation alters the apparent half-saturation constant for methane in the type II methanotroph *Methylocystis* strain LR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4136-4138.
- Fiedler, S., and Sommer, M.** 2000. Methane emissions, groundwater levels and redox potentials of common wetland soils in a temperate-humid climate. *Global Biogeochem. Cycles* **14**: 1081-1093.
- Frenzel, P.** 2000. Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *Adv. Microb. Ecol.* **16**: 85-114.
- Gebert, J., Groengroeft, A., and Michlich, G.** 2003. Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Manag. Res.* **23**: 609-19.

- Gulledge, J., and Schimel, J. P.** 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH₄ oxidation in soil and mechanism of NH₄⁺ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4291-4298.
- Henckel, T., Friedrich, M., and Conrad, R.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R.** 2000a. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1801-1808.
- Henckel, T., Roslev, P., and Conrad, R.** 2000b. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.* **2**: 666-679.
- Heuer, H., and Smalla, K.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: Elsas, JD, Trevors, JT and Wellington, EMH, eds. *Modern soil microbiology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- Holmes, A. J., Roslev, P., McDonald, I. R., Iversen, N., Henriksen, K., and Murrell, J. C.** 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.
- Horz, H.-P., Raghubanshi, A. S., Heyer, J., Kammann, C., Conrad, R., and Dunfield, P. F.** 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 247-257.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., and Xiaosu, D.** 2001. IPCC Climate Change 2001: The scientific basis - contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., and Nasu, M.** 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 129-141.
- Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R.** 2001. Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 965-971.
- Jäger, H.-J., Schmidt, S. W., Kammann, C., Grünhage, L., Müller, C., and Hanewald, K.** 2003. The University of Giessen free-air carbon dioxide enrichment study: description of the experimental site and of a new enrichment system. *J. Appl. Bot.* **77**: 117-127.
- Jensen, S., Holmes, A. J., Olsen, R. A., and Murrell, J. C.** 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**: 282-289.
- Joergensen, L., and Degn, H.** 1983. Mass spectrometric measurements of methane and oxygen utilization by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 331-335.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* **8**: 275-282.
- Kalyuzhnaya, M. G., Khmelenina, V. N., Kotelnikova, S., Holmquist, L., Pedersen, K., and Trotsenko, Y. A.** 1999. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 565-572.
- Kammann, C., Grünhage, L., Jäger, H.-J., and Wachinger, G.** 2001. Methane fluxes from differentially managed grassland study plots: the important role of CH₄ oxidation in grassland with a high potential for CH₄ production. *Environ. Pollut.* **115**: 261-273.
- Keller, M., E. Veldkamp, A. M. Weitz, and W. A. Reiners.** 1993. Effect of pasture age on soil trace-gas emissions from a deforested area of Costa Rica. *Nature* **365**: 244-246.

- Kightley, D., Nedwell, D. B., and Cooper, M.** 1995. Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 592-601.
- King, G. M.** 1992. Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. *Adv. Microb. Ecol.* **12**: 431-468.
- Klemedtsson, A. K., and Klemedtsson, L.** 1997. Methane uptake in Swedish forest soil in relation to liming and extra N-deposition. *Biol. Fertil. Soils* **25**: 296-301.
- Knief, C., and Dunfield, P. F.** 2004. Response and adaptation of methanotrophic bacteria to low methane concentrations. in preparation.
- Knief, C., Altendorf, K., and Lipski, A.** 2003a. Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of ¹³C-labeled fatty acids. *Environ. Microbiol.* **5**: 1155-1167.
- Knief, C., Lipski, A., and Dunfield, P. F.** 2003b. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6703-14.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., and Conrad, R.** 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2423-9.
- Koschorreck, M., and Conrad, R.** 1993. Oxidation of atmospheric methane in soil: Measurements in the field, in soil cores and in soil samples. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 109-121.
- Lontoh, S., and Semrau, J. D.** 1998. Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1106-1114.
- MacDonald, J. A., Skiba, U., Sheppard, L. J., Hargreaves, K. J., Smith, K. A., and Fowler, D.** 1996. Soil environmental variables affecting the flux of methane from a range of forest, moorland and agricultural soils. *Biogeochem.* **34**: 113-132.
- Megraw, S. R., and Knowles, R.** 1987. Methane production and consumption in a cultivated humisol. *Biol. Fert. Soils* **5**: 56-60.
- Nichols, P. D., Smith, G. A., Antworth, C. P., Hanson, R. S., and White, D. C.** 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 327-335.
- Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J., and Janssen, D. B.** 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 7-14.
- Pacheco-Oliver, M., McDonald, I. R., Groleau, D., Murrell, J. C., and Miguez, C. B.** 2002. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 313-9.
- Reay, D. S., Radajewski, S., Murrell, J. C., McNamara, N., and Nedwell, D. B.** 2001. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1613-1623.
- Roslev, P., Iversen, N., and Hendriksen, K.** 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 874-880.
- Roslev, P., and Iversen, N.** 1999. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4064-4070.
- Saari, A., Martikainen, P. J., Ferm, A., Ruuskanen, J., Boer, W. d., Troelstra, S. R., and Laanbroek, H. J.** 1997. Methane oxidation in soil profiles of Dutch and Finnish coniferous forests with different soil texture and atmospheric nitrogen deposition. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 1625-1632.
- Segers, R.** 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochem.* **42**: 23-51.
- Sexstone, A. J., and Mains, C. N.** 1990. Production of methane and ethylene in organic horizons of spruce forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 135-139.

- Silver, W. L., Lugo, A. E., and Keller, M.** 1999. Soil oxygen availability and biogeochemistry along rainfall and topographic gradients in upland wet tropical forest soils. *Biogeochem.* **44**: 301-328.
- Striegl, R. G.** 1993. Diffusional limits to the consumption of atmospheric methane by soils. *Chemosphere* **26**: 715-720.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H.** 1998. ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Munich.
- Wang, F. L., and Bettany, J. R.** 1995. Methane emission from a usually well-drained prairie soil after snowmelt and precipitation. *Can. J. Soil Sci.* **75**: 239-241.
- Wang, F. L., and Bettany, J. R.** 1997. Methane emission from Canadian prairie and forest soils under short term flooding conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 197-202.
- Ward, B. B., and Kilpatrick, K. A.** 1990. Relationship between substrate concentration and oxidation of ammonium and methane in a stratified water column. *Continental Shelf Res.* **10**: 1193-1208.
- Whalen, R. T., and Reeburgh, W. S.** 1990. Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature* **346**: 160-162.
- Whalen, S. C., and Reeburgh, W. S.** 1996. Moisture and temperature sensitivity of CH₄ oxidation in boreal soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1271-1281.
- Wickland, K. P., Striegl, R. G., Schmidt, S. K., and Mast, M. A.** 1999. Methane flux in subalpine wetland and unsaturated soils in the southern Rocky Mountains. *Glob. Biogeochem. Cycles* **13**: 101-113.
- Wilhelm, E., Battino, R., and Wilcock, R. J.** 1977. Low pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* **77**: 219-262.
- Yavitt, J. B., Downey, D. M., Lang, G. E., and Sextone, A. J.** 1990. Methane consumption in two temperate forest soils. *Biogeochem.* **9**: 39-52.
- Yavitt, J. B., Fahey, T. J., and Simmons, J. A.** 1995. Methane and carbon dioxide dynamics in a northern hardwood ecosystem. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**: 796-804.
- Yeates, and Gillings.** 1998. Rapid purification of DNA from soil for molecular biodiversity analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 49-53.

3.3 Vergleich der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in tropischen Böden unterschiedlicher Landnutzung

Zielsetzung: Die Charakterisierung der Gilde der Methan-oxidierenden Bakterien beschränkte sich in den zuvor beschriebenen Studien auf „upland soils“ der gemäßigten Breiten. Im Rahmen dieser Studie wurden Böden des tropischen Breitengrades im Hinblick auf die Methan-Aufnahmekapazität und die Zusammensetzung der Gilde der Methan-oxidierenden Bakterien analysiert. Im Vordergrund dieses Projektes stand das Erkennen von Zusammenhängen zwischen der Landnutzung, der Methan-Aufnahmekapazität eines Bodens und der Zusammensetzung der Gilde der Methan-oxidierenden Bakterien in dem Boden. Daher wurden drei benachbarte Standorte ausgewählt, die sich durch verschiedenartige Bewirtschaftung auszeichneten (Wald, Wiederaufforstung, Ackerland). Ein weiterer Aspekt war der Vergleich der erhaltenen Daten mit denen, die für Böden der gemäßigten Breiten publiziert sind.

Anmerkung: Die Daten zur Charakterisierung der Methanoxidation wurden von Dr. Amnat Chidthaisong und Mitarbeitern vor Ort erhoben. Sie entstammen dem aktuellen „Progress Report“ von Dr. Amnat Chidthaisong (Januar 2004). Die Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien wurde von Peter F. Dunfield durchgeführt.

Die hier gezeigten Daten entstammen dem folgenden Manuskript (Einreichung geplant bei *FEMS Microbiol. Ecol.*):

Claudia Knief, Ralf Conrad, Peter F. Dunfield, Amnat Chidthaisong. Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land use. (in preparation)

Abstract

Three upland soils in Thailand; a native forest, a 16-year-old reforested site, and an agricultural field, were compared with regard to methane uptake and the community composition of methanotrophic bacteria (MB). Methane uptake rates were similar to uptake rates published for respective forest and farmland soils of the temperate zone. Rates were lower in the agricultural soil than in the native forest or reforested sites. Sites also differed in the community composition of MB, which was characterized by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of *pmoA* gene fragments (encoding for a subunit of particulate methane monooxygenase) that were PCR-amplified from total soil DNA extracts. Cluster analysis based on the DGGE banding patterns of duplicate soil samples indicated that the MB community of the forested and reforested sites were more similar to each other than either was to the farmland site. Sequencing of excised DGGE bands and comparative sequence analysis indicated that *Methylobacter* spp. and an as-yet uncultivated group of Gammaproteobacteria (type I MB) were present at all sampling sites. *pmoA* sequences of *Methylocystis* spp. were detected at the reforested site and the farmland, but not in soil samples from the native forest site. However, *Methylocystis* spp. could be isolated from both the reforested site and the native forest. Sequences of upland soil cluster α (USC α), which is postulated to represent organisms involved in atmospheric methane consumption in diverse soils, were detected only in the native forest and reforested site, as were sequences that formed a separate branch related to USC α . An *amoA* gene fragment (coding for a subunit of the ammonia monooxygenase) of ammonia-oxidizing bacteria was only obtained from the farmland site, but an unknown sequence cluster that may represent either *amoA* or *pmoA* was recovered from the native forest and farmland.

Introduction

The current atmospheric mixing ratio of the greenhouse gas methane (CH₄) is 1.75 ppm of volume (ppmv) (Dlugokencky 2003). An estimated 30 Tg of CH₄ year⁻¹ is consumed via microbiological oxidation in upland soils, accounting for about 6 % of the global methane sink (Houghton *et al.* 2001). Atmospheric methane oxidation has been detected in many different upland soils ranging from arctic and sub-arctic tundra soils to forest soils, grasslands and arable soils of the temperate zone, to tropical forests, savannahs and even arid deserts (e. g. Keller *et al.* 1983, Mosier *et al.* 1991, Seiler *et al.* 1984, Striegel *et al.* 1992, Whalen and Reeburgh 1990). While several studies have been performed to estimate the methane uptake capacity of upland soils of the temperate zone, only few data are available for tropical and subtropical soils (Castro *et al.* 1994, Goreau and de Mello 1988, Keller *et al.* 1986, Keller *et al.* 1990, Keller and Reiners 1994, Reiners *et al.* 1994, Singh *et al.* 1997, Singh *et al.* 1998). These data indicate that methane uptake rates of tropical and subtropical forest soils are comparable to rates in forest soils of the temperate zone, although higher oxidation rates have been reported for some tropical soils (Smith *et al.* 2000).

Among upland soils, forest soils are much more efficient methane sinks than are cultivated soils (Ambus and Christensen 1995, Born *et al.* 1990, Hütsch *et al.* 1994). Changes in land use, especially cultivation of formerly undisturbed soils, reduce the sink strength for atmospheric methane by 60 – 90 % (Moiser *et al.* 1997, Smith *et al.* 2000, Willison *et al.* 1995). Such a reduction has been reported for tropical soils as well (Goreau and de Mello 1988, Keller *et al.* 1990), but the methane oxidation rate of these soils seems to recover much faster after abandonment of agricultural activities (Keller and Reiners 1994), compared to systems of the temperate zone. Recovery of the oxidation rate to predisturbance levels takes > 100 years for soils of the temperate zone (Smith *et al.* 2000).

The methane oxidation rate of tropical soils is subject to strong seasonal variations. Minimum values were measured during the rainy season and maximum values during the dry period in several sites in India (Singh *et al.* 1997). Keller *et al.* (1993) reported a 2 – 3 fold increase of the uptake rates of soils in Costa Rica during the dry season. The seasonal variation in methane uptake was related to the moisture content of the soils, a trend commonly observed because soil moisture controls the diffusion rate of methane and oxygen in the soil from the atmosphere (Adamsen and King 1993, Born *et al.* 1990, Dörr *et al.* 1993, Dunfield *et al.* 1995, Koschorreck and Conrad 1993, Striegl 1993). Even a net methane emission was observed for tropical pasture sites during the wet season (Keller *et al.* 1993).

Methane oxidation in upland soils is mediated by methanotrophic bacteria (MB). Seven recognized genera of MB belong to the group of type I methanotrophs (Gammaproteobacteria), while the group of type II methanotrophs consists of 4 genera of MB (Alphaproteobacteria). The key enzyme of MB is the methane monooxygenase (MMO). With the exception of *Methylocella*, all MB possess the particulate form of this enzyme (pMMO) (Dedysh *et al.* 2000, Dedyh *et al.* 2004, Dunfield *et al.* 2003). The *pmoA* gene, encoding the α subunit of the pMMO, is therefore an excellent marker gene for methanotrophs and has often been targeted by cultivation-independent methods to characterize the community of MB in different upland soils. Sequences that are closely related to those of 7 different genera of MB have been detected by these methods in upland soils (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). Additionally, some *pmoA* sequences that are not closely related to cultivated MB have been detected, indicating that uncultivated MB are present in these soils. Uncultivated organisms that harbour *pmoA* sequences of upland soil cluster α (USC α) or upland soil cluster γ (USC γ) are most likely involved in atmospheric methane oxidation in upland soils (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003, Kolb *et al.* 2004). With exception of one soil sample from a rainforest in Brazil, the characterization of soil methanotrophic communities has been restricted to upland soils from the temperate zone. The only detected *pmoA* sequence type in this rainforest soil sample belonged to USC α (Holmes *et al.* 1999).

In the present study, we compared the methane oxidation activity and methanotrophic community composition of several soils from Thailand. The soil samples were taken from adjacent sites of different land-use, including a native forest site, a reforestation site and a corn field. The methane oxidation activity and the community composition of these soils were analyzed and compared with other data available from temperate soils.

Materials and Methods

Sampling sites. Three adjacent sampling sites were located in Amphur Wang Nham Keaw, Nakorn Ratchasima province in Thailand. The forest site (SK) was a native dry evergreen forest from the area of the Sakerat Experimental station. The dominant tree species were *Hopea ferrea*, *Pterocarpus macrocarpus*, *Xylia xylocarpar*, *Dalbergia cochinchinensis*, *Lagerstroemia duppereana*, and *Shorea henryana*. Site AC was a restoration area of the Royal Forestry Department, Ministry of Natural Resources and Environment. It was planted with fast-growing, nitrogen-fixing tree species 16 years ago. Studies were performed on a plantation of *Acacia mangium*. Before reforestation, this site was used as a farmland. The third sampling site was a cornfield (CF), situated adjacent to the restoration area. It was deforested more than 40 years ago and corn has been continuously cultivated at this site during the last 16 years. Soil samples for molecular analysis were taken from 10 – 20 cm soil depth during the second half of the rainy season on the 27th and 28th July 2003. The soil pH in water was determined in soil slurries (10 g of soil in 20 ml of twice-distilled water) of these samples.

Methane oxidation activity. The net methane flux across the soil surface was determined once each month over a period of one year with the closed-static chamber method (January – November 2003). Ten chambers were used at site SK, while 5 chambers were used at sites AC and CF, respectively. Chambers consisted of a top made of transparent acrylic glass (30 cm width × 30 cm length × 15 cm height) that could be attached to a fixed collar made of stainless steel. The collar was inserted to between 10 – 15 cm soil depth and remained there during the whole study period. During measurement, the chamber top was inserted into a water-filled channel of the fixed collar. Six or ten gas samples of 25 – 30 ml were taken within 1 h by a 30-ml syringe through a silicon stopper in the chamber top. Gas samples were immediately transferred to vials pre-filled with sterile saturated NaCl solution. Methane mixing ratios of the gas samples were determined on a Shimadzu gas chromatograph (Model 14B), equipped with a flame ionization detector (FID), and an Unibead C packed column (injection temperature, 120 °C; oven temperature 100 °C; detector temperature 300 °C). The first-order uptake rate constant was estimated from the exponential decrease of methane over time. The methane oxidation rate was calculated from the first-order uptake rate constant by multiplication with the initial methane mixing ratio in the chamber headspace.

DNA extraction. DNA was extracted from 0.5 g of soil using the Fast DNA SPIN Kit (BIO 101, La Jolla, CA, USA), according to the manufacturer's instructions with modifications as described before (Knief *et al.* 2004). DNA extracts were purified with polyvinyl-polypyrrolidone and a QIAquick PCR Purification KitTM (Qiagen, Hilden, Germany) (Knief *et al.* 2003).

PCR amplification and DGGE. A partial fragment of the *pmoA*-gene was PCR-amplified with primer A189 with GC-clamp (Henckel *et al.* 1999) and primer A682 of Holmes *et al.* (1995) and primer mb661 of Costello and Lidstrom (1999). Composition of the PCR reactions and the PCR program were described previously (Knief *et al.* 2004). A fragment of the *mmoX* gene encoding the active-site subunit of the soluble MMO was amplified with forward primer mmoXf945 with GC-clamp (Knief *et al.* 2004) and reverse primer mmoXB1401 of Auman *et al.* (2000) using the PCR program of Knief *et al.* (2004).

Mixed *pmoA*-PCR products were separated by DGGE. Visible bands were excised and reamplified. PCR products from excised DGGE bands were purified and sequenced exactly as described before (Knief *et al.* 2004).

Phylogenetic sequence analysis. Phylogenetic tree reconstructions were based on deduced amino acid sequences of partial *pmoA* and *amoA* sequences and were performed with the ARB software package (Strunk *et al.* 1998). Original tree construction included sequences of all DGGE bands, all available *pmoA* sequences in the GenBank database (December 2003), and selected public-domain *amoA* sequences. A selection was then made of 24 representative sequences from this study plus 38 public-domain sequences.

Isolation of mehanotrophic bacteria. Diluted nitrate mineral salts medium at slightly acid pH (5.8) was used to enrich for MB as described by Dunfield *et al.* (2003) from soil samples of the forested sampling sites SK and AC.

Nucleotide sequence accession numbers. Representative *pmoA* nucleotide sequences obtained during this study have been deposited in the GenBank, EMBL, and DDBJ nucleotide sequence databases under the accession numbers XXXXXXXXX – XXXXXXXXX.

Results

Characterization of the sampling sites. The community of MB was characterized in tropical soil samples from three adjacent sampling sites in Thailand. Sampling site SK was a native dry evergreen forest. Site AC was a 16-year-old plantation of *Acacia mangium*, a fast growing, nitrogen fixing tree species. Before reforestation it was a farmland. The third sampling site (CF) was deforested more than 40 years ago. Corn has been continuously cultivated at this site during the last 16 years. The soil pH of duplicate samples from sites SK and AC was 4.0, while it was 5.7 for the cornfield soil. The methane oxidation activity of the sampling sites was studied in detail over a period of one year (detailed results will be published elsewhere). The uptake rates varied greatly within the sampling sites, especially for sites SK and CF. Occasional methane emission was observed in some chambers of these two sites. Nevertheless, a seasonal variation pattern was obvious, indicating higher methane uptake rates during the dry season (December – February) and lower uptake rates during the wet season (May – September). Sites SK and AC showed comparable rates of methane oxidation, while uptake rates at site CF were much lower. At site SK the highest average oxidation rates were measured in March ($6.0 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) and the lowest values were measured in July ($0.5 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). A net methane emission was observed in June at this site ($< -0.2 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). The average methane oxidation rates at site AC varied between $1.1 - 4.8 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Rates were highest in February and lowest in June. At site CF the highest methane oxidation rate was measured in November ($2.9 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). From March until June the methane uptake rates ranged from $0.5 - 1.6 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. In January, February, July, and October, net methane emission (-2 to $-4.5 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) was observed.

Characterization of the methanotrophic communities. Using cultivation-independent methods, the communities of MB were characterized in soil samples taken from 10 – 20 cm soil depth during the second half of the wet season. Duplicate soil samples were taken from each sampling site. The *pmoA* gene fragment, used as a functional marker for the characterization of the methanotrophic community, was successfully PCR-amplified from all soil DNA extracts. A gene fragment of the *mmoX* gene could not be amplified. Two different reverse primers were used for the amplification of the *pmoA* gene fragment. Primer A682 is the less specific of the two, since it was designed to amplify both *pmoA* and *amoA* gene fragments (Holmes *et al.* 1995). Primer mb661 was designed to amplify *pmoA* gene fragments specifically, excluding amplification of *amoA* gene fragments (Costello and Lidstrom 1999).

Table 1: PmoA sequence types detected in the different sampling sites. Phylogenetic positions of the different taxa are given in Figure 1. (Designation of Clusters 2, 3, and 5 according to Knief *et al.* 2004.)

Detected taxa	SK		AC		CF	
	A682b	mb661	A682b	mb661	A682b	mb661
Ammonia oxidizer (AmoA)					+	
Cluster 2 (PmoA/AmoA)	+				+	
<i>Methylobacter</i>		+		+	+	+
Cluster 3		+		+	+	+
<i>Methylocystis</i>			+	+	+	
USC α	+		+			
Cluster 5		+		+		

The recovery of PmoA sequences very closely related to sequences from isolates of *Methylocystis* and *Methylobacter* indicated that well-known cultivated genera of MB were present in the soil samples of the three sampling sites (> 98 % identity on amino acid level) (Table 1). Sequences from uncultivated bacteria of USC α were detected at sites SK and AC (98 % identity), but not in the soil samples from the cornfield (CF). Likewise, *pmoA* sequences in a closely related, but clearly distinct group from previously detected USC α sequences (Cluster 5) were detected in these two soil samples, but not at site CF. Cluster 5 sequences AC-A and SK-B, which are shown in the phylogenetic tree (Fig. 1), showed a maximum identity of 83 % to sequences of USC α , represented by DGGE band E L4-a in Figure 1. While USC α sequences were obtained only when using primer A682 in PCR reactions, this novel sequence type was detected only when using primer mb661.

Another PmoA sequence type indicative for a second taxon of uncultivated MB was detected at all sampling sites. PmoA sequences of this "Cluster 3" formed two separate branches, which were related to sequences of methanotrophic Gammaproteobacteria. The amino acid identity of PmoA sequences of these branches was 95 – 98 % to the uncultivated bacteria represented by "clone Zhenjiang 5" and "clone Beijyuan 2" (Hoffmann *et al.* 2002) and 91 – 92 % to the cultivated methanotrophs of the genera *Methylococcus* and *Methylocaldum*. Since the amino acid identity of these novel sequences was approximately equal to PmoA sequences from both of these genera, the phylogenetic relationship could not be resolved and is represented by a multifurcation in the tree (Fig. 1). Sequences with a phylogenetic position intermediate to those of clearly definable AmoA or PmoA sequence types were detected in soil samples SK and CF. These sequences of "Cluster 2" had 87 – 97 % identity to a sequence previously recovered by cultivation-independent methods from a

temperate forest soil, represented by DGGE band E 5FB-f (Knief *et al.* 2003). Sequences that were phylogenetically most closely related to *amoA* genes of ammonia-oxidizing bacteria were detected only in soil sample CF.

