
Methanogene Lebensgemeinschaften unter Stressbedingungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

aus dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Katrin Aschenbach

aus Leinefelde

Marburg/Lahn 2016

Die Untersuchungen der folgenden Arbeit wurden von November 2012 bis Oktober 2016 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:
8.12.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Dr. Werner Liesack

Tag der Disputation: 16.12.2016

Teile der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgenden Manuskripten zusammengefasst und nach abschließender Bearbeitung zur Veröffentlichung vorgesehen:

Aschenbach K, Klose M, Angel R, Conrad R. Adaptations of methanogens to different rewetted anoxic rice field soil: Effects of different moisture gradients on determination of activity, carbon isotope fractionation, abundance and community composition of methanogens. *(In Bearbeitung)*

Aschenbach K, Conrad R. Effects of agitation on mesophilic methanogenesis from three different ecosystems – rice field soil, river sediments and sewage sludge – in lab scale experiments. *(In Bearbeitung)*

„Die Arbeit läuft nicht davon, wenn Du Deinem Kind den Regenbogen zeigst.

Aber der Regenbogen wartet nicht, bis Du mit der Arbeit fertig bist.“

-Chinesisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	6
EINLEITUNG	8
1.1 METHANOGENESE, METHANPRODUZIERENDE MIKROORGANISMEN UND DIE ANALYSEMÖGLICHKEITEN VON MIKROBIELLEN GEMEINSCHAFTEN	8
1.1.1 METHAN, METHANOGENE ABBAUWEGE UND METHANOGENE ARCHAEN	8
1.1.2 METHANOGENE ARCHAEN UND IHR MARKERGEN FÜR PHYLOGENETISCHE STUDIEN	9
1.1.3 ANALYSEMÖGLICHKEITEN BEI MIKROBIELLEN GEMEINSCHAFTEN	12
1.2 ZELLULÄRE STRESSANTWORT UND GENERELLE STRESSFAKTOREN IN DER UMWELT	13
1.2.1 TROCKENSTRESS UND SALZSTRESS	14
1.2.2 METHANOGENESE BEI VERSCHIEDENEN FEUCHTIGKEITSSTUFEN	15
1.2.3 BIOTURBATION UND AUFLOCKERUNG AN GRENZSCHICHTEN	16
1.3 ANPASSUNG VERSCHIEDENER UMWELTSYSTEME AN STRESSSITUATIONEN: FLUSSSEDIMENTE, FAULSCHLAMM UND REISFELDER ALS MODELLSYSTEME	17
1.3.1 FLUSSSEDIMENTE	17
1.3.2 FAULSCHLAMM (DURCH AUSFAULEN STABILISierter KLÄRSCHLAMM)	18
1.3.3 REISFELDER	20
1.3.4 ALTERNATIVER REISANBAU MIT MÖGLICHKEITEN ZUM AUSTROCKNEN DER OBEREN ERDSCHICHT	21
1.4 ZIEL DER ARBEIT	22
MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 CHEMIKALIEN UND GASE	24
2.2 VERWENDETE UMWELTPROBEN	24
2.2.1 ITALIENISCHER REISFELDBODEN	24
2.2.2 PHILIPPINISCHER REISFELDBODEN	24
2.2.3 GIEßENER FAULSCHLAMM	25
2.2.4 MARBURGER FLUSSSEDIMENT DER LAHN	25
2.3 CHEMISCHE ANALYSEN	25
2.3.1 BESTIMMUNG VON PH-WERT UND C/H/N-GEHALT IN DEN BODENPROBEN	25
2.3.2 BESTIMMUNG DER BODENDICHTE, BODENPARTIKELDICHTE UND BERECHNUNG DER POROSITÄT	26

2.3.3	GRAVIMETRISCHE FEUCHTIGKEITSBESTIMMUNG, TROCKENGEWICHTSBESTIMMUNG UND MAXIMALE WASSERHALTEKAPAZITÄT	26
2.3.4	INKUBATIONSKONDITIONEN	27
2.3.4.1	Inkubationsexperiment mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten	27
2.3.4.2	Inkubationsexperiment des bewegten Systems	28
2.3.5	BESTIMMUNG DER CH ₄ - UND CO ₂ -KONZENTRATION	29
2.3.6	BESTIMMUNG DER ISOTOPENSIGNATUR IM KOHLENSTOFF VON CH ₄ UND CO ₂	30
2.3.7	QUANTIFIKATION VON ORGANISCHEN FETTSÄUREN UND DEREN ISOTOPENSIGNATUR MITTELS HPLC-MESSUNGEN	31
2.4	MOLEKULARE ANALYSEN	32
2.4.1	GESAMT-NUKLEINSÄUREEXTRAKTION	32
2.4.2	CDNA SYNTHESE	33
2.4.3	AMPLIFIKATION VON MARKERGENEN DURCH POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR) UND QUANTITATIVE PCR	33
2.4.4	TERMINALER-RESTRIKTIONS-FRAGMENT-LÄNGEN-POLYMORPHISMUS DES ARCHAEELLEN 16S-rRNA-GENS	40
2.4.5	BEARBEITUNG DER ILLUMINA-SEQUENZIERUNG DER TRANSKRIPTE DES <i>mcrA</i> -GENS DES PHILIPPINISCHEN UND ITALIENISCHEN REISFELDBODENS	43
2.5	BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	43
2.5.1	QUALITÄTSFILTERUNG UND AUSWERTUNG DER ROHDATEN MIT UCLUST	43
2.5.2	PHYLOGENETISCHE ZUORDNUNG MITHILFE DER SOFTWARE ARB	44
2.5.3	BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG MIT DEM STATISTIKPROGRAMM RSTUDIO	44
ERGEBNISSE		46
3.1	VERÄNDERUNG IN DER AKTIVITÄT DER METHANOGENEN GEMEINSCHAFT WÄHREND EINES INKUBATIONSEXPERIMENTS BEI VERSCHIEDENEN WASSERVERFÜGBARKEITEN	46
3.1.1	BETRACHTUNG DER VERSCHIEDENEN BODENPARAMETER	46
3.1.2	EINFLUSS DES WASSERGEHALTS IM INKUBATIONSEXPERIMENT AUF DIE METHANPRODUKTION IM ITALIENISCHEN REISFELDBODEN	48
3.1.3	EINFLUSS DES WASSERGEHALTES IM INKUBATIONSEXPERIMENT AUF DIE METHANPRODUKTION IM PHILIPPINISCHEN REISFELDBODEN	50
3.2	EINFLUSS DER WASSERVERFÜGBARKEIT AUF DIE VERTEILUNG DER METHANEMISSION ÜBER DEN ACETIKLASTISCHEN UND HYDROGENOTROPEN PRODUKTIONSWEG	53
3.2.1	STABILE KOHLENSTOFFISOTOPENFRAKTIONIERUNG	53
3.2.2	EINFLUSS AUF INTERMEDIÄRE FERMENTATIONSPRODUKTE	58

3.3 VERÄNDERUNG DER METHANOGENEN GEMEINSCHAFT AM ENDE EINES INKUBATIONSEXPERIMENTS MIT VERSCHIEDENEN FEUCHTIGKEITS-GEHALTEN	61
3.3.1 QUANTIFIZIERUNG DER PHYLOGENETISCHEN GRUPPEN UND DER AKTIVITÄT DER METHANOGENEN	61
3.3.2 UNTERSUCHUNG DER MIKROBIELLEN DIVERSITÄT DER ARCHAEEN MITTELS T-RFLP-METHODE	62
3.3.3 VERÄNDERUNGEN DER TRANSKRIPTE DES <i>mcrA</i> -GENS DES PHILIPPINISCHEN UND ITALIENISCHEN REISFELDBODENS – ILLUMINA-SEQUENZIERUNG	65
3.4 EINFLUSS VON BODEN AUFLOCKERNDEN BEWEGUNGEN IM INKUBATIONSEXPERIMENT (TECHNISCHER ANSATZ)	76
3.4.1 ALLGEMEINE BODENPARAMETER IN DREI UMWELTSYSTEMEN	76
3.4.2 PH-WERT-ÄNDERUNGEN DER DREI INKUBATIONSSYSTEME DURCH UNTERSCHIEDLICHE BEWEGUNG	77
3.4.3 EINFLUSS DER BEWEGUNG AUF DIE METHANPRODUKTION BEI DEN INKUBATIONSPROBEN DES FAULSCHLAMMS	77
3.4.4 EINFLUSS DER BEWEGUNG AUF DIE METHANPRODUKTION BEI DEN INKUBATIONSPROBEN DES REISFELDBODENS	79
3.4.5 EINFLUSS DER BEWEGUNG AUF DIE METHANPRODUKTION BEI DEN INKUBATIONSPROBEN DES FLUSSSEDIMENTS	81
3.4.6 MIKROBIELLE DIVERSITÄT DES ARCHAEELLEN 16S-RRNA-GENS	83
DISKUSSION	86
4.1 EINFLUSS VERSCHIEDENER WASSERVERFÜGBARKEITEN IM INKUBATIONSEXPERIMENT	86
4.1.1 METHANOGENES POTENTIAL	87
4.1.2 ISOTOPENSIGNATUR DES KOHLENSTOFFS	92
4.1.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	95
4.2 EINFLUSS VON BODEN AUFLOCKERNDEN BEWEGUNGEN IM INKUBATIONSEXPERIMENT (TECHNISCHER ANSATZ)	103
4.2.1 UMWELTSYSTEME IM VERGLEICH (BODENPARAMETER, PH-WERT, FETTSÄUREN, METHANPRODUKTION, ISOTOPIE, DIVERSITÄT)	104
4.2.2 VERGLEICH EINES BEWEGTEN SYSTEMS MIT EINEM STATISCHEN SYSTEM	105
4.3 GENERELLE BETRACHTUNGEN	107
4.4 AUSBLICK UND OFFENE FRAGESTELLUNGEN, GEPLANTE EXPERIMENTE	107
LITERATURANGABEN	109
ERGÄNZENDE INFORMATIONEN	127
ANHANG	I
LEBENS LAUF	I
PUBLIKATIONS LISTE	II

Abkürzungsverzeichnis

ΔG	Änderung der Gibbs freien Energie unter experimentellen Bedingungen
16S	Gen für die kleine Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen
ANOVA	Varianzanalyse („analysis of variance“)
AWD	Alternate Wetting and Drying
bp	Basenpaare
CCA	Korrespondenzanalyse („canonical correspondence analysis“)
CH₃F	Methylfluorid
C_{org}	organische Kohlenstoff im Boden
C_{tot}	Gesamtkohlenstoff
DGGE	Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese
FAM	Carboxyfluorescein
FISH	Fluoreszenz- <i>In-situ</i> -Hybridisierung
f_{ma}	relativer Anteil der acetiklastischen Methanogenese an der Methanbildung
f_{mc}	Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese an der Methanbildung
GC	Gas-Chromatograph
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatograph („High performance liquid chromatograph“)
IRMS	Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer („combustion isotope ratio mass spectrometry“)
max.	maximale
<i>mcrA</i>	Gen für die α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase
<i>mrtA</i>	zweites Isoenzym des MCR-Komplexes, codiert für die α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase
n	Anzahl der Proben
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N_{tot}	Gesamtstickstoff

OTU	Definition einer molekular abgeleiteten Art-Analoga aufgrund der Ähnlichkeit von Nukleotidsequenzen („operational taxonomic unit“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
ppbv	Anzahl Teile pro Milliarde (parts per billion)
ppmv	Einheit für Volumenmischungsverhältnis („parts per million by volume“)
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
RPD	Übergang von oxidischen Bedingungen im Sediment zu anoxischen und der Wechsel des Redoxpotentials von positiven zu negative Werten. („redox potential discontinuity zone“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SE	Standardfehler
TIC	gesamter anorganischer Kohlenstoff (total inorganic carbon)
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
WHC*	enthaltene Wassermenge bezogen auf die maximale Wasserhaltefähigkeit des Bodens
α	Isotopen-Fraktionierungsfaktoren
δ¹³C	stabiles Kohlenstoff-Isotopenverhältnis relativ zum internationalen Standard

Zusammenfassung

Methan spielt in anoxischen Habitaten eine wichtige Rolle als finales Endprodukt beim anaeroben Abbau von organischem Material. Ein Beispiel für anoxische Habitats sind geflutete Lebensräume, wie Reisfeldböden. In diesen Böden entsteht Methan durch die im Boden lebenden methanogenen Mikroorganismen und wird primär aus Acetat oder Kohlenstoffdioxid in Verbindung mit Wasserstoff gebildet. Die Anpassungen der Diversität und der Aktivität der methanogenen Gemeinschaft an verschiedene Wassergehalte im Boden, besonders nach einer Austrocknung, wurden bisher nicht ausreichend untersucht. Mit der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von verschiedenen Wassergehalten bei zwei verschiedenen Reisfeldböden (philippinischer und italienischer Herkunft) mittels klassischer Analysen (GC; HPLC; GC-IRMS) sowie molekularbiologischen Methoden (qPCR, T-RFLP des archaeellen 16S-rRNA-Gen und Sequenzierung der *mcrA*-Transkripte) analysiert.

Die Methanogenese korrelierte dabei positiv mit der Höhe des Wassergehalts. Für eine nachweisbare Methanproduktion wurde eine Wasserverfügbarkeit von mindestens 40 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit des Bodens benötigt, während die Kohlenstoffdioxidemission bereits bei 17 % anstieg. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung von Kohlenstoffdioxid aus verschiedenen Fermentationen bei sehr niedriger Bodenfeuchtigkeiten möglich ist und die Bildung von Methan höhere Bodenfeuchtigkeiten benötigt.

Die Daten der stabilen Kohlenstoffisotopenfraktionierung weisen darauf hin, dass hydrogenotrophe Methanogenese bei allen Feuchtigkeitsstufen zu Beginn der Inkubationen dominierte, allerdings ist diese bei niedrigen Wasserverfügbarkeiten stark beeinträchtigt. Die initiale Methanproduktion wechselte bei einer geringeren Wiederbefeuchtung schneller von hydrogenotroph zu acetiklastisch als bei völlig gefluteten Inkubationsproben. Die Veränderung des Wassergehalts zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Populationsdynamik der methanogenen Lebensgemeinschaft. Die Anpassung an die unterschiedlichen Feuchtigkeitsstufen erfolgte durch Aktivitätsänderungen bestimmter methanogener Archaeen in der Gemeinschaft. Durch die Sequenzierung der *mcrA*-Transkripte konnten einzelne Familien der Methanogenen dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass *Methanosarcinaceae* bei niedrigen Wasserverfügbarkeiten stärker aktiv waren als bei völliger Flutung des Bodens. Generell stieg die Anzahl der *mcrA*-Transkripte und somit die methanogene Aktivität bereits durch eine leichte Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts an. Im philippinischen Reisfeldboden verdoppelten sich die Kopienzahlen und im italienischen Reisfeldboden stiegen die *mcrA*-Transkripte um das 100-fache im Boden mit bereits niedrigen Wasserverfügbarkeiten an. In feuchteren Inkubationsproben wurden maximale *mcrA*-Transkriptmengen von 10^8 bis 10^9 pro Gramm Boden nachgewiesen. Die *mcrA*-Transkriptmengen im philippinischen Boden waren stets etwas niedriger als

die im italienischen Reisfeldboden, obwohl die Methanproduktionsraten im philippinischen Boden etwa doppelt so hoch waren wie im italienischen Reisfeldboden. Grundsätzlich war die Diversität im Boden auf DNA-Ebene jedoch unempfindlich auf Austrocknung und Wiederbefeuchtung. Mit den Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass der anaerobe Abbau von organischem Material in Reisfeldböden keine vollständige Flutung benötigt. Allerdings verändert sich die Aktivität der methanogenen Gemeinschaft unter verschiedenen Feuchtigkeitsbedingungen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von einem bewegten System (gerollt, geschüttelt oder magnetisch gerührt) im Vergleich zu einem statischen System auf die Methanproduktion analysiert. In den drei untersuchten Umweltsystemen (Faulschlamm, Flusssediment, Reisfeldboden) war der Unterschied in den bewegten Systemen wenig markant im Vergleich zum statischen System. In einigen Fällen war die Methanproduktion in den bewegten Systemen vermindert oder erreichte eine ähnliche Größenordnung wie im statischen System. Die Ergebnisse belegen, dass die Methanogenen wenig in ihrer Aktivität beeinflusst wurden und die gewählte Bewegungsintensität nicht ausreichte, um die syntrophe Beziehung der Methanogenen zu schädigen. Dennoch konnte im statischen System der Reisfeldbodeninkubationen die höchste Diversität beobachtet werden, was einen Effekt auf die Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft im Reisfeldboden vermuten lässt. Die Ergebnisse waren dahin gehend sehr stark von den gewählten Umweltsystemen abhängig. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Umweltsysteme sollten daher in ihrer positiven oder negativen Wirkung des mechanischen Stresses differenziert betrachtet werden.

Einleitung

1.1 Methanogenese, Methanproduzierende Mikroorganismen und die Analysemöglichkeiten von mikrobiellen Gemeinschaften

1.1.1 Methan, methanogene Abbauwege und methanogene Archaeen

Methan (CH_4) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) zählen zu den wichtigsten Treibhausgasen und sind mit 1,8 ppmv (CH_4) und ~ 400 ppmv (CO_2) Bestandteile der chemischen Zusammensetzung der Erdatmosphäre (Harde 2011; Le Quéré u. a. 2015). Ein Anstieg der Methankonzentration ergibt sich aus der weltweit stets ansteigenden Emission und der dabei aber gleichbleibenden Wiederaufnahme von CH_4 aus der Atmosphäre (Dzyuba u. a. 2012). Die natürliche Emission von CH_4 in die Atmosphäre ist in vielen Fällen an permanent geflutete Lebensräume wie Abwässer, Reisfelder und Sedimente, aber auch an Verdauungstrakte von Wiederkäuern und Termiten gekoppelt (Wang u. a. 2004; Chen und Prinn 2005). Die CH_4 - und CO_2 -Produktion erfolgt bei dem letzten Schritt des anaeroben Abbaus von organischem Material unter sauerstofffreien (anoxischen) Bedingungen. Zwischenprodukte dieses Abbauges wie z. B. Acetat, CO_2 in Verbindung mit H_2 (Wasserstoff), Methanol, Formiat, Methylamine und Dimethylsulfid (DMS) können als Substrate von methanproduzierenden Mikroorganismen für die Bildung von CH_4 genutzt werden (Madigan u. a. 2009).

In vielen Umweltsystemen wird das CH_4 hauptsächlich durch die Reduktion von CO_2 in Verbindung mit H_2 (hydrogenotrophe Methanogenese) oder durch die Spaltung von Acetat (acetiklastische Methanogenese) produziert. Nur ein kleiner Anteil von CH_4 wird durch den Abbau methylierter Verbindungen umgesetzt (Conrad 2005; Blaser und Conrad 2016). Durch die Bildung von CH_4 über die unterschiedlichen Abbauewege können Unterschiede in der Fraktionierung des stabilen Kohlenstoffisotops bestimmt werden. In der Praxis wird die Zusammensetzung des Isotopensignals *Delta* (δ) mit der Einheit Promille (‰) angegeben. Für die hydrogenotrophe Methanogenese sind Werte zwischen -73 und -49 ‰ (Fey u. a. 2004; Conrad u. a. 2010) und für die acetiklastische Methanogenese Werte von -18 bis -27 ‰ benannt (Conrad 2005; Blaser und Conrad 2016). Durch die Nutzung von Methylfluorid, einem selektiven Inhibitor der acetiklastischen Methanogenese, ist es möglich, die Anteile der beiden Hauptbildungswege des Methans auch in Umweltproben näher zu bestimmen (Frenzel und Bosse 1996).

1.1.2 Methanogene Archaeen und ihr Markergen für phylogenetische Studien

Methanogene Spezies nutzen CH₄-Produktion als Hauptbestandteil für ihren Energiestoffwechsel. Diese zeigen dabei unterschiedliche Substratpräferenzen, wie einer Datenbank von kultivierbaren Methanogenen entnommen wurde: 74,5 % nutzen H₂ und CO₂, 33 % Methylverbindungen und 8,5 % Acetat (Jabłoński u. a. 2015).

Methanogene werden den Archaeen zugeordnet (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988; Eme und Doolittle 2015). Sie zählen zum Stamm der Euryarchaeota und werden in sieben taxonomische Ordnungen unterteilt: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* (Madigan u. a. 2009), *Methanocellales* (Sakai u. a. 2008) und *Methanomassiliicoccales* (Lang 2014; Borrel u. a. 2013; Paul u. a. 2012; Dridi u. a. 2012). Die Verwandtschaft der Ordnungen wird durch die Konstruktion von phylogenetischen Bäumen auf Grundlage des archaeellen 16S-rRNA-Gens beschrieben (Großkopf u. a. 1998; Luton u. a. 2002).

Methanogene unterscheiden sich in einer Reihe wichtiger Merkmale von Bakterien (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988; Eme und Doolittle 2015). Sie sind in der Natur weit verbreitet und auch unter extremen Bedingungen zu finden. Sie überleben große Temperaturschwankungen, verschiedene pH-Wert-Bereiche, Trockenheit und hohe Salzkonzentrationen (Brioukhanov und Netrusov 2007; Perreault u. a. 2007; Ma und Lu 2011; Anderson u. a. 2012; Hao u. a. 2012; Wagner u. a. 2013). Es konnte z. B. gezeigt werden, dass Methanogene auch unter trockenen Bedingungen, wie sie in kalten oder heißen Wüsten herrschen, vorkommen (Angel u. a. 2012). Jedoch war deren Vielfalt in kalten Wüsten eher gering (Abbildung 1.1), denn es konnten nur Vertreter der *Methanosarcinaceae* und *Methanocellaceae* gefunden werden und in einigen Fällen auch *Methanobacteriaceae* (Aschenbach u. a. 2013).

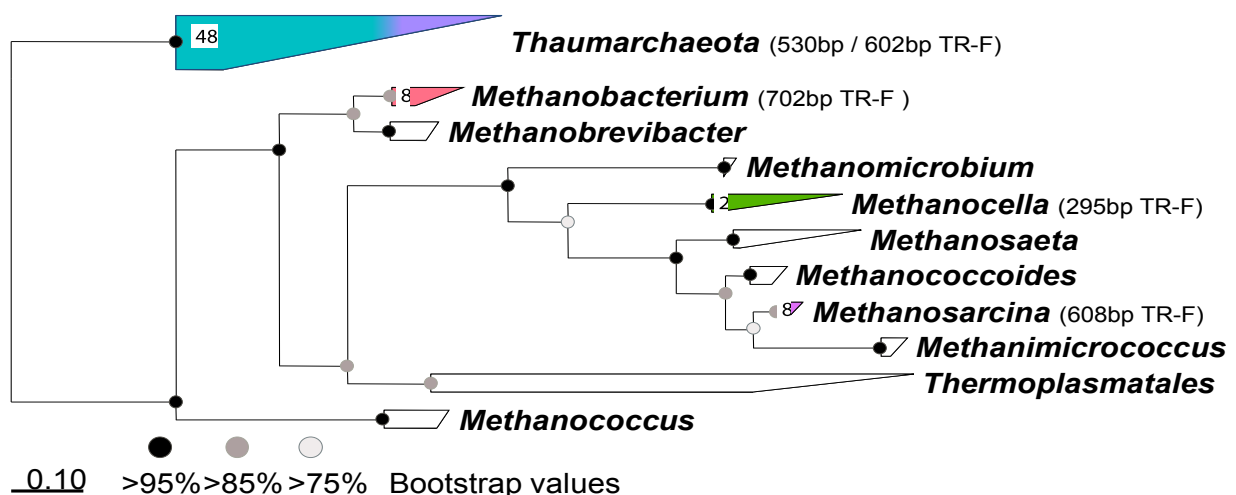


Abbildung 1.1: Phylogenetische Verwandtschaft der Archaeen auf Basis des 16S-rRNA-Gens. Die farbige markierten Gruppen zeigen die Vielfalt der Archaeen, die in trockenen, kalten Wüsten überleben können (Aschenbach u. a. 2013).

Um die Verwandtschaft, die Diversität und die Abundanz der methanogenen Gemeinschaft in Umweltproben genauer zu untersuchen (Conrad 2007; Luton u. a. 2002; Lueders und Friedrich 2000; Chin u. a. 1999), wurde das funktionelle *mcrA*-Gen (Gen für die α -Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase) als phylogenetischer Marker verwendet (Lueders u. a. 2001, Friedrich 2005). Die Methyl-Coenzym-M-Reduktase (McrABG), ein Schlüsselenzym der Methanogenese, wird durch das Operon *mcrBDCGA* codiert (Lueders u. a. 2001). Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der Methanogenese, die Abspaltung des CH_4 vom $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ (Thauer u. a. 2008) und ist einzigartig für alle Methanogene (Lueders u. a. 2001). Der Vorteil ist, dass Methanogene besser mithilfe dieses Markergens detektiert werden können als mittels des 16S-rRNA-Gen, da Methanogene mit eventuell niedrigen relativen Häufigkeiten von größeren Populationen wie Crenarchaeoten und Thermoplasmatales verdeckt werden könnten, wenn nicht ausreichend sequenziert wird. Mit der Etablierung von *mcrA* als Markergen (Lueders u. a. 2001) haben sich immer mehr Forscher dem phylogenetischen Zusammenhang gewidmet (Zhang u. a. 2008; Watanabe u. a. 2009; Hunger u. a. 2011; Zhu u. a. 2011; Biddle u. a. 2012; Paul u. a. 2012; Zeleke u. a. 2013; Wilkins u. a. 2015; Dowell u. a. 2016). Die phylogenetische Verwandtschaft des 16S-rRNA Gens und des *mcrA*-Gens sind sehr übereinstimmend (Luton u. a. 2002; Hallam u. a. 2003; Baptiste u. a. 2005). Ein Vergleich der phylogenetischen Verwandtschaft der Methanogenen auf Basis des Stammbaums des 16S-rRNA Gens gegenüber dem des *mcrA*-Gens ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

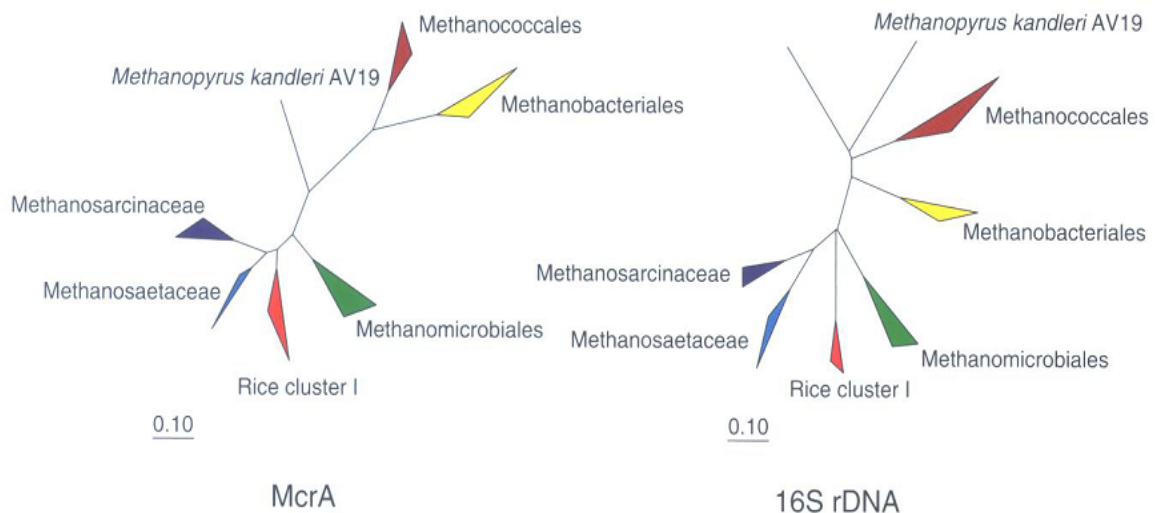


Abbildung 1.2: Vergleich der phylogenetischen Verwandtschaft der Methanogenen auf Basis des *mcrA*-Gens (Alpha-Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase) und des 16S-rRNA-Gens (Conrad 2007).

