

Charakterisierung unkultivierter *Archaea* aus Böden

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dana Kemnitz

aus Leisnig

Marburg / Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2001 bis September 2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 15.10.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der Disputation: 09.12.2004

Ein Großteil der während der Dissertation erzielten Ergebnisse sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Kemnitz D., Kolb S. and Conrad R. 2004. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative PCR to an enrichment culture. Environ. Microbiol. in press.

Erkel C., Kemnitz D., Kube M., Ricke P., Chin K.-J., Dedysh S., Reinhardt R., Conrad R. and Liesack W. Retrieval of first genom data for rice cluster I methanogens by a combined approach of cultivation and molecular ecology techniques. FEMS Microbiol. Ecol. in revision.

Inhalt

ABKÜRZUNGEN	5
ZUSAMMENFASSUNG	6
I EINLEITUNG.....	8
1. Die Domäne der <i>Archaea</i>	8
2. Molekulare Revolution der mikrobiellen Diversität	10
3. Phylogenetische Diversität der <i>Archaea</i>	12
4. Zurück zu den Wurzeln der Mikrobiologie – Kultivierung „Unkultivierter“	14
5. Ziel der Arbeit.....	17
II MATERIAL UND METHODEN.....	18
1. Material	18
1.1 Sterilisationsverfahren	18
1.2 Chemikalien und Gase.....	18
2. Verwendete Bodenproben.....	18
2.1 Böden eines Flutungsgebietes des Flusses Waal.....	18
2.2 Marburger Waldboden.....	19
3. Kultivierungsbedingungen und Anreicherungsexperimente	19
3.1 Anreicherung von Rice Cluster III- <i>Archaea</i>	19
3.1.1 Medium.....	19
3.1.2 Anreicherung von Rice Cluster III- <i>Archaea</i> aus Böden.....	21
3.1.3 Wachstumsbedingungen von Rice Cluster III- <i>Archaea</i>	21
3.2 Anreicherung von Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	24
3.2.1 Medium.....	24
3.2.2 Wachstumsbedingungen von Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	26

3.2.3 Isolierungsversuche	26
3.3 Kultivierung methanogener <i>Archaea</i>	27
4. Chemische Analysen.....	27
4.1 Gaschromatographische Analysen	27
4.1.1 Analyse von Wasserstoff.....	27
4.1.2 Analyse von Methan und Kohlendioxid.....	28
4.1.3 Berechnung.....	29
4.2 Bestimmung der ¹³ C/ ¹² C-Isotopensignatur von CH ₄ und CO ₂	29
4.3 Analyse organischer Säuren und Alkohole	30
4.4 Analyse anorganischer Ionen.....	31
4.5 Bestimmung von Ammonium	31
4.6 Bestimmung von Eisen.....	32
4.7 Bestimmung von pH-Wert, C/N – Gehalt und Trockengewicht	33
5. Molekularbiologische Analysen	33
5.1 DNA-Extraktion	33
5.2 PCR-Amplifikation.....	34
5.2.1 PCR-Amplifikation der DNA zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität... 36	
5.2.2 Quantifizierung phylogenetischer Gruppen mittels Real Time-PCR.....	37
5.3 T-RFLP-Analyse	42
5.4 Erstellung von Klonbibliotheken.....	44
5.5 Sequenzierung	44
5.6 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen	45
5.7 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	46
III ERGEBNISSE.....	49
1. Quantifizierung phylogenetischer Gruppen mittels Real Time-PCR und Validierung der Zielgruppenspezifität	49
2. Anreicherung und Analyse von Rice Cluster III-<i>Archaea</i>.....	51
2.1 Anreicherungskulturen aus gefluteten Böden.....	51
2.2 Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft der Anreicherungskulturen	51
2.3 Phylogenie der <i>Archaea</i>	52

2.4 Wachstumsbedingungen der Rice Cluster III- <i>Archaea</i> (LL25°C)	53
2.4.1 Einfluss der Hefeextraktkonzentration	53
2.4.2 Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft	55
2.4.3 Temperaturoptimum	57
2.4.4 pH-Optimum.....	57
2.4.5 Salzoptimum (NaCl).....	58
2.4.6 Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen	59
2.4.7 Einfluss von Elektronenakzeptoren, Reduktionsmittel, 2-Bromoethansulfonat und H ₂	61
2.4.8 Hemmung mit Antibiotika.....	63
2.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	64
3. Analyse von Rice Cluster I-<i>Archaea</i> in Anreicherungskultur.....	66
3.1 Wachstumsbedingungen der Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	66
3.1.1 Wachstum mit verschiedenen Substraten	66
3.1.2 Temperaturoptimum	68
3.1.3 Einfluss des Reduktionsmittels.....	68
3.1.4 Stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung.....	69
3.1.5 Abundanz der Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	70
3.1.6 Phylogenetische Diversität der <i>Bacteria</i>	72
3.2 Weitere Anreicherung der Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	73
3.2.1 Isolierung mit Hilfe von „roll tubes“	73
3.2.2 Mikrobielle Diversität der Kulturen MRE50-1, MRE50-5 und MRE50-6	73
3.3 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung und Autofluoreszenz der Rice Cluster I- <i>Archaea</i>	74
4. Untersuchung der <i>Archaea</i> im Tiefenprofil eines Walbodens.....	76
4.1 Analyse verschiedener Bodenparameter	76
4.2 Abundanz der <i>Archaea</i>	78
4.3 Phylogenetische Diverstität der <i>Archaea</i>	79
IV DISKUSSION.....	85
1. Phänotypische Charakterisierung der Rice Cluster III-<i>Archaea</i>.....	85

2. Phänotypische Charakterisierung der Rice Cluster I-<i>Archaea</i>.....	92
3. Abundanz und Diversität unkultivierter <i>Archaea</i> in einem Waldboden	99
4. Abschließende Betrachtung	104
V LITERATUR.....	105

Abkürzungen

BES	2-Bromoethansulfonat
bp	Basenpaare
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FAM	Carboxyfluorescein
g TG	Gramm Trockengewicht
<i>mcrA</i>	Gen für die α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase
n	Anzahl der Proben
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
ppmv	Mischungsverhältnis: „part per million by volume“
RC	Rice Cluster
SE	Standardfehler
T-RFLP	Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
v/v	Volumen pro Volume („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volume („weight per volume“)

Zusammenfassung

Die molekularbiologische Untersuchung von Böden führte in den letzten Jahren zu einer stetigen Zunahme der Zahl unkultivierter *Archaea*. Dabei wurden Sequenzen verschiedener Linien innerhalb der *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* detektiert. Über die Physiologie dieser Mikroorganismen ist bislang kaum etwas bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über unkultivierte *Archaea* zu erhalten.

Die Anreicherung der Rice Cluster (RC-) III-*Archaea* (verwandt mit *Thermoplasmatales*) aus zwei anoxischen Böden der Flutungsebene des Flusses Waal erfolgte anaerob in einem Mineralmedium mit Hefeextrakt als komplexem Substrat. Mit Hilfe der T-RFLP-Methode und der phylogenetischen Analyse von Klonsequenzen wurde die erfolgreiche Anreicherung dieser *Euryarchaeota* gezeigt. Unter Anwendung der Real Time-PCR-Methode war es möglich, das Wachstum der RC-III-*Archaea* innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft in Kultur zu verfolgen. Dieser langsam wachsende Mikroorganismus (Verdopplungszeit von ≤ 3 Tagen) zeigte eine hohe Abundanz innerhalb der *Archaea* ($\leq 60\%$). Da die Kultur jedoch einen hohen Hintergrund verschiedener Bakterien (10^9 16S rDNA-Zielmoleküle pro ml) enthielt, betrug der relative Anteil von RC-III nur ca. 0,1% an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft. Dennoch konnte der Phänotyp der RC-III-*Archaea* beschrieben werden. Sie wurden als anaerobe, heterotrophe, mesophile und neutrophile Mikroorganismen charakterisiert, die vermutlich an der Fermentation von Oligopeptiden beteiligt sind. Durch die weitere Anreicherung mit Pepton als Substrat wurde die kokkoide Zellform mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gezeigt.

Weiterhin wurde die Abundanz sowie der Phänotyp der methanogenen RC-I-*Archaea* einer Anreicherungskultur aus Reisfeldboden (Lueders *et al.*, 2001) untersucht. Der Anteil dieser *Euryarchaeota* betrug $\geq 50\%$ der mikrobiellen Gemeinschaft. Die RC-I-Methanogenen waren thermophil und hydrogenotroph, konnten aber ebenfalls mit Formiat wachsen. Trotz der nahen Verwandtschaft zu den acetoclastischen *Methanosarcinales* waren die RC-I-*Archaea* nicht in der Lage, mit Acetat zu wachsen. Erstmals gelang eine Vereinzelnung von RC-I durch Koloniebildung in festem Medium. Die RC-I-*Archaea* wurden jedoch nur in Begleitung einer charakteristischen bakteriellen Begleitflora isoliert. Der Nachweis des Coenzym F₄₂₀, welches im methanogenen Stoffwechsel vorkommt, gelang anhand der Autofluoreszenz der stäbchenförmigen Zellen.

Durch die molekularbiologische Untersuchung des Tiefenprofils eines Waldbodens konnten drei unkultivierte Linien der *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* nachgewiesen werden. Die *Euryarchaeota* waren am nächsten mit den *Thermoplasmatales* verwandt. Die Sequenzen der *Crenarchaeota* gruppierten in den von DeLong (DeLong, 1998) beschriebenen Linien 1.1b und 1.1c. Die T-RFLP-Analyse der verschiedenen Bodenschichten konnte eine Dominanz der *Crenarchaeota* (vor allem der Linie 1.1c) nachweisen. Mit Hilfe der Real Time-PCR-Methode wurde die Zahl der *Archaea* und *Bacteria* ermittelt. Die Zahl der *Archaea* veränderte sich zwar kaum mit der Bodentiefe, ihr relativer Anteil an der gesamten Mikrobenflora nahm jedoch zu und betrug ca. 60%. Dieser Anteil stellt im Vergleich mit vorherigen Studien von Böden eine sehr hohe Abundanz dar.

I Einleitung

1. Die Domäne der *Archaea*

Das Reich der Prokaryoten wird anhand der phylogenetischen Verwandtschaft der 16S rRNA in Eubakterien (*Bacteria*) und Archaeobakterien (*Archaea*) unterteilt. Die meisten *Archaea* lassen sich optisch (Größe und Form) nicht von den *Bacteria* unterscheiden, obwohl einige sehr eigene Zellformen, wie z.B. polygonale Zellen oder sehr unregelmäßige Kokken, zeigen (Forterre, 2002). Sie teilen Charakteristika sowohl mit den *Bacteria* als auch mit den *Eukarya*, besitzen jedoch auch spezielle Eigenschaften. Die geringe Zellgröße, das Fehlen eines Zellkerns, die geringe Genomgröße und die nicht-mitotische Zellteilung zählen z.B. zu den Gemeinsamkeiten mit den *Bacteria*. Im Gegensatz dazu sind die *Archaea* nicht nur phylogenetisch näher mit den *Eucarya* als mit den *Bacteria* verwandt, sie besitzen auch gemeinsame Elemente des Transkriptions- und Translationsapparates (Olsen und Woese, 1997). Einzigartige Merkmale stellen unter anderem die archaeellen Zytoplasmamembranen und Zellwände dar. Die Membranen bestehen aus Glycerinethern mit C₂₀ (Phytanyl)- und C₄₀ (Biphytanyl)-isoprenoidalkylen (Kates, 1993). Innerhalb der *Archaea* findet man Zellwände, die aus Pseudopeptidoglycan, Polysacchariden, Proteinen oder Glyceroproteinen aufgebaut sind (Kandler und König, 1993). Eine für *Bacteria* typische Mureinschicht findet man in dieser Domäne nicht, wodurch diese Mikroorganismen unempfindlich gegenüber Zellsynthese inhibierenden Antibiotika sind.

Die Domäne der *Archaea* unterteilt sich auf der Basis der 16S rDNA-Verwandtschaft in vier Königreiche (Phyla). Die kultivierten Vertreter der *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* wurden zum größten Teil aus „extremen“ Habitaten isoliert. Die *Korarchaeota* und *Nanoarchaeota* konnten hingegen bisher nur durch die direkte 16S rDNA-Analyse in Umweltproben nachgewiesen werden (Barns *et al.*, 1994; Barns *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2002). Die *Crenarchaeota* umfassen die drei Ordnungen *Thermoproteales*, *Desulfurococcales* und *Sulfolobales* (Itoh, 2003). Die bisher kultivierten Arten sind ausschließlich hyperthermophil bis thermophil und meist chemolithoautroph. Das Phylum der *Euryarchaeota* ist durch neun Ordnungen (*Halobacteriales*, *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, *Thermoplasmatales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* und *Methanopyrales*) charakterisiert. Die

Euryarchaeota bilden eine physiologisch diverse Gruppe, in der die meisten kultivierten Vertreter ebenfalls unter extremen Lebensbedingungen vorkommen. So wurden aus sehr salzhaltigen Habitaten verschiedene Arten der meist obligat anaerob und chemoorganotroph wachsenden Halobakterien isoliert. *Natronobacterium* und *Natronomanas*-Arten sind zudem extrem alkaliphil. Meist hyperthermophile und chemoorganotrophe, sowie chemolithotrophe Arten findet man innerhalb der *Archaeoglobales* und *Thermococcales*.

Zu den *Thermoplasmatales* gehören bisher nur sechs beschriebene Arten, die in drei Genera der *Thermoplasma*, *Picrophilus* und *Ferroplasma* unterteilt sind. Die *Thermoplasma*-Arten wurden aus Kohleabraumhalden und, wie auch die *Picrophilus*-Arten, aus sauren Schwefelfeldern (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988; Schleper *et al.*, 1995) isoliert. Die *Ferroplasma*-Arten stammen aus einer Pyrit-haltigen Bioreaktorpilotanlage (Golyshina *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004). Gemeinsam ist ihnen die acidophile und aerobe Lebensweise, wobei die *Picrophilus*-Arten die einzigen bekannten Organismen sind, die bei pH 0 wachsen können. Die *Thermoplasma*- und *Ferroplasma*-Arten sind außerdem in der Lage, unter anoxischen Bedingungen durch Schwefelrespiration bzw. Eisen(III)-Reduktion zu wachsen. Im Gegensatz zu diesen heterotrophen und thermophilen Mikroorganismen sind die *Ferroplasma*-Arten mesophil und vermutlich chemoautotroph oder chemoorganotroph (Dopson *et al.*, 2004).

Die größte physiologische Gruppe stellen die Methan bildenden *Euryarchaeota* dar. Sie besitzen einen hoch spezialisierten Metabolismus, da sie Acetat, H₂ und CO₂, Formiat und / oder andere C₁-Verbindungen wie Methanol, Methylthiole und Methylamine als Energiesubstrate nutzen (Thauer, 1998). Die C₁-Verbindungen werden entweder zu CO₂ und CH₄ disproportioniert oder mit H₂ zu CH₄ reduziert. Nur die *Methanosarcinales* sind in der Lage, Acetat zu CO₂ und CH₄ zu fermentieren und können auf Methanol, Methylthiolen oder Methylaminen als einziger Energiequelle wachsen. Einige Methanogene bilden Methan aus CO₂ mit Alkoholen (Ethanol, 1-Propanol und 2-Butanol, Pentanol) als Quelle für Reduktionsäquivalente (Bleicher *et al.*, 1989; Zellner und Winter, 1987a). CO kann ebenfalls von einigen Methanogenen genutzt werden, stellt aber kein wichtiges Substrat dar (Garcia *et al.*, 2000; Le Mer und Roger, 2001). Trotz der metabolischen Spezialisierung der Methanogenen bilden sie eine phylogenetisch diverse Gruppe. Sie unterscheiden sich außerdem in ihrem Zellwandaufbau (Sprott und Beveridge, 1993; Kandler und König, 1998), sind morphologisch divers und haben verschiedene Wachstumsoptima. Die meisten bekannten Methanogenen leben hinsichtlich ihrer

Temperatur- und Salzkonzentrationsoptima mesophil bis „extremophil“. Allen gemeinsam ist die strikt anaerobe Lebensweise und der Energiemetabolismus, welcher durch eine Reihe einzigartiger Coenzyme (z.B. Methanofuran, Tetrahydromethanopterin, Deazaflavin F₄₂₀, Coenzym-M und B) charakterisiert ist (Thauer, 1998). Methanogene *Archaea* kommen zum Beispiel in natürlich anoxischen Habitaten wie marinen Sedimenten und Süßwassersedimenten, in Mooren und Sumpfgebieten, im Verdauungstrakt von Tieren, hydrothermalen Spalten und auch als Endosymbionten in verschiedenen anaerob lebenden Protozoen vor. Auch anthropogen verursachte anoxische Standorte wie geflutete Reisfeldböden und Mülldeponien sind Quellen der Methanproduktion.

Aufgrund ihrer Verbreitung werden die *Archaea* oft als die dominierende, prokaryotische Gruppe extremer Standorte bezeichnet. Dies trifft tatsächlich für sehr heiße Standorte zu, da nur Vertreter der *Archaea* bei Temperaturen über 95°C (bis zu 113°C) gedeihen können (Huber *et al.*, 2000). In Habitaten mit hohen Salzkonzentrationen, niedrigen oder hohen pH-Werten, niedrigen Temperaturen, sowie unter hohem Druck findet man jedoch ebenfalls Vertreter der *Bacteria* und *Eukarya* (Rothschild und Mancinelli, 2001).

2. Molekulare Revolution der mikrobiellen Diversität

Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden im letzten Jahrzehnt führte zu einer entscheidenden Wende der Sichtweise über die Phylogenie und Diversität des Lebens.

Sie begann im Jahre 1990 mit dem Postulat von Woese, Kandler und Wheelies (Woese *et al.*, 1990). Die bis dahin angenommene Zweiteilung allen zellulären Lebens in *Procaryotae* und *Eukaryotae* wurde für unzureichend erklärt. Basierend auf den Analysen der ribosomalen RNA (16S der Prokaryoten bzw. 18S der Eukaryoten) wurde das Konzept der drei Domänen (*Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya*) entwickelt. Diese Dreiteilung beruhte nicht nur auf phylogenetischer Basis, sondern wurde ebenfalls durch die biochemischen und zytologischen Kenntnisse (siehe Abschnitt 1) unterstützt.

Die ersten Ideen, mikrobielle Gemeinschaften durch die direkte Analyse von ribosomaler RNA aus Umweltproben zu untersuchen und mit Hilfe von Oligonucleotidsonden Organismen zu identifizieren und zu quantifizieren, wurden 1985 unter der Leitung von Norman Pace entwickelt (Pace *et al.*, 1985; Olsen *et al.*, 1986; Giovannoni *et al.*, 1988). Diese kultivierungsunabhängigen Methoden etablierten sich bald auf dem Gebiet der mikrobiellen Ökologie und basieren vor allem auf der Analyse der 16S rRNA-Gene. Waren es 1987 noch 11 Phyla, die von Carl Woese beschrieben wurden (Woese, 1987), so

stieg die Anzahl der Phyla 2002 bereits auf 52 (Rappe und Giovannoni, 2003). Davon zählten 26 zu so genannten „candidate phyla“ oder „candidate divisions“ (Hugenholtz *et al.*, 1998), da diese nur durch Klonsequenzen bekannt und keine kultivierten Vertreter beschrieben waren. Basierend auf diesen Sequenzdaten lassen sich wiederum für jede taxonomische Gruppe Oligonucleotidsonden formulieren.

Mit Hilfe spezifischer Sonden ist es prinzipiell möglich nicht nur die Zellmorphologie unkultivierter Mikroorganismen durch *in situ* Hybridisierung darzustellen, sondern auch Mikroorganismen ohne Kultivierungstechniken zu quantifizieren (Olsen *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995). Dabei wird die rRNA innerhalb von fixierten, intakten Zellen durch die Bindung markierter Sonden detektiert. Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) sind die Oligonucleotidsonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, welcher durch die Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge im Epifluoreszenzmikroskop detektiert wird (DeLong *et al.*, 1989).

Die Quantifizierung von Mikroorganismen kann jedoch auch indirekt durch PCR (polymerase chain reaction) basierende Methoden erfolgen. Eine der quantitativen PCR-Techniken ist die sogenannte „Real Time-PCR“, bei der die Quantifizierung von Ziel-DNA-Molekülen auf der Anwendung der Messprinzipien der kinetischen PCR beruht (Raeymaeckers, 2000). Die PCR folgt einer sigmoiden Kinetik. Der Beginn der exponentiellen Phase der Kinetik ist abhängig von der Zahl der zu amplifizierenden Zielmoleküle, die in dieser Phase verdoppelt werden. Die Detektion der sich anhäufenden PCR-Produkte erfolgt durch einen Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet (Stubner, 2002). Durch die Eichung mit Hilfe quantitativer Standards lassen sich die Zielmolekülzahlen in DNA-Proben bestimmen. Im Vergleich zur Quantifizierung von Mikroorganismen mit FISH, stellen die ermittelten Zielmolekülzahlen der Real Time-PCR-Methode keine absoluten Werte dar, da Mikroorganismen zwischen 1 bis 15 Kopien der 16S rRNA-Gene besitzen. Jedoch lassen sich phylogenetische Gruppen geringer Zahl detektieren, während die Quantifizierung von Zellen im Epifluoreszenzmikroskop (FISH) durch eine geringe Abundanz bereits durch das Sichtfeld, sowie durch einen geringen rRNA-Gehalt der Zellen limitiert ist (Suzuki *et al.*, 2000).

Weiterhin wurden verschiedene molekularbiologische Techniken entwickelt, die bei der Untersuchung der Diversität mikrobieller Gemeinschaften angewendet werden. Die auch als „fingerprints“ bezeichneten Methoden eignen sich zur Analyse zeitlicher und räumlicher Änderungen der 16S rRNA- und funktioneller Markergene (Santegoeds *et al.*, 1998; Lüdemann *et al.*, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Marschner und Rumberger,

2004). Die T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)-Methode (Liu *et al.*, 1997) basiert auf der PCR-vermittelten Amplifikation phylogenetischer Gruppen mit einem fluoreszenzmarkierten Primer und der anschließenden Restriktion der Produkte. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente mittels Gelelektrophorese, werden nur die Fragmente, welche terminal markiert sind, analysiert. Im Idealfall gibt jedes terminale Restriktionsfragment die relative Abundanz einer phylogenetischen Gruppe wieder.

Metagenomanalysen aus Umweltproben (Schleper *et al.*, 1997; Handelsman *et al.*, 1998; Beja *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000) wie auch stabile Isotopenbeprobung von Umweltproben (Radajewski *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2002; Radajewski *et al.*, 2003; Lueders *et al.*, 2004) werden erfolgreich eingesetzt, um potentielle metabolische Fähigkeiten und die ökologische Bedeutung bisher unkultivierter Gruppen zu untersuchen.

3. Phylogenetische Diversität der *Archaea*

Noch vor ca. 25 Jahren glaubte man, dass die *Archaea* nur in extremen Habitaten vorkommen, da sie (für das menschliche Verständnis) nicht aus „normalen“ Standorten isoliert wurden (Woese *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1994). Sie wurden als nicht-konkurrenzfähige Relikte betrachtet, die keine bedeutende Rolle in der globalen Ökologie spielen. 1992 wiesen DeLong (DeLong, 1992) und Fuhrman (Fuhrman *et al.*, 1992) erstmals mit Hilfe molekularer Methoden unabhängig voneinander 16S rDNA-Sequenzen in nicht-extremen marinen Habitaten nach. Diese wurden im oxischen Oberflächen- bzw. Tiefenwasser detektiert und waren nur entfernt mit den kultivierten, meist thermophilen *Eury-* und *Crenarchaeota*, verwandt. Der GC-Gehalt dieser neuen Sequenzen betrug 51 bis 57% und war im Vergleich zum GC-Gehalt thermophiler Arten (60 bis 69%) sehr niedrig. Dies deutete auf eine mesophile Lebensweise der unbekanntenen *Archaea* hin und schloss somit die Kontamination mit Sequenzen aus heißen Standorten aus. In den darauf folgenden Jahren wurden zunehmend Umweltsequenzen in marinen und terrestrischen Habitaten detektiert, welche die weite Verbreitung, aber auch die Vielfalt der *Archaea* verdeutlichten. So wurden z.B. in oxischen Böden, wie z.B. Wald- und Agrarböden (Jurgens *et al.*, 1997; Bintrim *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1995) und in anoxischen Reisfeldböden (Kudo *et al.*, 1997; Großkopf *et al.*, 1998b, Chin *et al.*, 1999a) Sequenzen bislang nicht-kultivierter Linien gefunden.

Die in Reisfeldböden detektierten Linien innerhalb der *Eury-* und *Crenarchaeota* bezeichneten Großkopf und Mitarbeiter (Großkopf *et al.*, 1998b) als Rice Cluster (RC-) I

bis VI. Über die Physiologie dieser *Archaea* lassen sich jedoch anhand der phylogenetischen Verwandtschaft keine Aussagen machen. Erste Hinweise auf die methanogene Natur von RC-I erhielt man durch MPN (most probable number)-Experimente mit Reiswurzelnkubationen in H_2/CO_2 inkubierten Anreicherungskulturen (Lehman-Richter *et al.*, 1999). Weitere Kultivierungsversuche aus einer Reisfeldbodenaufschlammung (Lueders *et al.*, 2001) und einem Torfmoor (Sizova *et al.*, 2003) führten zur Anreicherung von zueinander nah verwandten RC-I-*Archaea*. Aufgrund dieser Anreicherungskulturen konnte man zeigen, dass diese neuen Mikroorganismen Methan produzieren und das Gen der α -Untereinheit der Methyl-CoenzymM-Reduktase (Ermler *et al.*, 1997), welches ein Schlüsselenzym der Methanogenese ist, besitzen (Lueders *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die relative Abundanz von RC-I innerhalb der *Archaea* in anoxisch inkubierten Reisfeldböden mit steigender Temperatur zunahm (Fey und Conrad, 2000; Fey *et al.*, 2001). Die Anreicherung von RC-II-*Archaea* durch die Inkubation mit Ethanol deutete ebenfalls auf einen methanogenen Stoffwechsel dieser unkultivierten Mikroorganismen hin (Lehman-Richter *et al.*, 1999). Da RC-III phylogenetisch mit den *Thermoplasmatales* verwandt ist, besitzen diese Mikroorganismen vermutlich andere metabolische Fähigkeiten. RC-III-Sequenzen wurden nicht nur im Reisfeldboden und an der Reiswurzel detektiert, sondern konnten ebenfalls in anoxischen Böden der Flutungsebene des Flusses Waal (Niederlande) nachgewiesen werden (Kemnitz *et al.*, 2004). Der Anteil dieser Gruppe betrug in beiden Habitaten maximal 10% (Chin *et al.*, 1999a; Fey *et al.*, 2001; Fey und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000; Kemnitz *et al.*, 2004). Neben den RC-III-Sequenzen wurden ebenfalls *Thermoplasmatales* verwandte Umweltsequenzen in marinen und terrestrischen Habitaten gefunden, die von DeLong in die Linien „Group 2 und 3“ untergliedert wurden (DeLong, 1998). Auch die Physiologie der RC-V-*Euryarchaeota* ist bislang noch ungeklärt. Die RC-IV und VI stellen unkultivierte Linien innerhalb der *Crenarchaeota* dar und gruppieren zusammen mit einer Vielzahl weiterer Umweltsequenzen, die auch als „Group 1.1 bis 1.3“ bekannt sind (DeLong, 1998; Jurgens *et al.*, 2000). Eine weitere Benennung dieser Linien („Terrestrial“ und „Freshwater Cluster“) wurde von Buckley geprägt (Buckley *et al.*, 1998).

Die ständige Entdeckung neuartiger 16S rDNA-Sequenzen aus „nicht-extremen“ Habitaten veränderte die Ansicht über die Spezialisierung der *Archaea* deutlich. Diese Erkenntnisse markierten den Beginn einer neuen Ära (Aravalli *et al.*, 1998). Welche physiologischen

und metabolischen Eigenschaften besitzen diese unkultivierten *Archaea*, und welche biologische Rolle spielen sie in komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften?

4. Zurück zu den Wurzeln der Mikrobiologie – Kultivierung „Unkultivierter“

Vor der Revolutionierung der Mikrobiologie durch die beschriebenen molekularbiologischen Methoden „wurde ein erfolgreicher Mikrobiologe an seinen Fähigkeiten gemessen, Mikroorganismen zu kultivieren.“ (Amann *et al.* 1995). Die Isolierung und anschließende Untersuchung von Reinkulturen war der erste und zwingende Schritt, um Mikroorganismen zu charakterisieren und klassifizieren zu können. Die ersten Techniken um Reinkulturen zu erhalten, wurden ursprünglich von De Bary und Brefeld zur Untersuchung von Pilzen entwickelt (Bull und Slater, 1982). Diese Methoden eigneten sich jedoch nicht zur Isolierung von Mikroorganismen. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelten Robert Koch und Mitarbeiter Methoden, Medien und Zubehör, auf denen ein Großteil der heute angewandten mikrobiellen Kultivierungstechniken basieren (Gottschal *et al.*, 1992). So wurden z.B. die Verfestigung von Medien mit Agar (Hesse), geschlossene Kulturschalen (Petri) und Färbetechniken (Koch und Ehrlich) eingesetzt, um Mikroorganismen zu untersuchen. Die ersten Versuche zur Kultivierung anaerober Mikroorganismen (Entfernung von O₂ mit alkalischem Pyrogallol, versiegelte Gefäße, Picken von Kolonien mit Kapillarpipetten, Begasung mit Wasserstoff) begannen bereits nach 1880. Bis 1940 kannte man jedoch hauptsächlich nur anaerobe Sporenbildner, die von medizinischer Wichtigkeit waren. Die meisten heute beschriebenen anaeroben Mikroorganismen aus Sedimenten, Böden, Verdauungstrakten und anderen Habitaten waren noch unbekannt. Die Ursachen lagen in den unzureichend anaeroben Bedingungen und den Medien, mit denen die natürlichen Standortbedingungen nicht simuliert wurden. Hungate entwickelte basierend auf älteren Studien die sogenannte „roll tube“-Technik und verwendete dafür Habitat-nachahmende Medien zur Isolierung strikt anaerober Pansenbakterien (Hungate, 1950; Hungate 1969).

Die gezielte und erfolgreiche Kultivierung von Mikroorganismen ist von einer Vielfalt von Parametern abhängig. So zählen zum Beispiel der pH-Wert und die damit verbundene Wahl des Puffersystems, die Temperatur, die Verfügbarkeit des Sauerstoffs, die Zugabe von Reduktionsmitteln bei anoxischer Inkubation und insbesondere der Einsatz des Substrates und Elektronenakzeptoren zu den entscheidenden Wachstumsfaktoren. Bei der Wahl des Substrates unterscheidet man zwischen Selektiv- (= Minimal-) und

Komplexmedien. Bei der selektiven Anreicherung ist man bestrebt, die minimalen Nährstoffansprüche zu erfüllen und ein Medium zu entwickeln, das nicht mehr Bestandteile enthält als für den Mikroorganismus zum Leben notwendig sind. Dadurch kann man das Wachstum unerwünschter Bakterien unterdrücken. Voraussetzung dieser Kultivierungsstrategie ist ein bereits bekannter Metabolismus. Für viele anspruchsvolle Mikroorganismen sind die Nährstoffbedürfnisse noch nicht genügend oder gar nicht bekannt. Um ein relativ breites Substratspektrum anzubieten werden komplexe Quellen wie Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton oder Hefeautohydrolysat verwendet. Auch andere Zusätze wie zum Beispiel Rumenfluid oder Brauereimalzextrakt werden zur Förderung des Wachstums eingesetzt. Wurde ein bestimmter Mikroorganismus angereichert, ist die Isolierung einer Reinkultur der nächste Schritt. Konventionelle Methoden sind die Anwendung von Verdünnungsreihen oder das Picken von Kolonien, die aus einer Zelle geklont wurden. Letzteres erfolgt durch die mechanische Trennung der Mikroorganismen auf oder in festem Medium. Doch nur ein geringer Prozentsatz der Mikroorganismen ist unter diesen Bedingungen in der Lage Kolonien zu bilden (Huber *et al.*, 1995). Die Verdünnung von Anreicherungskulturen erfordert dagegen eine hohe Anreicherung des gesuchten Mikroorganismus.

Obwohl bis heute mehr als 6200 Mikroorganismen isoliert und beschrieben wurden (Oren, 2004), stellt dies nur weniger als 1% der Mikroorganismen aus terrestrischen und aquatischen Habitaten dar (Schut *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1995). Die beschriebenen klassischen Kultivierungstechniken erfordern den Einsatz geeigneter Medien, damit die verschiedenen Mikroorganismen der jeweiligen Umweltproben wachsen und anschließend durch die Vereinzelung von Zellen isoliert werden können. Die Verwendung spezieller Medien und die Trennung der mikrobiellen Gemeinschaft führt oft zum Verlust des Hauptanteils der Mikroorganismen (Entcheva *et al.*, 2001). Die durch direktes Mikroskopieren erhaltenen Zellzahlen sind meist um einige Größenordnungen höher, als die durch Koloniebildung auf Platte oder MPN (most probable number)-Techniken erhaltenen Zellzahlen. Diese Beobachtung wurde von Staley und Konopka bereits 1985 als „great plate count anomaly“ beschrieben (Staley und Konopka, 1985). Die Ursachen dieses Phänomens wurden bereits oft diskutiert. Es zeichnet sich immer mehr ab, dass die konventionellen Medien, die im 19. Jahrhundert entwickelt wurden, für einen Großteil der Mikroorganismen zu hohe Nährstoff- und Salzkonzentrationen enthalten (Schut *et al.*, 1993; Torsvki *et al.*, 1990; Bartscht *et al.*, 99; Connon und Giovannoni, 2002). Für die meisten chemoorganotrophen Mikroorganismen, die in oligotrophen Standorten

vorkommen, spiegeln diese Voraussetzungen keine natürlichen Bedingungen wieder (Oren, 2004). Viele Mikroorganismen leben in Symbiosen (mit anderen Mikroorganismen oder Tieren) und lassen sich nicht allein kultivieren. Eine völlig andere Erklärung der „great plate count anomaly“ wurde bereits bei kultivierten Bakterien beobachtet (bei 35 Arten der Proteobakterien beschrieben, siehe McDougald und Kjelleberg, 1999). Unter ungünstigen Bedingungen (zu hoher oder niedriger Salzgehalt, oxidativer Stress, niedrige Temperaturen, etc.) befinden sich die Zellen in einem latenten Stadium. Sie zeigen zwar Signale metabolischer Aktivität und sind somit lebensfähig, jedoch lassen sie sich nicht mehr kultivieren und bilden keine Kolonien (Oren, 2004). Vermutlich besitzen viele der noch nicht kultivierten Arten neue Phänotypen (Forterre, 2002). Erst kürzlich wurden die in anoxischen, marinen Sedimenten detektierten unkultivierten *Euryarchaeota* als anaerobe Methanoxidierer (ANME-Linien 1 und 2) identifiziert, die in Syntrophie mit Sulfat reduzierenden *Bacteria* leben (Orphan *et al.*, 2001).

Es ist offensichtlich, dass die etablierten Kultivierungs- und Isolierungsmethoden für die meisten Prokaryoten unzureichend sind. In den letzten Jahren wurden neue Kultivierungsstrategien entwickelt und technische Fortschritte errungen. In den 80er Jahren wurde eine optische Pinzette entwickelt, mit deren Hilfe man einzelne Zellen durch einen Infrarotlaser manipulieren und trennen kann (Ashkin *et al.*, 1987). Huber und Mitarbeiter wendeten diese Technik erfolgreich an, um ein bis dahin nur aus Umweltanalysen bekanntes Archaeon zu isolieren (Huber *et al.*, 1995). Unter Verwendung von unbehandeltem, steril filtriertem Meerwasser und der Zugabe niedriger Nährstoffkonzentrationen konnten verschiedene marine Mikroorganismen durch Verdünnungstechniken isoliert werden (Button *et al.*, 1993; Schut *et al.*, 1993). Connon und Giovannoni (2000) entwickelten diese als „dilution to extinction“ bezeichnete Strategie zu einer „High throughput“-Methode weiter. Dabei werden Mikrotiterplatten und Zellarrays eingesetzt, die mikroskopisch mit Hilfe spezifischer Sonden (FISH) auf neue Mikroorganismen gescreent werden (Connon und Giovannoni, 2002; Rappe *et al.*, 2002). Mit dieser Technik wurde ein in den Weltmeeren abundantes α -Proteobakterium isoliert (SAR11), welches nur sehr geringe Zelldichten von 6 bis $7 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ erreicht (Rappe *et al.*, 2002). Die Kombination von Kultivierung und molekularbiologischen Techniken wurde in den letzten Jahren zunehmend attraktiver (Gonzalez *et al.*, 1996; Santegoeds *et al.*, 1996; Entcheva *et al.*, 2001; Toffin *et al.*, 2004). Die Analyse mikrobieller Gemeinschaften in Anreicherungskulturen mit Hilfe von FISH oder PCR-basierenden Methoden (z.B. DGGE oder T-RFLP) ermöglicht die schnelle Detektion bisher

unkultivierter Mikroorganismen. Die Erkenntnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die begrenzte Kultivierbarkeit durch die Limitierung der angewandten Methoden begründet war. Die Kultivierung und Isolierung neuer Mikroorganismen rückt wieder in das Zentrum des Interesses der mikrobiellen Ökologie.

5. Ziel der Arbeit

Der Standort Boden stellt sowohl physiko-chemisch als auch mikrobiologisch einen sehr komplexen Lebensraum dar, in dem mehrere tausend verschiedene mikrobielle Arten vorkommen (Torsvik *et al.*, 1990; Dykhuizen *et al.*, 1998). In vorangegangenen molekularbiologischen Untersuchungen konnte die Diversität und Verbreitung unkultivierter *Archaea* in oxischen und anoxischen Böden nachgewiesen werden. Über die Physiologie und ökologische Bedeutung dieser unkultivierten Arten ist jedoch bisher kaum etwas bekannt. In der folgenden Arbeit sollte diese Fragestellung durch die Untersuchung folgender Schwerpunkte verfolgt werden:

- Welche physiologischen Eigenschaften besitzen RC-III-*Archaea* in anoxischen Böden? Sind diese Mikroorganismen kultivierbar?
- Wie abundant sind RC-I-*Archaea* in einer methanogenen Anreicherungskultur (Lueders *et al.*, 2001)? Welche phänotypischen Eigenschaften besitzen sie? Besteht die Möglichkeit diese neuen *Euryarchaeota* weiter anzureichern oder sogar zu isolieren?
- Wie abundant und divers sind bisher unkultivierte *Archaea* im Boden des Marburger Waldes? Besteht ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Bodenparametern und den vorhandenen *Archaea*?

Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in den Anreicherungskulturen als auch in den Bodenproben sollte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden erfolgen. Zu diesem Zwecke sollten die T-RFLP- und vergleichende Sequenzanalyse (Diversität der phylogenetischen Gruppen), die Real Time-PCR-Methode (Quantifizierung phylogenetischer Gruppen) und die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Visualisierung phylogenetischer Gruppen) angewandt werden.

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Sterilisationsverfahren

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit demineralisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren (30 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Nr. FP 30/0,2 CA-5, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

1.2 Chemikalien und Gase

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p.A.-Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Darmstadt), BioRad Laboratories (München), Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Becton Dickinson und Eppendorf AG (Hamburg) bezogen.

Von der Firma Messer-Griesheim (Frankfurt) wurden folgende technische Gase eingesetzt. Als Eichgase dienten H₂ in Stickstoff und ein CH₄-, CO₂-, CO-Gemisch in Stickstoff. Zur Begasung von Proben oder Kulturen wurden N₂, ein N₂/CO₂-Gemisch (80/20 %) und ein H₂/CO₂-Gemisch (80/20 %) verwendet.

2. Verwendete Bodenproben

2.1 Böden eines Flutungsgebietes des Flusses Waal

Für anaerobe Anreicherungsexperimente der bisher unkultivierten Rice Cluster (RC-) III *Archaea* wurden bereits charakterisierte Böden von zwei Standorten im Flutungsgebiet des Flusses Waal (Niederlande) als Inokulum verwendet (Kemnitz *et al.*, 2004). Die Beprobung der in ihrer jährlichen Flutungsdauer unterschiedlichen Standorte erfolgte im

Dezember 2000 mit 20 cm langen Stechzylinder (3,8 cm Durchmesser). Der permanent geflutete Standort PM (permanent marshland) liegt im Untersuchungsgebiet „Oude Waal“. Der Standort LL (low level) befindet sich im „Ewijkse Waard“ und ist periodisch geflutet. Die Bodenkerne wurden in verschiedene Schichten unterteilt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2 Marburger Waldboden

Die Bodenproben des Waldbodens der Lahnberge Marburg wurden im Juli 2002 (N 50°49'; E 8°48') mit Plexiglasstechzylinder (Durchmesser: 6 cm, Länge: 30 cm) entnommen. Die drei ungestörten Bodenkerne wurden nach Abtragen der Humusschicht bis zu einer Tiefe von 21 cm in 3 cm dicke Schichten unterteilt und für molekularbiologische, sowie chemische Analysen verwendet. Die in Tiefenzonierung einander entsprechenden Schichten der Parallelen wurden vereint und mit einem 2 mm Sieb zerkleinert und homogenisiert. Für die Bestimmung der physiko-chemischen Bodenparameter wurden die Bodenproben sofort weiterverarbeitet. Die für die molekulare Analyse bestimmten Proben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert. Alle Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt.

3. Kultivierungsbedingungen und Anreicherungsexperimente

3.1 Anreicherung von Rice Cluster III-*Archaea*

3.1.1 Medium

Für die Kultivierung von Anreicherungskulturen wurde ein Bicarbonat- und Phosphatgepuffertes Mineralmedium (Scholten *et al.*, 2000) verwendet. Die verschiedenen Komponenten des Mediums wurden als Stammlösungen in demineralisiertem Wasser angesetzt. Je 15 ml der Lösungen (1) und (2), 12,5 ml der Lösung (3), je 1 ml der Lösungen (4a), (4b) (Spurenelementlösungen nach Stams *et al.*, 1993) und Lösung (5) wurden in einem Gesamtvolumen von 960 ml gemischt. Der pH-Wert lag zwischen 6,8 und 6,9. Als Indikator für anoxische Bedingungen wurde 1 ml Resazurinlösung (6) hinzugefügt. Davon wurden je 48 ml in 120 ml Serumflaschen abgefüllt und mit

Butylgummisepten und Alukappe verschlossen. Die Gasphase wurde gegen ein N_2/CO_2 -Gemisch (80% N_2 / 20% CO_2) ausgetauscht, was durch einen Wechsel von Vakuum und Begasen für 10 min erfolgte. Danach wiesen die Flaschen einen Druck von 1,6 bar auf. Weiterhin wurden 2ml der Lösung (7) und 100 μ l der Lösung (8) zugegeben und anschließend bei 121°C für 30 min autoklaviert. Die Lösung (9), bestehend aus einem Vitamingemisch (Wolin *et al.*, 1963) und $CaCl_2 \times 2 H_2O$, sowie die verschiedenen Substrate und Elektronenakzeptoren wurden vor dem Beimpfen steril zugegeben. Der pH-Wert des Mediums betrug 7,0 bis 7,2.

- (1) Pufferlösung I: 200 mM KH_2PO_4 (3 mM Endkonzentration)
- (2) Pufferlösung II: 200 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (3 mM Endkonzentration)
- (3) Salzlösung: 448,6 mM NH_4Cl (5,6 mM Endkonzentration)
39,4 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (0,5 mM Endkonzentration)
410,3 mM $NaCl$ (5 mM Endkonzentration)
- (4a) saure Spurenelementlösung: 1000-fach Stammlösung (1-fache Endkonzentration)
 - 1,53 ml l^{-1} 35%ige HCl
 - 7,5 mM $FeCl_2 \times 4 H_2O$
 - 0,5 mM $ZnCl_2$
 - 0,5 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$
 - 1 mM H_3BO_3
 - 0,5 mM $CoCl_2 \times 6H_2O$
 - 0,5 mM $CuCl_2 \times 2 H_2O$
 - 0,1 mM $NiCl_2 \times 6 H_2O$
- (4b) basische Spurenelementlösung: 1000-fache Stammlösung (1-fache Endkonzentration)
 - 10 mM $NaOH$
 - 0,1 mM $Na_2SeO_3 \times 5 H_2O$
 - 0,1 mM $Na_2SeWO_4 \times 2 H_2O$
 - 0,1 mM $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
- (5) KCl -Lösung: 2 M (2 mM Endkonzentration)
- (6) Resazurinlösung: 0,5 g l^{-1} (0,5 mg l^{-1} Endkonzentration)
- (7) Pufferlösung III: 952,4 mM $NaHCO_3$ (38 mM Endkonzentration)
- (8) Reduktionsmittel: 0,75 M $Na_2S \times 9 H_2O$ (1,5 mM Endkonzentration)
- (9) Vitamin-Calciumchlorid-Lösung:

5,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ / 90 ml H_2O (in Serumflasche mit N_2 -Gasphase); nach dem Autoklavieren wurden 10 ml eines konzentrierten Vitamingemischs (je 20 mg l^{-1} Biotin und Folsäure; 100 mg l^{-1} Vitamin B6; je 50 mg l^{-1} Vitamine B1, B2, B12, Nikotinsäure, D-Ca-Pantothensäure, p-Aminobenzoensäure, Liponsäure) steril filtriert hinzugefügt

3.1.2 Anreicherung von Rice Cluster III-*Archaea* aus Böden

Die Inkubation der Anreicherungskulturen erfolgte mit 0,025% Hefeextrakt (Fa. Fluka) als Substrat und bei verschiedenen Temperaturen (16, 25 und 37°C) im Dunkeln. Zum Animpfen des Mediums wurden je 2 g Boden der Standorte LL und PM (10 – 20 cm Tiefe) mit 4 ml steriler Natriumchloridlösung (0,85%ig) aufgeschlemmt und homogenisiert. Mit einer sterilen Spritze wurde je 1 ml Bodenaufschlammung zum Medium gegeben. Sobald ein Wachstum (Trübung) der Anreicherungskulturen zu sehen war (nach ca. 1 Monat), wurden 10% der Kultur in frisches Medium überführt. Später wurden ausgesuchte Kulturen nach 2 Wochen überimpft.

3.1.3 Wachstumsbedingungen von Rice Cluster III-*Archaea*

Der fortlaufende Transfer der Anreicherungskultur LL 25°C (Bodenaufschlammung LL als Inokulum und Inkubation bei 25°C) wurde als Inokulum für weitere Analysen der RC-III *Archaea* eingesetzt. Die Zellzahl wurde in 2 Wochen alten Kulturen (0,1 % Hefeextrakt) mit einer Helberzählkammer bestimmt. Die Extinktion der Kulturproben wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (= $\Delta\text{OD}_{600\text{nm}}$) mit einem Biophotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

Die Hefeextraktkonzentration wurde von 0,025 auf 0,1% erhöht (drei Parallelen) und jeweils eine Kultur nach 2, 7 und 21 Tagen untersucht. In einem weiteren Experiment wurde die Konzentration auf 0,2 und 0,5% erhöht und die Kulturen 2 Wochen inkubiert.

Die Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung und die Bildung von Stoffwechselprodukten aus 0,1% Hefeextrakt erfolgte in 2 parallelen Anreicherungskulturen (500 ml Medium in 1200 ml Serumflaschen) in einem Zeitraum von 6 Wochen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kulturen durch kurzes Schütteln homogenisiert und anschließend Kultur- und Gasproben entnommen.

Für die Untersuchung verschiedener physiologischer Parameter wurde das Medium und die Inkubationsbedingungen, wie folgt modifiziert und die Anreicherungskulturen, wenn nicht anders erwähnt, mit 0,1% Hefeextrakt bei 25°C inkubiert. Bei allen Experimenten wurden Kontrollen (0,1% Hefeextrakt, 25°C) mitgeführt.

Wachstumsoptima:

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte zwischen 4°C und 50°C. Für die Inkubation bei verschiedenen pH-Werten wurde das Medium nur mit Phosphat gepuffert (N₂-Gasphase) und der pH-Wert in jeder Serumflasche mit steriler 1 M HCl auf pH 3,5; 4,4; 5,5 und 6,3 oder mit steriler 1 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt. Am Ende der Inkubation wurde der pH-Wert kontrolliert. Um den Einfluss der Salinität auf RC-III zu untersuchen, wurde die NaCl-Konzentration von 0,005 M auf 0,01 bis 0,17 M (1 bis 10 g l⁻¹) erhöht.

Kohlenstoffquellen:

Folgende definierte und komplexe Kohlenstoffquellen wurden zu Hefeextrakt-freiem Medium hinzugefügt:

- Gemisch aus Glucose und Fructose (je 1 mM)
- Malzextrakt (Fa. Becton Dickinson, 0,1%)
- Fettsäuregemisch (je 1 mM Acetat, Formiat, Propionat, Butyrat, Lactat, Succinat, Malat [Na-Salze])
- Gemisch aus Ferula- und Syringasäure (je 1 mM)
- Benzoat (1 mM, Na-Salz)
- Pyruvat (10 mM, Na-Salz)
- Gemisch aus Nucleotidbasen (je 1 mM Adenin, Thymin, Uracil, Guanin und Cytosin)
- definierte Aminosäuregemische (Gemisch aus je 1 mM Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, Glu, Arg, His, Gly; Gemisch aus je 1 mM Trp und Tyr; 1 mM Phe [Na-Salze])
- Glycerol (0,2%)
- Ethanol (0,4%)
- Methanol (0,4%)

- Fleischextrakt (Fa. Merck; 0,1%)
- Pepton („Caseinhydrolysat (pankreatischer Verdau)“ und „Pepton aus Casein (pankreatischer Verdau)“, beide Fa. Fluka; je 0,1%)
- Trypton („Pepton aus Casein (tryptischer Verdau)“ Fa. Fluka und „Bactotryptone“ Fa. Becton Dickinson; je 0,1%)
- Rinderserumalbumin (Fa. Sigma; 0,1%)

Die Anreicherungskultur wurde zur Kontrolle ebenfalls auf Substrat freiem Medium (mit Vitaminen) inkubiert.

Elektronenakzeptoren:

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener, alternativer Elektronenakzeptoren auf das Wachstum von RC-III überprüft. Folgende Elektronenakzeptoren wurden dem Medium (0,1% Hefeextrakt) hinzugefügt:

- Nitrat (5 mM, Na-Salz)
- Sulfat (3, 5 and 8 mM, Na-Salz)
- Eisen(III)-Chlorid (8 mM)
- Thiosulfat (8 mM, Na-Salz)
- 9,10-Anthraquinone-2,6-Disulfonat (= AQDS; 2 mM, Na-Salz)
- Fumarat (8 mM, Na-Salz)
- elementarer Schwefel (0,1%)

Für die Zugabe folgender Elektronenakzeptoren wurde das Medium ohne Reduktionsmittel angesetzt:

- Fe(III)-Citrat (8mM), Citrat als Kontrolle (8mM)
- Ferrihydrit ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$; 10 mM)
- AQDS-Ferrihydrit-Gemisch (je 0,5 mM)

Für die Inkubation unter oxischen Bedingungen (Luft als Gasphase) war das Medium nur mit Phosphat gepuffert und enthielt ebenfalls kein Reduktionsmittel.

Einfluss des Reduktionsmittels:

Um den Einfluss des Reduktionsmittels zu testen, wurden anstelle von Natriumsulfid folgende Lösungen zugegeben: Titan(III)-Citrat (1 mM), Cystein-HCl (0,1%) und Ascorbat (0,2%). Weiterhin wurde die Anreicherungskultur auf nicht reduziertes Medium überimpft.

Hemmungsversuche mit 2-Bromoethansulfonat, Wasserstoff und Antibiotika:

Die Methanproduktion wurde mit 2-Bromoethansulfonat (= BES; 1mM) gehemmt. BES ist ein strukturelles Analogon von Coenzym-M, welches den letzten Katalyseschritt der Methanogenese inhibiert.

Ob RC-III *Archaea* durch hohe Wasserstoffkonzentrationen gehemmt werden, wurde durch die Inkubation der Anreicherungskultur in Phosphat-gepufferten Medium und einer 100%igen H₂ Gasphase überprüft. Dafür wurden die Kulturen mit und ohne Schütteln (120 rpm min⁻¹) inkubiert.

Um das Wachstum der *Bacteria* zu hemmen, wurden folgende Antibiotika (50 µg ml⁻¹) steril filtriert zum Medium (0,1% Hefeextrakt) hinzugefügt und für 2 Wochen inkubiert:

- Ampicillin, Bacitracin, Vancomycin zur Inhibierung der Zellwandsynthese (Mureinschicht)
- Gentamycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Kanamycin und Streptomycin zur Inhibierung der Proteinbiosynthese
- Rifampicin zur Inhibierung der DNA abhängigen RNA-Polymerase

3.2 Anreicherung von Rice Cluster I-*Archaea*

3.2.1 Medium

Die Anreicherungskultur MRE50 von Dr. Kuk-Jeong Chin (Lueders *et al.*, 2001) wurde in einem Bicarbonat-gepufferten Medium mit einer H₂/CO₂-Gasphase (80% H₂ / 20% CO₂) und 0,01% Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract, Fa. Becton Dickinson) inkubiert. Das verwendete Medium wurde zuerst von Widdel und Bak (Widdel und Bak, 1992) beschrieben und für die Anreicherung von Rice Cluster I modifiziert (Chin *et al.*, 1998; Lueders *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit erfolgten weitere Modifikationen. Die Präparation des verwendeten Mineralmediums von Widdel und Bak (Widdel und Bak, 1992) wurde modifiziert. Die Süßwasserkomponenten (1) wurden nun in 960 ml, zusammen mit je 1 ml Resazurin- (2) und Spurenelement- (3) (Tschech und Pfennig, 1984) und Selen/Wolfram-Lösung (4) (Tschech und Pfennig, 1984) gelöst und jeweils 48 ml in 120 ml Serumflaschen abgefüllt. Diese wurden mit Butylgummisepten und Alukappe verschlossen und danach die Gasphase gegen ein H₂/CO₂-Gemisch ausgetauscht. Die Flaschen wiesen danach 1,6 bar Druck auf.

Danach wurden die Pufferlösung (5) und das Reduktionsmittel (6) zugegeben und anschließend bei 121°C für 30 min autoklaviert. Die Vitaminlösung (8) und Substrate wurden vor dem Beimpfen steril zugefügt. Der pH-Wert des Mediums betrug 7,1 bis 7,2. Für den kontinuierlichen Transfer der Anreicherungskultur MRE50 auf frisches Medium wurde 0,01% Hefeextrakt zugegeben.

- (1) Süßwassermedium: 1 g l⁻¹ NaCl
 0,4 g l⁻¹ MgCl₂ × 6 H₂O
 0,1 g l⁻¹ CaCl₂ × 2 H₂O
 0,1 g l⁻¹ NH₄Cl
 0,2 g l⁻¹ KH₂PO₄
 0,5 g l⁻¹ KCl
- (2) Resazurinlösung: 0,5 g l⁻¹ (0,5 mg l⁻¹ Endkonzentration)
- (3) Spurenelementlösung SL 9: 1000-fach Stammlösung (1-fache Endkonzentration)
- 2 g l⁻¹ FeCl₂ × 4 H₂O
 0,07 g l⁻¹ ZnCl₂
 0,1 g l⁻¹ MnCl₂ × 2 H₂O
 0,006 g l⁻¹ H₃BO₃
 0,19 g l⁻¹ CoCl₂ × 6 H₂O
 0,002 g l⁻¹ CuCl₂ × 2 H₂O
 0,024 g l⁻¹ NiCl₂ × 6 H₂O
 0,036 g l⁻¹ Na₂MoO₄ × 2 H₂O
- (4) Selen/Wolfram-Lösung: 1000-fach Stammlösung (1-fache Endkonzentration)
- 0,5 g l⁻¹ NaOH
 0,003 g l⁻¹ Na₂SeO₃ × 5 H₂O
 0,004 g l⁻¹ Na₂WO₄ × 2 H₂O
- (5) Pufferlösung: 0,75 M NaHCO₃ Stammlösung, Endkonzentration 30 mM
- (6) Reduktionsmittel: 0,75 M Na₂S × 9 H₂O (1,5 mM Endkonzentration)
- (8) Vitaminlösung: 1000-fach Stammlösung (1-fache Endkonzentration), steril filtriert
- 40 mg l⁻¹ p-Aminobenzoesäure
 je 10 mg l⁻¹ Biotin, Liponsäure und Vitamin B1
 je 100 mg l⁻¹ D-Ca-Pantothersäure und Vitamin B6
 je 50 mg l⁻¹ Nikotinsäure, Vitamin B2 und Vitamin B12
 30 mg l⁻¹ Folsäure

3.2.2 Wachstumsbedingungen von Rice Cluster I-*Archaea*

Die Abundanz von RC-I und der *Bacteria*, sowie die Bildung von Stoffwechselprodukten in der Anreicherungskultur MRE50 (500 ml in einer 1200 ml Injektionsflasche) wurde in einem Zeitraum von 35 Tagen untersucht. Dafür wurde die Kultur durch kurzes Schütteln homogenisiert und anschließend Kultur- und Gasproben entnommen.

Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders erwähnt bei 50°C.

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte bei 25, 37, 50 und 55°C.

Kohlenstoffquellen:

Die Anreicherungskultur wurde auf Hefeextrakt-freiem Medium (H₂/CO₂-Gasphase) mit 2 und 10 mM Acetat, 20 mM Formiat, sowie ohne Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle (mit Vitaminen) inkubiert. Weiterhin wurde die Kultur auf Medium mit 2 und 20 mM Acetat, 20 mM Formiat, 1 und 10 mM Propionat oder 1,7 mM Cystein-HCl und einer N₂/CO₂-Gasphase getestet.

Einfluss des Reduktionsmittels:

Um den Einfluss des Reduktionsmittels zu testen, wurden anstelle von Natriumsulfid Titan(III)-Citrat (1 mM) und Cystein-HCl (3,4 mM) zugegeben.

3.2.3 Isolierungsversuche

Um RC-I *Archaea* zu isolieren wurden Verdünnungsreihen (1:10 Schritte) sowohl in flüssigem als auch festen Medium durchgeführt. Die Verdünnung in flüssigem Medium erfolgte wie bisher in 120 ml Serumflaschen mit 0,01% Hefeextrakt. Während der Inkubation wurde die Methanproduktion verfolgt und die höchste Verdünnung mit Methanproduktion für den weiteren Transfer auf eine neue Verdünnungsreihe ausgewählt. Für die Verdünnung in festen Medium mit sogenannten „roll tubes“ wurden 10 ml Medium (in 24 ml Hungate-Röhrchen) vor dem Autoklavieren mit 0,8% Gelrite® (Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt. Dieser Gelbildner bleibt auch bei hohen Temperaturen fest und ist durchsichtig, wodurch auch sehr kleine Kolonien erkennbar sind. Die Vorkulturen wurden mit und ohne Hefeextrakt inkubiert und die Bildung von Methan verfolgt. Der Transfer von 10% Kultur in Verdünnungsschritten erfolgte ebenfalls in Medium mit bzw. ohne Hefeextrakt. Die beimpften Röhrchen wurden sofort waagrecht auf Eis gerollt, bis sich

das Medium am Rand des Gefäßes gleichmäßig verteilt hatte. Die Röhren wurde über Kopf bei 50°C inkubiert. Nachdem die Bildung von Kolonien zu erkennen war, wurde die Methanproduktion kontrolliert. Die Kolonien wurden mit ausgezogenen, sterilen Glaspipetten aus dem festen Medium gepickt und in 25 ml flüssiges Medium überführt.

3.3 Kultivierung methanogener *Archaea*

Um genügend genomische DNA für die Entwicklung spezifischer PCR Assays zu erhalten, wurden 3 methanogene Stämme nach Anleitung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, <http://www.dsmz.de/>) kultiviert. Folgende Methanogene wurden verwendet: *Methanoplanus endosymbiosus* (DSM 3599) und *Methanococcus marisaludis* (DSM 2771). *Methanobacterium bryantii* (DSM 863) wurde von Holger Penning zur Verfügung gestellt.

4. Chemische Analysen

4.1 Gaschromatographische Analysen

Vor der Gasanalyse wurden die Anreicherungskulturen kurz von Hand geschwenkt, um ein Gleichgewicht zwischen Medium und Gasphase herzustellen. Die Gasproben wurden mit einer 0,25 ml Pressure-Lock-Spritze (VICI, Baton Rouge, LA, USA) unmittelbar vor der Analyse steril durch das Septum entnommen. Das Probenvolumen betrug 0,1 bis 0,25 ml.

4.1.1 Analyse von Wasserstoff

Zur Bestimmung von niedrigen Wasserstoffpartialdrücken (<100 ppmv) wurde ein Gaschromatograph GC-8A mit Reduktivgasdetektor (RGD2, TraceAnalytical, Techmation Vertriebsgesellschaft für Umweltanalytik GmbH, Düsseldorf) verwendet.

Injektor:	Betriebstemperatur: 100°C
Trägergas:	Synthetische Luft
Säule:	Edelstahlsäule, 1,4 m Länge, 1/2 Zoll Durchmesser
	Trägermaterial: Molsieb 5Å, 80-100 mesh
	Betriebstemperatur: 85°C

Detektor:	HgO-Konversions-Detektor Betriebstemperatur: 280°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv H ₂
Auswertung:	Integrator C-R A6 (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan)
Eichgas:	H ₂ in Stickstoff (50 ppmv)

Wasserstoffpartialdrücke >100 ppmv wurden mit einem Gaschromatographen GC-8A (SRI Instruments, Torrance, USA) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD).

Injektor:	Betriebstemperatur: 120°C
Trägergas:	Stickstoff
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, 1/8 Zoll Durchmesser Trägermaterial: Poropack QS 80/100 mesh Betriebstemperatur: 110°C
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) Betriebstemperatur: 120°C
Nachweisgrenze:	20 ppmv H ₂
Auswertung:	Softwareprogramm Peak Simple (SRI Instruments, California / Torrence, USA)
Eichgas:	H ₂ in Stickstoff (1000 ppmv)

4.1.2 Analyse von Methan und Kohlendioxid

Die Bestimmung von Methan und Kohlendioxid erfolgte mit einem Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu) mit Flammenionisationsdetektor (FID).

Injektor:	Betriebstemperatur: 120°C
Trägergas:	Wasserstoff 5,0
Säule:	Edelstahlsäule, 2 m Länge, 1/8 Zoll Durchmesser Trägermaterial: Poropack QS 50/100 mesh Betriebstemperatur: 40°C
Methanisator:	zur Bestimmung von CO ₂ (CO ₂ und CO wurden zu CH ₄ reduziert) Eigenbau Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande), Edelstahlsäule, Länge 20 cm, Innendurchmesser: 1/8 Zoll

	Betriebstemperatur: 350°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
	Brenngas: Wasserstoff und FID-Gas
	Quenchgas: Stickstoff 5,0
	Betriebstemperatur: 120°C
Nachweisgrenze:	1 ppmv CH ₄
Auswertung:	Integrator C-R A6 (Fa. Shimadzu)
Eichgas:	Gemisch aus CH ₄ , CO ₂ und CO in Stickstoff (1000 ppmv)

4.1.3 Berechnung

Die gemessenen Konzentrationen (ppmv) wurden in die Stoffmenge (μmol) umgerechnet. Dafür wurde die Zustandsgleichung idealer Gase nach der Stoffmenge n hin umgeformt.

$$n = \frac{p \times V}{R \times T}$$

n :	Stoffmenge [mol]
p :	Partialdruck des gemessenen Gases in [bar] (1 ppmv = 10 ⁻⁶ bar)
V :	Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]
R :	allgemeine Gaskonstante (0,083144 [l bar K ⁻¹ mol ⁻¹])
T :	Temperatur [K]

4.2 Bestimmung der ¹³C/¹²C-Isotopensignatur von CH₄ und CO₂

Die ¹³C/¹²C-Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ wurde mit einem Gaschromatographen mit Verbrennisotopenverhältnismassenspektrometer (GC-C-IRMS, Fa. Thermo Electron Cooperation, Bremen) bestimmt. Die Analyse wurde nach der Methode von Brand (1996) und Sugimoto (1991) durchgeführt.

GC:	Hewlett Packard 6890 (Waldbronn)
Injektor:	Splitt / Splittless; Betriebstemperatur: 150°C
Trägergas:	Helium 4,6; Flussrate 2,6 ml min ⁻¹
Säule:	Pora PLOT Q, 27,5 m Länge, 0,32 mm Durchmesser, Schichtdicke 10 μm (Crompack, Frankfurt)

Ofentemperatur:	25°C
GC/C interf.:	Standard GC Combustion Interface III Oxidations-Reaktor bei 940°C Reduktions-Reaktor bei 650°C
IRMS:	Finnigan MAT delta plus
Auswertung:	ISODAT™ (Version 5.0)
Eichstandard:	CO ₂ 4,8 (Reinheitsgrad 99.998%, Messer-Griessheim, Düsseldorf, Germany; interkalibriert gegen NBS22 vom Max-Planck-Institute für Biochemie, Jena)

Das Isotopen-Verhältnis war wie folgt dargestellt:

$$\delta^{13}C = 10^3 \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right)$$

Hierbei ist: $R = {}^{13}C/{}^{12}C$.

Die Präzision war $\pm 0,2$ ‰ bei wiederholter Injektion von 1,3 nmol CH₄.

4.3 Analyse organischer Säuren und Alkohole

Die Konzentration der organischen Säuren und Alkohole wurde mittels HPLC- (high performance liquid chromatography) Analyse bestimmt. Dafür wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand durch einen Membranfilter (0,2 µm Porengröße, PTFE Membran, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) filtriert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

HPLC-Anlage:	Pumpe S1000, Säulenofen S4110 (Fa. Sykam, Gilching), Probenaufgeber Jasco 851-AS (Jasco, Japan)
Trägermaterial:	Polystyrenebivinylnbenzen
Säule:	Edelstahlsäule, 30 cm Länge, 7,8 mm Durchmesser
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäure, Flussrate: 0,8 ml min ⁻¹
Ofentemperatur:	65°C
Detektor:	Refraction Index (RI)-Detektor ERC-7512 (ERMA CR. INC., Tokyo), Betriebstemperatur: 40°C UV-Detektor: UVis 200 (LINEAR Instruments, Reno, USA),

	Wellenlänge: 208 nm
Nachweisgrenze:	5 μM (Substanz abhängig)
Auswertung:	Programm Peak Simple (SRI-Instruments, Torrence, USA)
Eichstandard:	Mischstandard aus Lactat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Ethanol, Isopropanol, Valerat, Butanol und Caproat (je 1 mM)

4.4 Analyse anorganischer Ionen

Anorganische Substanzen wurden mit einem ionenchromatographischen System (IC) nachgewiesen. Dafür wurden die Proben wie in Abschnitt 4.3 zentrifugiert und filtriert.

Anionentrennsäule (LCA09, Sykam), einem

IC-Anlage:	Pumpe S1121, Säulenofen S4260B, Suppressorsystem S4260A, Probenaufgeber S5200 (Fa. Schambeck, Bad Honnef)
Trägermaterial:	Styrol/Divinobenzol, 10 μm Korngröße
Säule:	Edelstahlsäule, 6 cm Länge, 4,6 mm Durchmesser
Fließmittel:	5 mM Na_2CO_3 , 1 ml l^{-1} Modifier (1g 4-Hydroxybenzonnitril in 50 ml Methanol), Flussrate: 1,5 ml min^{-1}
Ofentemperatur:	65°C
Detektor:	Leitfähigkeitsdetektor S3111 UV-Detektor Linear UVis 200, Wellenlänge 220 nm
Nachweisgrenze:	5 μM (Substanz abhängig)
Auswertung:	Integrationsprogramm Peak Simple
Eichstandard:	Mischstandard aus Chlorid, Bromid, Nitrit, Nitrat, Phosphat und Sulfat (je 1 mM)

4.5 Bestimmung von Ammonium

2,5 g frischer, homogenisierter Boden wurde 1:10 (w/v) mit 1 M KCl-Lösung (25 ml) versetzt und auf einem Horizontalschüttler für 1 h bei 4°C geschüttelt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert. 2 ml der Aufschlammung wurden für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand filtriert (0,2 μm Porengröße, PTFE Membran, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel). Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration der Proben erfolgte colorimetrisch (Kandeler und Gerber, 1988). Die Absorption wurde in einem Photometer (Unikon 30F, Spektrometer 930, Kontron-Instruments GmbH, Stuttgart)

bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Die Eichlösungen (Verdünnungsreihe von 0,5 bis 2,5 mM) wurden ebenfalls mit 1 M KCl angesetzt in Triplikaten bestimmt.

4.6 Bestimmung von Eisen

Für die Bestimmung von Eisen(II) und (III) wurden 0,5 g frischer Boden mit 4,5 ml 0,5 M HCl versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Extraktion erfolgte für 24 h bei Raumtemperatur. 2 ml der Aufschlämmung wurden für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Bestimmung von Eisen(II)

Die Bestimmung von Eisen(II) wurde mit der Ferrozin-Methode durchgeführt (Modifikation nach Lovely und Philips, 1987). Das Testprinzip beruht auf der Bildung eines farbigen Komplexes durch die Reaktion von drei Ferrozin ([3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure-1,2,3-triazin-Dinatriumsalz)-Molekülen mit einem Eisen(II)kation (Stookey, 1970). Das Ferrozinreagenz wurde 0,1%ig (v/v) in 200 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyl-ethypiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) gelöst und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Der Probenüberstand wurde in drei Verdünnungsstufen mit 0,5 M HCl verdünnt und davon jeweils 100 μl mit 1 ml Ferrozinreagenz gemischt. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm in einem Photometer gemessen. Als Blindwert wurden 100 μl 0,5 M HCl eingesetzt. Die Eichgerade wurde in Dreifachbestimmung aus Verdünnungen einer 1 mM FeCl_2 -Eichstammlösung ermittelt.

Bestimmung von Hydroxylamin-reduzierbarem Gesamteisen

Bei der Gesamteisenbestimmung (Lovley und Phillips, 1987) wurde das Eisen(III) mit 0,25 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung zu Eisen(II) reduziert. Die Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung wurde mit 0,25 M HCl angesetzt. Der Probenüberstand wurde in drei Stufen verdünnt und davon jeweils 100 μl mit 2 ml Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung gemischt. Die Reduktion wurde in einem Wasserbad bei 60°C für 2 h durchgeführt. Die Bestimmung des Gesamteisens erfolgte mit dem Ferrozin-Reagenz wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben.

Bestimmung von Eisen(III)

Die Eisen(III)-Konzentration wurde aus der Differenz der gemessenen Gesamteisenkonzentration und der Eisen(II)-Konzentration berechnet.

4.7 Bestimmung von pH-Wert, C/N – Gehalt und Trockengewicht

Für die Bestimmung des pH-Wertes wurde ein digitales pH-Meter (Microprozessor pH Meter 539, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit einer pH-Sonde (InLab 427, pH 2 bis 11, Mettler Toledo, Gießen) verwendet.

Der C/N-Gehalt stellt den Quotienten aus Gesamtkohlenstoff (C_{org}) und Gesamtstickstoff (N_t) dar (Scheffer / Schachtschabel, 1989). Zur Bestimmung des C/N – Gehaltes wurde der bei 105°C getrocknete Boden mit einem Mörser zerkleinert und homogenisiert. Der Kohlenstoff- und Stickstoffanteil der Bodenproben wurde durch das Routinelabor des Fachbereichs Chemie, der Philipps-Universität-Marburg bestimmt.

Die Bestimmung des Trockengewichts von Bodenproben erfolgte gravimetrisch (Schlichting & Blume, 1966). Von jeder Bodenschicht wurden 10 g Boden (je drei Parallelen) in einer Porzellanschale bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet. Danach wurden diese im Exikkator (mit Silikagel) abgekühlt und anschließend gewogen. Die Differenz des Netto- und Bruttogewichts der Porzellanschalen ergab das Gewicht der Trockensubstanz (Schlichting *et al.*, 1995). Mit Hilfe des Trockengewichts kann der Wassergehalt der Probe in % berechnet werden.

5. Molekularbiologische Analysen

5.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion aus den Anreicherungskulturen LL25°C und MRE50 wurden 5 bis 10 ml zentrifugiert (15 min, 8500 rpm bzw. 10000 rpm, 4°C; Sorvall RC 5B Plus, Rotor SS34). Der Überstand wurde entfernt, die pelletierten Zellen in 0,5 ml sterilem Wasser (Fa. Sigma) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 2 ml Schraubdeckelgefäße überführt und bis zur Extraktion bei -20°C aufbewahrt.

Die DNA-Extraktion erfolgte durch einen mechanischen Aufschluss der Zellen mit 0,5 g Glasbeads (Durchmesser 0,17 – 0,18 mm, B. Braun Biotech International, Melsungen). Dafür wurden die Proben zweimal für 30 s bei 2500 rpm in einer Zelmühle (Mikro-Dismembrator, Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen) geschüttelt und zwischendurch auf Eis gestellt. Die Reinigung der DNA von Proteinen wurde mit Hilfe des Wizard[®] DNA Clean-Up – Kit (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde dabei an einen Matrix gebunden, mit 80%igem Isopropanol gewaschen und danach mit 50 µl Elution Buffer (EB: 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, Fa. QIAquick PCR-Purifikation KIT, Quiagen GmbH, Hilden) eluiert.

Die DNA-Extraktion aus Waldböden wurde von Dr. Steffen Kolb mit dem DNA-Extraktionskit (FastDNA Spin Kit, Bio 101, Fa. La Jolla, USA) in modifizierter Form durchgeführt und wurde bereits ausführlich in seiner Dissertation beschrieben.

5.2 PCR-Amplifikation

Mit Hilfe der PCR wurden bestimmte Fragmente phylogenetischer Markergene (16S rRNA und Methyl-Coenzym-M-Reduktase) aus DNA-Extrakten vermehrt und die erhaltenen PCR-Produkte für T-RFLP- (Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus) und Sequenzanalysen (siehe Abschnitt 5.3 und 5.5) weiterverwendet. Die Real Time-PCR-Methode wurde für die Quantifizierung der Zielmoleküle (= Anzahl der Gene) eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei jeder Amplifikation wurde als Negativkontrolle eine Reaktion mitgeführt, die anstelle des DNA-Templates das entsprechende Volumen H₂O enthielt. Als Positivkontrolle diente DNA mit dem zu amplifizierenden Zielmolekül.

Tabelle 1: Beschreibung der verwendeten Primer für quantitative (hier: Real Time) PCR (= qPCR), T-RFLP-Analyse, Sequenzierung (= Seq) der partiellen 16S rRNA-Gene und der *mcrA* (α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase)-Gene und des Vektorinserts von Klonen (= Klon). Oligonuk. = Oligonukleotid. Topo = TOPO-TA-Cloning[®]-Kit (Invitrogen, de Schelp, Niederlande); *gekennzeichnete Referenz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt; K = G/T; H = A/C/T; M = A/C ; N = A/C/G/T; R = A/G; S = G/C, W = A/T, Y = C/T.

Oligonuk.	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Zielgruppe	Verwendung	Referenz
RC-III-126f	GGATAACATGCCCTAAGG	RC-III	qPCR, T-RFLP	Kemnitz <i>et al.</i> , 2004 *
RC-If	AGGCAACTGCGATAGGGG	RC-I	qPCR	Erkel <i>et al.</i> , in revision *
RC-Ib	CCCAGTCCCAAGCAATGT	RC-I	qPCR	Erkel <i>et al.</i> , in revision *
A109f	ACKGCTCAGTAACACGT	<i>Archaea</i>	T-RFLP, Seq	Großkopf <i>et al.</i> , 1998a
A346aF	CGGGGYGCASCAGGCGCGAA	<i>Archaea</i>	qPCR, T-RFLP, Seq	Burggraf <i>et al.</i> , 1997
A934b	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i>	qPCR, T-RFLP, Seq	Großkopf <i>et al.</i> , 1998a
B8f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>Bacteria</i>	T-RFLP	Braker <i>et al.</i> , 2001
B1407b	ACGGGCGGTGTGTACA	<i>Bacteria</i>	T-RFLP	Braker <i>et al.</i> , 2001
519f ^c	CAGCMGCCGCGGTAANWC	<i>Bacteria</i>	qPCR	Lane, 1991
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTT	<i>Bacteria</i>	qPCR	Lane, 1991
9f	GAGTTTGMTCTGGCTCAG	<i>Bacteria</i>	T-RFLP, Seq	Lane, 1991
1492b	ACGGYTACCTTGTTACGACCT	<i>Bacteria</i>	T-RFLP, Seq	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
MCRC-If	TACGCACAGATCTGGCTCGGC	McrA (RC-I)	qPCR	diese Arbeit *
MCRC-Ib	CGTAGTTCGGGTAGTTCGGGC	McrA (RC-I)	qPCR	diese Arbeit *
T7f	TAATACGACTCACTATAGGG	Vektor	Klon	Topo
M13b	CAGGAAACAGCTATGAC	Vektor	Klon	Topo

5.2.1 PCR-Amplifikation der DNA zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität

Die PCR-Reaktionen wurden mit einem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt, wenn nicht anders beschrieben, folgende Komponenten:

- forward und reverse primer (Fa. MWG), Endkonzentration 0,33 μM
- Taq-Polymerase (Fa. Promega, 5 U μl^{-1}), Endkonzentration 1,25 U
- dNTP (Fa. Amersham Pharmacia Biotech), Endkonzentration 50 μM
- MgCl_2 (Fa. Promega, 25 mM), Endkonzentration 1,5 mM
- Reaktionspuffer (Fa. Promega, 10-fach konzentriert), 1-fache Endkonzentration
- BSA (Roche Biochemicals, Mannheim, 20 mg ml^{-1}), Endkonzentration 0,8 μg μl^{-1}
- DNA-Template, 0,5 bis 1 μl
- Endvolumen 50 μl

Die Amplifikation von PCR-Produkten für die T-RFLP-Analyse erfolgte mit einem Carboxyfluorescein (=FAM) markierten Primer (5'-Ende). Für die Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Gene aus DNA-Extrakten der Anreicherungskulturen PM und LL (Primerpaar A109f und A934b) wurde das Reaktionsgemisch modifiziert (1 \times Premix F [Biozym Diagnostic GmbH]; je 33 μM Primer; 1,25 U Taq-Polymerase in einem Endvolumen von 100 μl). Das Temperaturprofil der PCR-Reaktionen ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die Primer-Kombination, Zyklenzahl, Primer-Anlagerungstemperatur und die Dauer der verschiedenen Schritte sind in der Tabelle 2 für jede Reaktion aufgeführt. Die Primer B8f und B1407b wurden zur Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA der Anreicherungskulturen PM und LL (siehe Abschnitt 3.1) verwendet. Zur Amplifikation der *Bacteria* der Anreicherungskultur MRE50 (siehe Abschnitt 3.2) dienten die Primer 9f und 1492b.