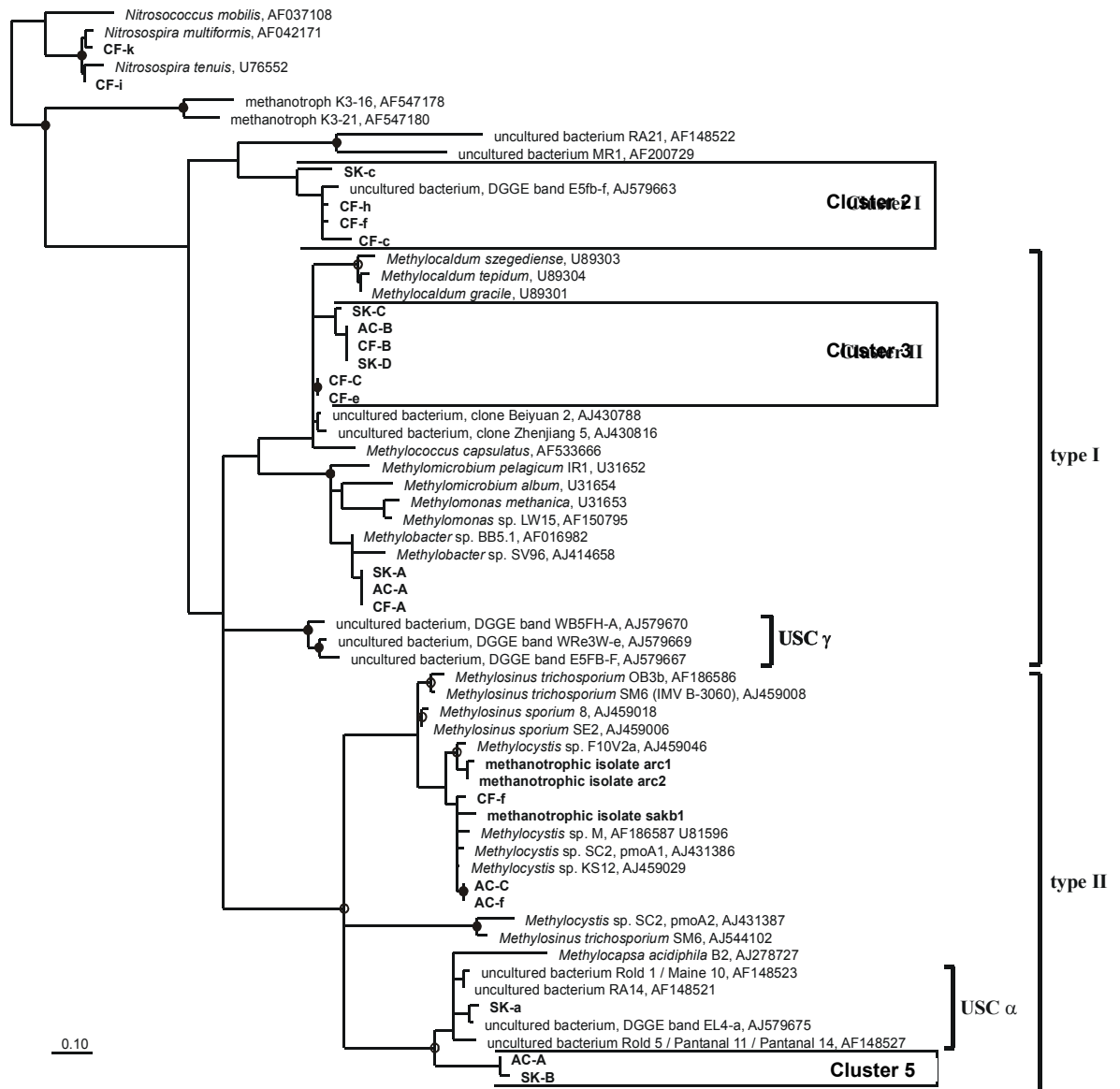


Figure 1: Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of partial *pmoA* and *amoA* sequences. The tree includes representatives of different PmoA sequences that were detected at the different sampling sites. Sequences recovered from PCR products that were amplified using the A682 reverse primer are shown in small letters while capitals indicate sequences from PCR products that were obtained using the mb661 reverse primer. PmoA sequences of three methanotrophic isolates, obtained from soils SK and AC, are also included. Tree calculation was based on 130 amino acid positions using the treepuzzle algorithm with the Jones-Taylor-Thornton evolutionary model (Jones *et al.* 1992). The position of recovered PmoA and AmoA sequences in this tree was confirmed by the topology of a maximum-likelihood and a neighbor-joining tree. Black circles indicate branches that were present in 90 % of 25,000 reconstructed treepuzzle trees, white circles indicate branches present in 80 % of the trees. AmoA sequences of ammonia-oxidizing bacteria were set as an outgroup. The bar represents 0.10 change per amino acid position.

Isolation of MB from forested sites. The methanotrophic isolate sakb1 was isolated from site SK, while two isolates (arc1 and arc2) were obtained from site AC. Based on the partial *pmoA* gene sequence, these isolates were identified as *Methylocystis* spp. (Fig. 1). This result was confirmed by 16S rRNA sequence analysis and by the morphology of the isolates. The *pmoA* sequences of the isolates from site AC were not identical to the *pmoA* sequences that were detected in this soil by cultivation independent methods. At site SK *pmoA* sequences indicating the presence of *Methylocystis* spp. were not detected at all.

Relationship between sampling site and community composition of methane-oxidizing bacteria. The DGGE banding pattern of PCR products from both backward primers indicated clear differences in the community composition of methane-oxidizing bacteria at the different sampling sites. The analyzed duplicates from each sampling site were very similar to each other (Fig. 2). This impression was confirmed by the results of a cluster analysis (SYSTAT version 9; SPSS Inc. Richmond, Calif.), which was performed based on the DGGE banding pattern (Fig. 2). The duplicates of all soil samples formed separate clusters. The MB community similarity between sites SK and AC was higher than the similarity of either to site CF.

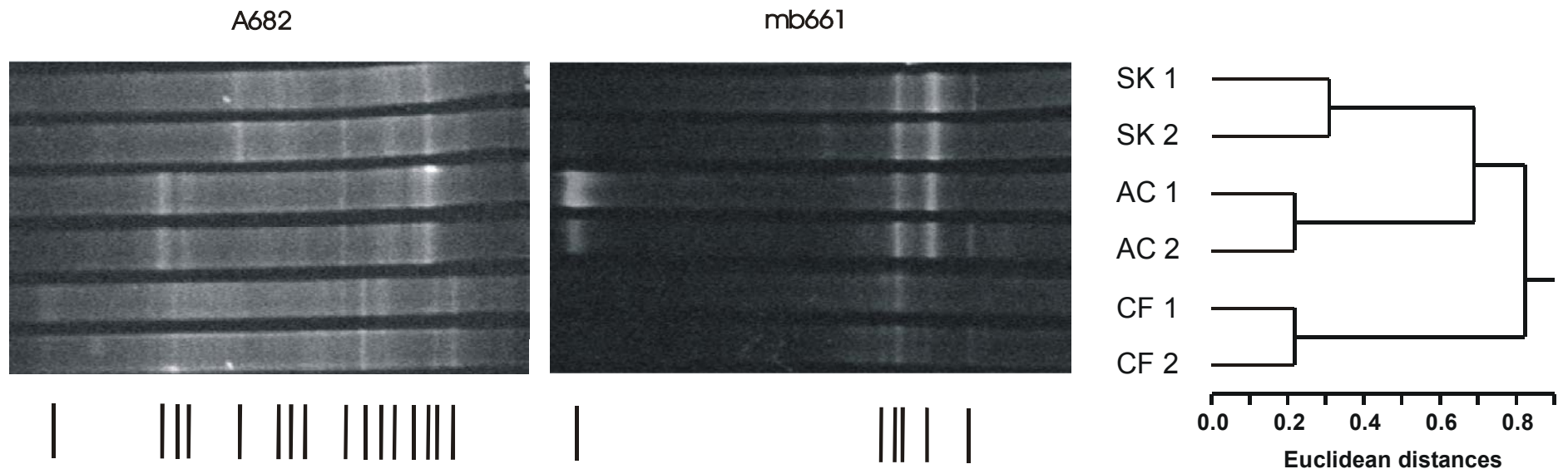


Figure 2: DGGE banding pattern of mixed *pmoA* PCR products of the soil samples. Duplicates from each sampling site were analyzed. PCR was performed from DNA extracts using either primer A682 or mb661 as the reverse primer. A cluster analysis was performed based on the presence or absence of the 21 indicated D bands of both gels. Jaccard similarity coefficients were calculated and a hierarchical tree was constructed based on average linking and Euclidean distances.

Discussion

In recent years, several studies have examined the methane oxidation activity together with the structure of the methanotrophic community of diverse upland soils (Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001). With the exception of Brazilian rainforest soil (Holmes *et al.* 1999), all data on methanotrophic community structure originate from upland soils of the temperate zone of the northern hemisphere. Because some tropical sites have much higher rates of methane oxidation than temperate sites (Singh *et al.* 1997, Singh *et al.* 1998, Smith *et al.* 2000), it is useful to study the MB community in these areas. This is the first study to analyze the methanotrophic community composition of a tropical forest soil under different land use. Three adjacent soil sites were chosen for this study, a native forest site, a reforestation site and a farmland. The soil pH was 4.0 in both forested sites, while the pH of the corn-cultivated soil was increased to 5.7. This increase was most probably caused artificially by agricultural utilization.

The measured methane oxidation rates of the soils corresponded quite well to those published in several other studies for upland soils (up to $7 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), including tropical and subtropical forest soils (Smith *et al.* 2000), but were not as high as the rates reported for some tropical forest soils (up to $14 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Singh *et al.* 1997, Singh *et al.* 1998). The methane oxidation rates showed large temporal and spatial variation within and between the sampling sites. Methane uptake rates were highest during the dry season and decreased during the wet season. A decrease in the oxidation rates during the wet season has been previously described for tropical forest soils and attributed to limited gas diffusion (Keller *et al.* 1993). Methane production was observed in some areas of site SK during the wet season, which indicates that the soil MB may temporarily benefit from an increased substrate supply. At site CF the methane oxidation activity was always lower than in the forested sites, and net methane production was observed more often, not only during the wet season, but also during the dry season. In general, the oxidation capacity decreased in the order forest site (SK), reforestation site (AC), and cornfield (CF). This agrees well with the general observation that the conversion of natural forest sites to farmland leads to a reduction of 60 – 90 % of the atmospheric methane uptake rate, but that the activity recovers in reforested sites (Keller *et al.* 1990, Moiser *et al.* 1997, Smith *et al.* 2000, Willison *et al.* 1995). It has been stated that the oxidation rate of tropical soils recovers much faster after abandonment of agricultural activities, compared to temperate systems (Keller and Reiners 1994, Smith *et al.* 2000). This may explain why the methane oxidation rate of the reforestation site AC was only slightly

lower than the rate in site SK, although site AC was reforested only 16 years ago. The methane oxidation process was localized in subsurface soil layers (> 5 – 10 cm below soil surface) at sites SK and AC, while samples of site CF showed potential methane oxidation activity at all soil depths down to 40 cm (Chidthaisong, unpublished data). Thus, the methanotrophic community was characterized in soil samples from 10 – 20 cm depth.

Fragments of the *pmoA* gene were amplified from all soil DNA extracts, but *mmoX* genes were not recovered from the soil samples. This is in accordance with results from upland soils from Central Europe (Knief *et al.* 2003) and suggests two different explanations. Either the primer systems used are not very sensitive for the detection of *mmoX* genes, or the dominant MB in upland soils do not possess *mmoX* genes. The latter is reasonable considering that MB in upland soils have to live on very low substrate concentrations. Under these oligotrophic conditions it should be more preferable to use pMMO over sMMO, since it has a lower energy demand for the oxidation of methane to methanol. This leads to higher growth yields and a higher affinity for methane (Hanson and Hanson 1996).

The only known genera of MB detected in the Thai soil samples were those of *Methylocystis* and *Methylobacter*. While *Methylocystis* has been detected in several different upland soils (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001), *Methylobacter* has only been detected in an acidic heath-land soil (Bourne *et al.* 2001). Unusual sequences obtained from several DGGE bands indicated that different taxa of uncultivated putative methanotrophs were also present in the soil samples. Organisms harbouring *pmoA* sequences of USC α have been detected in several upland soils before, including acidic tropical forest soils (Holmes *et al.* 1999). They were present at sampling sites SK and AC, as were sequences that are represented by Cluster 5, which is closely related to USC α . Cluster 3 sequences represent a group of uncultivated type I methanotrophs related to *Methylocaldum* and *Methylococcus*. A further branch of PmoA sequences within this broad *Methylococcus-Methylocaldum* cluster is formed by sequences that were detected in different rice field soils (Hoffmann *et al.* 2002). Thus, different uncultivated taxa of MB seem to exist, which have – on PmoA level – a phylogenetic position between *Methylocaldum* spp. and *Methylococcus* spp.

The detection of the third cluster representing uncultivated bacteria, Cluster 2, has as yet been restricted to upland soils. Since the sequences of this branch are only distantly related to PmoA sequences of recognized genera of MB, it cannot be excluded that these sequences code for the AmoA of uncultivated ammonia-oxidizing bacteria. However, the growth of the organisms harbouring these sequences was possibly stimulated by addition of methane (Knief

and Dunfield 2004). In this study, only *Methylocystis* spp. were isolated. These isolates probably did not represent the dominant *Methylocystis* spp. in the soil samples, since *PmoA* sequences identical to those of the isolates were not detected by cultivation-independent methods in the soil samples.

The different land-use of the sampling sites was reflected by different methane uptake rates and different soil pHs, especially for the cornfield soil. The characterization of the methanotrophic community indicated that the community composition reflected the land use change as well. The *pmoA* sequences of USC α and Cluster 5 were detected in samples from sites SK and AC, but not in the soil samples from the cornfield. The absence of USC α at site CF is in agreement with the results of other studies, in which the methanotrophic community of some farmland soils was analyzed and in which USC α sequences were not detected, although they were present in adjacent grassland and forest soils (Knief *et al.* 2003). The pH shift in the farmland soil is probably not the reason for the disappearance of USC α sequences at this sampling site, since the organisms harbouring USC α sequences, although they appear to occur more frequently in acidic than in neutral soils, do occur in soils of a wide pH range (4.0 – 8.0) (Knief *et al.* 2003). Further sequences that led to the different community compositions of the different sampling sites were those of *Methylocystis* spp., Cluster 2 and of ammonia-oxidizing bacteria (Table 1). Sequences of *Methylobacter* and Cluster 3 were detected at all sampling sites. A cluster analysis was used to compare the degree of similarity across sites among the communities of MB plus ammonia-oxidizing bacteria. The resulting tree confirmed the high similarity of replicate samples from one sampling site and differences between the different sampling sites. The differences within the replicate samples from one site were due to faint DGGE bands visible in one sample but not in the other one. Thus, *pmoA* sequences with an abundance near the detection limit of the methods were mainly responsible for the dissimilarity of duplicate samples. The main purpose of this cluster analysis was the comparison of the different sampling sites. The community composition of sites SK and AC were more similar to each other than either was to site CF. This finding is in accordance with the methane uptake rates and pHs of the sampling sites, which also indicated a high degree of dissimilarity of site CF compared to sites SK and AC.

These data demonstrate clearly that land use changes are not only connected to changes in the methane uptake capacity of soils, but also to changes in the community composition of methane-oxidizing bacteria. The change in the community composition may be an important factor leading to the general decrease in the methane uptake rate of farmland soils. The methanotrophic communities of replicate samples within one sampling site were highly

similar, although methane uptake rates varied over space and time. However, several other factors influence the methane uptake rate of a soil. The water content is an important factor, since it heavily influences gas diffusion in the soil (Adamsen and King 1993, Dunfield *et al.* 1995, Keller *et al.* 1994, Koschorreck *et al.* 1993, Smith *et al.* 2003). A high water content can also explain the methane emission observed in some areas of sampling sites SK and CF during the wet season. The limited gas diffusion leads to the formation of anoxic sites within the soil, which in turn favour the activity of methanogenic *Archaea*. Whether and how the community of MB responds to changes in the water content of a soil, remains to be studied.

The community composition of the reforested site AC represents a kind of intermediate state between the communities at sites SK and CF. Since it is unknown how the community composition and methane uptake activity of the reforested site AC looked before the site was reforested, we cannot conclude whether the community we see today has redeveloped or whether the community structure was not as much changed after deforestation. During this period this site was a farmland like site CF, so it is likely that the MB community was different at this time.

References

- Adamsen, A. P. S., and King, G. M.** 1993. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 495-490.
- Auman, A. J., S. Stolyar, A. M. Costello, and M. E. Lidstrom.** 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5259-5266.
- Ambus, P., and Christensen, S.** 1995. Spatial and seasonal nitrous-oxide and methane fluxes in Danish forest-ecosystems, grassland-ecosystems, and agroecosystems. *J. Environ. Qual.* **24**: 993-1001.
- Born, M., Dörr, H., and Ingeborg, L.** 1990. Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. *Tellus B* **42**: 2-8.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.
- Castro, M. S., Peterjohn, W. T., Melillo, J. M., Gholz, H. L., and Lewis, D.** 1994. Effects of nitrogen fertilization on the fluxes on N₂O, CH₄, and CO₂ from soils in a Florida slash pine plantation. *Can. J. For. Res.* **24**: 9-13.
- Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Bares, A. M., Panikov, N. S., and Tiedje, J. M.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969.
- Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., and Zavarzin, G. A.** 2004. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 151-156.
- Dlugokencky, E. J., Houweling, S., Bruhwiler, L., Masarie, K. A., Lang, P. M., Miller, J. B., and Tans, P. P.** 2003. Atmospheric methane levels off: Temporary pause or a new steady-state? *Geophys. Res. Lett.* **30**: 1-4.
- Dörr, H., Katruff, L., and Levin, I.** 1993. Soil texture parameterization of the methane uptake in aerated soils. *Chemosphere* **26**: 697-713.
- Dunfield, P. F., Topp, E., Archambault, C., and Knowles, R.** 1995. Effect of nitrogen fertilizers and moisture content on CH₄ and N₂ fluxes in a humisol: measurements in the field and intact soil cores. *Biogeochem.* **29**: 199-222.
- Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., A., T. Y., and Dedysh, S. N.** 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1231-1239.
- Goreau, T. J., and de Mello, W. Z.** 1988. Tropical deforestation: some effects on atmospheric chemistry. *Ambio* **17**: 275-281.
- Hanson, R. S., and Hanson, T. E.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- Henckel, T., Friedrich, M., and Conrad, R.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R.** 2000a. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1801-1808.

- Hoffmann, T., Horz, H. P., Kemnitz, D., and Conrad, R.** 2002. Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different rice field soils in China and the Philippines. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 267-274.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- Holmes, A. J., Roslev, P., McDonald, I. R., Iversen, N., Henriksen, K., and Murrell, J. C.** 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., and Xiaosu, D.** 2001. IPCC Climate Change 2001: The scientific basis - contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Hütsch, B. W., Webster, C. P., and Powlson, D. S.** 1994. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1613-1622.
- Jensen, S., Holmes, A. J., Olsen, R. A., and Murrell, J. C.** 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**: 282-289.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* **8**: 275-282.
- Keller, M., Goreau, T. J., Wofsy, S. C., Kaplan, W. A., and McElroy, M. B.** 1983. Production of nitrous oxide and consumption of methane by forest soils. *Geophys. Res. Lett.* **10**: 1156-1159.
- Keller, M., Kaplan, W. A., and Wofsy, S. C.** 1986. Emissions of N₂O, CH₄ and CO₂ from tropical forest soils. *J. Geophys. Res.* **91**: 11791-11802.
- Keller, M., Mitre, M. E., and Stallard, R. F.** 1990. Consumption of atmospheric methane in tropical soils of Central Panama. *Glob. Biogeochem. Cycles* **4**: 21-27.
- Keller, M., E. Veldkamp, A. M. Weitz, and W. A. Reiners.** 1993. Effect of pasture age on soil trace-gas emissions from a deforested area of Costa Rica. *Nature* **365**:244-246.
- Keller, M., and Reiners, W. A.** 1994. Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide, nitric oxide, and methane under secondary succession of pasture to forest in the Atlantic lowlands of Costa Rica. *Global Biogeochem. Cycl.* **8**: 399-409.
- Knief, C., and Dunfield, P. F.** 2004. Response and adaptation of methanotrophic bacteria to low methane concentrations. in preparation.
- Knief, C. Kolb, S. Bodelier, P. L. E. Lipski, A., Dunfield, P. F.** 2004. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. in preparation.
- Knief, C., Lipski, A., and Dunfield, P. F.** 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6703-14.
- Kolb, S., Knief, C., Dunfield, P. F., Conrad, R.** 2004. Quantitative evidence for oxidation of atmospheric methane by uncultivated methanotrophic bacteria in forest soils. in preparation.
- Koschorreck, M., and Conrad, R.** 1993. Oxidation of atmospheric methane in soil: Measurements in the field, in soil cores and in soil samples. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 109-121.
- Mosier, A., Schimel, D., Valentine, D., Bronson, K., and Parton, W.** 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* **350**: 330-332.
- Mosier, A. R., Delgado, J. A., Cochran, V. L., Valentine, D., and Parton, W. J.** 1997. Impact of agriculture on soil consumption of atmospheric CH₄ and a comparison of CH₄ and N₂O flux in subarctic, temperate and tropical grasslands. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 71-83.
- Reay, D. S., Radajewski, S., Murrell, J. C., McNamara, N., and Nedwell, D. B.** 2001. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1613-1623.
- Reiners, W. A., Bouwman, A. F., Parsons, W. F. J., and Keller, M.** 1994. Tropical rain forest conversion to pasture: changes in vegetation and soil properties. *Ecological Applications* **4**: 363-377.

- Seiler, W., Conrad, R., and Scharffe, D.** 1984. Field studies of methane emission from termite nests into the atmosphere and measurements of methane uptake by tropical soils. *J. Atmos. Chem.* **1**: 171-186.
- Singh, A. K., Raghubanshi, A. S., Reddy, V. S., Singh, S., and Kashyap, A. K.** 1998. Methane flux from irrigated paddy and dryland rice fields, and from seasonally dry tropical forest and savanna soils of India. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 135-139.
- Singh, J. S., Singh, S., Raghubanshi, A. S., Singh, S., Kashyap, A. K., and Reddy, V. S.** 1997. Effect of soil nitrogen, carbon and moisture on methane uptake by dry tropical forest soils. *Plant and Soil* **196**: 115-121.
- Smith, K. A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K. E., Massheder, J., Rey, A.** 2003. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur. J. Soil Sci.* **54**: 779-791.
- Smith, K. A., Dobbie, K. E., Ball, B. C., Bakken, L. R., Sitaula, B. K., Hansen, S., Brumme, R., Borken, W., Christensen, S., Prieme, A., Fowler, D., Macdonald, J. A., Skiba, U., Klemedtsson, L., Kasimir-Klemedtsson, A., Degorska, A., and Orlanski, P.** 2000. Oxidation of atmospheric methane in Northern European soils, comparison with other ecosystems, and uncertainties in the global terrestrial sink. *Global Change Biology* **6**: 791-803.
- Steinkamp, R., Zimmer, W., and Papen, H.** 2001. Improved method for detection of methanotrophic bacteria in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* **42**: 316-322.
- Striegl, R. G., McConnaughey, T. A., Thorstenson, D. C., and Woodward, J. C.** 1992. Consumption of atmospheric methane by desert soils. *Nature* **357**: 145-147.
- Striegl, R. G.** 1993. Diffusional limits to the consumption of atmospheric methane by soils. *Chemosphere* **26**: 715-720.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H.** 1998. ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Munich.
- Whalen, R. T., and Reeburgh, W. S.** 1990. Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature* **346**: 160-162.
- Willison, T. W., Webster, C. P., Goulding, K. W. T., and Powlson, D. S.** 1995. Methane oxidation in temperate soils: effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere* **30**: 539-546.