Gerade bei Fingerprinting Methoden blieben bestimmte Methanogene, die weniger als 1 % der Gemeinschaft ausmachten, oft unentdeckt. In dem Zusammenhang wurden unterschiedliche Primersysteme zur spezifischen Amplifikation des *mcrA*-Gens beschrieben (Springer u. a. 1995; Hales

u. a. 1996; Luton u. a. 2002; Steinberg und Regan 2008). Das ML-Primer-Set kann eine Vielzahl von Methanogenen detektieren: Mitglieder der *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanobacteriales* (*mrtA*- und *mcrA*-Gen), *Methanococcales*, *Methanocellales* (Reis-Cluster I), *Methanomicrobiales* (*Methanoregula*/Fen-Cluster) (Sakai u. a. 2011a) und der unkultivierten Gruppe MCR-2. Steinberg und Regan (2008) optimierten die Primer „ML“. Zwei Isoenzyme vom MCR sind beschrieben: MCR I (*mcrA*) mit dem Operon MCR I *mcrBDCGA* (in allen Methanogenen) und MCR II (*mrtA*) mit dem Operon *mrtBDGA* (nur in *Methanobacteriales* und *Methanococcales*) (Thauer 1998; Lueders u. a. 2001; Luton u. a. 2002). Abhängig von der Wasserstoffverfügbarkeit wird bei hohen Verfügbarkeiten eher *mrtA* exprimiert, und bei niedrigen Wasserstoffverfügbarkeiten wird es durch *mcrA* ersetzt (Pihl u. a. 1994; Nölling u. a. 1995; Reeve u. a. 1997). Ein weiterer Vorteil des *mcrA*-Gens ist, dass es nur mit ein oder zwei Kopien im Genom vorliegt und dass anhand dieser Genkopien präzise bestimmt werden kann, wie viele Methanogene beteiligt sind am anaeroben Abbau. Beim 16S-rRNA Gen hingegen können bis zu vier Kopien oder mehr im Genom vorliegen, was je nach Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft schnell zu hohen Kopienzahlen führen kann (Klappenbach u. a. 2001).

Für die Bestimmung dieser aktiven methanogenen Gemeinschaft werden die *mcrA*-Transkripte benötigt. Nur dadurch kann ein reelles Bild über die Aktivität im anaeroben Abbau gegeben werden (Watanabe u. a. 2009; Ma u. a. 2012; Alvarado u. a. 2014). Ma und Kollegen (2012) konnten zeigen, dass sich die Transkripte mit dem Austrocknungsstress verringerten und unter gefluteten Bedingungen wieder stiegen (Abbildung 1.3).

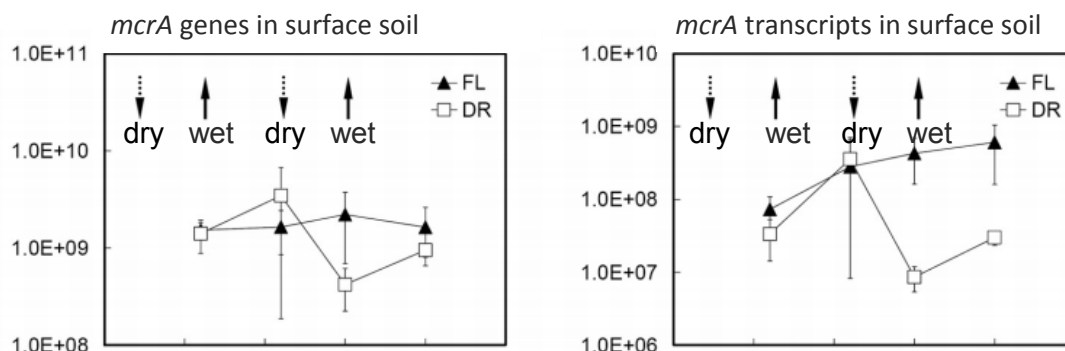


Abbildung 1.3: Bestimmung der *mcrA*-Genkopien (links) und der *mcrA*-Transkriptveränderungen (rechts) in einem wechselnden Zyklus von Austrocknen und Wiederbefeuchten (DR) im Vergleich zur ständig gefluteten Kontrolle (FL) (Ma u. a. 2012).

Des Weiteren sollte auch bedacht werden, dass das Isoenzym *mrtA* zusätzlich mit dem Primer-system erfasst wird (Luton u. a. 2002; Steinberg und Regan 2008) und dass die Aktivität von *mcrA* temperaturabhängig ist (Goenrich u. a. 2005). Luton und Kollegen (2002) konnten das Vorhandensein des Isoenzym *mrtA* nur bei einigen *Methanobacteriales* und *Methanococcales* beschrieben. Eine

zweite Kopie des *mcrA*-Gens konnte bei Vertretern der *Methanomicrobiales* gefunden werden, wie z. B. in den voll sequenzierten Genomen von *Methanolacinia petrolearia* (älterer Name *Methanoplanus petrolearius*) (Brambilla u. a. 2010) und in *Methanoregula formicica* (Yamamoto u. a. 2014). Noch nicht ganz vollendete Genome zeigen aber ein ähnliches Bild einer zweiten Kopie des *mcrA*-Gens in *Methanocorpusculum bavaricum*, *Methanocorpusculum labreanum*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanofollis liminatans* und *Methanolacinia paynteri* (NCBI-Proteinsuche, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.1.3 Analysemöglichkeiten bei mikrobiellen Gemeinschaften

In der mikrobiellen Ökologie sind viele kultivierungsunabhängige Analysemethoden etabliert. Diese sind allerdings oft sehr zeitaufwendig und hinsichtlich ihrer Genauigkeit limitiert. Durch die Sanger-Sequenzierung war es erstmals möglich, die Diversität von unkultivierbaren Mikroorganismen (99 % der Gemeinschaft) zu untersuchen (Cowan u. a. 2005; Vakhlu u. a. 2008). Außerdem konnte mit der Kombination von Fingerprinting-Methoden, wie z. B. dem Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP), und der Sanger-Sequenzierung die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft erstmals in groß angelegten Studien untersucht werden (Chin u. a. 1999; Brune und Friedrich 2000; Henckel u. a. 2001). Als Standard wurde das 16S-rRNA-Gen verwendet, aber um funktionelle Gemeinschaften zu untersuchen, setzten sich auch immer mehr funktionelle Markergene durch, wie das *amoA*-Gen für Ammoniumoxidierer, das *mcrA*-Gen für Methanogene und das *pmoA*-Gen für Methanotrophe (Henckel u. a. 2001; Ma und Lu 2011; Pratscher u. a. 2011; Ke u. a. 2014). Im letzten Jahrzehnt gab es einen enormen Fortschritt hinsichtlich der verwendeten Sequenzierungsmethoden. Dies führte zu einem starken Anstieg von vollständig sequenzierten Organismen und entsprechend viele Entwürfe von kompletten Genomsequenzen sind derzeit verfügbar. Die heutzutage zur Verfügung stehenden Next-Generation-Sequencing-Methoden (NGS-Methoden) sind sehr hochauflösend und liefern viele neue Informationen. Ihre Anwendung zur Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften wurden in verschiedenen Übersichtsartikeln beschrieben (Metzker 2010; Zhou u. a. 2015).

Das Fehlen einer umfassenden Referenzstamm-Datenbank für die Analyse von funktionellen Gemeinschaften erschwert allerdings die Auswertung von funktionellen Markergenen. Die Zuordnung der *mcrA*-Sequenzen zu den verschiedenen Methanogenen erfolgt nicht über einen generellen Klassifizierer, sondern über die phylogenetische Einordnung in einen Referenzstammbaum. Am besten eignen sich für diese Analysen kladistische Verfahren, wie *Maximum-Parsimony*- oder *Maximum-Likelihood*-Ansätze. Sie sind robust und durch eine statistische Theorie gestützt. Dabei werden unterschiedlichen Baumtopologien verglichen und bewertet und zuverlässige Ergebnisse sind auch mit kurzen Sequenzen zu erzielen (Merkl 2015).

1.2 Zelluläre Stressantwort und generelle Stressfaktoren in der Umwelt

Fast alle Umgebungen mit mikrobiellem Leben sind im Laufe der Zeit durch Veränderungen der Umweltbedingungen geprägt. In Abhängigkeit von Amplitude und Dauer können diese Änderungen von Mikroorganismen als Stress registriert werden und eine Stressreaktion auslösen. Mögliche Auslöser dieser Stressreaktion sind z. B. pH-Wert-Änderungen, Sauerstoffentzug oder -zufuhr, mechanischer Stress, verschiedene Metalle oder extreme Schwankungen in der Temperatur (de Macario und Macario 2003).

Die Stressantwort des Organismus kann auf zellulärer Ebene aufgrund der Zunahme bestimmter Proteine, wie z. B. der Hitzeschockproteine, untersucht werden. Diese schützen andere Proteine und Zellverbindungen vor den schädlichen Einflüssen der jeweiligen Stressoren (Garcia und Forterre 2000). Es gibt zwei Überlebensstrategien der Organismen: Einerseits die aktive Erhöhung der Fähigkeiten, direkt mit dem Stress umzugehen, und andererseits die Neutralisierung des Stresses, indem die Schäden repariert werden, die durch den Stress verursacht wurden. An beiden Wegen sind komplexe Regulationsmechanismen beteiligt, welche aktiv kontrolliert werden. Dies erfolgt, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene und auf posttranslationaler Ebene (Matin 2003).

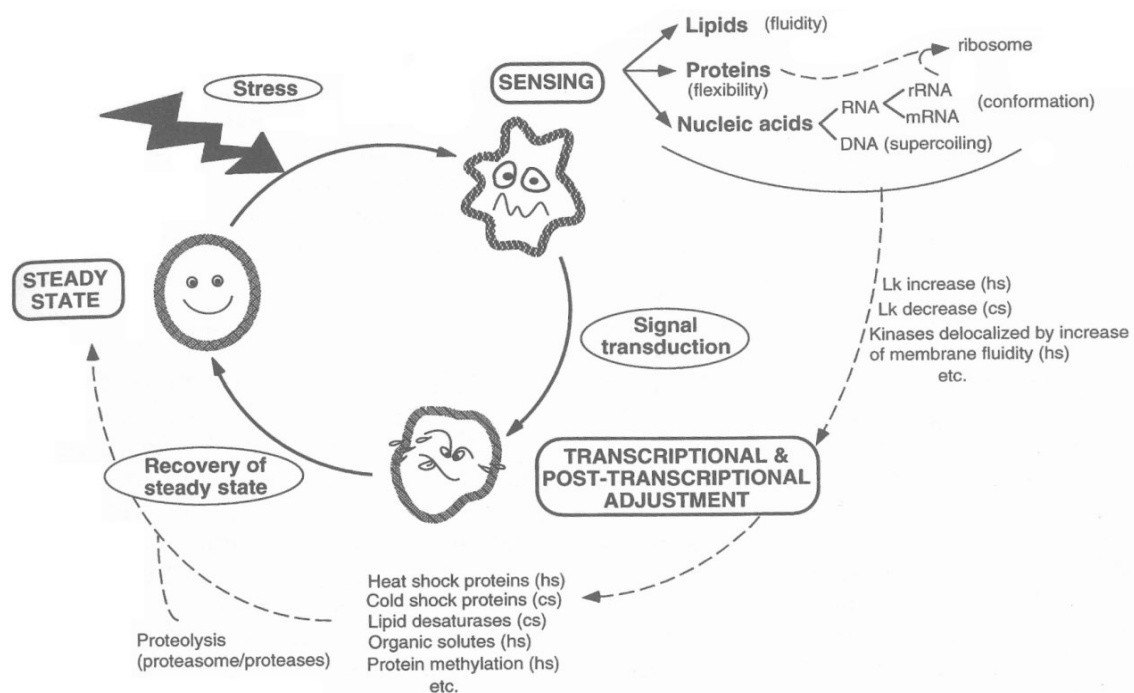


Abbildung 1.4: Genereller Mechanismus der Stressantwort von Mikroorganismen bei thermischem Stress (Lopez Garcia und Forterre 2000).

1.2.1 Trockenstress und Salzstress

Austrocknungsstress kann in drei Phasen unterteilt werden: Während der Trocknung (Phase I) leiden die Mikroorganismen unter osmotischem Stress, Sauerstoffstress und unter der Anwesenheit von toxischen Verbindungen (Vriezen u. a. 2007). Bei niedrigen Wasseraktivitäten (Werte kleiner als 0,53) kommt es zu einer Funktionsstörung der Enzyme und dies führt zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels (Brown 1990; Vriezen u. a. 2007). Sauerstoff und Strahlung verursachen den größten Schaden während der Phase II in der die Trockenheit toleriert wird. In der Wiederbenetzungsphase (Phase III) sind der hypoosmotischen Stress und der Kampf mit reaktiven Sauerstoffspezies die Hauptstressoren (Vriezen u. a. 2007). Mit der Austrocknung kommt auch noch ein weiterer Stressor hinzu, die Salinität.

Die Salinität kann in vier Klassen unterteilt werden: Klasse I mit 6 bis 10 % (\cong 1,0 bis 1,7 M NaCl), Klasse II mit 10 bis 14 % (\cong 1,7 bis 2,4 M NaCl), Klasse III mit 14 bis 30 % (\cong 2,4 bis 5,1 M NaCl) und Klasse IV, die alle Konzentrationen über 30 % abdeckt. Es existieren halotolerante Mikroorganismen, die in der Lage sind, in Abwesenheit von Salz zu wachsen, aber auch Salzkonzentrationen bis zu 2,5 M zu tolerieren, d. h. sie kommen in den ersten drei Klassen vor. Halophile Mikroorganismen dagegen benötigen eine bestimmte Salzkonzentration (ab $50 \text{ g l}^{-1} \cong 0,85 \text{ M NaCl}$), um wachsen zu können. Sie können nicht in Abwesenheit von Salz gedeihen (Oren 2008; Margesin und Schinner 2001; Javor 1989).

Innerhalb der Domäne der Archaeen wurden halophile Vertreter der *Methanosarcinales* und *Halobacteriaceae* beschrieben, in der Familie der *Methanosarcinales* sind es z. B. *Methanohalophilus* und *Methanohalobium spp.* (Oren 2008). Es gibt bislang keine Vertreter unter den Methanogenen, welche oberhalb einer Salzkonzentration von $200 \text{ g l}^{-1} \cong 3,4 \text{ M NaCl}$ auftreten (Oren 2011). Bei niedrigeren Salzkonzentrationen wurden auch halotolerante Methanogene beschrieben wie *Methanobacterium subterraneum* (Kotelnikova u. a. 1998). Abbildung 1.5 zeigt die Grenzen der hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanogenese und anderer Abbauprozesse über die Salzkonzentration.

Durch die Ansammlung von osmotisch schützenden Verbindungen, auch bekannt als kompatible Solute, sind auch methanogene Vertreter in der Lage, sich an verschiedene osmotische Bedingungen anzupassen (Oren 2008). *Methanosarcina thermophila* TM-1 synthetisiert Alpha-Glutamat und N-epsilon-acetyl-beta-Lysin als kompatible Solute oder akkumuliert Glycinbetain und Kaliumionen aus der Umgebung (Proctor u. a. 1997). Auch *Methanohalophilus portucalensis* synthetisiert beim Wachstum bei hohen NaCl-Konzentrationen kompatible Solute, wie Beta-Glutamin, N(sup(epsilon))-acetyl-(beta)-Lysin, und Glycinbetain (Robinson und Roberts 1997).

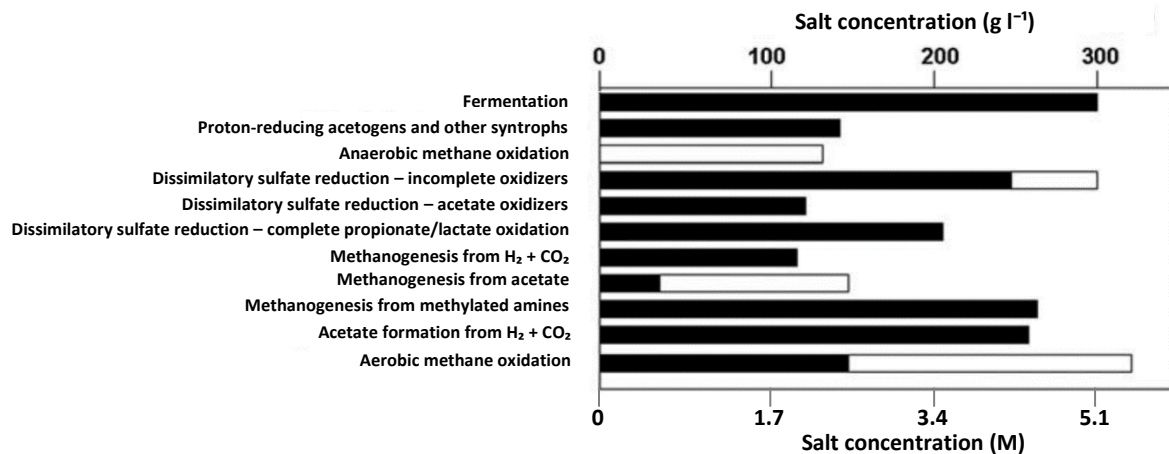


Abbildung 1.5: Limitierung der verschiedenen mikrobiellen Abbauprozesse über die tolerierte Salzkonzentration (modifiziert von Oren 2011)

1.2.2 Methanogenese bei verschiedenen Feuchtigkeitsstufen

Die Methanogenese ist der letzte Schritt im anaeroben Abbau von organischem Material und tritt vorzugsweise unter anoxischen Bedingungen auf. Jüngste Studien haben gezeigt, dass Methanogenese nicht auf dauerhaft geflutete Systeme beschränkt ist, sondern auch in belüfteten und trockenen Wüstenböden auftreten kann, wenn diese unter feuchten, anoxischen Bedingungen inkubiert werden (Angel u. a. 2012; Aschenbach u. a. 2013). In vielen Umgebungen müssen Methanogene die Austrocknung und Wiederbefeuchtung tolerieren, wie z. B. bei saisonalen Schwankungen in einem Reisfeld, da am Ende der Vegetationsperiode das Reisfeld trockenfallen kann. In nur wenigen Studien wurden die Auswirkungen auf die methanogene Gemeinschaft durch gezielte Austrocknung oder Wiederbefeuchtung untersucht. In der Studie von Ma und Kollegen (2012) wurden die Transkripte des *mcrA*-Gens von Methanogenen während eines Trocken-nass-Zyklus untersucht. In einem Inkubationsexperiment mit einem Reisfeldboden, welcher abwechselnd ausgetrocknet und wieder befeuchtet wurde, konnte im Vergleich zu einem kontinuierlich gefluteten System eine signifikante Abnahme der *mcrA*-Genkopien und *mcrA*-Transkripte gezeigt werden.

Eine andere Möglichkeit um Feuchtigkeitsstufen zu generieren ist, die Feuchtigkeit zu reduzieren oder den trockenen Boden wieder zu benetzen. Jäckel und Kollegen (2001) versuchten die Bodenfeuchtigkeit so zu reduzieren, dass aus der CH₄-Produktion ein CH₄-Verbrauch wurde. Aber bei niedrigeren Wasserhaltekapazität des Bodens stellte sich heraus, dass die CH₄-Oxidation sehr austrocknungsempfindlich war, was abhängig von den Ausgangspopulationen zu sein schien. Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, dass methanogene Archaeen relativ resistent gegenüber Austrocknung und Sauerstoffexposition sind (Fetzer u. a. 1993; Joulain u. a. 1996; Ueki u. a. 1997; Jäckel u. a. 2001).

In Bezug auf Sauerstoffstress konnte gezeigt werden, dass nach Sauerstoffbelastung die methanogene Aktivität, gemessen an der *mcrA*-Transkriptmenge, um eine Größenordnung abnahm (Yuan u. a. 2011). Allerdings waren zu Beginn der Sauerstoffbelastung die Transkripte von *Methanocellales* relativ gesehen am häufigsten aller gemessenen methanogenen Transkripte, was auf eine Widerstandsfähigkeit von hydrogenotrophen Methanogenen hinweisen könnte. Während einer länger andauernden Belastung erhöhte sich die Häufigkeit der *mcrA*-Transkripte von acetiklastischen Methanogenen (Yuan u. a. 2011).

1.2.3 Bioturbation und Auflockerung an Grenzschichten

Ungestörte Sedimente können in drei Zonen unterteilt werden: die oxidierte, sauerstoffreiche Zone, die Grenzschicht (redox potential discontinuity zone, RPD-Zone) und die anoxische Zone (Abbildung 1.6). In der oxidierten und der RPD-Zone wird Sauerstoff durch heterotrophe Mikroorganismen, wie bspw. CH₄-oxidierende Bakterien, verbraucht. Dies führt zur Bildung einer anoxischen Zone in tieferen Schichten oder zu anoxischen Mikrohabitaten (Kuivila u. a. 1988; Frenzel u. a. 1990). Dieses Gleichgewicht kann durch anthropogene Aktivitäten, wie durch das Pflügen des Bodens oder im traditionellen Reisanbau das Paddeln oder durch die Aktivitäten von Tieren, wie z. B. von kleinen Wirbellosen in den Küstengewässern, gestört werden (Kogure und Wada 2005). In terrestrischen Böden kann diese Störung der oxisch-anoxischen Grenzschicht z. B. durch Regenwürmer hervorgerufen werden. Wie sich diese Störung durch Regenwürmer auf die Methanbildung auswirkt, wurde in einem Inkubationsexperiment mit Mikrokosmen untersucht (Koubová u. a. 2012). So konnten durch Regenwürmer die CH₄-Produktionsrate erhöht werden und die Abundanz der Methanogene wurde so nicht beeinflusst. Durch die Zugabe von Regenwürmern konnte vielmehr eine Änderung der methanogenen Gemeinschaft beobachtet werden. Die Genkopienzahl des 16S-rRNA-Gens von *Methanosarcina* sank um das Zweifache und mit längerer Inkubation sogar um das Dreifache (Koubová u. a. 2012).

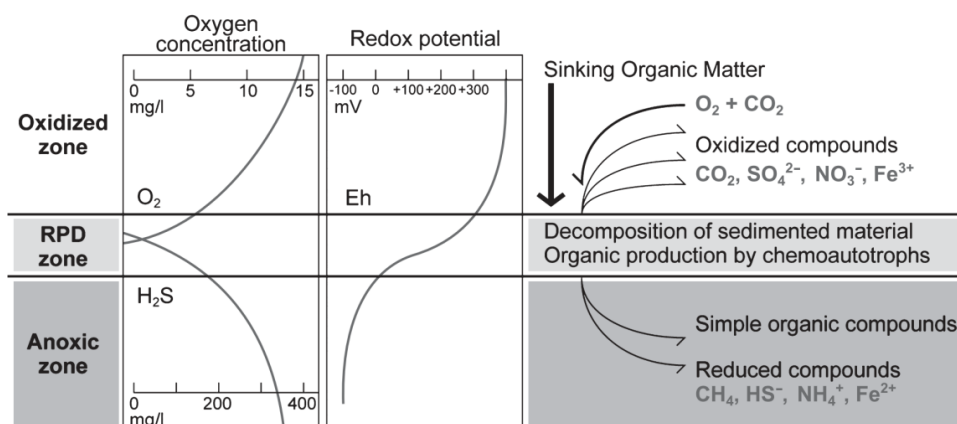


Abbildung 1.6: Charakterisierung der physikalisch-chemischen Parameter in einem Sediment (Frenzel u. a. 1990).

1.3 Anpassung verschiedener Umweltsysteme an Stresssituationen: Flusssedimente, Faulschlamm und Reisfelder als Modellsysteme

Stress beeinflusst nicht nur den Stoffwechsel von einzelnen Organismen, sondern durch Stress muss sich die gesamte mikrobielle Gemeinschaft anpassen und gegebenenfalls verändern. Degens (1998) stellte die Hypothese auf, dass die Reduktion von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in ihrer funktionellen Vielfalt nicht der kritische Punkt sei, sondern vielmehr, dass die richtige Kombination von wesentlichen Funktionen unter einer Reihe von Bedingungen entscheidend sind, solange die reduzierte Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaften die wichtigsten Funktionen erhalten kann. Allerdings sind komplexe Gemeinschaften unter optimalen Bedingungen effizienter in ihrem Kohlenstoffverbrauch (Degens 1998).

Die mikrobielle Gemeinschaft ist wichtig für den aeroben und anaeroben Abbau von organischen Stoffen. Insbesondere der anaerobe Abbau spielt eine wichtige Rolle bei permanent gefluteten Systemen wie Faulschlamm, Reisfeldern oder Sedimenten. Ihr Anteil an der globalen Gesamtmethanproduktion ist in Abbildung 1.7 gezeigt (Conrad 2009). Die anoxischen Bedingungen in diesen Systemen sind optimal für die Methanogenese, allerdings kann die Zusammensetzung der Gemeinschaft je nach Ökosystem variieren. Dies ergibt sich aus den verschiedenen Nährstoffverfügbarkeiten und den veränderten Eigenschaften der verschiedenen Systeme.

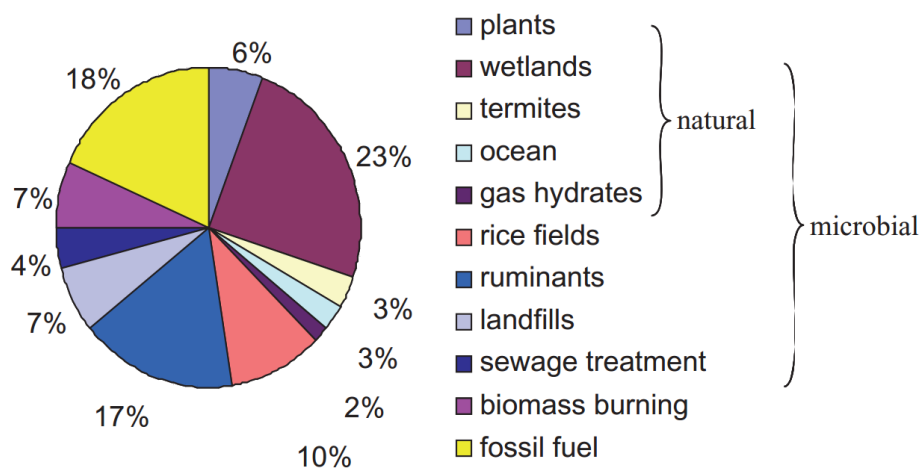


Abbildung 1.7: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Methanquellen im Gesamtmethanhaushalt (Conrad 2009)

1.3.1 Flusssedimente

Feuchtgebiete weisen sehr verschiedene Erscheinungsformen auf; ihnen können Seen, küstennahe marine Systeme, Moore, Sümpfe, Flüsse und Bäche zugeordnet werden. Der Begriff Fluss charakterisiert beispielsweise ein Frischwassersystem mit unidirektionaler Wasserbewegung. Das

Auftreten von hohen Flussraten und natürlichen Strömungen ist nach starken Regenfällen besonders ausgeprägt (Calow 2009). Darüber hinaus ist das Überleben der Mikroorganismen in aquatischen Ökosystemen von mikrobiellen Räubern, ungenügenden Nährstoffverfügbarkeiten, suboptimalen physikalischen Bedingungen sowie gelegentlich auch von Toxinen und Bioziden natürlichen oder anthropogenen Ursprungs abhängig (Barcina u. a. 1997). Die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Temperaturänderungen sind mit saisonalen Wetterumschlägen und dem Jahreszyklus gekoppelt (Sigg 2005). In der Studie von Gao und Kollegen (2005) wurde die mikrobielle Gemeinschaft in mehreren Süßwasserströmen mithilfe von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) untersucht. Die durch die Hybridisierung bestimmte Archaeenzellzahl lag im Bereich von $4,75 \times 10^6$ Zellen bis $4,99 \times 10^7$ Zellen pro Gramm Sediment (Gao u. a. 2005). Die mikrobielle Gemeinschaft in Flüssen beruht auf einer Vielzahl von Quellen wie auf terrestrischen Lebensräumen (Bauernhöfe, Ackerland, Siedlungen, Waldboden etc.), auf Ablagerungen, auf Biofilmen und auf Abwässern (Pernthaler 2013). Die CH₄-Produktion in Flusssedimenten wird eher als nicht so relevante atmosphärische Methanquelle eingestuft. Die Flusssedimente werden daher mit den anderen Feuchtgebieten zusammengefasst und der zusammengefasste Anteil von Feuchtgebieten umfasst 23 % (Abbildung 1.7, Conrad 2009). In einzelnen Studien wurde bereits das methanogene Potential von Flusssedimenten (Berger und Heyer 1989; de Angelis und Scranton 1993; Sha u. a. 2011; Ortiz-Llorente und Alvarez-Cobelas 2012; Mach u. a. 2015) und deren methanogene Gemeinschaften (Chen und Yin 2013; Beckmann und Manfield 2014; Conrad u. a. 2014b; Mach u. a. 2015) untersucht.