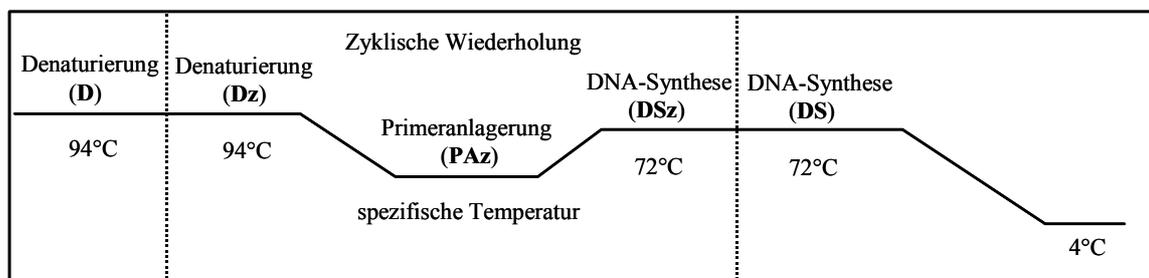


Abbildung 1: Temperaturprofil der PCR.

Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität (16S rRNA-Gene): Primer-Anlagerungstemperatur (PAT); Dauer der initialen Denaturierungsphase (D); Dauer der Denaturierung (Dz), der Primeranlagerung (PAz) und der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung; Dauer der abschließenden DNA-Synthese. Primer, die markiert sind (*), waren für die T-RFLP-Analyse mit FAM markiert. PCR-Assays, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden, sind in fett-markierter Schrift dargestellt.

Primerkombination	Ziel- gruppe	Anzahl der Zyklen	PAT [°C]	D [min]	Dz [sec]	PAz [sec]	DSz [sec]	DS [min]
A109f / A934b*	<i>Archaea</i>	28 – 30	52	4	45	60	60	7
A364aF / A934b*	<i>Archaea</i>	30	66	4	35	30	45	7
B8f* / B1407b	<i>Bacteria</i>	28 – 30	57	3	30	30	90	5
9f* / 1492b	<i>Bacteria</i>	30	48	3	45	60	120	7
T7f / M13b	Vektor	28	55	5	60	60	120	7

Nach der PCR wurden Aliquots der erhaltenen Amplifikate durch Gelelektrophorese (1,5% [w/v] TAE-Agarosegel, SeaKem LE, Fa. Biozym; in TAE-Puffer) überprüft.

Zur Entfernung von Nukleotiden, Enzymen, Salzen und nicht gebundenen Primern wurden die PCR-Produkte, soweit nicht anders vermerkt, mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Quiagen GmbH) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

5.2.2 Quantifizierung phylogenetischer Gruppen mittels Real Time-PCR

Die Quantifizierung phylogenetischer Markergene (16S rRNA und *mcrA*) in den DNA-Extrakten der Anreicherungskulturen und Waldbodenproben, erfolgte mit Hilfe der Real Time-PCR-Methode mit dem iCycler IQ Thermocycler (Fa. Biorad Laboratories GmbH, München). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 beschrieben. Die Reaktionen wurden mit einer Antikörper geblockten Hot-Start DNA-Polymerase „iTAQ“ (Fa. Biorad Laboratories GmbH) in 96-Well-Mikrotiterplatten (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Die DNA-Extrakte wurden 1:5 verdünnt und davon 5 µl in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die DNA-Extrakte der Waldböden wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt, um die Hemmung durch Huminsäuren auszuschließen. Für die Eichung wurden jeweils 5 µl einer Verdünnungsreihe eines spezifischen, quantifizierten DNA-Standards bei jeder Messung (d.h. jede Mikrotiterplatte) mitgeführt. Alle Proben und Standards wurden in drei Replikaten gemessen. Nach Zugabe der Reaktionslösung wurden die Platten mit

selbstklebenden optischen Folien (Biorad) verschlossen. Dem Reaktionsgemisch wurde eine Fluoreszeinlösung (= Calibrationdye, 1 mM, Fa. Biorad Laboratories GmbH) zur Kalibrierung zugegeben, um die Kameraeinstellung zu optimieren. Um die Amplifikations-Kinetik während der PCR verfolgen zu können, enthielt das Reaktionsgemisch den DNA-Farbstoff SybrGreen I (10000-fach konzentriert, Fa. Bio Whitaker Molecular Applications, USA). Laut Hersteller steigt die Fluoreszenz (Extinktion: 490 nm, Emission: 530 nm) des Farbstoffes bei Bindung an die große Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) um den Faktor 10000. So steigt mit fortschreitender Zyklenzahl die Konzentration der dsDNA und entsprechend die Fluoreszenzintensität der Lösung. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden die Daten, wenn nicht anders erwähnt, in der Elongationsphase (Drei-Schritt-Protokoll) dokumentiert. Das Reaktionsgemisch enthielt, bis auf einige Modifikationen, folgende Komponenten:

- forward und reverse primer (Fa. MWG), Endkonzentration 0,33 μM
- iTaq-Polymerase (Fa. Biorad Laboratories GmbH, 5 U μl^{-1}), Endkonzentration 0,313 bzw. 0,625 U
- dNTP (Fa. Amersham Pharmacia Biotech), Endkonzentration 50 μM
- MgCl_2 (Fa. Biorad Laboratories GmbH, 25 mM), Endkonzentration 1,5 mM
- Reaktionspuffer (Fa. Biorad Laboratories GmbH, 10-fach konzentriert), 1-fache Endkonzentration
- BSA (Roche Biochemicals, Mannheim, 20 mg ml^{-1}), Endkonzentration 0,8 $\mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$
- SybrGreen (20-fach), 0,2-fache Endkonzentration
- Fluoreszein-Gemisch (1 μM), 10 pM Endkonzentration
- DNA-Template, 0,5 bis 1 μl
- Endvolumen 25 bzw. 50 μl

Für die Entwicklung gruppenspezifischer Primer wurden die Softwaretools „Probedesign“ und „Probematch“ der Phylogenie-Software ARB verwendet. Anschließend wurden die PCR-Bedingungen optimiert. Zuerst wurden Referenz-DNA (Klon-DNA) der Zielgruppe und DNAs von Organismen mit möglichst wenigen Fehlpaarungen in der Primer-Binderegion (Kontroll-DNA) in einer Gradienten-PCR (Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf) eingesetzt. Dabei sind Replikate jeder Reaktion verschiedenen Primer-Anlagerungstemperaturen ausgesetzt. Die dafür verwendeten PCR-Chemikalien (Reaktionspuffer, Taq-Polymerase, MgCl_2) wurden von der Firma Promega bezogen. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Stringente PCR-Bedingungen sind gegeben, wenn von den Ziel-DNAs, aber nicht von den Kontroll-DNAs PCR-Produkte richtiger Größe amplifiziert wurden. Zur Bestimmung der exakten Primer-

Anlagerungstemperatur wurde dieses Verfahren mit einem engeren Temperaturgradienten im iCycler IQ Thermocycler durchgeführt.

Das Temperaturprofile der PCR-Reaktionen wurden ebenfalls als Drei-Schritt-Protokolle durchgeführt (siehe Abbildung 1). Anstelle des abschließenden DNA-Synthese-Schrittes (DS) erfolgte die Aufnahme der Schmelzkurve. Dabei wurde das entstandene PCR-Produkte während einer Temperaturerhöhung von 75 auf 100°C aufgeschmolzen. Die Primer-Kombination, Zyklenzahl, Primer-Anlagerungstemperatur und die Dauer der verschiedenen Schritte sind in der Tabelle 3 für jede Reaktion aufgeführt.

Bei der Messung der archaeellen Zielmoleküle in DNA-Extrakten der Bodenproben erfolgte die Datenaufnahme nach dem DNA-Synthese-Schritt (DSz) während eines zusätzlichen Temperaturschrittes (10 sec 86,5°C). Auf diese Weise konnte die Detektionsgrenze der Messung gesenkt werden, da das Aufschmelzen kleiner unspezifischer PCR-Produkte in diesem Schritt erfolgte. Diese unspezifischen PCR-Produkte können durch die Bildung von Primerdimeren und der Synthese kurzer PCR-Fragmente entstehen.

Tabelle 3: PCR-Bedingungen zur Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen: Primer-Anlagerungstemperatur (PAT); Dauer der initialen Denaturierungsphase (D); Dauer der Denaturierung (Dz), der Primeranlagerung (PAz) und der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung; Endvolumen der PCR-Reaktion. Amplifiziert wurden die 16S rRNA-Gene (*Archaea*, RC-III, RC-I, *Bacteria*), sowie die *mcrA* (α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase)-Gene von RC-I. PCR-Assays, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden, sind als Fett-markierte Schrift dargestellt.

Primerkombination	Ziel- gruppe	Anzahl der Zyklen	PAT [°C]	D [min]	Dz [sec]	PAz [sec]	DSz [sec]	Vol. [µl]
A364aF / A934b	<i>Archaea</i>	45	66	6	35	30	45	25
A109f / A934b	<i>Archaea</i>	40	52	3	40	30	90	50
RC-III-126f / A934b	RC-III	38	61	8	45	50	60	50
RC-If / RC-Ib	RC-I	40	63	5	60	50	60	25
MCRC-If / MCRC-Ib	McrA	40	65	5	50	50	60	25
519f ^c / 907r	<i>Bacteria</i>	38	50	5	40	20	40	50

Quantifizierung der Zielmolekülzahlen aus DNA-Extrakten:

Aus der Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl wurde der Schwellenwertzyklus (= Threshold Cycle [C_T]) bestimmt. Dieser Wert ist definiert als die rationale Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit der iCycler IQ Optical System Software V 3.0a (Biorad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Da ein linearer Zusammenhang zwischen dem C_T einer Reaktion und dem Logarithmus der Menge an Zielmolekülzahlen besteht, konnten die Daten mit Hilfe linearer Regression interpoliert werden. Mit der resultierenden Geradengleichung aus den C_T -Werten der Eichstandards (Verdünnungsreihe) wurde die Anzahl der Zielmoleküle in den DNA-Extrakten bestimmt. Die Zielmolekülzahlen wurden in das Programm Exel V7.0 exportiert und bearbeitet.

Quantifizierung der *Archaea*:

Um die Zahl der archaeellen 16S rRNA Gene in DNA-Extrakten der Anreicherungskultur LL 25°C und von Bodenproben zu bestimmen, wurden bereits publizierte *Archaea*-Primer mit dem in der Phylogenie-Software ARB (<http://www.arb-home.de/>; Ludwig *et al.*, 2004) vorhandenen Softwaretool „Probematch“ auf ihre Spezifität untersucht. Der forward-Primer A364aF (70% GC-Gehalt, siehe Tabelle 1) wurde daraufhin mit dem bisher verwendeten reverse-Primer A934b kombiniert. Die Primer-Anlagerungstemperatur des PCR-Assays wurde mit genomischer *Bacteria*-DNA von *Pirellula staley* (DSM 6068, 2 Fehlpaarungen), *Desulfobotulus sapovorans* (DSM 2055, 4 Fehlpaarungen), *Desulfobacter postgatei* (DSM 2034, 4 Fehlpaarungen) als Negativkontrollen für den reverse-Primer eingestellt, da dieser einen niedrigeren GC-Gehalt von 65% besitzt (deshalb niedrigere Schmelztemperatur). Als Positivkontrollen wurden archaeelle Klon-DNA verwendet. Die eingesetzten Primerkonzentrationen betragen 0,67 μ M.

Quantifizierung von Rice Cluster III:

Um die Abundanz von RC-III der Kulturen LL25°C im Verhältnis zu *Archaea* und *Bacteria* zu quantifizieren (16S rRNA-Gen), wurde ein RC-III spezifischer Real Time-PCR-Assay etabliert. Dafür wurden vier RC-III-spezifische forward-Primer mit Hilfe des Softwaretools „Probedesign“ der Phylogenie-Software ARB entwickelt und mit dem bisher verwendeten *Archaea*-reverse-Primer A934b kombiniert. Diese Kombinationen wurden mit Referenz- und Kontroll-DNA getestet. Der Primer RC-III 126f (siehe Tabelle

1) wurde dann für die Einstellung exakter PCR-Bedingungen verwendet. Die optimale Primer-Anlagerungstemperatur wurde für den forward-Primer (auf Grund des niedrigeren GC-Gehaltes 50%; vergleichsweise: 65% des Primers A934b) und der damit verbundenen niedrigeren Schmelztemperatur eingestellt. Als Positivkontrollen dienten T7f / M13b-PCR-Produkte von RC-III-Klonsequenzen. Genomische DNA von *Methanoplanus endosymbiosus* (DSM 3599, 1 Fehlpaarung), *Methanobacterium bryantii* (DSM 863, 2 Fehlpaarungen) und *Methanococcus maripaludis* (DSM 2771, 3 Fehlpaarungen) wurden als Kontrollen mit Fehlpaarungen in der forward-Primer-Binderegion eingesetzt.

Der entwickelte PCR-Assay wurde durch die Amplifikation aus DNA-Extrakten der Anreicherungskultur LL 25°C-Kulturen mit einem FAM-markierten reverse-Primer (ohne SybrGreen und Fluoreszein) und anschließender T-RFLP-Analyse kontrolliert. Die PCR wurde mit dem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei an Stelle der Schmelzkurvenbestimmung ein abschließender DNA-Synthese-Schritt erfolgte.

Quantifizierung von Rice Cluster I:

Um die 16S rRNA-Gene, sowie die Gene der α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (*mcrA*) von RC-I in der Anreicherungskultur MRE50 zu quantifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit Christoph Erkel, spezifische Primerpaare für alle zu der Zeit verfügbaren RC-I-Sequenzen entwickelt.

Die Quantifizierung der 16S rDNA erfolgte mit den Primern RC-If und RC-Ib. Die optimale Primer-Anlagerungstemperatur wurde mit Klon-DNA von RC-I als Zielmolekül und genomischer DNA von *Methanothermobacter marburgensis* (DSM 2133), *Methanoplanus endosymbiosus* (DSM 3599), und *Methanococcus maripaludis* (DSM 2771) als Negativkontrollen (jeweils 3 Fehlpaarungen in der forward-Primer-Binderegion) eingestellt. Die eingesetzten Primerkonzentrationen betragen je 0,67 μ M. Zusätzlich wurden die erzielten Ergebnisse mit einem bereits beschriebenen Real Time-PCR-Assay zur Quantifizierung der *Archaea* (Primer A109-A934, Lueders *et al.*, 2003) kontrolliert.

Herstellen eines quantitativen Standards:

Für die Eichung der entwickelten PCR-Assays wurden PCR-Produkte von Klon-DNA eingesetzt. Dafür wurden die Vektorinserts mit dem Primerpaar T7f und M13b in den flankierenden Sequenzregionen amplifiziert und mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Quiagen GmbH) zweimal nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Zur Eichung

der *Bacteria*-PCR wurde genomische DNA von *Escherichia coli* (Roche Diagnostics) verwendet. Die DNA-Konzentrationen der Eichstandards wurden mit dem PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) nach Herstelleranweisung auf einer Microtiterplatte (Nunc GmbH Co KG, Wiesbaden) in einem Fluorimeter (SAFIRE, Fa. TECAN, Crailsheim) vermessen. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte des λ -Phagen-DNA-Mengenstandards wurden dann gegen ihre Menge [ng] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der erhaltenen Geradengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten des M13-PCR-Produktes die Konzentration der DNA [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$] bestimmt werden. Mit folgender Formel wurde anschließend dieser Wert in die Anzahl der amplifizierbaren Zielmoleküle (= Zielmolekülzahlen) umgerechnet:

$$C_S = \frac{C_W}{N \times M_N} \times N_A$$

C_S :	Konzentration der Zielmoleküle [μl^{-1}]
C_W :	Konzentration [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]
N_A :	Avogadrokonstante ($6,23 \times 10^{23} \times 10^{-9} \text{ nmol}^{-1}$)
N :	Anzahl der Nukleotide
M_N :	Molgewicht von einem Basenpaar, $649,5 \text{ ng nmol}^{-1}$

Diese Standardlösung wurde anschließend auf 10^{10} Zielmolekülzahlen $\times (5 \mu\text{l})^{-1}$ mit Elutionbuffer (QIAquick PCR Purifikation Kit) verdünnt und bei -20°C gelagert.

5.3 T-RFLP-Analyse

Mit Hilfe der T-RFLP-Methode werden genetische Fingerabdrücke verschiedener Markergene (16S rRNA-Gene) erstellt, welche eine direkte Analyse phylogenetischer Gruppen erlaubt. Diese Methode basiert auf der Analyse von Restriktionsfragmenten, die an einem Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehen sind. Dadurch wird nicht das gesamte Fragmentmuster (wie bei einer RFLP-Analyse), sondern nur das terminale Restriktionsfragment detektiert. Mit Hilfe von Klonbibliotheken und anschließender

Sequenzanalysen (siehe Abschnitt 5.4), können die einzelnen Fragmente bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden.

Die fluoreszierenden Amplifikate wurden, wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 5.2), durch eine PCR mit einem 5'-FAM-markierten Primer und einem unmarkierten Primer hergestellt. Die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte wurde durch die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

Für die Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate wurden 30-50 ng DNA (entsprach 2-8 µl) eingesetzt. Der Restriktionsansatz für die archaeellen PCR-Produkte enthielt weiterhin 1 µl Puffer E und 1 µl des Restriktionsenzym *TaqI* (10 U µl⁻¹, Erkennungssequenz: 5'-T[~]CGA-3'). Mit sterilem H₂O wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und für 3 h bei 65°C inkubiert. Die bakteriellen PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *MspI* (Erkennungssequenz: 5'-C[~]CGC -3') oder *HhaI* (Erkennungssequenz: 5'-GCG[~]C -3') verdaut. Die Restriktion erfolgte mit 1 µl Puffer B bzw. C; 0,5 µl Enzym (10 U µl⁻¹), und der entsprechenden Menge sterilem H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 3 h bei 37°C inkubiert.

Die verdaute DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die eingesetzten Chemikalien wurden von der Firma Promega bezogen.

2,5 µl der verdauten PCR-Produkte wurden einem internen Längenstandard (0,8 µl Genescan-1000 Rox (*Archaea*) oder 0,5 µl Genescan-2500 Rox (*Bacteria*) (Fa. Applied Biosystems) und Formamid Loading Dye (Fa. Amersham Pharmacia Biotech Inc.) gemischt, 2 min bei 95°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die Auftrennung des Gemisches erfolgte durch Elektrophorese mit einem 6%-igen Polyacrylamidgel mit 8,3 M Harnstoff in einem automatischen Sequenziergerät (373A Sequencer, Fa. Applied Biosystems) für 6 h bei 2500 V und 40 mA. Die Auswertung wurde mit der Analysesoftware (GeneScan Analysis Version 2.1, Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Mit Hilfe des internen Längenstandards wurde die Länge der Restriktionsfragmente ermittelt. Gleichzeitig wurde die Intensität der Fluoreszenzsignale bestimmt. Anhand der Peakflächen wurden die relativen Häufigkeiten der terminalen Restriktionsfragmente im Verhältnis zu der Gesamtfläche aller Peaks (= 100%) berechnet.

5.4 Erstellung von Klonbibliotheken

Um die Phylogenetische Einordnung der 16S rDNA Sequenzen zu ermöglichen, wurden die aus Anreicherungskulturen- und Umwelt-DNA amplifizierte PCR-Produkte über Klonierung vereinzelt. Die unbehandelten PCR-Produkte wurden mit dem TOPO-TA-Cloning[®]-Kit (Fa. Invitrogen, de Schelp, Niederlande) nach dem Protokoll des Herstellers kloniert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Kanamycin-X-Gal-Agarplatten ausplattiert (X-Gal = 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid), über Nacht bei 37°C inkubiert und positive Kolonien (Blau-Weiß-Selektion) auf eine Masterplatte überimpft. Die DNA von ausgewählten Klonen wurde durch Aufkochen (10 min, 100°C) von Flüssigkulturen gewonnen.

5.5 Sequenzierung

Die verwendete DNA-Sequenzierungsmethode basiert auf dem Prinzip des „Kettenabbruchs“ (Sanger *et al.*, 1977). Das Reaktionsgemisch enthält neben den üblichen dNTPs vier unterschiedlich 5'-fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs = Terminatoren). Letztere führen zum Abbruch der Polymeraseaktivität, wodurch man ein Gemisch unterschiedlich langer 3'-fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente erhält. Vor der eigentlichen Sequenzierreaktion wurde das Insert der Klone direkt mit dem Primerpaar T7f und M13b (siehe Abschnitt 5.3.3) amplifiziert und danach aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde mit dem „ABI PRISM DNA Sequencing Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ mit AmpliTaq[®] DNA Polymerase, FS, (Applied Biosystems) durchgeführt. Dem Reaktionsgemisch wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 5 pmol des Sequenzier-Primers (T7f oder M13b) und ca. 50 ng Matrizen-DNA zugefügt. Die Reaktion erfolgte mit 25 Sequenzierzyklen (30 sec 96°C, 25 \times [10 sec 96°C, 5 sec 50°C, 4 min 60°C]) mit dem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems). Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit AutoSeq[™] G-50-Chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) aufgereinigt und das Eluat unter Vakuum in der DNA-SpeedVac (DNA 110, Savant) für 30 min getrocknet. Das Pellet wurde danach in 3 μ l Formamid Loading Dye (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) resuspendiert, 3 min bei 90°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Das Fragmentgemisch (1,5 μ l) wurde über ein Polyacrylamidgel in einem Sequenzierer (ABI Prism 377 DNA Sequenzierer, Applied

Biosystems) getrennt. Anhand der Fluoreszenzsignale lässt sich die Basensequenz der DNA-Matrize ablesen.

5.6 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen

Die Rohsequenzdaten (Elektropherogramme) wurden mit dem Programm Seqman II (DNASTAR, Madison, Wisconsin) bearbeitet. Teilsequenzen wurden zusammengefügt und die Vektorsequenzen entfernt. Ein erster phylogenetischer Vergleich der Sequenzen erfolgte mit Hilfe einer öffentlich verfügbaren Datenbank durch das Programm „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Nah verwandte Sequenzen wurden ebenfalls heruntergeladen.

Die Phylogenetische Verrechnung und Darstellung der 16S rDNA-Sequenzdaten in phylogenetischen Stammbäumen erfolgte mit der Phylogenie-Software ARB (<http://www.arb-home.de/>; Ludwig *et al.*, 2004). Die Klonsequenzen, sowie nah verwandte Umweltsequenzen („BLAST“-Suche) wurden importiert und mit der in ARB enthaltenen „FAST-Aligner“-Funktion mit bereits vorhandenen Sequenzen in ein Alignment gebracht (Ludwig, 1995). Dabei wurden die jeweiligen homologen Positionen einander gegenübergestellt, was eine weitgehend korrekte Zuordnung in den hypervariablen Regionen der 16S rRNA-Gene ermöglicht (Gutell *et al.*, 1994). Anschließend wurde das Alignment manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert, sowie die Primersequenzen entfernt. Unter Anwendung des Parsimony-Algorithmus (Fitch, 1971) wurden die aufgearbeiteten Sequenzdaten in den „Gesamtbaum“ der ARB-Datenbank eingebracht. Mit dieser Funktion wird die zu analysierende Sequenz im Stammbaum einer Sequenz zugeordnet, zu der die geringste Anzahl an Nukleotidsubstitutionen besteht. Für diese Berechnung wurden keine evolutiven Korrekturfaktoren berücksichtigt, und die eingerechnete Sequenz hat hierbei keinen Einfluss auf die Topologie des Stammbaumes. Dieser vorläufige Baum diente als Basis für die phylogenetische Verrechnungen ausgewählter Sequenzen.

Für die Stammbaumanalysen wurden zunächst Basenfrequenz-Filter für die jeweilige bearbeitete phylogenetische Gruppe erstellt. Mit diesen Filtern ist es möglich nur diejenigen Nukleotidpositionen in die nachfolgenden Berechnungen mit einzubeziehen, die bei mindestens 50% der betrachteten Sequenzen konserviert ist. Somit werden hochvariable Regionen der 16S rRNA, deren phylogentischer Informationsgehalt aufgrund hoher Mutationsraten fraglich ist, aus den Berechnungen ausgeschlossen.

Danach wurde mit einer Auswahl möglichst langer (> 750 Basen) Sequenzen ein präziser phylogenetischer Baum konstruiert. Die Berechnungen wurden mit verschiedenen Algorithmen durchgeführt, um die Topologie der jeweiligen Bäume miteinander zu vergleichen. Dafür wurden die Treepuzzle-Methode (Version 5.0; <http://www.tree-puzzle.de>; Strimmer und VonHaeseler, 1996), die FastDnaMI (Olsen *et al.*, 1994; <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/fastdnaml.html>) und Neighborjoining-Methode (Saitou und Nei, 1987) verwendet. Im Idealfall sollten diese Bäume ein übereinstimmendes Bild der wahren phylogenetischen Beziehung ergeben (Ludwig *et al.*, 1998). Anschließend wurden die kurzen Sequenzen mit Hilfe des Parsimony-Algorithmus in den Grundbaum eingebracht, ohne die Topologie des Grundbaumes zu verändern (Ludwig *et al.*, 1998). Da die meisten verfügbaren Umweltsequenzen von kurzer Sequenzlänge waren, konnten in die Stammbaumberechnung der *Thermoplasmatales* und verwandter Umweltklone nur 679 Basen einbezogen werden.

5.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Zum spezifischen Nachweis einzelner Zellen in der Anreicherungskultur wurde eine Methode der Ganzzellhybridisierung, die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Amann *et al.*, 1995) verwendet. Bei dieser Methode lagern sich unter optimalen Bedingungen fluoreszenzmarkierte (in dieser Arbeit mit Cy3 oder Fluoreszein) Oligonucleotidsonden spezifisch an die 16S rRNA einer Zielgruppe (RC-III, *Archaea*, *Bacteria*). Zellen, die eine ausreichende Menge Sonde gebunden haben, fluoreszieren und können mikroskopisch detektiert werden.

Für die taxon-spezifische Detektion von RC-III *Archaea* wurden vier Oligonucleotidsonden mit den Softwaretools „Probedesign“ und „Probematch“ der Phylogenie-Software ARB entwickelt. Die Bindung der Sonden (Fa. MWG) wurde mit fixierten Zellen der Anreicherungskultur LL25°C getestet. Optimale Signalstärke der Fluoreszenz wurde mit der Sonde RC-III131 (siehe Tabelle 4) erzielt. Die Stringenz der Sonden wurde mit fixierten Zellen von *Methanoplanus endosymbiosus* (DSM 3599) und *Methanococcus maripaludis* (DSM 2771) getestet, da die 16S rRNA dieser Organismen 2 Fehlpaarungen in der Zielregion der Oligonucleotidsonde besitzen. Weiterhin wurden *Archaea* und *Bacteria* spezifischen Oligonucleotidsonden (siehe Tabelle 4) zur Kontrolle des RC-III-Signals eingesetzt.

Tabelle 4: Beschreibung der 16S rRNA Oligonukleotidsonden für Ganzzellhybridisierung. *gekennzeichnete Referenz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Zielgruppe	Referenz
RC-III131	CATGCCCTAAGGTGGGGG	RC-III	Kemnitz <i>et al.</i> , 2004 *
ARC344	TCGCGCCTGCTGCICCCCGT	<i>Archaea</i>	Raskin <i>et al.</i> , 1994
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i>	Stahl und Amann, 1991
EUB	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Bacteria</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Bacteria</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999

Das verwendete Protokoll der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung orientiert sich an der Publikation Dedysh *et al.* (Dedysh *et al.*, 2001). Dafür wurde die Anreicherungskultur LL25°C mit 0,1% Pepton (mit und ohne 50 µg ml⁻¹ Kanamycin) inkubiert und nach 2 Wochen davon 5 ml zentrifugiert (15 min, 8500 rpm, 4°C, Sorvall RC 5B Plus, Rotor SS34). Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Die Ganzzellfixierung erfolgte mit 3% Paraformaldehyd (=1,5 ml 4% Paraformaldehyd in PBS) für 5 h auf Eis. Die Zellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (2 min, 14000 rpm, 20°C, Centrifuge 5417R, Eppendorf) und Resuspendieren mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl 50% Ethanol-PBS (vol/vol) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Hybridisierung wurden Objektträger mit 8 Vertiefungen in einer hydrophoben Teflonbeschichtung (MAGV, Rabenau-Londorf) verwendet, die zuvor mit 70% Ethanol gereinigt wurden. 3 bis 4 µl der Zellsuspension wurden auf die Vertiefung verteilt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entwässerung der Zellen erfolgte über eine Ethanolreihe (50%, 80%, 100%) für je 3 min. Für die Hybridisierung wurden 8 µl Hybridisierungslösung und je 1 µl der Sondenlösung (10 pmol µl⁻¹) auf die Vertiefung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 46°C für 90 min im Hybridisierungssofen (HYBAID, MWG-Biotech, Ebersberg) in einer feuchten Kammer. Die Objektträger wurden anschließend mit vorgewärmter Waschlösung abgespült, für 20 min in der Waschlösung bei 48°C inkubiert und dann mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden die Gesamt-DNA der Zellen mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 2 µM) für 5 min gefärbt. Die DAPI-Lösung wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Die trockenen Präparate wurden mit einem Tropfen Antifading-Reagenz

(Citifluor AF1 auf Glycerinbasis, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die mikroskopische Betrachtung wurde mit einem Mikroskop mit Fluoreszenzleuchte (Axiophot, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Digitalkamera (Magna Fire, Fa. Intas) und dem zugehörigen Programm „Mega Fire“.

Lösungen:

PBS (=phosphate-buffered saline):

8 g l ⁻¹	NaCl
0,2 g l ⁻¹	KCl
1,44 g l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄
0,2 g l ⁻¹	NaH ₂ PO ₄

Hybridisierungslösung:

0,9 M	NaCl
20 mM	Tris/HCl (pH 7.2)
30%	Formamid
0,01%	Natriumdodecylsulfat (SDS)

Waschlösung:

112	mM NaCl
20	mM Tris-HCl
5	mM EDTA
0,01%	SDS

III Ergebnisse

1. Quantifizierung phylogenetischer Gruppen mittels Real Time-PCR und Validierung der Zielgruppenspezifität

Zur Quantifizierung der archaeellen 16S rRNA-Gene wurde ein spezifischer PCR-Assay entwickelt. Dafür wurden bereits publizierte *Archaea* spezifische Primer mit Hilfe der ARB-Datenbank theoretisch überprüft. Der für die T-RFLP-Analysen verwendete forward-Primer A109f wies bereits bei einer Fehlpaarung eine mögliche Bindung von bakteriellen 16S rRNA Gensequenzen auf. Der Primer A364aF (Burgraff *et al.*, 1997) zeigte hingegen erst bei 2 Fehlpaarungen eine mögliche Bindung bakterieller Sequenzen und war zusätzlich GC-reicher (77,5%) als der Primer A109f (50%). Letzteres erlaubte eine höhere Primerbindetemperatur und somit eine spezifischere Amplifikation, wenn der forward Primer A364aF mit dem reverse Primer A934b (65% GC-Gehalt) (Großkopf *et al.*, 1998a) kombiniert wird. Die Klonierung von PCR-Produkten aus einem DNA-Extrakt der Anreicherungskultur (LL25°C), sowie einem DNA-Extrakt von Waldboden bestätigte die Spezifität des PCR-Assays, da nur archaeelle Sequenzen nachgewiesen wurden. Von 19 Klonen der Anreicherungskultur LL25°C (siehe Abschnitt 2) gehörten 15 Sequenzen zu den *Methanosarcinaceae* und 4 zu den *Methanomicrobiaceae*. Rice Cluster III-Sequenzen wurden nicht gefunden, da die Sequenzen der Methanogenen dominierten. Die Klonbibliothek des Waldbodens zeigte ebenfalls nur archaeelle Sequenzen, wohingegen die Klonierung eines mit dem Primerpaar A109f / A934b erhaltenen Amplikons zu 14 archaeellen und 23 unspezifischen (bakteriellen) Sequenzen führte (siehe Abschnitt 4).

Um die Abundanz von Rice Cluster (RC-) III-*Archaea* zu bestimmen, wurde ein spezifischer forward-Primer (RC-III-126f) entwickelt, welcher an die 16S rRNA-Gensequenzen von RC-III der Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C, sowie des verwendeten Bodens PM (Kemnitz *et al.*, 2004) bindet. Dieser wurde mit dem archaeellen reverse-Primer A934b kombiniert. Der PCR-Assay wurde optimiert und durch T-RFLP-Analyse validiert. Die T-RFLP-Muster zeigten nur ein Restriktionsfragment von 381 bp Länge. Abbildung 2A zeigt ein repräsentatives T-RFLP-Muster der Anreicherungskultur LL25°C. Das T-RF von 381 bp Länge ist charakteristisch für RC-III, welches ebenfalls bei

der Amplifikation der archaeellen 16S rDNA mit dem Primerpaar A109f / A934b (Abbildung 2B) detektiert wurde.

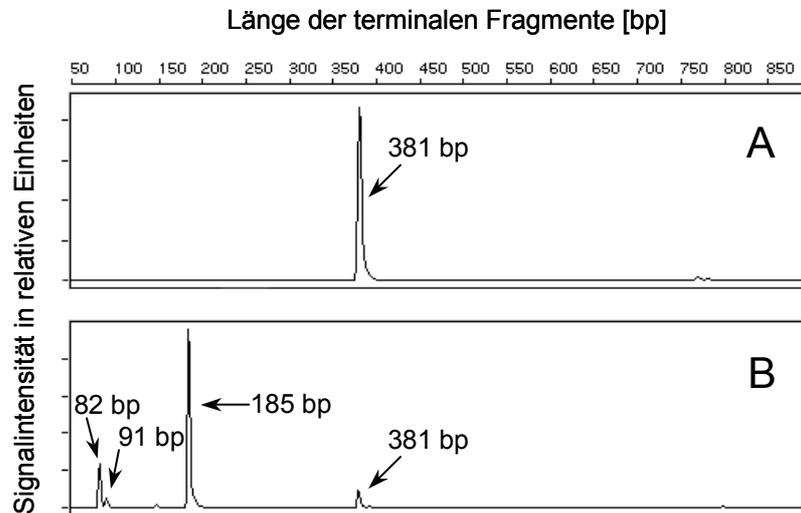


Abbildung 2: Repräsentatives T-RFLP-Muster der Anreicherungskultur LL25°C (0,1% Hefeextrakt als Substrat) nach Amplifikation aus DNA-Extrakten mit dem Primerpaar RC-III-126f / A934b (A) und dem Primerpaar A109f / A934b (B) nach Restriktion der PCR-Produkte mit dem Enzym *TaqI*.

Weiterhin wurden Real Time-PCR-Assays zur Quantifizierung von Rice Cluster I-spezifischen Genen (16S rRNA-Gen und *mcrA*-Gen) entwickelt. Da die Primer spezifisch für RC-I-Sequenzen waren und eine unspezifische Amplifikation bakterieller Sequenzen der Anreicherungskultur MRE50 nicht zu erwarten wurde, erfolgte keine Validierung der Real Time-PCR-Assays mittels T-RFLP-Analyse oder Klonierung der PCR-Produkte.

2. Anreicherung und Analyse von Rice Cluster III-*Archaea*

2.1 Anreicherungskulturen aus gefluteten Böden

Die Anreicherung anaerober Mikroorganismen aus Böden wurde mit einem anoxischen Mineralmedium (Scholten *et al.*, 2000) und Hefeextrakt (0,025%) als Substrat durchgeführt. Als Inokulum wurden Bodenaufschlammungen der Böden PM (= permanent marshland, ständig gefluteter Boden) und LL (= low level, zeitlich gefluteter Boden) aus Flutungsgebieten des Flusses Waal (Niederlande) verwendet, da in diesen Böden das bisher unkultivierte RC-III detektiert wurde (Kemnitz *et al.*, 2004). Die Inkubation der Anreicherungskulturen erfolgte bei 16, 25 und 37°C. Nach ca. 1 Monat war ein sichtbares Wachstum von Mikroorganismen zu sehen und die Kulturen wurden 10%ig auf frisches Medium überimpft. Nach mehreren Transfers nahm die notwendige Inkubationszeit ab.

2.2 Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft der Anreicherungskulturen

Die Diversität der *Archaea* (Abbildung 3) in den Anreicherungskulturen wurde nach dem zweiten Transfer mittels T-RFLP-Analyse der amplifizierten 16S rDNA-PCR-Produkte untersucht. Da die terminalen Restriktionsfragmente (T-RF) der phylogenetischen Gruppen bereits aus der Analyse der Böden bekannt waren (Kemnitz *et al.*, 2004), konnten die ermittelten T-RFs zugeordnet werden. RC-III (381 bp) wurde, außer in der Kultur LL16°C (Inokulation mit dem Boden LL, Inkubation bei 16°C), mit unterschiedlich hohen relativen Anteilen detektiert. In den Anreicherungskulturen PM konnten die RC-III-Fragmente nur mit geringem relativem Anteil (3 bis 17%) nachgewiesen werden. Höhere Abundanzen wurden in den Anreicherungskulturen LL 25°C (58%) und LL37°C (30%) gefunden. In allen Kulturen wurden weiterhin T-RFs folgender Methanogener detektiert: *Methanomicrobiaceae* (82 und 392 bp), *Methanobacteriaceae* (91 bp) und *Methanosarcinaceae* (185 bp).