3.4 Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien aus „upland soils“

Die Anreicherung und Isolierung von MB erfolgte aus einer Auswahl 8 verschiedener Bodenproben (Tab. 3.1). Die Methan-Aufnahme und die Zusammensetzung der Gilde der MB in diesen Bodenproben war zuvor charakterisiert worden (Knief *et al.* 2003). Mit Ausnahme von Probe E 20 war für alle Proben die Aufnahme von Methan atmosphärischer Konzentration nachweisbar. Die Gilde Methan-oxidierender Bakterien war anhand der Detektion eines *pmoA*-Genfragmentes charakterisiert worden. Neben *pmoA*-Sequenzen des USC α und USC γ , die auf unkultivierte MB hindeuten, wurden *pmoA*-Sequenzen der Gattungen *Methylosinus*, *Methylocystis* und *Methylocaldum* detektiert. In den Bodenproben GE BF und BB NH waren weder *pmoA*- noch *mmoX*-Gene detektiert worden, obwohl diese Böden atmosphärisches Methan aufnahmen.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Gilde der MB in den „upland soils“, welche für die Anreicherung und Isolierung MB eingesetzt wurden, und Zusammensetzung der Gilde der MB nach 286 Tagen Inkubation unter erhöhten Methan-Mischungsverhältnissen (bis 1 %). Daten der nicht-inkubierten, frischen Bodenproben entstammen Knief *et al.* 2003. Die phylogenetische Position der PmoA-Sequenzen ist in den Stammbäumen in Kapitel 3.1 (Fig. 1) und Kapitel 3.5 (Fig. 1) dargestellt.

Probe	pH	USC α	USC γ	<i>Methylo-</i> <i>sinus</i>	<i>Methylo-</i> <i>cystis</i>	<i>Methylo-</i> <i>caldum</i>	<i>Methylo-</i> <i>cystis</i> pmoA2	pmoA/ amoA (E 5FB-f)
FrISCHE Bodenproben								
E 5FB	7.5		+	+				
VA DWT	6.8		+		+			
VA DFT	4.4	+						
MF	4.0	+						
E L6	6.2	+	+	+				
E 20	7.6			+		+		
GE BF	6.8			keine <i>pmoA</i> -Gene detektiert				
BB NH	4.6			keine <i>pmoA</i> -Gene detektiert				
Vorinkubierte Bodenproben								
E 5FB	7.5				+		+	+
VA DWT	6.8				+			+
VA DFT	4.4	+						
MF	4.0	+						

Die Anreicherung und Isolierung MB aus „upland soils“ erfolgte nicht nur in den Standardmedien (Heyer *et al.* 1984), sondern auch in modifizierten Medien. Von King (1996)

wurde die Verwendung von Medien mit geringeren Salzkonzentrationen vorgeschlagen, eine Strategie, die sich bereits bei der Isolierung von MB der Gattung *Methylocella* aus Waldböden bewährt hat (Dunfield *et al.* 2003). Neben der Verringerung der Salzkonzentration wurde der pH-Wert des Mediums an denjenigen des Bodens, aus dem isoliert wurde, angepasst. Ein leicht saurer pH-Wert für die Anreicherung MB aus sauren Böden erscheint sinnvoll, da aus sauren Böden extrahierte MB ihre Aktivität unter neutralen Bedingungen verlieren (Amaral *et al.* 1998). Zudem wurden längere Inkubationszeiten für die Anreicherung von MB aus „upland soils“ vorgeschlagen (King 1996). Somit wurden in einem ersten Versuch Medien mit unterschiedlicher Stickstoffquelle (Ammonium, Nitrat, ohne N-Quelle), verschiedenen pH-Werten (5 oder 7, je nach Boden) und unterschiedlicher Salzkonzentration (unverdünntes Medium und 10-fach verdünntes Medium) eingesetzt. Wachstum von Mikroorganismen wurde lediglich in Verdünnungen von 10^1 bis 10^3 beobachtet. Stämme der Gattungen *Methylocystis* (DWT, L6), *Methylosinus* (BF1) und *Methylocaldum* (5FB, E10a) wurden auf unverdünntem Festmedium mit pH 7 und Ammonium oder Nitrat als Stickstoffquelle erhalten. Darüber hinaus wurde eine Anreicherungskultur mit *Methylobacter* sp. (5FB) als einzigen Stamm MB erhalten. Die Identifizierung der Isolate erfolgte anhand morphologischer Merkmale und basierend auf Sequenzabschnitte des Gens der 16S rRNA (Abb. 3.1), des *pmoA*-Gens und, sofern vorhanden und mit den verwendeten Primern amplifizierbar, der Gene *mxoF*, *moxX* und *pmoA2* (vgl. Kap. 3.5).

Eine zweite Anreicherungsstrategie beruhte auf der Hypothese, dass MB, die in „upland soils“ leben, möglicherweise auf zusätzliche organische Verbindungen angewiesen sind (vgl. Kap. 1.5.2). Daher wurden Verdünnungsreihen angesetzt, denen 0,1 % Methanol, Acetat, Formiat, ein Aminosäure-Mix, Malzextrakt oder 10 % eines Bodenextraktes zugesetzt worden war. Der Bodenextrakt war aus dem jeweiligen Boden gewonnen worden, aus dem angereichert werden sollte. Das Wachstum MB wurde unter diesen Bedingungen jedoch nicht nachweisbar stimuliert, denn *pmoA*-Gene waren weder nach 3 Wochen noch nach 7 Monaten Inkubation in den Aliquots ausgewählter Verdünnungsstufen nachweisbar.

In einem dritten Ansatz wurden die MB direkt im Boden angereichert. Zu diesem Zweck wurde Boden der Proben E 5FB, VA DWT, VA DFT und MF in Gegenwart von erhöhten Methan-Mischungsverhältnissen (zunächst im Bereich von 0 – 1.000 ppmv, ab dem 79. Tag 0 – 10.000 ppmv) über 300 Tage inkubiert. Bei Inkubation in Gegenwart von 10.000 ppmv Methan stieg $V_{\max(\text{app})}$ in den pH-neutralen Bodenproben VA DWT und E 5FB exponentiell an. In zwei von drei Replikaten der Probe VA DWT stieg $V_{\max(\text{app})}$ von

anfänglich 0.8 auf 20 bzw. 31 nmol CH₄ gdw⁻¹ h⁻¹. In einem der drei Replikate der Probe E 5FB wurde ein Anstieg von 3.1 auf 60 nmol CH₄ gdw⁻¹ h⁻¹ beobachtet, während die Rate in den beiden anderen Parallelen nahezu konstant blieb. In den sauren Bodenproben MF und VA DFT verdoppelte sich die Oxidationsrate innerhalb der ersten 54 Tage bei Inkubation unter ≤ 1000 ppmv, bei anschließender Inkubation unter höheren Methan-Mischungsverhältnissen nahm $V_{\max(\text{app})}$ jedoch wieder ab. Ob diese Abnahme in irgendeiner Weise mit den höheren Methan-Mischungsverhältnissen zusammenhängt, ist unklar. Nach 300 Tagen Inkubation wurde die Gilde der MB erneut über kultivierungs-unabhängige Methoden charakterisiert. In den Bodenproben MF und VA DFT, in denen $V_{\max(\text{app})}$ nicht angestiegen war, war die Zusammensetzung der Gilde der MB unverändert (Tab. 3.1). In den vorinkubierten Bodenproben VA DWT und E 5FB, in denen $V_{\max(\text{app})}$ exponentiell angestiegen war, wurden PmoA Sequenzen detektiert, die verwandt waren zu *Methylocystis* spp. *pmoA1* und *pmoA2* und der Sequenz eines unkultivierten Bakteriums (Cluster 2; Knief *et al.* 2004). Die anfänglich nachweisbaren Sequenzen des USC γ waren über DGGE nicht mehr nachweisbar. Aus Bodenprobe E 5FB wurden *Methylocystis* sp. 5FB1 und *Methylocystis* sp. 5FB2 isoliert (Abb. 3.1). *Methylocystis* sp. 5FB2 wuchs ausschließlich auf verdünntem Festmedium.

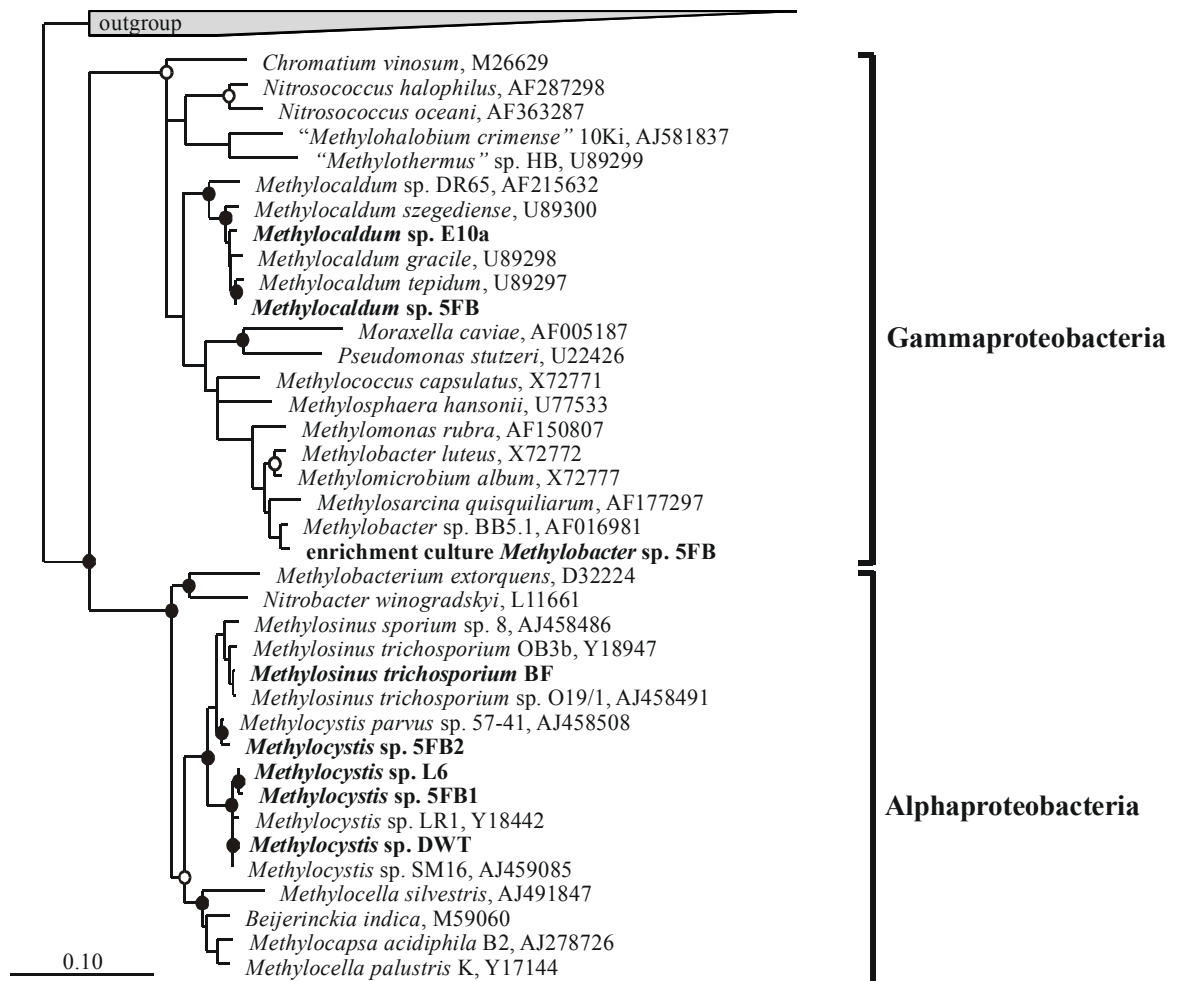


Abbildung 3.1: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Sequenzen. Dargestellt ist die Verwandtschaft der methanotrophen Isolate zu anderen MB und nicht-methanotrophen Bakterien. Der Stammbaum wurde über den Treepuzzle Algorithmus mit dem evolutionären Modell von Hasegawa (Hasegawa *et al.* 1985) berechnet, basierend auf 1377 Nukletid-Positionen (50 % Filter). Schwarze Kreise zeigen Verzweigungen an, die bei 90 % der 10.000 berechneten Bäume erhalten wurden, während weiße Kreise Verzweigungen mit 80 % anzeigen. In der „outgroup“ sind 6 Sequenzen von Nicht-Proteobakterien zusammengefasst. Die dargestellte Skala zeigt 0,1 Austausche pro Nukleotid-Position an.

3.5 Oligotrophe Adaption methanotropher Bakterien – Aktivität methanotropher Bakterien unter niedrigen Methankonzentrationen

Zielsetzung: Im Vordergrund dieses Versuches stand die Frage nach der physiologischen Anpassungsfähigkeit kultivierter MB an oligotrophe Bedingungen. Verschiedene Stämme MB wurden unter Methan-Mischungsverhältnissen ≤ 1000 ppmv inkubiert und deren Methan-Oxidationsaktivität und Wachstumsfähigkeit beobachtet. Bei denjenigen methanotrophen Stämmen, die über einen Zeitraum von mehreren Wochen ihre Methan-Oxidationsaktivität unter niedrigen Methankonzentrationen beibehielten, wurde die Fähigkeit zur Oxidation von Methan atmosphärischer Konzentration überprüft.

Da die in Stammsammlungen vorhandenen Isolate überwiegend von Standorten isoliert wurden, die höheren Methankonzentrationen ausgesetzt waren, erfolgte zunächst die Isolierung von MB aus „upland soils“ unter Anwendung verschiedener Anreicherungs- und Isolierungs-Strategien (vgl. Kap. 3.4). Die Überlebensfähigkeit MB unter niedrigen Methankonzentrationen wurde für einige ausgewählte Isolate überprüft und mit der von Referenzorganismen aus der Stammsammlung verglichen.

Anmerkung: Die Inkubation MB unter Methan-Mischungsverhältnissen < 1000 ppmv erfolgt über mehrere Wochen bis Monate. Sie ist derzeit noch nicht für alle Stämme der MB unter allen getesteten Bedingungen abgeschlossen. Daher sind einige der in Tabelle 2 eingetragenen Werte vorläufige Ergebnisse, die den generellen Trend angeben.

Die hier gezeigten Daten entstammen dem folgenden Manuskript (Einreichung geplant bei *Environ. Microbiol.*):

Claudia Knief, Peter F. Dunfield. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane concentrations. (in preparation)

Abstract

Uncultivated methanotrophic bacteria (MB) have been detected in many different upland soils, and are hypothesized to be involved in atmospheric methane consumption. Recognized, cultivated genera of MB are also present in most upland soils, but it is not well understood whether these MB are able to oxidize atmospheric methane. Therefore, MB were isolated from different upland soils and their ability to remain active and grow under low methane mixing ratios was tested and compared to common methanotrophic reference strains. Eight isolates belonging to the genera *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocaldum*, and *Methylobacter* were obtained. When cultivated under high methane concentrations (10 %), the kinetic parameters (apparent half saturation constant [$K_{m(\text{app})}$], apparent maximum methane uptake rate [$V_{\text{max}(\text{app})}$], and specific affinity [a_s^0]) of selected isolates were similar (within one order of magnitude) to reference strains. It was not evident from these parameters that any particular strain was better adapted to grow on low substrate concentrations over a prolonged period of time. Nevertheless, there were large differences in the oligotrophic adaptation among strains and species of MB. The threshold concentration of methane for growth or maintenance of methane-oxidation activity in most tested methanotrophic Gammaproteobacteria (type I MB) and in *Methylocapsa acidiphila* B2 was > 1000 ppmv. Two strains of *Methylosinus trichosporium* and one strain of *Methylomicrobium album* (BG8) maintained methane oxidation activity over a prolonged period of time (>10 weeks) at 100 ppmv. Some *Methylocystis* spp. displayed no loss of activity, or even grew at ≤ 10 ppmv of methane. One *Methylocystis* strain even showed stable oxidation activity under atmospheric methane (1.75 ppmv) for more than 6 weeks. Based on the methane oxidation kinetics of *Methylocystis* spp., cell densities of $1.4 - 349 \times 10^6$ cells per gram of dry soil could explain the atmospheric methane uptake rates of upland soils. Although it is likely that uncultivated groups of MB are responsible for atmospheric methane oxidation in most forest soils, the results suggest that some strains of cultivated MB can also be involved in the process, and may even be dominant in soils with low methane oxidation rates, such as agricultural soils.

Introduction

Methanotrophic bacteria (MB) inhabit the aerobic interfaces of methanogenic environments and reduce the potential methane emissions from these environments by 1 – 90 % (Conrad 1997, Frenzel 2000, Segers 1998). In upland soils MB are also responsible for the oxidation of atmospheric methane (Bender and Conrad 1992, Bender and Conrad 1994a, Schnell and King 1995, Whalen and Reeburgh 1990, Yavitt *et al.* 1990). The MB in these soils must live on the trace amount of methane available from the atmosphere (≤ 2.5 nM). Alternatively, it has been shown that MB may utilize substrates such as methanol or formate in addition to atmospheric methane (Benstead *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998b). Moreover, additional methane may be available for the MB from anoxic methanogenic microsites in upland soils (Andersen *et al.* 1998, Conrad 1995). Based on the maintenance energy requirement, Conrad (1984) calculated that soil microorganisms can grow on atmospheric trace gases only if either their $K_{m(\text{app})}$ values are low (high affinity) or their enzyme levels ($V_{\text{max}(\text{app})}$) are high. A reasonable $V_{\text{max}(\text{app})}$ was estimated at $250 \text{ mmol h}^{-1} \text{ C-mol}^{-1}$ biomass, equivalent to 0.3 enzyme units per mg protein (Conrad 1999). Assuming an energy demand for maintenance of $4.5 \text{ kJ h}^{-1} \text{ C-mol}^{-1}$ microbial biomass, Conrad calculated a $K_{m(\text{app})}$ value of 110 nM to allow maintenance at atmospheric methane concentrations. The specific affinity (a^0_s), calculated from these values, is $25 \times 10^{-12} \text{ l cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Indeed, upland soils show a high-affinity methane uptake, characterized by $K_{m(\text{app})}$ values of 10 – 280 nM (e. g. Bender and Conrad 1992, Bender and Conrad 1993, Benstead and King 1997, Czepiel *et al.* 1995, Dunfield and Knowles 1995, Gulledge and Schimel 1998, Whalen and Reeburgh 1996), while the $K_{m(\text{app})}$ for methane oxidation in ecosystems with high methane supply and in pure cultures of MB is usually $> 1 \mu\text{M}$ (e. g. Joergensen and Degn 1983, Megraw and Knowles 1987, Whalen *et al.* 1990, Whalen and Reeburgh 1996, Yavitt *et al.* 1990).

Thus, the existence of uncultivated MB with a high-affinity activity for the oxidation of atmospheric methane was postulated originally by Bender and Conrad (1992) and has become widely accepted. These MB are hypothesized to have special physiological adaptations to maintain activity under oligotrophic conditions. Indeed, as-yet uncultivated MB have been detected in different upland soils by cultivation-independent methods based on the retrieval of a *pmoA* gene fragment. The *pmoA* gene codes for the active-site containing subunit of particulate methane monooxygenase (pMMO), an enzyme which is unique and nearly universal to MB. Several different *pmoA* sequence types have been detected that were presumed to represent uncultivated MB in upland soils. Biomarker labeling experiments using

$^{13}\text{CH}_4$ or $^{14}\text{CH}_4$ have supported the view that MB harbouring *pmoA* sequences of upland soil cluster α (USC α) or upland soil cluster γ (USC γ) are most likely involved in atmospheric methane consumption in upland soils (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003).

However, *pmoA* gene fragments of recognized genera of MB have also been retrieved from many upland soils, indicating the presence of strains of the genera *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, and *Methylocapsa* (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Horz *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). Moreover, MB belonging to the genera *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis* and *Methylocella* have been isolated from upland soils (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield *et al.* 2003, Fjellbirkeland *et al.* 2001, Jensen *et al.* 1998a, Øvreås *et al.* 1998). Of these, *Methylocella silvestris* BL2 failed to oxidize atmospheric methane (Dunfield *et al.* 2003), and the other isolates were not tested for their ability to oxidize atmospheric methane. It is almost universally assumed that cultivated MB are not capable of surviving and remaining active at 1.75 ppmv methane, but in fact this has not been systematically tested for many strains, and the assumption rests on a few studies by the group of King (King 1993, Roslev and King 1994, Schnell and King 1995). In these studies the type strains *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas rubra*, and *Methylomicrobium album*, which were isolated from ecosystems with high methane supply, were not able to grow or maintain long-term activity at atmospheric methane concentrations. These observations supported the idea of the existence of uncultivated specialized atmospheric methane-oxidizing bacteria.

Detailed studies on *Methylocystis* sp. LR1 revealed that at least some cultivated MB may be more oligotrophic than previously believed (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield and Conrad 2000). *Methylocystis* sp. LR1 was cultivated on methane mixing ratios < 275 ppmv of methane and displayed $K_{m(\text{app})}$ values of 56 – 186 nM under these conditions. Cultivation under higher methane mixing ratios (up to 1 % of methane) led to an increase in the $K_{m(\text{app})}$ towards values determined for other strains of MB. Thus, the $K_{m(\text{app})}$ of at least some MB seems to exhibit large variation, depending on the methane supply. Despite the variation in $K_{m(\text{app})}$ in strain LR1, the specific affinity (a_s^0) remained nearly constant under the different methane mixing ratios. The specific affinity is a pseudo first-order rate constant and corresponds to the initial slope of a kinetic hyperbolic curve. This value directly indicates how fast limited substrate is consumed (Button 1993). The constant a_s^0 of *Methylocystis* sp. LR1 grown under different methane mixing ratios indicated that the ability of the cells to

oxidize atmospheric methane remained the same, regardless of the methane concentration under which they were incubated. The "high-affinity" activity (low $K_{m(\text{app})}$) was postulated to be an artifact produced by reductant limitation of cells, and not a physiological adaptation.

In the present study we isolated MB from different upland soils and compared the oligotrophic ability of these isolates to that of methanotrophic reference strains isolated from ecosystems with higher methane concentrations. We presumed that specific affinity (a_s^0) rather than the $K_{m(\text{app})}$ would best describe the oligotrophic ability. Specific affinity has been described as "the best available index of nutrient collection ability" (Button 1993).

Materials and Methods

Reference bacterial strains. *Methylococcus capsulatus* Bath (NCIMB 11853), *Methylomicrobium album* BG8 (NCIMB 11123), *Methylobacter luteus* (NCIMB 11914), *Methylosinus trichosporium* OB3b (NCIMB 11131), *Methylocystis* sp. LR1, *Methylocystis* sp. SC2, and *Methylocaldum* sp. E10a were cultivated on nitrate mineral salt medium (medium 1a; Heyer *et al.* 1984), as were the isolates obtained in this study. *Methylocapsa acidiphila* B2^T (NCIMB 13765) was cultivated on medium M2 without nitrate (Dedysh *et al.* 2002). Cultures were maintained by periodic transfer once per month.