1.3.2 Faulschlamm (durch Ausfaulen stabilisierter Klärschlamm)

Die Abwasserbehandlung ist die größte auf biotechnologischen Verfahren beruhende Industrie der Welt (Seviour und Blackall 1999). Die Ziele der Abfallbehandlungsverfahren sind die Reduktion des organischen Anteils, die Entfernung von Nährstoffen und die Inaktivierung von pathogenen Keimen und Parasiten. Das Belebtschlammverfahren und die anaerobe Vergärung von Klärschlamm sind wichtige Phasen in den Kläranlagen. Mithilfe von unterschiedlichen Mikroorganismen werden organische Verbindungen durch den anaeroben Abbau zu CH₄ umgewandelt (Bitton 1994). Der anaerobe Abbau ist ein mehrstufiger Prozess und verläuft über Zwischenstufen, an denen verschiedene mikrobielle Gruppen mit verschiedenen physiologischen Aufgaben beteiligt sind: 1. Hydrolyse, 2. Versäuerungsphase (Acidogenese), 3. Acetogenese und 4. die Methanogenese (Demirel und Scherer 2008).

Eine schematische Darstellung des anaeroben Abbaus von organischen Substraten zu CH₄ ist in Abbildung 1.8 dargestellt (Demirel und Scherer 2008).

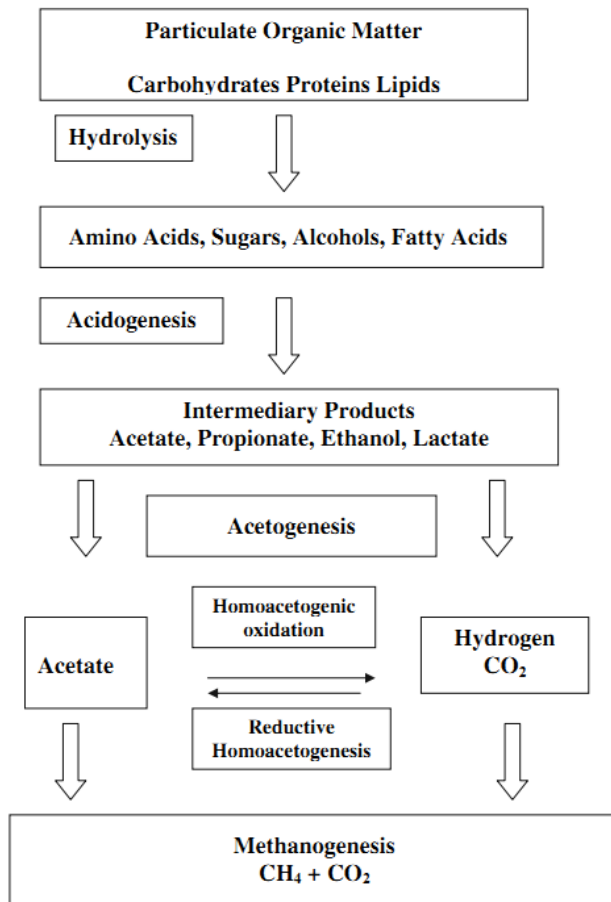


Abbildung 1.8: Anaerobe Abbau des organischen Materials zu CH₄ (Demirel und Scherer 2008).

Anaerobe Abbauprozesse liefern nur sehr wenig Energie. Um die Prozesse thermodynamisch zu ermöglichen, müssen Zwischenprodukte von anderen Organismen weiterverarbeitet werden. Der initiale Schritt wird durch extrazelluläre Enzyme von hydrolytisch aktiven Bakterien durchgeführt. In diesem Schritt werden Polymere wie Zellulose in Mono- oder Oligosaccharide aufgespalten (Schink und Stams 2006). Fermentierende Mikroorganismen nutzen diese Ausgangsstoffe für die primäre Fermentation zu organischen Säuren, Succinat, Laktat, Acetat, Alkoholen sowie zu H₂ und CO₂. Acetat, H₂ und CO₂ und andere C1-Verbindungen können direkt von Methanogenen verwendet werden. Acetat kann außerdem von Homoacetogenen, z. B. aus H₂ und CO₂ oder Glukose oder anderen Monosacchariden, gebildet werden. In einer sekundären Fermentation oxidieren weitere fermentierende Bakterien, sekundäre Fermentierer und syntrophe Bakterien die übrigen langkettigen Verbindungen, Alkohole, Aromaten und organische Säuren zu Acetat, Formiat, H₂ und CO₂, welche anschließend auch von den Methanogenen zu CH₄ umgesetzt werden (Schink und Stams 2006).

Die hydrogenotrophen und die acetiklastischen Methanogene sind in Faulschlamm die relevantesten funktionellen Gruppen (Bitton 1994). Trotzdem konnte eine große phylogenetische Vielfalt von Methanogenen im Faulschlamm gefunden werden. Gray und Kollegen (2002) zeigten dort das Auftreten von *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* und *Methanococcales*.

1.3.3 Reisfelder

Reisfelder sind wichtige anthropogene Methanquellen (Wang u. a. 2004). Sie können als Modellsystem dienen, um die mikrobielle Ökologie der anaeroben Nahrungsketten zu verstehen. Es gibt einige Variablen, wie Bodenart und Reisvarietät, Temperatur, Redox-Potential des Bodens und die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen, welche die CH₄-Produktion in Reisfeldern beeinflussen (Conrad 2002).

Die Einteilung des Reisanbaus wird durch das verfügbare Feuchtigkeitsprofil der Felder charakterisiert (Abbildung 1.9) und kann in drei Haupttypen unterteilt werden: (I) durch Regen bewässerter Reis, wo der Reis nur nach starken Regenfällen überflutet wird, (II) künstlich bewässerter Reis, wo die Felder im Winter und zur Ernte trockenliegen und der Reis während der Saison überschwemmt wird, (III) permanent überfluteter Tiefwasser-Reis, bei dem das Feld immer mit Wasser geflutet ist (Neue und Roger 1993).

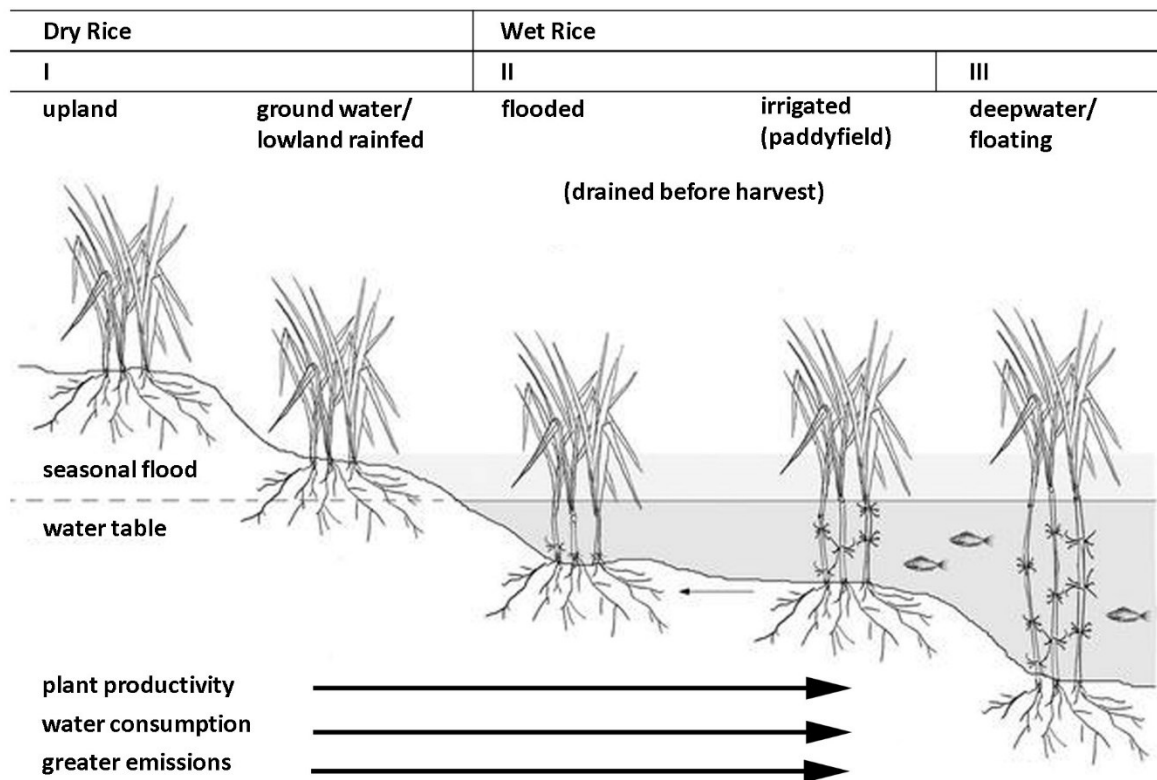


Abbildung 1.9: Einteilung des Reisanbaus nach verschiedenen Bewässerungsmethoden, modifiziert von http://sites.utexas.edu/mecc/files/2013/11/rice_ecological_spectrum-copy.jpg

Gerade bei frisch gefluteten Reisfeldern kann eine zeitliche Änderung des Redoxpotentials beobachtet werden. Während dieses Prozesses werden Sauerstoff, Nitrat, Eisen (III) und Sulfat reduziert (Conrad und Frenzel 2003). In dieser neu erzeugten anaeroben Zone werden optimale Bedingungen für den anaeroben Abbau geschaffen. Dies hat auch zur Folge, dass Methanogene in großen Mengen in Reisfeldern gefunden werden können (Peters und Conrad 1995). Das Prinzip des anaeroben Abbaus durch Mikroben ist ähnlich wie beim Faulschlamm, aber durch die unterschiedlichen

Umweltbedingungen hat jedes Umweltsystem seine einzigartige mikrobielle Gemeinschaft (Conrad und Frenzel 2003). Diese Gemeinschaft kann einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität im Reisanbau haben. Außerdem spielen die Wasserverfügbarkeit und die Sauerstoffverfügbarkeit eine Rolle (Conrad und Frenzel 2003). Das organische Material im Boden stammt von bereits vorliegenden organischen Substanzen, organischem Kohlenstoff, der durch den Abbau von Pflanzenmaterial freigesetzt wird oder durch freigegebene Wurzelexsudate (Hartmann u. a. 2009).

Unter bestimmten Umständen kann das gebildete CH₄ bei der Verfügbarkeit von alternativen Elektronenakzeptoren, z. B. an der Reisswurzel oder an der Bodenoberfläche, von Methanotrophen genutzt werden. Die Oxidation von CH₄ erfolgt entweder durch aerobe Methanotrophe an einer Grenzschicht mit gleichzeitiger Verfügbarkeit von O₂ und CH₄ oder möglicherweise auch anaerob durch eine Wechselwirkung von syntrophen, methanotrophen Archaeen (ANME-1, ANME-2 oder ANME-3) und Sulfat reduzierenden Bakterien (Boetius u. a. 2000; Raghoebarsing u. a. 2006). Desweiteren ist es auch möglich, dass CH₄ mit Nitrat oder Eisen (III) oxidiert wird. *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* gehört zu den denitrifizierenden anaeroben Methanoxidierern (damo), welche die CH₄-Oxidation an die Nitritreduktion und die intrazelluläre Sauerstoffproduktion gekoppelt haben (Zhu u. a. 2010; Ettwig u. a. 2010). Vertreter der ANME-2d-Gruppe, wie *Candidatus Methanoperedence nitroreducens*, sind in der Lage, CH₄ zu oxidieren, indem sie die reverse Methanogenese mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor nutzen (Haroon u. a. 2013).

1.3.4 Alternativer Reisanbau mit Möglichkeiten zum Austrocknen der oberen Erdschicht

Reis wird traditionell ständig überflutet, um einen möglichst hohen Ertrag zu erwirtschaften (Abbildung 1.10, Maclean u. a. 2002). Um den zunehmend höheren Bedarf an Lebensmitteln zu decken, wird bei traditionellen Anbaumethoden mehr Wasser zur Bewässerung erforderlich sein. Allerdings wird in Asien die verfügbare Wassermenge, welche zur Bewässerung zur Verfügung stehen muss, zunehmend knapper (Guerra u. a. 1998; Tabbal u. a. 2002). Es gibt einige Studien, in denen der Wasserverbrauch während der Reisproduktion reduziert wurde und trotzdem die wirtschaftliche Effizienz erhöht werden konnte (Belder u. a. 2004; Tuong u. a. 2005; Ye u. a. 2013; Shao u. a. 2014). Die alternative Bewässerung mit Möglichkeit zum Austrocknen (Alternate Wetting and Drying - AWD) ist eine vielfach eingesetzte Bewässerungsmethode in der Reisproduktion (Abbildung 1.10, Belder u. a. 2004; Tuong u. a. 2005). Bei der AWD wird das Feld nicht aktiv überflutet, sondern nur bewässert, wenn der Wasserstand eine bestimmte Schwelle unterschreitet. Diese Schwelle wird erreicht, wenn die Bodenoberfläche Risse zeigt oder wenn die Pflanzen visuell Symptome von Wassermangel zeigen (Tuong u. a. 2005; Ye u. a. 2013). In der Tiefe wird der Boden daher immer bis zur Sättigung mit Wasser feucht gehalten. Dadurch fällt die Spannung, mit der das Wasser im Boden zurückgehalten wird, nicht unter -10 kPa. Dies hat auch zur Folge, dass es in dem gesättigten Boden nur wenig Belüftung gibt und

somit weniger Nitrifikation stattfindet (Belder u. a. 2004). Des Weiteren wird die gespeicherte Wassermenge stark von den hydrologischen Bedingungen des Feldes beeinflusst (Belder u. a. 2004). Die Wasserersparnis in der Feldstudie von Belder und Kollegen (2004) betrug 6–14 % der gesamten Wasserzufuhr (Niederschläge und Bewässerung) und 15–18 % der künstlichen Bewässerungszufuhr. Noch weiter optimiert werden konnte die Wasserersparnis in einer Studie von Ye und Kollegen (2013), bei der im Jahr 2010 41 % und im Jahr 2011 28 % der künstlichen Bewässerungszufuhr eingespart werden konnten.



Abbildung 1.10: Links: kontinuierlich geflutetes Reisfeld, rechts: der leicht angetrocknete Reisfeldboden mit Rissen in der oberen Bodenschicht und einer verfügbaren Wassersäule in tieferen Schichten. <http://www.knowledgebank.irri.org/step-by-step-production/growth/water-management/alternate-wetting-drying-awd>

1.4 Ziel der Arbeit

Methanogene Archaeen können in fast jedem anoxischen Lebensraum nachgewiesen werden, z. B. in natürlichen Feuchtgebieten, auf Reisfeldern, in Meeren, im Pansen von Wiederkäuern und auch im Darm von Termiten und Kakerlaken (Zinder 1993; Lemke u. a. 2001; Brune 2010). Des Weiteren konnte auch für belüftete Böden wie Wüstenböden gezeigt werden, dass die Gruppen der Methanogene ein wichtiger Bestandteil der mikrobiellen Gemeinschaft ist (Aschenbach u. a. 2013; Angel u. a. 2012; Peters und Conrad 1995). In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass einige Methanogene unter verschiedensten Stressbedingungen, wie z. B. bei Sauerstoffstress, Austrocknungsstress oder mechanischem Stress, sehr widerstandsfähig sind (Anderson u. a. 2012; Ma und Lu 2011; Sakai u. a. 2011b; Dannenberg u. a. 1997). Über die Diversität der methanogenen Gemeinschaft und deren Aktivität unter andauernden Stressbedingungen ist bisher wenig bekannt. Mit der vorliegenden Arbeit sollte diese Fragestellung mithilfe folgender Schwerpunkte weiter untersucht werden:

- Ist einer der zwei in der vorliegenden Studie untersuchten Reisfeldböden (italienisch/philippinisch) besser an Austrocknung angepasst? Dazu wurde die Änderung der Aktivität und der Leistungsfähigkeit der methanogenen Gemeinschaft während eines Inkubationsexperiments bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten untersucht.
- Welchen Einfluss hat die Wasserverfügbarkeit auf die Methanemission und dessen mögliche Produktionswege, z. B. den acetiklastischen oder den hydrogenotrophen Produktionsweg? Wird ein Produktionsweg bei niedriger Wasserverfügbarkeit bevorzugt im Vergleich zu dem anderen?
- Wie abundant und divers ist die methanogene Gemeinschaft am Ende eines Inkubationsexperiments mit verschiedenen Feuchtigkeitsgehalten? Gibt es eine Anpassung in der Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft oder wird nur die Aktivität der methanogenen Gemeinschaft geregelt? Übernehmen nur einzelne angepasste Gruppen unter nicht gefluteten Bedingungen die Funktion, die unter gefluteten Bedingungen von einer Gemeinschaft übernommen werden?
- Können Methanogene in einem bewegten System produktiver sein als in einem statischen System? Sind Methanogene, die aus einem bewegten System wie der Abwasserreinigung stammen, im Vorteil gegenüber Methanogenen aus natürlicherweise eher wenig bewegten Systemen? Welche Rolle spielt die Wahl des Inkubationsmaterials mit verschiedenen methanogenen Ausgangsdiversitäten? Gibt es Veränderungen im Verhältnis der stabilen Isotope des Kohlenstoffs zueinander und hat dieses Verhältnis einen Einfluss auf eine tendenziell eher hydrogenotrophe oder eher acetiklastische Methanogenese?

Die Analyse der Aktivität der Methanogene erfolgte mithilfe von Gasmessungen und der Isotopenbestimmung. Für eine quantitative Bestimmung von phylogenetischen Gruppen wurde die Realtime-PCR-Methode (PCR: Polymerase-Kettenreaktion) für die Gene und Transkripte des 16S-rRNA-Gens und des *mcrA*-Gens verwendet. Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgte durch die Anwendung von T-RFLP des 16S-rRNA Gens. Abschließend konnte durch Illumina-Sequenzierung der *mcrA*-Transkripte die aktive Struktur der methanogenen Lebensgemeinschaft charakterisiert und ihre Aktivität molekularbiologisch bestimmt werden.

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Gase

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad pro analysi von den Firmen: Ambion (Darmstadt), Bio-Rad Laboratories (München), BioVentures (Murfreeseboro, USA), Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf), Fluka (Buchs, Schweiz), Life Technologies (Darmstadt), MP Biomedicals (Heidelberg), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Prenzlberg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Thermo Fischer Scientific (Dreieich) bezogen. Von der Firma Messer (Bad Soden) wurden die technischen Gase verwendet, welche als Eichgase für Gaschromatographen dienten oder zur Begasung der Bodenproben. Das für Inhibitionsversuche verwendete Methylfluoridgas wurde von ABCR (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Verwendete Umweltproben

2.2.1 Italienischer Reisfeldboden

Die Entnahme der Bodenproben des bereits charakterisierten italienischen Reisfeldbodens erfolgte im Frühjahr 2010 durch Dr. Judith Pump am „Istituto Sperimentale Della Cerealicoltura“ in Vercelli (Abbildung 2.1, Pump 2013). Eine erneute Bodenprobe wurde im Mai 2013 durch Dr. Judith Pump und Dirk Vogel entnommen. Die Bodenproben vom Jahr 2010 wurden nur in den bewegten Inkubationen vergleichend zu den neuen Bodenproben von 2013 verwendet. Beprobte wurde die obere Schicht eines nicht bepflanzten und nicht gefluteten Reisfeldes. Für weitere Analysen wurde der Boden nach Marburg transportiert, wo er trocken und unter Raumtemperatur gelagert wurde. Zur Homogenisierung wurden alle Proben mit einem Backenbrecher (Retsch GmbH, Haan) zerkleinert und durch ein 1 mm Sieb gegeben. Anschließend wurden Bodenproben entnommen, welche für die molekularen Analysen bis zur Extraktion der Nukleinsäuren bei -80 °C aufbewahrt wurden. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Analysen in Triplikaten durchgeführt.

2.2.2 Philippinischer Reisfeldboden

Für das Inkubationsexperiment mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten wurde ein weiterer Reisfeldboden analysiert (Abschnitt 2.3.4). Die Beprobung des bereits charakterisierten philippinischen Reisfeldbodens erfolgte im Frühjahr 2012 durch Mitarbeiter des International Rice Research Institute (IRRI) in Los Baños (Abbildung 2.1, Breidenbach 2015). Anschließend wurde der Boden luftgetrocknet und nach Deutschland transportiert, wo er im Frühjahr 2013 für die weiteren Analysen zur Verfügung stand. Die Homogenisierung erfolgte analog zu dem italienischen Reisfeldboden. Ebenfalls wurden Bodenproben für die molekularen Analysen entnommen und bei -80 °C aufbewahrt.



Abbildung 2.1: Geographische Karte von Italien (links) und den Philippinen (rechts), der orange Pfeil zeigt auf Vercelli (links) und auf Los Baños (rechts) (Bildquellen: <https://www.saudiaramcoworld.com/issue/201002/risotto.s.roots.html>; <http://members.relia.net/thedane/garrett.html>)

2.2.3 Gießener Faulschlamm

Der Faulschlamm stammt von einer Kläranlage nahe Gießen. Die Beprobung wurde von Dirk Vogel im Frühjahr 2013 durchgeführt. Anschließend wurde der Schlamm an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung unter Raumtemperatur gelagert. Zur Homogenisierung wurde der getrocknete Faulschlamm mit einem Backenbrecher (Retsch GmbH, Haan) zerkleinert und durch ein 1 mm Sieb gegeben.

2.2.4 Marburger Flusssediment der Lahn

Die Beprobung des permanent gefluteten Flussbettes der Lahn erfolgte im April 2013, im flachen Gewässer nahe der Afföllerwiesen in Marburg, (N50° 49' 9.682" E8° 46' 4.825"). Mithilfe eines langen Stechzylinders konnte ungefähr die obere Schicht (von 5 bis 10 cm) des Flussbettes entnommen werden. Für den Transport wurde das Sediment in Gläsern unter einer Schicht Flusswasser transportiert. Nach der Ankunft wurden größere Steine entfernt und das Sediment durch ein 1 mm Sieb gegeben. Die Lagerung erfolgte bis zur Inkubation unter Flusswasser bei 4 °C.

2.3 Chemische Analysen

2.3.1 Bestimmung von pH-Wert und C/H/N-Gehalt in den Bodenproben

Für die Bestimmung des pH-Wertes wurde ein digitales pH-Meter (Type CG 842, Schott Instruments, Mainz) mit einer pH-Sonde (Blue line 21, pH 2-13, Schott Instruments) verwendet. Bestimmt wurde der pH-Wert im Überstand nach der Inkubation (Abschnitt 2.3.7).

Das Verhältnis von Gesamtkohlenstoff, Gesamtwasserstoff und Gesamtstickstoff in der Bodenprobe wurde vom Routinelabor des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität-Marburg bestimmt. Hierfür wurden die Proben gemörsert und bei 60 °C getrocknet. Außerdem wurde ein Teil mit 2 M Salzsäurelösung angesäuert, um eventuell vorhandenes Carbonat zu entfernen und ebenfalls analysiert.

2.3.2 Bestimmung der Bodendichte, Bodenpartikeldichte und Berechnung der Porosität

Für die Reisfeldböden wurden die Bodendichte, Bodenpartikeldichte und Porosität ermittelt. Die Bodendichte ist der Quotient vom Gewicht des trockenen Bodens zu dem totalen Volumen von Boden und Luft. Bestimmt wurde die Bodendichte für den aufgeschlammten Reisfeldboden, der für das Experiment verwendet wurde. Der aufgeschlammte Reisfeldboden wurde in ein geeichtes Volumengefäß gefüllt um nach der Trocknung bei 105 °C das Trockengewicht und das Volumen zu bestimmen.

Die Bodenpartikeldichte konnte bestimmt werden indem ein bestimmtes Gewicht des getrockneten Bodens in ein geeichtes Volumengefäß gegeben wurde und mit Wasser bis zu 100 ml aufgefüllt wurde. Anschließend konnte durch die Bestimmung des Gewichtes, des Wassers und des Bodengemisches das Volumen des Bodens bestimmt werden. Die Bodenpartikeldichte ist der Quotient von dem Gewicht des trockenen Bodens zu dem Volumen der Partikel ohne Luft.

Die Porosität konnte anschließend mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Porosität} = 1 - \left(\frac{\text{Bodendichte}}{\text{Bodenpartikeldichte}} \right) \times 100 .$$

2.3.3 Gravimetrische Feuchtigkeitsbestimmung, Trockengewichtsbestimmung und maximale Wasserhaltekapazität

Die Bestimmung des Trockengewichtes erfolgte gravimetrisch. Von jedem Bodentyp wurden Triplikate mit 50 g Boden analysiert. Diese wurden bei 105 °C für einen Tag getrocknet und anschließend gewogen. Das im Boden befindliche Wasser kann durch Bindungskräfte (elektrostatische Anziehungskräfte, Ionen und Wasser-Dipolen) mit entsprechender Wasserspannung gebunden werden und daraus, resultiert die Wasserkapazität des Bodens. Die maximale Wasserhaltekapazität im Boden ist erreicht wenn die Trockensubstanz des Bodens die maximale Haftwassermenge aufgenommen hat. Die Berechnung ist wie folgt:

$$100 \% \text{ Wasserhaltekapazität} = \left(\frac{\text{Wasseraufnahme} + \text{Restfeuchte des Bodens}}{100\text{g Trockengewicht}} \right) \times 100 .$$

Für die Bestimmung im Labor wurde ein Kunststoffbecherglas mit fein perforiertem Boden verwendet und mit 200 g Boden befüllt. Der Boden wurde vollständig mit Wasser gesättigt und anschließend

wurde das überschüssige Wasser durch die Öffnungen entfernt. Dies wurde so lange wiederholt bis die aufgenommene Wassermenge dreimal hintereinander stabil blieb.

2.3.4 Inkubationskonditionen

2.3.4.1 Inkubationsexperiment mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten

Um die verschiedenen Wasserverfügbarkeiten experimentell einzurichten wurde 5 g italienischer Reisfeldboden in 60 ml Flaschen gefüllt und mit unterschiedlich großen Wassermengen benetzt (von 0 bis 5 ml). Die Wasserverfügbarkeiten sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Der Wassergehalt wurde als Prozent der Wassermenge auf die maximale Wasserhaltefähigkeit des Bodens (WHC) ausgedrückt. Alle Inkubationen, welche mehr Wasser (größer als 1,5 ml) enthielten waren vollständig gesättigt. Die Inkubation erfolgte unter N₂ Atmosphäre, im Dunkeln bei 25 °C und für jeden Wassergehalt in Triplikaten.



water in ml	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	5
expressed as % of maximal WHC	5.2	17.4	29.7	41.9	54.2	78.7	saturated with 100 %			
water filled pore space (%)	<1	12.7	25.3	38	50.7	76	saturated with 100 %			

Abbildung 2.2: Inkubation des italienischen Reisfeldbodens mit verschiedenen Wassergehalten, ausgedrückt in ml, als Prozent der Wassermenge auf die maximale Wasserhaltefähigkeit des Bodens (WHC) und Prozent der durch Wasser gefüllten Poren zum gesamten Porenvolumen.