Die Diversität der *Bacteria* wurde ebenfalls mittels T-RFLP-Analyse der 16S rDNA-Amplikons untersucht (Abbildung 3). In allen Anreicherungskulturen wurden bis zu 25 verschiedene T-RFs detektiert.

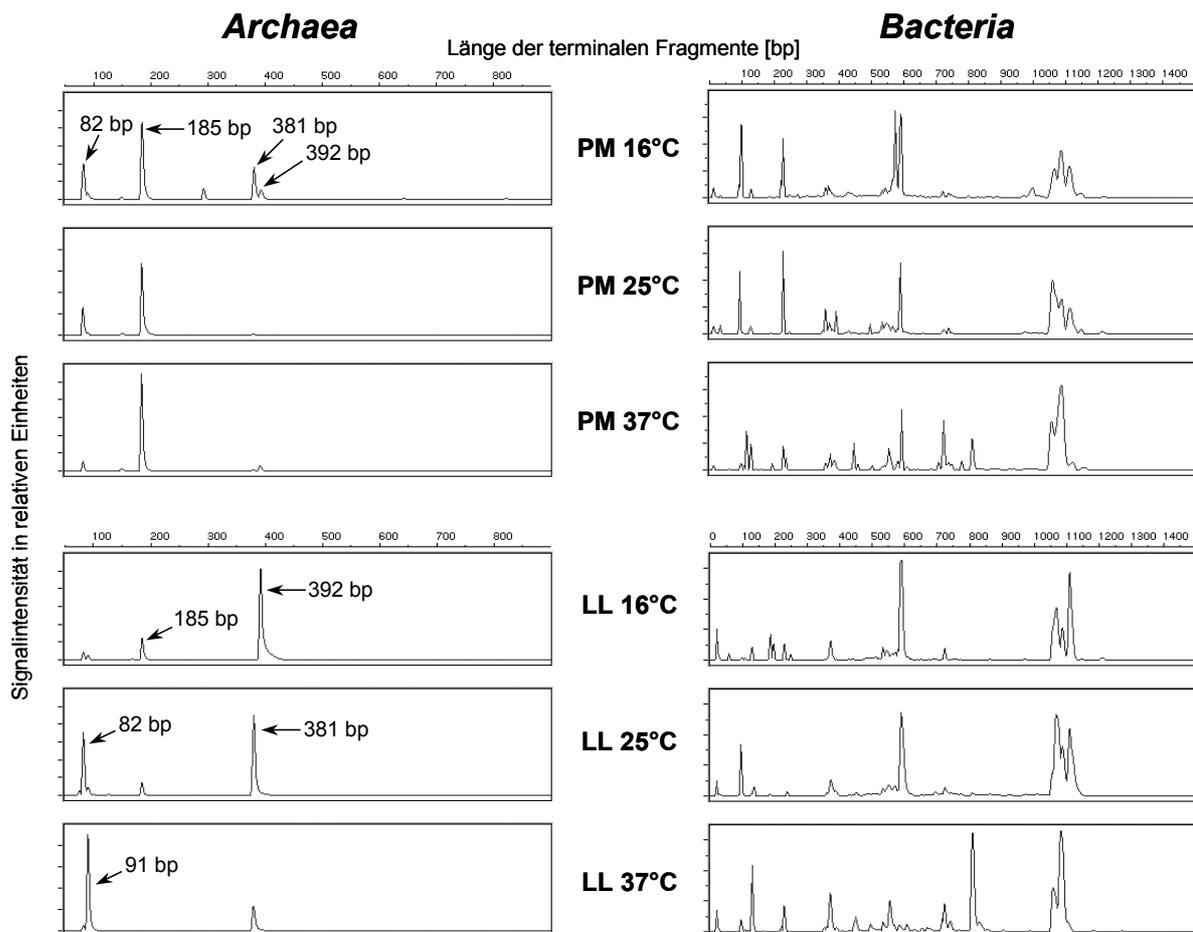


Abbildung 3: Archaeelle und bakterielle T-RFLP-Muster (Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate mit *TaqI*, bzw. *HhaI*) der Anreicherungskulturen, welche bei drei verschiedenen Temperaturen mit den Böden PM (= permanent marshland) und LL (= low level) inkubiert wurden. Die Längen der T-RFs sind mit Pfeilen beschriftet.

2.3 Phylogenie der *Archaea*

Um die Zuordnung der ermittelten T-RFs zu phylogenetischen Gruppen der *Archaea* zu überprüfen, wurden die 16S rDNA-Amplifikate der Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C kloniert und sequenziert. Die terminalen Restriktionsfragmente von 15 bzw. 40 Klonen wurden mittels T-RFLP-Analyse ermittelt. Jeweils 5 Klone mit einem T-RF von 381 bp und 3 weitere Klone wurden sequenziert und in einem Stammbaum verrechnet (Stammbaum nicht gezeigt). Die Klonsequenzen waren nah mit den Umweltsequenzen des Bodens PM (Kemnitz *et al.*, 2004) verwandt und gruppierten zusammen mit Sequenzen der *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* und RC-III (siehe

Tabelle 5). In den Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C wurden zwei verschiedene Sequenztypen (LL25A und LL37A) nachgewiesen, die sich maximal in 1,8% der Sequenz voneinander unterschieden. Eine ausführliche Darstellung der *Thermoplasma*-verwandten Umweltsequenzen und der RC-III-Klonsequenzen der Anreicherungskulturen ist in der Diskussion der Ergebnisse beschrieben.

Tabelle 5: Terminale Fragmentlänge und Phylogenie der archaeellen Klonsequenzen der Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C.

T-RF	Phylogenie	Klone
82 bp	<i>Methanomicrobiaceae</i>	LL 25°C A2, 3
91 bp	<i>Methanobacteriaceae</i>	LL 37°C A1, 2, 3
185 bp	<i>Methanosarcinaceae</i>	LL 25°C A6
381 bp	Rice Cluster III	LL 25°C A1, 4, 7, 8, 10 LL 37°C A9, 20, 29, 33, 35

2.4 Wachstumsbedingungen der Rice Cluster III-Archaea (LL25°C)

Auf Grund des hohen relativen Anteils von RC-III innerhalb der *Archaea* in der Anreicherungskultur LL25°C, wurde diese für die Charakterisierung dieser bislang unkultivierten *Archaea* verwendet. Mit Hilfe der Real Time-PCR-Assays konnte die Zu- bzw. Abnahme von RC-III, sowie aller *Archaea* und *Bacteria* verfolgt werden.

2.4.1 Einfluss der Hefeextraktkonzentration

Abbildung 4 zeigt die Zunahme der RC-III-Zielmoleküle über die Zeit mit Hefeextrakt als Substrat. Die DNA-Extraktion und Amplifikation erfolgte in Triplikaten und zeigte eine gute Reproduzierbarkeit (SE = 1 – 20%). Die Erhöhung der Hefeextraktkonzentration von 0,025 auf 0,1% führte zu einer 3,4- bis 4,6-fachen Zunahme der 16S rDNA-Zielmoleküle nach 7 und 21 Tagen. Nach 21 Tagen wurden $1,5 \times 10^5$ Zielmoleküle ml⁻¹ (0,025% Hefeextrakt) und $6,8 \times 10^5$ Zielmoleküle ml⁻¹ Kultur (0,1% Hefeextrakt) detektiert. Eine weitere Erhöhung der Hefeextraktkonzentration auf 0,2 und 0,5%, führte im Vergleich zu 0,1% Hefeextrakt zur 1,8- und 2,3-fachen Zunahme von RC-III-Zielmolekülen nach 2

Wochen Inkubationszeit (Daten nicht gezeigt). Die folgenden Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit 0,1% Hefeextrakt durchgeführt.

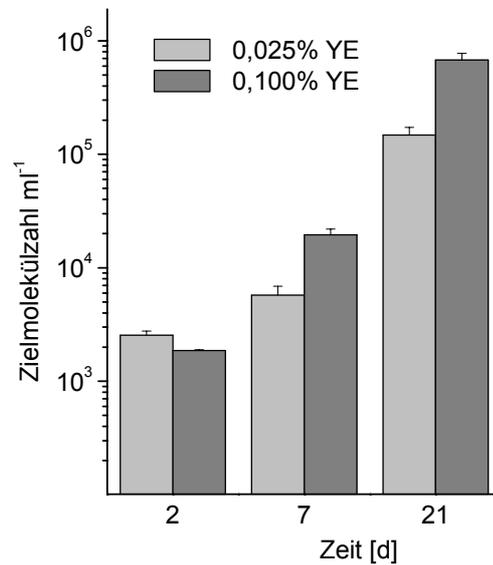


Abbildung 4: Wachstum der Anreicherungskultur LL25°C mit 0,025 und 0,1% Hefeextrakt nach 2, 7 und 21 Tagen Inkubationszeit. x-Achse: Inkubationszeit, y-Achse: logarithmische Darstellung der RC-III-Zielmolekülzahlen ml⁻¹ Kultur. n = 3 ± SE von parallelen DNA-Extraktionen.

Die Anreicherungskulturen zeigten nach 2 Wochen Inkubation mit 0,1% YE durchschnittlich eine Trübung ($\Delta\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) von 0,2. Dies korrelierte mit einer Gesamtzellzahl von 2×10^8 Zellen ml⁻¹ und einer Gesamtzielmolekülzahl von 6×10^8 bis 1×10^9 Zielmoleküle ml⁻¹ Kultur.

2.4.2 Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft

Eine genaue Untersuchung der Zunahme von RC-III über die Zeit ist in Abbildung 5 dargestellt. Dafür wurden zwei parallele Kulturen (500 ml) mit 0,1% YE bei 25°C inkubiert und die 16S rDNA-Zielmoleküle von RC-III, *Archaea* und *Bacteria* bestimmt. Die RC-III-Zielmoleküle zeigten eine kurze lag-Phase von zwei Tagen (Abbildung 5A). In der exponentiellen Phase (2 bis 9 Tag) konnte anhand der Zunahme der Zielmolekülzahlen eine Verdopplungszeit von ca. 3 Tagen bestimmt werden. Nach dieser Periode nahmen die RC-III-Zielmolekülzahlen nur noch gering bis auf $1,3 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1} Kultur zu (Tag 13) und nahmen danach wieder gering ab.

Gleichzeitig stiegen die archaeellen Zielmoleküle bis auf 6×10^6 Zielmoleküle ml^{-1} an (Abbildung 5B). Somit nahm der relative Anteil von RC-III- zu *Archaea*-Zielmolekülen von 60% (Tag 13) auf 18% (Tag 42) ab (Abbildung 5A).

Bakterielle Zielmolekülzahlen zeigten einen schnellen Anstieg bis zum fünften Inkubationstag ($6,8 \times 10^9$ Zielmoleküle ml^{-1}) und nahmen danach wieder stark ab (Abbildung 5B). Die bakteriellen Zielmolekülzahlen waren jedoch bis zum Tag 9 mindestens um den Faktor 700 höher als die archaeelle Zielmoleküle.

Die $\Delta\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ -Werte stiegen von 0,04 zu Beginn der Inkubation auf 0,2 (Tag 2) und nahmen über die Zeit wieder kontinuierlich bis auf 0,14 ab. Innerhalb der ersten Tage wurden ca. $0,02 \mu\text{mol ml}^{-1}$ H_2 (bis Tag 5) und ca. 4 bis $6 \mu\text{mol ml}^{-1}$ Acetat (Tag 2 bis 13) gebildet (Abbildung 5C). Der anschließende Verbrauch der Fermentationsprodukte korrelierte mit einem Anstieg der Methankonzentration ($4 \mu\text{mol ml}^{-1}$). Propionat wurde nur in geringen Mengen von $<1 \mu\text{mol ml}^{-1}$ gebildet. Weitere Fermentationsprodukte, wie Valerat und Isopropanol waren kaum detektierbar.

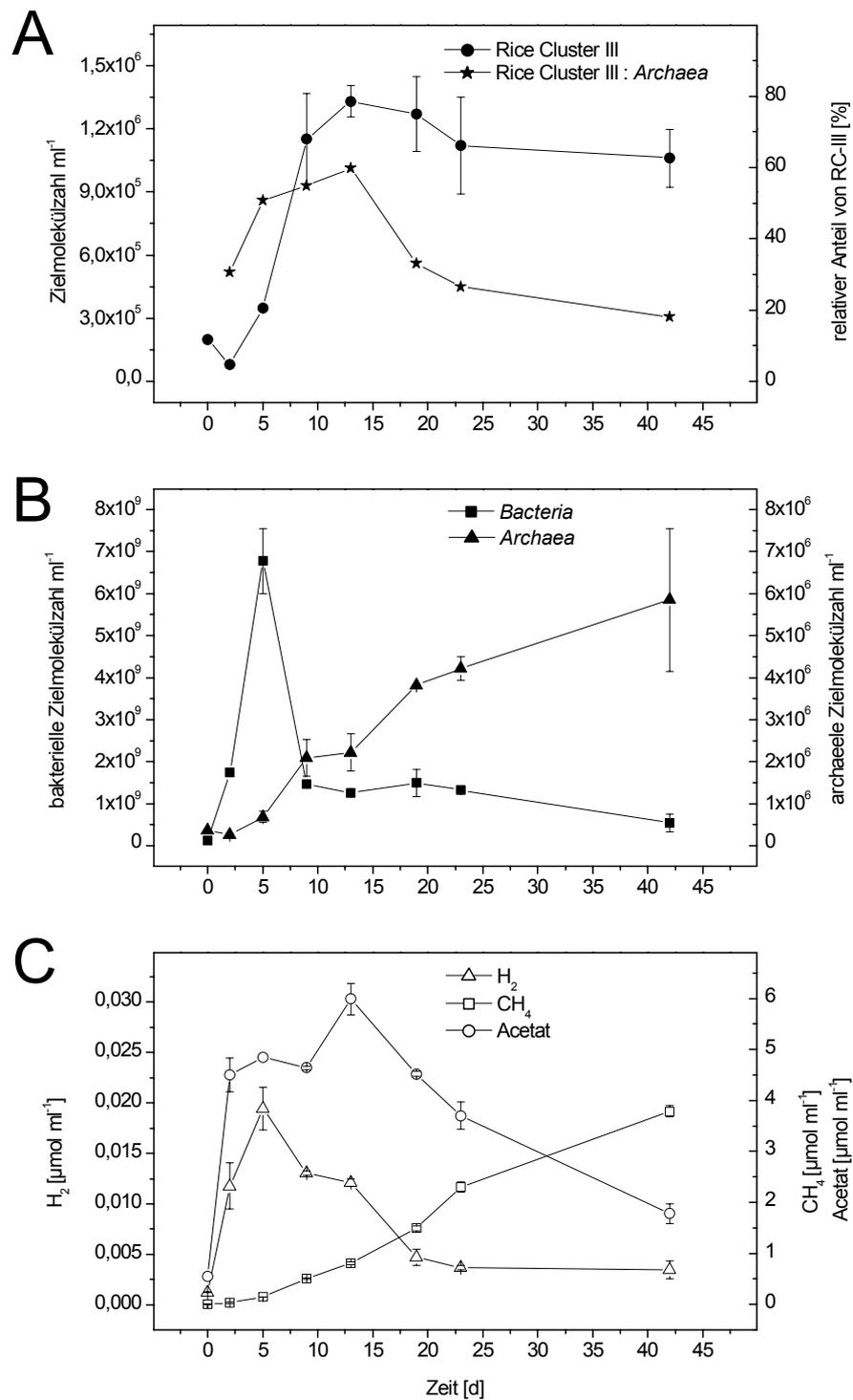


Abbildung 5: Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft der Anreicherungskultur LL25°C während 42 Tagen Inkubationszeit mit 0,1% Hefeextrakt. RC-III-Zielmolekülzahlen pro ml Kultur und der berechnete relative Anteil von RC-III innerhalb der *Archaea* (A), Zielmolekülzahlen der *Archaea* und *Bacteria* pro ml Kultur (B), H_2 -, CH_4 - und Acetat-Konzentrationen (C). $n = 2 \pm \text{SE}$.

2.4.3 Temperaturoptimum

Eine maximale Zunahme der Zielmoleküle von RC-III (Abbildung 6A), als auch der gesamten *Archaea* (Abbildung 6B), wurde zwischen 25 bis 30°C (2 Wochen Inkubation) bzw. 20 und 30°C (4 Wochen Inkubation) detektiert. Bei $\leq 11^\circ\text{C}$ und $\geq 37^\circ\text{C}$ war kein Wachstum von RC-III detektierbar. Die bakteriellen Zielmoleküle nahmen zwischen 4 und 43°C zu und waren bei 16°C am höchsten (Abbildung 6B).

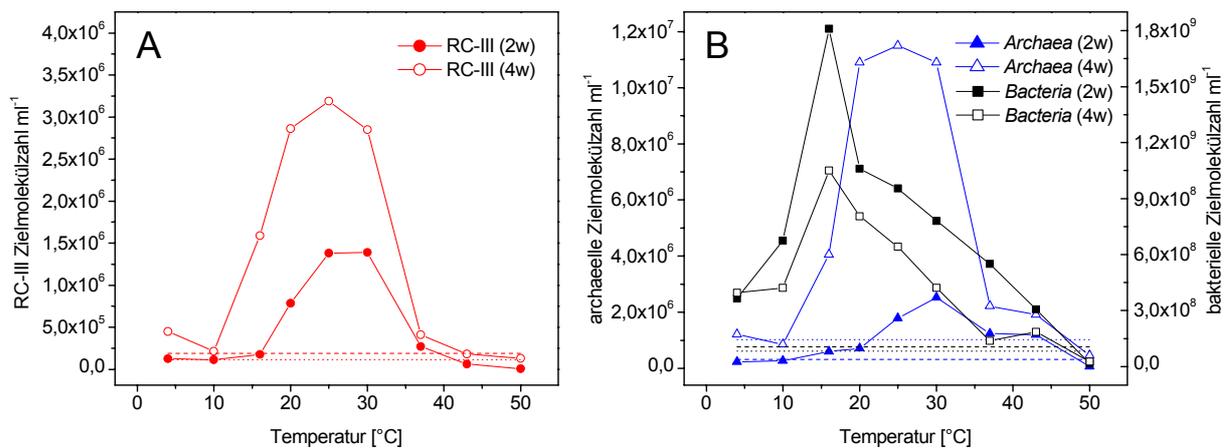


Abbildung 6: Temperaturoptima von RC-III (A), *Archaea* und *Bacteria* (B) nach 2 und 4 Wochen (w) Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. x-Achse: Temperatur, y-Achse: 16S rDNA-Zielmolekülzahlen pro ml Kultur. Die unterbrochenen Linien stellen die Zielmolekülzahl zu Beginn der Inkubation dar (gestrichelt: der 2 Wochen inkubierten Kulturen; gepunktet: der 4 Wochen inkubierten Kulturen).

2.4.4 pH-Optimum

Ein Anstieg der RC-III-Zielmoleküle nach 2 Wochen Inkubationszeit war bei pH 7,2, jedoch nicht im sauren und alkalischen Bereich nachweisbar (Abbildung 7A). Die *Archaea*-Zielmolekülzahlen zeigten das gleiche pH-Optimum, wogegen ein Wachstum der *Bacteria* in einem größeren pH-Bereich (5,5 bis 7,2) detektiert wurde (Abbildung 7B).

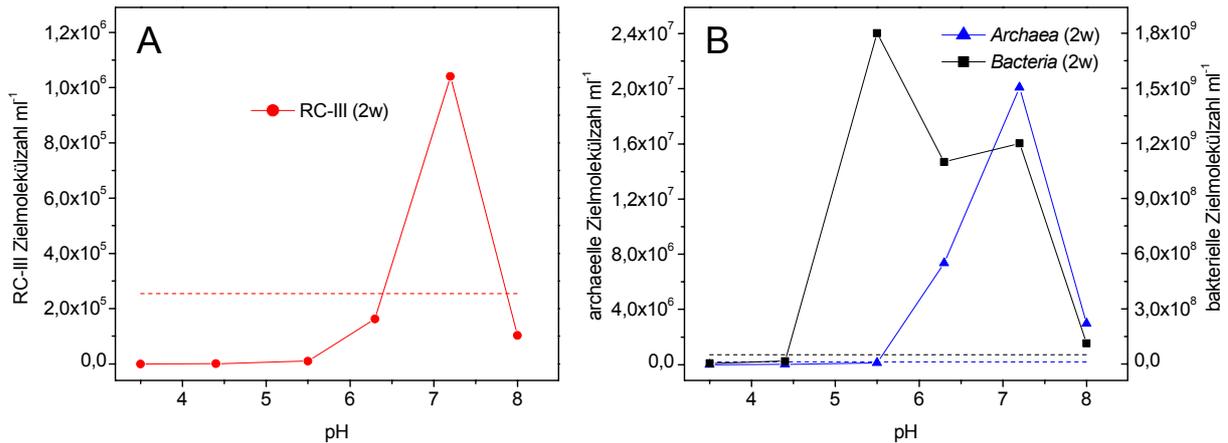


Abbildung 7: pH-Optima von RC-III (A), *Archaea* und *Bacteria* (B) nach 2 Wochen (w) Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. x-Achse: pH-Wert, y-Achse: 16S rDNA-Zielmolekülzahlen pro ml Kultur. Die unterbrochenen Linien (gestrichelt) stellen die Zielmolekülzahl zu Beginn der Inkubation dar.

2.4.5 Salzoptimum (NaCl)

Die Salzkonzentration wurde schrittweise von 5 auf 170 mM NaCl (=0,03 bis 1%) erhöht. Eine optimales Wachstum der RC-III-*Archaea* wurde zwischen 50 und 102 mM NaCl detektiert (Abbildung 8A). NaCl-Konzentrationen von ≥ 136 mM führten zu einer Zunahme der Zielmoleküle. Die Zielmoleküle der *Archaea* waren bei 85 und 102 mM NaCl am höchsten (Abbildung 8B). Die bakteriellen Zielmoleküle zeigten hingegen eine geringe Variabilität (Abbildung 8B)

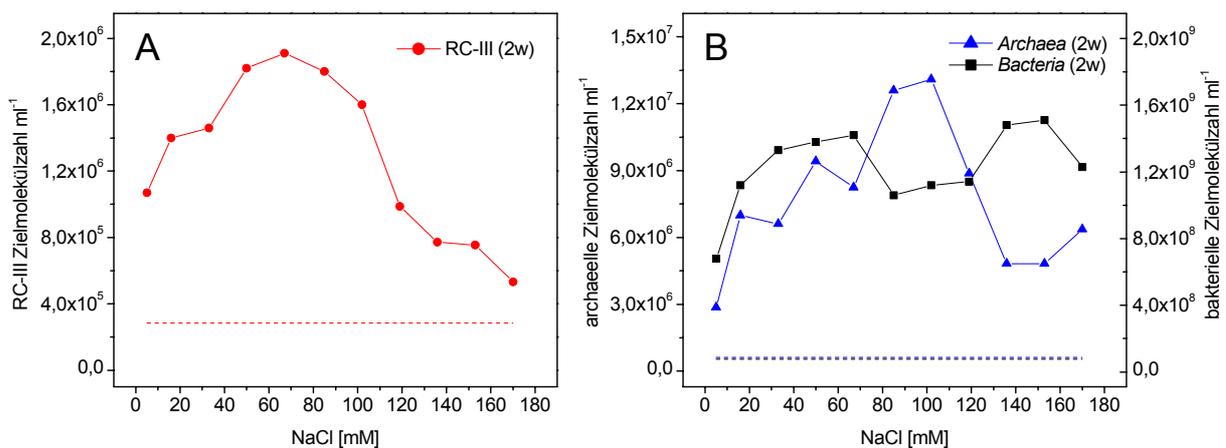


Abbildung 8: Optima der Salzkonzentration (NaCl) von RC-III (A), *Archaea* und *Bacteria* (B) nach 2 Wochen (w) Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. x-Achse: NaCl-Konzentration, y-Achse: 16S rDNA-Zielmolekülzahlen pro ml Kultur. Die unterbrochenen Linien (gestrichelt) stellen die Zielmolekülzahl zu Beginn der Inkubation dar.

2.4.6 Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Die Anreicherungskultur LL25°C wuchs mit dem komplexen Substrat Hefeextrakt. Um die von RC-III genutzten Substratbestandteile zu identifizieren, wurde die Kultur mit verschiedenen definierten, aber auch komplexen Kohlenstoffquellen inkubiert. Nach 2 und 4 Wochen Inkubationszeit wurden die 16S rDNA-Zielmolekülzahlen pro ml Kultur von RC-III, sowie von den *Archaea* und *Bacteria* bestimmt. In Tabelle 6 ist die relative Zunahme der Zielmolekülzahlen (in %) der verschiedenen Zielgruppen im Vergleich zu einer Referenzkultur (0,1% Hefeextrakt) dargestellt. Dazu wurde die Zielmolekülzahl des eingesetzten Inokulums (entspricht der Zielmolekülzahl zum Zeitpunkt 0) von allen Werten subtrahiert und die daraus resultierende Zielmolekülzahl der Referenzkultur als 100% definiert. Die gemessenen Extinktionen ($\Delta OD_{600 \text{ nm}}$) der Kulturen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

RC-III nahm nach 2 und 4 Wochen in den mit Hefeextrakt inkubierten Referenzkulturen um $1,1$ bis $2,3 \times 10^6$, bzw. $9,9 \times 10^5$ bis $1,9 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1} Kultur zu. Das Wachstum der *Archaea* wurde durch einen Anstieg von $1,1$ bis $5,2 \times 10^6$, bzw. $1,4$ bis $4,6 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1} nachgewiesen. Die *Bacteria* zeigten einen Anstieg von $5,3 \times 10^8$ bis $1,3 \times 10^9$ Zielmoleküle ml^{-1} .

Im Vergleich zu diesen Referenzkulturen wurde eine relative Zunahme von RC-III nur in den Inkubationen mit 0,1% Pepton und Trypton gefunden. Die Zielmolekülzahlen aller *Archaea* waren ebenfalls höher, wohingegen eine geringe Zunahme die bakteriellen Zielmoleküle detektiert wurde. Das Verhältnis der RC-III-Zielmoleküle zur Gesamtzielmolekülzahl (*Archaea* + *Bacteria*) stieg somit nach 2 Wochen in den Peptoninkubationen auf 1% (Pepton 1 = Casein Hydrolysat, pankreatischer Verdau, Fa. Fluka) und 2% (Pepton 2 = Peptone aus Casein, pankreatischer Verdau, Fa. Fluka). Die Zugabe von Fleischextrakt und Rinderserumalbumin (BSA) führte zu einer gering höheren bzw. niedrigeren relativen Zunahme von RC-III. Wurde die Anreicherungskultur LL25°C mit verschiedenen Zucker-, Fettsäure- und Aminosäuregemischen, mit Glycerol, Ethanol, Methanol, Ferula- und Syringasäure, Benzoat, Pyruvat und Nucleotidbasen inkubiert, konnte kein Wachstum der RC-III-*Archaea* nachgewiesen werden. Die Anreicherungskultur LL25°C wurde zur Kontrolle ebenfalls auf Medium ohne Substrat überimpft, welches jedoch Vitamine enthielt. Die Zielmolekülzahlen der drei phylogenetischen Gruppen zeigten kein Wachstum nach 4 Wochen Inkubation.

Tabelle 6: Einfluss verschiedener Substrate auf das Wachstum von RC-III, *Archaea* und *Bacteria* nach 2 und 4 Wochen (w) Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. Die Werte geben die relative Zunahme der 16S rDNA-Zielmoleküle (in %) im Vergleich zu Referenzkulturen (mit 0,1% Hefeextrakt) an. Das Zellwachstum wurde durch die Extinktion ($\Delta OD_{600\text{ nm}}$) bestimmt. Pepton (1) = Casein Hydrolysat (pankreatischer Verdau, Fa. Fluka); Pepton (2) = Peptone aus Casein (pankreatischer Verdau, Fa. Fluka); Trypton (1) = Peptone aus Casein (tryptischer Verdau, Fa. Fluka); Trypton (2) = BactoTrypton (Fa. Becton Dickinson); BSA = Rinderserumalbumin. Kontrolle: Inkubation ohne Substrat (mit Vitaminen). n.b. = nicht bestimmt.

C-Quelle	RC-III [%]		<i>Archaea</i> [%]		<i>Bacteria</i> [%]		$\Delta OD_{600\text{ nm}}$	
	2 w	4 w	2 w	4 w	2 w	4 w	2 w	4 w
Glucose+Fructose	-7	-2	-11	-8	36	94	0,2	0,149
Malzextrakt	1	2	42	20	88	60	0,722	0,566
Fettsäuren	-3	-6	-2	12	0	4	0,068	0,04
Glycerol	-8	-7	-13	-7	3	20	0,09	0,079
Ethanol	n.b.	-11	n.b.	-8	n.b.	27	n.b.	0,122
Methanol	n.b.	-3	n.b.	30	n.b.	-6	n.b.	0,057
Ferula-+Syringa- säure	-7	-8	-8	-8	-5	49	0,024	0,211
Benzoat	-9	-9	-15	-11	-5	7	0,056	0,1
Pyruvat	-4	-7	2	240	143	91	0,204	0,146
Nucleotidbasen	-1	-2	110	61	19	41	0,069	0,068
Aminosäuren	≤ 0	≤ -2	≤ 22	≤ 41	≤ 4	≤ 24	0,035- 0,062	0,011- 0,035
Fleischextrakt	127	64	261	141	105	77	0,123	0,135
Pepton (1)	334	164	363	222	46	82	0,137	0,175
Pepton (2)	460	118	345	193	33	63	0,135	0,174
Trypton (1)	304	112	492	205	84	60	0,209	0,163
Trypton (2)	244	116	340	278	24	67	0,181	0,192
BSA	62	35	589	374	123	37	0,277	0,147
Kontrolle	n.b.	13	n.b.	-19	n.b.	-8	n.b.	0,027

2.4.7 Einfluss von Elektronenakzeptoren, Reduktionsmittel, 2-Bromoethansulfonat und H₂

Die Zugabe von Nitrat (5 mM), elementarem Schwefel (0,1%), Thiosulfat (8 mM), Fumarat (8 mM), Eisen(III)-Chlorid (8 mM) und Eisen(III)-Citrat (8 mM), sowie die Kontrolle letzterer mit Citrat (8 mM), führte zu geringeren RC-III-Zielmolekülzahlen (Tabelle 7). Im Vergleich zu Referenzkulturen, die nur mit 0,1% Hefeextrakt inkubiert wurden, betrug der relative Anteil weniger als 52%. Die Zugabe von Nitrat führte nach 2 und 4 Wochen zur Bildung von 3 bzw. 4 mM Nitrit. Die RC-III-Zielmolekülzahlen nahmen zwar mit steigender Sulfatkonzentration (3, 5 und 8 mM) zu, erreichten aber nur einen relativen Anteil von 79%. Die Sulfat wurde nicht verbraucht. Die Inkubation mit Ferrihydrit (10 mM), 9,10-Anthraquinone-2,6-Disulfonat (=AQDS, 2 mM), sowie mit einem Gemisch beider Elektronenakzeptoren (je 0,5 mM) hatte nahezu keinen Einfluss auf RC-III-*Archaea*. Unter oxischen Bedingungen (O₂-Gasatmosphäre) waren keine RC-III-Zielmoleküle nachweisbar.

Um das Medium zu reduzieren, wurde eine 1,5 mM Na₂S-Lösung verwendet. Wurde diese gegen alternative Reduktionsmittel wie Titan(III)-Citrat (1 mM), Cystein-HCl (0,1%) und Ascorbat (0,2%) ausgetauscht, nahmen die RC-III-Zielmolekülzahlen nicht zu (Tabelle 4). Die Inkubation der Anreicherungskultur ohne Reduktionsmittel führte jedoch zu vergleichbaren RC-III-Zielmolekülzahlen wie nach Na₂S-Zugabe. Der Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (blau → farblos) zeigte eine Reduktion des Mediums innerhalb weniger Tage an.

Um die Methanogenese zu hemmen, wurde 1 mM 2-Bromoethansulfonat (= BES) hinzugefügt und für 2 und 4 Wochen inkubiert (Tabelle 7). Diese Anreicherungskulturen produzierten, wie erwartet, nur wenig Methan ($\leq 0,04 \mu\text{mol ml}^{-1}$) und zeigten einen sehr geringen Anstieg der 16S rDNA-Zielmolekülzahlen der *Archaea*. Die RC-III-Zielmoleküle nahmen ebenfalls nicht zu. Um einen möglichen syntrophen Einfluss der Methanogenese als Elektronenakzeptor ausschließen zu können, wurde die Anreicherungskultur LL25°C mit einer 100% H₂-Gasphase inkubiert. Die RC-III-Zielmolekülzahlen zeigten nach der Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C mit und ohne Schütteln vergleichbare Werte wie die Referenzkultur mit einer N₂-Gasphase. In Tabelle 4 ist der Mittelwert der geschüttelten und stehend inkubierten Kulturen dargestellt.

Tabelle 7: Einfluss verschiedener Elektronenakzeptoren, Reduktionsmittel, 2-Bromoethansulfonat (BES) und H₂ auf das Wachstum von RC-III, *Archaea* und *Bacteria* nach 2 und 4 Wochen (w) Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. Die Werte geben die relative Zunahme der 16S rDNA-Zielmoleküle (in %) im Vergleich zu Referenzkulturen (nur 0,1% Hefeextrakt) an. Das Zellwachstum wurde durch die Extinktion ($\Delta OD_{600\text{ nm}}$) bestimmt. AQDS = 9,10-Anthraquinone-2,6-Disulfonat, Red. = Reduktionsmittel, * = 6 Wochen inkubiert, n.d = nicht detektierbar, n.b. = nicht bestimmt.

	RC-III [%]		<i>Archaea</i> [%]		<i>Bacteria</i> [%]		$\Delta OD_{600\text{ nm}}$	
	2 w	4 w	2 w	4 w	2 w	4 w	2 w	4 w
Nitrat	13	-6	90	17	198	67	0,258	0,059
S ⁰	10	30	116	22	261	135	0,256	0,236
Sulfat	25-73	73-79	18-118	69-121	87-111	76-81	0,122- 0,145	0,101- 0,121
Thiosulfat	2	15	105	16	362	200	0,233	0,254
Fumarat	2	52	132	22	444	29	0,185	0,166
AQDS	133	114	748	512	572	229	0,297	0,323
Fe(III)Clorid	27	42	127	978	149	56	n.b.	n.b.
Fe(III)-Citrat (Citrat)	24 (57)	15 (34)	185 (66)	112 (90)	401 (139)	136 (86)	0,986 (0,3)	0,980 (0,415)
Ferrihydrit	130	49	82	165	84	52	0,445	0,689
AQDS+Ferrihydrit	122	69	81	84	72	54	0,254	0,285
O ₂	n.d.	n.b.	-19	n.b.	51	n.b.	0,331	n.b.
Titan(III)-Citrat	8	17	195	589	176	100	0,551	0,519
Cystein-HCl	-1	1	115	35	85	32	0,165	0,071
Ascorbat	2	5	169	240	440	251	0,88	0,947
Ohne Red.	98	110	1307	177	1100	177	0,255	0,285
BES	-1	-6	9	12	169	62	0,124	0,083
H ₂	110	78*	579	439*	63	20*	0,157	0,144*

2.4.8 Hemmung mit Antibiotika

Um das Wachstum der *Bacteria* zu hemmen und den relativen Anteil der *Archaea* in der Anreicherungskultur LL25°C zu erhöhen, wurden verschiedene Antibiotika ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), welche die Zellwandsynthese, Proteinbiosynthese und die DNA abhängige RNA-Polymerase inhibieren, zum Medium mit 0,1% Hefeextrakt zugegeben. Nach 2 Wochen Inkubationszeit wurden die Zielmolekülzahlen von RC-III, *Archaea* und *Bacteria*, sowie die Extinktion der Kulturen bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten Referenzkulturen (entsprechen 100%) wurde die Zielmolekülzahl von RC-III, sowie aller *Archaea* mit Ampicillin und Streptomycin gering beeinflusst (Tabelle 8). Die Zielmolekülzahlen der *Bacteria* wurden hingegen gehemmt (85 bzw. 87%). Nach der Zugabe von Kanamycin war die Zielmolekülzahl von RC-III nur 9% geringer, jedoch wurden die *Bacteria* auch nur zu 19% gehemmt. Die Inkubation mit Bacitracin, Vancomycin, Gentamycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Rifampicin führte zu weniger als 50% der RC-III-Zielmoleküle.

Tabelle 8: Hemmung von RC-III, *Archaea* und *Bacteria* mit verschiedenen Antibiotika ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) nach 2 Wochen Inkubation der Anreicherungskultur LL25°C. Die Werte geben den relativen Anteil der 16S rDNA-Zielmoleküle (in %) im Vergleich zu Referenzkulturen (ohne Antibiotikum) an. Das Zellwachstum wurde durch die Extinktion ($\Delta\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) bestimmt. RNA-Pol. = DNA abhängige RNA-Polymerase.

Ziel	Zellwandsynthese			Proteinbiosynthese					RNA Pol.
	Ampicillin	Bacitracin	Vancomycin	Gentamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Kanamycin	Streptomycin	
RC-III [%]	86	8	11	13	4	18	91	65	42
<i>Archaea</i> [%]	164	26	93	61	2	13	68	24	103
<i>Bacteria</i> [%]	15	75	2	29	64	7	81	13	85
$\Delta\text{OD}_{600 \text{ nm}}$	0,083	0,139	0,073	0,103	0,078	0,103	0,169	0,115	0,133

Die Anreicherungskultur LL25°C wurde mit 0,1% Pepton zusammen mit Ampicillin, Kanamycin oder Streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) 2 Wochen inkubiert und zweimal transferiert. Hierbei nahmen die RC-III-Zielmolekülzahlen im Vergleich mit Kulturen ohne Antibiotikum nur in den Inkubationen mit Kanamycin (54 bis 167%) zu und erreichten durchschnittlich $5,4 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1} Kultur. Die Zielmolekülzahlen aller *Archaea* betragen in den drei folgenden Transfers 130 bis 161% (durchschnittlich $7,1 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1}). Dagegen nahmen die Zielmolekülzahlen der *Bacteria* auf 37 bis 64% ab (durchschnittlich $2,8 \times 10^8$ Zielmoleküle ml^{-1}). Dies entspricht einem Anteil von RC-III-Zielmolekülen von 2% an der Gesamtmolekülzahl. Im Vergleich dazu betragen die RC-III-Zielmoleküle in den Kulturen ohne Antibiotikum (mit Pepton) durchschnittlich 1%.