Isolation of methanotrophic bacteria. Soil samples E 5FB, VA DWT, VA DFT, MF, E L6, E 20, and GE BF were used for enrichment and isolation of methanotrophic bacteria. These soils were chosen based on methane oxidation activity and the community of MB, which had been characterized by cultivation-independent methods (Knief *et al.* 2003). MB were isolated using the method of Heyer *et al.* (1984 and 2002). Briefly, a serial 10× dilution series of the soil samples was made in mineral salts medium with nitrate or ammonia as source for nitrogen (medium 10 or medium 1a, respectively). Tubes were incubated at 30 °C in closed glass chambers containing a gas mixture of 20 % (v/v) methane, 5 % (v/v) CO₂, and 75 % (v/v) air over a maximum period of 18 months. Cell material of positive dilutions was streaked on solidified medium for the further isolation of MB. Purity of the cultures was verified by phase-contrast microscopy.

A pre-enrichment of MB was performed in soil samples VA DFT, MF, VA DWT, and E 5FB. Twenty-five-gram amounts of sieved soil were incubated in 120-ml flasks. These were sealed with rubber butyl septa and methane injected into the headspace. 1,000 ppmv of methane was added to the soil samples during the first 79 days of incubation and 10,000 ppmv after this. Methane was added each time after it had been consumed or after flushing the headspace with air to prevent O₂ limitation.

After 286 days of incubation, the methanotrophic community was characterized by cultivation-independent detection of *pmoA* gene fragments, exactly as described in Knief *et al.* (2003). Briefly, DNA was extracted from 0.5 g of soil with the Fast DNA SPIN Kit (BIO 101, La Jolla, CA, USA) and DNA extracts were purified with polyvinylpolypyrrolidone and a QIAquick PCR Purification KitTM (Qiagen, Hilden, Germany). The *pmoA* gene fragment was amplified with primers of Holmes *et al.* (1995) and Costello and Lidstrom (1999). Mixed

PCR products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and distinct DGGE bands were excised, reamplified, and sequenced.

For the further enrichment of MB, soil crumbs were spread on plates of diluted or undiluted medium 1a or 10 (pH 7), or added to 10-fold diluted liquid mineral salt medium. MB were isolated as described by Heyer *et al.* (1984 and 2002).

Molecular analyses of MB. DNA was extracted from cells that were grown on agar plates, and fragments of the 16S rRNA, *pmoA*, *mmoX* and the *mxoF* genes were amplified as described by Heyer *et al.* (2002). Sequencing of the obtained gene fragments was done on a ABI Prism 377 DNA sequencer as described by Knief *et al.* (2003). The *pmoA2* gene was amplified using the primers A206f and A703b of Tchawa Yimiga *et al.* (2003).

Methane uptake kinetics of MB cultivated under high methane concentrations. MB were cultivated in 100 ml of medium 1a in 500-ml serum vials sealed with butyl rubber septa. The medium was inoculated with cells from exponentially grown cultures. Cells were cultivated under 10 % (v/v) of methane in the gas phase on a rotary shaker at 180 rpm and at 25 °C. After 1 to 1.5 days of incubation the headspace was flushed well with air and 10 % of methane again added. During the whole incubation period of 2 days, the methane mixing ratio did not decrease below 4000 ppmv. *Methylocapsa acidiphila* B2 was the only exception to this procedure; it was grown in medium M2 for 8 days.

The cell density of exponentially grown cultures was determined in a Helber counting chamber. The cultures were diluted to 5×10^7 cells ml⁻¹ and 2.5×10^7 cells ml⁻¹ with 0.5 mM phosphate buffer and 1.25 mg l⁻¹ of chloramphenicol was added to prevent further cell growth. Three-milliliter amounts of these cell suspensions were added to 38-ml tubes, which were sealed gas-tight with butyl rubber septa. Methane was added to final mixing ratios of 50 to 100 ppmv or 0.5 %. The tubes were fixed in a horizontal position on a rotary shaker and shaken at 250 rpm. The decrease of methane in the headspace was followed over time using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) as described previously (Knief *et al.* 2003).

A linear decrease of methane versus time in cultures incubated under 0.5 % of methane was used to estimate maximum apparent methane oxidation rates ($V_{\max(\text{app})}$). Incubation under 50 to 100 ppmv of methane resulted in an exponential decrease of methane, from which the specific affinity a_s^0 (first-order uptake rate constant) was calculated by using the least-squares iterative fitting procedure of Origin 6.1 (Microcal Software, Inc. Northampton, Maine). The

apparent half saturation constant ($K_{m(\text{app})}$) was calculated as $K_{m(\text{app})} = V_{\text{max}(\text{app})}/a^0$. Multiplication by the Oswald constant (0.03395 at 25 °C; Wilhelm *et al.* 1977) gave the $K_{m(\text{app})}$ as methane concentration in water.

Long-term incubation of MB under low methane mixing ratios. Exponentially grown cultures of MB were diluted to 5×10^6 cells ml⁻¹ in medium 1a (or medium M2 for *Methylocapsa acidiphila* B2). Cell suspensions (10 ml) were incubated in 120-ml serum vials on a rotary shaker (250 rpm) under methane mixing ratios of 1000, 100, 10, and 1.8 ppmv of methane at 25 °C. The flasks were connected to a 54 l gas reservoir (2 × 27 l Plastigas bags; Roth, Karlsruhe, Germany) by tygone and iso-versinic tubes. The gas flow was controlled by gas flowmeters (0.2 – 2.0 l min⁻¹, Fuergut, Eichstetten, Germany) that were coupled to membrane pumps (FM1101 F, Fuergut). The gas phase in the flasks was replaced 2 – 4 times each day, depending on the activity of the cultures. Sterility of the cultures was ensured by passing the in- and out-flowing air through autoclaved cotton wool. Each culture could be disconnected from the system via two-way stopcocks, in order to measure methane oxidation activity in closed vials.

The methane oxidation rate constants were determined weekly. The decrease of methane in the gas phase was followed by gas chromatography over 8 to 50 h (3 – 6 datapoints). The log-linear decrease of methane mixing ratios versus time was used to calculate methane oxidation rate constants.

Results

Isolation of methanotrophic bacteria from upland soils. Seven different upland soils were chosen for the enrichment and isolation of MB (E 20, E 5FB, E L6, MF, VA DWT, VA DFT, and GE BF). The methane oxidation activity of each of these soils has been characterized in detail (Knief *et al.* 2003). With the exception of sample E 20, which was not active, all soils consumed atmospheric methane at rates of 18 – 470 pmol of CH₄ (g dry soil)⁻¹ h⁻¹. The soils displayed a high-affinity methane oxidation activity with $K_{m(\text{app})}$ values in the nanomolar range. The community of MB had been characterized by cultivation-independent methods in these soils, based on the detection of a *pmoA* gene fragment (Knief *et al.* 2003). Besides *pmoA* sequences of USC α and USC γ , which are presumed to belong to uncultivated MB of the Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, respectively (Knief *et al.* 2003), *pmoA* sequences of *Methylosinus*, *Methylocystis*, and *Methylocaldum* were detected in some soil samples. In soil sample GE BF, neither *pmoA* nor *mmoX* gene fragments were detected, although these soils consumed methane. Strains of *Methylocystis* (DWT, L6), *Methylosinus* (BF1), and *Methylocaldum* (5FB, E10a) were successfully isolated from some of these soils. Additionally, an enrichment culture with a *Methylobacter* sp. (5FB) as the only detectable methanotrophic strain was obtained.

In a second enrichment strategy, MB were preenriched in the soil under elevated methane mixing ratios without the addition of mineral salts medium, and soil crumbs were later spread on solidified media or added to diluted liquid media with ammonia or nitrate as source for nitrogen. After 300 d of preincubation, the methanotrophic community was characterized again by retrieval of *pmoA* gene fragments from the soil samples. In preincubated samples VA DWT and E 5FB, which showed an exponential increase in $V_{\text{max}(\text{app})}$ over the incubation period, *PmoA* sequences related to *Methylocystis* spp. *pmoA1*, and *pmoA2* and to the sequence of uncultivated bacteria (Cluster 2; Knief *et al.* 2004) were detected (Fig. 1), while the initially detected USC γ sequences were no longer detectable. In soil samples MF and VA DFT, which did not show an increased $V_{\text{max}(\text{app})}$ at the end of the incubation period, the community composition remained unchanged. *Methylocystis* sp. 5FB1 and *Methylocystis* sp. 5FB2 were isolated from the preenriched soil sample E 5FB.

Characterization of methanotrophic isolates. Methanotrophic isolates were identified by their morphology and phylogenetic sequence analysis of the 16S rRNA gene and the functional genes *pmoA*, *mmoX*, and *mxoF*. Based on 16S rRNA sequences, all isolates were

closely related (> 98 % sequence identity) to cultivated MB. Morphological characterizations by phase-contrast microscopy were in agreement with the results of this phylogenetic analysis. The identities of all isolates were confirmed by a PmoA-based phylogenetic analysis (Fig. 1). The PmoA sequence of *Methylocaldum* sp. E10a was identical to some PmoA sequences detected in upland soils (Knief *et al.* 2003). The PmoA sequences of *Methylocystis* sp. L6 and *Methylocystis* sp. DWT were identical to that of *Methylocystis* sp. LR1 (Dunfield *et al.* 1999), and to many strains isolated from diverse habitats (Heyer *et al.* 2002). *Methylocystis* sp. L6 harboured a *pmoA2* gene with > 99 % amino acid identity to that of *Methylocystis* sp. LR1.



Figure 1: Phylogenetic tree showing the relationship of PmoA sequences of the isolates to PmoA and AmoA sequences of cultivated and uncultivated bacteria. PmoA sequences of methane-preincubated soil samples VA DWT and E 5FB are included (labeled as enrichment). The tree was calculated based on 140 amino acid positions with the treepuzzle algorithm using the Jones-Taylor-Thornton evolutionary model (Jones *et al.* 1992). Black circles indicate branches that were recovered by 90 % of 10,000 reconstructed trees, white circles indicate branches with 80 % recovery. AmoA sequences of ammonia-oxidizing bacteria were set as an outgroup. The bar represents 0.10 change per position.

The soluble form of MMO was present in *Methylosinus* sp. BF1 and *Methylocystis* sp. 5FB2 but was not detected in other isolates using a PCR-based test. A *mxoF* gene fragment could be amplified in all isolates with the exception of *Methylocystis* sp. 5FB1, using the primers published by McDonald *et al.* (1997a). Phylogenetic trees based on the 16S rRNA

sequence and available *mmoX* and *mxoF* gene fragments reflected the phylogenetic position of the isolates as given and PmoA based tree (trees not shown). PmoA sequences of the isolates *Methylocystis* sp. DWT and *Methylocystis* sp. 5FB1 were identical to sequences recovered from the respective soils VA DWT and E 5FB after preincubation with methane (Fig. 1), but none of the PmoA sequences of the isolated *Methylocystis* spp., *Methylosinus* sp., and *Methylocaldum* spp. were detected in the unincubated soil samples.

Methane oxidation kinetics of methanotrophic bacteria. The methane oxidation kinetics of different methanotrophic strains were characterized in cultures growing exponentially under high methane supply. Gas phase methane concentrations decreased from 10 – 12 % to not below 0.4 % during the exponential growth phase. The methane uptake kinetic was characterized by the specific affinity a_s^0 , $V_{\max(\text{app})}$, and $K_{m(\text{app})}$ in 10 strains of MB representing 6 different genera. The specific affinity corresponds to the initial slope of a Michaelis-Menten hyperbolic curve, or a pseudo first-order rate constant, which was determined from the logarithmic decrease of methane at mixing ratios below 75 ppmv of methane ($\ll K_{m(\text{app})}$). The maximum methane uptake rate ($V_{\max(\text{app})}$) is a pseudo zero-order rate constant, which was calculated from the decrease of methane in incubations with > 0.5 % methane. The $K_{m(\text{app})}$ was calculated from $V_{\max(\text{app})}/a_s^0$. It was important to prevent diffusion limitation in the liquid phase of the cultures or across the air-water interface while the uptake rates were being determined. Diffusion limitation might occur under low methane mixing ratios and would lead to a lower oxidation rate, and thus an underestimation of a_s^0 and an overestimation of $K_{m(\text{app})}$. Since incubations with a cell number reduced by half resulted in methane oxidation rate constants that were also reduced by half in the most active culture, diffusion was not limiting (Fig. 2). Growth of MB during incubations was prevented by addition of chloramphenicol. Incubations with 0.5 % methane showed a linear decrease of methane over time. Thus, further growth of the cultures was also ruled out (Fig. 2).

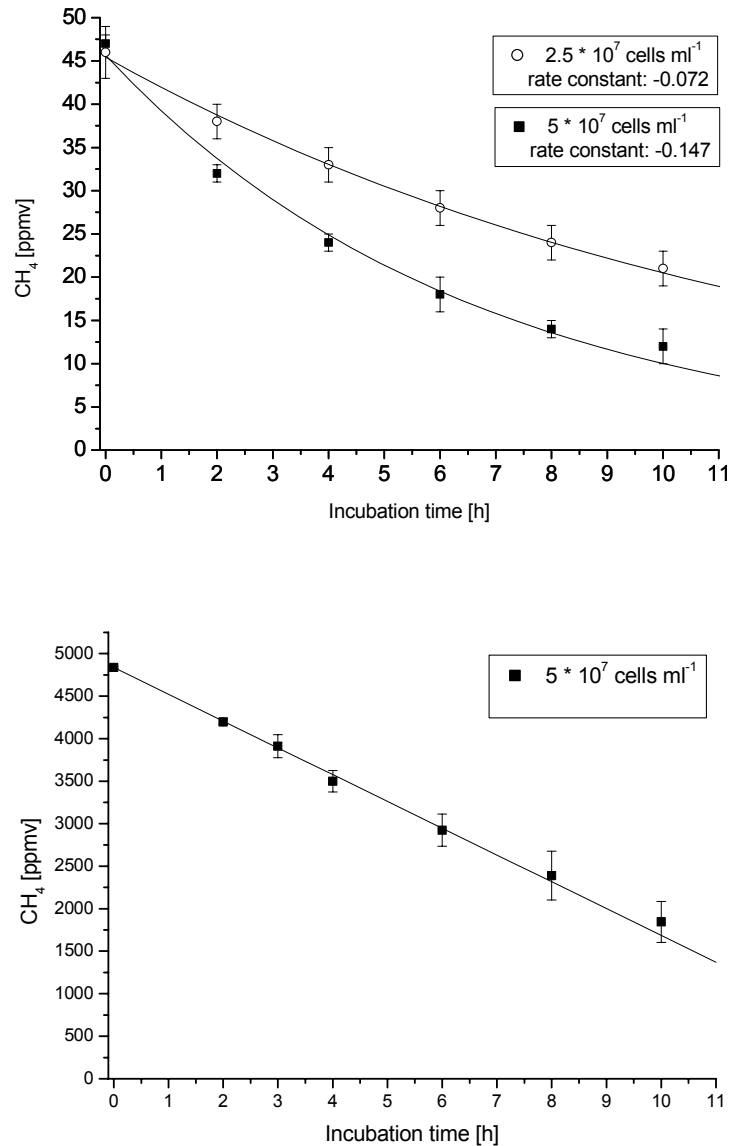


Figure 2: Methane oxidation activity of *Methylocystis* sp. SC2 at 50 ppmv methane (upper panel) and 0.5 % methane (lower panel). 50% reduction of the cell number resulted in an equal reduction of the methane oxidation rate constant at 50 ppmv of methane, indicating that diffusion was not limiting at low methane mixing ratios. Cell-growth at 0.5 % of methane was also excluded, as the oxidation rate did not increase during the incubation period.

The kinetic parameters a_s^0 , $V_{\max(\text{app})}$, and $K_{m(\text{app})}$ of all tested methanotrophic strains were within one order of magnitude (Table 1). The highest values for a_s^0 and $V_{\max(\text{app})}$ were measured for *Methylocystis* sp. SC2, *Methylosinus trichosporium* BF, and *Methylosinus trichosporium* OB3b. The $K_{m(\text{app})}$ was between 2.2 μM (*Methylocystis* sp. DWT) and 10.2 μM (*Methylococcus capsulatus* Bath). The methane uptake kinetics of *Methylosinus trichosporium* BF and *Methylocystis* sp. DWT were each determined twice in separately

grown cultures. The variation of the kinetic parameters within these different trials was smaller than the differences among strains.

Table 1: Kinetic parameters of exponentially grown MB under 10 % methane. Literature data of different pMMO-expressing MB are included.^a

Strain	a_s^0 [$\times 10^{-12}$ l cell ⁻¹ h ⁻¹]	$V_{\max(\text{app})}$ [$\times 10^{-15}$ mol CH ₄ cell ⁻¹ h ⁻¹]	$K_{m(\text{app})}$ [μM]
This study:			
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	5.0 ± 0.25	1.52 ± 0.03	10.2
<i>Methyломicrobium album</i> BG8	9 ± 1.4	1.30 ± 0.07	4.7
<i>Methylobacter luteus</i>	22.5 ± 0.8	2.7 ± 0.21	4.1
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	12 ± 1.7	1.2 ± 0.11	3.4
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	32 ± 1.2	3.3 ± 0.32	3.5
<i>Methylosinus trichosporium</i> BF1, trial 1	31 ± 2.6	5.2 ± 0.73	5.6
<i>Methylosinus trichosporium</i> BF1, trial 2	27 ± 2.4	3.7 ± 0.26	4.7
<i>Methylocystis</i> sp. SC2	34 ± 1.8	3.1 ± 0.30	3.2
<i>Methylocystis</i> sp. LR1	20 ± 1.9	1.5 ± 0.17	2.5
<i>Methylocystis</i> sp. DWT, trial 1	18 ± 1.3	1.2 ± 0.29	2.2
<i>Methylocystis</i> sp. DWT, trial 2	17.1 ± 0.8	1 ± 3.0	3.0
<i>Methylocystis</i> sp. L6	10.6 ± 0.5	1.34 ± 0.03	4.3
Literature:^b			
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath ^c	11.2	7.6	23
<i>Methyломicrobium album</i> BG8 ^d	31.6	6.5	7.0
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2 ^e	2.83	0.2	2.0
<i>Methylosinus trichosporium</i> ^f	6.8	0.4	2.0
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ^g	10.2 – 5.0	2.5 – 9.2	8.3 – 62
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ^h	34.0	6.7	1.0
<i>Methylocystis</i> sp. LR1 (fresh culture) ⁱ	3.1	0.2	2.2
root associated methanotrophic isolates ^h	43.9 – 226	11.8 – 37.3	3.0 – 17
methanotrophic isolate ^j	21.9	6.0	9.3

^a Mean values ± 1 SEM for a_s^0 are based on 4 measurements (duplicates of cell suspensions with 5×10^7 cells ml⁻¹ and 2.5×10^7 cells ml⁻¹). Values for a_s^0 were calculated as liters of gas (standardized to a 1-l total gas volume) per cell per hour. Mean values ± 1 SEM for $V_{\max(\text{app})}$ are based on duplicate measurements (cell suspension with 5×10^7 cells ml⁻¹).

^b Most values of $V_{\max(\text{app})}$ from the literature are converted from [mol mg dry weight⁻¹ min⁻¹] or [mol mg protein⁻¹ min⁻¹] to [mol CH₄ cell⁻¹ h⁻¹] based on a cell dry weight of 2.8×10^{-13} g cell⁻¹ and a protein content of 55 % (parameters for a growing *E. coli* cell [Neidhard *et al.* 1996]). a_s^0 was calculated from $V_{\max(\text{app})}/K_{m(\text{app})}$ based on the solubility of methane in the liquid phase (Oswald-constant 0.03395).

^c Carlsen *et al.* 1991

^d Benstead *et al.* 1998

^e Dedysh *et al.* 2001

^f Joergensen 1985

^g Lontoh and Semrau 1998

^h Calhoun and King 1997

ⁱ Dunfield and Conrad 2000, $V_{\max(\text{app})}$ was recalculated

^j Whalen *et al.* 1990

Methane oxidation activity and growth of MB at low methane mixing ratios. Altogether, 12 isolates and methanotrophic reference strains of 7 methanotrophic genera were chosen for long-term incubation experiments under low methane mixing ratios (Table 2). The first incubation was performed at 1000 ppmv of methane. The incubation procedure was repeated under decreased methane mixing ratios as long as the methane oxidation activity for a certain strain increased or remained stable over several weeks of incubation. During incubation at 1000, 100 and 10 ppmv, the methane mixing ratio did not fall below 50 % of these given ratios. In incubations at 1.8 ppmv the methane mixing ratio did not fall below 1.5 ppmv. A gradual increase in the methane oxidation rate during the incubation period was taken as evidence for growth. The exponential increase or decrease of the first-order rate constant over time was used to calculate μ_a , the first-order growth or decline rate based on increasing or decreasing activity (Table 2). Positive values indicate an increase in activity over time (and thus probably cell growth), while negative values indicate a decrease in activity over time. Growth was confirmed and quantified by cell counts at the beginning and the end of the experiments. Growth rates (μ_c) were calculated based on the results of the cell counts (Table 2).

The tested strains showed different abilities to grow under low methane mixing ratios. *Methylocapsa acidiphila* B2, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylocaldum* sp. E10a and the *Methylobacter* spp. were not able to maintain active methane oxidation when incubated at 1000 ppmv of methane. Activity was reduced > 99 % within 4 – 5 weeks of incubation (Table 2). Strains of the genera *Methylomicrobium*, *Methylocystis*, and *Methylosinus* grew with rates of $\mu_c = 0.09 - 0.31 \text{ d}^{-1}$ under 1000 ppmv of methane. The first order rate constant of these strains increased with rates of $\mu_a = 0.5 \text{ d}^{-1} - 1.4 \text{ d}^{-1}$. At 100 ppmv of methane, the methane oxidation rate constant of *Methylocystis* sp. L6 and *Methylosinus trichosporium* OB3b declined over time but four other strains grew or maintained activity. At 10 ppmv of methane, only *Methylocystis* sp. LR1 and *Methylocystis* sp. DWT oxidized methane with a stable or slightly increasing oxidation rate constant over the entire incubation periods of 21 weeks and 14 weeks, respectively. The growth rate (μ_c) of *Methylocystis* sp. LR1 and *Methylocystis* sp. DWT decreased with decreasing methane mixing ratios, as did the rate of methane oxidation activity (μ_a).

Table 2: Pseudo first-order rate constants for methane oxidation by different strains of MB incubated under low methane mixing ratios, the resulting growth rates based on activity (μ_a), and growth rates calculated based on cell counts (μ_c).