Für den philippinischen Reisfeldboden wurde ein ähnliches Experiment wie beim italienischen Reisfeldboden durchgeführt, allerdings wurde die Dimension vergrößert, um mehr Messpunkte zu ermöglichen. Fünfzehn Gramm philippinischer Reisfeldboden wurden in eine 120 ml Flasche gefüllt und mit einem definierten Volumen Wasser benetzt (siehe Abbildung 2.3). Auch hier wurde der Wassergehalt als Prozent der Wassermenge auf die maximale Wasserhaltefähigkeit des Bodens (WHC) ausgedrückt. Die Inkubationen mit mehr als 10,2 ml Wasser waren vollständig gesättigt. Inkubiert wurden alle Proben in Triplikaten unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln bei 25 °C. Die Atmosphäre enthielt entweder N₂ oder N₂ mit 2 % Methylfluorid (CH₃F), einem Hemmstoff der acetiklastischen Methanogenese.

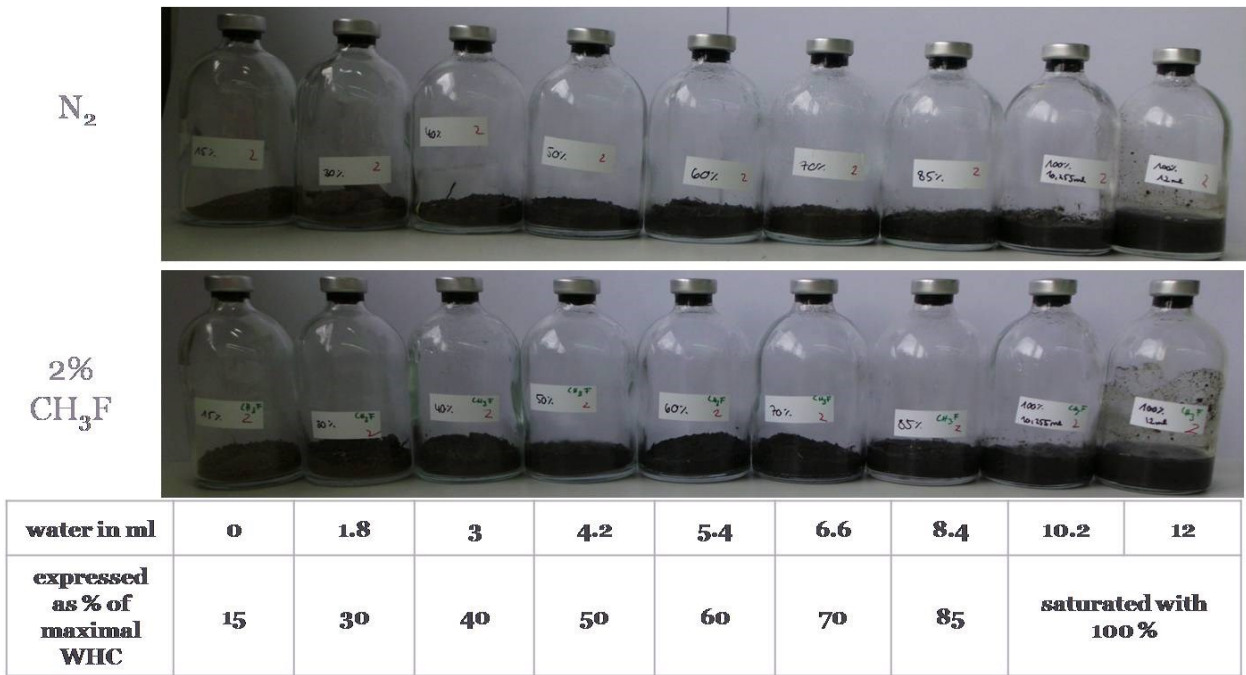


Abbildung 2.3: Inkubation des philippinischen Reisfeldbodens mit verschiedenen Wassergehalten, ausgedrückt in ml und als Prozent der Wassermenge auf die maximale Wasserhaltefähigkeit des Bodens (WHC)

2.3.4.2 Inkubationsexperiment des bewegten Systems

Für die Inkubation wurden 5 g italienischer Reisfeldboden und 10 ml Wasser in eine 60 ml Flasche gegeben. Für die magnetisch gerührten Proben wurde noch ein 2 cm langer Rührfisch hinzu gegeben. Vom Faulschlamm wurden ebenfalls 5 g abgewogen und in eine 60 ml Flasche gefüllt. Um die Liquidität zu gewährleisten wurden zum Faulschlamm 15 ml Wasser zugefügt. Das Flusssediment wurde mit dem Flusswasser gemeinsam umgefüllt und gut durchmischt. Es wurde ein Gesamtvolumen von 15 ml umgefüllt. Dies entspricht durchschnittlich 5,59 g Flusssediment. Die gefüllten Flaschen wurden gut gemischt und mit einem Butylstopfen verschlossen. Anschließend erfolgten die Evakuierung mit einer Membranpumpe sowie die Begasung mit N_2 (mit 0,5 bar Überdruck) für mindestens 10 min. Die Inkubation erfolgte in Triplikaten im Dunkeln bei 25 °C. Jedes Umweltsystem (Flusssediment, Faulschlamm, italienischer Reisfeldboden) wurde mit drei technischen Behandlungen bewegt: Rollen, Schütteln, Rühren. Zum Vergleich wurde eine statisch ruhende Inkubation durchgeführt (Abbildung 2.4). Das Rühren wurde mithilfe eines Magnetrührers bei 120 Umdrehungen pro Minute durchgeführt; das Schütteln erfolgte auf einem Rotationsschüttler mit 120 Umdrehungen pro Minute; das Rollen ermöglichte ein Rotator mit 60 Umdrehungen pro Minute. Gaskonzentrationen wurden in regelmäßigen Intervallen am Gaschromatographen gemessen, siehe nächstes Kapitel.

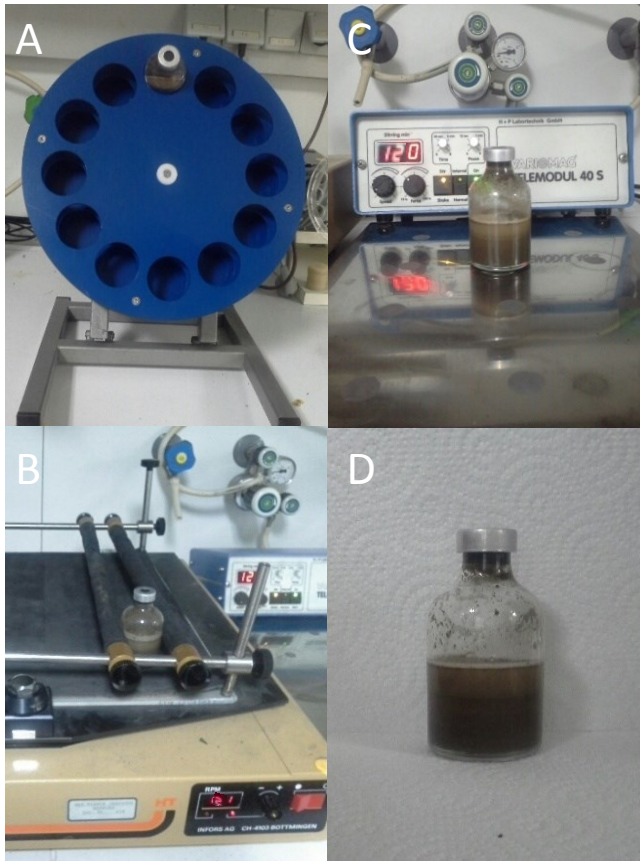


Abbildung 2.4: Demonstration der drei bewegten Systeme und der statischen Kontrolle – rollend (A), schüttelnd (B), rührend (C) und stehend (D)

2.3.5 Bestimmung der CH₄- und CO₂-Konzentration

Für die Bestimmung der Methan- und Kohlenstoffdioxidkonzentration wurde ein Gaschromatograph GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) ausgerüstet mit einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) verwendet (Tabelle 2.1). Das Injektionsvolumen von 500 µl wurde mit einer 500 µl gasdichte Glasspritze (Vici) eingespritzt. Bei hohen Gaskonzentrationen wurde das Injektionsvolumen auf 250 µl oder 100 µl reduziert.

Tabelle 2.1: Technische Betriebsdaten des Gaschromatographen mit Flammen-Ionisations-Detektor (FID)

Injektor Temperatur	160 °C
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Säule	3 m Edelstahlsäule, ø1/8", Trägermaterial: Hayesep Q 80/100 mesh, Temperatur: 120 °C
Methanisator	Eigenbau, Säule: NiCr-Ni Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande)
Detektor	FID, Brenngas: Wasserstoff und FID-Gas, Quenchgas: Stickstoff 5.0, Temperatur: 160 °C
Detektionslimit	1 ppmv CH ₄
Integration	Peak Simple Chromatography Data System, SRI Model 202, four channel serial port (SRI Instruments, Bad Honnef)
Prüfgas	Gemisch von CH ₄ (1000 ppmv) und CO ₂ (1003 ppmv)

2.3.6 Bestimmung der Isotopensignatur im Kohlenstoff von CH₄ und CO₂

Die ¹³C/¹²C-Isotopensignatur im CH₄ und CO₂ wurde durch einen GC-C-IRMS (Gas-Chromatograph-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer, Trace GC Ultra, Thermo Fischer Scientific) bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein Isotopenhäufigkeitsmassenspektrometer mit angekoppeltem Gaschromatographen. Beschrieben wurde die Methode von Brand (1996). Das Isotopenverhältnis wird als Verhältnis des schweren zum leichteren Kohlenstoffisotop angegeben, als Deltawert. Das Isotopenverhältnis kann wie folgt berechnet werden:

$$\delta^{13}\text{C} = 10^3 \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \quad \text{mit:} \quad R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} .$$

Vor der Analyse von Gasen wurden die Inkubationsgefäße kurz mit der Hand geschüttelt um eventuelle Gasblasen freizusetzen. Verwendet wurde eine 500 µl gasdichte Glasspritze (Vici) zur Bestimmung der Isotopensignatur. Das Detektionslimit zur Bestimmung der Isotopensignatur im CH₄ oder CO₂ lag bei 40 nmol g⁻¹ bei einem Injektionsvolumen von 500 µl, bei entsprechend geringeren CH₄-Konzentrationen, konnte anfangs die Isotopensignatur nicht bestimmt werden. Für technische Daten siehe Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2: Technische Betriebsdaten: GC-C-IRMS

GC	Trace GC Ultra (Thermo Fischer Scientific)
Injektor	Split Verhältnis 1:10, Temperatur: 150 °C
Trägergas	Helium 5.0, Flussrate: 2.6 ml min ⁻¹
Säule	27 m Pors PLOT Q, ø 0.32 mm, 10 µm Filmdicke (Varian)
GC/C-Interface	GC Isolink 1030 (Thermo Fischer Scientific) Oxidationsreaktor bei 940 °C
Detektor	IRMS: Delta V Advantage (Thermo Fischer Scientific)
Software	Isodat™ NT 3.0 (Thermo Fischer Scientific)
Kalibrationsgas	CO ₂ 4,5 (99.995 % Reinheit, Messer), mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck) kalibriert. Letztere wurde am Max-Planck -Institut für Biogeochemie, Jena (Dank an Dr. W.A. Brand), interkalibriert gegen NBS 22 und USGS 24.

Die Isotopensignatur des Kohlenstoffs im organischen Material wurde vom Kompetenzzentrum Stabile Isotope der Universität in Göttingen analysiert. Die Messungen erfolgten mit einem Elementaranalysator, welcher an eine IRMS gekoppelt ist.

Für die Berechnung des Anteils der hydrogenotrophen Methanogenese (f_{H_2}) an der Gesamtproduktion wurden die CH_4 Isotopensignaturen des gesamten gebildeten CH_4 (δCH_4) und die Signatur des hydrogenotroph gebildeten CH_4 (δmc) genutzt. Die Berechnung erfolgte dann nach Conrad (2005) mit folgender Formel:

$$f_{mc} = (\delta CH_4 - \delta ma) / (\delta mc - \delta ma).$$

Die Kohlenstoffisotopensignatur im acetiklastisch gebildeten CH_4 (δma) kann aus der Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat oder dem Vorläufer des Acetats, dem organischen Kohlenstoff, geschätzt werden. Bei einem hohen Umsatz von organischem Kohlenstoff über Acetat zu CH_4 ist eine eher niedrige Fraktionierung anzunehmen (Goevert und Conrad 2009). Der Fraktionierungsfaktor (α) variiert in Reinkulturen für *Methanosarcinales* in einem Bereich von 1,007 bis 1,035 (Gelwicks u. a. 1994; Valentine u. a. 2004; Goevert und Conrad 2009; Blaser und Conrad 2016) und beträgt für *Methanosaeta concilii* 1,010 (Penning 2005). Für die Isotopensignatur im acetiklastischen CH_4 sind zwei Faktoren relevant, einmal die Änderung der Isotopensignatur durch die Abspaltung der Methylgruppe vom Acetat ($\emptyset -10\text{‰}$) und die empirisch ermittelte Fraktionierung aus dem Acetat zu CH_4 , mit Werten von 0 bis -10‰ (Conrad u. a. 2014a). Für unsere Berechnungen wurde ein eher niedriger, gesamt Fraktionierungswert von 1,01 angenommen, ausgehend vom organischen Kohlenstoff zum δma . Es wurde ein eher niedriger Fraktionierungswert angenommen, aufgrund der niedrigen Acetatwerte und dem daraus geschätzten hohen Umsatz.

2.3.7 Quantifikation von organischen Fettsäuren und deren Isotopensignatur mittels HPLC-Messungen

Die Konzentrationsbestimmung von kurzen Fettsäuren, wie Acetat, Propionat und Butyrat, wurde mittels HPLC- (Hochdruckflüssigkeitschromatograph) Analyse (Tabelle 2.3) bestimmt. Hierfür wurde jede Probe zentrifugiert und das Porenwasser (Überstand) durch einen Membranfilter (Polytetrafluoroethylene) mit der Porengröße $0,2\ \mu m$ filtriert und anschließend analysiert. Für die Ausgangsproben (*In situ*) oder die nicht vollständig befeuchteten Inkubationsproben wurde bis auf die maximale Wassermenge der vollständig befeuchteten Inkubationen aufgefüllt. Anschließend erfolgten die Zentrifugation und die Entnahme des Porenwassers wie bei den vollständig befeuchteten Inkubationen. Falls nötig erfolgte die Lagerung bei -20°C . Verwendet wurden die Standards mit folgender Zusammensetzung: Standard 1 enthielt 1 mM Formiat, 1 mM Acetat, 1 mM Propionat und 1 mM Butyrat/ Standard 2 enthielt 1 mM Formiat, 1 mM Acetat, 1 mM Glukose und 1 mM Pyruvat.

Die Isotopensignatur $\delta^{13}C$ der Kohlenstoffverbindungen wurde über eine HPLC-Analyse bestimmt, welche direkt an eine IRMS (HPLC-IRMS) gekoppelt war. Dadurch erfolgte die Messung der

Isotopensignatur an einer separaten HPLC-IRMS-Anlage (siehe Tabelle 2.4) getrennt von der Konzentrationsbestimmung. Beschrieben wurde dieses Prinzip von (Krummen u. a. 2004).

Tabelle 2.3: Technische Betriebsdaten der HPLC-Anlage

Probenaufgeber	S 5200 Sample Injektor
Pumpe	S 1125 HPLC-Pumpsystem (Sykam, Eresing)
Säule	Edelstahlsäule 30 cm Länge, $\varnothing 7,8$ mm, Trägermaterial: Sulfurierte-Divinyl-Benzol-Harze (Nucleogel Sugar 810, MN)
Säulenofen	Mistral (Spark, Emmen, Niederlande), Ofentemperatur, 35 °C
Fließmittel	1 mM Schwefelsäure
Fluß	0,5 ml min ⁻¹
Detektor	RI Detektor ERC-7512 (ERMA CR Inc), UV Detektor 2500 (Sykam, Eresing)
Integration	Clarity Version 4.0.3.843 (Techlab, Braunschweig)

Tabelle 2.4: Technische Betriebsdaten der HPLC-IRMS-Anlage

Probenaufgeber	HTC Pal (CTC Analysis, Zwingen, Schweiz)
Pumpe	Spectra System P1000 (Thermo Finnigan, Jan Jose, CA, USA)
Fließmittel	5 mM Schwefelsäure
Fluß	0,3 ml min ⁻¹
Säule	Edelstahlsäule 30 cm Länge, $\varnothing 7,8$ mm, Trägermaterial: Sulfurierte-Divinyl-Benzol-Harze (Nucleogel Sugar 810, MN)
Oxidationsreagentien	Natriumperoxodisulfatlösung und Phosphorsäure; Flussrate jeweils 50 μ l min ⁻¹
Säulenofen	Mistral (Spark, Emmen, Niederlande), Temperatur 35 °C
Interface	Finnigan LC IsoLink (Thermo Electron, Bremen)
Detektor	IRMS: Finnigan MAT delta plus advantage (Thermo Electron, Bremen)
Integration	ISODAT™ NT 2.0 (Thermo Electron, Bremen)
Kalibrationsgas	CO ₂ 4,5 (99.995 % Reinheit, Messer). Das Referenzgas wurde mit dem Arbeitsstandard Methylstearat (Merck, Darmstadt) kalibriert. Kalibrierung wie bei GC-IRMS.

2.4 Molekulare Analysen

2.4.1 Gesamt-Nukleinsäureextraktion

Die Proben für die DNA und RNA-Extraktion wurden direkt nach den Inkubationen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-Nukleinsäureextraktion erfolgte nach dem bereits ausführlich in der Literatur beschriebenen Verfahren (Angel u. a. 2011; Angel u. a. 2012) mit 0,5 g des trockenen nicht inkubierten Bodens und mit 0,5 g des inkubierten Bodens. Die

Nukleinsäurequalität wurde auf einem Agarose-Gel überprüft und die Konzentration wurde mit dem Nano-Drop-1000-Spektralphotometer (Thermo Fischer Scientific) bestimmt. Die Lagerung der Nukleinsäuren erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.2 cDNA Synthese

Von einem Teil der Nukleinsäureextrakte wurde die DNA hydrolysiert, um einen reinen RNA-Extrakt zu generieren. Der Abbau der DNA wurde mit Ambions Turbo DNaseI durchgeführt. Für die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches siehe Tabelle 2.5. Danach wurde die RNA anhand der Herstellerangaben aufgereinigt mit Qiagen's RNeasy Min Elute Cleanup Aufreinigungskit (Qiagen) und die RNA wurde in RNase Storage Solution (Ambion) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der erfolgreiche Abbau der DNA wurde durch Vergleich des RNA-Extrakts mit dem DNA/RNA-Extrakt auf einem Agarosegel kontrolliert.

Tabelle 2.5: Reaktionsgemisch für die DNA-Hydrolysisierung

Komponenten	1 Ansatz (100 μL)
Gesamt-Nukleinsäureextrakt (10-85 ng)	40
10x Buffer	10
RNase Inhibitor (40 U/ μL)	2
0,1 M DTT	1
DNaseI (1 μL für 2 μg DNA)	2
RNase freies H_2O	45

Ausgehend von der RNA wurde durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden 2 μL RNA-Extrakt, 5 μL Hexanukleotidmix (50 ng/ μL ; Roche), 2 μL Desoxynukleosidtriphosphatmix (10 mM) und 4 μL RNase freies Wasser (H_2O) gemischt und für 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert (Gesamtvolumen 13 μL). Während des Pausierens bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde ein Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 7,4 μL) mit den folgenden Komponenten zugeben: 4 μL 5x Reaktionspuffer (Promega), 1 μL 0,1 M DTT, 0,4 μL BSA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL Superase Inhibitor (20 U/ μL , Promega) und 1 μL Superscript III RT (200 U/ μL , Promega). Nach dem Mischen wurde alles 5 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und danach erfolgte die cDNA Synthese für 60 min bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend erfolgten eine 15 min Inkubation bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und das Abkühlen auf $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.3 Amplifikation von Markergenen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Quantitative PCR

In der vorliegenden Studie wurden die phylogenetischen Markergene der 16S-rRNA und der α -Untereinheit des Methyl-CoenzymM-Reduktase näher untersucht. Vermehrt werden konnten die Markergene aus DNA-Extrakten oder aus RNA-Extrakten, welche mithilfe der Reversen Transkriptase

in cDNA umgeschrieben wurden (Kapitel 2.4.2). Die entstandenen PCR-Produkte wurden für T-RFLP und Illumina Sequenzierungen weiterverwendet. Die Real-Time PCR wurde zur Quantifizierung der Genkopien eingesetzt. Bei jeder Amplifikation wurde eine Positivkontrolle (DNA mit dem zu amplifizierenden Gen) und eine Negativkontrolle (anstelle des DNA Templates wurde das entsprechende Volumen H₂O hinzugegeben) mitgeführt.

Das PCR-Gemisch für die archaeelle 16S-rRNA wurde gemäß Tabelle 2.6 hergestellt und anschließend unter Verwendung des PCR-Programmes, siehe Tabelle 2.7, in einem Thermocycler Primus 96 plus (MWG Biotech) durchgeführt. Eine Auflistung aller verwendeten Primer ist in Tabelle 2.10 dargestellt.

Tabelle 2.6: PCR-Reaktionsgemisch für das Zielgen 16S-rRNA der Archaeen (T-RFLP)

Komponenten	Finale Konzentration	1 Ansatz (50 µL)
PCR H ₂ O		27,7
GoTaq®Flexi 5x Green Buffer	1X	10
dNTP mixture (2.0 mM)	0,2 mM	5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	3
BSA (20 µg/µL)	0,8 µg/µL	2
109f* (25 µM)	0,25 µM	0,5
934r* (25 µM)	0,25 µM	0,5
GoTaq®Polymerase (5 U/µL)	1,5 U/50 µl	0,3
Template		1 (oder 2)

*für die T-RFLP wurde ein 6-FAM markiertes Oligonukleotid verwendet siehe Tabelle 2.10.

Tabelle 2.7: PCR-Programm für das Zielgen 16S-rRNA der Archaeen (T-RFLP)

Schritt	Dauer	Temperaturverlauf	Anzahl der Zyklen
1 Hot Start	∞	94 °C	1 ×
2 Initiale Denaturierung	4 min	94 °C	1 ×
3 Hybridisierung	30 s	52 °C	} 30 ×
4 Elongation	45 s	72 °C	
5 Denaturierung	30 s	94 °C	
6 finale Hybridisierung	30 s	52 °C	1 ×
7 finale Elongation	10 min	72 °C	1 ×
8 Abkühlen	∞	8 °C	1 ×

Für die Amplifikation des *mcrA*-Gens wurde das PCR-Gemisch gemäß Tabelle 2.8 hergestellt und anschließend unter Verwendung des PCR-Programms in Tabelle 2.9 in einem Thermocycler Mastercycler pro (Eppendorf) durchgeführt.

Tabelle 2.8: PCR-Reaktionsgemisch für das Zielgen *mcrA* der Methanogenen (Illumina-Sequenzierung)

Komponenten	Finale Konzentration	1 Ansatz (50 µL)
PCR H ₂ O		40,55
10x Red Accu Taq Puffer	1X	5
MgCl ₂ (50 mM)	0,25 mM	0,25
BSA (50 µg/µL)	0,2 µg/µL	0,2
Primer mlas-f* (25 µM)	0,75 µM	1,5
Primer <i>mcrA</i> -rev* (25 µM)	0,75 µM	1,5
RedAccuTaq® Polymerase (5 U/µL)	2,5 U/50µl	0,5
Template		0,5 (bis 5)

*für die Sequenzierung wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.9: PCR-Programm für das Zielgen *mcrA* der Methanogenen (Illumina-Sequenzierung)

Schritt	Dauer	Temperaturverlauf	Anzahl der Zyklen
1 Initiale Denaturierung	4 min	94 °C	1 ×
2 Denaturierung	30 s	94 °C	5 ×
3 Hybridisierung	45 s	60 °C - touch down 1 °C je Zyklus	
4 Elongation	30 s	72 °C	
5 Denaturierung	30 s	94 °C	35 ×
6 Hybridisierung	45 s	55 °C	
7 Elongation	30 s	72 °C	
8 finale Elongation	10 min	72 °C	1 ×
9 Abkühlen	∞	4 °C	1 ×

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 120 V durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelbande wurde ausgeschnitten und mit dem MinElute Gelextraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Berechnung der RNA- oder DNA-Konzentration erfolgte die DNA Qubit Messung mit dsDNA HS Kit nach Herstellerangaben.

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primer für PCR, quantitative PCR, T-RFLP Analyse und Illumina Sequenzierung

Verwendung	Oligonukleotid	Zielgruppe	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Referenz
T-RFLP	109f[fam]/ 934r	Archaea 16S-rRNA-Gen	ACK GCT CAG TAA CAC GT/ GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Großkopf und Kollegen (1998)
T-RFLP	109f/ 934r[fam]	Archaea 16S-rRNA-Gen	ACK GCT CAG TAA CAC GT/ GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Großkopf und Kollegen (1998)
qPCR	364f/ 934r	Archaea 16S-rRNA-Gen	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA/ GTG CTG CCC CGC CAA TTC CT	Burggraf und Kollegen (1997)/ Großkopf und Kollegen (1998)
qPCR	Mlas-mod*/ <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	GGY GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA/ CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Steinberg und Regan (2008)
PCR	Mlas/ <i>mcrA</i> rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA/ CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4003-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>AGA GTC</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4004-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>AGC TGA</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4005-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>AGT CAG</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4006-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>ATA TCG</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4007-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>ATC GAT</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4008-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>ATG CTA</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)

Fortsetzung Tabelle 2.10:

Verwendung	Oligonukleotid	Zielgruppe	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Referenz
Illumina	4009-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CAC AGT</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4010-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CAG TCA</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4011-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CAT GAC</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4012-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CGA TAT</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4013-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CGC GCG</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4014-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>CGT ATA</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4015-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>GAC TAG</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4016-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>GAG ATC</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
Illumina	4017-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>GAT CGA</u> GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)

Fortsetzung Tabelle 2.10:

Verwendung	Oligonukleotid	Zielgruppe	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Referenz
Illumina	4018-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>GTA CAC</u> GGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
			GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG	
			GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT	
			TVG GRT AGT	
Illumina	4019-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>GTC ACA</u> GGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
			GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG	
			GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT	
			TVG GRT AGT	
Illumina	4020-Mlas-F/ Ad- <i>mcrA</i> -rev	Methanogene <i>mcrA</i> -Gen	G ATG GCC ATT ACG GCC <u>AGA GTC</u> GGT	Modifiziert von Steinberg und Regan (2008)
			GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA /G GTG	
			GCC GAG GCG GCC CGT TCA TBG CGT AGT	
			TVG GRT AGT	

* nach Angel und Kollegen (2012) wurde die erste Thymin-Nukleotidbase zu einem Y (= G oder T) erweitert

Die Quantifizierung phylogenetischer Markergene (16S-rRNA und *mcrA*) in den DNA-Extrakten erfolgte mithilfe eines iCycler Thermocycler mit MyiQ™ Detektionssystem (BioRad). Die resultierenden Daten wurden mit der iQ5 optischen Systems Software (BioRad) analysiert. Die DNA oder cDNA-Extrakte wurden 1:10 verdünnt und davon 5 µl in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Für die Eichung wurden jeweils 5 µl einer Verdünnungsreihe eines spezifischen, quantifizierten DNA-Standards bei jeder Messung mitgeführt. Diese Standards wurden von einem *Methanosarcina barkeri str. Fusaro* und aus einer reinen Kultur von *Methanosarcina thermophila* erzeugt. Die Herstellung des Standards erfolgte nach Angel und Kollegen (2011). Alle Proben und Standards wurden in drei Replikaten gemessen. Die Quantifizierung der Vervielfältigung wurde während der PCR mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SybrGreen verfolgt. Der Fluoreszenzfarbstoff (Extinktion: 490 nm, Emission: 530 nm) bindet an die große Furche doppelsträngiger DNA. Durch die fortschreitende Zyklenzahl wird die DNA-Konzentration und entsprechend die Fluoreszenzintensität der Lösung erhöht. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgt mithilfe einer Digitalkamera nachdem eine komplette Wiederholung (4 Schritte) abgeschlossen war.