2.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Anreicherung von RC-III *Archaea* durch die Inkubation mit 0,1% Pepton (mit und ohne $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin) führte zum erfolgreichen Nachweis dieser Mikroorganismen mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Abbildung 9A). In mit Hefeextrakt inkubierten Kulturen war ein eindeutiges Signal mit einer RC-III spezifischen Oligonukletidsonde auf Grund der geringen Zellzahl nicht möglich. Die Spezifität dieser Sonde wurde mit Hilfe von *Methanococcus maripaludis* und *Methanoplanus endosymbiosus*, die 2 Fehlpaarungen in der 16S rRNA-Binderegion der Oligonukletidsonde aufweisen, bestätigt. Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Bild der RC-III-*Archaea* in der Anreicherungskultur LL25°C, die mit Pepton und Kanamycin inkubiert wurde. Die RC-III-*Archaea* zeigten eine kokkoide Zellform und wurden hauptsächlich innerhalb von Zellaggregaten gefunden. Das Fluoreszenzsignal der RC-III spezifischen Sonde (Abbildung 9A I) wurde durch das Signal *Archaea* spezifischer Sonden (Abbildung 9A II) bestätigt. RC-III-Zellen waren zwar nur selten außerhalb von Zellaggregaten zu sehen, konnten dann aber eindeutig dem DAPI-Signal (Färbung der gesamten DNA) und Zellen im Phasenkontrast zugeordnet werden. Weiterhin wurde die Spezifität des RC-III spezifischen Signals, dadurch bestätigt, dass *Bacteria* spezifische Sonden nicht an die RNA der RC-III-*Archaea* hybridisierten (Abbildung 9B I und II).

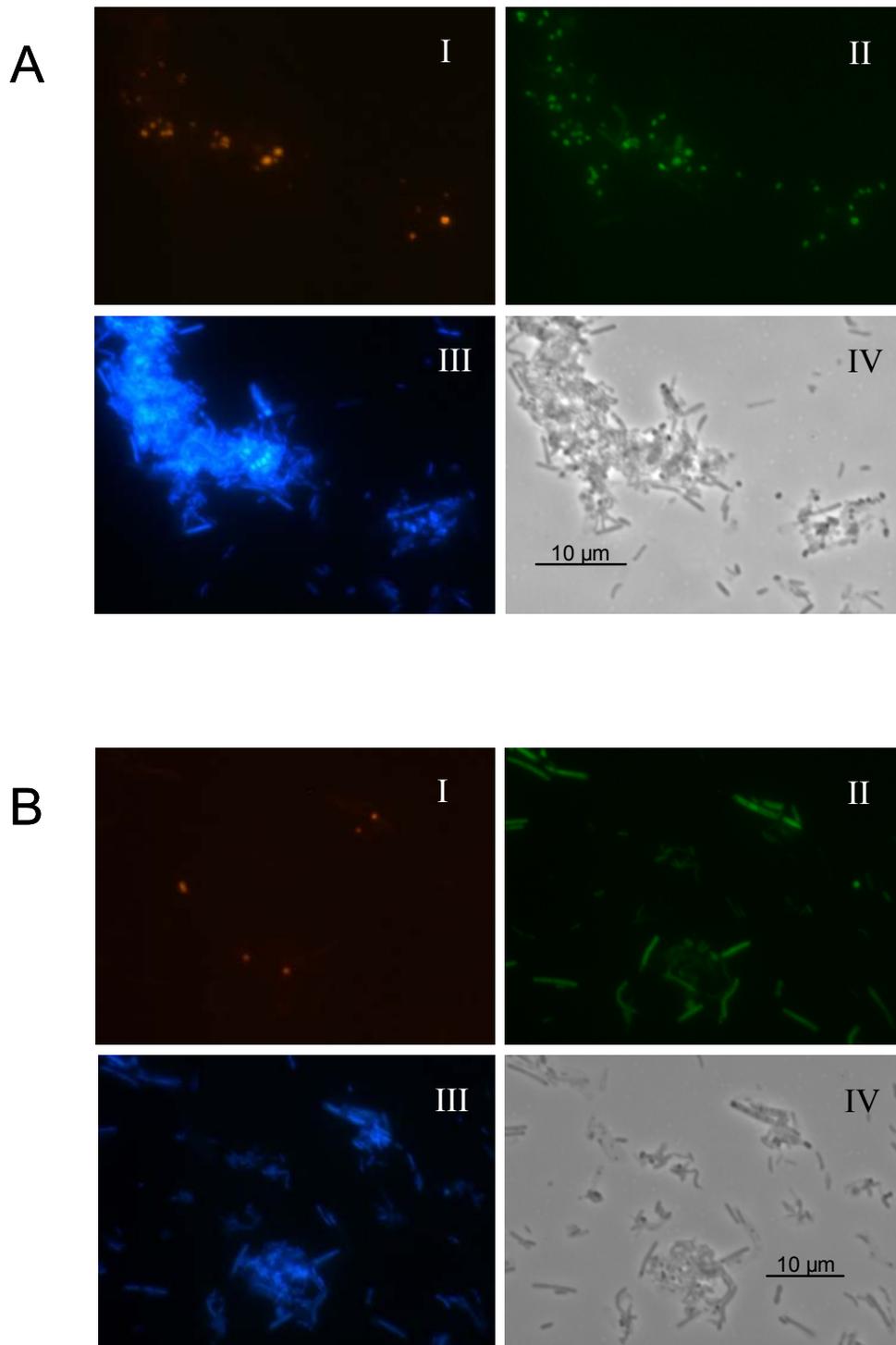


Abbildung 9: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Anreicherungskultur LL25°C (inkubiert mit 0,1% Pepton und 50 µg ml⁻¹ Kanamycin) mit einer Cy3-markierten RC-III spezifischen Oligonucleotidsonde (I) und Fluorescein-markierten Oligonucleotidsonden (II) spezifisch für *Archaea* (A) bzw. *Bacteria* (B), sowie DAPI-Färbung der Gesamt-DNA (III) und Phasenkontrastbild (IV) des gleichen Ausschnittes. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

3. Analyse von Rice Cluster I-*Archaea* in Anreicherungskultur

Die initiale Anreicherung von Rice Cluster I (RC-I)-*Archaea* wurde von Dr. Kuk-Jeong Chin durchgeführt. Dafür wurde Reisfeldboden anoxisch bei 50°C für 3 Wochen vorinkubiert und diente anschließend zum Beimpfen des Mineralmediums (Lueders *et al.*, 2001). Die erhaltene Anreicherungskultur MRE50 (methanogenic rice field soil enrichment at 50°C) enthielt eine mikrobielle Gemeinschaft aus verschiedenen *Bacteria* und methanogenen *Archaea* (RC-I, *Methanomicrobiaceae*). Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Abundanz von RC-I innerhalb der *Archaea* mittel Hilfe der T-RFLP und vergleichender Sequenzanalyse in Zusammenarbeit mit Christoph Erkel überprüft. Die T-RFLP-Muster zeigten nur ein Fragment von 392 bp Länge, welches charakteristisch für RC-I ist. Weiterhin gruppieren alle 32 untersuchten Klonsequenzen innerhalb des RC-I.

3.1 Wachstumsbedingungen der Rice Cluster I-*Archaea*

3.1.1 Wachstum mit verschiedenen Substraten

Die Anreicherungskultur MRE50 wurde unter verschiedenen Substratbedingungen bei 50°C inkubiert und die Methanproduktion verfolgt (Abbildung 10A). Die Inkubation mit 0,01% Hefeextrakt und H₂/CO₂-Gasphase führte zu einer sofortigen Bildung von Methan (17 µmol ml⁻¹ Kultur). Die Inkubationen mit 2 und 10 mM Acetat (mit H₂/CO₂) zeigten eine lag-Phase von 4 bzw. 2 Tagen und erreichten geringere Methankonzentrationen von 15 und 14 µmol pro ml Kultur. Die Acetatkonzentrationen nahmen während der Inkubation nicht ab. Wurde die Kultur auf Medium mit 2 und 20 mM Acetat oder mit 1 und 10 mM Propionat (N₂/CO₂-Gasphase) überimpft, konnte keine Bildung von Methan nachgewiesen werden und die Acetat- und Propionatkonzentrationen blieben konstant (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation von 20 mM Formiat mit einer H₂/CO₂-Gasphase führte nach 2 Tagen lag-Phase zu einer ähnlichen Methanproduktion wie mit Acetat. Wurde die Kultur mit einer N₂/CO₂-Gasphase und 20 mM Formiat inkubiert, zeigte sich eine Bildung von 4 µmol CH₄ pro ml Kultur. Die Formiatkonzentrationen nahmen auf 0,09 mM ab. Die Kultur wurde außerdem mit einer H₂/CO₂-Gasphase ohne Zugabe weiterer Kohlenstoffquellen (aber mit Vitaminen) inkubiert und weiter transferiert. Die Methanbildung zeigte einen geringeren Anstieg und begann erst nach einigen Tagen. In Abbildung 10 A ist die

Methanproduktion nach dem ersten und dritten Transfer der Kultur dargestellt (H_2/CO_2 I und III). Nach dem fünften Transfer konnte keine Methanproduktion mehr nachgewiesen werden. Die Methanbildung konnte wieder initiiert werden, wenn dem Medium 1,7 mM Cystein-HCl zugegeben wurde. Der kontinuierliche Transfer auf frisches Medium führte zu einer stabilen Methanproduktion (Beispiel siehe Abbildung 10A: zwölfter Transfer der Kultur). Die Analyse der organischen Säuren während der Inkubation konnte nur geringe Mengen Acetat (0,8 mM) und Lactat (0,01 mM) zeigen.

In Abbildung 10B sind die amplifizierten PCR-Produkte aus DNA-Extrakten der folgenden Kulturen dargestellt: 0,01% Hefeextrakt + H_2/CO_2 , 2 mM Acetat + H_2/CO_2 und nur H_2/CO_2 (Kultur H_2/CO_2 III). Die Amplifikation wurde mit dem RC-I und einem *Bacteria* spezifischen Primerpaar bei gleicher Zyklenzahl (30) durchgeführt. RC-I-Amplifikate wurden in allen Kulturen nachgewiesen. Das bakterielle PCR-Produkt war in den H_2/CO_2 -Inkubationen jedoch wesentlich schwächer, als in den Kulturen mit Hefeextrakt und Acetat.

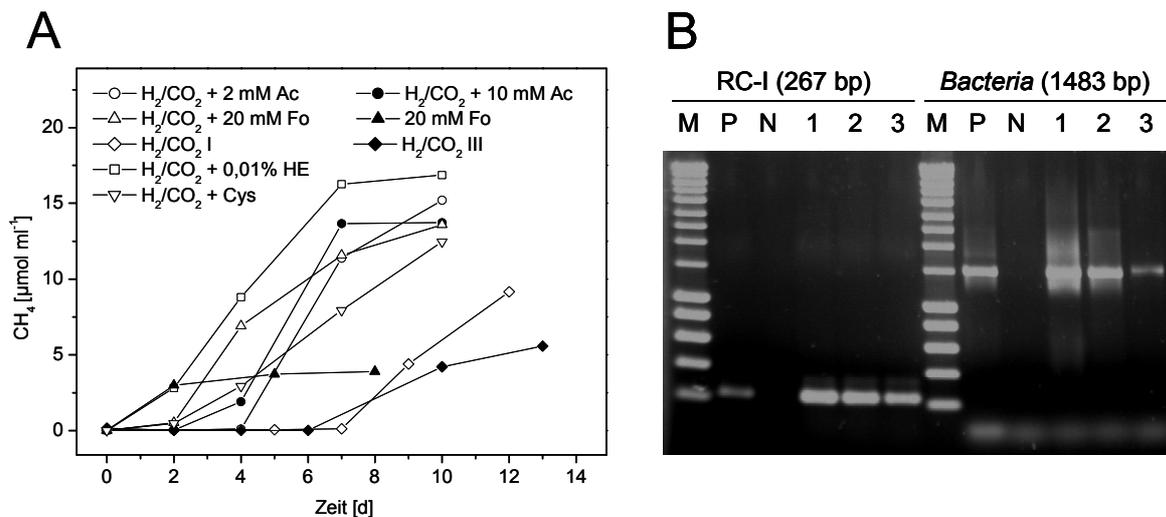


Abbildung 10: Einfluss verschiedener Substratbedingungen auf die Methanproduktion der Anreicherungskultur MRE50 bei 50°C (A) und Gelelektrophorese der PCR-Produkte (RC-I und *Bacteria*) aus DNA-Extrakten (B) folgender Inkubationen: 1 = H_2/CO_2 und 0,01% Hefeextrakt, 2 = H_2/CO_2 und 2 mM Acetat, 3 = H_2/CO_2 . P = Positivkontrolle, N = Negativkontrollen. Länge der Amplifikate ist in bp angegeben.

3.1.2 Temperaturoptimum

Die Anreicherungskultur MRE50 wurde bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, um das Optimum zu bestimmen (Abbildung 11). Bei 50°C dauerte die lag-Phase nur einen Tag. Die lag-Phase nahm bei niedrigeren Temperaturen zu (Abbildung 11A). Die Methanproduktionsrate, welche in der exponentiellen Phase der Methanproduktion bestimmt wurde, nahm mit der Temperatur ab (Abbildung 11B). Bei 55°C wurde kaum Methan produziert.

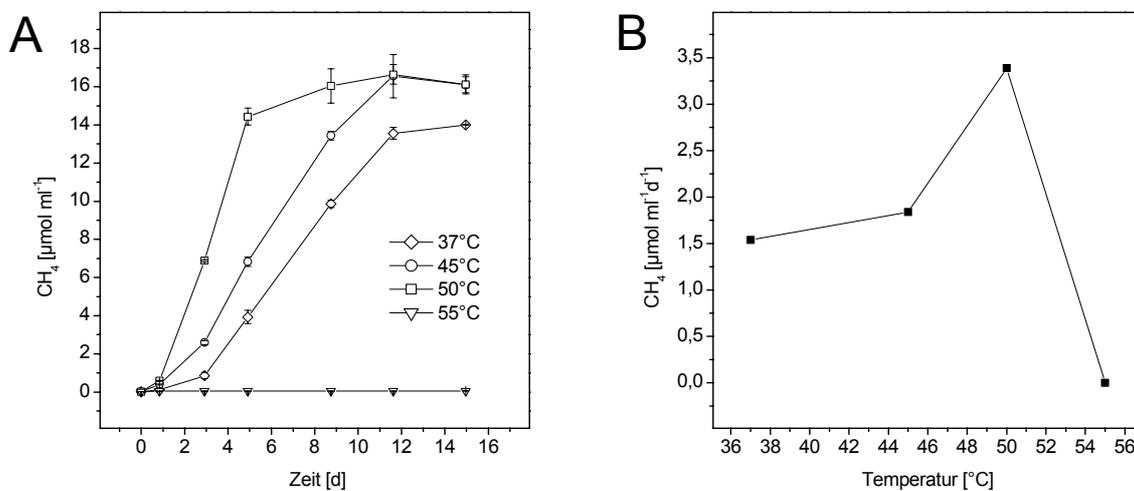


Abbildung 11: Temperaturoptimum der Methanbildung Bildung von Methan (A) und Bestimmung der Methanproduktionsraten (B) in der Anreicherungskultur MRE50 bei verschiedenen Temperaturen innerhalb von 15 Tagen Inkubationszeit.

3.1.3 Einfluss des Reduktionsmittels

Das verwendete Medium zur Kultivierung der Anreicherungskultur MRE50 wurde routinemäßig mit 1,5 mM Natriumsulfid reduziert. Wurden 1 mM Titan(III)-Citrat oder 3,4 mM Cystein-HCl als Reduktionsmittel verwendet (Inkubation bei 50°C), hatte dies nur einen geringen Einfluss auf die Methanproduktion (Abbildung 12). Die lag-Phase der Methanproduktion verlängerte sich gegenüber der mit Natriumsulfid reduzierten Kultur (1 Tag) nur gering (2 Tage mit Cystein-HCl und 3 Tage mit Titan(III)-Citrat).

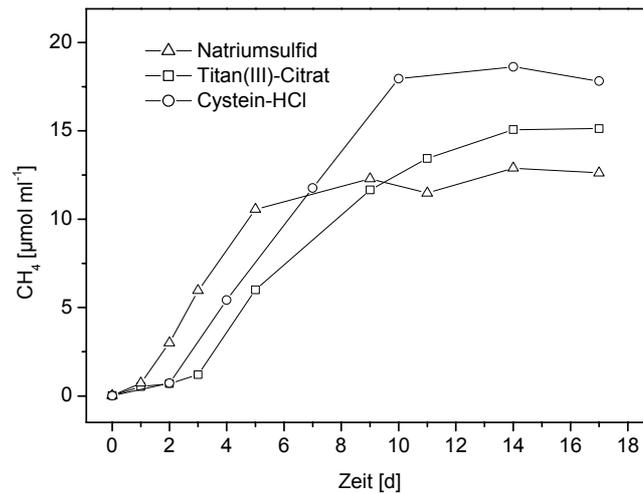


Abbildung 12: Methanproduktion der Anreicherungskultur MRE50 in Medium mit 0,01% Hefeextrakt bei 50°C, welches mit Natriumsulfid (1,5 mM), Titan(III)-Citrat (1 mM) oder Cystein-HCl (3,4 mM) reduziert wurde.

3.1.4 Stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung

Weiterhin wurde die stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) der Methanogenese untersucht. Dafür wurden die Kulturen sowohl in NaHCO_3 - als auch KHCO_3 -gepuffertem Medium bei 50°C inkubiert (H_2/CO_2 -Gasphase mit 0,01% Hefeextrakt oder 1 mM Acetat). Die Fraktionierung von CO_2 zu CH_4 zeigte bei einem hohen Wasserstoffpartialdruck (> 60%) α -Werte von 1,029 bis 1,034.

3.1.5 Abundanz der Rice Cluster I-*Archaea*

Um die mikrobielle Zusammensetzung der Anreicherungskultur MRE50 zu charakterisieren wurde eine 500 ml-Kultur mit 0,01% Hefeextrakt für 35 Tage inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Die gemessene Extinktion ($= \Delta OD_{600 \text{ nm}}$) zeigte ein Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft bis zum neunten Tag (Abbildung 13A). Die 16S rDNA-Zielmolekülzahlen der *Bacteria* stiegen bis Tag 2 stark an und erst ab Tag 5 dominierten die RC-I-Zielmolekülzahlen. Ein bereits etablierter Real Time PCR-Assay (Lueders und Friedrich, 2003) diente zur Kontrolle der Zielmolekülzahl der *Archaea*. Die archaeellen Zielmoleküle stimmten mit den RC-I-Zielmolekülzahlen überein. Bis zum neunten Inkubationstag korrelierte der Anstieg der RC-I-Zielmoleküle mit der Zunahme der Methankonzentration und dem Verbrauch von Wasserstoff und Kohlendioxid (Abbildung 13B). Die initiale Methanproduktion (Tag 1 – 4) betrug $0,6 \mu\text{mol pro ml Kultur}$. Weiterhin konnte eine geringe Bildung von Acetat ($0,57 \mu\text{mol ml}^{-1}$), Butyrat ($1,09 \mu\text{mol ml}^{-1}$) und Propionat ($0,30 \mu\text{mol ml}^{-1}$) nachgewiesen werden (Abbildung 13C). Formiat, Ethanol, Caproat und Valerat wurden nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert ($< 0,35 \mu\text{mol ml}^{-1}$). Formiat wurde verbraucht und konnte ab Tag 5 nicht mehr detektiert werden. Mit Hilfe des RC-I-spezifischen Real Time-PCR-Assays, mit dem das Gen der α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (*mcrA*) amplifiziert wird, wurde die *mcrA*-Zielmolekülzahl am zweiten ($1,7 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1}), fünften ($9,6 \times 10^6$ Zielmoleküle ml^{-1}) und neunten ($1,3 \times 10^7$ Zielmoleküle ml^{-1}) Inkubationstag bestimmt. Demzufolge betrug das Verhältnis von 16S rDNA zu *mcrA*-Zielmolekülen 1 zu 4 (Tag 5) bzw. 1 zu 3 (Tag 9).

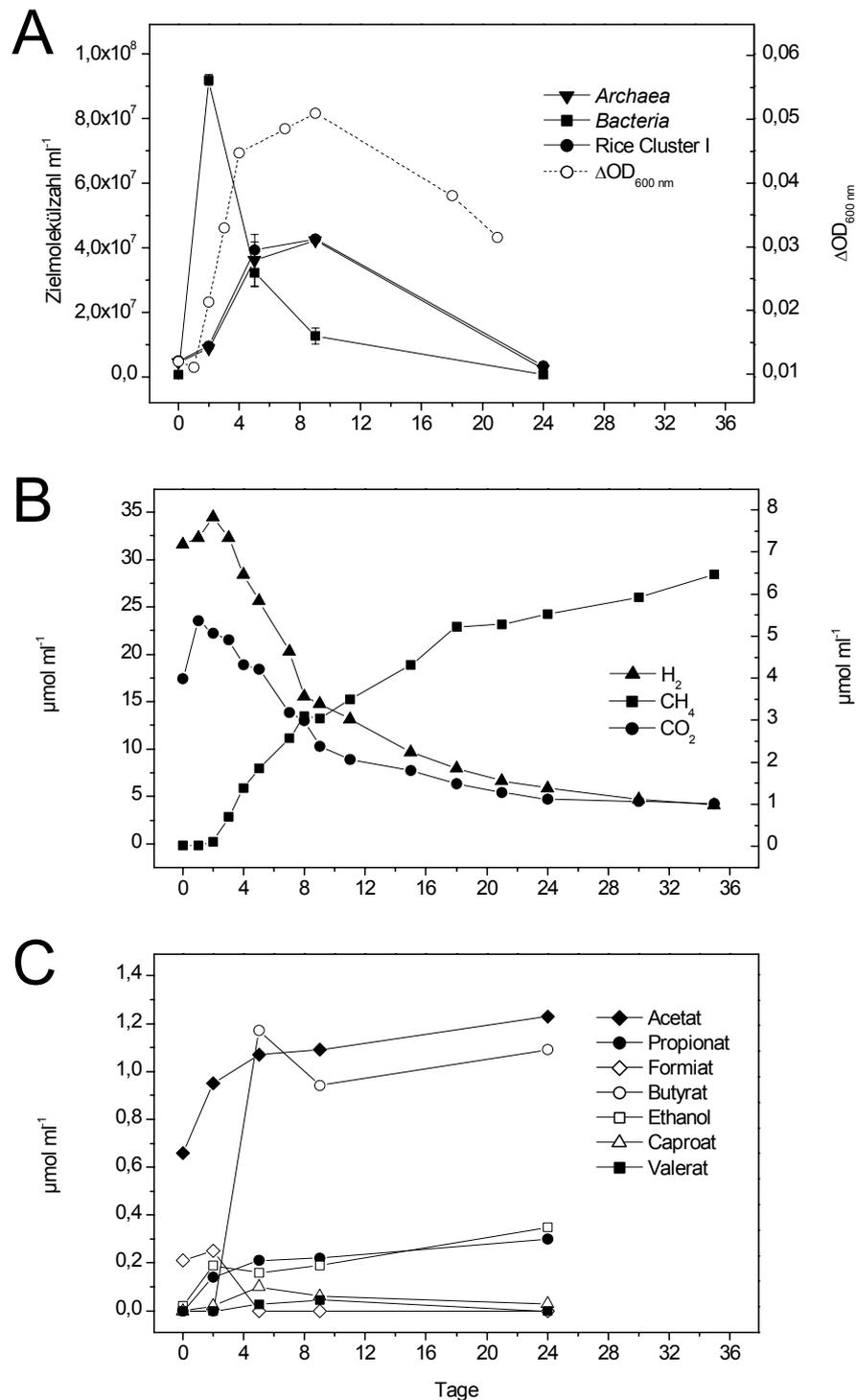


Abbildung 13: Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft der Anreicherungskultur MRE50 während 35 Tagen Inkubationszeit mit einer H₂/CO₂-Gasphase und 0,01% Hefeextrakt bei 50°C. Zielmolekülnzahlen von Rice Cluster I, *Archaea* und *Bacteria* pro ml Kultur (n = 2 ± SE von parallelen Extraktionen), sowie die Extinktion (ΔOD_{600 nm}) (A). H₂-, CO₂- und CH₄-Konzentration (B). Konzentrationen der organischen Säuren und Alkohole (C).

3.1.6 Phylogenetische Diversität der *Bacteria*

Um einen Eindruck über die Diversität und die zeitliche Veränderung der bakteriellen Population in der Anreicherungskultur MRE50 zu erhalten, wurde die T-RFLP-Methode angewandt (Abbildung 14). Die Diversität der *Bacteria* nahm mit der Zeit ab. Anhand der vorhandenen Klonbibliothek (Erkel *et al.*, in revision) konnten einige T-RFs den entsprechenden phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Das 300 bp-T-RF einer unkultivierten Clostridien-Linie war dominant. Weitere Klonsequenzen, die phylogenetisch mit kultivierten Clostridien verwandte waren, zeigten ein T-RF von 80 bp und waren nach 2 Tagen mit geringer Signalintensität detektierbar. T-RFs mit einer Fragmentlänge von 138 und 178bp, gehörten zu einer *Thermoterrabacterium*-verwandten Gruppe von Umweltsequenzen. Der 138 bp-Peak war nur mit sehr geringer Signalintensität in allen Proben nachweisbar, hingegen nahm der Peak des 178 bp T-RFs mit der Zeit zu. T-RFs mit einer Länge von 129 bp (*Moorella*- verwandte Sequenzen) und 210 bp (*Geleria*-verwandte Sequenzen) wurden nur mit sehr geringem relativen Anteil gefunden. Weiterhin wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten abundante T-RFs mit 306, 388, 441 und 452 bp Fragmentlänge detektiert, deren phylogenetische Zuordnung jedoch noch unbekannt ist.

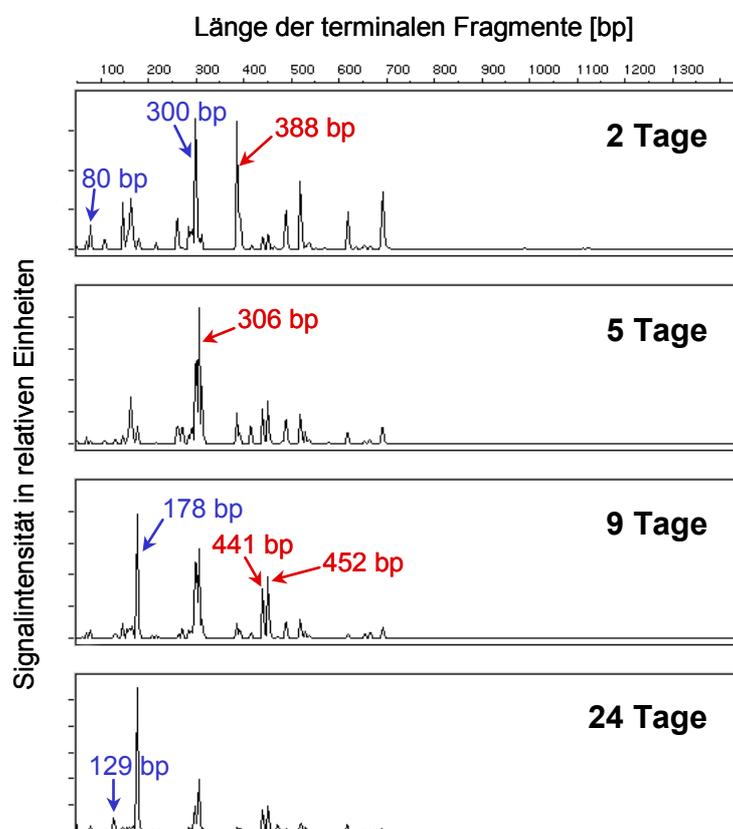


Abbildung 14: Struktur der *Bacteria* in der Anreicherungskultur MRE50 nach verschiedenen Inkubationszeiten (T-RFLP-Muster nach Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate mit *MspI*). Die Längen der T-RFs sind mit Pfeilen beschriftet, wobei die T-RFs mit bekannter phylogenetischer Zuordnung in blau und T-RFs mit unbekannter Zuordnung in rot dargestellt sind.

3.2 Weitere Anreicherung der Rice Cluster I-*Archaea*

3.2.1 Isolierung mit Hilfe von „roll tubes“

Die Vereinzelung der RC-I-*Archaea* ist in vorangegangenen Experimenten von Dr. Kuk-Jeong Chin durch Verdünnung in festem Medium noch nicht geglückt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Anreicherungskulturen auf Medium mit und ohne 0,01% Hefeextrakt bei 50°C vorinkubiert und anschließend in sogenannten „roll tubes“ verdünnt. Dazu wurde dem Medium der Gelator Gelrite (0,8%) zugefügt. Die Verdünnung der Vorkulturen erfolgte ebenfalls mit bzw. ohne Hefeextrakt. Die Röhrchen wurden kurz nach dem Beimpfen auf Eis gerollt, um das Medium abzukühlen und eine große Oberfläche zur Diffusion von H₂/CO₂ zu gewährleisten. Die Inkubation dieser Verdünnungsreihen erfolgte bei 50°C. Die Methanproduktion in den „roll tubes“ wurde vor dem Picken der Kolonien kontrolliert. In den Verdünnungsreihen, die nur mit H₂/CO₂-Gasphase gewachsen waren (Vorkultur ohne Hefeextrakt), dauerte die Koloniebildung wesentlich länger (ca. 4 Wochen), jedoch wurden 5 – 6 µmol Methan pro ml Kultur nachgewiesen. Die sehr kleinen und fast durchsichtigen Kolonien wurden auf Flüssigmedium (mit Hefeextrakt) überimpft. In 3 von 20 Kulturen wurden nach 7 Wochen Inkubationszeit 24-28 µmol Methan ml⁻¹ gemessen, worauf diese Kulturen weiterhin überimpft wurden (mit Hefeextrakt).

3.2.2 Mikrobielle Diversität der Kulturen MRE50-1, MRE50-5 und MRE50-6

Die isolierten Kulturen (MRE50-1, MRE50-5 und MRE50-6) wurden molekularbiologisch kontrolliert. Die PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rRNA Gene von RC-I und von den *Bacteria* führte in beiden Fällen zu einem positiven Signal, was eine Kontamination der Kulturen mit *Bacteria* zeigt. Die T-RFLP-Analyse der bakteriellen Amplifikate zeigten jedoch im Vergleich zur Anreicherungskultur MRE50 (siehe Abbildung 14) eine Verringerung der Diversität (Abbildung 15). Die T-RFLP-Muster der drei Kulturen zeigten die gleichen T-RFs mit ähnlichen Abundanzen. Die zwei dominanten T-RFs hatten eine

Länge von 441 und 452 bp. Die phylogenetische Zuordnung der detektierten T-RFs ist bisher noch unbekannt.

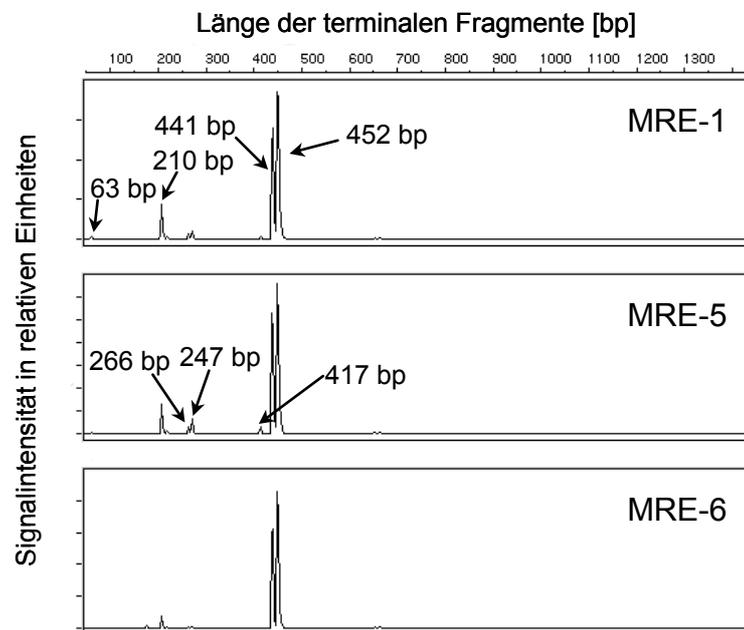


Abbildung 15: Struktur der *Bacteria* in den isolierten Kulturen MRE-1, MRE-5 und MRE-6 nach 11 Tagen Inkubationszeit (T-RFLP-Muster nach Restriktion der 16S rDNA-Amplifikate mit *MspI*). Die Längen der einzelnen T-RFs sind angegeben (Pfeile).

3.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Autofluoreszenz der Rice Cluster I-*Archaea*

Die Zellform von RC-I wurde bereits mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Anreicherungskultur MRE50 von Christoph Erkel und Dr. Svetlana Dedysh nachgewiesen (Abbildung 16A). Fixierte RC-I-Zellen, die mit *Archaea* spezifischen Sonden hybridisierten, waren als Stäbchen von bis zu 5 μm Länge und 1 μm Breite zu finden und enthielten intrazellulär stärker gefärbte Regionen. Aber auch die *Bacteria* waren meist stäbchenförmig (Abbildung 16B). Da Methanogene den Cofaktor F_{420} besitzen und dieser eine Autofluoreszenz der Zellen bewirkt, konnten RC-I-Zellen in den Kulturen MRE50-1, MRE50-5 und MRE50-6 identifiziert werden. Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Bild der Kultur MRE50-5.

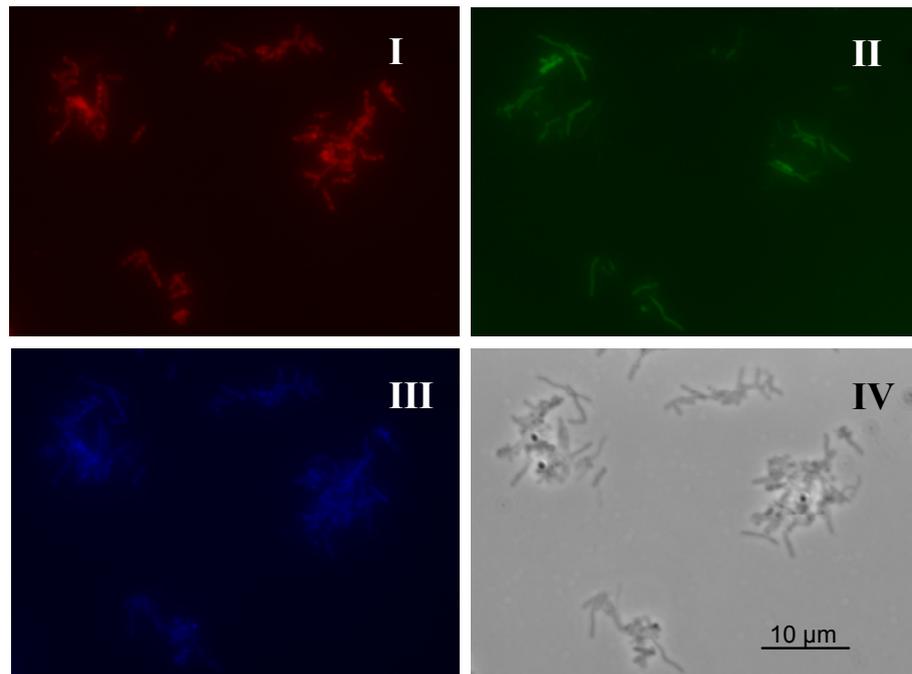


Abbildung 16: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Anreicherungskultur MRE50 mit Cy3-markierten *Archaea* spezifischen Oligonucleotidsonden (I) und einer Fluoreszein-markierten *Bacteria* spezifischen Oligonucleotidsonde (II), sowie DAPI-Färbung der Gesamt-DNA (III) und Phasenkontrastbild (IV) des gleichen Ausschnittes. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

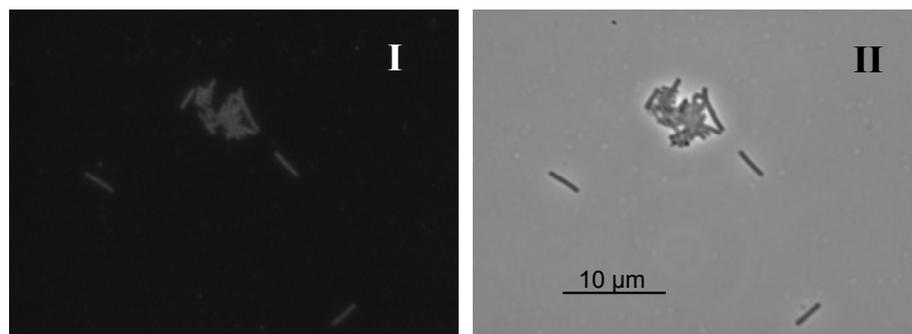


Abbildung 17: Autofluoreszenzbild (I) und Phasenkontrastbild (II) des gleichen Ausschnittes von RC-I-Zellen der Kultur MRE50-5. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

4. Untersuchung der *Archaea* im Tiefenprofil eines Waldbodens

4.1 Analyse verschiedener Bodenparameter

Der Boden des Marburger Waldes ist ein Braunerdeboden unter einem Laubmischwald (überwiegend *Fagus Sylvatica* mit *Quercus robur*) auf Carbonat-haltigem Gestein. Das Ausgangsgestein war Bundsandstein und die Bodenart wurde bereits als lehmiger Sand bestimmt (Henkel *et al.*, 2000). Der organische Oberboden A_h der untersuchten Bodenkerne war 6 cm tief. Der mineralische Unterboden B_v wurde bis in eine Tiefe von 21 cm untersucht. Für die Analyse des Tiefenprofils wurde der Boden in 3 cm dicke Schichten unterteilt.

Das Tiefenprofil des Waldbodens wurde auf einige biogeochemische Parameter untersucht. Der pH-Wert der verschiedenen Schichten wurde in Bodenaufschlämmungen (1:1 [m/vol]) bestimmt und nahm nur gering von pH 3,8 bis auf pH 4,4 mit der Tiefe zu. Der gravimetrische Wassergehalt verringerte sich mit der Tiefe von 66 auf 26%. Der Anteil an Kohlenstoff an der Trockenmasse des Bodens nahm mit der Tiefe von 35 auf 3% ab (Abbildung 18). Der Stickstoffanteil betrug nur 1,5 bis 0,3%. Das C/N-Verhältnis veränderte sich jedoch nur gering im Tiefenprofil.