Incubation conditions/Strain	initial rate constant ^a [$\times 10^{-6}$ l ml culture ⁻¹ h ⁻¹]	final rate constant [$\times 10^{-6}$ l ml culture ⁻¹ h ⁻¹]	incubation period [weeks]	μ_a : growth rate constant of activity [d ⁻¹]	μ_c : growth rate constant of cell division [d ⁻¹]
1000 ppmv (1,390 nM)					
<i>Methylocystis</i> sp. LR1	566 ± 23	4576 ± 439	3	0.8 ± 0.14	0.25 ± 0.01
<i>Methylocystis</i> sp. DWT	480 ± 37	4646 ± 88	3	1.39 ± 0.06	0.31 ± 0.02
<i>Methylocystis</i> sp. L6	132 ± 14	1241 ± 264	8	0.6 ± 0.17	0.10 ± 0.01
<i>Methylosinus trichosp.</i> OB3b	300 ± 10	3242 ± 325	5	0.466 ± 0.001	0.085 ± 0.007
<i>Methylosinus trichosp.</i> BF1	419 ± 24	1504 ± 186	5	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.01
<i>Methylomicrobium album</i> BG8	623 ± 14	7473 ± 194	3	1.12 ± 0.06	0.259 ± 0.007
<i>Methylocapsa acidiphila</i> B2	106 ± 2.4	13 ± 25	4	-0.29 ± 0.12	
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	82 ± 3.3	< 1	4	-1.8 ± 0.72	
<i>Methylobacter luteus</i>	105 ± 12	< 1	5	-1.6 ± 0.30	
<i>Methylobacter</i> sp. 5FB ^b	240 ± 8.1	< 1	4	-2.43 ± 0.04	
<i>Methylocaldum</i> sp. E10a	49 ± 5.6	7 ± 1	4	-0.29 ± 0.07	
100 ppmv (139 nM)					
<i>Methylocystis</i> sp. LR1	325 ± 100	1664 ± 84	7	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02
<i>Methylocystis</i> sp. DWT	237 ± 63	2128 ± 439	5	0.28 ± 0.05	0.16 ± 0.02
<i>Methylocystis</i> sp. L6	40 ± 27 (43 ± 7.7)	< 1	10	-0.46 ± 0.06	
<i>Methylosinus trichosp.</i> OB3b ^c	375 ± 2.7 (539 ± 9.1)	256 ± 6.0	10	-0.079 ± 0.003	
<i>Methylosinus trichosp.</i> BF1 ^c	237 ± 36 (405 ± 44)	400 ± 22	10	0.02 ± 0.03	
<i>Methylomicrobium album</i> BG8 ^c	201 ± 4.6	1245 ± 202	13	0.17 ± 0.02	≤ 0
10 ppmv (13.9 nM)					
<i>Methylocystis</i> sp. LR1 ^c	198 ± 47 (472 ± 51)	509 ± 1.4	21	0.02 ± 0.02	0.023 ± 0.002
<i>Methylocystis</i> sp. DWT ^c	74 ± 3.6 (233 ± 37)	264 ± 37	14	0.03 ± 0.02	
<i>Methylosinus trichosp.</i> OB3b	255 ± 10	13 ± 8.4	17	-0.14 ± 0.02	
<i>Methylosinus trichosp.</i> BF1 ^c	243 ± 24	60 ± 55	14	-0.15 ± 0.07	
<i>Methylomicrobium album</i> BG8	194 ± 6.3	< 1	10	-0.5 ± 0.15	
1.8 ppmv (2.5 nM)					
<i>Methylocystis</i> sp. LR1 ^c	88 ± 2.4 (272 ± 23)	33.2 ± 0.7	5	-0.16 ± 0.03	
<i>Methylocystis</i> sp. DWT ^{c,d}	109 ± 12	141	6	0.035	
<i>Methylosinus trichosp.</i> OB3b ^c	103 ± 9.4	8 ± 5.9	6	-0.24 ± 0.02	
<i>Methylosinus trichosp.</i> BF1	135 ± 13	< 1	5	-0.5 ± 0.10	

^a The rate constants of some strains increased within the 1st to 4th week of incubation and then either declined or levelled off. The maximum rate constant is given in brackets.

^b enrichment culture.

^c preliminary results, incubation is still ongoing or being repeated; cell division rates of cultures with increasing rate constant will be calculated at the end of the experiment.

^d one of the duplicates lost.

An intense formation of exospores was observed for *Methylosinus trichosporium* BF and *Methylosinus trichosporium* OB3b when grown under 1000 ppmv of methane. After an incubation period of 5 weeks at 1000 ppmv of methane, approximately 10 % of the *Methylosinus trichosporium* BF cells appeared as typical rod-shaped cells while 90 % were of coccoidal or cup-shaped form. These exospores were excluded from the calculation of cell division rates. Intensive spore formation was also observed at lower methane mixing ratios for these strains. *Methylosinus trichosporium* OB3b was unable to grow at 100 ppmv and

10 ppmv of methane, but maintained a gradually declining methane oxidation activity for several weeks. The rate constant of *Methylosinus trichosporium* BF remained almost constant over 9 weeks of incubation at 100 ppmv, after a twofold increase during the first week of incubation. Under 10 ppmv and 1.8 ppmv of methane, the rate constant (μ_a) gradually decreased.

The *Methylocystis* spp. and *Methylosinus* spp. that had maintained stable or slowly decreasing methane oxidation rates over a prolonged period of time at 10 ppmv of methane, were incubated at the atmospheric methane mixing ratio (1.8 ppmv). After one week of incubation, the rate constants of both *Methylocystis* spp. increased. While the rate constant of *Methylocystis* sp. DWT increased further after the initial week, the rate constant of *Methylocystis* sp. LR1 showed large variation. The general trend was a decrease in activity over 5 weeks of incubation. In this time *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylosinus trichosporium* BF had lost > 92 and 99 % of their initial methane oxidation activity, respectively. The initial rate constant, which was determined after one day of incubation at 1.8 ppmv, was comparable to the initial rate constants under higher methane mixing ratios (Table 2). Atmospheric methane uptake rates, calculated from the initial rate constants at 1.8 ppmv of methane, were between 1.0×10^{-18} mol cell⁻¹ h⁻¹ (*Methylocystis* sp. DWT) and 2.1×10^{-18} mol cell⁻¹ h⁻¹ (*Methylosinus trichosporium* OB3b). Comparable values can be calculated from a_s^0 of cultures grown under 10% of methane (Table 1) (multiplication of a_s^0 by 74 nmol l⁻¹ [= 1.75 ppmv]).

The methane uptake kinetics of some MB were characterized after growth at low methane mixing ratios. The specific affinity values were in the range of $7 - 38 \times 10^{-12}$ l cell⁻¹ h⁻¹ and thus similar to values measured in cultures grown under 10% of methane ($11 - 32 \times 10^{-12}$ l cell⁻¹ h⁻¹; Table 1). The values for a certain strain were not more than 2-fold increased or decreased.

Discussion

Nine strains of MB were isolated from pH-neutral upland soil samples. Four isolates were identified as *Methylocystis* spp. Further isolates belonged to the genera *Methylosinus* and *Methylocaldum*, while *Methylobacter* sp. 5FB was the only detected MB in a methane-consuming enrichment culture. Organisms harbouring *pmoA* sequences of USC α or USC γ are presumed to be the most active and numerically dominant MB in most of the soil samples used in this study (Knief *et al.* 2003), but these MB were not enriched or isolated. Preincubation of the soil samples led to an enrichment of *Methylocystis* spp., which were successfully isolated (Fig. 1). Additional sequences ("Enrichment E 5FB-1" and "Enrichment VA DWT-1"), which were related to sequences of uncultivated bacteria with either PmoA or AmoA (Cluster 2), were detected in the pH-neutral soil samples after enrichment. The growth of these organisms may have been stimulated by methane, but a further enrichment in mineral salts media or on agar plates with methane as sole source for carbon and energy failed to obtain them in pure culture.

The methane uptake kinetics of these isolates from upland soils and of methanotrophic reference strains, originally isolated from ecosystems with a higher methane supply, was characterized during growth under 10 % of methane. There were no obvious differences according to the phylogeny of the strains tested. All methanotrophic strains had similar kinetic values for methane oxidation (Table 1). There were only slight differences in $V_{\max(\text{app})}$ and a_s^0 among the tested strains, and these were all similar to other values from the literature (Table 1). Literature data showed a broader variation, even for single strains. This variation can partly be attributed to the different methods that were used to estimate the kinetic parameters and differences in the cultivation of the MB within different studies. The $K_{m(\text{app})}$ values estimated in this study agreed well with values reported by Joergensen and Degn (1983). They determined $K_{m(\text{app})}$ values of 0.8 – 2 μM for MB by measuring methane uptake via membrane inlet mass spectroscopy, which eliminates measurement artifacts due to phase-transfer limitation. It was not evident from the kinetic values that any particular strain should possess a higher potential to grow on low substrate concentrations over a prolonged period of time (i.e. no strain had a particularly high specific affinity compared to others).

Since it is known that at least some MB grow on lower methane mixing ratios than was initially believed (Dunfield *et al.* 1999, Dunfield and Conrad 2000), the ability of selected MB to maintain or even increase their activity (i.e. to survive and grow) was tested on low methane mixing ratios of 1000 to 1.8 ppmv (Table 2). The tested strains varied in their

response to low methane concentrations. Four of five type I strains lost methane oxidation activity rapidly during incubation at 1000 ppmv of methane. Thus, the threshold methane concentration for maintenance and growth of these strains is $> 1.4 \mu\text{M}$, at least under the conditions used in these experiments. All tested strains of the genera *Methylocystis* and *Methylosinus* were able to grow at 1000 ppmv of methane, although with a significantly decreased growth rate compared to the maximum growth rate under high substrate concentrations (Table 1). While *Methylocystis* sp. L6 was not able to remain physiologically active for long at 100 ppmv of methane, *Methylocystis* sp. LR1 and *Methylocystis* sp. DWT maintained a relatively constant rate of methane oxidation at only 10 ppmv for > 150 d and > 100 d, respectively (Table 2). This indicates that the degree of adaptation to low methane mixing ratios varies not only between different genera but also within one genus. There was no clear indication that MB isolated from upland soils were consistently better adapted to oligotrophic conditions than MB isolated from ecosystems with higher methane supply. However, the two strains of *Methylocystis* that performed best were in fact isolated from upland soils.

Methylocapsa and *Methylocella* have a very low ability to metabolize low methane mixing ratios, although strains of both genera can be found in upland soils (Dunfield *et al.* 2003, Horz *et al.* 2002). *Methylocapsa acidiphila* B2 did not maintain metabolic activity at 1000 ppmv of methane. *Methylocella silvestris* BL2, which was isolated from an upland soil, fails to oxidize methane below a threshold of about 100 ppmv (Dunfield *et al.* 2003). Physiological activity and growth of *Methylocella* sp. cannot be expected at low methane concentrations, since all members of the genus *Methylocella* lack pMMO. Organisms that express sMMO have lower growth yields on methane and a lower affinity for methane than do cells that contain pMMO (Hanson and Hanson 1996). The growth rate of *Methylosinus trichosporium* OB3b was shown to be about 30 % decreased in cells expressing sMMO (Graham *et al.* 1993). This deficiency does not favour survival of sMMO-expressing cells in general, and *Methylocella* spp. in particular, under low methane concentrations.

Low methane concentrations led to intense exospore formation in *Methylosinus* spp. cultures. At 1000 ppmv of methane cell growth was observed, but at lower methane mixing ratios, the number of rod-shaped cells remained constant or decreased. Spore formation was observed and the methane oxidation activity decreased continuously. It has been reported that cells of *Methylosinus* spp. fail to form additional spores or to divide after spore formation, but become granulated and frequently lyse. Unlysed organisms that have formed spores fail to grow when transferred to fresh medium (Whittenbury *et al.* 1970a). In our experiments part of

the population remained physiologically active at 1000 ppmv of methane and was able to reproduce, while other cells of the population contributed to exospore formation. With decreasing methane mixing ratios, exospore formation was induced in an increasing proportion of the population. *Methylosinus trichosporium*, or at least the tested strains, are unlikely candidates for atmospheric methane oxidation. This is confirmed by our observations that two *Methylosinus trichosporium* strains lost all methane oxidation activity within a few weeks at atmospheric methane concentrations.

Transient consumption of atmospheric methane has been observed in a variety of MB strains, but the tested strains neither grew nor maintained long-term activity under these conditions (King 1993). Among the tested strains were *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas rubra*, and *Methylomicrobium album*. The methane oxidation rates of dense cultures (1.9×10^9 cells ml⁻¹) of *Methylomicrobium album* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b decreased to 2 – 12 % of the initial activity within 15 days of incubation at 1.7 ppmv methane (Schnell and King 1995). However, it is obvious that these dense cultures were diffusion-limited, and less than 1.7 ppmv of methane was available for the cells. When cells were sprayed on sand to promote diffusion, they showed 2-fold higher rate constants for atmospheric methane uptake. In another study, starvation of *Methylosinus trichosporium* OB3b under less than 2.5 nM of methane led to a complete loss of activity after 42 days of incubation (Roslev and King 1994). Based on these studies, it has been assumed that known cultivated MB cannot be responsible for the oxidation of atmospheric methane in soils. However, in our tests we observed that there are large differences among strains in their ability to maintain or increase their activity under low methane mixing ratios. The results cited above agree with our observations for *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomicrobium album*, and *Methylosinus trichosporium* spp. However, the methane oxidation capacity of *Methylocystis* sp. DWT remained stable for at least 14 weeks under 10 ppmv of methane and for at least 6 weeks under atmospheric conditions (experiments are ongoing). Growth of *Methylocystis* sp. LR1 was observed at as low as 10 ppmv. These results indicate that some strains of *Methylocystis* are much more oligotrophic than other MB. The adaptation of these strains may be even better under *in situ* conditions. A coculture of *Methylocystis* sp. LR1 and *Variovorax* sp. PB2 grew better under low methane mixing ratios than a pure culture of *Methylocystis* sp. LR1 (preliminary results, Peter F. Dunfield). Cometabolism of additional substrates such as methanol or formate also supports atmospheric methane oxidation (Benstead *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998b). These

findings suggest that it is possible that *Methylocystis* spp. account for atmospheric methane uptake in certain upland soils.

Table 3: Estimated cell numbers necessary to explain atmospheric methane uptake rates in middle European upland soils of different land use.

	Forest (n = 24)	Grassland (n = 10)	Farmland (n = 4)
Atmospheric methane uptake rate:^a [$\times 10^{-12}$ mol CH ₄ g of dry soil ⁻¹ h ⁻¹]			
maximum uptake rate	472	111	7.9
minimum uptake rate	6.0	3.6	1.9
mean uptake rate	74	36	4.1
Cell number necessary to explain the uptake rate:^b [$\times 10^6$ cells g of dry soil ⁻¹]			
maximum uptake rate	349	82	5.8
minimum uptake rate	4.4	2.7	1.4
mean uptake rate	55	27	3.0

^a atmospheric methane uptake rates calculated from a^0_s , published for 38 soils (Knief *et al.* 2003).

^b calculated from the average initial atmospheric methane uptake rates of *Methylocystis* cultures incubated at 1.8 ppmv of methane (1.35×10^{-18} mol cell⁻¹ h⁻¹).

Based on the initial atmospheric methane uptake rates (week 0) of *Methylocystis* spp., we calculated the cell number that would be necessary to explain atmospheric methane uptake rates of different upland soils (Table 3). A minimum of $1.4 - 4.4 \times 10^6$ cells g of dry soil⁻¹ would account for the lowest methane uptake rates of upland soils in Europe. Cell numbers one order of magnitude higher are necessary to explain average methane uptake rates of grassland and forest soils. 3.5×10^8 cells g of dry soil⁻¹ would be necessary to meet the highest atmospheric methane oxidation rate of 4.7×10^{-10} mol CH₄ g dry soil⁻¹ h⁻¹.

Only a few studies have been performed to determine the numbers of MB cells in upland soils. Plate counts estimated 0.7×10^5 cells g of dry soil⁻¹ in arable soil and 9×10^5 cells g of dry soil⁻¹ in woodland and grassland (Willison *et al.* 1997). Bender and Conrad (1992) determined $2.4 - 42 \times 10^5$ cells g of dry soil⁻¹ in different soils, and $0.6 - 10 \times 10^6$ cells g of dry soil⁻¹ were determined by MPN for a meadow soil (Horz *et al.* 2002). In the latter study, cells present in the highest dilutions were identified as *Methylocystis* spp. Similar cell numbers of $1.5 - 4.1 \times 10^6$ cells g of dry soil⁻¹ were determined for MB represented by *pmoA* sequences of USC α and USC γ in two different forest soils by real-time PCR (Kolb *et al.* 2004). Based on table 3, these cell numbers could theoretically account for

methane oxidation in certain upland soils of different land use. There is considerable evidence that uncultivated MB represented by *pmoA* sequences of USC α and USC γ are involved in atmospheric methane oxidation in “upland soils“, and until these organisms are available in pure culture it is difficult to speculate on their specific affinity (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003). However, the calculations with *Methylocystis* are of special interest for arable soils and other soils in which methane oxidation rates are rather low and in which *pmoA* sequences of USC α and USC γ have so-far not been detected (Fjellbirkeland *et al.* 2001, Knief *et al.* 2003).

The specific affinity of *Methylocystis* sp. LR1 remained nearly constant during starvation (Dunfield and Conrad 2000). Similar results were obtained here for other strains of MB that were able to grow on methane mixing ratios ≤ 1000 ppmv. The a_s^0 values of *Methylosinus trichosporium* spp. and *Methylocystis* sp. L6 incubated under 1000 ppmv of methane and *Methylocystis* sp. DWT and *Methylocystis* sp. LR1 incubated under 100 ppmv of methane were in a range of $7 - 32 \times 10^{-12} \text{ l cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$. These values agree well with the theoretically calculated specific affinity for MB in upland soils ($25 \times 10^{-12} \text{ l cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$, calculated from the value given by Conrad [1999]). Thus, the consumption of methane at low concentrations occurred with the same activity regardless of how the cells were incubated. This suggests that changes in the cell architecture or physiology did not occur in response to lowered methane. Furthermore, the specific affinity does not appear to be good measure for the ability of different MB to survive at low methane concentrations.

The growth rates of all methanotrophic strains were decreased at 1000 ppmv (Table 2) compared to the maximum growth rates that have been published for MB. Maximum growth rates of $3.7 - 8.0 \text{ d}^{-1}$ have been published for type I methanotrophs (excluding psychrophilic MB), and rates of $0.3 - 4.8 \text{ d}^{-1}$ for type II methanotrophs (Dedysh *et al.* 2004, Dedysh *et al.* 2002, Dedysh *et al.* 2000, Dunfield *et al.* 2003, Graham *et al.* 1993, Lidstrom 1988, Lontoh and Semrau 1998, Whittenbury *et al.* 1970b, Wise *et al.* 2001). The lowest growth rates in our studies, calculated for *Methylocystis* sp. LR1 incubated at 10 ppmv, were about 0.023 d^{-1} , corresponding to a generation time of 43 days (Table 2). Based on assumed cell densities, cell carbon content, and methane uptake rates, doubling times for MB in upland soils of $> 10 \text{ d}$ were calculated (King 1997). In general, estimates for the generation time of microorganisms in soil and sediment range from 3 h to $> 1 \text{ yr}$ (Morita 1993). Thus, even lower growth rates of *Methylocystis* spp. at lower methane mixing ratios are possible.

Growth rates of type I methanotrophs are in general higher than those of type II methanotrophs. This has led to the assumption that type I methanotrophs outcompete type II

methanotrophs under low methane concentrations. This assumption was confirmed in continuous culture experiments (Graham *et al.* 1993). However, the methane concentrations used in the experiment of Graham *et al.* (1993) were still high (1.7 % [v/v]), compared to the concentrations we tested. Environmental studies have also indicated that type I methanotrophs dominate in environments with low methane concentrations, while type II methanotrophs are more abundant in environments with high methane concentrations (e. g. Hanson and Hanson 1996, Henckel *et al.* 2000b, Macalady *et al.* 2002). Our data indicate the opposite, that the oligotrophic ability of type II methanotrophs is generally higher than of type I methanotrophs, at least in pure culture. Thus, type II methanotrophs should be favoured in systems with constant low-level methane supply such as upland soils. Indeed, cultivation-independent characterizations of the methanotrophic communities in different upland soils have detected *Methylocystis* and *Methylosinus* more often than type I methanotrophs (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). However, conclusions must be drawn carefully, since a certain degree of bias of the methods used to characterize the methanotrophic community *in situ* cannot be excluded.

This study shows that there are large differences in the oligotrophic adaptation among strains and species of MB. While the threshold concentration of methane for growth and maintenance of *Methylosinus* spp. and *Methylocystis* spp. was about 100 ppmv under the given cultivation conditions, the threshold for growth was around 10 ppmv in some *Methylocystis* strains, and these remained active even at 1.8 ppmv of methane over several weeks. These findings clearly demonstrate that at least some cultivated MB are able to grow and to consume methane at much lower concentrations than previously believed. This is of special relevance for soils in which uncultivated putative "high-affinity" methanotrophs, represented by *pmoA* sequences of USC α and USC γ , are not detectable. Many different MB can transiently consume atmospheric methane after being grown on higher levels, and thereby may at least temporarily contribute to atmospheric methane oxidation in soils. Additional methane may be available from anoxic microsites in the soils, from anoxic soil horizons in deeper soil layers or the humus layer, and after temporary flooding (e. g. Adamsen and King 1993, Andersen *et al.* 1998, Conrad 1995, Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Yavitt 1995).

Since there are already large differences in the oligotrophic adaptation of known MB, it is easy to imagine that the postulated uncultivated "high-affinity" MB, which may be represented by MB harbouring *pmoA* sequences of USC α and USC γ , might be even more oligotrophic and able to live on atmospheric methane. These uncultivated MB may not be that

much different physiologically from known *Methylocystis* strains, since the oligotrophic adaptation of these cultivated MB is almost sufficient to allow growth at atmospheric methane concentrations.

References

- Adamsen, A. P. S., and King, G. M.** 1993. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 495-490.
- Andersen, B. L., Bidoglio, G., Leip, A., and Rembges, D.** 1998. A new method to study simultaneous methane oxidation and methane production in soils. *Global Biogeochem. Cycles* **12**: 587-594.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1992. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 261-270.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1993. Kinetics of methane oxidation in oxic soils. *Chemosphere* **26**: 687-696.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1994a. Microbial oxidation of methane, ammonium and carbon monoxide, and turnover of nitrous oxide and nitric oxide in soils. *Biogeochem.* **27**: 97-112.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1994b. Methane oxidation activity in various soils and freshwater sediments: Occurrence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain-size fractions. *J. Geophys. Res. Atmos.* **99**: 16531-16540.
- Benstead, J., and King, G. M.** 1997. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 333-340.
- Benstead, J., King, G. M., and Williams, H. G.** 1998. Methanol promotes atmospheric methane oxidation by methanotrophic cultures and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1091-1098.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.
- Button, D. K.** 1993. Nutrient-limited microbial growth kinetics: overview and recent advances. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**: 225-235.
- Calhoun, A., and King, G. M.** 1997. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3051-3058.
- Carlsen, H. N., Joergensen, L., and Degn, H.** 1991. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 124-127.
- Conrad, R.** 1984. Capacity of aerobic microorganisms to utilize and grow on atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄). In: Klug, MG and Reddy, CA, eds. Current perspectives in microbial ecology. Washington D.C.: American Society for Microbiology. 461-467.
- Conrad, R.** 1995. Soil microbial processes involved in production and consumption of atmospheric trace gases. *Adv. Microb. Ecol.* **14**: 207-250.
- Conrad, R.** 1997. Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere. In: Helas, G, Slanina, J and Steinbrecher, R, eds. Amsterdam: SBP Academic Publ. 27-44.
- Conrad, R.** 1999. Soil microorganisms oxidizing atmospheric trace gases (CH₄, CO, H₂, NO). *Ind. J. Microbiol.* **39**: 193-203.
- Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Czepiel, P. M., Crill, P. M., and Harriss, R. C.** 1995. Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soils. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **100**: 9359-9364.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Bares, A. M., Panikov, N. S., and Tiedje, J. M.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969.