Tabelle 2.11: PCR-Reaktionsgemisch für das Zielgen 16S-rRNA der Archaeen (qPCR)

Komponenten	Finale Konzentration	1 Ansatz (25 µL)
PCR H ₂ O		3,4
SybrGreen Ready Mix (Sigma)	1X	12,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
BSA (50 µg/µL)	0,2 µg/µL	0,1
364f (33 µM)	0,66 µM	0,5
934r (33 µM)	0,66 µM	0,5
Template (1:10 verdünnt)		5

Tabelle 2.12: PCR-Programm für das Zielgen 16S-rRNA der Archaeen (qPCR)

Schritt	Dauer	Temperaturverlauf	Anzahl der Zyklen
1 Initiale Denaturierung	6 min	94 °C	1 ×
2 Denaturierung	35 s	94 °C	} 40 ×
3 Hybridisierung	30 s	66 °C	
4 Elongation	45 s	72 °C	
5 Denaturierung	10 s	84 °C	
	➤ Aufnahme der Fluoreszenz		
6 Schmelzkurve	6 s	75 -94,8 °C	Anstieg von 0,2 °C
7 Abkühlen	∞	8 °C	1 ×

Tabelle 2.13: PCR-Reaktionsgemisch für die Amplifizierung methanogener Archaeen mithilfe des *mcrA*-Gens (qPCR)

Komponenten	Finale Konzentration	1 Ansatz (25 µL)
PCR H ₂ O		2,85
Ready Mix (Sigma)	1X	12,5
MgCl ₂ (25 mM)	3,5 mM	3,5
BSA (50 µg/µL)	0,8 µg/µL	0,4
mlas_mod (25 µM)	0,25 µM	0,25
<i>mcrA</i> -rev (25 µM)	0,25 µM	0,25
Template (1:10 verdünnt)		5

Tabelle 2.14: PCR-Programm für das *mcrA*-Zielgen methanogener Archaeen (qPCR)

Schritt	Dauer	Temperaturverlauf	Anzahl der Zyklen
1 Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1 ×
2 Denaturierung	30 s	95 °C	} 40 ×
3 Hybridisierung	45 s	57 °C	
4 Elongation	30 s	72 °C	
5 Denaturierung	10 s	84 °C	
	➤ Aufnahme der Fluoreszenz		
6 Schmelzkurve	6 s	75 -94,8 °C	Anstieg von 0,2 °C
7 Abkühlen	∞	8 °C	1 ×

2.4.4 Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus des archaeellen 16S-rRNA-Gens

Die Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (T-RFLP-Methode) ist ein Verfahren, um den genetischen Fingerabdruck von einer phylogenetischen Gemeinschaft zu bestimmen und wurde erstmals von Liu und Kollegen (1997) beschrieben. Die gesamte DNA wird mithilfe eines Restriktionsenzym gespalten, sodass einzelne Restriktionsfragmente entstehen. Diese werden an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 6-Carboxyfluorescein) markiert. Durch die Analyse der Längen können diese einzelnen Fragmente bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Für unbekannte Ökosysteme erfolgt die Interpretation und Zuordnung mithilfe von neu sequenzierten Klonbibliotheken, wodurch die phylogenetischen Gruppen und die Längen bestimmt werden. Für Reisfeldböden sind schon viele Klonbibliotheken publiziert worden (Lueders und Friedrich 2000; Ramakrishnan u. a. 2001; Chin u. a. 2003; Peng u. a. 2008; Wu u. a. 2009; Ma und Lu 2011; Scavino u. a. 2013; Ke u. a. 2014). Die für die vorliegende Arbeit relevanten Gruppen sind in Tabelle 2.15 zusammengefasst.

Das fluoreszenz markierte archaeelle PCR-Produkt (50 ng) der 16S-rRNA wurde mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde mit 1 µl Restriktionsenzym *TaqI* (10 U µl⁻¹, Erkennungssequenz: 5' T[~]CGA 3') und 1 µl Puffer Tango vermischt und anschließend für mindestens 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 bis 5 µl des verdauten PCR-Produktes mit 11 µl HiDi-Formamid-Lösung (Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 µl internem DNA-Standard (X-Rhodamine MapMarker® 1000, BioVentures, Murfreesboro, USA) vermischt. Nach der Denaturierung (3 min bei 95 °C) wurden die Proben auf Eis gelagert und mit einem automatischen Kapillarsequenziergerät (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgetrennt. Für die Auswertung wurde die Software Genescan 4.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) verwendet.

Anschließend wurde die relative Häufigkeit der Fragmente anhand der Peakhöhe im Verhältnis zur Gesamthöhe aller Peaks (= 100 %) berechnet. Peaks von unterschiedlichen Proben wurden zum vollen Zahlenwert zusammengefasst, wenn sie sich nicht mehr als 0,5 Basenpaare (bp) voneinander unterschieden haben. Standardisiert wurde zunächst die Gesamthöhe der größten Fluoreszenzhöhe proportional zu den kleinsten totalen Fluoreszenzhöhen. Anschließend wurden alle Peaks, welche größer als 1 % der totalen Fluoreszenzhöhe waren, ausgewertet (Dunbar u. a. 2001).

Tabelle 2.15: Einordnung der 16S-rRNA-T-RF des italienischen Reisfeldbodens und der OTU (operational taxonomic unit) aus der Illuminasequenzierung der Transkripte des *mcrA*-Gens des philippinischen und italienischen Reisfeldbodens zu ihren phylogenetischen Gruppen. (Für eine Zuordnung der jeweiligen T-RF, welche durch die Verwendung der Primerkombination 109f/934r[fam] entstanden sind, existieren in der Literatur für Reisfeldböden bereits gute Klonbibliotheken). Angegeben sind die Längen der T-RF in Basenpaaren (bp).

Abkürzung	Systematische Zuordnung	Gruppe	T-RF (bp)	OTU
CRB	Stamm	<i>Thaumarchaeota</i> ^a	183/184/186 ^{1, 2, 4, 5, 6, 7}	-
		(<i>Crenarchaeota</i> 1.1b (<i>Rice Cluster</i> VI) und <i>Creanarchaeota</i> 1.1a)	88 ⁶	
CRA	Stamm	<i>Miscellaneous</i>	75/76 ^{2, 3}	-
		<i>Crenarchaeotic Group</i>	83 ^{2, 5}	
		(<i>Creanarchaeota</i> 1.3/ <i>Rice Cluster</i> IV)	87 ³	
			395 ^{2, 7}	
			738 ⁸ 809 ^{2, 3, 6, 7}	
MBT	Ordnung	<i>Methanobacteriales</i>	88 ^{3, 4}	-
MCL	Ordnung	<i>Methanocellales</i>	255 ³	-
		(<i>Rice Cluster</i> I)	390/392 ^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}	
MMB	Ordnung	<i>Methanomicrobiales</i>	83 ^{2, 5}	400
			390/392 ^{1, 2, 4, 5}	
RCV	Klasse	<i>Thermoplasmata</i> ^b	78 ^{1, 4, 5}	-
		(<i>Rice Cluster</i> V)	280 ⁶	
MMC	Ordnung	<i>Methanomassiliicoccales</i> ^c	282/284 ^{1, 3, 4}	-
		(<i>Rice Cluster</i> III)	379 ^{1, 2, 5, 6, 7}	
MSL	Familie	<i>Methanosarcinaceae</i>	183/184/186 ^{2, 3, 4, 5, 6, 7} 809 ^{6, 7}	250
MSA	Familie	<i>Methanosaetaceae</i>	282/284 ^{2, 3, 4, 5, 6, 7}	406; 35; 379; 382; 289; 393; 232
MBE	Familie	<i>Methanobacteriaceae</i>	88 ^{6, 7}	87; 106; 477; 375; 303;
			390/392 ⁷	280; 466; 557
MRE	Familie	<i>Methanoregulaceae</i>	-	483; 373; 409; 176; 86; 19; 388; 402

Fortsetzung Tabelle 2.15:

Abkürzung	Systematische Zuordnung	Gruppe	T-RF (bp)	OTU
MME	Familie	<i>Methanomassiliicoccaceae</i>	-	370
MCE	Familie	<i>Methanocellaceae</i>	-	168
MSE	Familie	<i>Methanospirillaceae</i>	-	111
MPE	Familie	<i>Methanoperedenaceae</i>	-	507
MFE/ RCII	Familie	<i>Methanoflorentaceae</i> ^d (Rice Cluster II)	390/392 ^{6, 7}	491

¹ (Wu u. a. 2009)

² (Ke u. a. 2014)

³ (Scavino u. a. 2013)

⁴ (Peng u. a. 2008)

⁵ (Chin u. a. 2003)

⁶ (Ramakrishnan u. a. 2001)

⁷ (Lueders und Friedrich 2000)

⁸ (Ma und Lu 2011)

^a (Pester u. a. 2011), ^b (Cao u. a. 2015), ^c (Paul u. a. 2012), ^d (Mondav u. a. 2014)

Für die Einordnung der T-RF, welche durch die Verwendung der Primerkombination 109f[fam]/934r entstanden sind, existiert nur eine Klonbibliothek in der Literatur (Aschenbach u. a. 2013). Anhand von Reinkultursequenzen können weitere mögliche Fragmentlängen vorhergesagt werden. Eine Zuordnung zu möglichen phylogenetischen Gruppen ist in Tabelle 2.16 dargestellt.

Tabelle 2.16: Einordnung der 16S-rRNA-T-RF der Umeltsysteme Fluss, Faulschlamm und Reisfeldboden im bewegten und statischen Inkubationsexperiment zu ihren phylogenetischen Gruppen (für die verwendete Primerkombination 109f[fam]/934r). Angegeben sind die Längen der T-RF in Basenpaaren (bp).

Abkürzung	Systematische Zuordnung	Gruppe	T-RF (bp)
CRB	Stamm	<i>Thaumarchaeota</i>	529/530 ¹
		<i>(Crenarchaeota 1.1b (Rice Cluster VI) und Creanarchaeota 1.1a)</i>	601 ¹
MBT	Ordnung	<i>Methanobacteriales</i>	400 ²
			701 ¹
MSL	Familie	<i>Methanosarcinaceae</i>	607 ¹
MSA	Familie	<i>Methanosaetaceae</i>	296 ⁴
MCL	Ordnung	<i>Methanocellales</i>	102 ²
		<i>(Rice Cluster I)</i>	295 ¹
MMB	Ordnung	<i>Methanomicrobiales</i>	394/396 ²
MMC	Ordnung	<i>Methanomassiliicoccales</i> <i>(Rice Cluster III)</i>	405 ²

¹ (Aschenbach u. a. 2013)

² Vorhergesagte Fragmentlängen anhand von Reinkultursequenzen mithilfe der Software ARB

2.4.5 Bearbeitung der Illumina-Sequenzierung der Transkripte des *mcrA*-Gens des philippinischen und italienischen Reisfeldbodens

Für die Illumina-Sequenzierung wurden die Primerpaare Mlas-F und *mcrA*-rev (Steinberg und Regan 2008) modifiziert und verwendet. Jeder Vorwärtsprimer wurde mit einem 6-Basen-Barcode versehen, der sich für jede Probe unterschied. (Dieser 6-Basen-Barcode wurde in Tabelle 2.10 bei den 18 verschiedenen Sequenzen unterstrichen). Dies ist wichtig für die spätere Zuordnung der einzelnen Proben nach der Sequenzierung. Anschließend wurde an alle Vorwärtsprimer und den Rückwärtsprimer noch eine 16 Basen-Adaptorsequenz (G ATG GCC ATT ACG GCC / G GTG GCC GAG GCG GCC) angehängt. Für die Generierung des PCR-Produktes siehe Abschnitt 2.4.3. Sequenziert wurde das PCR-Produkt von jeder Seite am Max-Planck-Genome-Zentrum in Köln mithilfe einer Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA; 300 bp).

2.5 Bioinformatische Analysen

2.5.1 Qualitätsfilterung und Auswertung der Rohdaten mit UCLUST

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der UPARSE-Anleitung, beschrieben von Edgar (2013). Darunter fällt das Zusammenfügen der beiden überlappenden Sequenzen (merging), das Entfernen nicht biologischer Sequenzen (trimming), die Benennung der Sequenzen (labeling) und die Qualitätsprüfung der Sequenzen (quality filtering). Als Voraussetzung für qualitative Sequenzen wurde ein Maxee von eins (Sequenzen mit einer vorausgesagten Fehlerrate von einer Base pro Sequenz oder mehr wurden entfernt) und eine minimale Sequenzlänge von 300 bp gewählt. Rund 30 % aller Sequenzen konnten diesem Standard gerecht werden (ca. 364 000 Sequenzen). Anschließend wurden die Sequenzen derepliziert (dereplication), wodurch alle Duplikate oder Multiplikate zu einer einzigartigen Sequenz zusammengefasst wurden. Singletons sind Sequenzen, welche nur einmalig auftreten. Sie wurden für die phylogenetische Analyse entfernt, da sie aus einem Sequenzierfehler resultieren können. Sequenzen, die zwei oder mehrere Male gefunden werden können, sind mit großer Wahrscheinlichkeit korrekt. Anschließend wurden aus ähnlichen Sequenzen Cluster gebildet (clustering). Dadurch konnten Chimäre erkannt und herausgefiltert werden. Die ähnlichen Nukleotidsequenzen wurden in einem ersten Schritt sehr streng unter Verwendung einer Distanzmatrix mit 2 % Unähnlichkeit zusammengefasst. Yang und Kollegen (2014) schlugen für *mcrA*-Nukleotidsequenzen einen Schwellenwert (cut-off-value) von 84 % für eine Art vor. Um somit die Nukleotidsequenzen zu einer einzigartigen OTU (operational taxonomic unit) zusammenzufassen, wurden anschließend an das Clustering mit 2 % noch einmal alle Nukleotidsequenzen mit 16 % Unähnlichkeit geclustert. Für die Zuordnung der OTU von *mcrA*-Sequenzen existiert keine automatische Zuweisung zu einer taxonomisch vorhersagbaren Gruppe. Die Zuordnung der Sequenz kann mithilfe eines taxonomischen Stammbaums erfolgen (siehe nächstes Kapitel 2.5.2).

2.5.2 Phylogenetische Zuordnung mithilfe der Software ARB

Die phylogenetische Verrechnung in phylogenetische Stammbäume und die entsprechende Zuordnung der *mcrA*-rRNA-Sequenzdaten erfolgte mit der Phylogenie-Software ARB, Version 5.2 (Ludwig u. a., 2004). Mithilfe dieser Software wurden alle einzigartigen Nukleotidsequenzen (30 OTU, für die Einordnung siehe Tabelle 3.5 und Abbildung 3.25) zu Proteinsequenzen (AA) konvertiert und gegen die *mcrA*-ARB-Datenbank von Dr. Roey Angel (<http://www.staff.uni-marburg.de/~angel/>, Angel 2010) ausgerichtet (aligned). Anschließend wurden 428 *mcrA*-Sequenzen, die nicht in der Datenbank eingeschlossen waren, aus voll sequenzierten Genomprojekten, Genomentwürfen, Teilsequenzen von kultivierten methanogenen Reinkulturen, sowie nah verwandte Umweltsequenzen („BLAST-Suche“) importiert. All diese importierten Sequenzen wurden über die NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder JGI (<http://jgi.doe.gov/>) abgerufen und durch die in ARB enthaltenen FAST-Aligner-Funktion gegen die bereits ausgerichteten Sequenzen in ein Alignment gebracht. Dieses Alignment wurde anschließend manuell überprüft und korrigiert. Da es zu viele neue Sequenzen waren, erwies sich der Parsimony-Algorithmus (Fitch 1971) als ungeeignet. Besser geeignet sind in diesem Fall kladistische Verfahren, z. B. *Maximum-Likelihood*-Algorithmen (Felsenstein 1981), die einem bestimmten Modell für Mutationsereignisse folgen und den phylogenetischen Baum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit suchen (Merkl 2015). Für die neue Berechnung des *Maximum-Likelihood*-phylogenetischen Stammbaums wurden insgesamt 569 Proteinsequenzen verwendet. Rekonstruiert wurde der *Maximum-Likelihood*-Stammbaum unter Verwendung von RAxML (Protein), dem Rapid-Hill-Climbing-Algorithmus, dem evolutionären Modell PROT MIX-JTT, einer Rapid-Bootstrapp-Analyse (100-mal) und dem Aminosäurefrequenzfilter mit der Filterlänge von 154 Aminosäuren (\cong 459 Nukleotiden).

Anschließend wurde die Topologie des neu berechneten Stammbaums mit denen der in der Literatur erwähnten verglichen (Angel 2010). Sie zeigten gute Übereinstimmungen. Falls eine Spezies zwei *mcrA*-Genkopien oder eine *mrtA*-Sequenz enthielt, wurden beide Sequenzen mit einberechnet. Daraufhin wurde die Distanz der OTU-Proteinsequenz auf Grundlage des phylogenetischen Stammbaums zur nächstmöglichen verwandten Spezies berechnet. Für die Einordnung auf Familienebene mussten 75,4 % der Proteinsequenz übereinstimmen (Hunger u. a. 2011). Für eine Zuordnung auf Artebene musste die Übereinstimmung 85,7 % betragen (Hunger u. a. 2011).

2.5.3 Bioinformatische Auswertung mit dem Statistikprogramm RStudio

Statistische Analysen wurden mit dem Statistikprogramm RStudio, Version 3.2.4 (RStudio, Inc), durchgeführt. Für die Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) und die Korrespondenzanalyse (canonical correspondence analysis, CCA) konnte das Erweiterungspaket „vegan“ (Version 2.3-4.) verwendet werden (Oksanen u. a. 2016). Für die Berechnung und Visualisierung des ternären Diagramms (Tenary Plot) wurde das Erweiterungspaket „vcd“ (Version 1.4-1.) verwendet (Meyer u. a.

2006). Für die Rarefraktion-Kurve wurden die Erweiterungspakete „lattice“ (Version 0.19-26.) und „permute“ (Version 0.9-0.) genutzt (Sarkar 2008; Simpson u. a. 2016). Für die Bestimmung der Diversität wurde „phyloseq“ (Version 1.12-2) mit der Funktion „estimate richness“ verwendet (McMurdie und Holmes 2013). Um abzuschätzen, wie hoch der Anteil an der gesamten Artenvielfalt in einer Probe ist, konnte die Good's Coverage ($\text{Coverage} = 1 - [\text{Anzahl der Individuen von einer Art} / \text{Gesamtzahl der Bevölkerung}]$) bestimmt werden (Chao u. a. 1988). Dies erfolgte mit „entropart“ (Version 1.4-5.) (Marcon und Hérault 2015).

Ergebnisse

3.1 Veränderung in der Aktivität der methanogenen Gemeinschaft während eines Inkubationsexperiments bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten

Um die Aktivität der methanogenen Gemeinschaft bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten zu untersuchen, wurde ein Inkubationsexperiment mit variierenden Feuchtigkeitsstufen von zwei verschiedenen Reisfeldböden analysiert (siehe 2.3.4). Die Feuchtigkeitsstufen des Bodens staffelten sich vom raumtrockenen Zustand, über 5 bis 6 Zwischenstufen, bis zum vollständig mit Wasser gesättigten Boden. Alle Bodenproben wurden unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die Proben des italienischen Reisfeldbodens wurden für eine Dauer von 70 Tagen und die Proben des philippinischen Reisfeldbodens für eine Dauer von 77 Tagen inkubiert.

3.1.1 Betrachtung der verschiedenen Bodenparameter

Die Bodenparameter wurden vor und nach dem Inkubationsexperiment bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten untersucht. Bei der Bodenart des italienischen Reisfeldbodens handelte es sich um einen sandig-lehmigen Schluff (Dissertation von Dr. Pump), während die Bodenart des philippinischen Reisfeldbodens ein stark tonige Schluff war (Dissertation von Dr. Breidenbach). Die maximale Wasserhaltekapazität des tonigen philippinischen Reisfeldbodens war doppelt so hoch wie die des sandigen italienischen Reisfeldbodens. Dafür waren im philippinischen Reisfeldboden die Partikeldichte und die Bodendichte etwas niedriger als im italienischen Reisfeldboden. Das Porenvolumen betrug 64 % im philippinischen und 48 % im italienischen Boden. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Bodenparameter des italienischen und philippinischen Reisfeldbodens.

variable	max. water holding capacity (ml g ⁻¹)	particle density (g/cm ³)	bulk density (g/cm ³)	pore space (%)
italian rice field soil	0.4	2.57	1.27	47.9
philippine rice field soil	0.8	2.33	0.83	64.4

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs und des Gesamtkohlenstoffs zeigte, dass der philippinische Boden etwas reicher an Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff war. Die Isotope des Kohlenstoffs im italienischen Reisfeldboden waren etwas leichter mit rund -27 ‰ im Vergleich zu denen im philippinischen Reisfeldboden mit -21 ‰ (Tabelle 3.2).

Der Gesamtstickstoffgehalt änderte sich durch die Inkubation nicht, unabhängig von der Wasserverfügbarkeit. Der Kohlenstoffgehalt schwankte im italienischen Reisfeldboden stärker als im philippinischen Boden. Die Gesamtkohlenstoffmenge war bei den trockeneren Inkubationen etwas höher im Vergleich zur Ausgangsprobe und in den feuchteren Inkubationen etwas niedriger verglichen mit der Ausgangsprobe. Durch die separate Bestimmung des organischen Kohlenstoffs im angesäuerten Boden konnte die Carbonatmenge in jeder Probe bestimmt werden. Insgesamt enthielten trockene sowie feuchtere Bodenproben wenig Carbonat; die maximale Carbonatmenge betrug 0,24 %. Das Isotopenverhältnis des Kohlenstoffs zeigte ähnliche Werte wie die Ausgangsproben des jeweiligen Bodens.

Tabelle 3.2: Stickstoffgehalt, Kohlenstoffgehalt und das Isotopenverhältnis des Kohlenstoffs im italienischen und philippinischen Reisfeldboden.

WHC: prozentuale Wassermenge in den inkubierten Proben bezogen auf die maximalen Wasserhaltekapazität (max. WHC). N_{tot} : Gesamtstickstoffgehalt, C_{tot} : Gesamtkohlenstoffgehalt, C_{org} : organischer Kohlenstoff, $\delta^{13}C_{\text{tot}}$: Isotopenverhältnis des Gesamtkohlenstoffs, $\delta^{13}C_{\text{org}}$: Isotopenverhältnis des organischen Kohlenstoffs

Verwendung des Reisfeldbodens		N_{tot} (%)	C_{tot} (%)	$\delta^{13}C_{\text{tot}}$ (‰)	C_{org} (%)	$\delta^{13}C_{\text{org}}$ (‰)	Carbonat (%)	Umsatz von C_{org} zu CO_2 und CH_4 (%)
Italien	<i>In situ</i>	0,2	1,4	-26,6	1,3 ($\pm 0,03$)	-26,8	0,02	-
	5 % WHC	0,2	1,5	-26,7	1,5 ($\pm 0,11$)	-27,0	0,01	<0,1
	17 % WHC	0,2	1,8	-26,6	1,4 ($\pm 0,00$)	-26,9	0,24	0,6
	54 % WHC	0,2	1,3	-26,7	1,3 ($\pm 0,04$)	-26,8	0,05	2,4
	100 % WHC	0,1	1,3	-26,6	1,1 ($\pm 0,02$)	-26,7	0,13	2,9
Philippinen	<i>In situ</i>	0,2	2,1	-21,1	1,8 ($\pm 0,01$)	-21,5	0,13	-
	15 % WHC	0,2	2,1	-21,2	1,9 ($\pm 0,04$)	-21,6	0,09	<0,1
	40 % WHC	0,2	2,1	-21,1	1,9 ($\pm 0,08$)	-21,7	0,09	1,9
	50 % WHC	0,2	1,9	-21,1	1,8 ($\pm 0,01$)	-21,8	0,06	2,3
	100 % WHC	0,2	2,0	-21,5	1,8 ($\pm 0,01$)	-21,9	0,09	4,0

Aus dem Mittelwert der Bestimmungen des organischen Kohlenstoffs (C_{org}) konnte eine Abschätzung getroffen werden, wie viel organisches Material sich in den Inkubationsproben befand. Geteilt durch die molare Masse des Kohlenstoffs ergibt sich die maximal mögliche Kohlenstoffmenge in Mol, welche unter optimalen Bedingungen theoretisch zu CH_4 und CO_2 umgesetzt werden könnte. Durch den prozentualen Vergleich der real produzierten CH_4 - und CO_2 -Gesamtmenge (Abbildung 3.3, Abbildung 3.7) mit der maximal möglichen Kohlenstoffmenge errechnet sich der Umsatz von Kohlenstoff bei den einzelnen Inkubationen.

3.1.2 Einfluss des Wassergehalts im Inkubationsexperiment auf die Methanproduktion im italienischen Reisfeldboden

Analysiert wurde die Gasproduktion während des laufenden Inkubationsexperiments, vor allem das CH_4 als Indikator für die Aktivität der Methanogenese und das CO_2 als mögliches Substrat für die Methanogenese. Abbildung 3.1 zeigt die Zunahme der CH_4 -Menge über die gesamte Inkubationsdauer von 70 Tagen. Alle mit Wasser gesättigten Reisfeldböden (Wasserhaltekapazität = 100 %) zeigten die maximale CH_4 -Produktion. Für nicht vollständig mit Wasser gesättigte Böden beobachtete man eine Abnahme in der Gesamtmethanproduktion und auch die CH_4 -Raten sanken. Für Bodeninkubationen, welche nur mit minimalen Wassermengen (prozentuale Wasserhaltekapazität < 30 %) durchgeführt wurden, sah man nur eine initiale CH_4 -Produktion, welche ab einem Zeitraum (14. – 20. Tag) wieder abebbte. Eine anaerobe Inkubation ohne die Zugabe von Wasser (Wasserhaltekapazität = 5 %) zeigte keine mikrobiologische Aktivität und auch kein Ausgasen von CH_4 .