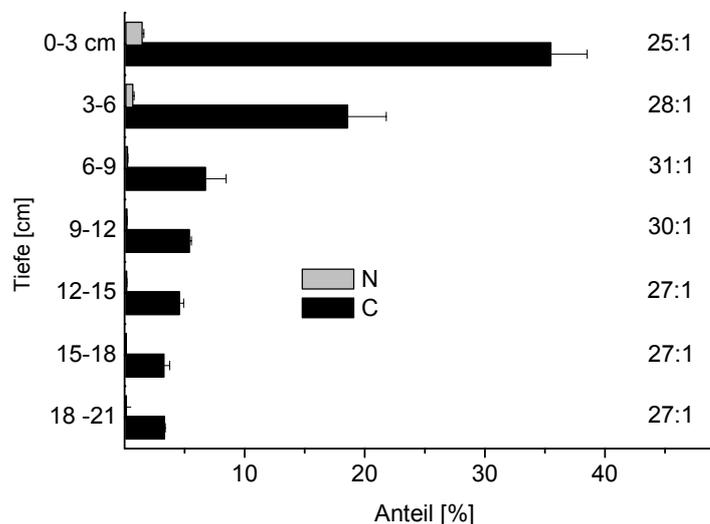


Abbildung 18: Kohlenstoff- und Stickstoffanteile, sowie das berechnete C/N-Verhältnis im Tiefenprofil des Marburger Waldbodens. (n=3 ± SE)

Der höhere Stickstoffanteil des A-Horizontes war mit höheren Nitrat- und Ammoniumkonzentrationen korreliert (Tabelle 9). Die Sulfat- und Chloridkonzentrationen

nahmen mit der Tiefe nur gering ab. Die Eisen(III)-Konzentration war in allen Schichten höher als die von Eisen(II).

Tabelle 9: Konzentrationen von Nitrat, Sulfat, Chlorid, Ammonium, Eisen(II) und Eisen(III) in verschiedenen Tiefen des Marburger Waldbodens im Juli 2002. (n=3 ± SE)

Tiefe [cm]	Nitrat [$\mu\text{mol g TG}^{-1}$]	Sulfat [$\mu\text{mol g TG}^{-1}$]	Chlorid [$\mu\text{mol g TG}^{-1}$]	N-NH ₄ ⁺ [$\mu\text{g N g TG}^{-1}$]	Fe(II) [$\mu\text{mol g TG}^{-1}$]	Fe(III) [$\mu\text{mol g TG}^{-1}$]
0-3	958 ± 128	254 ± 32	1452 ± 106	10,9 ± 0,6	13 ± 0,5	27 ± 1,7
3-6	107 ± 2	157 ± 2	918 ± 170	0,7 ± 0,1	16 ± 0,8	51 ± 14
6-9	5 ± 1	94 ± 5	964 ± 202	0,3 ± 0,1	16 ± 0,7	63 ± 0,1
9-12	2 ± 0,5	79 ± 3	467 ± 35	0,4 ± 0,2	16 ± 0,7	57 ± 13
12-15	2 ± 0,6	48 ± 7	830 ± 489	0,4 ± 0,04	13 ± 1,8	52 ± 4
15-18	2 ± 0,4	74 ± 9	353 ± 104	0,3 ± 0,04	12 ± 0,2	53 ± 0,2
18-21	1 ± 0,2	71 ± 8	656 ± 153	0,3 ± 0,02	11 ± 0,4	55 ± 2

Weiterhin konnten nur geringe Konzentrationen organischer Säuren detektiert werden (Abbildung 19). So wurden nur 38 (0-3 cm) und 3 (3-6 cm) $\mu\text{mol Succinat g TG}^{-1}$ im A-Horizont bestimmt. Formiat und Isobutyrat waren in allen Tiefen mit 111 - 275 $\mu\text{mol g TG}^{-1}$, bzw. 120 - 34 $\mu\text{mol g TG}^{-1}$ nachweisbar.

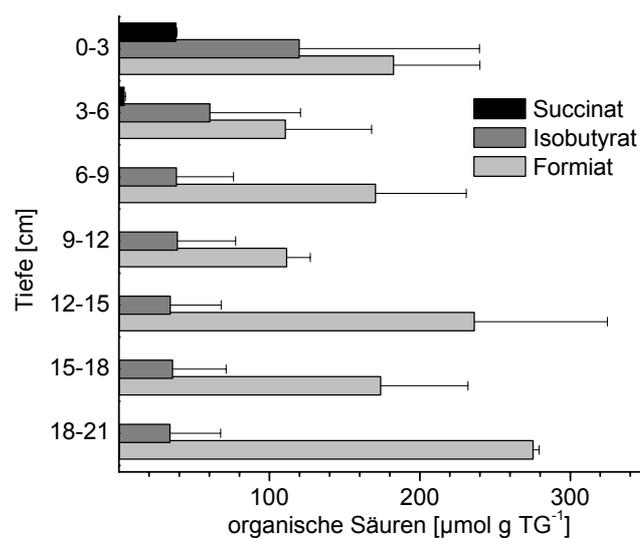


Abbildung 19: Konzentration der organischen Säuren im Tiefenprofil des Marburger Waldbodens. (n=3 ± SE).

4.2 Abundanz der *Archaea*

Mit Hilfe des neu etablierten Real Time-PCR-Assays (Primer A364aF / A934b) wurde in der vorliegenden Arbeit die Abundanz der 16S rRNA Genkopien (=16S rDNA-Zielmoleküle) der *Archaea* von DNA-Extrakten der Bodenproben des Marburger Waldbodens (in Zusammenarbeit mit Steffen Kolb) analysiert und mit der 16S rDNA-Zielmolekülzahl der *Bacteria* verglichen. Die archaeellen Zielmoleküle betragen 2,1 bis $7,9 \times 10^7$ Zielmoleküle g TG^{-1} und zeigten keine große Varianz (Abbildung 20A). Die *Bacteria* wurden bis zu einer Tiefe von 9 cm mit $2,5$ bis $3,4 \times 10^8$ Zielmoleküle g TG^{-1} nachgewiesen und nahmen in den tieferen Bodenschichten ab ($3,3$ bis $5,2 \times 10^7$ Zielmoleküle g TG^{-1}). Die relativen Anteile der archaeellen Zielmoleküle an der Gesamtzielmolekülzahl (Summe bakterieller und archaeeller Zielmoleküle) nahm mit der Tiefe zu (Abbildung 20B). Im A-Horizont wurden die archaeellen Zielmoleküle mit einem relativen Anteil von maximal 14% bestimmt. In den tieferen Bodenschichten (6 – 18 cm) nahm der Anteil bis auf durchschnittlich 36% zu. Nur in der tiefsten Schicht betragen die archaeellen Zielmoleküle 64%.

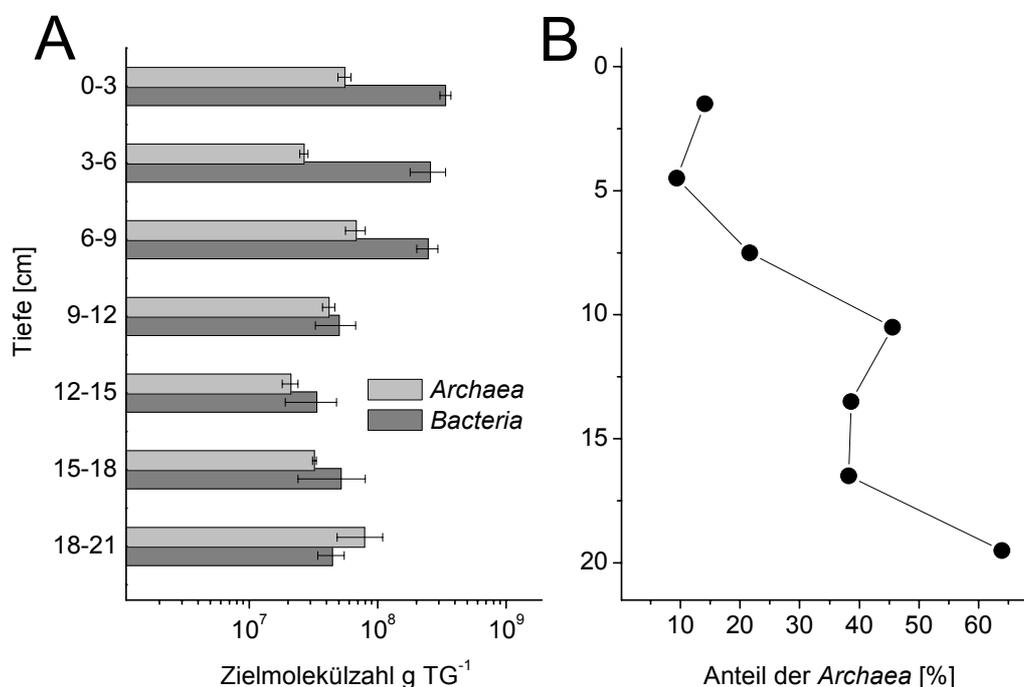


Abbildung 20: Abundanz der *Archaea* und *Bacteria* im Tiefenprofil des Marburger Waldbodens. x-Achse: Tiefe, y-Achse: 16S rDNA Zielmolekülzahlen pro g Trockengewicht (A) bzw. relativer Anteil der archaeellen Zielmolekülzahlen im Verhältnis zu den berechneten Gesamt-Zielmolekülzahlen (B).

4.3 Phylogenetische Diversität der *Archaea*

Die Diversität der *Archaea* wurde mit Hilfe der T-RFLP- und vergleichender Sequenz-Analyse im Tiefenprofil untersucht. Die Amplifikation erfolgte mit dem für die Real Time-PCR-Messungen verwendeten Primerpaar A364aF / A934b, wobei der reverse Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert wurde. In den verschiedenen Bodenschichten wurden vier verschiedene T-RFs von 83, 185, 447 und 218 bp Länge detektiert (Tabelle 10). Das Fragment von 185 bp war im gesamten Bodenprofil mit 74 bis 88% dominant. Die relativen Häufigkeiten der T-RFs mit 83 bp und 447 bp Länge wurden ebenfalls in allen Bodenschichten nachgewiesen, betragen aber hingegen nur maximal 9 bzw. 15%. Ein T-RF von 218 bp Länge wurde nur in einer Tiefe von 15 bis 21 cm mit 8% relativen Anteil detektiert. Der relative Anteil der *Crenarchaeota* (phylogenetische Zuordnung siehe Abbildung 22), der aus der Summe der relativen Häufigkeiten der 83 bp und 185 bp T-RFs berechnet wurde, betrug durchschnittlich 88%.

Tabelle 10: Relative Häufigkeiten der terminalen Restriktionsfragmente (T-RF in bp Länge) der *Archaea* in verschiedenen Tiefen des Marburger Waldbodens (FAM-Markierung des reverse Primers). Die relativen Häufigkeiten der *Crenarchaeota* (= Cren) wurden aus der Summe der zugehörigen T-RFs (83 und 185 bp) bestimmt. $n = 3 \pm SE$ von parallelen Extraktionen. n.d. = nicht detektiert

Tiefe [cm]	83 bp	185 bp	218 bp	447 bp	Cren
0-3	5,4 ± 1,6	88,5 ± 2,5	n.d.	6,2 ± 0,9	93,9
3-6	8,3 ± 1,7	82,8 ± 1,7	n.d.	8,9 ± 0,9	91,1
6-9	9,4 ± 0,8	86,4 ± 0,7	n.d.	4,2 ± 0,5	95,8
9-12	2,6 ± 0,6	82,9 ± 0,7	n.d.	14,5 ± 1,2	85,5
12-15	1,5 ± 1,1	85,8 ± 0,7	n.d.	12,6 ± 1,1	87,4
15-18	1,4 ± 0,3	84,3 ± 0,7	8,1 ± 0,3	6,2 ± 0,7	85,7
18-21	1,5 ± 0,2	74,1 ± 0,6	8,1 ± 0,6	16,3 ± 1,0	75,6

Die Zuordnung der T-RFs zu phylogenetischen Gruppen erfolgte durch die Sequenzanalyse von Klonen, die aus dem DNA-Extrakt der Bodenschicht 3-6 cm stammen. Es wurden zwei 16S rDNA-Klonbibliotheken erstellt. Zum einen wurde das

Amplikon, welches mit dem Primerpaar A364aF / A934b amplifiziert wurde, kloniert (Klone A364-2 bis 24). Um eine größere Sequenzinformation der unkultivierten *Archaea* zu erhalten (754 bp), wurde eine weitere Klonbibliothek von einem PCR-Produkt des gleichen DNA-Extraktes erstellt (Klone A109-1 bis 38). Dafür wurde das Primerpaar A109b/A934f (Großkopf *et al.*, 1998a) verwendet.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die phylogenetische Verwandtschaft der Klonsequenzen innerhalb der *Cren-* und *Euryarchaeota*. Von 23 Klonsequenzen der Klonbibliothek A364 gruppierten 19 innerhalb der *Crenarchaeota* (Abbildung 21). Davon gehörten 16 Sequenzen zu dem bereits von Jurgens (DeLong, 1998) beschriebene Linie „Group 1.1c“. 10 der Klone besaßen ein terminales Restriktionsfragment von 185 bp Länge und waren näher miteinander verwandt, als mit 6 weiteren Klonen, die ein T-RF von 83 bp aufwiesen. Drei der in dieser Arbeit gefundenen *Crenarchaeota*-Sequenzen (A364) mit einem 185 bp T-RF fielen in das Cluster 1.1b (DeLong, 1998). Ein Großteil der verwandten Umweltsequenzen wurde in Böden detektiert, aber auch im Süßwasser und im Termitendarm konnte man Sequenzen dieser Gruppe nachweisen. Die vier Klonsequenzen der *Euryarchaeota* waren mit den *Thermoplasmatales* (TR-F von 447 bp) verwandt (Abbildung 22).

Nur 14 der 37 Klonsequenzen der Klonbibliothek A109 gehörten zu den *Crenarchaeota*-Linien Group 1.1b (3 Klone) und 1.1c (11 Klone) und zeigten ein T-RF von 185 bp Länge. Diese Sequenzen waren nah verwandt mit den Klonsequenzen A364. Nur der Klon A109-33 gehörte zu einer kleinen Gruppe von Sequenzen die nah mit der Linie „Group 1.1c“ verwandt war und bisher nur in Waldböden nachgewiesen wurde. *Thermoplasmatales* verwandte Sequenzen (*Euryarchaeota*) wurden in der Klonbibliothek A109 nicht gefunden. Die restlichen Klonsequenzen ähnelten laut der NCBI-Datenbank bakteriellen Sequenzen.

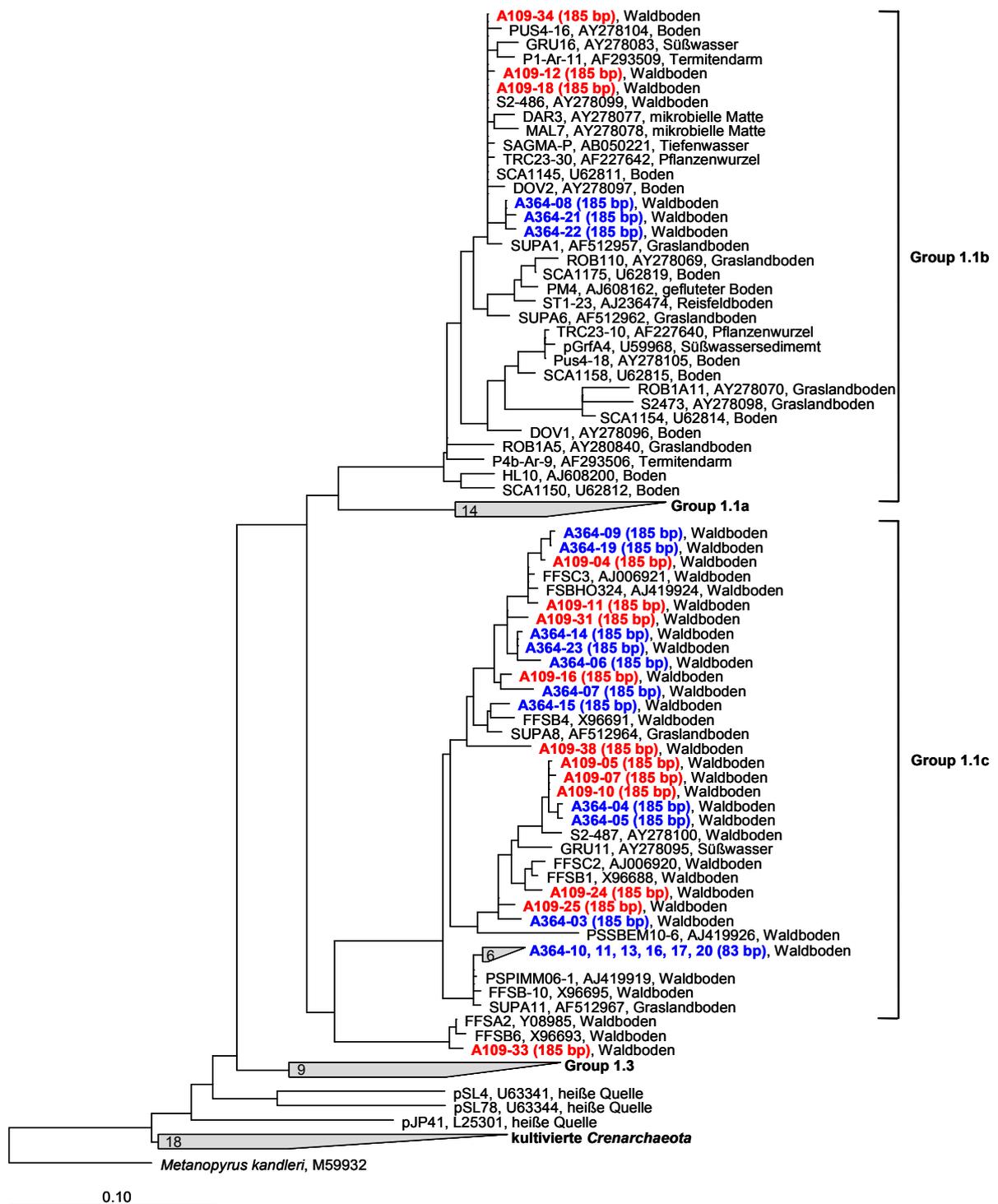


Abbildung 21: Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft basierend auf 16S rDNA Sequenzanalyse von Klonsequenzen des Marburger Waldbodens (A109-Klone: amplifiziert mit den Primerkombination A109f / A934b, in rot markiert; A364-Klone: amplifiziert mit den Primerkombination A364aF / A934b, in blau markiert), weiteren Umweltsequenzen und Sequenzen kultivierter *Crenarchaeota* darstellt. Die zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (in bp) sind in der Klammer angegeben. *Methanopyrus kandleri* wurde als Außengruppe (*Euryarchaeota*) mit in die Stammbaumberechnung einbezogen. Der Maßstab gibt 10% Sequenzunterschied an.

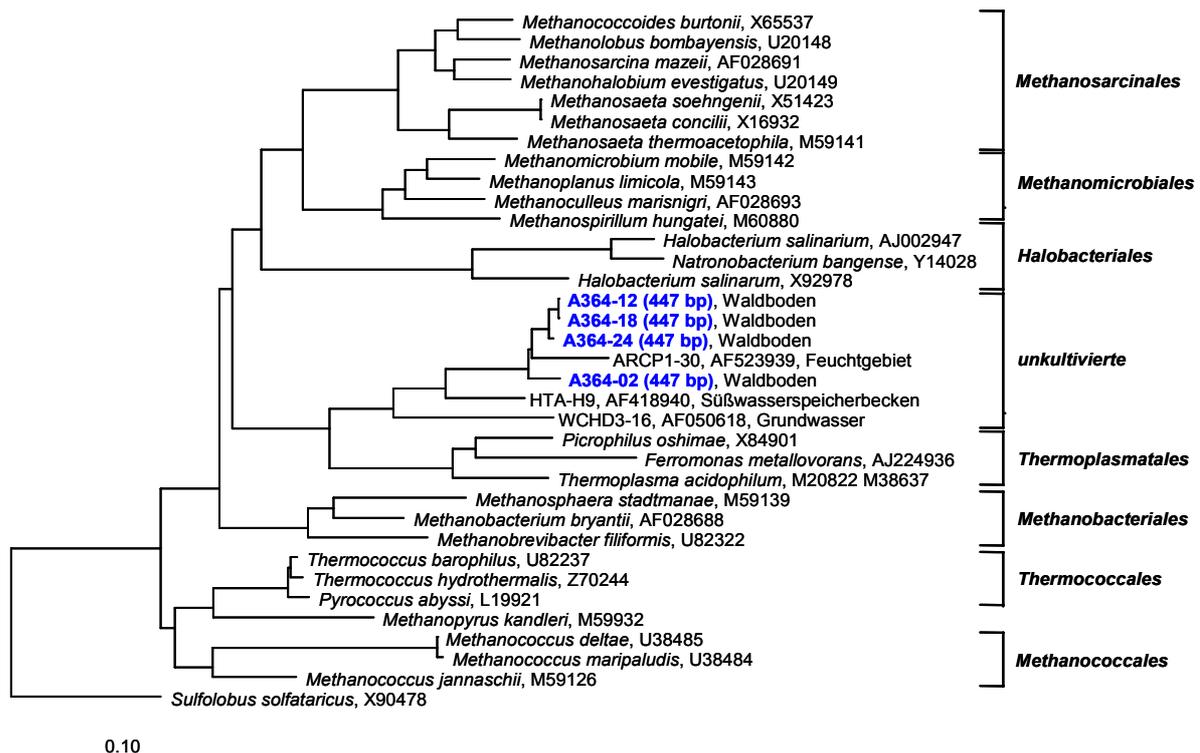


Abbildung 22: Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft basierend auf 16S rDNA Sequenzanalyse von Klonsequenzen des Marburger Waldbodens (A364: amplifiziert mit den Primerkombination A364aF / A934b, in blau markiert), weiteren Umweltsequenzen und Sequenzen kultivierter *Euryarchaeota* darstellt. Die zugehörigen terminalen Restriktionsfragmente (in bp) sind in der Klammer angegeben. *Sulfolobus solfataricus* wurde als Außengruppe (*Crenarchaeota*) mit in die Stammbaumberechnung einbezogen. Der Maßstab gibt 10% Sequenzunterschied an.

Da durch die Markierung des reverse-Primers die beiden Linien der *Crenarchaeota* („Group 1.1b und 1.1c“) nicht aufgelöst werden konnten (Primerkombination A364aF / A934b), wurde mit Hilfe des in ARB implementierten und erst kürzlich entwickelten „T-RF cut“-Programmes (Ricke *et al.*, accepted) nach geeigneten Schnittstellen gesucht. Dabei zeigte sich in-silico eine Trennung der drei Gruppen mit dem bisher verwendeten Enzym *TaqI*, wenn der forward-Primer A364aF FAM-markiert würde. Die T-RFLP-Analyse bestätigte die theoretischen T-RFs von 87 bp (*Thermoplasmatales* Verwandte), 157 bp („Group 1.1c“) und 291 bp („Group 1.1b“). „Group 1.1c“ stellte mit 60 bis 91% die dominante Linie innerhalb der *Archaea* dar (Tabelle 11). „Group 1.1c“ wurde nur im A-Horizont mit 33 und 5% nachgewiesen. Der relative Anteil der aller *Crenarchaeota* (Summe beider Linien) betrug durchschnittlich 88%. Die relativen Häufigkeiten der T-RFs *Crenarchaeota* und der *Euryarchaeota* (*Thermoplasmatales* verwandte) zeigten vergleichbare Werte, wenn der forward bzw. der reverse Primer markiert wurden.

Tabelle 11: Relative Häufigkeiten der terminalen Restriktionsfragmente (T-RF in bp Länge) der *Archaea* in verschiedenen Tiefen des Marburger Waldbodens (FAM-Markierung des forward Primers). Die relativen Häufigkeiten der *Crenarchaeota* (=Cren) wurden aus der Summe der zugehörigen T-RFs (157 und 291 bp) bestimmt. $n = 3 \pm \text{SE}$ von parallelen Extraktionen. n.d. = nicht detektiert.

Tiefe [cm]	87 bp	157 bp	291 bp	Cren
0-3	7,3 \pm 3,5	60,0 \pm 6,2	32,8 \pm 9,6	92,7
3-6	7,7 \pm 3,0	86,9 \pm 4,6	5,3 \pm 4,5	92,3
6-9	9,3 \pm 1,4	90,7 \pm 1,4	n.d.	90,7
9-12	17,1 \pm 3,3	82,9 \pm 3,3	n.d.	82,9
12-15	17,7 \pm 5,1	82,3 \pm 5,1	n.d.	82,3
15-18	12,6 \pm 2,5	87,4 \pm 2,5	n.d.	87,4
18-21	14,1 \pm 1,8	85,9 \pm 1,8	n.d.	85,9

Die Abbildung 23 zeigt noch einmal zusammenfassend ein Beispiele für die T-RFLP-Muster der verschiedenen Amplikons der Tiefe 3 – 6 cm, welche für die Erstellung der Klonbibliotheken verwendet wurde. Auffällig ist die scheinbar höhere Diversität bei der Amplifikation mit dem Primerpaar A109f / A934b im Vergleich zur Amplifikation mit den Primern A364aF und A934b. Die zusätzlichen T-RFs zeigen vermutlich bakterielle Sequenzen, die in der Klonbibliothek zahlreich nachgewiesen wurden.

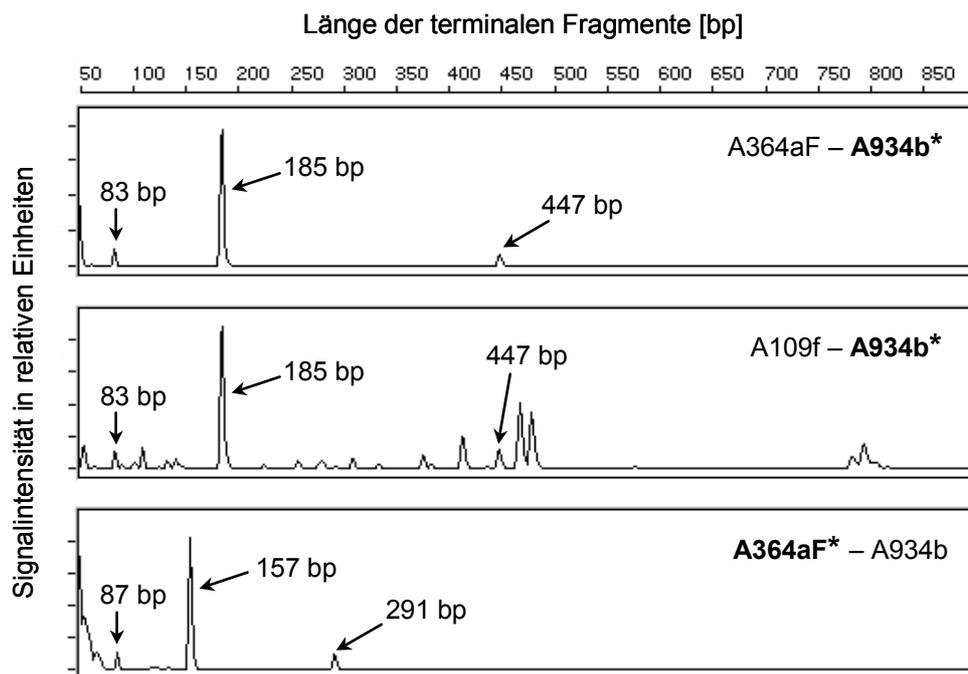


Abbildung 23: T-RFLP-Muster nach Amplifikation aus einem DNA-Extrakt der Bodenschicht 3-6 cm mit den Primerpaaren A364aF / A934b und A109f / A934b. Der jeweils hervorgehobene Primer (* und fett dargestellt) war FAM-markiert. Die Sequenzen der phylogenetischen Gruppen zeigten folgende T-RFs: *Crenarchaeota* „Group 1.1b“ – 185 oder 291 bp; *Crenarchaeota* „Group 1.1c“ – 83 + 185 oder 157 bp; *Thermoplasmatales* verwandte Sequenzen – 447 oder 87 bp.

IV Diskussion

1. Phänotypische Charakterisierung der Rice Cluster III-*Archaea*

Zur Anreicherung der Rice Cluster III-*Archaea* wurde ein anoxisches Mineralmedium verwendet, da die Umweltsequenzen ausschließlich in gefluteten Böden detektiert wurden (Großkopf *et al.*, 1998b; Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000; Kemnitz *et al.*, 2004). Die metabolischen Fähigkeiten dieser unkultivierten Mikroorganismen waren bislang unbekannt. RC-III-Sequenzen wurden innerhalb der *Archaea* mit einem geringen relativen Anteil von maximal 10% detektiert (Chin *et al.*, 1999a; Fey *et al.*, 2001; Fey und Conrad, 2000; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000; Kemnitz *et al.*, 2004) und deshalb konnten diesen Mikroorganismen keine biochemischen Prozesse zugeordnet werden. Als komplexes Substrat wurde Hefeextrakt eingesetzt, da die nächsten kultivierten Verwandten, die *Thermoplasmatales*, vorwiegend mit Hefeextrakt kultiviert und isoliert wurden (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988; Schleper *et al.*, 1995). Als Inokulum wurden zwei Böden der Flutungsebene des Flusses Waal (PM = „permanent marshland“, ständig gefluteter Boden; LL = „low level“, temporär gefluteter Boden) verwendet, in dem wir erst kürzlich RC-III-Sequenzen detektierten (Kemnitz *et al.*, 2004). Aufgrund der durchschnittlich mittleren Temperaturen (gemäßigte Klimazone) dieser Standorte, erfolgte die Anreicherung bei 16°C, 25°C und 37°C. Die Analyse der 16S rRNA-Gene mit Hilfe der T-RFLP-Methode konnte die erfolgreiche Anreicherung von RC-III-*Archaea* innerhalb einer komplexen Lebensgemeinschaft verschiedener *Archaea* und *Bacteria* nachweisen. Außer in der Anreicherungskultur LL16°C (Inokulation mit dem Boden LL, Inkubation bei 16°C) wurde ein für RC-III charakteristisches T-RF in allen Kulturen ermittelt. Im Vergleich mit dem verwendeten Boden, in dem diese Linie innerhalb der *Archaea* mit maximal 2% detektiert wurde (Kemnitz *et al.*, 2004), konnten diese Sequenzen in den Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C auf 58 bzw. 30% angereichert werden. Die anschließende phylogenetische Analyse der Klonsequenzen bestätigte die Zugehörigkeit der archaeellen T-RFs zu RC-III und verschiedenen Methanogenen (*Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae* und *Methanosarcinaceae*).

Um einen Überblick über die Verwandtschaft der RC-III-Sequenzen mit den *Thermoplasmatales* und weiteren Umweltsequenzen verschiedener Habitats zu erlangen,

wurden diese in einem Stammbaum verrechnet (Abbildung 24). Die Stammbaumanalyse erfolgte mit drei verschiedenen Berechnungsmethoden. Dabei spiegelten die Multifurkationen des Treepuzzle-Baumes (siehe Abbildung 24), die unterschiedlichen Verzweigungen der einzelnen Linien innerhalb der Neighbor Joining- und Maximum-Likelihood-Bäume wider. Vermutlich lässt sich die Verzweigung nicht korrekt auflösen, da die meisten Umweltsequenzen von relativ kurzer Sequenzlänge sind und zur Berechnung der Stammbäume nur 680 Basen verwendet werden konnten. Trotz der unsicheren Abzweigung einiger Sequenzgruppen bildeten die Umweltsequenzen 8 Linien (Linien A bis H), wobei sich eine Korrelation zwischen den einzelnen Linien und ihrer Herkunft zeigte. Sequenzen der Linie A, die gleichzeitig RC-III darstellt, stammen aus Bodenhabitaten. In den Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C wurden zwei verschiedene Sequenztypen (LL25A und LL37A) nachgewiesen, die maximal 1,8% Sequenzunterschied zeigten. Sequenzen einer Klonbibliothek zeigten nahezu keine Unterschiede (< 0,3%). Die RC-III-Sequenzen der Anreicherungskulturen zeigten große Sequenzähnlichkeit (> 98%) mit der Umweltsequenz aus dem Boden PM (PM60). Linie B und D enthalten ebenfalls Sequenzen aus terrestrischen Standorten (Wasser und Böden). Sequenzen die im Verdauungstrakt von Tieren (Insekten und Rinder) und im Klärschlamm detektiert wurden, bilden die Linie C. Die Linie G beinhaltet bisher nur eine Umweltsequenz aus dem Wasser einer Goldmine (Takai *et al.*, 2001). Die marinen Sequenzen gruppieren in den Linien E (marines Picoplankton), F (marine Sedimente) und H (marine Spalten). Die Linie F beinhaltet ebenfalls zwei Sequenzen aus Süßwasserhabitaten (Lake Kinneret – Nüsslein *et al.*, 2001; Waldsee – Jurgens *et al.*, 2000). Takai und Mitarbeiter (Takai *et al.*, 2001) fassten die terrestrischen Sequenzen (Linien A, B, D und G) in die als „Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group“ (TMEG) beschriebene Gruppe zusammen. Linie E wurde bereits als „Marine Group II“ (DeLong 1992) und Linie F als „Marine benthic Group D“ (Vetriani *et al.*, 1999) beschrieben. Kultiviert wurden Vertreter der *Thermoplasmatales*, deren Sequenzen eng miteinander verwandt sind und bislang nur drei Genera (*Thermoplasma*, *Picrophilus* und *Ferroplasma*) umfassen. Im Gegensatz zu den meisten Umweltsequenzen wurden diese Arten aus extremen Standorten (saurer pH und hohe Temperaturen) isoliert. Der dargestellte Stammbaum verdeutlicht nicht nur die weite Verbreitung der mit den unkultivierten *Thermoplasmatales* verwandten *Archaea* in nicht extremen Standorten, er gibt auch Grund zu der Annahme, dass die phänotypische Vielfalt dieser Organismen groß ist, da sie in sehr unterschiedlichen Habitaten vorkommen.

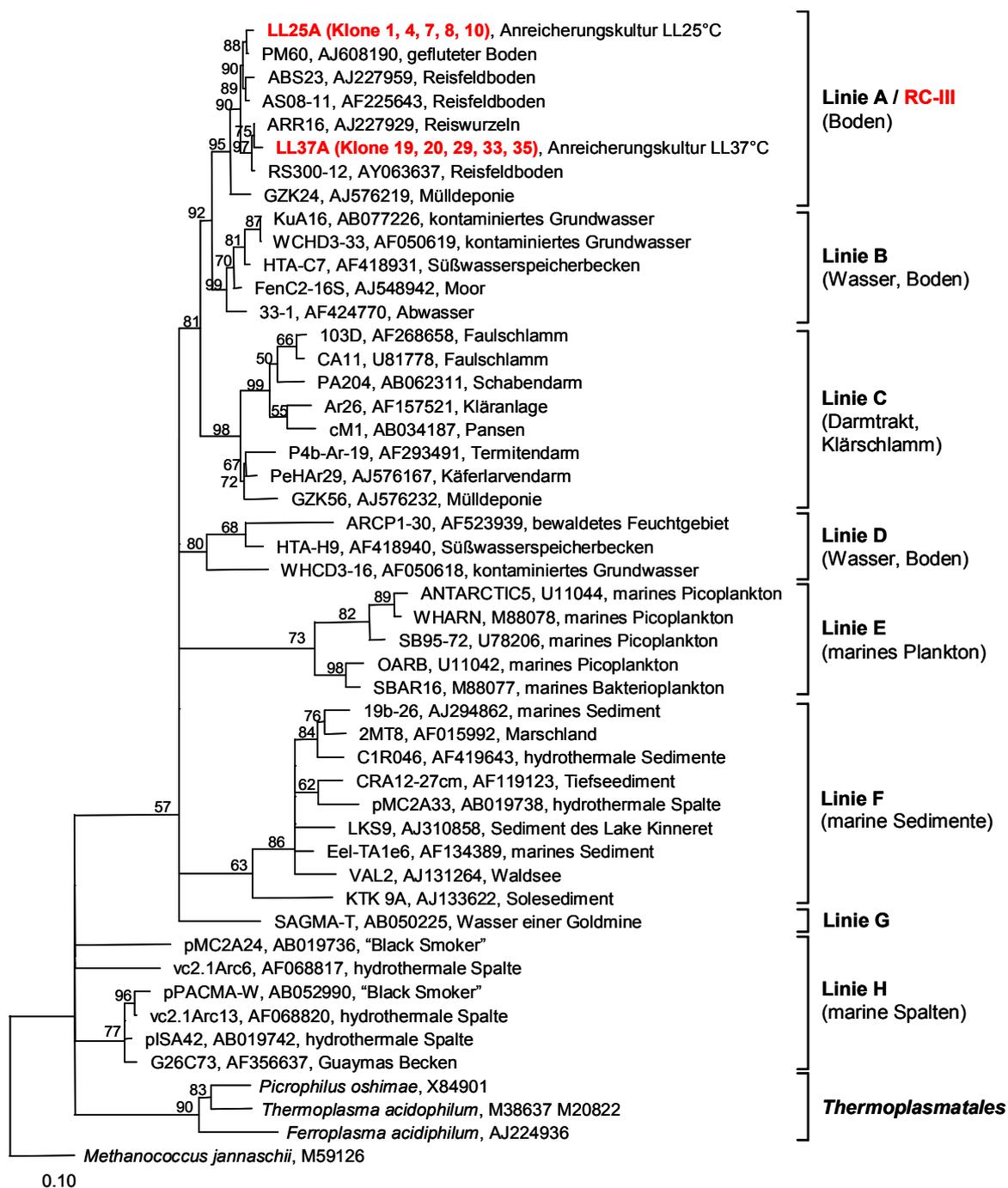


Abbildung 24: Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft der 16S rDNA-Klonsequenzen der Anreicherungskulturen LL25°C und LL37°C (LL25A und LL37A-Klone, in rot markiert), verschiedener Umweltsequenzen und Sequenzen der *Thermoplasmatales* darstellt. Knoten, die in den einzelnen Puzzle-Bäumen (Anwendung der Treepuzzle-Methode, n=10000) bestätigt wurden, sind an den Verzweigungen in Prozent angegeben. *Methanococcus jannaschii* wurde als Außengruppe (*Euryarchaeota*) in die Stammbaumanalyse einbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied.