- Dedysh, S. N., Horz, H.-P., Dunfield, P. F., and Liesack, W. 2001. A novel *pmoA* lineage represented by the acidophilic methanotrophic bacterium *Methylocapsa acidiphila* B2. *Arch. Microbiol.* **177**: 117-121.
- Dedysh, S. N., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Liesack, W., and Tiedje, J. M. 2002. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 251-61.
- Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., and Zavarzin, G. A. 2004a. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 151-156.
- Dunfield, P. F., and Knowles, R. 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3129-3135.
- Dunfield, P. F., E. Topp, C. Archambault, and R. Knowles. 1995. Effect of nitrogen fertilizers and moisture content on CH₄ and N₂ fluxes in a humisol: measurements in the field and intact soil cores. *Biogeochem.* **29**:199-222.
- Dunfield, P. F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R., and Conrad, R. 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1009-1014.
- Dunfield, P. F., and Conrad, R. 2000. Starvation alters the apparent half-saturation constant for methane in the type II methanotroph *Methylocystis* strain LR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4136-4138.
- Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., A., T. Y., and Dedysh, S. N. 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1231-1239.
- Fjellbirkeland, A., Torsvik, V., and Øvreås, L. 2001. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxoF* and 16S rDNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 209-217.
- Frenzel, P. 2000. Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *Adv. Microb. Ecol.* **16**: 85-114.
- Graham, D. W., Chaudhary, J. A., Hanson, J. S., and Arnold, R. G. 1993. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. *Microb. Ecol.* **25**: 1-17.
- Gulledge, J., and Schimel, J. P. 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH₄ oxidation in soil and mechanism of NH₄⁺ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4291-4298.
- Hanson, R. S., and Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- Henckel, T., Roslev, P., and Conrad, R. 2000b. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.* **2**: 666-679.
- Heyer, J., Malashenko, Y., Berger, U., and Budkova, E. 1984. Verbreitung methanotropher Bakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 725-744.
- Heyer, J., Galchenko, V. F., and Dunfield, P. F. 2002. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* **148**: 2831-46.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- Holmes, A. J., Roslev, P., McDonald, I. R., Iversen, N., Henriksen, K., and Murrell, J. C. 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.
- Horz, H.-P., Raghubanshi, A. S., Heyer, J., Kammann, C., Conrad, R., and Dunfield, P. F. 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 247-257.

- Jensen, S., Øvreås, L., Daae, F. L., and Torsvik, V. 1998a. Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 17-26.
- Jensen, S., Prieme, A., and Bakken, L. 1998b. Methanol improves methane uptake in starved methanotrophic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1143-1146.
- Jensen, S., Holmes, A. J., Olsen, R. A., and Murrell, J. C. 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**: 282-289.
- Joergensen, L. 1985. Methane oxidation by *Methylosinus trichosporium* measured by membrane-inlet mass spectrometry. In R. K. Poole and C. S. Dow eds., *Microbial gas metabolism: mechanistic, metabolic and biotechnological aspects*. Academic Press, Orlando. 287-294.
- Joergensen, L., and Degn, H. 1983. Mass spectrometric measurements of methane and oxygen utilization by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 331-335.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* **8**: 275-282.
- Kammann, C., Grünhage, L., Jäger, H.-J., and Wachinger, G. 2001. Methane fluxes from differentially managed grassland study plots: the important role of CH₄ oxidation in grassland with a high potential for CH₄ production. *Environ. Pollut.* **115**: 261-273.
- King, G. M. 1993. Ecophysiological characteristics of obligate methanotrophic bacteria and methane oxidation in situ. In: Murrell, JC and Kelly, DP, eds. *Microbial growth on C₁-compounds*. Andover: Intercept. 303-313.
- King, G. M. 1997. Responses of atmospheric methane consumption by soils to global climate change. *Global Change Biology* **3**: 351-362.
- Knief, C., Kolb, S., Bodelier, P. L. E., Lipski, A., Dunfield, P. F. 2004. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. in preparation.
- Knief, C., Lipski, A., and Dunfield, P. F. 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6703-14.
- Kolb, S., Knief, C., Dunfield, P. F., Conrad, R. 2004. Quantitative evidence for oxidation of atmospheric methane by uncultivated methanotrophic bacteria in forest soils. in preparation.
- Lidstrom, M. E. 1988. Isolation and characterization of marine methanotrophs. *Antonie van Leeuwenhoek* **54**: 189-199.
- Lontoh, S., and Semrau, J. D. 1998. Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1106-1114.
- Macalady, J. L., A. M. S. McMillan, A. F. Dickens, S. C. Tyler, and K. M. Scow. 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environ. Microbiol.* **4**:148-157.
- McDonald, I. R., and Murrell, J. C. 1997a. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3218-3224.
- Megraw, S. R., and Knowles, R. 1987. Methane production and consumption in a cultivated humisol. *Biol. Fert. Soils* **5**: 56-60.
- Morita, R. Y. 1993. Bioavailability of energy and the starvation state. In: Kjelleberg, S, ed. *Starvation in Bacteria*. New York: Plenum Press. 1-23.
- Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F. L., and Torsvik, T. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2739-2742.

- Reay, D. S., Radajewski, S., Murrell, J. C., McNamara, N., and Nedwell, D. B. 2001. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1613-1623.
- Roslev, P., and King, G. M. 1994. Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2602-2608.
- Schnell, S., and King, G. M. 1995. Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 285-294.
- Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochem.* **42**: 23-51.
- Steinkamp, R., Zimmer, W., and Papen, H. 2001. Improved method for detection of methanotrophic bacteria in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* **42**: 316-322.
- Tchawa Yimga, M., Dunfield, P. F., Ricke, P., Heyer, J., and Liesack, W. 2003. Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its expression in *Methylocystis* strain SC2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5593-5602.
- Whalen, R. T., and Reeburgh, W. S. 1990. Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature* **346**: 160-162.
- Whalen, S. C., and Reeburgh, W. S. 1996. Moisture and temperature sensitivity of CH₄ oxidation in boreal soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1271-1281.
- Whittenbury, R., Davies, S. L., and Davey, J. F. 1970a. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 219-226.
- Whittenbury, R., Phillips, K. C., and Wilkinson, J. F. 1970b. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 205-218.
- Wilhelm, E., Battino, R., and Wilcock, R. J. 1977. Low pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* **77**: 219-262.
- Willison, T. W., O'Flaherty, M. S., Tlustos, P., Goulding, K. W. T., and Powlson, D. S. 1997. Variations in microbial populations in soils with different methane uptake rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 95-90.
- Wise, M. G., McArthur, J. V., and Shimkets, L. J. 2001. *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 611-621.
- Yavitt, J. B., Downey, D. M., Lang, G. E., and Sextone, A. J. 1990. Methane consumption in two temperate forest soils. *Biogeochem.* **9**: 39-52.
- Yavitt, J. B., Fahey, T. J., and Simmons, J. A. 1995. Methane and carbon dioxide dynamics in a northern hardwood ecosystem. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**: 796-804.

4 Zusammenfassende Diskussion

„Upland soils“ sind als Senke für atmosphärisches Methan im globalen Methan-Kreislauf von großer Bedeutung. Die Methanaufnahme in diesen Böden ist auf die Aktivität methanotropher Bakterien zurückzuführen. Während die abiotischen Faktoren, die den Prozess der Methanaufnahme in diesen Böden beeinflussen, sehr gut untersucht sind, sind die für den Prozess verantwortlichen MB nur ansatzweise identifiziert. Bereits vorhandene Studien belegen, dass sowohl Vertreter der bekannten Gattungen von MB als auch nicht-kultivierte Bakterien in „upland soils“ vorkommen. Es ist jedoch unklar, inwieweit diese nachgewiesenen MB tatsächlich am Prozess der Oxidation atmosphärischen Methans beteiligt sind. Von entscheidender Bedeutung dafür ist die Fähigkeit, unter der niedrigen Methankonzentrationen der Atmosphäre zumindest einen Erhaltungsstoffwechsel aufrecht erhalten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, um die an der Oxidation atmosphärischen Methans beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren. Die Diversität MB in „upland soils“ wurde erfasst, indem die Gilde Methan-oxidierender Bakterien in verschiedensten „upland soils“ durch kultivierungs-unabhängige Methoden charakterisiert wurde. In einem zweiten Schritt wurden durch $^{13}\text{CH}_4$ -Markierungsexperimente die physiologisch aktiven MB in ausgewählten Bodenproben identifiziert. Neben diesen kultivierungs-unabhängigen Ansätzen wurde die Fähigkeit zur Oxidation atmosphärischen Methans in Reinkulturen verschiedener Gattungen von MB überprüft.

4.1 Diversität methanotropher Bakterien in „upland soils“

Die Diversität methanotropher Bakterien in „upland soils“ wurde anhand kultivierungs-unabhängiger Methoden untersucht. Ein Abschnitt des *pmoA*-Gens wurde aus DNA-Extrakten der jeweiligen Bodenproben amplifiziert, die verschiedenartigen PCR-Produkte wurden über DGGE separiert und durch vergleichende Sequenzanalyse identifiziert. Eine derartige Charakterisierung der Gilde der MB wurde für insgesamt 58 Bodenproben durchgeführt. Auf diese Weise wurde nicht nur die Diversität der MB in „upland soils“ erfasst, sondern es konnten mögliche Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Gilde der MB, der Methan-Oxidationsaktivität und den Standortfaktoren analysiert werden. Dazu zählten einerseits chemische Bodenparameter wie pH, Wasser- und Ammonium-Gehalt, andererseits die Landnutzung und die Pflanzenbedeckung des Standortes.

4.1.1 Verbreitung bekannter Gattungen methanotropher Bakterien in „upland soils“

Die Charakterisierung der Gilde der MB belegt, dass MB verschiedener Gattungen in „upland soils“ vorkommen. In etwa der Hälfte der analysierten Bodenproben wurden *pmoA*-Gene nachgewiesen, die das Vorkommen der Gattung *Methylocystis* belegen und somit für die weite Verbreitung der Stämme dieser Gattung in den verschiedensten „upland soils“ sprechen. Weitere in den Bodenproben detektierte *pmoA* Gene beweisen das Vorkommen von MB der Gattungen *Methylocaldum*, *Methylosinus* und *Methylobacter* in „upland soils“ (Abb. 4.1). *PmoA*-Sequenzen der Gattungen *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus* oder *Methylocapsa* wurden ebenfalls in „upland soils“ nachgewiesen, sie wurden jedoch nicht in den hier untersuchten Böden detektiert (Bourne *et al.* 2001, Horz *et al.* 2002, Reay *et al.* 2001). Somit wurden von den 11 beschriebenen Gattungen von MB 8 Gattungen durch kultivierungs-unabhängige Methoden in „upland soils“ nachgewiesen. Die Isolation von *Methylocella silvestris* aus einem sauren Waldboden deutet darauf hin, dass auch diese Gattung in „upland soils“ vorkommt (Dunfield *et al.* 2003). Durch kultivierungs-unabhängige Methoden über das *mmoX*-Gen wurde diese Gattung jedoch bislang in keinem Boden nachgewiesen.

4.1.2 Verbreitung unbekannter Methan-oxidierender Bakterien

In mehr als 85 % aller analysierten Bodenproben wurden Sequenzen detektiert, die auf verschiedene Taxa unkultivierter Methan-oxidierender Bakterien hinweisen. Der kultivierungs-unabhängige Nachweis der MB beruht, wie schon erwähnt, auf die Detektion des *pmoA*-Gens. Von dem verwendeten Primer A682 zur Amplifikation des gewünschten Genabschnittes wurde das zum *pmoA*-Gen homologe *amoA*-Gen der Ammoniak-Oxidierer ebenfalls erfasst (Holmes *et al.* 1995). Daher kann bei dem Nachweis neuartiger Sequenztypen nicht in jedem Fall davon ausgegangen werden, dass es sich um *pmoA*-Sequenzen unkultivierter MB handelt.



Abbildung 4.1: Phylogenetischer Stammbaum, der die verschiedenen in allen Studien detektieren PmoA und AmoA Sequenzen zusammenfassend darstellt. Dieser Stammbaum wurde nach dem Neighbor-Joining Verfahren mit Kimura-Korrektur basierend auf 130 Aminosäure-Positionen berechnet. Sequenz-Gruppen, die auf unkultivierte Organismen hinweisen, wurden gekennzeichnet.

Die erste Gruppe von Sequenzen wurde im Rahmen dieser Arbeit als „upland soil cluster α “ (USC α) bezeichnet (Abb. 4.1). Diese Bezeichnung beruht auf der Beobachtung, dass die Sequenzen dieses Typs in verschiedensten „upland soils“ nachgewiesen wurden und

die bislang geläufige Bezeichnung „forest cluster“ nicht länger zutreffend ist. Die Sequenzen des USC α , die höchstwahrscheinlich MB repräsentieren (Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003), zeigen die größte Ähnlichkeit zu der PmoA-Sequenz von *Methylocapsa acidiphila*, einem acidophilen methanotrophen Alphaproteobakterium. Sequenzen dieses Typs wurden bereits mehrfach in sauren Waldböden nachgewiesen (Bourne *et al.* 2001, Henckel *et al.* 2000a, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde USC α darüber hinaus in Wiesenböden und Böden unter Weidewirtschaft nachgewiesen. In den analysierten Böden von Ackerbauflächen waren Sequenzen des USC α nicht nachweisbar (Kap. 3.1 und Kap. 3.3). Die Verbreitung der Organismen dieses Sequenztyps ist nicht auf saure Böden beschränkt. USC α wurde allerdings statistisch signifikant häufiger in sauren als in pH-neutralen Böden nachgewiesen. Sequenzen des USC α wurden auch in temporär gefluteten „upland soils“ nachgewiesen. Die Detektion gelang jedoch nur mittels eines speziell für diese Gruppe entwickelten Primers (Kolb *et al.* 2003). Bei der Charakterisierung der Gilde der MB mit Hilfe der DGGE wurde diese Gruppe nicht erfasst, was darauf schließen lässt, dass die Organismen des USC α in Böden mit regelmäßig erhöhten Methankonzentrationen weniger häufig eine dominante Gruppe innerhalb der Gilde Methanoxidierender Bakterien bilden, als es in selten gefluteten Böden der Fall ist (Knief *et al.* 2003, Kolb 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweite Gruppe von Sequenzen beschrieben (USC γ), die ein weiteres Taxon unkultivierter MB repräsentiert. Wegen der Ähnlichkeit der Sequenzen dieser Gruppe zu methanotrophen Gammaproteobakterien, insbesondere zu den Gattungen *Methylocaldum*, *Methylococcus* und *Methylobacter*, wurde diese Sequenzgruppe als USC γ bezeichnet (Abb. 4.1). Der Nachweis des USC γ beschränkte sich ebenfalls auf Bodenproben bewaldeter Standorte, Wiesen und Weiden. Die Verbreitung der Organismen, die durch Sequenzen des USC γ repräsentiert werden, scheint darüber hinaus auf pH-neutrale Böden begrenzt zu sein. Dass es sich bei den Organismen des USC γ höchstwahrscheinlich um MB handelt, wurde durch Markierungsexperimente mit $^{13}\text{CH}_4$ nachgewiesen. Für diesen Nachweis wurden drei Bodenproben ausgewählt, in denen dominierend Sequenzen des USC γ nachgewiesen worden waren. Diese Proben wurden für 4 Wochen in Gegenwart von ≤ 50 ppmv $^{13}\text{CH}_4$ inkubiert. Anschließend wurden die PLFAs extrahiert und nach gaschromatographischer Auftrennung per Massenspektrometrie analysiert. Diese Analyse belegte eine Inkorporation von ^{13}C in die PLFAs 14:0, 16:1 ω 7c und 16:0, welche charakteristisch für methanotrophe Gammaproteobakterien sind (Bowman *et al.* 1993,

Nichols *et al.* 1985). Da außer den Sequenzen des USC γ keine *pmoA*-Sequenzen in den Böden nachgewiesen wurden, die auf methanotrophe Gammaproteobakterien hindeuteten, liegt der Schluss nahe, dass diese markierten Fettsäuren den Organismen des USC γ entstammen.

Für die Behauptung, dass es sich bei den Organismen des USC α und USC γ tatsächlich um MB handelt, spricht auch die Beobachtung, dass in einigen Böden mit hoher atmosphärischer Methan-Oxidationsrate ausschließlich die Sequenzen dieser beiden Gruppen nachweisbar waren (MF, VA DFT, WO DFH, BB NNW, G 13FH). Auch war ein kultivierungs-abhängiger Nachweis von MB bekannter Gattungen aus einigen dieser Böden nicht möglich (MF und VA DFT).

Eine weitere Gruppe neuartiger Sequenzen zeigte die größte Ähnlichkeit zu den Sequenzen der Gattungen *Methylocaldum* und *Methylococcus* (Cluster 3; Abb. 4.1). Derartige Sequenzen wurden in „upland soils“ mit hydromorphen Merkmalen und in tropischen „upland soils“ nachgewiesen. Die phylogenetische Position dieser Sequenzen innerhalb der MB des Typ I lässt vermuten, dass es sich hierbei um methanotrophe Bakterien handelt. Diese Vermutung wurde ebenfalls durch ^{13}C -Markierungsexperimente in den Bodenproben temporär gefluteter Standorte unterstützt. Nach einwöchiger Inkubation in Gegenwart von 430 – 570 ppmv waren die für Typ I MB charakteristischen einfach ungesättigten 16:1-Fettsäuren in der Bodenprobe L 58 markiert. Da die neuartige *pmoA*-Sequenz aus Cluster 3 die einzige war, die in der Bodenprobe auf Typ I MB hinwies, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den markierten Fettsäuren um die der unkultivierten MB handelt.

Andere detektierte Sequenzen nahmen im phylogenetischen Stammbaum eine Position zwischen den *PmoA*-Sequenzen der MB und den *AmoA*-Sequenzen der Ammoniak-Oxidierer ein (Abb. 4.1). Über die Identität der entsprechenden Organismen kann nur spekuliert werden. Ein Teil der Sequenzen bildete ein Cluster mit den *pmoA*-Sequenzen methanotropher Isolate, welche aufgrund ihrer 16S rRNA-Sequenz als methanotrophe Alphaproteobakterien beschrieben worden sind (Pacheco-Oliver *et al.* 2002). Derartige Sequenzen wurden in Gleyböden detektiert (Cluster 1). Wegen der Verwandtschaft dieser Sequenzen zueinander liegt der Schluß nahe, dass es sich bei den detektierten Sequenzen des Cluster 1 um *pmoA*-Sequenzen unkultivierter MB handelt.

Eine zweite Sequenzgruppe mit ähnlicher Position im phylogenetischen Stammbaum wurde in allen vier Studien detektiert (Cluster 2). In der ersten Studie (Kap. 3.1) wurde dieser Sequenztyp (E 5FB-f) lediglich in zwei Böden detektiert. Sequenzen dieses Typs wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch in temporär gefluteten Böden und tropischen „upland

soils“ nachgewiesen. Der Hinweis darauf, dass auch diese Sequenzen MB repräsentieren, wird in der vierten Studie dieser Arbeit erbracht (Kap 3.5), in der gezeigt wurde, dass die Organismen mit derartigen Sequenzen durch Inkubation in Gegenwart von 1 % Methan im Boden angereichert wurden. Eine weitere Anreicherung außerhalb des Bodens war jedoch nicht möglich.

Ein gleichartiger indirekter Beweis kann für die im Boden K M1c nachgewiesene Sequenz des Cluster 4 geführt werden. Die zweite Sequenz dieses Clusters (*pmoA*-MO3) wurde in einem Reisfeld-Boden nach Inkubation in Gegenwart von 1 % Methan detektiert (Henckel *et al.* 2000b).

Die Organismen, die repräsentiert werden durch die in einigen Bodenproben detektierten Sequenzen des Clusters 5, welche zu den Sequenzen des USC α verwandt sind, sind ebenfalls nicht bekannt. Es liegt auch hier der Schluß nahe, dass dieser Sequenztyp *pmoA*-Sequenzen von MB repräsentiert. Dafür spricht die Verwandtschaft dieser Sequenzen zu den kultivierten und unkultivierten MB des Typ II. Es sind derzeit keine *amoA*-Sequenzen bekannt, die im phylogenetischen Stammbaum innerhalb der *pmoA*-Sequenzen methanotropher Alphaproteobakterien abzweigen.

4.2 Nachweis physiologisch aktiver methanotropher Bakterien in „upland soils“

Anhand markierter Fettsäuren wurde nachgewiesen, dass eine Beteiligung der Organismen des USC α und USC γ an der atmosphärischen Methanoxidation in „upland soils“ sehr wahrscheinlich ist (Kap. 3.1; Holmes *et al.* 1999, Knief *et al.* 2003). In den meisten Böden, die für ^{13}C -Markierungsexperimente eingesetzt wurden, wurden neben den *pmoA*-Sequenzen des USC α oder USC γ auch Sequenzen der Gattungen *Methylosinus* bzw. *Methylocystis* nachgewiesen (Bodenproben E 5FB, G 15F, G 44F, K M1b, L 61 und L 58). Eine Aktivität konnte für diese Gattungen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die für alle MB des Typ II charakteristische Fettsäure 18:1 ω 7c war in den Böden E 5FB und G 15F so schwach markiert, dass ein sekundärer Markierungseffekt nicht auszuschließen ist. Die für *Methylosinus* und *Methylocystis* charakteristische Fettsäure 18:1 ω 8c war in diesen Böden nicht nachgewiesen worden, sie lag offensichtlich unterhalb des Detektionslimits der Methode. Da in den Böden K M1b, L 61 und L 58 neben *Methylocystis* auch Sequenzen nicht-kultivierter Organismen nachgewiesen wurden (USC α , Cluster 1, Cluster 2), kann eine

Markierung der Fettsäure 18:1 ω 7c in diesen Bodenproben nur bedingt auf Vertreter der Gattung *Methylocystis* zurückgeführt werden. Ohne das Wissen um die taxonomischen Merkmale und die Physiologie der nicht-kultivierten Organismen können hinsichtlich der in diesen Böden unter bestimmten Bedingungen aktiven methanotrophen Bakterien somit nur bedingt Aussagen getroffen werden. Es sind weitere Versuche nötig, um die Bedeutung dieser unbekanntem Organismen zu erkennen. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Anreicherung und Isolierung dieser unbekanntem Organismen.

In temporär gefluteten Böden steht den MB zeitweilig Methan in Konzentrationen oberhalb der atmosphärischen zur Verfügung. Die unter diesen Bedingungen zeitweilig beobachtete Netto-Methanemission des Bodens deutet darauf hin, dass der Prozess der Methanproduktion die Kapazität, mit der Methan oxidiert wird, überschreitet. Welche MB in einem solchen Boden unter verschiedenen Methankonzentrationen physiologisch aktiv sind, wurde in einem zusätzlichen Experiment analysiert. Es wurde bereits beschrieben, dass bei Inkubation in Gegenwart von ≥ 1000 ppmv Methan die sogenannten „niedrig-affinen“ MB in „upland soils“ induziert werden können (Bender und Conrad 1995, Benstead und King 1997, Schnell und King 1995). Mit dem hier durchgeführten Experiment wurde belegt, dass auch niedrigere Methankonzentrationen ausreichen, um die Aktivität von MB zu stimulieren. In den analysierten Böden L 61 und L 58 war nach Inkubation mit etwa 30 ppmv ausschließlich die Aktivität MB des Typ II nachweisbar. Die Inkubation in Gegenwart von etwa 500 ppmv führte zu einer zusätzlichen Markierung von 16:1 Fettsäuren, was belegt, dass die MB verschiedener Gattungen spezifisch auf bestimmte Methan-Mischungsverhältnisse reagieren. Die nachgewiesene Aktivität der Typ I MB unter erhöhten Methankonzentrationen ist entweder auf eine Aktivierung der MB zurückzuführen, oder auf eine mit zunehmender Methankonzentration im Vergleich zu den aktiven Typ II MB steiler ansteigenden Methan-Oxidationsrate.