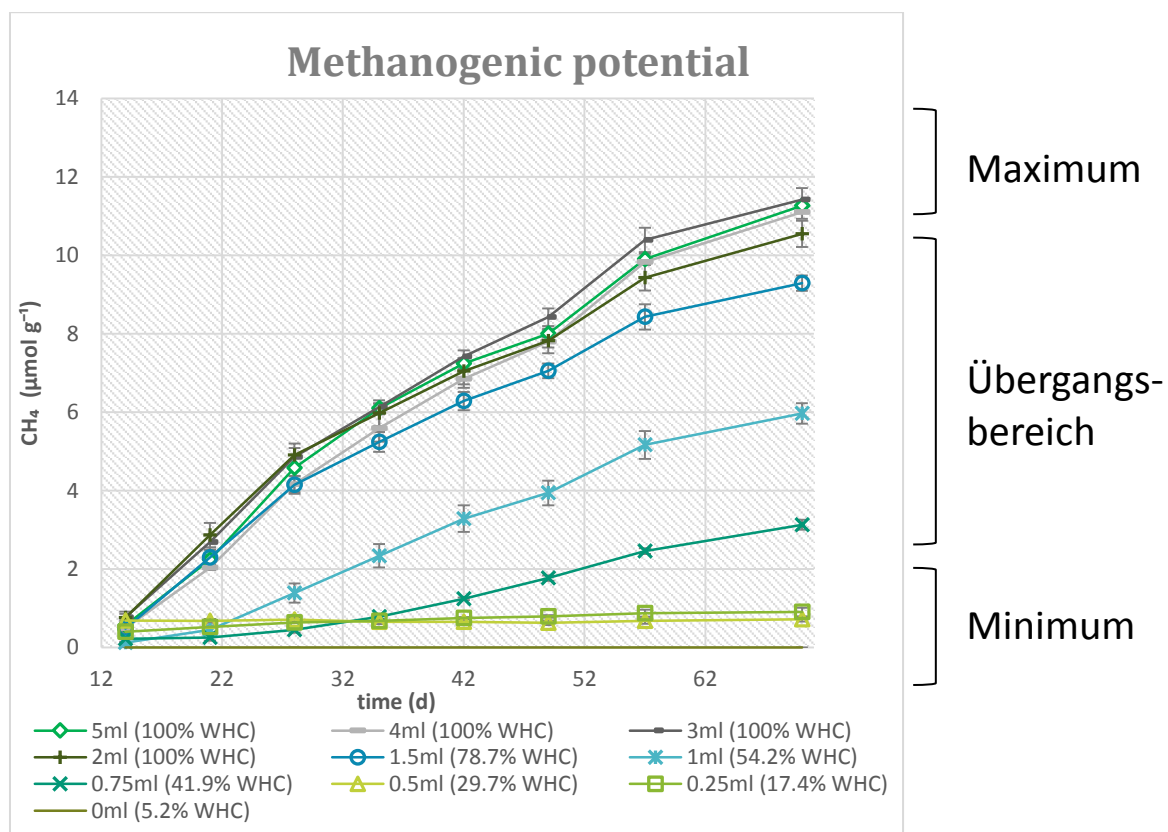


Abbildung 3.1: Methanproduktion im Verlauf eines 70-tägigen Inkubationsexperiments eines italienischen Reisfeldbodens mit unterschiedlichen Wassergehalten. Mit höherem Wassergehalt erreichte die CH_4 -Produktion höhere Werte und wurde je nach Feuchtigkeit in drei Gruppen eingeteilt. Die minimale Gruppe zeigte nur eine geringfügige Methanmenge. Die Übergangsgruppe zeigte mit höheren prozentualen Wassermengen eine höhere Methanmenge und eine etwas längere Anpassungsphase (lag-Phase), in der möglicherweise noch alternative Elektronenakzeptoren vorhanden waren. Die maximale Gruppe, bei der die 100 %-Sättigung erreicht war, zeigte sich die maximale CH_4 -Produktion unabhängig vom überschüssigen Wasser. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

Besonders deutlich wird der Unterschied der initialen CH_4 -Produktion der wenig befeuchteten Proben zur nicht befeuchteten Kontrolle durch Betrachtung der logarithmischen Auftragung (Abbildung 3.2).

Bei allen Inkubationen, in denen die Befeuchtung über 50 % Wasserhaltekapazität betrug, ging die CH₄-Produktion fortlaufend weiter. Bei niedrigeren Wassermengen gab es eine stagnierende Phase. Bei einem prozentualen Wassergehalt von 42 % stieg die CH₄-Produktion nach 21 Tagen wieder an. Bei noch niedrigeren Wassergehalten folgte nach der initialen CH₄-Produktion nur ein sehr langsamer und geringer weiterer Anstieg. Generell konnte mit steigender Wasserverfügbarkeit auch ein Anstieg der CH₄-Gesamtproduktion gezeigt werden (Abbildung 3.3).

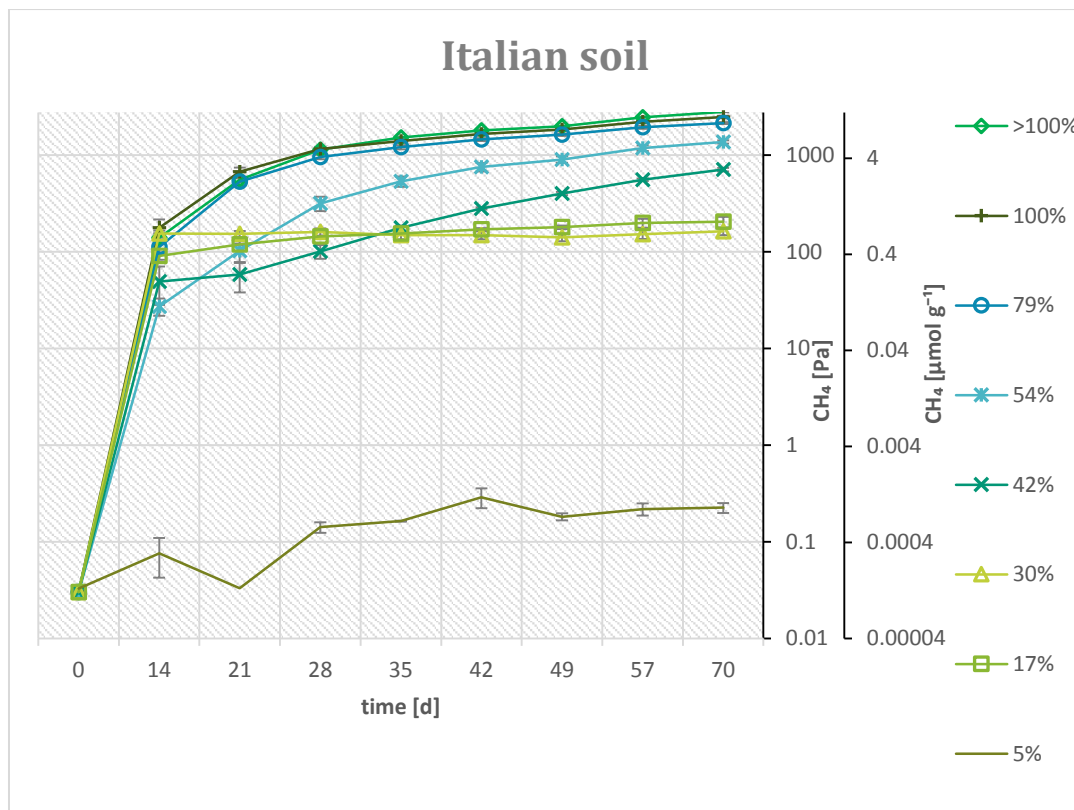


Abbildung 3.2: Die logarithmische Auftragung der CH₄-Produktion (in Pascal oder in $\mu\text{mol pro Gramm Boden}$) im Inkubationsexperiment vom italienischen Reisfeldboden mit unterschiedlicher Befeuchtung, dargestellt über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

Die CO₂-Gesamtproduktion am Ende der Inkubation stieg mit der Wasserverfügbarkeit an (Abbildung 3.3, Abbildung 3.4). Verglichen mit der CH₄-Gesamtproduktion war die CO₂-Gesamtproduktion nicht so stark beeinträchtigt unter niedrigen Wasserverfügbarkeiten. Auch bei sehr trockenen Proben konnte schon eine ansteigende CO₂-Gesamtproduktion gezeigt werden. Dies ist in einem normalisierten Graphen, der die CH₄- und CO₂-Gesamtproduktion verdeutlicht, zu sehen (Abbildung 3.4).

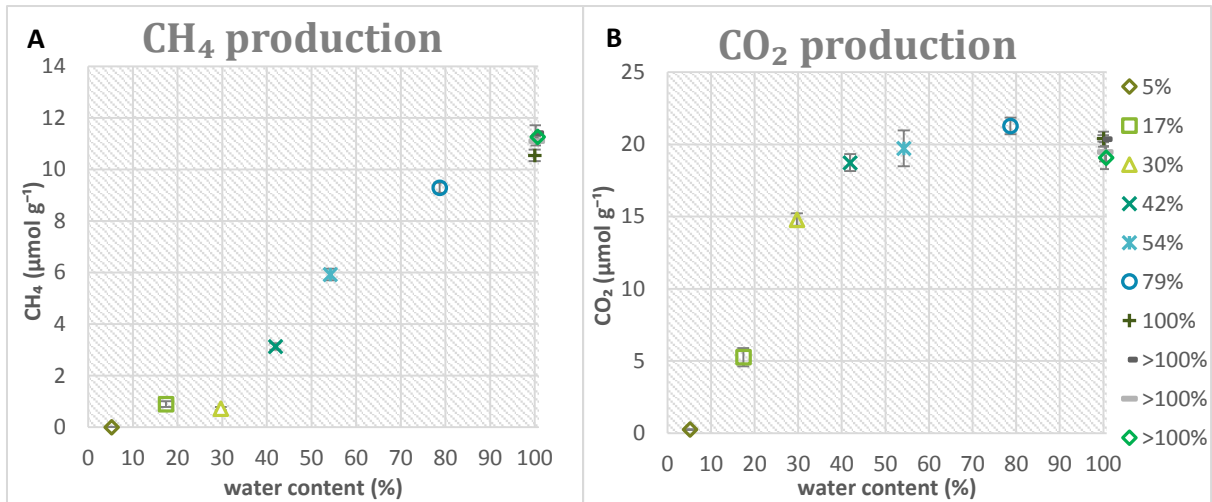


Abbildung 3.3: Die Gesamtproduktion an CH₄ (A), und an CO₂ (B), bei den verschiedenen feuchten Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

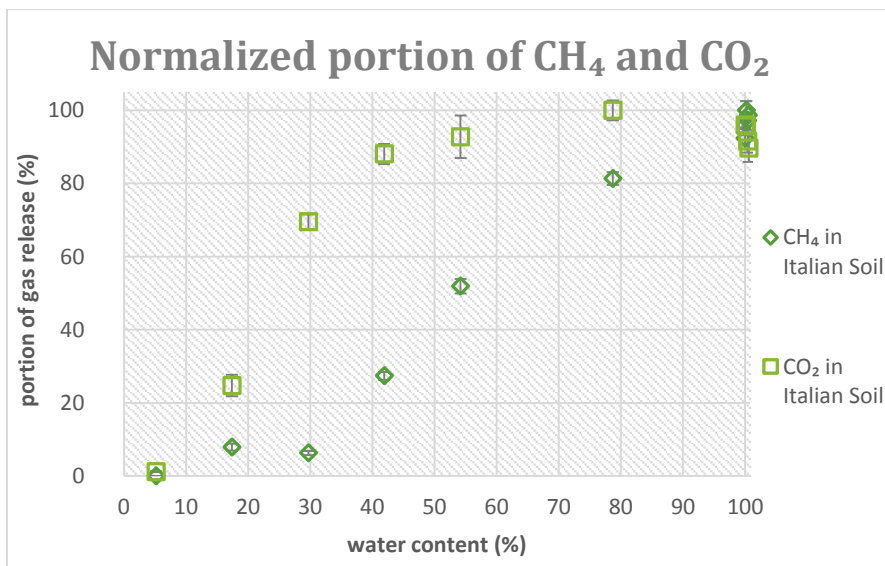


Abbildung 3.4: Normalisierung der Gesamtgaskonzentration (CH₄ und CO₂) am Ende der Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten gegen die maximalen Produktionen unter vollständig gefluteten Bedingungen aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

3.1.3 Einfluss des Wassergehaltes im Inkubationsexperiment auf die Methanproduktion im philippinischen Reisfeldboden

Um eine möglichst umfangreiche Aussage über den Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die CH₄-Produktion zu treffen, wurde ein zweiter Reisfeldboden aus dem Ursprungsland Philippinen analysiert. Die Analyse eines zweiten Reisfeldbodens ermöglicht spätere Aussagen, inwiefern andere Faktoren, wie z. B. die Bodenstruktur, der Gesamtkohlenstoffgehalt oder die initiale mikrobielle Gemeinschaft, die dargestellten Ergebnisse beeinflussen. Für eine verallgemeinerungsfähige Aussage wurde der philippinische Reisfeldboden untersucht und mit dem italienischen Boden verglichen.

Die CH_4 -Produktion im Inkubationsexperiment verhielt sich ähnlich wie es beim italienischen Reisfeldboden beobachtet werden konnte. Zwar konnte der philippinische Reisfeldboden höhere CH_4 -Mengen am Ende der Inkubationszeit aufweisen, aber auch hier gab es nach der initialen CH_4 -Produktion einen weiteren Anstieg, der in der Übergangsgruppe (50–70 % Wasserhaltekapazität) deutlicher zu sehen war (Abbildung 3.5). Bei den minimal feuchten Inkubationen (prozentuale Wasserhaltekapazität < 40 %) folgte (wie bei den Inkubationen des italienischen Bodens) nach der initialen CH_4 -Produktion nur ein sehr geringer weiterer Anstieg (Abbildung 3.5).

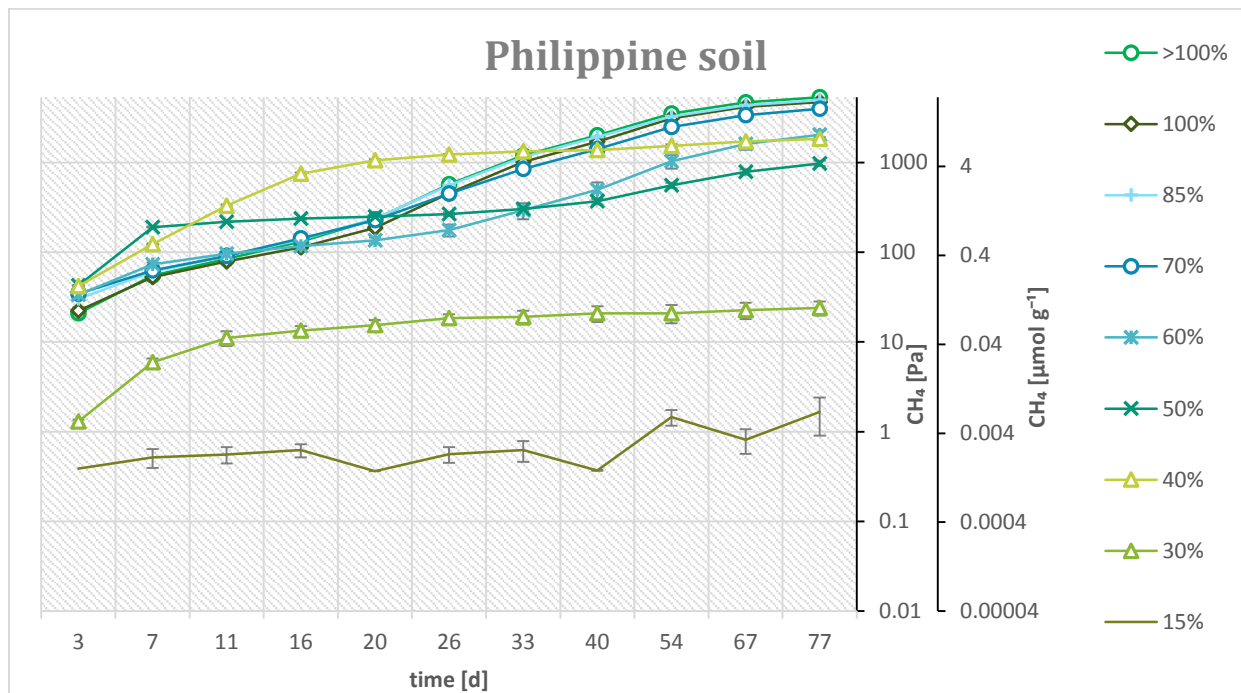


Abbildung 3.5: Die logarithmische Auftragung der CH_4 -Produktion (in Pascal oder in μmol pro Gramm Boden) bei Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

In Abbildung 3.6 sind die aus der CH_4 -Produktionsraten des italienischen Reisfeldbodens ermittelten Werte im Vergleich zu den CH_4 -Produktionsraten des philippinischen Reisfeldbodens dargestellt. Bei sehr schwach befeuchteten Inkubationsproben sind die CH_4 -Produktionsraten jeweils niedrig und dabei in beiden Reisfeldböden ähnlich hoch. Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens mit einem Wassergehalt von über 50 % (bezogen auf die max. Wasserhaltekapazität) zeigten unter vollständig gefluteten Bedingungen höhere CH_4 -Produktionsraten (bis hin zur Verdoppelung).

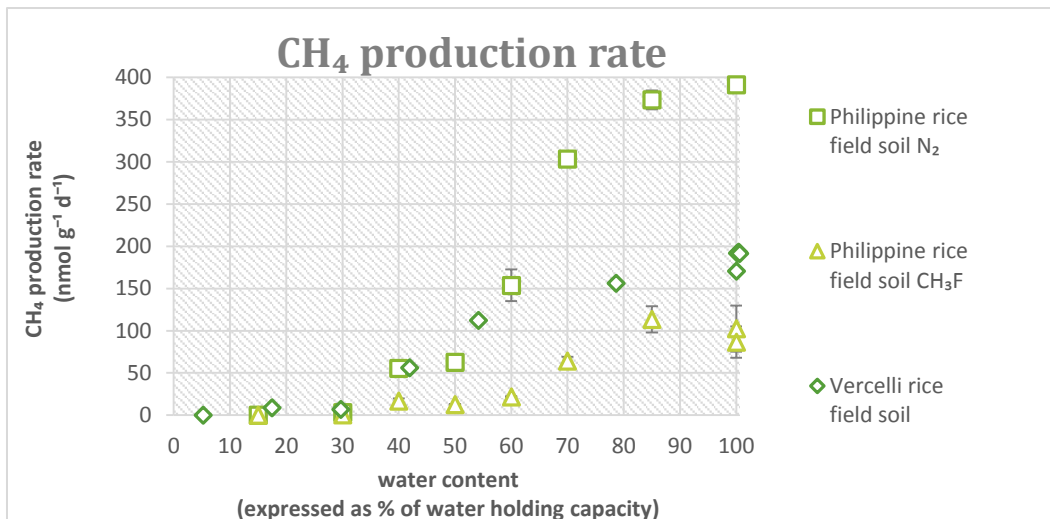


Abbildung 3.6: CH₄-Produktionsraten bei Inkubationen von zwei verschiedenen Reisfeldböden (unter einer N₂-Atmosphäre) bei ansteigenden Wasserverfügbarkeiten. Für den philippinischen Reisfeldboden wurden zusätzlich die CH₄-Produktionsraten unter einer N₂-Atmosphäre mit 2 % CH₃F dargestellt, CH₃F ist ein Inhibitor der acetiklastische Methanogenese. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

Die CH₄-Produktionsraten verhielten sich bei niedrigeren Wasserverfügbarkeiten ähnlich zueinander und unterschieden sich erst bei den relativ feuchten Inkubationen, bei denen die Wassermenge über 60 % der Wasserhaltekapazität lag. Die im Inkubationsexperiment höchsten Raten unter vollständiger Sättigung mit Wasser betragen im philippinischen Boden 391 nmol g⁻¹ d⁻¹ und im italienischen Reisfeldboden 191 nmol g⁻¹ d⁻¹ (Abbildung 3.6). Im Vergleich, zeigte der philippinische Boden ebenfalls eine fast doppelt so hohe Kohlenstoff- und Stickstoffmenge (Tabelle 3.2).

Bei den Inkubationen mit CH₃F (2 % des Gesamtvolumens) konnte gezielt die acetiklastische Methanogenese inhibiert werden. Auch hier stiegen die Raten mit steigender Bodenfeuchtigkeit an (Abbildung 3.6). Die Endkonzentration von CH₄ in den inhibierten Inkubationen machte ungefähr 30 % der nicht gehemmten Endkonzentration von CH₄ aus (Abbildung 6.1). Die höchsten Methanraten wurden hier ebenfalls bei den stark befeuchteten Inkubationen gemessen mit 113 und 102 nmol g⁻¹ d⁻¹ bei 85 % und 100 % Wasserverfügbarkeit (prozentuale Werte im Vergleich zu der max. Wasserhaltekapazität).

Ähnlich wie bereits für den italienischen Reisfeldboden wurden auch für den philippinischen Boden die gesamten Gaskonzentrationen (Abbildung 3.7) zueinander normalisiert, um den Startpunkt der CH₄- und CO₂-Produktion miteinander zu vergleichen. Die normalisierte relative Gaskonzentration von der CO₂- Gesamtproduktion und der CH₄-Gesamtproduktion zeigte in der inhibierten und nicht inhibierten Inkubation einen direkten Anstieg an CO₂ mit steigender Wasserverfügbarkeit und einen CH₄-Anstieg ab einer Wasserverfügbarkeit von 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität (Abbildung 3.8). Die CO₂-

Endkonzentrationen zeigten bei der inhibierten und nicht inhibierten Inkubation vergleichbare Werte für die jeweiligen Wasserverfügbarkeiten (Daten nicht aufgeführt).

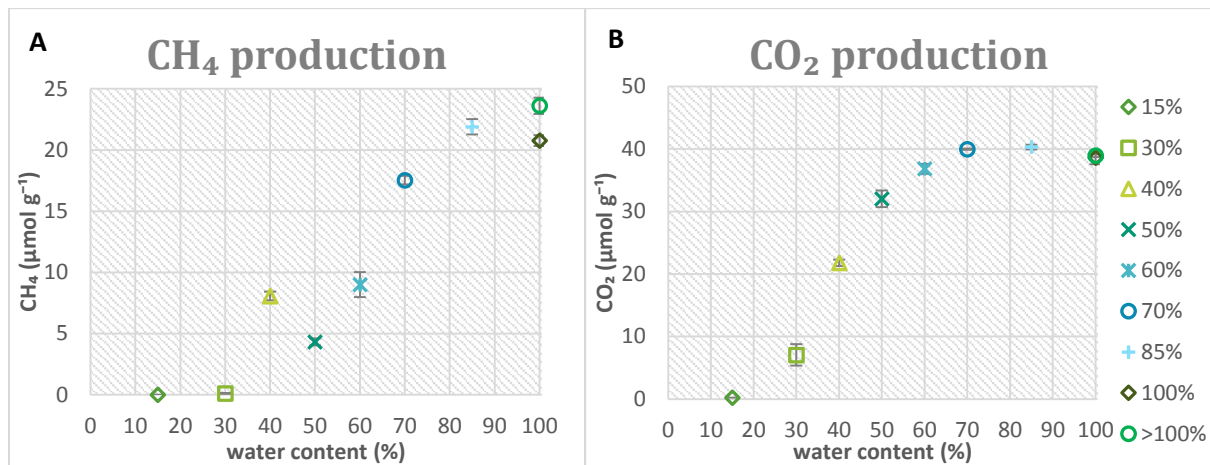


Abbildung 3.7: Die Gesamtproduktion des CH₄ (A) und des CO₂ (B) bei den unterschiedlich feuchten Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

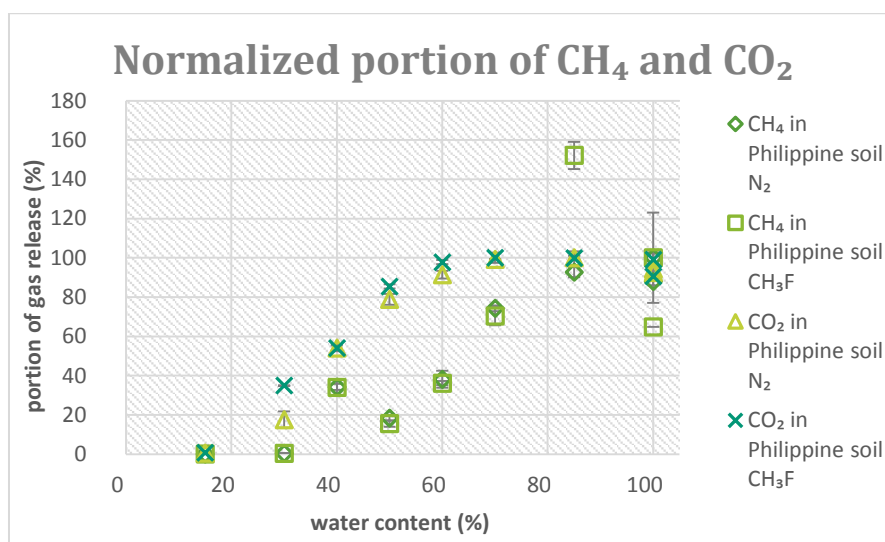


Abbildung 3.8: Normalisierung der Gesamtgaskonzentration am Ende der Inkubationszeiten bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten von CH₄ und CO₂ gegen die maximalen Produktionen bei vollständig gefluteten Böden aufgetragen. Für absolute Werte siehe Abbildung 3.5. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

3.2 Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die Verteilung der Methanemission über den acetiklastischen und hydrogenotrophen Produktionsweg

3.2.1 Stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung

Die Isotopensignatur des Kohlenstoffs im CH₄ und im CO₂ wurde in den Inkubationen mit den verschiedenen Feuchtigkeitsstufen gemessen. Die Änderung in dem Isotopensignal resultiert daraus,

dass bei verschiedenen Biosynthesewegen die entsprechenden Enzyme das leichte Kohlenstoffatom dem etwas schwereren Kohlenstoffisotop unterschiedlich stark bevorzugen. In Umweltproben wird oft der angenäherte Fraktionierungsfaktor α verwendet ($\alpha = (\delta\text{CO}_2 + 10^3)/(\delta\text{CH}_4 + 10^3)$). Dieser angenäherte Fraktionierungsfaktor kann ein Indikator für hydrogenotrophe oder acetiklastische Methanogenese in diesen Proben sein.

Die Abbildung 3.9 zeigt die Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 aufgetragen über die Kohlenstoffisotopensignatur im CO_2 im italienischen Reisfeldboden. Die Hilfslinien zeigen den Fraktionierungsfaktor α . Mit steigenden α -Werten steigt auch der prozentuale Anstieg an hydrogenotrophen Methanogenen. Bei den Inkubationen mit den verschiedenen Feuchtigkeitsstufen ist ein Trend von eher acetiklastisch beeinflussten α -Werten in trockenen Proben zu mehr hydrogenotroph beeinflussten α -Werten in feuchteren Proben erkennbar. Die feuchten Inkubationen zeigen am Ende α -Werte von circa 1,043 und diese sind damit höher als die der trockenen Proben.

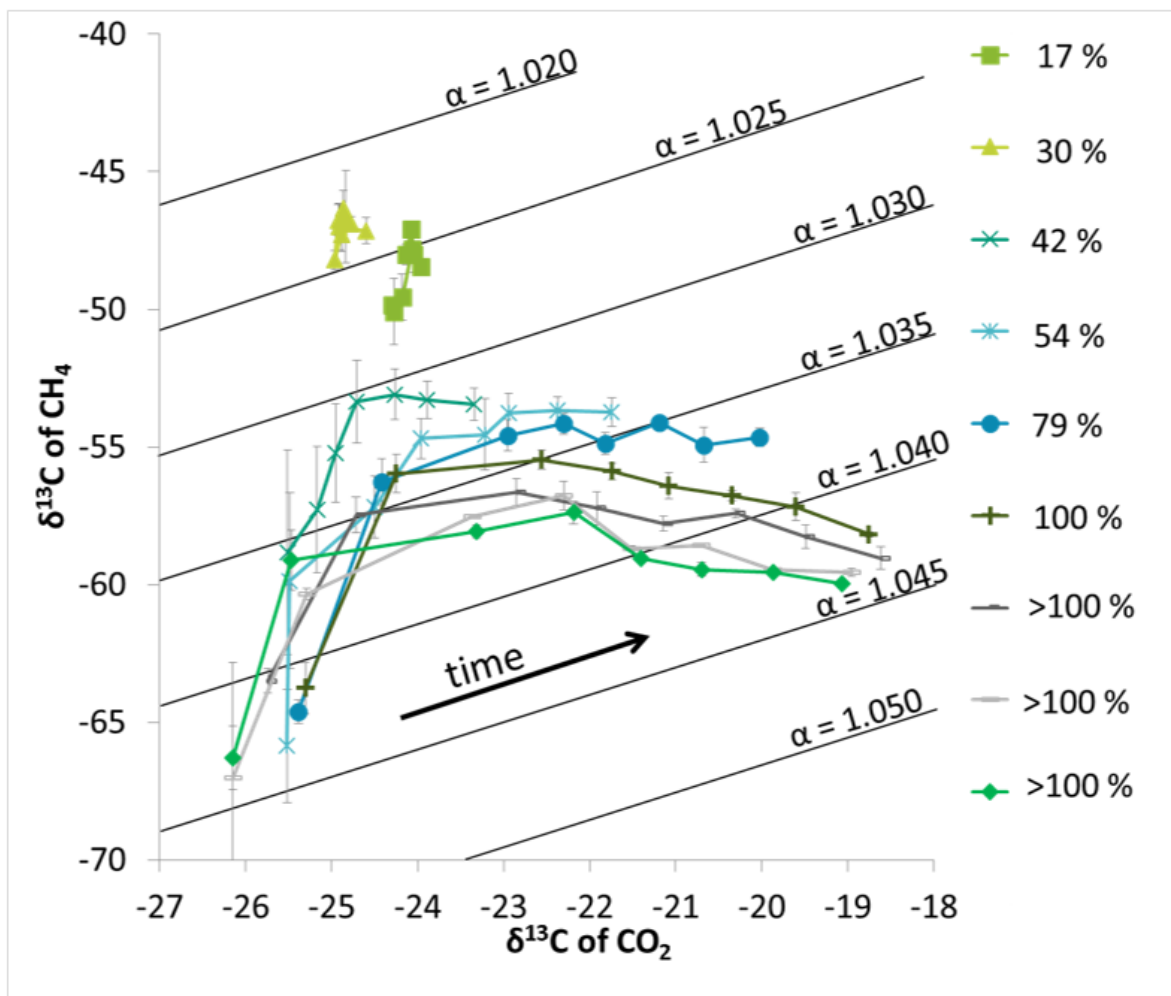


Abbildung 3.9: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 über die Kohlenstoffisotopensignatur im CO_2 bei den Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$). Die schrägen Hilfslinien zeigen den angenäherten Fraktionierungsfaktor α ; die Berechnung erfolgte mit der Formel $\alpha = (\delta\text{CO}_2 + 10^3)/(\delta\text{CH}_4 + 10^3)$.