Aufgrund der hohen relativen Abundanz der RC-III-Sequenzen innerhalb der *Archaea*, wurde die Anreicherungskultur LL25°C zur Charakterisierung dieser neuen Mikroorganismen gewählt. Mit Hilfe der entwickelten Real Time-PCR-Assays war es möglich, die 16S rDNA-Zielmoleküle zu quantifizieren und somit das Wachstum von RC-III, *Archaea* und *Bacteria* zu verfolgen. Die Verdopplungszeit von RC-III-*Archaea* betrug ≤ 3 Tage. Im Vergleich zu den *Thermoplasma*-, *Picrophilus*- und *Ferroplasma*-Arten, die unter optimalen Bedingungen eine Verdopplungszeit von wenigen Stunden (4 – 6 h) erreichen (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988; Schleper *et al.*, 1995; Dopson *et al.*, 2004), zeigten die RC-III-*Archaea* unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen ein sehr langsames Wachstum bis zum Tag 13. Die Methanogenen zeigten hingegen ein kontinuierliches Wachstum. Besonders die acetoclastische Methanogenese gewann nach 2 Wochen Inkubation an Bedeutung. Die Inhibierung des terminalen katalytischen Schrittes der Methanogenese mit 2-Bromoethansulfonat (BES) resultierte, wie erwartet, in einer sehr geringen Methanproduktion. BES ist ein Strukturanalogon zu Coenzym-M (2-Mercaptoethansulfonat), welches in allen Methanogenen gefunden wurde (Balch und Wolfe, 1979). BES hemmte sowohl das Wachstum der Methanogenen, als auch das der RC-III-*Archaea*. Dieses Ergebnis beweist jedoch nicht eindeutig, schließt es aber auch nicht völlig aus, dass RC-III-*Archaea* an der Methanogenese beteiligt sind. Aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu den nicht-methanogenen *Thermoplasmatales* scheint das Wachstum der RC-III-*Archaea* durch einen anderen Wirkungsmechanismus von BES gehemmt zu sein. In vorangegangenen Arbeiten konnte eine Hemmung dechlorinierender Bakterien durch BES gezeigt werden (Löffler *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1999). Die dafür verwendeten Anreicherungskulturen enthielten keine Methanogenen, was einen indirekten Effekt ausschloss. Weiterhin wurde Coenzym-M in einem gram-negativen Bakterium (*Xanthobacter* strain Py2) gefunden und spielt eine zentrale Rolle als Cofaktor bei der aliphatischen Epoxidcarboxylierung (Allen *et al.*, 1999). RC-III-*Archaea* wurden nicht durch hohe Wasserstoffkonzentrationen gehemmt. Dies weist darauf hin, dass sie nicht von methanogenen syntrophen Partner abhängig sind, welche den Wasserstoffpartialdruck niedrig halten.

Wir vermuten, dass diese Mikroorganismen an der primären Fermentation beteiligt sind. In der initialen Anreicherungskultur bildete RC-III nur einen sehr geringen Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft, da die Zahl der bakteriellen 16S rRNA-Gene etwa 1000-fach höher war. Die *Bacteria* zeigten ein Wachstumsoptimum innerhalb der ersten fünf Tage,

was mit der Bildung der Fermentationsprodukte Acetat und Wasserstoff korrelierte. Trotzdem betrug der Anteil von RC-III maximal 60% innerhalb der *Archaea*.

Die gemessenen 16S rRNA-Gene der *Bacteria* und *Archaea* (6×10^8 bis 1×10^9 16S rDNA-Zielmoleküle ml^{-1}) waren vergleichbar mit den mikroskopisch ermittelten Zellzahlen von 2×10^8 Zellen ml^{-1} . Da die Prokaryoten im Durchschnitt 3,5 (1 bis sogar 15) 16S rRNA-Genkopien pro Zelle besitzen (<http://rrndp.cme.msu.edu/rrndp/servlet/controller>), stimmten die mit Hilfe der Real Time-PCR detektierten Zielmoleküle recht gut mit der Zellzahl überein.

Die RC-III-Zielmolekülzahlen zeigten eine stöchiometrische Zunahme mit Erhöhung der Hefeextraktkonzentration bis auf 0,2%. Dass die weitere Erhöhung auf 0,5% nicht in einer entsprechenden Zunahme von RC-III resultierte, liegt möglicherweise an der zu kurzen Inkubationszeit. Die Ursache könnte aber auch in der Inhibierung des Wachstums begründet sein, was bereits innerhalb der *Thermoplasmatales* beobachtet wurde. Maximales Wachstum bei einer Hefeextraktkonzentration von 0,2% wurde ebenfalls bei *Thermoplasma*- und *Picrophilus*-Arten nachgewiesen, (Darland *et al.*, 1970; Schleper *et al.*, 1995). *Ferroplasma*-Arten benötigen nur geringe Hefeextraktkonzentrationen von 0,01 bis 0,05% (Dopson *et al.*, 2000). Höhere Konzentrationen führten bei allen *Thermoplasmatales* zur Hemmung des Wachstums (Darland *et al.*, 1970; Schleper *et al.*, 1995; Golyshina *et al.*, 2000).

Mehr als ein Viertel des eingesetzten Hefeextraktes ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) wurde in Acetat umgesetzt ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$ entspricht $4,2 \mu\text{mol ml}^{-1}$), welches anschließend zur Bildung von Methan diente. Unter der Annahme, dass eine Zelle durchschnittlich ein Trockengewicht von ca. 10^{-13} g hat und ein Wachstum der *Bacteria* von ca. 10^9 Zellen ermittelt wurde, wurden $100 \mu\text{g}$ Zellmasse pro ml Kultur gebildet. Dies entspricht einer Nutzung des angebotenen Hefeextraktes von <10%. Dagegen nutzten die *Archaea* (10^6 Zellen) nur <0,01% des angebotenen Substrates.

Die Entwicklung des RC-III spezifischen Real Time-Assays ermöglichte nicht nur eine Quantifizierung dieses Sequenztyps im Vergleich zur Gesamtheit der *Archaea* und *Bacteria*, sondern stellte eine hilfreiche Methode dar, um die physiologischen Bedingungen zu untersuchen und zu optimieren. Eine optimale Zunahme der 16S rDNA-Zielmoleküle von RC-III wurde zwischen 20 und 30°C detektiert. Hingegen wachsen die

Thermoplasmatales, bis auf die *Ferroplasma*-Arten (15 – 51°C; Golyshina *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004), in einem Temperaturbereich von 33 und 65°C (Darland *et al.*, 1970; Segerer *et al.*, 1988; Schleper *et al.*, 1995). Die RC-III-*Archaea* sind, im Gegensatz zu den acidophilen und aeroben *Thermoplasmatales*, neutrophile und scheinbar strikt anaerobe Mikroorganismen. Die *Thermoplasma*- und *Ferroplasma*-Arten sind ebenfalls in der Lage anaerob durch Schwefelrespiration bzw. Eisen(III)-Reduktion zu leben. Das Wachstum der RC-III-*Archaea* konnte jedoch nicht durch die Zugabe verschiedener alternativer Elektronenakzeptoren (elementarer Schwefel, Sulfat, Thiosulfat, Eisen(III)-Verbindungen, Nitrat, Fumarat, 9,10-Anthraquinone-2,6-Disulfonat) stimuliert werden.

Das Substratspektrum wurde mit verschiedenen Kohlenstoffquellen unter anoxischen Bedingungen getestet. Dabei diente die Methanogenese als Elektronenakzeptor. Ein Wachstum von RC-III konnte nur mit komplexen Substraten wie Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton und Trypton erzielt werden. Die höchste Anreicherung (1% an der Gesamtzielmolekülzahl) wurde mit Pepton erzielt. Die Inkubation mit Rinderserumalbumin führte zu einer geringen Zunahme der RC-III-Zielmoleküle, jedoch wurde kein Wachstum mit definierten Aminosäuregemischen ermittelt. Vermutlich sind Peptide die einzige nutzbare Substratquelle der RC-III-*Archaea*. Aufgrund der kontaminierenden Bakterien können wir bisher nicht ausschließen, dass sie von den Produkten Oligopeptid-fermentierender Arten leben. Interessanterweise, konnten Smith und Mitarbeiter zeigen, dass die Wachstum stimulierenden Faktoren von *Thermoplasma acidophilum* Oligopeptide sind (8 bis 10 Aminosäuren lang) (Smith *et al.*, 1975), die sehr wahrscheinlich in komplexen organischen Kohlenstoffquellen vorkommen (Segerer *et al.*, 1988). Die *Thermoplasmatales* können, wie auch RC-III, nicht mit Gemischen von Zuckern, Fettsäuren, Glycerol, Aromaten, Alkoholen, Pyruvat, sowie Purin- und Pyrimidinbasen wachsen. Aufgrund dieser Ergebnisse nehmen wir an, dass die RC-III-*Archaea* an der Fermentation der Peptide beteiligt sind.

Ein Wachstum der RC-III-*Archaea* konnte nur in einem mit Natriumsulfid reduzierten Medium oder einem Medium ohne Reduktionsmittel nachgewiesen werden. Alternative Reduktionsmittel (Titan(III)-Citrat, Cystein-HCl und Ascorbat) führten zu keinem Wachstum. Die Ursache ist bislang noch unbekannt.

Um den Anteil von RC-III zu erhöhen, wurden verschiedene Antibiotika eingesetzt, die das Wachstum der *Bacteria* hemmen sollten. Die Zugabe von Kanamycin, Ampicillin und Streptomycin zu Anreicherungskulturen, die mit 0,1% Hefeextrakt wuchsen, führte zu

einer Hemmung der *Bacteria*, während die Zunahme von RC-III kaum beeinflusst wurde. Unter Verwendung von Pepton und Kanamycin wurde ein Anteil der RC-III-Zielmoleküle an der Gesamtmolekülzahl von 2% bestimmt.

Die erfolgreiche Anreicherung der RC-III-*Archaea* ermöglichte die Visualisierung dieser unbekanntem Mikroorganismen mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Mit Hilfe einer RC-III spezifischen Sonde konnte die kokkoide Zellform der sehr kleinen Zellen ($\leq 1 \mu\text{m}$) gezeigt werden.

Die Kombination der klassischen Anreicherung und der Real Time-PCR-Methode ermöglichte eine erste phänotypische Charakterisierung der RC-III-*Archaea* ohne Isolierung. Dieses neue Archaeon ist sehr wahrscheinlich ein heterotropher, anaerober, mesophiler und neutrophiler Mikroorganismus. Diese kokkoiden *Euryarchaeota* scheinen an der Fermentation von Oligopeptiden beteiligt zu sein. Wir nehmen an, dass RC-III-*Archaea* im natürlichen Habitat eine Rolle beim Abbau toter Zellen spielen, was bereits für die *Thermoplasma*- und *Picrophilus*-Arten diskutiert wurde (Seegerer *et al.*, 1988; Schleper *et al.*, 1995). Ob die beschriebene Physiologie für alle RC-III-*Archaea* zutrifft, lässt sich allein durch die phylogenetische Verwandtschaft nicht beantworten. Unveröffentlichte Ergebnisse konnten bereits zeigen, dass auch die Anreicherung mit Hefeextrakt unter anoxischen Bedingungen zur Kultivierung von RC-III-*Archaea* von Reiswurzeln führte.

In weiteren Experimenten soll die Zusammensetzung der bakteriellen Begleitflora der mit Pepton inkubierten Anreicherungskulturen mit Hilfe der T-RFLP-Methode untersucht werden. Es soll geklärt werden ob das Wachstum der Kultur mit Pepton zur Verringerung der bakteriellen Diversität führen konnte, da Pepton im Vergleich zu Hefeextrakt hauptsächlich aus Peptiden und Aminosäuren besteht und damit ein geringeres Substratspektrum bietet. Der Anteil der RC-III-*Archaea* soll weiter erhöht werden, um eine Isolierung durch Koloniebildung in festem Medium zu erzielen. Die Isolierung einer Reinkultur erlaubt die weitere Charakterisierung dieses neuen Archaeons.

2. Phänotypische Charakterisierung der Rice Cluster I-*Archaea*

Die initiale Anreicherung von Rice Cluster (RC-) I-*Archaea* erfolgte im Jahre 2000 durch Dr. Kuk-Jeong Chin (Lueders *et al.*, 2001). Anoxisch inkubierter Reisfeldboden diente als Inokulum zum Beimpfen eines Mineralmediums. Die Inkubation der Anreicherungskultur MRE50 (methanogenic rice field soil enrichment at 50°C) erfolgte mit einer H₂/CO₂-Gasphase (80 / 20% v/v), 2 mM Acetat, 0,2 ‰ Reisfeldbodenextrakt und 0,01% Hefeextrakt bei 50°C. Während mehreren Transfers der Kultur in frisches Medium wurde die Methanproduktion kontrolliert. Die T-RFLP-Analyse des archaeellen 16S rRNA-Gens zeigte ein dominantes T-RF der RC-I-*Archaea*, sowie ein T-RF der *Methanobacteriales*. Phylogenetisch ist RC-I sowohl auf 16S rRNA- als auch auf *mcrA* (Gen der α -Untereinheit des Methyl-Coenzym-M-Reduktase)-Ebene am nächsten mit den *Methanosarcinales* verwandt (Großkopf *et al.*, 1998b; Lueders *et al.*, 2001). In Abbildung 25 ist die phylogenetische Verwandtschaft der 16S rRNA-Gensequenzen der Anreicherungskultur MRE50 innerhalb der *Euryarchaeota* dargestellt. Zu Beginn der Anreicherungsexperimente gruppieren 11 von 12 Klonsequenzen innerhalb des RC-I (MRE-Klone, Lueders *et al.*, 2001) und bildeten zwei verschiedene Sequenzlinien (maximal 11% Sequenzunterschied), von denen jeweils zwei repräsentative Klone in der Abbildung 10 dargestellt sind. Die Klone MRE02, 06, 07 und 09 waren mindestens zu 97% identisch, während die Sequenzen der Klone MRE01, 03, 04, 05, 10, 11 und 12 zu 91% übereinstimmten. Eine der Klonsequenzen (MRE08) gruppierte innerhalb der *Methanobacteriales*. Nach über einem Jahr fortlaufendem Transfer der Anreicherungskultur MRE50 zeigte die Sequenzanalyse, die im Rahmen der Dissertationsarbeit von Christoph Erkel durchgeführt wurde, dass zwei neue Sequenztypen (T-Typ und G-Typ Sequenzen; Erkel *et al.*, in revision) vorhanden waren. Diese unterschieden sich nur in 1% ihrer Sequenz, zeigten aber mindestens 10% Sequenzunterschied zu den MRE-Klonen der initialen Kultur. *Methanobacteria*-Sequenzen wurden innerhalb der 32 Sequenzen nicht mehr detektiert. Auch die T-RFLP-Analyse, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte nur ein für RC-I charakteristisches T-RF.

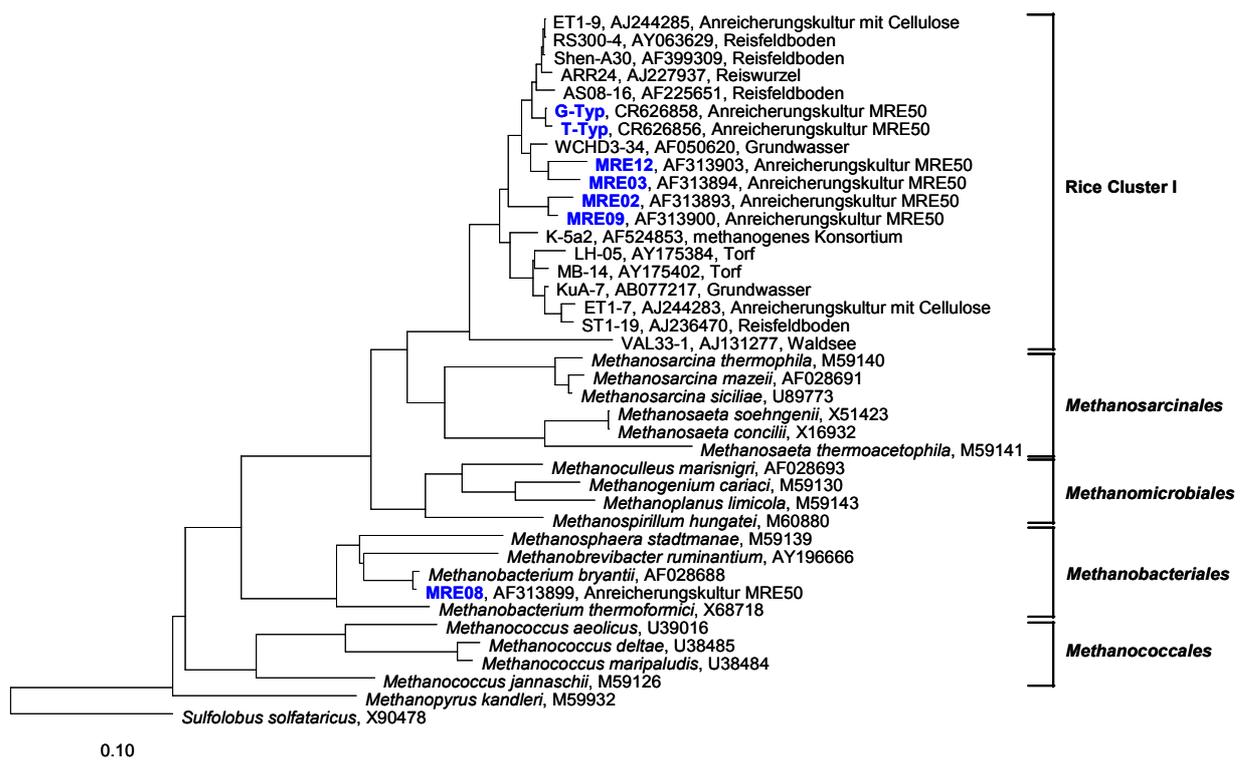


Abbildung 25: Stammbaum, der die phylogenetische Verwandtschaft basierend auf 16S rDNA-Sequenzanalyse von Klonsequenzen der Anreicherungskultur MRE50 (MRE-Klone: Lueders *et al.*, 2001; G- und T-Typ-Fosmidklone: Erkel *et al.*, in revision; in blau markiert), einem methanogenen Konsortium (K-5a2: Sizova *et al.*, 2003), verschiedenen Umweltsequenzen und Sequenzen kultivierter *Euryarchaeota* darstellt (Anwendung der Neighbor Joining-Methode). *Sulfolobus solfataricus* wurde als Außengruppe (*Crenarchaeota*) in die Stammbaumanalyse einbezogen. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied.

Die Sequenzunterschiede zwischen den 16S rDNA-Klonbibliotheken der initialen und späteren Anreicherungskultur deuten auf einen Shift der methanogenen RC-I-*Archaea* während des kontinuierlichen Transfers über einen längeren Zeitraum hin. Zu Beginn der Anreicherung zeigte sich eine größere Varianz der Sequenztypen (MRE-Klone), dagegen hatten sich nach mehr als einem Jahre zwei Sequenztypen (T-Typ und G-Typ) durchgesetzt, die vermutlich Genkopien verschiedener *rrn* Operons eines RC-I-Genotyps darstellen (Erkel *et al.*, in revision). Da die Sequenzanalyse der ersten Klonbibliothek nur 12 Klone berücksichtigte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die später detektierten Sequenztypen nicht erfasst wurden. Ein Shift konnte ebenfalls durch die Analyse der *mcrA*-Sequenzen bestätigt werden (Erkel *et al.*, in revision). Die speziellen Bedingungen der Anreicherung (z.B. Nährstoffangebot, stimulierende Wachstumsfaktoren) oder bestimmte Fähigkeiten der erhaltenen RC-I-*Archaea* (z.B. schnellere Wachstumsrate)

können zur Selektion einer oder weniger Arten geführt haben. Die Klonsequenzen ET1-7 und ET1-9 stammten ebenfalls aus einer Anreicherungskultur mit Reisfeldboden, die jedoch bei 30°C mit Cellulose als Substrat inkubiert wurde (Chin *et al.*, 1999b). Die Variation der Inkubationsbedingungen würde vermutlich zu einer weit größeren Diversität der RC-I-Sequenztypen führen. Die Sequenz K-5a2 repräsentiert ebenfalls RC-I-*Archaea* eines methanogenen Konsortiums, welches in einer Anreicherungskultur aus Torfböden detektiert wurden (Sizova *et al.*, 2003). Die Wachstumsoptima unterscheiden sich jedoch stark von denen der RC-I-*Archaea* der Anreicherungskultur MRE50 (diese Arbeit), was im Folgenden noch genauer diskutiert wird. RC-I-Sequenzen wurden jedoch vor allem in verschiedenen terrestrischen Habitaten detektiert. Umweltsequenzen wurden bislang nicht nur in Reisfeldböden (Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2001; Kim und Cho, unveröffentlicht) und an Reiswurzeln (Großkopf *et al.*, 1998b) gefunden, sondern auch in kontaminiertem Grundwasser (Dojka *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2002), im Torf (Basiliko *et al.*, 2003) und in einem Waldsee (Jurgens *et al.*, 2000) detektiert (Abbildung 25).

Da RC-I-*Archaea* die einzigen detektierbaren Methanogenen in der Anreicherungskultur MRE50 waren, konnte ihre Aktivität durch die Bestimmung der Methanproduktion verfolgt werden. Die Stöchiometrie der Methanbildung mit Wasserstoff und Kohlendioxid (Zugabe von 0,01% Hefeextrakt) ($4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$) wies auf einen hydrogenotrophen Methanogenen hin. Wie die meisten hydrogenotrophen Methanogenen sind auch RC-I-*Archaea* in der Lage mit Formiat zu wachsen. Es zeigte sich eine typische Stöchiometrie des Formiatverbrauchs (20 mmol) und der Methanbildung (4 mmol) (N_2/CO_2 -Gasphase): $4 \text{ HCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Thauer, 1998). Die Inkubation der Anreicherungskultur mit einer H_2/CO_2 -Gasphase und Acetat führte zu einer vergleichbaren Methanproduktion. Acetat wurde jedoch nicht verbraucht. Es konnte keine Methanbildung nachgewiesen werden, wenn die Anreicherungskultur mit Acetat als Substrat inkubiert wurde. Dass RC-I-*Archaea* nicht zu den acetoclastischen Methanogenen zählen, konnte zusätzlich mit Hilfe eines ^{14}C -Markierungsversuchs von Dr. Kuk-Jeong Chin gezeigt werden (persönliche Mitteilung). Es erfolgte keine Umwandlung von $[\text{2}^{14}\text{C}]$ -Acetat zu $^{14}\text{CH}_4$. Dagegen wurde die ^{14}C Markierung von CO_2 fast vollständig im CH_4 wieder gefunden. Diese Ergebnisse bestätigten die vorangegangenen Beobachtungen von Lehmann-Richter *et al.* (Lehmann-Richter *et al.*, 1999) und Fey *et al.* (Fey *et al.*, 2001). Die MPN-Analyse von Reiswurzelninkubationen führte zur Anreicherung (H_2/CO_2 -

Gasphase) eines methanogenen Konsortiums, in dem RC-I die dominante archaeelle Gruppe war (Lehmann-Richter *et al.*, 1999). In anoxisch inkubierten Bodenaufschlämmungen von Reisfeldboden nahm die Abundanz von RC-I mit der Erhöhung der Temperatur auf 50°C zu. Damit war eine Verschiebung der dominanten acetoclastischen (37°C) zur hydrogenotrophen Methanogenese (50°C) verbunden (Fey *et al.*, 2001). Durch die Metagenomanalyse der Anreicherungskultur MRE50 konnte weiterhin gezeigt werden, dass die notwendigen Enzyme für eine hydrogenotrophe Methanogenese im Genom von RC-I kodiert sind (Erkel *et al.*, in revision). Die Anreicherungskultur MRE50 wird mit einem hohen Wasserstoffpartialdruck inkubiert. Im Gegensatz dazu zeigten Lu und Mitarbeiter, dass eine Hemmung von RC-I erfolgte, wenn Reiswurzeln unter einer H₂-Atmosphäre inkubiert wurden (Lu *et al.*, 2004). RC-I konnte nur in Inkubationen mit einer N₂-Atmosphäre detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass die RC-I-*Archaea* nicht nur phylogenetisch divers sind, sondern sich auch in ihren phänotypischen Eigenschaften unterscheiden. Eine syntrophe Assoziation von Propionat-oxidierenden *Bacteria* von methanogenen *Archaea* wurde erst kürzlich mit Hilfe der SIP (Stabilen Isotopenbeobachtung)-Methode in Reisfeldboden gezeigt (Lueders *et al.*, 2004). Dabei wurde auch RC-I als potentieller Partner der *Bacteria* identifiziert. In der Anreicherungskultur MRE50 konnte keine solche Interaktion nachgewiesen werden.

Da neben den methanogenen *Archaea* nur wenige *Bacteria* in der Lage sind, unter anoxischen Bedingungen chemolithoautotroph mit H₂ und CO₂ zu wachsen, wurde die Anreicherungskultur MRE50 mit einer H₂/CO₂-Gasphase und ohne weitere Kohlenstoffquellen (mit Vitaminen) inkubiert. Während des kontinuierlichen Transfers dieser Kultur auf frisches Medium, konnte die Bildung von Methan in vier aufeinander folgenden Passagen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine verlängerte lag-Phase der Methanproduktion, die außerdem geringer war als in Kulturen, die mit Hefeextrakt oder Acetat als zusätzliche Kohlenstoffquellen inkubiert wurden. Die PCR-vermittelte Amplifikation konnte, wie erwartet, eine Verringerung der bakteriellen 16S rRNA-Gene nachweisen. Interessanterweise wurde die Methanproduktion durch die Zugabe von Cystein-HCl, was bei der Kultivierung vieler Methanogener neben Natriumsulfid als Reduktionsmittel verwendet wird, wieder stimuliert. Der kontinuierliche Transfer dieser Kultur auf frisches Medium (mit Cystein-HCl, H₂/CO₂-Gasphase) führte zu einem stabilen Wachstum der RC-I-*Archaea*. Die stimulierende Wirkung von Cystein wurde bereits für *Methanobacterium formicium* und *Methanobacterium bryantii* beschrieben (Boone *et al.*, 1993).

Die RC-I-*Archaea* der Anreicherungskultur MRE50 zeigten ein Temperaturoptimum von 50°C. Mit abnehmender Temperatur verringerte sich auch die Aktivität dieser Methanogenen, was in Übereinstimmung mit der Untersuchung von Reisfeldböden ist (Fey *et al.*, 2001). Die RC-I-*Archaea* (Sequenz K-5a2 siehe Abbildung 25) einer weiteren Anreicherungskultur, die von Sizova und Mitarbeitern beschrieben wurde, bilden ebenfalls CH₄ aus H₂ und CO₂, sind jedoch mesophil (Sizova *et al.*, 2003). Diese Methanogenen konnten ebenfalls bisher nicht isoliert werden. Sie leben in einem Konsortium mit Citrat verwertenden *Bacteria*. Weitere Unterschiede der beiden Anreicherungskulturen bestehen im pH-Wert und dem Reduktionsmittel des Mediums. RC-I-*Archaea* der Anreicherungskultur MRE50 wachsen bei neutralem pH-Wert, die K-5a2-Methanogenen wurden dagegen als acido-tolerante Organismen (pH-Optimum um pH 5) beschrieben. Letztere können nur mit Titan(III)-Citrat als Reduktionsmittel wachsen. Natriumsulfid scheint dagegen das Wachstum der RC-I-*Archaea* (K-5a2) zu hemmen. Die Wahl des Reduktionsmittels (Natriumsulfid, Titan(III)-Citrat und Cystein-HCl) hatte hingegen keinen Einfluss auf das Wachstum der RC-I-*Archaea* der Anreicherungskultur MRE50. Die Morphologie beider RC-I-Zellen ist ähnlich. Die dünne, stäbchenförmige Zellform konnte in beiden Fällen durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abundanz der RC-I-*Archaea*, sowie der kontaminierenden *Bacteria* mit Hilfe der Real Time-PCR-Methode in einem Zeitraum von 24 Tagen untersucht (Inkubation mit H₂/CO₂ und Hefeextrakt). Der Wachstumsertrag der RC-I-*Archaea* betrug 3×10^7 16S rRNA-Zielmoleküle pro 6,5 µmol CH₄. Aufgrund der Metagenomanalyse (Erkel *et al.*, in revision) und dem Verhältnis der detektierten 16S rRNA und *mcrA*-Gene (1 : 3) vermuten wir, dass eine RC-I-Zelle 3 *rrn* Operons enthält. Unter dieser Annahme und einem spezifischen Trockengewicht von $0,5 \times 10^{-12}$ g pro Zelle, erreichten die RC-I-*Archaea* einen Wachstumsertrag von 0,8 g TG mol⁻¹ CH₄. Methanogene Reinkulturen zeigten unter ähnlichen Bedingungen vergleichbare Wachstumserträge von durchschnittlich 0,6 g TG mol⁻¹ CH₄ (Schönheit *et al.*, 1980). Eine starke Zunahme der 16S rRNA-Gene der *Bacteria* wurde innerhalb der ersten zwei Tage ($9,2 \times 10^7$ 16S rRNA-Zielmoleküle ml⁻¹) detektiert. Das schnelle Wachstum deutet auf eine hohe Anzahl der *rrn* Operons hin (Klappenbach *et al.*, 2000). Vermutlich ist die Zahl der *Bacteria* 5- bis 10-fach geringer als die detektierten 16S rDNA-Zielmoleküle. Dem zu Folge beträgt der Anteil der RC-I-*Archaea* $\geq 50\%$, was durch die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung bestätigt wurde (Erkel *et al.*, in revision).

Die Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft wurde mit Hilfe der T-RFLP-Methode analysiert. Die entsprechenden phylogenetischen Gruppen einiger T-RFs wurden bereits geklärt (Erkel *et al.*, in revision). Während der Inkubation nahm nicht nur die Diversität ab, auch eine periodische Dominanz der T-RFs war zu erkennen. Vertreter der *Clostridiaceae* (80 bp-T-RF: Clostridium-Cluster III; 300 bp-T-RF: Linie unkultivierter Arten) waren bis Tag 5 abundant, was mit der Bildung von H₂, CO₂ und geringen Konzentrationen organischer Säuren und Alkohole (Acetat, Butyrat, Propionat, Caproat, Valerat und Ethanol) korrelierte. Vermutlich wurden einige Substratbestandteile des Hefeextraktes fermentiert. Alternativ dazu wiesen die Bildung geringer Mengen Acetat und Butyrat, sowie die Detektion von *Moorella* verwandter Sequenzen, auf eine chemolithoautotrophe Lebensweise homoacetogener Mikroorganismen mit H₂/CO₂ hin (Collins *et al.*, 1994). Das T-RF der *Moorella* verwandten Sequenzen (129 bp) wurde jedoch nur mit sehr geringem relativem Anteil detektiert. Ein T-RF von 178 bp Länge, das durch Sequenzen einer bisher unkultivierten Linie der *Thermoanaerobacteriaceae* repräsentiert wurde, gewann während der Inkubation an Dominanz. Die Physiologie dieser Mikroorganismen ist bisher noch nicht bekannt, doch scheinen sie eine anaerobe, thermophile Lebensweise mit den kultivierten Vertretern dieser Familie gemeinsam zu haben (Slobodkin *et al.*, 1997; Hattori *et al.*, 2000; Plugge *et al.*, 2002).

Um die Abundanz der *Bacteria* zu verringern, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Versuche unternommen, die jedoch bislang ohne Erfolg blieben. Die Anwendung von Verdünnungsreihen in vorangegangenen Experimenten, sowie im Rahmen dieser Arbeit, führten nicht zur Isolierung von RC-I. Auch der Einsatz verschiedener Antibiotika (z.B. Ampicillin, Streptomycin und Kanamycin) konnte zwar eine Resistenz der RC-I-*Archaea* zeigen, verringerte die Abundanz der *Bacteria* jedoch nicht wesentlich. In dieser Arbeit ist es jedoch zum ersten Mal gelungen, Kolonien der RC-I-*Archaea* in einem festen Medium zu isolieren. Dazu wurde eine Vorkultur in einem substratfreien Medium mit einer H₂/CO₂-Gasphase und Vitaminen inkubiert, wobei eine Verringerung der *Bacteria* nachgewiesen wurde. Diese Kultur wurde mit Hilfe der „roll tube“-Technik verdünnt. Nach dem Picken der Kolonien und dem Transfer in flüssiges Medium, wurde in drei von 20 Kulturen Methanproduktion nachgewiesen. Durch die Minimierung der Wachstumsbedingungen wurde vermutlich eine Selektion zu Gunsten der autotrophen Mikroorganismen erzielt. Im Vergleich dazu, führte die Vorinkubation und die Verdünnung der Anreicherungskultur MRE50 mit Zugabe von Hefeextrakt ausschließlich

zur Detektion verschiedener *Bacteria*-Kolonien (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen methanogenen Kulturen (MRE-1, MRE-5 und MRE6) wurden mittels PCR-Analyse untersucht. Dabei wurde, wie erwartet, ein RC-I-spezifisches archaeelles PCR-Produkt nachgewiesen. Jedoch erfolgte ebenfalls eine Amplifikation von *Bacteria*. Die T-RFLP-Analyse zeigte, dass in allen drei Kulturen bakterielle T-RFs mit gleicher Länge und ähnlich relativem Anteil auftraten, deren phylogenetische Zuordnung noch unbekannt ist. Zwei der T-RFs (441 und 452 bp) waren sehr dominant. Bisher ist noch nicht geklärt, ob dies nur ein zufälliges Ereignis ist oder möglicherweise eine Abhängigkeit zwischen den RC-I-*Archaea* und den detektierten *Bacteria* besteht. Man kann spekulieren, dass es sich hierbei um eine obligate bakterielle Begleitflora handelt. Ähnlich zu den gepickten Kolonien, führte der Transfer der Anreicherungskultur MRE50 mit Cystein-HCl und einer H₂/CO₂-Gaspase (siehe oben) zu einem vergleichbaren T-RFLP-Muster (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich, dass durch die Minimierung der verfügbaren Substrate eine Selektion von RC-I und bestimmten *Bacteria* erfolgte.

Die mikroskopische Untersuchung der isolierten Kulturen (MRE-1, MRE-5 und MRE6) zeigte das dominante Vorkommen stäbchenförmiger Mikroorganismen, die den mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachgewiesenen RC-I-Zellen ähnelten (Erkel *et al.*, in revision). Der Nachweis von Autofluoreszenzsignalen des Coenzym F₄₂₀, welches in allen bekannten Methanogenen vorkommt, bestätigte die Dominanz der RC-I-Zellen. Erstmals konnte das Vorkommen des Coenzym F₄₂₀ auch in RC-I-*Archaea* detektiert werden, obwohl in der initialen Kultur kein Autofluoreszenzsignal gefunden wurde (Lueders *et al.*, 2001).

Im Anschluss an diese Arbeit soll der Sequenztyp (G- oder T-Typ) der isolierten RC-I-*Archaea*, sowie die phylogenetische Zuordnung der unbekanntesten bakteriellen T-RFs der Kulturen MRE-1, MRE-5 und MRE6 geklärt werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob eine Substratabhängigkeit der RC-I-*Archaea* von den detektierten *Bacteria* besteht. Das Hauptziel der weiteren Experimente besteht vor allem in der Isolierung von RC-I.

3. Abundanz und Diversität unkultivierter *Archaea* in einem Waldboden

Das Vorkommen unkultivierter und mesophiler *Archaea* in oxischen Böden wurde bereits durch einige Untersuchungen verdeutlicht (Buckley *et al.*, 1998; Jurgens *et al.*, 2000; Pesaro und Widmer, 2002; Bomberg *et al.*, 2003; Ochsenreiter *et al.*, 2003; Sliwinski und Goodman, 2004). Der Waldboden der Marburger Lahnberge ist ein typisch oxischer Boden, welcher bereits auf die Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft und deren Aktivität untersucht wurde (Henkel *et al.*, 2000; Knief *et al.*, 2003). Über die Abundanz und die Diversität der *Archaea* war bislang nur wenig bekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Flutung und anoxische Inkubation von Bodenproben zum Wachstum Methanogener führten (Peters und Conrad, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Tiefenprofil des Waldbodens (Juli 2002) mit Hilfe PCR-basierender Methoden untersucht. Weiterhin wurden einige biogeochemischen Parameter bestimmt. Dazu wurde der Boden bis zu einer Tiefe von 21 cm in jeweils 3 cm dicke Schichten unterteilt.

Um die Abundanz der *Archaea* zu ermitteln, wurde der in dieser Arbeit entwickelte Real Time-PCR-Assay verwendet. Die Anzahl der detektierten 16S rDNA-Zielmoleküle zeigte keine große Varianz innerhalb der verschiedenen Schichten und betrug zwischen 2,1 bis $7,9 \times 10^7$ Zielmoleküle pro g TG. Die bakteriellen 16S rDNA-Zielmoleküle der obersten Schichten (0-9 cm) zeigten bis zu 10-fach höhere Werte und nahmen in den tieferen Schichten ab. Der relative Anteil der archaeellen Zielmoleküle an der Gesamtzielmolekülzahl (*Archaea* + *Bacteria*) betrug im B_v-Horizont durchschnittlich 36%. In einer Tiefe von 18 – 21 cm wurde sogar ein relativer Anteil von 64% bestimmt. Geht man aufgrund der *rrn* Operon-Zahl kultivierter *Crenarchaeota* davon aus, dass auch die unkultivierten Vertreter nur eine 16S rRNA-Gen und die *Bacteria* im Durchschnitt 3,6 Genkopien pro Zelle besitzen (Ochsenreiter *et al.*, 2003; <http://rmdp.cme.msu.edu/rmdp/servlet/controller>), würde der Anteil der *Archaea* an der mikrobiellen Biomasse im Marburger Waldboden 27 bis maximal 86% (durchschnittlich 60%) betragen. Im Vergleich mit der Analyse eines weiteren Tiefenprofils des Marburger Waldbodens im Juni 2002, sind die 16S rDNA-Zielmolekülzahlen der *Archaea*, sowie der *Bacteria* im Durchschnitt um ein zehnfaches höher (Dissertation von Dr. Steffen Kolb). Dieser Unterschied kann mehrere Ursachen haben. Zum einen wurden die Bodenkerne in zwei verschiedenen, jedoch nahe gelegenen Standorten gestochen und unterschiedlich bearbeitet. Die Lagerung der Bodenproben bis zur DNA-Extraktion bei -20°C dauerte bei

den Juli-Proben (diese Arbeit) länger, was zum Verlust von Gesamt-DNA führen kann (Pesaro *et al.*, 2003). Trotzdem wurde der relative Anteil der archaeellen 16S rDNA-Zielmoleküle an der Gesamtmolekülzahl im Juli 2002 (diese Arbeit) durch die Bodenanalyse vom Juni 2002 (durchschnittlich 37% im B_v-Horizont) bestätigt. Eine Zunahme des relativen Anteils der *Archaea* konnte ebenfalls gezeigt werden.

Ein ähnlich hoher Anteil unkultivierter *Archaea* konnte bisher nur in marinen Standorten nachgewiesen werden. So wurden in marinen Gewässern der Antarktik und des Santa Barbara Kanals unkultivierte *Archaea* detektiert, die bis zu 34% der prokaryotischen Biomasse ausmachten (DeLong, 1994; Massana *et al.*, 1997; Karner *et al.*, 2001). Dagegen führte die Quantifizierung der 16S rDNA der *Crenarchaeota* in verschiedenen Böden mit Hilfe einer Filterhybridisierungstechnik (slot blot Hybridisierung) und der Real Time-PCR-Methode nur zu geringen relativen Anteilen von maximal 3% (Buckley *et al.*, 1998; Ochsenreiter *et al.*, 2003). Die relative Abundanz der *Crenarchaeota* an Wurzeln von Tomatenpflanzen betrug dagegen bis zu 16% und wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ermittelt (Simon *et al.*, 2000). Die Untersuchungen zur Abundanz unkultivierter *Crenarchaeota* in Böden sind jedoch noch sehr lückenhaft.