4.3 Atmosphärische Methanoxidation durch kultivierte methanotrophe Bakterien

Tatsächlich konnte im vierten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verschiedenen Stämme methanotropher Bakterien unterschiedliche Methan-Schwellenkonzentrationen für das Aufrechterhalten des Stoffwechsels benötigen. Generell lagen die Schwellenkonzentrationen für Methan bei den MB des Typ I über denen der Typ II Organismen. So benötigten die meisten getesteten MB des Typ I unter den gegebenen Kultivierungs-

bedingungen zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels > 1000 ppmv Methan. Die Aktivität von Vertretern der Gattung *Methylosinus* blieb auch bei 100 ppmv über mehr als 2 Monate erhalten. *Methylocystis* spp. überlebten selbst unter Mischungsverhältnissen < 10 ppmv mehr als 2 Monate. Somit liegt nahe, dass diese Organismen auch unter den Bedingungen im Boden zur Oxidation von Methan in atmosphärischen Konzentrationen in der Lage sind. Dieses erscheint insbesondere dann möglich, wenn berücksichtigt wird, dass die MB im Boden neben Methan auch vorhandenes Methanol und Formiat oxidieren (Jensen *et al.* 1998b, Benstead *et al.* 1998). Auch steht den MB durch die Aktivität methanogener *Archaea* unter Umständen zusätzliches Methan zur Verfügung. Einerseits wurde in einigen „upland soils“ eine endogene Methanogenese-Aktivität nachgewiesen (Andersen *et al.* 1998, Bradford *et al.* 2001, Jensen und Olsen 1998), zum anderen wird bei temporärer Flutung der Böden Methan in tieferen anoxischen Bodenschichten oder der Humusschicht freigesetzt (Adamsen und King 1993, Amaral und Knowles 1997b, Dunfield *et al.* 1995, Kammann *et al.* 2001, Klemmedtsson und Klemmedtsson 1997, Saari *et al.* 1997, Sexstone und Mains 1990, Yavitt 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Rate, mit der *in vitro* Methan atmosphärischer Konzentration von einigen Stämmen der Gattung *Methylocystis* oxidiert wird, ausreicht, um die beobachteten Methan-Oxidationsraten in „upland soils“ mit vergleichsweise niedriger Aktivität zu erklären. Zu diesen Böden zählen insbesondere Böden landwirtschaftlich genutzter Flächen, in denen die Methanoxidation im Vergleich zu Waldböden um 60 – 90 % reduziert ist (Mosier *et al.* 1997, Smith *et al.* 2000, Willison *et al.* 1995). Tatsächlich wurden in diesen Böden häufig *pmoA*-Sequenzen kultivierter MB nachgewiesen, während *pmoA*-Sequenzen des USC α und USC γ insbesondere in Ackerböden nicht nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.1 und Kap. 3.3). Diese Beobachtungen legen nahe, dass MB des USC α und USC γ in anthropogen unbeeinflussten „upland soils“ Methan atmosphärischer Konzentration mit hoher Rate oxidieren, während kultivierte MB für diesen Prozess in landwirtschaftlich beanspruchten Böden verantwortlich zu sein scheinen. Um diese Vermutungen zu bestätigen, bedarf es jedoch weiterer Studien, in denen die Methan-Oxidationsrate in Böden benachbarter Standorte unterschiedlicher Nutzung (Wald, Grünflächen und Ackerflächen) bestimmt wird, die Zusammensetzung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien charakterisiert wird und die *in situ* aktiven MB identifiziert werden.

Die Ergebnisse der kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Versuche widersprechen der bisherigen Annahme, dass MB des Typ I in Ökosystemen mit geringer Verfügbarkeit von Methan dominieren, während Typ II in Systemen hoher Methankonzentrationen dominant vertreten sind (z. B. Hanson und Hanson 1996, Henckel *et*

al. 2000b, Macalady *et al.* 2002). Dieser Widerspruch liegt darin begründet, dass in den meisten bisher durchgeführten Studien Methan-Mischungsverhältnisse von 1.000 – 10.000 ppmv als niedrig angesehen wurden. Erweitert man die untere Grenze bis auf atmosphärische Methan-Mischungsverhältnisse, so wird offensichtlich, dass einige der kultivierten methanotrophen Alphaproteobakterien unter diesen Bedingungen im Vorteil sind. Anhand der Versuche mit Reinkulturen von MB wurde gezeigt, dass methanotrophe Alphaproteobakterien wesentlich besser dazu in der Lage sind, ihren Stoffwechsel unter niedrigen Methan-Mischungsverhältnissen (< 1000 ppmv) aufrecht zu erhalten. Insbesondere der Stamm *Methylocystis* sp. DWT zeichnete sich aus durch eine über mehrere Wochen gleichbleibende Methan-Oxidationsaktivität unter atmosphärischen Bedingungen, während den meisten Vertretern der getesteten methanotrophen Gammaproteobakterien Methan-Mischungsverhältnisse von 1000 ppmv zum Überleben nicht genügten. Diese Ergebnisse spiegeln sich in der Zusammensetzung der Gilde Methan-oxidierender Bakterien in „upland soils“ wider. Durch kultivierungs-unabhängige Methoden wurde die Gattung *Methylocystis* häufiger detektiert und scheint somit weiter verbreitet zu sein als es methanotrophe Gammaproteobakterien sind. (Bourne *et al.* 2001, Holmes *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2000, Knief *et al.* 2003, Reay *et al.* 2001, Steinkamp *et al.* 2001). Es muß jedoch berücksichtigt werden, dass die verwendeten Methoden zur Charakterisierung der Gilde möglicherweise fehlerbehaftet sind und unter Umständen methanotrophe Alphaproteobakterien bevorzugt detektiert werden.

Die bessere Überlebensfähigkeit der MB des Typ II bestätigt die von Vecherskaya *et al.* (1993) aufgestellte Hypothese, dass MB des Typ I eher eine r-Strategie verfolgen, also unter geeigneten Bedingungen mit schneller Rate wachsen, während die MB des Typ II k-Strategen sind. Letztere haben in der Regel niedrigere Wachstumsraten, überleben jedoch unter ungünstigen Umwelt-Bedingungen wie beispielsweise sehr niedrigen Methankonzentrationen besser.

4.4 Oxidation atmosphärischen Methans als Resultat spezieller Adaptionen?

Unklar ist, worin die Ursache für das bessere Überleben einiger MB unter niedrigen Methan-Konzentrationen liegt. Grundsätzlich wurden für oligotrophe Mikroorganismen sowohl morphologische als auch physiologische Anpassungen beschrieben, welche das Überleben unter Substrat-limitierenden Bedingungen ermöglichen. Als morphologische Anpassung wird

eine Erhöhung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses angesehen, wodurch die Effizienz des Substrat-Austausches mit der Umgebung gesteigert wird (Poindexter 1981). Tatsächlich weisen die Kokken der Gattung *Methylocystis* mit weniger als 1 μm Durchmesser die geringste Größe innerhalb der MB auf (Bowmann 2000, Dedysh *et al.* 2002, Dedysh *et al.* 2004, Dunfield *et al.* 2003, Wise *et al.* 2001). Im Widerspruch zu dieser Hypothese steht jedoch die Beobachtung, dass *Methylocapsa acidiphila*, deren Zellen mit 0,6 – 1,2 μm Länge nur geringfügig größer sind als die von *Methylocystis*, mehr als 1000 ppmv Methan in der Gasphase zum Überleben benötigen, während die weitaus größeren Zellen von *Methylosinus trichosporium* (1,5 – 3 μm lang) in Gegenwart von 1000 ppmv wachsen.

Die Substrataufnahme wird in oligotrophen Mikroorganismen auch durch die Expression hoch-affiner Substrat-Aufnahmesysteme gesteigert (Poindexter 1981). Die Konstanz der spezifischen Affinität der getesteten methanotrophen Stämme nach Inkubation unter verschiedenen Methankonzentrationen deutet jedoch nicht darauf hin (Kap. 3.5 und Dunfield *et al.* 1999, Dunfield und Conrad 2000), dass spezielle hochaffine Enzymsysteme induziert wurden.

Offensichtlich benötigen die Organismen, die unter atmosphärischen Bedingungen aktiv sind, weniger Energie für ihren Erhaltungsstoffwechsel. Über die physiologischen Unterschiede, auf die diese Erniedrigung zurückzuführen ist, kann derzeit nur spekuliert werden. Beispielhaft sei hier angeführt, dass die Translations-Maschinerie, die im anabolen Stoffwechsel den größten Energiebedarf hat, bei oligotrophen Organismen offensichtlich mit höherer Genauigkeit arbeitet, wodurch weniger Energie durch die Synthese unvollständiger oder fehlerhafter Proteine verloren geht (Schmidt 2003). Betrachtet man den katabolen Stoffwechsel, so wirkt sich die Expression der pMMO günstig aus, da die für die Oxidation des Methans benötigten Elektronen vom Cytochrom-bc₁-Komplex bereitgestellt werden und das Enzym nicht, wie die sMMO, von NADH + H⁺ als Elektronen-Donator angewiesen ist.

Auch wenn die Ursachen für die unterschiedliche Überlebensfähigkeit MB unter niedrigen Methankonzentrationen unbekannt sind, so zeigen die Ergebnisse, dass die Bandbreite der Schwellenwerte für das Überleben MB über einen weiten Bereich von < 10 ppmv bis zu > 1000 ppmv Methan reichen. Dieses lässt darauf schließen, dass einerseits ein Überleben der bislang unkultivierten MB des USC α und USC γ unter atmosphärischen Methan-Konzentrationen ohne zusätzliches Substrat möglich sein kann und es dazu andererseits – verglichen mit den kultivierten MB – nicht zwangsläufig grundlegende physiologische Unterschiede im Stoffwechsel dieser Organismen bedarf.

5 Literatur

- Adamsen, A. P. S., and King, G. M.** 1993. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 495-490.
- Amaral, J. A., and Knowles, R.** 1997a. Inhibition of methane consumption in forest soils and pure cultures of methanotrophs by aqueous forest soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 1713-1720.
- Amaral, J. A., and Knowles, R.** 1997b. Localization of methane consumption and nitrification activities in some boreal forest soils and the stability of methane consumption on storage and disturbance. *J. Geophys. Res.* **102**: 29255-29260.
- Amaral, J. A., Ekins, A., Richards, S. R., and Knowles, R.** 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 520-525.
- Amaral, J. A., and Knowles, R.** 1998. Inhibition of methane consumption in forest soils by monoterpenes. *J. Chem. Ecol.* **24**: 723-734.
- Amaral, J. A., Ren, T., and Knowles, R.** 1998. Atmospheric methane consumption by forest soils and extracted bacteria at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2397-2402.
- Andersen, B. L., Bidoglio, G., Leip, A., and Rembges, D.** 1998. A new method to study simultaneous methane oxidation and methane production in soils. *Global Biogeochem. Cycles* **12**: 587-594.
- Anthony, C.** 1982. The biochemistry of methylotrophs: Academic Press, London.
- Auman, A. J., Stolyar, S., Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5259-5266.
- Auman, A. J., Speake, C. C., and Lidstrom, M. E.** 2001. *nifH* sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 4009-4016.
- Ball, B. C., Dobbie, K. E., Parker, J. P., and Smith, K. A.** 1997. The Influence of Gas Transport and Porosity on Methane Oxidation in Soils. *J. Geophys. Res. Atmos.* **102**: 23301-23308.
- Barnes, R. O., and Goldberg, E. D.** 1976. Methane production and consumption in anaerobic marine sediments. *Geology* **4**: 297-300.
- Baxter, N. J., Hirt, R. P., Bodrossy, L., Kovacs, K. L., Embley, T. M., Prosser, J. I., and Murrell, J. C.** 2002. The ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Arch. Microbiol.* **177**: 279-89.
- Bedard, C., and Knowles, R.** 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**: 68-84.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1992. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 261-270.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1993. Kinetics of methane oxidation in oxic soils. *Chemosphere* **26**: 687-696.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1994a. Microbial oxidation of methane, ammonium and carbon monoxide, and turnover of nitrous oxide and nitric oxide in soils. *Biogeochem.* **27**: 97-112.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1994b. Methane oxidation activity in various soils and freshwater sediments: Occurrence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain-size fractions. *J. Geophys. Res. Atmos.* **99**: 16531-16540.
- Bender, M., and Conrad, R.** 1995. Effect of CH₄ concentration and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 1517-1527.
- Benstead, J., and King, G. M.** 1997. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 333-340.

- Benstead, J., King, G. M., and Williams, H. G.** 1998. Methanol promotes atmospheric methane oxidation by methanotrophic cultures and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1091-1098.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Blume, H. P., Brümmner, G. W., Schwertmann, U., Horn, R., Kögel-Knabner, I., Stahr, K., Auerswald, K., Beyer, L., Hartmann, A., Litz, N., Scheinhorst, A., Stanjek, G., Welp, G., and Wilke, B.-M.** 2002. Scheffer/Schachtschabel - Lehrbuch der Bodenkunde. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Bodelier, P. L., and Frenzel, P.** 1999. Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1826-1833.
- Bodelier, P. L. E., and Laanbroek, H. J.** 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol*: in press.
- Bodrossy, L., Holmes, E. M., Holmes, A. J., Kovacs, K. L., and Murrell, J. C.** 1997. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. *Arch. Microbiol.* **168**: 493-503.
- Bodrossy, L., Kovacs, K. L., McDonald, I. R., and Murell, J. C.** 1999. A novel thermophilic methane-oxidising γ -*Proteobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 335-341.
- Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Murell, J. C., Radajewski, S., Weilharter, A., and Sessitsch, A.** 2003. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* **5**: 566-582.
- Boeckx, P., Cleemput, O. v., and Meyer, T.** 1998. The influence of land use and pesticides on methane oxidation in some Belgian soils. *Biol. Fertil. Soils* **27**: 293-298.
- Born, M., Dörr, H., and Ingeborg, L.** 1990. Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. *Tellus B* **42**: 2-8.
- Bosse, U., Frenzel, P., and Conrad, R.** 1993. Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 123-134.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2001. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.
- Bowman, J.** 2000. The methanotrophs - The families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. In: Dworkin, M, ed. The Prokaryotes. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>.
- Bowman, J. P., Skerratt, J. H., Nichols, P. D., and Sly, L. I.** 1991. Phospholipid fatty acid and liposaccharide fatty acid signature lipids in methane utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 15-22.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D., and Hayward, A. C.** 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the Group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 735-753.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., and Stackebrandt, E.** 1995. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 182-185.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., and Skerratt, J. H.** 1997. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology - UK* **143**: 1451-1459.
- Bradford, M. A., Ineson, P., Wookey, P. A., and Lappin-Scott, H. M.** 2001. Role of CH₄ oxidation, production and transport in forest soil CH₄ flux. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1625-1631.
- Bull, I. D., Parekh, N. R., Hall, G. H., Ineson, P., and Evershed, R. P.** 2000. Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature* **405**: 175-178.

- Cai, Z. C. C., and Mosier, A. R.** 2000. Effect of NH_4Cl addition on methane oxidation by paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1537-1545.
- Calhoun, A., and King, G. M.** 1997. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3051-3058.
- Carlsen, H. N., Joergensen, L., and Degn, H.** 1991. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 124-127.
- Castro, M. S., Steudler, P. A., Melillo, J. M., Aber, J. D., and Millham, S.** 1993. Exchange of N_2O and CH_4 between the atmosphere and soils in spruce-fir forests in the northeastern United States. *Biogeochem.* **18**: 119-135.
- Chan, A. S. K., and Parkin, T. B.** 2000. Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in a landfill cover soil. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1581-1590.
- Chan, A. S. K., and Parkin, T. B.** 2001. Methane oxidation and production activity in soils from natural and agricultural ecosystems. *J. Environ. Qual.* **30**: 1896-1903.
- Cicerone, R. J., and Oremland, R. S.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob. Biogeochem. Cycles* **2**: 299-327.
- Conrad, R.** 1989. Control of methane production in terrestrial ecosystems. In: Andreae, MO and Schimel, DS, eds. Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Chichester: John Wiley & Sons. 39-58.
- Conrad, R.** 1995. Soil microbial processes involved in production and consumption of atmospheric trace gases. *Adv. Microb. Ecol.* **14**: 207-250.
- Conrad, R.** 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609-640.
- Conrad, R.** 1997. Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere. In: Helas, G, Slanina, J and Steinbrecher, R, eds. Amsterdam: SBP Academic Publ. 27-44.
- Conrad, R.** 1999. Soil microorganisms oxidizing atmospheric trace gases (CH_4 , CO , H_2 , NO). *Ind. J. Microbiol.* **39**: 193-203.
- Costello, A. M., and Lidstrom, M. E.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Crill, P. M.** 1991. Seasonal patterns of methane uptake and carbon dioxide release by a temperate woodland soil. *Glob. Biogeochem. Cycles* **5**: 319-334.
- Crill, P. M., Martikainen, P. J., Nykanen, H., and Silvola, J.** 1994. Temperature and N fertilization effects on methane oxidation in a drained peatland soil. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1331-1339.
- Czepiel, P. M., Crill, P. M., and Harriss, R. C.** 1995. Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soils. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **100**: 9359-9364.
- De Visscher, A., Thomas, D., Boeckx, P., and Van Cleemput, O.** 1999. Methane oxidation in simulated landfill cover soil environments. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 1854-1859.
- De Visscher, A., Schippers, M., and Van Cleemput, O.** 2001. Short-term kinetic response of enhanced methane oxidation in landfill cover soils to environmental factors. *Biol. Fertil. Soils* **33**: 231-237.
- Dedysh, S. N., Panikov, N. S., and Tiedje, J. M.** 1998. Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 922-929.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Bares, A. M., Panikov, N. S., and Tiedje, J. M.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969.
- Dedysh, S. N., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Liesack, W., and Tiedje, J. M.** 2002. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-

- oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 251-61.
- Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Liesack, W., and Zavarzin, G. A.** 2004a. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 151-156.
- Dedysh, S. N., Knief, C., and Dunfield, P. F.** 2004b. Facultatively methanotrophic bacteria. in preparation.
- Dlugokencky, E. J., Masarie, K. A., Lang, P. M., and Tans, P. P.** 1998. Continuing decline in the growth rate of the atmospheric methane burden. *Nature* **393**: 447-450.
- Dlugokencky, E. J., Houweling, S., Bruhwiler, L., Masarie, K. A., Lang, P. M., Miller, J. B., and Tans, P. P.** 2003. Atmospheric methane levels off: Temporary pause or a new steady-state? *Geophys. Res. Lett.* **30**: 1-4.
- Dörr, H., Katruff, L., and Levin, I.** 1993. Soil texture parameterization of the methane uptake in aerated soils. *Chemosphere* **26**: 697-713.
- Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., and Moore, T. R.** 1993. Methane production and consumption in temperate and sub-arctic peat soils - response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 321-326.
- Dunfield, P. F., and Knowles, R.** 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3129-3135.
- Dunfield, P. F., Topp, E., Archambault, C., and Knowles, R.** 1995. Effect of nitrogen fertilizers and moisture content on CH₄ and N₂ fluxes in a humisol: measurements in the field and intact soil cores. *Biogeochem.* **29**: 199-222.
- Dunfield, P. F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R., and Conrad, R.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1009-1014.
- Dunfield, P. F., and Conrad, R.** 2000. Starvation alters the apparent half-saturation constant for methane in the type II methanotroph *Methylocystis* strain LR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4136-4138.
- Dunfield, P. F., Tchawa Yimiga, M., Dedysh, S. N., Berger, U., Liesack, W., and Heyer, J.** 2002. Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel *pmoA*-like gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 17-26.
- Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., A., T. Y., and Dedysh, S. N.** 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1231-1239.
- Etheridge, D. M., Steele, L. P., Francey, R. J., and Langenfelds, R. L.** 1998. Atmospheric methane between 1000 A.D. and present: Evidence of anthropogenic emissions and climatic variability. *J. Geophys. Res.* **103**.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP: phylogeny inference package. University of Washington, Seattle.
- Fischer, S. G., and Lerman, L. F.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**: 191-200.
- Fitch, W. M.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**: 406-416.
- Fjellbirkeland, A., Torsvik, V., and Øvreås, L.** 2001. Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxoF* and 16S rDNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 209-217.
- Frenzel, P.** 2000. Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *Adv. Microb. Ecol.* **16**: 85-114.

- Fuse, H., Ohta, M., Takimura, O., Murakami, K., Inoue, H., Yamaoka, Y., Oclarit, J. M., and Omori, T. 1998. Oxidation of trichloroethylene and dimethylsulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1925-1931.
- Goodwin, P. M., and Anthony, C. 1998. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* **40**: 1-80.
- Green, P. N. 1992. Taxonomy of methylotrophic bacteria. In: Murrell, JC and Kelly, DP, eds. Microbial growth on C₁-compounds. Andover, United Kingdom: Intercept Press. Ltd. 23-84.
- Guckert, J. B., Ringelberg, D. B., White, D. C., Hanson, R. S., and Bratina, B. J. 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2631-2641.
- Gulledge, J., and Schimel, J. P. 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH₄ oxidation in soil and mechanism of NH₄⁺ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4291-4298.
- Gulledge, J., Steudler, P. A., and Schimel, J. P. 1998. Effect of CH₄-starvation on atmospheric CH₄ oxidizers in taiga and temperate forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1463-1467.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M., and DeLong, E. F. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5483-91.
- Hanson, R. S., and Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- Harriss, R. C., Sebach, D. I., and Day, J. F. P. 1982. Methane flux in the Great Dismal Swamp. *Nature* **297**: 673-674.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, K. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160-174.
- Henckel, T., Friedrich, M., and Conrad, R. 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R. 2000a. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1801-1808.
- Henckel, T., Roslev, P., and Conrad, R. 2000b. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.* **2**: 666-679.
- Heyer, J., Malashenko, Y., Berger, U., and Budkova, E. 1984. Verbreitung methanotropher Bakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 725-744.
- Heyer, J., Galchenko, V. F., and Dunfield, P. F. 2002. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* **148**: 2831-46.
- Heyer, J., Berger, U., Hardt, M., and Dunfield, P. F. 2004. *Methylohalobium crimense* gen. nov. sp. nov., a novel moderately halophilic methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea. submitted.
- Hoffmann, T., Horz, H. P., Kemnitz, D., and Conrad, R. 2002. Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different rice field soils in China and the Philippines. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 267-274.
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K., and Tiedje, J. M. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- Holmes, A. J., Roslev, P., McDonald, I. R., Iversen, N., Henriksen, K., and Murrell, J. C. 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.

- Horz, H.-P., Yimga, M. T., and Liesack, W.** 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4177-4185.
- Horz, H.-P., Raghubanshi, A. S., Heyer, J., Kammann, C., Conrad, R., and Dunfield, P. F.** 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 247-257.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., and Xiaosu, D.** 2001. IPCC Climate Change 2001: The scientific basis - contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Hutchens, E., Radajewski, S., Dumont, M. G., McDonald, I. R., and Murrell, J. C.** 2004. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* **6**: 111-120.
- Hütsch, B. W.** 1998. Tillage and land use effects on methane oxidation rates and their vertical profiles in soil. *Biol. Fertil. Soils* **27**: 284-292.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., and Nasu, M.** 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 129-141.
- Jaatinen, K., Knief, C., Dunfield, P. F., Yrjälä, K., and Fritze, H.** 2004. Methanotrophic bacteria in boreal forest soil after fire, submitted.
- Jäckel, U.** 2001. Der Methankreislauf im Wald- und Reisfeldboden: Natürliche Prozesse und anthropogene Einflüsse. Dissertation am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Jäckel, U., Schnell, S., and Conrad, R.** 2001. Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 965-971.
- Jensen, S., and Olsen, R. A.** 1998. Atmospheric methane consumption in adjacent arable and forest soil systems. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1187-1193.
- Jensen, S., Øvreås, L., Daae, F. L., and Torsvik, V.** 1998a. Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 17-26.
- Jensen, S., Prieme, A., and Bakken, L.** 1998b. Methanol improves methane uptake in starved methanotrophic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1143-1146.
- Jensen, S., Holmes, A. J., Olsen, R. A., and Murrell, J. C.** 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**: 282-289.
- Jiang, Q. Q., and Bakken, L. R.** 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2679-2684.
- Joergensen, L., and Degn, H.** 1983. Mass spectrometric measurements of methane and oxygen utilization by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 331-335.
- Joergensen, L., and Degn, H.** 1987. Growth rate and methane affinity of a turbidostatic and oxystatic continuous culture of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biotech. Lett.* **9**: 71-76.
- Jollie, D. R., and Lipscomb, J. D.** 1991. Formate dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: purification and spectroscopic characterization of the cofactors. *J. Biol. Chem.* **266**: 21853-21863.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* **8**: 275-282.
- Kammann, C., Grünhage, L., Jäger, H.-J., and Wachinger, G.** 2001. Methane fluxes from differentially managed grassland study plots: the important role of CH₄ oxidation in grassland with a high potential for CH₄ production. *Environ. Pollut.* **115**: 261-273.
- Kandeler, E., and Gerber, H.** 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* **6**: 68-72.