Da die CH_4 -Konzentration kontinuierlich mit der Zeit anstieg, kann für einen direkteren zeitlichen Verlauf die Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 über die CH_4 -Konzentration dargestellt werden (Abbildung 3.10).

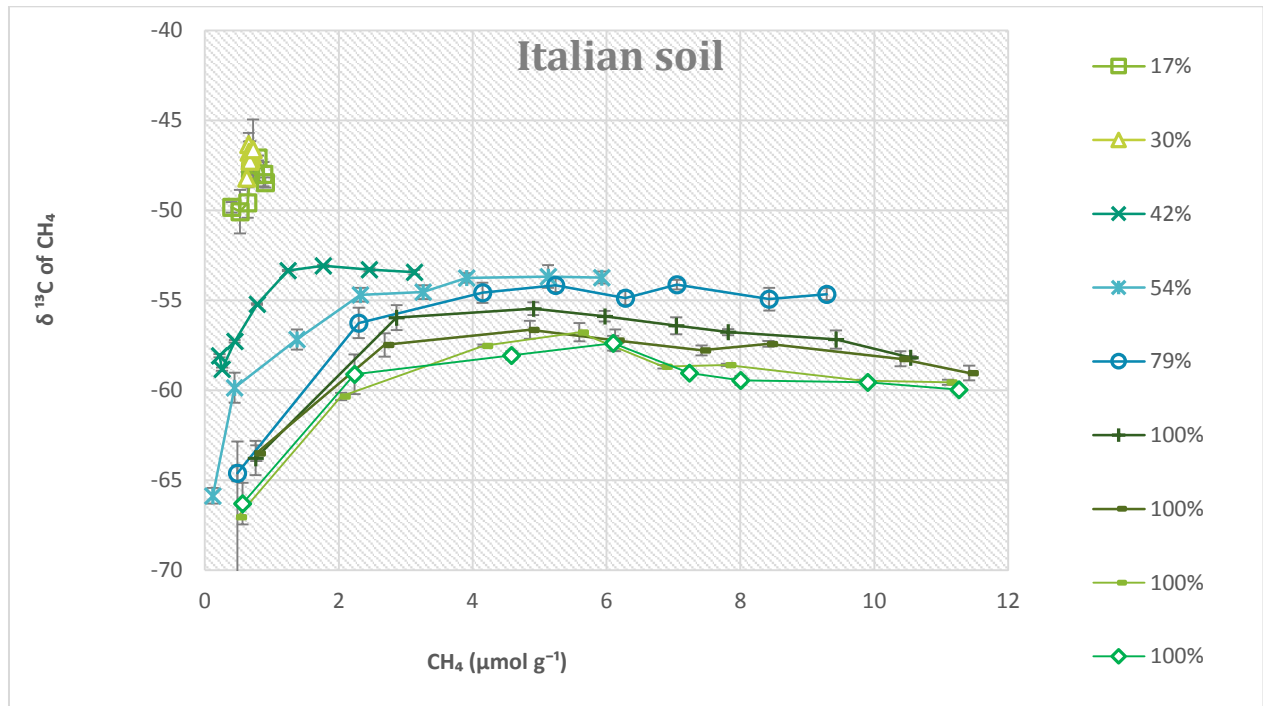


Abbildung 3.10: Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 über die kontinuierlich steigende CH_4 -Konzentration bei den Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

Bei den Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens wurden ebenfalls die Kohlenstoffisotopensignaturen im CH_4 über die im CO_2 aufgetragen (Abbildung 3.11). Ähnlich wie beim italienischen Reisfeldboden konnte auch hier der angenäherte Fraktionierungsfaktor α bestimmt werden, der mithilfe der schrägen Hilfslinien abgelesen werden kann. Bodeninkubationen mit niedrigen Wasserverfügbarkeiten zeigen eine Tendenz zu niedrigeren α -Werten und damit ein eher acetiklastisches Signal. Bei den feuchteren Inkubationen zeigen die Anfangswerte länger ein hydrogenotrophes Signal und gehen dann auch in ein mehr acetiklastisches Signal über. In den mit Methylfluorid gehemmten Inkubationen (Abbildung 6.2) liegen die α -Werte ausschließlich im hydrogenotrophen Bereich ($\alpha \geq 1,045$) und zeigen eine Änderung über den Wassergehalt von über 40 ‰. Dadurch erreichten feuchte Inkubationen mit 2 % CH_3F sehr niedrige Kohlenstoffisotopensignaturen im CH_4 (Abbildung 6.3). Die höchste CH_4 -Konzentration in den mit Methylfluorid gehemmten Inkubationen erreichte die feuchte Inkubation mit 8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Abbildung 6.3).

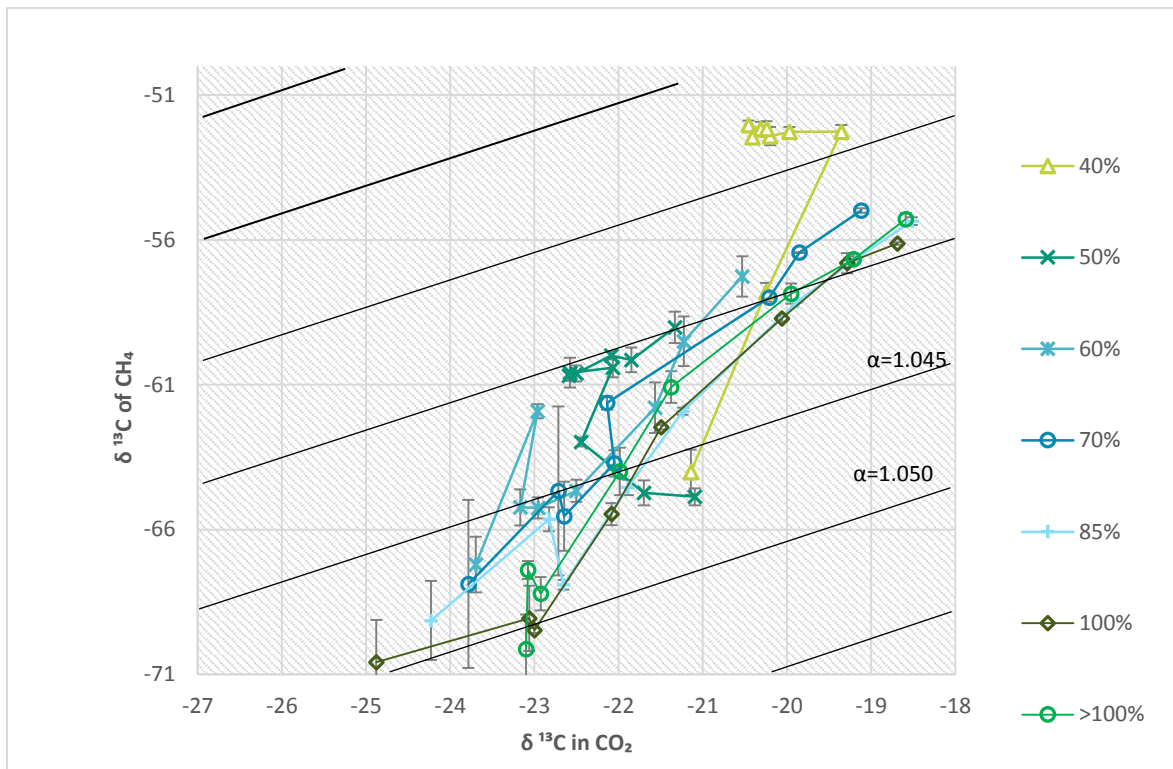


Abbildung 3.11: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 über die Kohlenstoffisotopensignatur im CO_2 in den Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten unter N_2 -Atmosphäre. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$). Die schrägen Hilfslinien zeigen den angenäherten Fraktionierungsfaktor α . Die Berechnung erfolgte mit der Formel $\alpha = (\delta\text{CO}_2 + 10^3)/(\delta\text{CH}_4 + 10^3)$.

Mit der Auftragung der jeweiligen Kohlenstoffisotopensignaturen des philippinischen Reisfeldbodens kann der zeitliche Verlauf nur schwer dargestellt werden. Die Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 über die kontinuierlich steigende CH_4 -Konzentration stellt die Signale über den indirekten zeitlichen Verlauf dar (Abbildung 3.12).

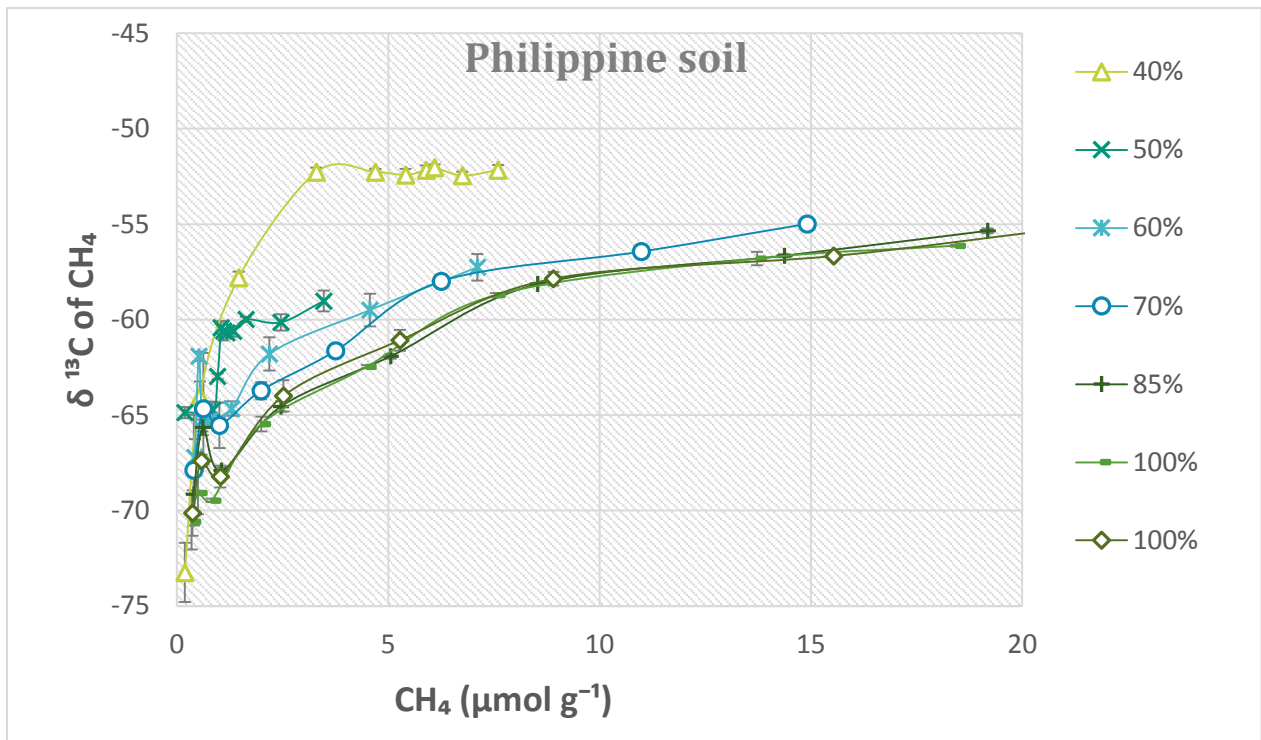


Abbildung 3.12: Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ über die kontinuierlich steigende CH₄-Konzentration bei den Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

Für die Inkubation des philippinischen Reisfeldbodens konnte der Anteil an hydrogenotrophen Methanogenen berechnet werden, was in Abbildung 3.13 gezeigt ist. Dies ist abhängig von der CH₄-Konzentration. Wenn sie nicht detektierbar war, konnte der Anteil für den frühen Zeitpunkt nicht berechnet werden. Gezeigt wird die Veränderung des hydrogenotrophen Anteils über die sechs Zeitpunkte. Trockene Proben sanken sehr schnell auf einen Anteil von 65 % ab, während feuchtere Proben noch bei einem Anteil von mindestens 80 % lagen. Später sank bei allen Inkubationen der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese ab. Während bei trockeneren Inkubationen der Anteil bei circa 60 % verblieb, pendelte er sich bei den feuchteren Proben (85–100 % Wasserhaltekapazität) bei ungefähren 30–40 % ein. Generell konnte ein Trend von hydrogenotropher zur acetiklastischen Methanogenese bei allen Inkubationen beobachtet werden.

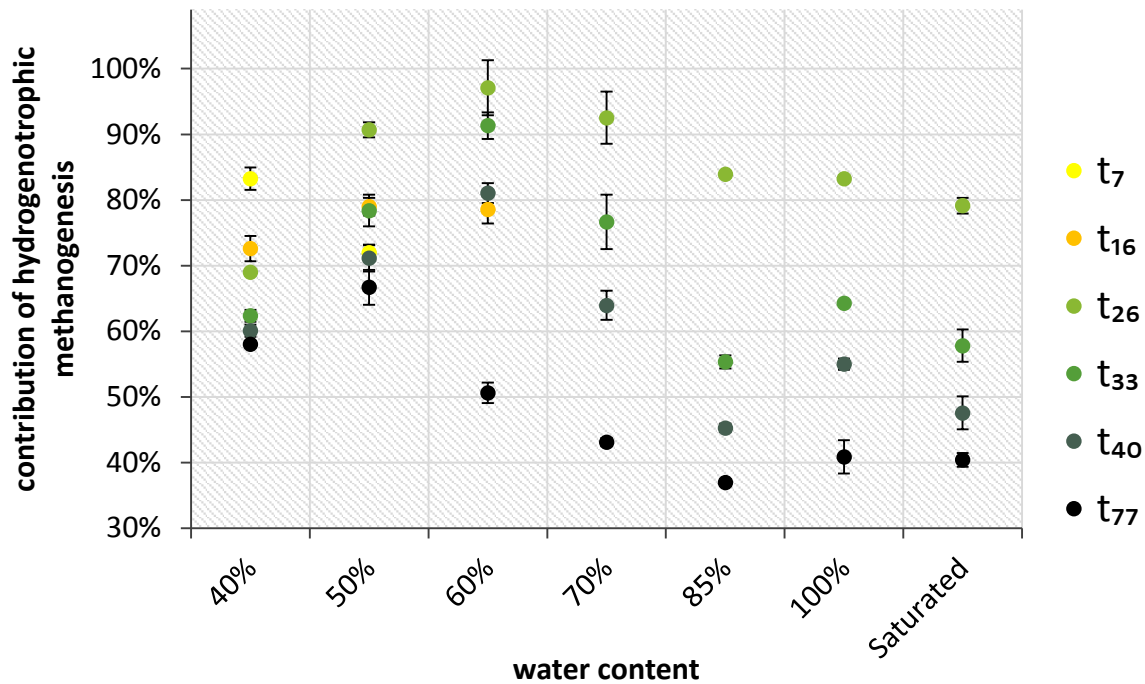


Abbildung 3.13: Veränderungen des Anteils der hydrogenotrophen Methanogenese über sechs Zeitpunkte der Inkubation, sofern die gemessenen CH_4 -Konzentrationen detektiert werden konnten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

3.2.2 Einfluss auf intermediäre Fermentationsprodukte

Um besser zu verstehen, inwiefern sich der anaerobe Abbau bei unterschiedlichen Wasserverfügbarkeiten ändert, wurde neben dem Einfluss auf die CH_4 -Produktion auch die Produktion von intermediären Fermentationsprodukten (Formiat, Acetat, Propionat und Butyrat) verfolgt. Die Inkubationen von Böden mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten zeigten einen normalen Abbau der kurzkettigen Fettsäuren durch Methanogene zu CH_4 und CO_2 . Acetat war nur in geringen Mengen detektierbar, in seltenen Fällen wurde auch Propionat detektiert (Abbildung 3.14, Abbildung 3.15, Abbildung 3.16). Nur bei der Inkubation mit CH_3F akkumulierten Acetat und Propionat. Die Kohlenstoffisotopensignaturen im Acetat waren in den mit CH_3F inhibierten Inkubationen gleich oder leichter im Vergleich zu den Inkubationen unter reinem N_2 , wo das leichtere Acetat bevorzugt verbraucht wurde. Ebenfalls zeigte die Kohlenstoffisotopensignatur im Propionat relativ leichte Werte bei feuchteren Inkubationen. Bei allen Inkubationen wurde keine Anhäufung von Formiat oder Butyrat beobachtet.

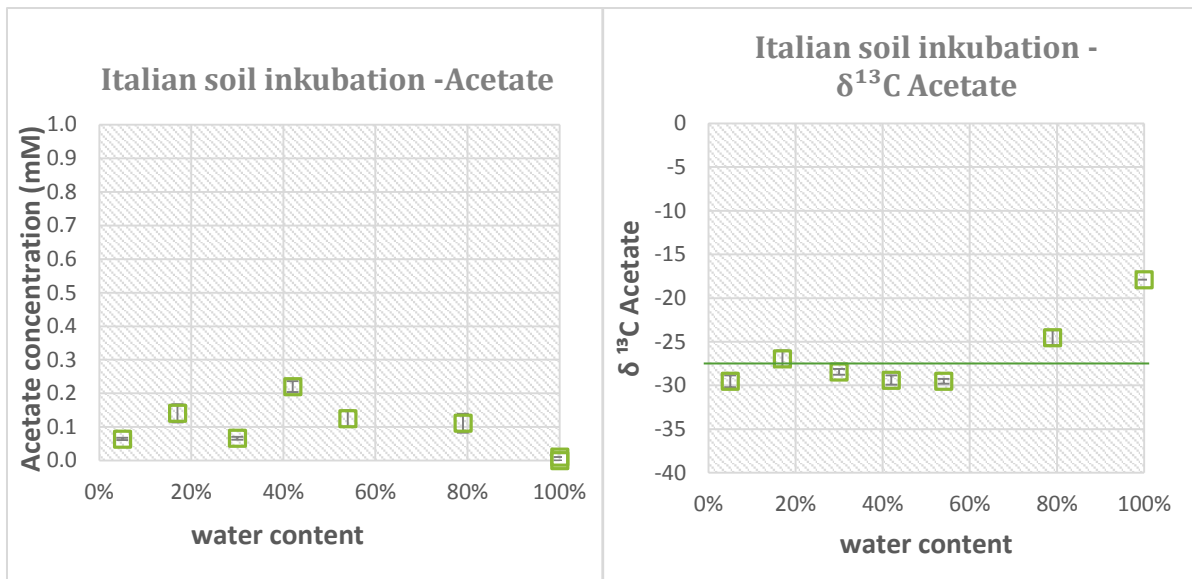


Abbildung 3.14: Der Verlauf der Acetatkonzentration und der Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat über die Wasserverfügbarkeit im italienischen Reisfeldboden unter N_2 -Atmosphäre. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$). Die horizontale Linie zeigt die Kohlenstoffisotopensignatur in dem organischen Kohlenstoff (Tabelle 3.2) im Vergleich zur Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat (Symbole).

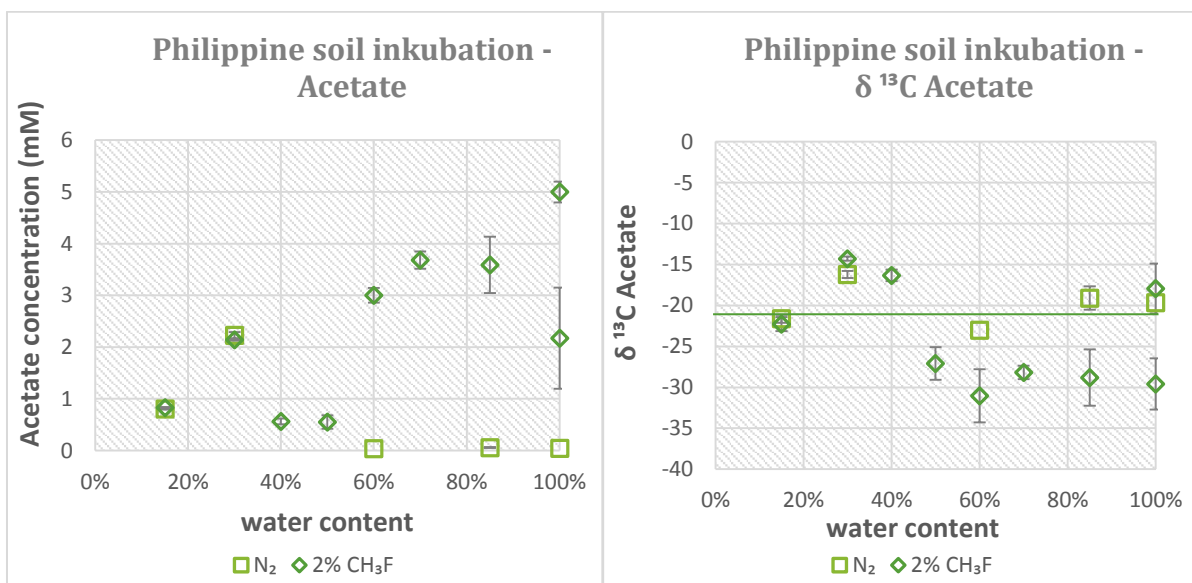


Abbildung 3.15: Der Verlauf der Acetatkonzentration und der Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat über die Wasserverfügbarkeit im philippinischem Reisfeldboden unter N_2 -Atmosphäre und einer N_2 -Atmosphäre mit 2 % CH_3F . Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$). Die horizontale Linie zeigt die Kohlenstoffisotopensignatur in dem organischen Kohlenstoff (Tabelle 3.2) im Vergleich zur Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat (Symbole).

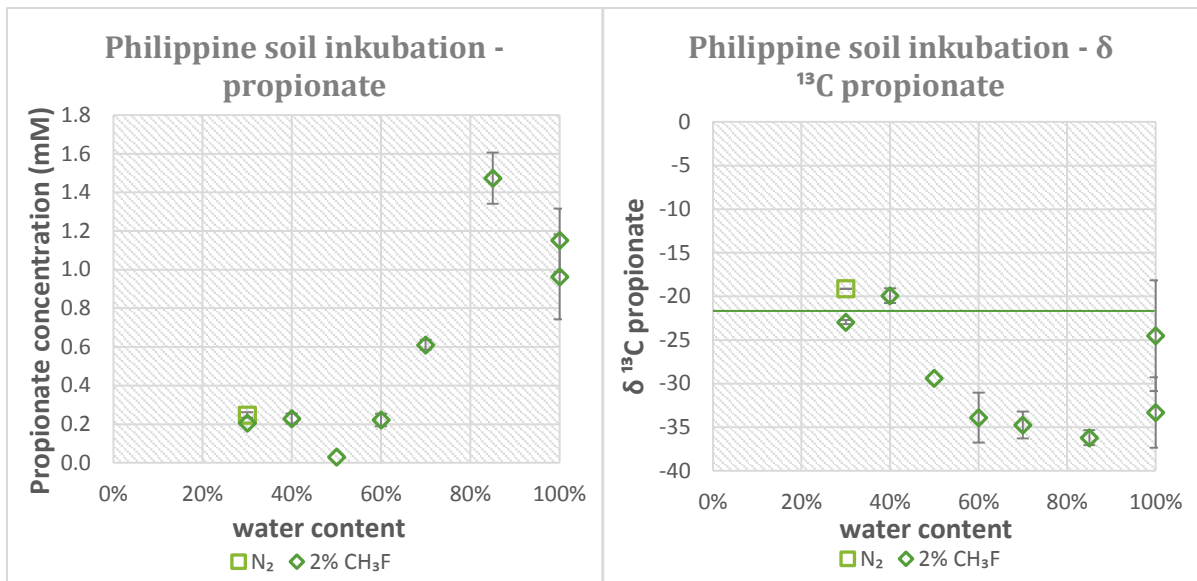


Abbildung 3.16: Der Verlauf der Propionatkonzentration und der Kohlenstoffisotopensignatur im Propionat über die Wasserverfügbarkeit im philippinischem Reisfeldboden unter N₂-Atmosphäre und einer N₂-Atmosphäre mit 2% CH₃F. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3). Die horizontale Linie zeigt die Kohlenstoffisotopensignatur im organischen Kohlenstoff (Tabelle 3.2) im Vergleich zur Kohlenstoffisotopensignatur im Propionat (Symbole).

Der pH-Wert änderte sich nicht bei den mit 2 % CH₃F gehemmten Inkubationen im Vergleich zu den nicht gehemmten Inkubationen (Abbildung 3.17).

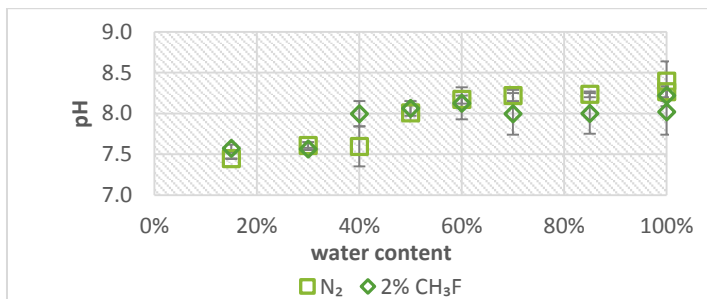


Abbildung 3.17: pH-Werte des inkubierten philippinischen Reisfeldbodens unter N₂-Atmosphäre im Vergleich zur N₂-Atmosphäre mit 2% CH₃F. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

3.3 Veränderung der methanogenen Gemeinschaft am Ende eines Inkubationsexperiments mit verschiedenen Feuchtigkeitsgehalten

3.3.1 Quantifizierung der phylogenetischen Gruppen und der Aktivität der Methanogenen

Die Quantifizierung der Archaeen, mit dem archaeellen 16S-rRNA-Gen, und der Methanogenen mit dem *mcrA*-Gen erfolgte durch Messungen mittels quantitativer PCR (qPCR). Die Zahl der Genkopien dieser zwei Gene blieb über die Inkubationen mit verschiedenen Feuchtigkeitsverfügbarkeiten konstant (Abbildung 3.18). Der Feuchtigkeitsgehalt hat somit keinen Einfluss auf die Populationsgröße der Methanogenen im Reisfeldboden. Anschließend erfolgte noch eine Quantifizierung der Transkripte des *mcrA*-Gens. Hier konnte gezeigt werden, dass die Feuchtigkeitsverfügbarkeiten einen Einfluss auf die Anzahl der verfügbaren Transkripte aufwiesen. Dies war sowohl beim italienischen als auch beim philippinischen Reisfeldboden zu beobachten (Abbildung 3.19, Abbildung 3.20). Bei den Inkubationsbedingungen ohne die Zugabe von Wasser (Wasserhaltekapazität = 5 %) waren Transkriptmengen von 10^6 Kopien zu finden und nur durch eine leichte Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes verdoppelten sich die Kopienzahlen im philippinischen Reisfeldboden (Wasserhaltekapazität = 40 %) oder stiegen auf bis zu 10^8 Kopien im italienischen Reisfeldboden (Wasserhaltekapazität = 17 %) an. In feuchteren Inkubationen wurden maximale Transkriptmengen von 10^8 – 10^9 beobachtet. Die Kopienzahlen im philippinischen Boden waren immer etwas niedriger als die im italienischen Reisfeldboden.