Die Abundanz der unkultivierten *Archaea* ist somit weit höher, als bisherige Untersuchungen zeigen konnten. Natürlich werfen diese hohen Zahlen automatisch die Frage nach möglichen Fehlerquellen der angewandten Methode auf. Der Unterschied der ermittelten Anteile der *Archaea* dieser Studie und der Untersuchung von Ochsenreiter und Mitarbeitern (Ochsenreiter *et al.*, 2003) scheint nicht in der verwendeten DNA-Extraktionsmethode und dem damit verbundenen Zellaufschluss zu liegen, da beide Untersuchungen mit dem gleichen kommerziell erhältlichen Bodenextraktionskit durchgeführt wurden. Die Quantifizierung der *Archaea* und *Bacteria* mit Hilfe der Real Time-PCR-Methode wurde hingegen mit anderen Primerpaaren vorgenommen. Der in dieser Arbeit verwendete PCR-Assay erfasst die Gesamt-DNA der *Archaea*, dagegen entwickelten Ochsenreiter *et al.* (2003) ein *Crenarchaeota*-spezifisches Primerpaar, was durch seine hohe Spezifität zum Verlust möglicher weiterer Sequenzen führen kann. Aber dies kann auch für den hier entwickelten *Archaea*-PCR-Assay und prinzipiell für alle PCR-basierenden Methoden zutreffen. Suzuki und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass die durch quantitative PCR (5'-Nuklease-Assay = TaqMan) ermittelten Zahlen verschiedener mikrobieller Gruppen vergleichbar mit Werten alternativer Methoden (quantitative Hybridisierung von Sonden, Ganzzellhybridisierung und Durchflußzytometrie) waren (Suzuki *et al.*, 2000). Chapelle und Mitarbeiter bestätigten ebenfalls den durch quantitative

PCR (Real Time-PCR) und MPN-PCR ermittelten Anteil der *Archaea* mit Hilfe einer quantitativen rRNA-Hybridisierung-Methode (Chapelle *et al.*, 2002).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem untersuchten Boden dieser Arbeit und dem Boden vorangegangener Studien besteht im pH-Wert. Der Marburger Waldboden ist ein saurer Boden (pH 3,8 bis 4,4). Die meisten Böden, die einen geringeren Anteil der *Archaea* aufwiesen, zeigten pH-Werte $>5,5$ (Ochsenreiter *et al.*, 2003). Der Einfluss des pH-Wertes auf die bakterielle Zusammensetzung im Humus von Nadelwäldern wurde bereits in zahlreichen Feldstudien nachgewiesen (Zusammenfassung siehe Pennanen T., 2001). Die Erniedrigung des pH-Wertes wirkte sich direkt und indirekt auf die Größe, die Zusammensetzung und die Aktivität der *Bacteria* aus. Über die Auswirkung auf die archaeelle Population ist bisher nichts bekannt. Eine vergleichende Untersuchung oxischer Böden könnte klären, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Abundanz sowie die Struktur der *Archaea* hat.

Die Diversität der *Archaea* des Marburger Waldbodens wurde mit Hilfe der T-RFLP-Methode und vergleichender Sequenzanalyse bestimmt. Es wurden unkultivierte Linien der *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota* nachgewiesen. Die *Crenarchaeota* gruppierten in den von DeLong beschriebenen Linien „Group 1.1b“ und „Group 1.1c“ (DeLong, 1998), während die *Euryarchaeota* mit den *Thermoplasmatales* verwandt waren. Die zuerst verwendete Markierung des reversen Primers mit dem Fluoreszenzfarbstoff konnte die Struktur der *Archaea* nicht komplett auflösen, da das T-RF von 185 bp beide Linien der *Crenarchaeota* repräsentierte. Die Markierung des forward Primers konnte die theoretisch ermittelten Schnittstellen der Sequenzen bestätigen, wodurch der relative Anteil jeder phylogenetischen Gruppe bestimmt werden konnte. Der relative Gesamtanteil der *Crenarchaeota* („Group 1.1b“ + „Group 1.1c“) war in allen Bodenschichten sehr hoch und betrug durchschnittlich 88%. Das dominante T-RF der Linie 1.1c zeigte einen relativen Anteil innerhalb der *Archaea* von 60 bis 91%. Sequenzen dieser Linie wurden vorwiegend in Waldböden detektiert, (Jurgens *et al.*, 1997; Jurgens und Saano, 1999; Pesaro und Widmer, 2002; Bomberg *et al.*, 2003; Ochsenreiter *et al.*, 2003). Buckley beschrieb diese Gruppe auch als „FFSB cluster“ (Buckley *et al.*, 1998), da die ersten Sequenzen aus Waldboden stammten (FFSB-Klone von Jurgens *et al.*, 1997; Jurgens und Saano, 1999). Das T-RF der Linie 1.1b (= „Group 1.1b“), wurde nur im A_h-Horizont mit maximal 33% relativem Anteil nachgewiesen. Diese Gruppe von Sequenzen ist auch als „Terrestrial cluster“ (Buckley *et al.*, 1998) oder Rice Cluster VI (Großkopf *et al.*, 1998b) bekannt. Der

Großteil der bekannten Umweltsequenzen der Linie 1.1c wurde in Böden detektiert, die oxische sowie anoxische Bedingungen aufwiesen (Bintrim *et al.*, 1997; Großkopf *et al.*, 1998b; Chin *et al.*, 1999a; Ochsenreiter *et al.*, 2003; Kemnitz *et al.*, 2004). Weitere Sequenzen wurden in Termitendärmen (Friedrich *et al.*, 2001), in mikrobiellen Matten (Ochsenreiter *et al.*, 2003) und Gewässern (Hershberger *et al.*, 1996; Takai *et al.*, 2001; Ochsenreiter *et al.*, 2003) gefunden. Das T-RF der *Thermoplasmatales*-verwandten Sequenzen (*Euryarchaeota*) wurde in allen Bodenschichten nachgewiesen, wobei sich der relative Anteil innerhalb der *Archaea* ab einer Tiefe von 9 cm verdoppelte (maximal 15%). Die Sequenzen waren mit Umweltklonen aus einem bewaldeten Feuchtgebiet (Brofft *et al.*, 2002), einem Süßwasserspeicherbecken (Stein *et al.*, 2002) und einem kontaminierten Grundwasser (Dojka *et al.*, 1998) verwandt. In der in Abschnitt 1 beschriebenen Stammbaumanalyse der *Thermoplasmatales* (Abbildung 24) gruppieren die Sequenzen des Marburger Waldbodens in der terrestrischen Linie D. Pesaro und Widmer beschrieben erstmals und bisher als einzige weitere Umwelsequenzen dieser Linie, die ebenfalls in einem Waldboden detektiert wurden (Pesaro und Widmer, 2002).

Die Physiologie der unkultivierten *Eury*- und *Crenarchaeota* ist bislang unbekannt. Vermutlich besitzen diese Organismen eine Vielfalt metabolischer Fähigkeiten, da vor allem die Linien der *Crenarchaeota* (1.1b und 1.1c) sehr divers sind und eine interne Gruppierung der Sequenzen zu erkennen ist. Wie bereits beschrieben wurde das T-RF der Linie 1.1b nur im A_h-Horizont detektiert. Da die T-RFLP-Analyse nur den relativen Anteil innerhalb der *Archaea* zeigt, ist dies kein Beweis dafür, dass diese Linie nicht in tieferen Schichten vorkommt. Steigt der Anteil der anderen *Archaea* stark an, würde das zur Folge haben, dass die Linie 1.1b nicht mehr detektiert würde, obwohl sich die Zahl nicht verändert. Da mit Hilfe der Real Time-PCR-Methode jedoch gezeigt werden konnte, dass die Anzahl der archaeellen 16S rDNA-Zielmoleküle der verschiedenen Bodenschichten nur gering variiert, scheint ein Einfluss der Bodenparameter auf das Vorkommen dieser *Crenarchaeota* vorhanden zu sein. Generell nimmt der Nährstoffanteil mit der Tiefe stark ab. Die Metagenomanalyse eines unkultivierten Vertreters dieser Linie, der ebenfalls in einem oxischen Boden nachgewiesen wurde, führte zur Detektion eines *nirK*-äquivalenten Genes (Präsentation von A.H. Treusch bei der VAAM-Tagung 2003, bisher unveröffentlicht). Dies führte zur Diskussion, ob mesophile *Crenarchaeota* der Linie 1.1b an der Denitrifizierung in Böden beteiligt sein könnten. Auch in dieser Arbeit scheint eine Korrelation zwischen der Verfügbarkeit von Nitrat im A_h-Horizont und der Detektion

dieser Linie vorhanden zu sein. Da das Tiefenprofil jedoch durch die Variation verschiedener Bodenparameter charakterisiert ist (z.B. Abnahme des gravimetrischen Wassergehaltes, des C/N-Anteils, der Sulfat- und Ammoniumkonzentrationen u.a. nicht untersuchten Parametern), bleibt dies nur eine Vermutung. Da die *Crenarchaeota* der Linie 1.1c und die zu *Thermoplasmatales* verwandte Linie in allen Bodenschichten mit ähnlichem relativen Anteilen nachgewiesen wurden, konnte ihnen keine physiologischen Eigenschaften zugeordnet werden. Ein möglicher Einfluss der *Bacteria* auf die *Archaea* darf ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Sie könnten um Substrate konkurrieren, aber auch in einer Substratabhängigkeit leben.

Die Abnahme der *Bacteria* mit der Tiefe scheint mit der Verfügbarkeit der Substrate im Zusammenhang zu stehen. So nehmen z.B. der C/N-Gehalt und somit die Nitrat- und Ammoniumkonzentration, aber auch die Sulfatkonzentration ab. Die Streuauflage führt zu einem Nährstoffeintrag in den oberen Schichten, was vermutlich zu einer höheren Aktivität der Mikroorganismen führt. Der C/N-Gehalt wurde mit maximal 35% bzw. 1,5% in der obersten Schicht bestimmt und nahm mit der Tiefe stark ab. Diese Werte waren vergleichbar mit dem C/N-Gehalt eines Tiefenprofils des Marburger Waldbodens im Winter 1999 (Dissertation von Dr. Udo Jäckel, 2001). Die starke Abnahme von Nitrat mit der Tiefe weist z.B. auf eine Aktivität nitrifizierender Bakterien an der Bodenoberfläche hin, was in Übereinstimmung mit der Untersuchung von Schnell und King (1994) wäre. Sie konnten eine maximale Nitrifikation an der Bodenoberfläche eines Waldbodens zeigen und diese Beobachtung mit den gefundenen höheren Ammoniumkonzentrationen korrelieren. Schwefel kann durch den Proteinabbau und die Abspaltung von S^{2-} aus Aminosäuren freigesetzt (Desulfuration) und unter oxidischen Bedingungen entweder abiotisch oder durch Bakterien über Schwefel zu Sulfat oxidiert werden (Schlegel, 1992). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass unter anoxischen Bedingungen in typisch oxidischen Böden kurzkettige organischen Säuren (Acetat, Formiat und Lactat) gebildet werden und dies auf anaerobe Prozesse im Zentrum von Bodenaggregaten und der Streuauflagen hinweist (Sexstone *et al.*, 1985; Krzyszowska *et al.*, 1996; Van der Lee *et al.*, 1999; Küsel und Drake, 1999). Dabei wurde Acetat als das dominante organische Produkt in Waldböden und Mineralböden nachgewiesen (Shen *et al.*, 1996; Küsel und Drake, 1994; Küsel und Drake, 1995; Wagner *et al.*, 1996; Küsel und Drake, 1999; Peters und Conrad, 1996). Acetat konnte nicht im Tiefenprofil des Marburger Waldbodens nachgewiesen werden. Dagegen wurden Succinat, Isobutyrat und Formiat detektiert. Küsel

und Drake konnten zeigen, dass Formiat und Lactat in der initialen Phase anaerober mikrobieller Prozesse in Waldböden produziert werden (Küsel und Drake, 1999). Die Aktivität anaerober Mikroorganismen in Mikronischen von Böden scheint vom Wassergehalt und der Rate der aeroben Respiration abhängig zu sein (Tiedje *et al.*, 1984; Sexstone *et al.*, 1985; Smith und Arah, 1986).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hohe Zahl der *Archaea* im Waldboden der Marburger Lahnberge auf deren wichtige ökologische Rolle hinweist. Um den Anteil der *Archaea* an der mikrobiellen Gemeinschaft zu überprüfen, soll in den folgenden Untersuchungen die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung angewandt werden. Trotz der hohen Abundanz der *Archaea* im untersuchten Waldboden, zeigten sich keine eindeutigen Hinweise über die metabolischen Fähigkeiten der unkultivierten Gruppen. Da die Zahl dieser *Archaea* jedoch sehr hoch ist, bestehen gute Chancen diese Mikroorganismen in Kultur anzureichern. Mit Hilfe der analysierten Bodenparameter lassen sich die Umweltbedingungen im Boden mit einem speziellen Medium imitieren.

4. Abschließende Betrachtung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die quantitative PCR ein hilfreiches Werkzeug zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften darstellt. Durch den Einsatz spezifischer Primer war es möglich das Wachstum oder die Abundanz verschiedener phylogenetischer Gruppen nachzuweisen. Dabei konnten die zeitlichen oder räumlichen Veränderungen der einzelnen Gruppen verfolgt und neue Erkenntnisse über bislang unkultivierte *Archaea* gewonnen werden. Weiterhin konnte die Kombination klassischer Kultivierungstechniken mit molekularbiologischen Methoden zur Charakterisierung neuer Mikroorganismen angewendet werden. Die Beobachtungen dieser Arbeit verdeutlichen außerdem, dass die Kultivierung bisher unkultivierter *Archaea* dringend notwendig ist um ihre ökologische Bedeutung besser zu verstehen.

V Literatur

Allen J.R., Clark D.D., Krum J.G. und Ensign S.A. 1999. A role for coenzym M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8432-8437.

Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R. und Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.

Amann R.I., Zarda B., Stahl D.A. und Schleifer K.H. 1992. Identification of individual prokaryotic cells by using enzym-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3007-3011.

Amann R., W. Ludwig und Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.

Aravalli R.N., She Q. und Garrett R.A. 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *TREE.* 13:190-194.

Ashkin A. und Dziedzic J.M. 1987. Optical Trapping and Manipulation of viruses and bacteria. *Science.* 235:1517-1520.

Balch W.E. und Wolfe R.S. 1979. Specific and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethane sulfonic acid). *J. Bacteriol.* 137:264-273.

Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D. und Pace N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *PNAS.* 93:9188-9193.

Barns S.M., Fundyga R.E., Jeffries M.W. und Pace N.R. 1994. Remarkable archaeal diversity in a Yellowstone National Park hot spring environment. *PNAS.* 91:1609-1613.

- Bartscht K., Cypionka H. und Overmann J. 1999.** Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:249-259.
- Basiliko N., Yavitt J.B., Dees P.M. und Merkel S.M. 2003.** Methane biogeochemistry and methanogen communities in two northern peatland ecosystems, New York State. *Geomicrobiology Journal* 20:563-577.
- Beja O., Suzuki M.T., Koonin E.V. Aravind L., Hadd A., Nguyen L.P., Villacorta R., Amjadi M., Garrigues C., Jovanovich *et al.* 2000.** Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* 2:516-529.
- Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsmann J., Roberts G.P. und Goodman R.M. 1997.** Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. *PNAS* 94:277-282.
- Bleicher K., Zellner G., und Winter J. 1989.** Growth of metanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 59:307-312.
- Bomberg M., Jurgens G., Saano A., Sen R. und Timonen S. 2003.** Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizo spheres developed in boreal forest humus microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:163-171.
- Boone D.R., Whitman W.B. und Rouvière P. 1993.** Diversity and Taxonomy of Methanogens. In: *Methanogenesis*. Ferry J.G. (eds). New York and London: Chapman and Hall. 35-80.
- Braker G., Ayala-Del-Rio H.L., Devol A.H., Fesefeldt A. und J.M. Tiedje. 2001.** Community Structure of Denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4):1893-1901.

Buckley D.H., Graber J.R. und Schmidt T.M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4333-4339.

Bull A.T. und Slater J.H. 1982. Microbial interactions and community structure. In: Bull A.T. und Slater J.H. (eds). *Microbial interactions and communities*. Academic Press London. Vol 1:13-44.

Burggraf S., Huber H. und Stetter K.O. 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *IJSB.* 47:657-660.

Chapelle F.H., O'Neill K., Bradley P.M., Methe B.A., Clufo S.A., Knobel L.L. und Loveley D.R. 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature.* 415:312-315.

Chin K.-J., Lukow T. und Conrad R. 1999a. Effect of Temperature on Structure and Function of the Methanogenic Archaeal Community in an Anoxic Rice Field Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2341-2349.

Chin K.-J., Lukow T., Stubner S. und Conrad R. 1999b. Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:313-326.

Chin K.-J., Rainey F.A., Janssen P.H. und R. Conrad. 1998. Methanogenic Degradation of Polysaccharides and the Characterisation of Polysacchralytic *Clostridia* from Anoxic Rice Field Soil. *System. Appl. Microbiol.* 21:185-200.

Collins M.D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H. und Farrow J.A. 1994. The phylogenie of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *IJSB.* 44:812-826.

- Connon S.A. und Giovannoni S.J.** 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3878-3885.
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H. und Wagner M.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:434-444.
- Darland G., Brock T.D., Samsonoff W. und Conti S.F.** 1970. A thermophilic acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* 170: 1416-1418.
- Dedysh S.N., Derakshani M. und Liesack W.** 2001. Detection and Enumeration of Methanotrophs in Acidic *Sphagnum* Peat by 16S rRNA Fluorescence In Situ Hybridisation, Including the Use of Newly Developed Oligonucleotide Probes for *Methylocella palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4850-4857.
- DeLong E.F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *PNAS.* 89:5685-5689.
- DeLong E.F.** 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics and Development.* 8 (6): 649-654.
- DeLong E.F., Wickham G.S. und Pace N.R.** 1989. Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells. *Science.* 243:1360-1363.
- DeLong, E.F., K.Y. Wu, B.P. Prezelin und R.V.M. Jovine.** 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371:695-697.
- Dojka M.A., Hugenholtz P., Haack S.K. und Pace N.R.** 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 3869-3877.
- Dopson M., Baker-Austin C., Hind A., Bowman J.P., und Bond P.L.** 2004. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp.nov., extreme

acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol. 70:2079-2088.

Dykhuizen D.E. 1998. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? Antonie van Leeuwenhoek. 73:25-33.

Entcheva P., Liebl W., Johann A., Hartsch T. und Streit W.R. 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. Appl. Environ. Microbiol. 67:89-99.

Erkel C., Kemnitz D., Kube M., Ricke P., Chin K.-J., Dedysh S., Reinhardt R., Conrad R. and Liesack W. in revision. Retrieval of first genom data for rice cluster I methanogens by a combined approach of cultivation and molecular ecology techniques. FEMS Microbiol. Ecol.

Ermiler U., Grabarse W., Shima S., Goubeaud M. und Thauer R.K. 1997. Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation. Science 278:1457-1462.

Fey A., Chin K.-J. und Conrad R. 2001. Thermophilic methanogens in rice field soil Environ. Microbiol. 3:295-303.

Fey, A. und Conrad R. 2000. Effect of Temperature on Carbon and Electron Flow and on the Archaeal Community in Methanogenic Rice Field Soil. Appl. Environ. Microbiol. 66:4790-4797.

Fitch, W. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool. 20:406-416.

Forsterre P. 2002. Evolution of the Archaea. Theoretical Population Biology. 61:409-422.

Friedrich M., Schmitt-Wagner D., Lueders T. und Brune A. 2001. Axial Differences in Community Structure of *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in the Highly

Compartmentalized Gut of the Soil-Feeding Termite *Cubitermes orthognathus*. Appl. Environ. Microbiol. 67:4880-4890.

Fuhrman J.A., McCallum K. und Davis A.A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plancton. Nature. 356:148-149.

Garcia J.-L., Patel B.K.C. und Ollivier B. 2000. Taxonomic Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. Anaerobe. 6:205-226.

Giovannoni S.J., DeLong E.F., Olsen G.J. und Pace N.R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. 170:720-726.

Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrat'eva T.F., Moore E.R.B., Abraham W.-R., Lünsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M. und P.N. Golyshin. 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., spe. nov., an cell-wall-leaking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. IJSEM 50:997-1006.

Gonzalez J.M., Whitman W.B., Hodson R.E. und Moran M.A. 1996 Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: An example from a lignin enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 62:4433-4440.

Gottschal J.C., Harder W. und Prins R.A. 1992. Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation, and Preservation of Bacteria. In: The Prokaryotes. Balow A., Trüpler H.G., Dworkin M., Harder W. und Schleifer K.-H. (eds.) Springer-Verlag New York Inc. 149-196.

Großkopf R., Janssen P.H. und Liesack W. 1998a. Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval. Appl. Environ. Microbiol. 64:960-969.

- Großkopf R., Stubner S. und Liesack W.** 1998b. Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4983-4989.
- Gutell, R.R., Larsen N. und Woese C.R.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23 rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58:10-26.
- Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J. und Goodman, R.M.** 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: R245-R249.
- Hattori S., Kamagata Y., Hanada S., und Shoun H.** 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *IJSEM.* 50. 1601-1609.
- Hershberger K.L., Barns S., Reysenbach A.-L., Scott C. D. und Pace N.R.** Wide diversity of Crenarchaeota. *Nature.* 384:420.
- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C. und Stetter K.O.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature.* 417:63-67.
- Huber R., Burggraf S., Mayer T., Barns S.M., Rossnagel P. und Stetter K.O.** 1995. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature.* 376:57-58.
- Huber R., Huber H. und Stetter K.O.** 2000. Towards the ecology of hyperthermophiles: Biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:615-623.
- Hugenholtz P., Goebel B.M. und Pace N.R.** 1998. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal Bacteriol.* 180:4765-4774.

- Hungate R.E.** 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49.
- Hungate R.E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J.R. und Ribbons W.D. (eds). *Methods in microbiology*. Academic Press London. Vol 3B:117-132.
- Itoh T.** 2003. Taxonomy of Nonmethanogenic Hyperthermophilic and Related Thermophilic Archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96:203-212.
- Jäckel U.** 2001. Der Methankreislauf im Wald- und Reisfeldboden: Natürliche Prozesse und anthropogene Einflüsse. Dissertation.
- Jurgens G., Glöckner F.A., Amann R., Saano A., Montonen L., Likolammi M. und Münster U.** 2000. Identification of novel *Archaea* in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:45-56.
- Jurgens G. und Saano A.** 1999. Diversity of soil *Archaea* in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:205-213.
- Jurgens G., Lindström K. und Saano A.** 1997. Novel Group within the Kingdom *Crenarchaeota* from Boreal Forest Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:803-805.
- Kandler O. und König H.** 1998. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell. Mol. Life Sci.* 54:305-308.
- Kandler O. und König H.** 1993. Cell envelopes of archaea: structure and chemistry. In: Kates M., Kushner D.J. und Matheson A.T. (eds). *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Vol 26: 223-295.
- Karner M.B., DeLong E.F. und Karl D.M.** 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409:507-510.

- Kates M.** 1993. Membrane lipids of Archaea, In: Kates M., Kushner D.J. und Matheson A.T. (eds). *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Vol 26: 261-295.
- Kemnitz D., Chin K.-J., Bodelier P. und Conrad R.** 2004. Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. *Environ. Microbiol.* 6 449-461.
- Kim J.A. and Cho K.H.** unveröffentlicht. Effect of Salt Stress on Function and Structure of the Methanogenic Archaeal Community in Rice Field Soil.
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M. und Schmidt T.M.** 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1328-1333.
- Knief C., Lipski A. und Dunfield P.F.** 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6703-6714.
- Krzyszowska A., Blaylock M.J., Vance G.F. und David M.B.** 1996. Ion-chromatography analysis of low molecular weight organic acids in spodosol forest floor solutions. *SSSAJ.* 60:1565-1571.
- Kudo Y., Shibata S., Miyaki T., Aono T. und Oyaizu H.** 1997. Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. *PNAS.* 94:277-282.
- Küsel K. und Drake H.L.** 1994. Acetat synthesis in soil from a Bavarian beech forest. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1370-1373.
- Küsel K. und Drake H.L.** 1995. Effect of environmental parameters on the formation and turnover of a acetate in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3667-3675.
- Küsel K. und Drake H.L.** 1999. Microbial turnover of low molecular weight organic acids during leaf litter decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 31:107-118.
- Lane D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. und Goodfellow M. (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, England. 205-248.

Le Mer J. und Roger P. 2001. Produktion, oxidativen, emission and Consumption of methane by soils : A review. *Eur. J. Soil Biol.* 37:25-50.

Lehmann-Richter S., Großkopf R., Liesack W., Frenzel P. und Conrad R. 1999. Methanogenic archaea and CO₂-dependent methanogenesis on washed rice roots. *Environ. Microbiol.* 1:159-166.

Liu W-T., Marsh T.L., Cheng H. und Forney L.J. 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.

Löffler F.E., Ritalahti K.M. und Tiedje J.M. 1997. Dechlorination of Chloroethenes Is Inhibited by 2-Bromoethanesulfonate in the Absence of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4982-4985.

Lovley D.R. und Phillips E.J.P. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1536-1540.

Lu Y., Lueders T., Friedrich M.W. und Conrad R. 2004. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* in press.

Lüdemann H., Arth I. und Liesack W. 2000. Spatial Changes in the Bacterial Community Structure along a Vertical Oxygen Gradient in Flooded Paddy Soil Cores. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:754-762.

Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J. et al. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* 19:554-568.

Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar et al. 2004. ARB: software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.

- Ludwig, W.** 1995. Sequence database. In: Molecular microbial ecology manual. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas und F.J. de Bruijn (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Lueders T. und Friedrich M.** 2000. Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2732-2742.
- Lueders T. und Friedrich M.** 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:320-326.
- Lueders T., Pommerenke B. und Friedrich M.W.** 2004. Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5778-5786.
- Lueders T., Wagner B., Claus P., und Friedrich M.W.** 2003. Stable Isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotrophic community and coupled trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* 6: 73-78.
- Lueders, T., Chin K.-J., Conrad R. und Friedrich M.W.** 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ. Microbiol.* 3:194-204.
- Marschner P. und Rumberger A.** 2004. Rapid changes in the rhizosphere bacterial community structure during re-colonization of sterilized soil. *Biol. Fert. Soils.* 40:1-6.
- Massana R., Murray, A.E., Preston C.M. and DeLong E.F.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1), 50-56.

- McDougald D. und Kjelleberg S.** 1999. New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia*. 54:617-623.
- Morris S.A., Radajewski S., Willison T.W. und Murell J.C.** 2002. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1446-1453.
- Nüsslein B., Chin K.-J., Eckert W. und Conrad R.** 2001. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* 3:460-470.
- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L. und Schleper C.** 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR *Environ. Microbiol.* 5:787-797.
- Olsen G.J.** 1994. *Archaea, Archaea, everywhere.* *Microbiol. Ecol.* 371:657-658.
- Olsen G.J. und Woese C.R.** 1997. Archaeal genomics. *Cell.* 89:991-994.
- Olsen G.J., Lane D.L., Giovannoni S.J. und Pace N.R.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:337-365.
- Olsen G.J., Lane D.L., Giovannoni S.J. und Pace N.R.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:337-365.
- Oren A.** 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359: 623-638.
- Orphan V.J., Hinrichs K.-U., Ussler III W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M. und DeLong E.F.** 2001. Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1922-1934.

- Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J. und Olsen G.J.** 1985. Analyzing natural microbial population by rRNA sequences. *Asm News*. 51:4-12.
- Pennanen T.** 2001. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH – a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog[®] and ³H-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma*. 100:91-126.
- Pesaro M., Widmer F., Nicollier G. und Zeyer J.** 2003. Effect of freez-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidation degradation. *Soil Biol. Biochem.* 35:1049-1061.
- Pesaro M. und Widmer F.** 2002. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 89-98.
- Peters V. und R. Conrad.** 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biol. & Biochem.* 28:371-382.
- Plugge C.M., Balk M., Zoetendal E.G. und Stams A.J.M.** 2002. *Gelria glutamica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligately syntrophic, glutamate-degrading anaerobe. *IJSB* 52, 401-407.
- Radajewski S., Ineson P., Parekh N.R., und Murell J.C.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*. 403:646-649.
- Radajewski S., McDonald I.R. und Murrell J.C.** 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion In Biotechnology*. 14:296-302.
- Raeymaeckers L.** 2000. Basic Principles of Quantitativ PCR. *Molecular Biotechnology*. 15:115-122.

Ramakrishnan B., Lueders T., Conrad R. und Friedrich M. 2000. Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32:261-270.

Rappe M.S. und Giovannoni S.J. 2003. The Uncultured Microbial Majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.

Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E. und Stahl D.A. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240.

Ricke P., Kolb S. und Braker G. accepted. Application of a newly developed ARB-integrated in silico T-RFLP tool reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiaconon K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C. et al. 2000. Cloning the soil metagenom: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2541-2547.

Rothschild L.J. und Mancinelli R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature.* 409:1092-1101.

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. 1977. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5467.

Santegoeds C. M., Ferdelman T. G., Muyzer G., De Beer D. 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3731-3739.

Santegoeds C.M., Nold S.C. und Ward D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3922-3928.

Schefer / Schachtschabel. 1989. Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. 12., neu bearbeitete Auflage.

Schlegel H.G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York.

Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.-P. and W. Zilling. 1995. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a Novel Aerobic, Heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family Comprising Archaea Capable of Growth around pH 0. J. Bacteriol. 177(24): 7050-7059.

Schlichting E. und H.-P. Blume. 1966. Bodenkundliches Praktikum. Verlag Paul Parey, Hamburg.

Schnell S. und King G.M. 1994. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. Appl. Environ. Microbiol. 60:3514-3521.

Scholten J.C.M., Conrad R. und Stams A.J.M.. 2000. Effect of 2-bromo-ethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 32:35-42.

Schönheit P., Moll J. und Thauer R.K. 1980. Growth parameters (K_s , μ_{max} , Y_S) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Arch. Microbiol. 127:59-65.

Schut F., Devries E.J., Gottschal. J.C. Robertson B.R., Harder W., Prins R.A. und Button D.K. 1993. Isolation of Typical Marine Bacteria by Dilution Culture: Growth, Maintenance, and Characteristics of Isolates under Laboratory Conditions. Appl. Environ. Microb. 59: 2150-2160.

Segerer A., Langworthy T.A. und K.O. Stetter. 1988. *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfataro Fields. System. Appl. Microbiol. 10: 161-171.

- Sexstone A.J., Revsbech N.P., Parkin T.B. und Tiedje J.M.** 1985. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49:645-651.
- Shen Y. Ström L., Jönsson J.A., Tyler G.** 1996. Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L.) cambisol determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. *Soil Biol. Biochem.* 28:1163-1169.
- Simon H.M., Dodsworth J.A. und R.M. Goodman.** 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ. Microbiol.* 2:495-505.
- Sizova M.V., Panikov N.S., Tourova T.P. und P.W. Flanagan.** 2003. Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from a *Sphagnum* peat bog. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 301-315.
- Sliwinski M.K. and Goodman R.M.** 2004. Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR-single-stranded conformation polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1811-1820.
- Slobodkin, A., Reysenbach, A.-L., Struntz, N., Dreier M und Wiegel J.** 1997. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a Thermophilic Anaerobic Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacterium from a Continental Hot Spring. *IJSB.* 47, 541-547.
- Smith K.A. und Arah J.R.M.** 1986. Anaerobic micro-environment in soil and the occurrence of anaerobic bacteria. In: *Microbial communities in Soil.* Jensen V., Kjölller A. und Sorensen L.H. (eds). Elsevier, London. 247-261.
- Smith P.F., Langworthy T.A. und Smith M.R.** 1975. Polypeptidic nature of growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*. *J. Bacteriol.* **124**: 884-892.
- Sprott G.D. und Beveridge T.J.** 1993. Microscopy. In: *Methanogenesis.* Ferry J.G. (eds). New York and London: Chapman and Hall. 81-127.

- Stahl D.A. und Amann R.** 1991. Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt E. und Goodfellow M. (eds). New York: Wiley, 205-248.
- Staley J.T. und Konopka A.** 1985. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 321-346.
- Stams A.J.M., Van Dijk J.B., Dijkema C. und Plugge C.** 1993. Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1114-1119.
- Stein L.Y., Jones G., Alexander B., Elmund K., Wright-Jones C. und Nealson K.H.** 2002. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:431-440.
- Stockey L.L.** 1970. Ferrozine – A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42:779-781.
- Strimmer K. und A. von Haeseler.** 1996. Quartet Maximum-Likelyhood Method for reconstructing Tree Topologies. *Mol. Boil. Evol.* 13(7):964-969.
- Stubner S.** 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection. *Journal of Microbiological Methods.* 50:155-164.
- Suzuki M.T., Taylor L.T. und DeLong E.F.** 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4605-4614.
- Takai K. Moser D.P. DeFlaun M. Onstott T.C. und Fredrickson J.K.** 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5750-5760.

Thauer R.K. 1989. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Majory Stephenson. *Microbiol.* 144:2377-2406.

Tiedje J.M., Sexstone A.J., Parkin T.B., Revsbech N.P. und Shelton D.R. 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant and Soil.* 76:197-212.

Toffin L., Webster G., Weightman A.J., Fry J.C. und Prieur D. 2004. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:357-367.

Torsvik V., Salte K., Sorheim R. und Goksoyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNS heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 56:776-781.

Tschech A. und N. Pfennig. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 137:163-167.

Ueda T., Suga Y. und Matsuguchi T. 1995. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Eur. J. Soil Sci.* 46:415-421.

Van der Lee G.E.M., de Winder B., Bouten W. und Tieteman A. 1999. Anoxic microsites in douglas fir litter. *Soil Biol. Biochem.* 31:1295-1301.

Vetriani C., Reysenbach A.L. und Dore J. 1998. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* 161: 83-88.

Wagner C., Griebhammer A. and Drake H.L. 1996. Acetogenic capacities and the anaerobic turnover of carbon in a Kansas prairie soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:494-500.

Watanabe K., Kodama Y., Hamamura N. and Kaku N. 2002. Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the

bottom of an underground crude oil storage cavity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3899-3907.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. und Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:679-703.

Widdel F. und F. Bak. 1992. Gram-negative mesophile sulfat-reducing bacteria. In: *The Prokaryotes*. (Hrsg. Balows A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer), Springer Verlag, New York, Berlin: 3352-3378.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

Woese C.R., Kandler O. und Wheelis M.L. 1990. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.

Woese, C.R., O. Kandler und M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *PNAS* 87:4576-4579.

Wolin E.A., Wolin M.J. und Wolfe R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238:2882-2886.

Ye D., Quensen III J.F., Tiedje J.M. und Boyd S.A. 1999. 2-Bromoethanesulfonate, Sulfate, Molybdate, and Ethanesulfonate Inhibit Anaerobic Dechlorination of Polychlorobiphenyls by Pasteurized Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:327-329.

Zellner G., und Winter J. 1987. Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:323-328.

Lebenslauf

Dana Kemnitz
Adresse: Marburger Ring 34B, 35274 Kirchhain – Großseelheim
Geburtsdatum: 12.01.1978
Geburtsort: Leisnig
Familienstand: ledig

Schulbildung

1986 – 1992 Arthur-Becker-Realschule Polkenberg
1992 – 1996 Martin-Luther-Gymnasium Hartha

Studium

WS 1996 / 1997 Grundstudium Biologie (Diplom), Friedrich- Schiller-Universität
Jena
SS 1998 Vordiplom
WS 1998 / 1999 Hauptstudium Biologie (Diplom), Philipps-Universität Marburg
WS 2000 / 2001 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie, Marburg, unter der Anleitung von Prof. Dr. R.
Conrad, Thema: „Struktur methanogener *Archaea* in den
Flutungsgebieten des Flusses Waal (Niederlande)“
August 2001 Diplom

Dissertation

2001-2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut
für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter der Anleitung von
Prof. Dr. R. Conrad

Publikationsliste

Kemnitz D., Chin K.-J., Bodelier P. and Conrad R. 2004. Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. *Environ. Microbiol.* 6:449-461.

Hoffmann T., Horz H.-P., Kemnitz D. and Conrad R. 2002. Diversity of the Particulate Methane Monoxygenase Gene in Methanotrophic Samples from Different Rice Filed Soils in China and the Philippines. *System. Appl. Microbiol.* 25:267-274.

Kemnitz D., Kolb S. and Conrad R. 2004. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative PCR to an enrichment culture. *Environ. Microbiol.* in press.

Krüger M., Frenzel P., Kemnitz D. and Conrad R. 2004. Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flodded Italien rice field. *FEMS Microbiol. Ecol.* in press.

Erkel C., Kemnitz D., Kube M., Ricke P., Chin K.-J., Dedysh S., Reinhardt R., Conrad R. and Liesack W. Retrieval of first genom data for rice cluster I methanogens by a combined approach of cultivation and molecular ecology techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* in revision.

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

Kemnitz D., Bodelier P. L.E and Chin K.-J. Structure of methanogenic *Archaea* on the floodplain of the River Waal (Netherlands). Jahrestagung der VAAM. März 2002. Göttingen (Poster).

Kemnitz D. and Conrad R. Enrichment of a novel *Archaeon* belonging to Rice Cluster III. Jahrestagung der VAAM. März 2003. Berlin (Poster).

Kemnitz D., Kolb S. and Conrad R. High abundance of *Crenarchaeota* Group 1.1b in an oxic forest soil. Jahrestagung der VAAM. März 2004. Braunschweig (Poster).

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit, sowie für die gewährten Freiräume.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. R. Thauer für die Begutachtung der Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. M. Bölker möchte ich mich für die Bereitstellung als Prüfer (-in) meiner Disputation bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft danken. Ein besonderer Dank gilt dabei Gesche Braker, welche mir nicht nur wissenschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Steffen Kolb möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen danken. Bei Kuk-Jeong Chin bedanke ich mich für die Bereitstellung der MRE50-Kultur und bei Christoph Erkel für die gute Zusammenarbeit. Andrea Graff, Melanie Klose und Holger Penning danke ich für die Hilfsbereitschaft, besonders auf den letzten Metern. Vielen Dank auch an Claudia Knief und Sonja Fleissner für die netten Diskussionen jeglicher Art.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Jan bedanken, welcher alle Höhen und Tiefen life miterleben durfte, und bei meinen Eltern, die sicher einen Anteil darin haben, dass diese Arbeit je geschrieben wurde.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Charakterisierung unkultivierter *Archaea* aus Böden“

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

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

Marburg, den 15.10.2004