- Keller, M., E. Veldkamp, A. M. Weitz, and W. A. Reiners.** 1993. Effect of pasture age on soil trace-gas emissions from a deforested area of Costa Rica. *Nature* **365**:244-246.
- Kimura, M.** 1983. The neutral theory of molecular evolution. In: Nei, M and Koehn, RK, eds. Evolution of genes and proteins. Sunderland, Massachusetts: Sinauer. 208-233.
- King, G. M.** 1993. Ecophysiological characteristics of obligate methanotrophic bacteria and methane oxidation in situ. In: Murrell, JC and Kelly, DP, eds. Microbial growth on C₁-compounds. Andover: Intercept. 303-313.
- King, G. M., and Schnell, S.** 1994. Effect of increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption. *Nature* **370**: 282-284.
- King, G. M.** 1996. Physiological limitations of methanotrophic activity in situ. In: Murrell, JC and Kelly, DP, eds. Microbiology of atmospheric trace gases: sources, sinks and global change processes.
- King, G. M.** 1997. Responses of atmospheric methane consumption by soils to global climate change. *Global Change Biology* **3**: 351-362.
- Klemedtsson, A. K., and Klemedtsson, L.** 1997. Methane uptake in Swedish forest soil in relation to liming and extra N-deposition. *Biol. Fertil. Soils* **25**: 296-301.
- Knief, C. Kolb, S. Bodelier, P. L. E. Lipski, A., Dunfield, P. F.** 2004. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. in preparation.
- Knief, C., Altendorf, K., and Lipski, A.** 2003. Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of ¹³C-labeled fatty acids. *Environ. Microbiol.* **5**: 1155-1167.
- Knief, C., Lipski, A., and Dunfield, P. F.** 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6703-14.
- Kolb, S.** 2003. Oxidation von atmosphärischem Methan in Böden: Ein neuer quantitativer Ansatz zur Erfassung der Struktur und Aktivität methanotropher Gilden. Dissertation am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., and Conrad, R.** 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2423-9.
- Koschorreck, M., and Conrad, R.** 1993. Oxidation of atmospheric methane in soil: Measurements in the field, in soil cores and in soil samples. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 109-121.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F. O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Böcher, R., Thauer, R. K., and Shima, S.** 2003. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-81.
- Kruse, C. W., and Iversen, N.** 1995. Effect of plant succession, ploughing, and fertilization on the microbiological oxidation of atmospheric methane in a heathland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 121-128.
- Le Mer, J., and Roger, P.** 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 25-50.
- Leadbetter, R. E., and Foster, J. W.** 1958. Studies on some methane-utilizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **30**: 91-118.
- Legendre, L., and Legendre, P.** 1998. Numerical ecology. Developments in environmental modelling 20. Elsevier Scientific Publ. Co, Amsterdam.
- Liesack, W., and Dunfield, P. F.** 2002. Use of molecular methods to characterize soil microbial diversity. In: Bitton, G, ed. Encyc. Environ. Microbiol.: John Wiley & Sons.
- Lipski, A., and Altendorf, K.** 1997. Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 448-457.
- Lontoh, S., and Semrau, J. D.** 1998. Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1106-1114.

- Macalady, J. L., A. M. S. McMillan, A. F. Dickens, S. C. Tyler, and K. M. Scow. 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environ. Microbiol.* **4**:148-157.
- MacDonald, J. A., Skiba, U., Sheppard, L. J., Hargreaves, K. J., Smith, K. A., and Fowler, D. 1996. Soil environmental variables affecting the flux of methane from a range of forest, moorland and agricultural soils. *Biogeochem.* **34**: 113-132.
- Mancinelli, R. L. 1995. The regulation of methane oxidation in soil. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 581-605.
- McDonald, I. R., and Murrell, J. C. 1997a. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3218-3224.
- McDonald, I. R., and Murrell, J. C. 1997b. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 205-210.
- Megraw, S. R., and Knowles, R. 1987. Methane production and consumption in a cultivated humisol. *Biol. Fert. Soils* **5**: 56-60.
- Menyailo, O. V., and Hungate, B. A. 2003. Interactive effects of tree species and soil moisture on methane consumption. *Soil Biol. Biochem.* **35**: 625-628.
- Miguez, C. B., Bourque, D., Sealy, J. A., Greer, C. W., and Groleau, D. 1997. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (*sMMO*) genes using the polymerase chain reaction (PCR). *Microb. Ecol.* **33**: 21-31.
- Mosier, A. R., Klemetsson, A. K., Sommerfeld, R. A., and Musselman, R. C. 1993. Methane and nitrous oxide flux in a Wyoming subalpine meadow. *Glob. Biogeochem. Cycles* **7**: 771-784.
- Mosier, A. R., Delgado, J. A., Cochran, V. L., Valentine, D., and Parton, W. J. 1997. Impact of agriculture on soil consumption of atmospheric CH₄ and a comparison of CH₄ and N₂O flux in subarctic, temperate and tropical grasslands. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 71-83.
- Murrell, J. C., McDonald, I. R., and Gilbert, B. 2000. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol.* **8**: 221-225.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 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.
- Nakicenovic, N., and Swart, R. 2000. IPCC Special report: Emission scenarios. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Nesbit, S. P., and Breitenbeck, G. A. 1992. A laboratory study of factors affecting methane uptake by soils. *Agric. Ecosys. Environ.* **41**: 39-54.
- Nichols, P. D., Smith, G. A., Antworth, C. P., Hanson, R. S., and White, D. C. 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 327-335.
- Nichols, P. D., Guckert, J. B., and White, D. C. 1986. Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulfide adducts. *J. Microbiol. Methods* **5**: 49-55.
- Nicol, G. W., Glover, L. A., and Prosser, J. I. 2003. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. *Global Change Biology* **9**: 1451-1457.
- Ojima, D. S., Valentine, D. W., Mosier, A. R., Parton, W. J., and Schimel, J. P. 1993. Effect of land use change on methane oxidation in temperate forest and grassland soils. *Chemosphere* **26**: 675-685.
- Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J., and Janssen, D. B. 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 7-14.
- Orphan, V. J., Hinrichs, K. U., Ussler, W., 3rd, Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M., and Delong, E. F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1922-1934.

- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D., and DeLong, E. F.** 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7663-8.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F. L., and Torsvik, T.** 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2739-2742.
- Pacheco-Oliver, M., McDonald, I. R., Groleau, D., Murrell, J. C., and Miguez, C. B.** 2002. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 313-9.
- Papen, H., Daum, M., Steinkamp, R., and Butterbach-Bahl, K.** 2001. N₂O and CH₄-fluxes from soils of a N-limited and N-fertilized spruce forest ecosystem of the temperate zone. *J. Appl. Bot.* **75**: 159-163.
- Peters, V., and Conrad, R.** 1995. Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1673-1676.
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J. M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., Pépin, L., Ritz, C., Saltzman, E., and Stievenard, M.** 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**.
- Poindexter, J. S.** 1981. Oligotrophy - Fast and famine existence. *Adv. Microb. Ecol.* **5**: 63-89.
- Priemé, A., and Christensen, S.** 1997. Seasonal and spatial variation of methane oxidation in a Danish spruce forest. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 1165-1172.
- Priemé, A., and Ekelund, F.** 2001. Five pesticides decreased oxidation of atmospheric methane in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 831-835.
- Radajewski, S., and Murrell, J. C.** 2002. Stable isotope probing for detection of methanotrophs after enrichment with ¹³CH₄. In: Aquino de Muro, M and Rapley, R, eds. *Methods in Molecular Biology*, vol 179: Gene Probes: Principles and Protocols: Humana Press Inc. Totowa NJ. 149-157.
- Reay, D. S., Radajewski, S., Murrell, J. C., McNamara, N., and Nedwell, D. B.** 2001. Effects of land-use on the activity and diversity of methane oxidizing bacteria in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1613-1623.
- Reeburgh, W. S.** 1976. Methane consumption in Cariaco Trench water and sediments. *Earth Planetary Sci. Lett.* **5**: 337-344.
- Reeburgh, W. S., Whalen, S. C., and Alperin, M. J.** 1993. The role of methylotrophy in the global methane budget. In: Murrell, JC and Kelly, DP, eds. *Microbial growth on C₁ compounds*. Andover: Intercept. 1-14.
- Riele, G.** 1994. Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes. *Analyst* **119**: 915-919.
- Rigler, E., and Zechmeister-Boltenstern, S.** 1998. Influence of nitrogen and carbon dioxide on ethylene and methane production in two different forest soils. *Microbiological Research* **153**: 227-237.
- Rodhe, H.** 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science* **248**: 1217-1219.
- Roslev, P., and King, G. M.** 1994. Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2602-2608.
- Roslev, P., Iversen, N., and Hendriksen, K.** 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 874-880.
- Roslev, P., and Iversen, N.** 1999. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4064-4070.

- Saari, A., Martikainen, P. J., Ferm, A., Ruuskanen, J., Boer, W. d., Troelstra, S. R., and Laanbroek, H. J. 1997. Methane oxidation in soil profiles of Dutch and Finnish coniferous forests with different soil texture and atmospheric nitrogen deposition. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 1625-1632.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nalt. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Schmidt, T. M. 2003. Why grow slowly? Potential physiological tradeoffs in soil bacteria. International Symposium: Structure and Function of Soil Microbiota. Marburg. 163.
- Schnell, S., and King, G. M. 1994. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3514-3521.
- Schnell, S., and King, G. M. 1995. Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 285-294.
- Schnell, S., and King, G. M. 1996. Responses of methanotrophic activity in soils and cultures to water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3203-3209.
- Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochem.* **42**: 23-51.
- Seghers, D., Top, E. M., Reheul, D., Bulcke, R., Boeckx, P., Verstraete, W., and Siciliano, S. D. 2003a. Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic community in agricultural soils. *Environ Microbiol* **5**: 867-77.
- Seghers, D., Verthe, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S. D., Verstraete, W., and Top, E. M. 2003b. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 139-146.
- Sextstone, A. J., and Mains, C. N. 1990. Production of methane and ethylene in organic horizons of spruce forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 135-139.
- Shigematsu, T., Hanada, S., Eguchi, M., Kamagata, Y., Kanagawa, T., and Kurane, R. 1999. Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5198-5206.
- Silver, W. L., Lugo, A., E., and Keller, M. 1999. Soil oxygen availability and biogeochemistry along rainfall and topographic gradients in upland wet tropical forest soils. *Biogeochem.* **44**: 301-328.
- Smith, K. A., Dobbie, K. E., Ball, B. C., Bakken, L. R., Sitaula, B. K., Hansen, S., Brumme, R., Borken, W., Christensen, S., Prieme, A., Fowler, D., Macdonald, J. A., Skiba, U., Klemmedtsson, L., Kasimir-Klemmedtsson, A., Degorska, A., and Orlanski, P. 2000. Oxidation of atmospheric methane in Northern European soils, comparison with other ecosystems, and uncertainties in the global terrestrial sink. *Global Change Biology* **6**: 791-803.
- Stainthorpe, A. C., Lees, V., Salmond, G. P., Dalton, H., and Murrell, J. C. 1990. The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Gene* **91**: 27-34.
- Steele, L. P., Dlugokencky, E. J., Lang, P. M., Tans, P. P., Martin, A. P., and Masarie, K. A. 1992. Slowing down of the global accumulation of atmospheric methane during the 1980s. *Nature* **358**: 313-316.
- Steinkamp, R., Zimmer, W., and Papen, H. 2001. Improved method for detection of methanotrophic bacteria in forest soils by PCR. *Curr. Microbiol.* **42**: 316-322.
- Stuedler, P. A., Bowden, R. D., Melillo, J. M., and Aber, J. D. 1989. Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* **341**: 314-316.
- Striegl, R. G. 1993. Diffusional limits to the consumption of atmospheric methane by soils. *Chemosphere* **26**: 715-720.

- Strimmer, K., and von Haesler, A.** 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 964-969.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H.** 1998. ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Munich.
- Syamsul Arif, M. A., Houwen, F., and Verstraete, W.** 1996. Agricultural factors affecting methane oxidation in arable soil. *Biol. Fertil. Soils* **21**: 95-102.
- Tchawa Yimiga, M., Dunfield, P. F., Ricke, P., Heyer, J., and Liesack, W.** 2003. Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its expression in *Methylocystis* strain SC2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5593-5602.
- Valentine, D. L.** 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 271-82.
- Vecherskaya, M. S., Galchenko, V. F., Sokolova, E. N., and Samarkin, V. A.** 1993. Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils. *Curr. Microbiol.* **27**: 181-184.
- Veldkamp, E., Weitz, A. M., and Keller, M.** 2001. Management effects on methane fluxes in humid tropical pasture soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1493-1499.
- Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Stolyar, S. M., Thauer, R. K., and Lidstrom, M. E.** 1999. Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *J. Bacteriol.* **181**: 5750-5757.
- Vorholt, J. A.** 2002. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **178**: 239-249.
- Wang, F. L., and Bettany, J. R.** 1995. Methane emission from a usually well-drained prairie soil after snowmelt and precipitation. *Can. J. Soil Sci.* **75**: 239-241.
- Wang, F. L., and Bettany, J. R.** 1997. Methane emission from Canadian prairie and forest soils under short term flooding conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 197-202.
- Weisburg, W., Barns, G., Dale, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **2**: 697-903.
- West, A. E., and Schmidt, S. K.** 1998. Wetting stimulates atmospheric CH₄ oxidation by alpine soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 349-353.
- West, A. E., and Schmidt, S. K.** 1999. Acetate stimulates atmospheric CH₄ oxidation by an alpine tundra soil. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1649-1655.
- West, A. E., and Schmidt, S. K.** 2002. Endogenous methanogenesis stimulates oxidation of atmospheric CH₄ in alpine tundra soil. *Microbial Ecology* **43**: 408-415.
- Whalen, R. T., and Reeburgh, W. S.** 1990. Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature* **346**: 160-162.
- Whalen, S. C., Reeburgh, W. S., and Barber, V. A.** 1992. Oxidation of methane in boreal forest soils - a comparison of 7 measures. *Biogeochem.* **16**: 181-211.
- Whalen, S. C., and Reeburgh, W. S.** 1996. Moisture and temperature sensitivity of CH₄ oxidation in boreal soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1271-1281.
- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D., and Bobbie, R. J.** 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- White, D. C.** 1988. Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* **31**: 1-18.
- Whittenbury, R., Phillips, K. C., and Wilkinson, J. F.** 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 205-218.
- Whittenbury, R., and Dalton, H.** 1981. The methylotrophic bacteria. In: Starr, MP, Stolph, H, Trüper, HG, Balows, A and Schlegel, HG, eds. The prokaryotes. Berlin: Springer-Verlag KG. 894-902.

- Wickland, K. P., Striegl, R. G., Schmidt, S. K., and Mast, M. A. 1999. Methane flux in subalpine wetland and unsaturated soils in the southern Rocky Mountains. *Glob. Biogeochem. Cycles* **13**: 101-113.
- Wilhelm, E., Battino, R., and Wilcock, R. J. 1977. Low pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* **77**: 219-262.
- Willison, T. W., Webster, C. P., Goulding, K. W. T., and Powlson, D. S. 1995. Methane oxidation in temperate soils: effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere* **30**: 539-546.
- Willison, T. W., O'Flaherty, M. S., Tlustos, P., Goulding, K. W. T., and Powlson, D. S. 1997. Variations in microbial populations in soils with different methane uptake rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 95-90.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741-3751.
- Wise, M. G., McArthur, J. V., and Shimkets, L. J. 2001. *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov. and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 611-621.
- Yavitt, J. B., Downey, D. M., Lang, G. E., and Sextone, A. J. 1990. Methane consumption in two temperate forest soils. *Biogeochem.* **9**: 39-52.
- Yavitt, J. B., Fahey, T. J., and Simmons, J. A. 1995. Methane and carbon dioxide dynamics in a northern hardwood ecosystem. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**: 796-804.
- Yeates, and Gillings. 1998. Rapid purification of DNA from soil for molecular biodiversity analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 49-53.
- Zahn, J. A., and DiSpirito, A. A. 1996. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* **178**: 1018-29.
- Zahn, J. A., Bergmann, D. J., Boyd, J. M., Kunz, R. C., and DiSpirito, A. A. 2001. Membrane-associated quinoprotein formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *J. Bacteriol.* **183**: 6832-40.
- Zelles, L., and Bai, Q. Y. 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 495-507.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysacchrides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* **29**: 111-129.

Lebenslauf

Claudia Knief, geboren am 8. Februar 1976 in Nordhorn

Schulbildung:

1982 – 1986: Grund- und Hauptschule in Bad Bentheim/Gildehaus
1986 – 1995: Missionsgymnasium St. Antonius in Bad Bentheim/Bardel
Mai 1995: Abitur

Hochschulstudium:

Oktober 1995 – Dezember 2000: Biologie-Studium am Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück
Dezember 2000: Biologie Diplom
(Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Pflanzenphysiologie)
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie bei Prof. Dr. K. Altendorf: „Direktnachweis von autotrophen Bakterien in Umweltproben durch ¹³C-Markierung charakteristischer Fettsäuren“

Promotion:

seit April 2001: Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie bei Prof. Dr. R. Conrad
Oktober 2001 – März 2003: Immatrikulation zum Promotionsstudium am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

Wissenschaftliche Publikationen (chronologisch):

- Alexandrino, M., Knief, C., and Lipski, A.** 2001. Stable-isotope-based labeling of styrene-degrading microorganisms in biofilters. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4796 – 4804.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., and Conrad, R.** 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2423 – 2429.
- Knief, C., Altendorf, K., and Lipski, A.** 2003. Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of ¹³C-labelled fatty acids. *Environ. Microbiol.* 5: 1155 – 1167.
- Knief, C., Lipski, A., and Dunfield P. F.** 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6703 – 6714.
- Jaatinen, K., Knief, C., Dunfield, P. F., Yrjälä, K., and Fritze, H.** Methanotrophic bacteria in boreal forest soil after fire. (submitted)
- Knief, C., Kolb, S., Bodelier, P. L. E., Lipski, A., and Dunfield P. F.** Diversity and activity of methanotrophic bacteria in temporary flooded upland soils. (in preparation)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** Response and adaptation of methanotrophic bacteria to low methane concentrations. (in preparation)
- Knief, C., Conrad, R., Dunfield, P. F., and Chidthaisong, A.** Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land use. (in preparation)
- Dedysh, S. N., Knief, C., and Dunfield, P. F.** Facultatively methanotrophic bacteria. (in preparation)
- Kolb, S., Knief, C., Dunfield, P. F., and Conrad, R.** Quantitative evidence for oxidation of atmospheric methane by uncultivated methanotrophic bacteria in forest soils. (in preparation)
- Basiliko, N., Henry, K., Knief, C., Moore, T., Dunfield, P. F.** Microbial communities of pristine, harvested, and restored Canadian peatlands: land use effects and ecological constraints on microbial activity. (in preparation)

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen und Symposien:

- Knief, C., Dunfield, P. F.** Characterization of methanotrophic communities in upland soils of different pH-value and land use. Jahrestagung der VAAM, März 2002, Göttingen (Poster)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** Detection of a novel group of atmospheric methane-oxidizing bacteria in upland soils. Jahrestagung der VAAM, März 2003, Berlin (Poster)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** Characterization of methane-oxidizing bacterial communities in upland soils with molecular methods. 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Juni/Juli 2003, Ljubljana (Slowenien) (Poster)
- Jaatinen, K., Knief, C., Dunfield, P. F., Yrjälä, K., Fritze, H.** Methanotrophic bacteria in boreal forest soil: long-term effects of prescribed burning and ash fertilization. 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Juni/Juli 2003, Ljubljana (Slowenien) (Poster)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** A novel group of atmospheric methane-oxidizing bacteria in upland soils. International Symposium on „Structure and Function of Soil Microbiota“, September 2003, Marburg. (Poster)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** Who is responsible for atmospheric methane oxidation in upland soils? Mini-Symposium, November 2003, Wageningen (Niederlande) (Vortrag)
- Knief, C., Dunfield, P. F.** Adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios. Jahrestagung der VAAM, März 2004, Braunschweig (Poster)

DANKSAGUNGEN

An erster Stelle und ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Peter F. Dunfield bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit unter seiner Anleitung anzufertigen. Vielen Dank für die hilfreiche Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und für all die Anregungen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Dankeschön auch für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit, insbesondere der in Englisch verfassten Kapitel.

Bei Herrn Prof. Ralf Conrad bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu arbeiten, und für die Unterstützung, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem herzlichen Dank für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Thauer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Finanzierung dieser Arbeit in Form eines DFG-Projektes (DU 733/1-1).

Mein ganz besonderer Dank gilt weiterhin Dr. Jürgen Heyer, Dr. Steffen Kolb und Dr. Svetlana N. Dedysh für zahllose Diskussionen, nicht nur über das wohl unerschöpfliche Thema der methanotrophen Bakterien. Vielen Dank für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für eine gute und erfolgreiche Zusammenarbeit über die Diplomarbeit hinaus bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. André Lipski von der Universität Osnabrück. Für die Möglichkeit der Kooperation im Rahmen dieser Doktor-Arbeit möchte ich mich weiterhin bei Dr. Paul L. E. Bodelier vom NIOO in Nieuwersluis (leider waren die Daten nicht mehr rechtzeitig verfügbar) und Dr. Amnat Chidthaisong von der University of Technology in Bangkok bedanken. Dr. Christoph Müller von der Universität Giessen sei gedankt für (bereits gesiebte) Bodenproben.

Nun zu all denen, die Tag für Tag mit mir den Laboralltag im Labor C0.15 geteilt haben. An erster Stelle danke ich Nina Ringleff, die mir als Einzige von Beginn bis zum Ende Gesellschaft geleistet hat. Ich danke Dir auch dafür, dass Du mir zu Beginn meiner Arbeit gezeigt hast „wie der Laden läuft“ und mir die Grundzüge des praktischen molekular-biologischen Arbeitens beigebracht hast.

Nicht weniger Dank gebührt Dr. Jürgen Heyer und Dr. Nicole Treude: die ersten zwei Jahre mit Euch haben es im Labor niemals langweilig werden lassen. Danke auch Krista Jaatinen und Nathan Basiliko, die vorübergehend für Abwechslung im und außerhalb des Labors gesorgt haben. Für die Gesellschaft während des letzten Jahres danke ich Dr. Akhilesh Raghubanshi.

Allen Mitgliedern der Abteilung Biogeochemie gilt mein Dank für das nette Arbeitsklima und jegliche Art von Unterstützung während der Zeit meiner Promotion.

An dieser Stelle auch ein „Dankeschön“ an meine Familie für ihre Unterstützung, nicht nur während der letzten drei Jahre.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaften in Böden mit geringem Methanangebot und der oligotrophen Adaption methanotropher Bakterien“

selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

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

Marburg, 15. April 2004