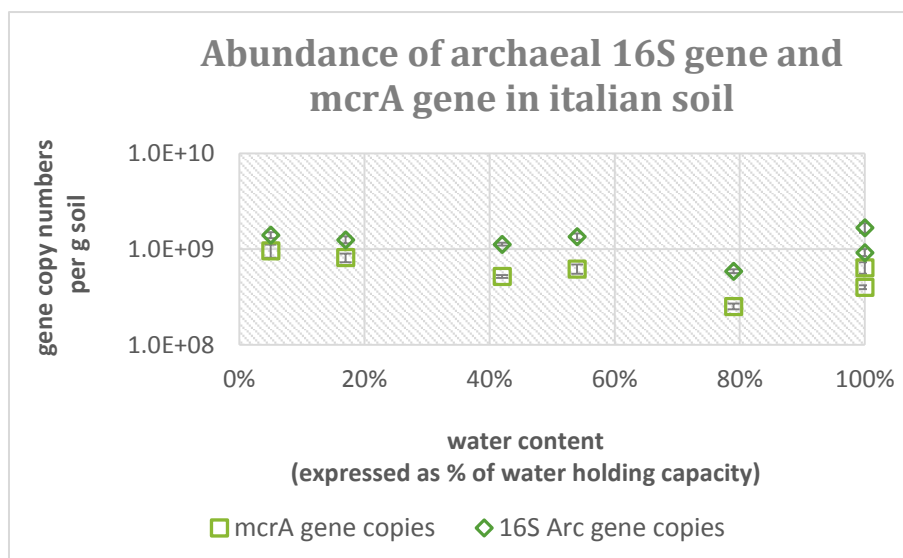


Abbildung 3.18: Quantifizierung der Archaeen und der Methanogenen auf DNA-Ebene mit dem jeweiligen Markergen, archaeellen 16S-rRNA-Gen und dem *mcrA*-Gen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

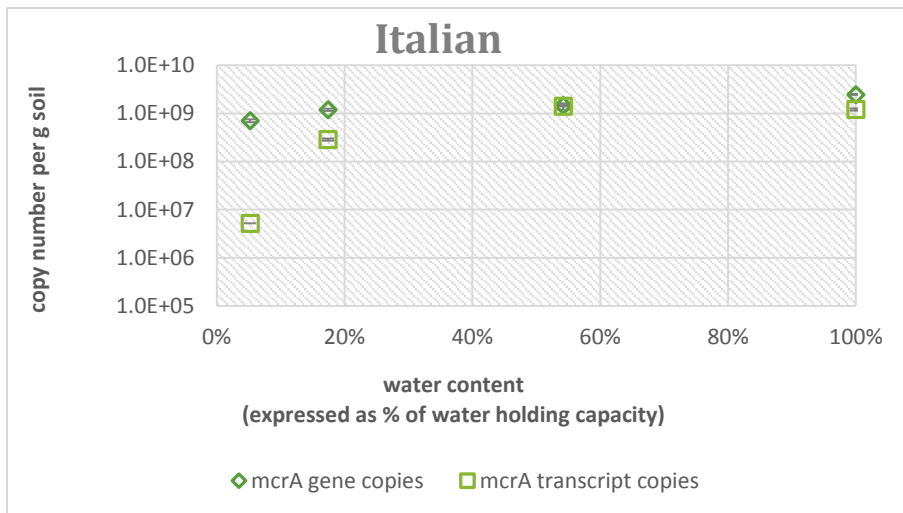


Abbildung 3.19: Vergleich der *mcrA*-Gen-Kopienzahlen mit den *mcrA*-Transkripten im italienischen Reisfeldboden; Inkubationen bei vier verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n=9).

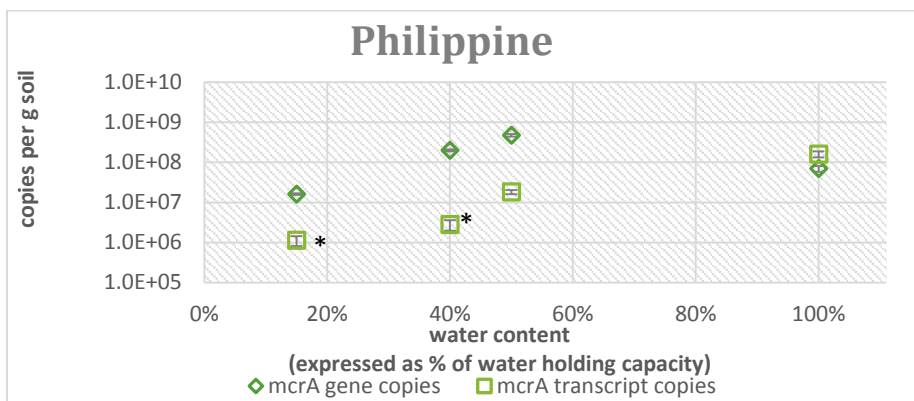


Abbildung 3.20: Vergleich der *mcrA*-Gen-Kopienzahlen mit den *mcrA*-Transkripten im philippinischen Reisfeldboden; Inkubationen unter 4 Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n=9, ausgenommen *, hier SE n=6)

3.3.2 Untersuchung der mikrobiellen Diversität der Archaeen mittels T-RFLP-Methode

Im italienischen Reisfeldboden wurde die T-RFLP-Methode angewandt, um ein aussagekräftiges Ergebnis über die archaeellen Gemeinschaft bei verschiedenen Feuchtigkeitsstufen zu bekommen. Verwendet wurden für die T-RFLP-Methode der Vorwärtsprimer 109f und der rückwärtsmarkierte Primer 934r[fam] (Tabelle 2.10). Um die Veränderung unter dem Aspekt der Wasserverfügbarkeit zu analysieren, wurde anhand der mikrobiellen Diversität der Archaeen (ermittelt durch die T-RFLP) eine CCA (canonical correspondence analysis) durchgeführt. Die Abbildung 3.21 zeigt, dass die Wasserverfügbarkeit ein Faktor ist, der die relative Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflusst. Mit der CCA kann 13,6 % der Inertia (Trägheit), einem Maß für die Streuung der Daten, erklärt werden.

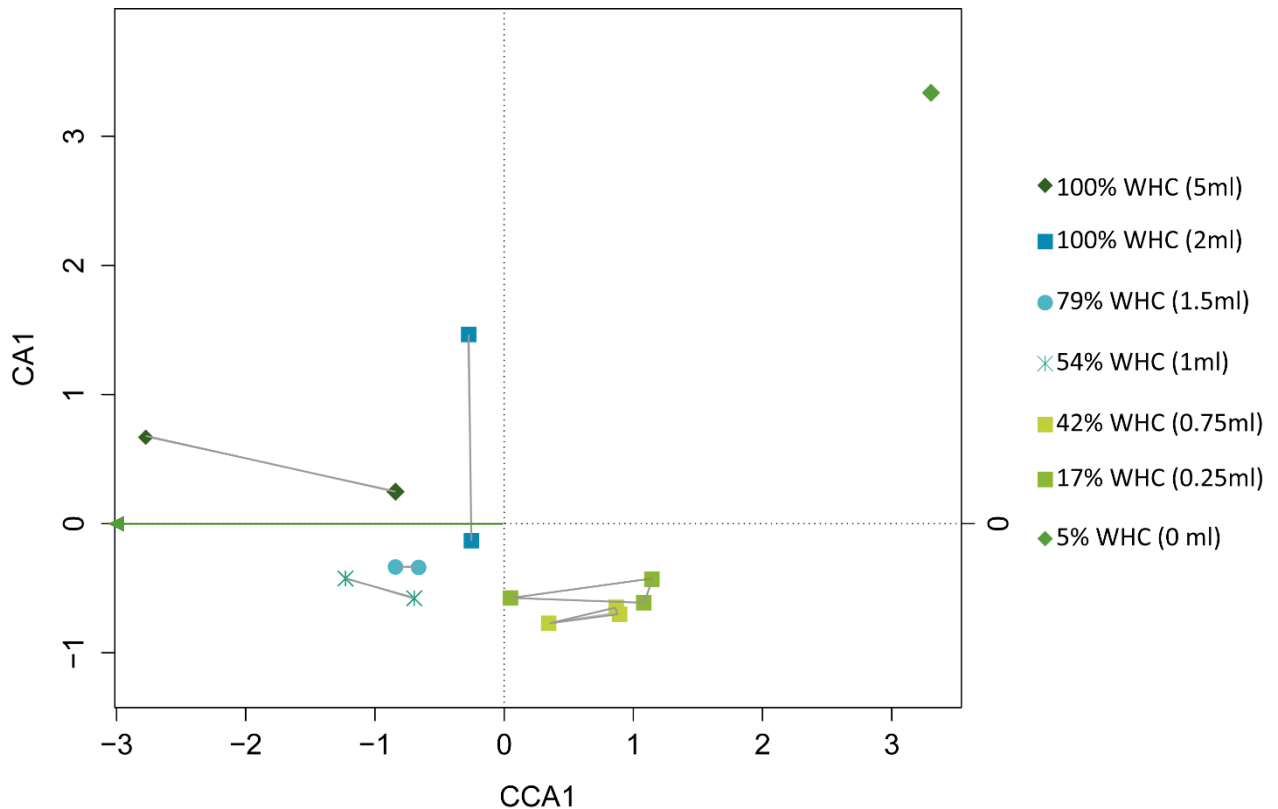


Abbildung 3.21: Kanonische Korrespondenzanalyse (CCA) basierend auf den Ergebnissen der T-RFLP-Methode des archaeellen 16S-rRNA Gens. Der Pfeil zeigt den Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft.

Für die Zuordnung einzelner T-RF zu entsprechenden phylogenetischen Gruppen konnten vorhandene Klonbibliotheken von früheren Studien genutzt werden, in denen ebenfalls italienische Reisfeld- oder andere Reisfeldböden unter gefluteten Bedingungen untersucht wurden (Tabelle 2.15) (Lueders und Friedrich 2000; Glissman u. a. 2004; Lü und Lu 2012).

Die gesamte Diversität über die verschiedenen Feuchtigkeitsgehalte der archaeellen Population ist in der Abbildung 3.22 gezeigt. Acht der 27 T-RF konnten möglichen Methanogenen zugeordnet werden (Abbildung 3.23). Diese T-RF kamen in Signalstärken von 2–35 % vor. Mit geringer Signalintensität waren die T-RF 78, 183, 186 und 390 nachweisbar. Das 184 bp-T-RF einer *Methanosarcinales*-Linie war dominant, gefolgt von 392 bp-T-RF, welches den Vertretern von vier Linien zugeordnet werden kann (*Methanocellales*, *Methanobacteriaceae*, Rice Cluster II und der *Creanarchaeota 1.3*). Weitere relativ stark vertretene T-RF waren das 282/284 bp-T-RF, welches zu einer *Methanosaetaceae*-verwandten Gruppe gehört und der 88 bp-Peak welcher zu *Methanobacteriaceae*-verwandten Gruppe gehört.

In den verschiedenen methanogenen Gruppen wurde die relative Häufigkeit der *Methanobacteriales* und *Methanosarcinales* bei Inkubationen mit niedriger Wasserverfügbarkeit leicht erhöht, während *Methanosaetacea* bei feuchten Bedingungen häufiger zu sein schien. Bei dem 183 bp-Peak waren

keine klaren Tendenzen zu sehen, bei nassen und trockenen Bedingungen war die Signalstärke ziemlich hoch, aber bei Übergangsbedingungen sank die Signalstärke ab.

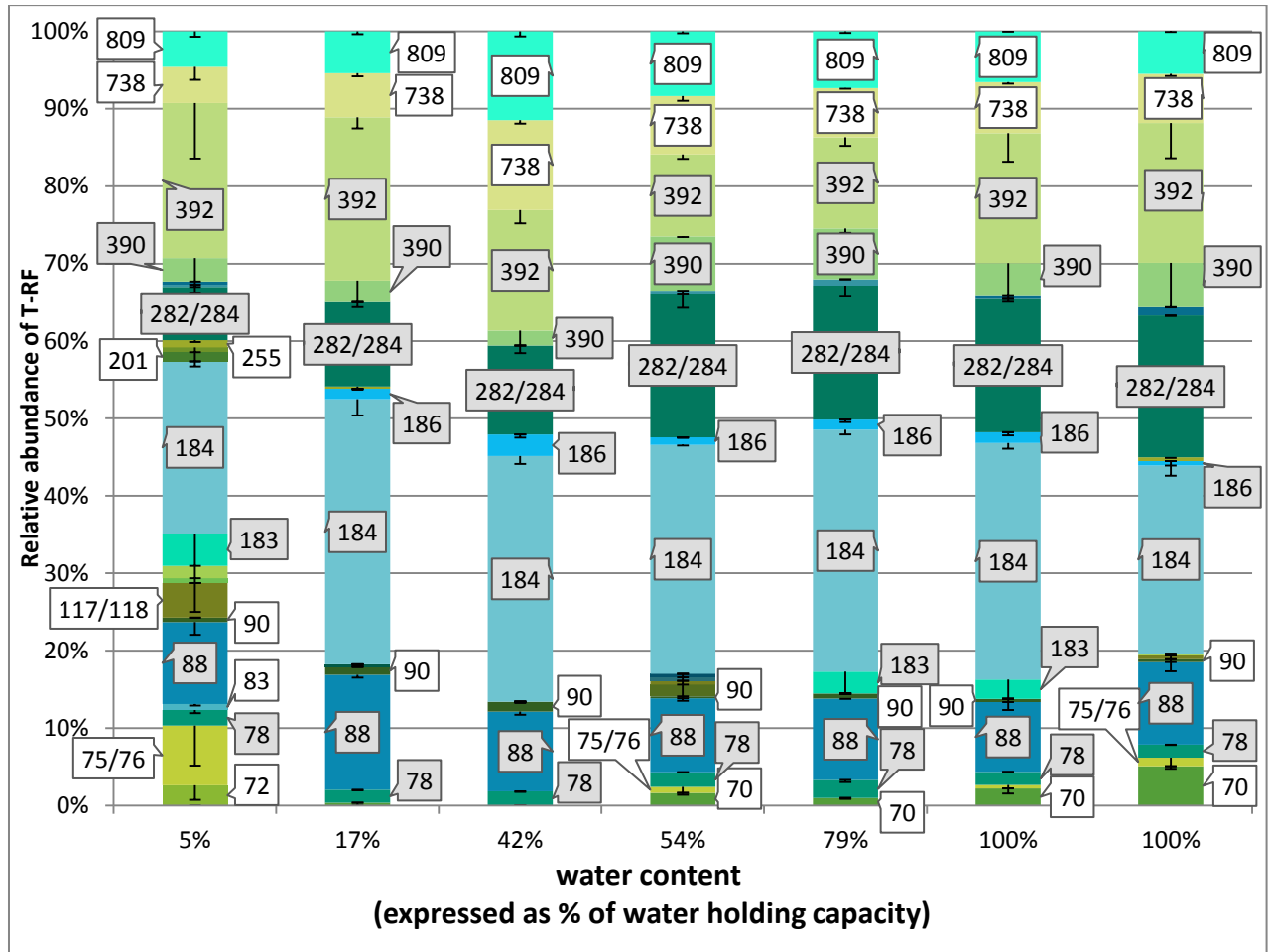


Abbildung 3.22: Übersicht über die 16S-terminalen-Restriktions-Fragmente (T-RF) der archaeellen Gemeinschaft am Ende des Inkubationsexperiments nach 70 Tagen bei dem italienischen Reisfeldboden bei verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

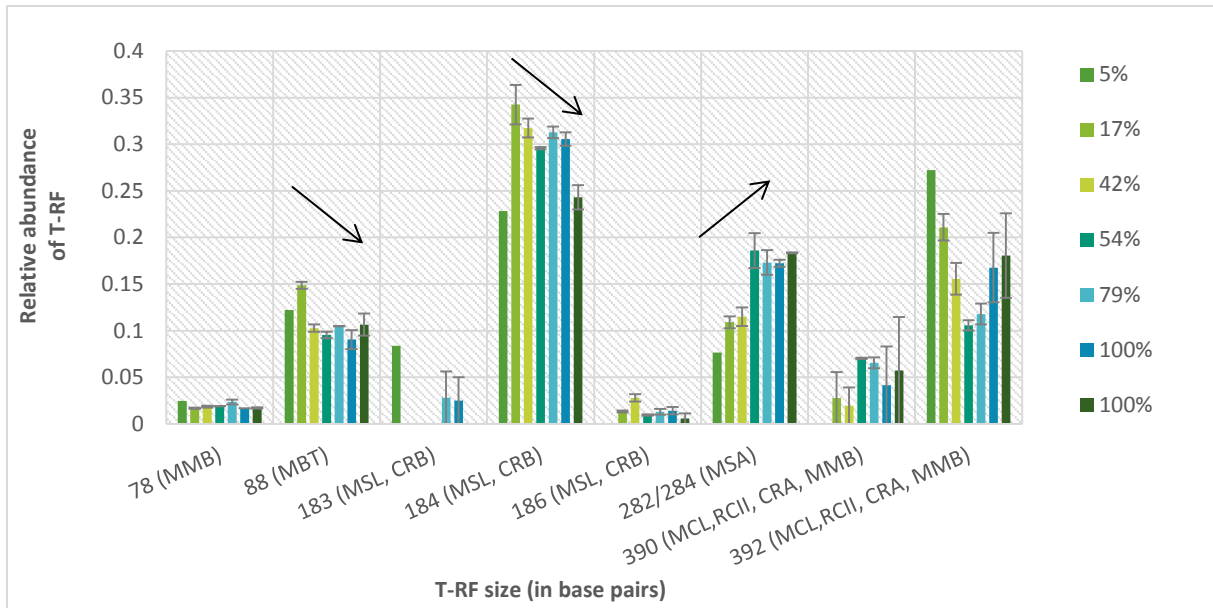


Abbildung 3.23: Die relative Abundanz von einigen T-RF über die ansteigende Wasserverfügbarkeit. Dargestellt sind nur die Fragmente, welche den taxonomischen Gruppen der Methanogenen (siehe Tabelle 2.15) zugeordnet werden konnte. MMB: *Methanomicrobiales*, MBT: *Methanobacteriales*, MSL: *Methanosarcinaceae*, MSA: *Methanosaetacea*, MCL: *Methanocellales*, CRA: *Creanarchaeota 1.3*, CRB: *Creanarchaeota 1.1b*. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

3.3.3 Veränderungen der Transkripte des *mcrA*-Gens des philippinischen und italienischen Reisfeldbodens – Illumina-Sequenzierung

Die aktiven Methanogenen wurden am Ende des Inkubationsexperiments von jeweils drei unterschiedlichen Feuchtigkeitsverfügbarkeiten pro Reisfeldboden untersucht. Hierfür wurden von jeder Inkubation die Transkripte des *mcrA*-Gens in Triplikaten analysiert. Zur Darstellung des erreichten Artenreichtums wurde für jede Inkubation und deren dazugehörige Sequenzen eine Rarefraktion-Kurve berechnet, welche in Abbildung 3.24 zu sehen ist.

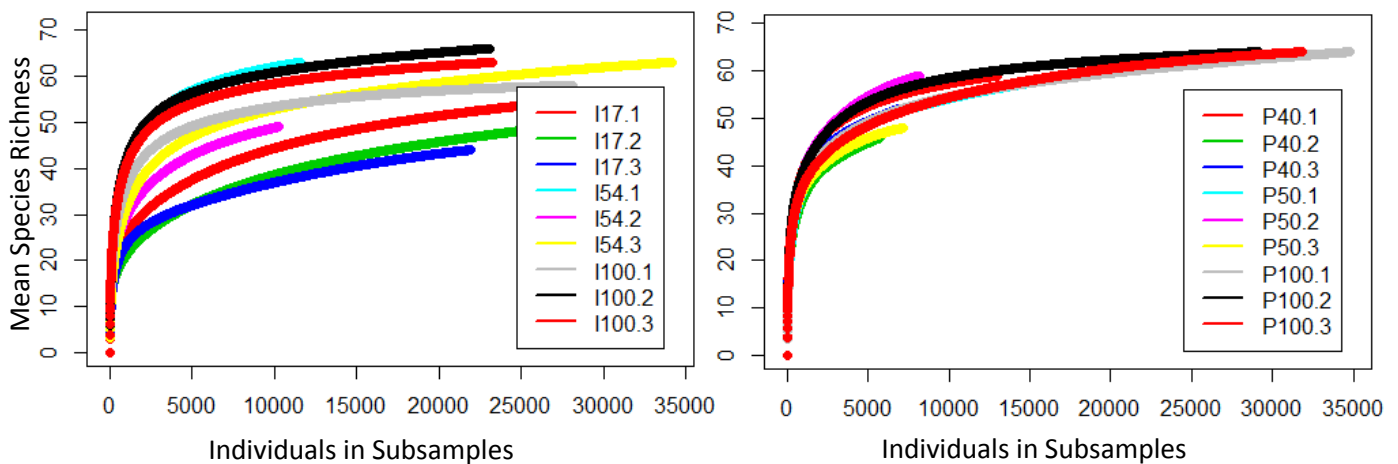


Abbildung 3.24: Rarefraktion-Kurven von Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens (links) und des philippinischen Reisfeldbodens (rechts). Die Benennung der Legende setzt sich aus dem abgekürzten Ursprung (I = Italien und P = Philippinen), der verfügbaren Wassermenge (17 %, 54 %, 100 % bzw. 40 %, 50 % und 100 %) und – abgetrennt durch einen Punkt – der Zahl des jeweiligen Triplikats zusammen.

Die berechnete Good's Coverage der einzelnen Inkubationen zeigt ebenfalls eine gute Abdeckung der vorhandenen Vielfalt (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Die Berechnung des Chao1, ACE, Shannon-Index, Simpson-Index, des reziproken Simpson-Index und des Fishers-Alpha-Index ermöglichte eine gute Abschätzung der vorhandenen Diversität in der jeweiligen Probe (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4).

Die Gesamtanzahl der Transkripte belief sich nach der Qualitätsfilterung auf eine Summe von 360 764 hochwertiger Sequenzen. Die Aufteilung dieser Sequenzen auf die einzelnen Inkubationen zeigen die Tabelle 3.3 und 3.4. Insgesamt konnte für jede verschiedene Feuchtigkeitsstufe eine Summe von mindestens 25 636 bis maximal 94 928 Sequenzen generiert werden. Insgesamt wurden 30 verschiedene OTU gefunden, davon konnten alle 30 im italienischen Boden und 29 im philippinischen Boden gefunden werden (OTU gezeigt im Abbildung 3.25, Abbildung 3.26, Abbildung 3.27).

Tabelle 3.3: Anzahl der *mcrA*-Transkripte, Anzahl der OTU, Chao1, ACE, Shannon-Index, Simpson-Index, reziproker Simpson-Index, Fishers-Alpha-Index und Good's Coverage von den analysierten Illumina-Daten

Ur- sprung	Verfügbare Wassermenge	Triplikate	Barcode	Sequenz- anzahl*	OTU Anzahl*	Chao1 ± SE	ACE ± SE	Shannon	Simpson	1/ Simpson	Fisher	Good's Coverage	
italienischer Reisfeldboden	17%	1	4003/ AGA GTC	28678	18	62,50 ± 6,35	63,00 ± 3,93	1,80	0,72	3,60	6,56	0,9997	
		2	4004/ AGC TGA	28259	16	66,50 ± 12,89	61,54 ± 3,91	1,85	0,74	3,80	5,87	0,9996	
		3	4005/ AGT CAG	21891	17	49,14 ± 4,65	57,61 ± 4,39	1,80	0,76	4,15	5,28	0,9996	
			1	4006/ ATA TCG	11589	23	65,14 ± 2,53	66,21 ± 4,01	2,21	0,83	5,82	8,76	0,9995
		54%	67 Seite										
	2		4007/ ATC GAT	10263	16	53,67 ± 4,49	55,40 ± 3,61	2,31	0,84	6,35	6,68	0,9992	
	3		4008/ ATG CTA	34132	22	67,00 ± 3,89	69,53 ± 3,86	1,97	0,78	4,62	7,48	0,9998	
		100%	1	4009/ CAC AGT	28063	20	59,00 ± 1,81	59,02 ± 3,14	2,36	0,85	6,56	6,99	0,9999
	2		4010/ CAG TCA	23046	25	69,00 ± 3,42	70,90 ± 3,56	2,44	0,85	6,53	8,33	0,9997	
3	4011/ CAT GAC		23168	22	65,50 ± 3,16	66,23 ± 3,37	2,53	0,88	8,03	7,89	0,9998		

* nach Qualitätsfilterung ohne Singletons

Tabelle 3.4: Anzahl der *mcrA*-Transkripte, Anzahl der OTU, Chao1, ACE, Shannon-Index, Simpson-Index, reziproker Simpson-Index, Fishers-Alpha-Index und Good's Coverage von den analysierten Illumina-Daten

Ur- sprung	Verfügbare Wassermenge	Triplikate	Barcode	Sequenz- anzahl*	OTU Anzahl*	Chao1 ± SE	ACE ± SE	Shannon	Simpson	InvSimp- son	Fisher	Good's Coverage	
philippinischer Reisfeldboden	40%	1	4012/ CGA TAT	12975	21	62,00 ± 3,42	62,81 ± 3,82	2,53	0,86	7,15	7,97	0,9995	
		2	4013/ CGC GCG	5719	12	55,33 ± 8,85	52,73 ± 3,70	2,43	0,86	7,10	6,82	0,9986	
		3	4014/ CGT ATA	6942	18	70,00 ± 16,12	58,15 ± 3,76	2,43	0,84	6,07	7,63	0,9987	
			1	4015/ GAC TAG	15765	17	70,00 ± 10,76	65,73 ± 3,79	2,21	0,80	5,08	7,59	0,9994
	50%	68 Seite	2	4016/ GAG ATC	8143	19	62,50 ± 3,44	65,04 ± 3,90	2,35	0,82	5,66	8,60	0,999
		3	4017/ GAT CGA	7203	14	49,67 ± 2,20	51,79 ± 3,34	2,38	0,84	6,44	6,90	0,9993	
		1	4018/ GTA CAC	34546	21	76,00 ± 10,76	71,75 ± 3,89	2,19	0,79	4,85	7,59	0,9997	
	100%	2	4019/ GTC ACA	28902	21	65,50 ± 2,23	66,20 ± 3,63	2,33	0,82	5,57	7,78	0,9999	
		3	4020/ AGA GTC	31480	23	65,67 ± 2,04	68,42 ± 3,90	2,30	0,81	5,35	7,68	0,9998	

* nach Qualitätsfilterung ohne Singletons

Die Zuordnung der einzelnen OTU auf Artebene und auf Familienebene erfolgte anhand eines Stammbaums mithilfe der phylogenetischen Zuordnung in ARB (Kapitel 2.5.3). Es konnten nahezu alle OTU auf Familienebene zugewiesen werden, bis auf die OTU 400, welche nur der Ordnung *Methanobacteriales* zugewiesen werden konnte. Bei 20 OTU konnte eine Zuordnung auf Artebene erfolgen. Eine Auflistung der OTU, deren phylogenetische Zuordnung, die nächstmöglichen verwandten Spezies mit der jeweiligen Sequenzähnlichkeit und der maximale Anteil der OTU in den verschiedenen Feuchtigkeitsstufen (in % und in absoluten Sequenzen) sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Auflistung der OTU, deren phylogenetische Zuordnung, die nächstmöglichen verwandten Spezies mit der jeweiligen Sequenzähnlichkeit und der maximale Anteil der OTU in den verschiedenen Feuchtigkeitsstufen; alle mit einem * markierten OTU erfüllen durch ihre Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (AS) die Zuordnung auf Artebene (Hunger u. a. 2011).

phylogenetic group				mcrA						
class	order	family	genus & species*	representative mcrA OTU (84%)	nearest species strain match	% sequence similarity (AS)	nearest environmental sequence match	% sequence similarity (AS)	maximal contribution (average replicates)	maximal number of sequences (average of replicates)
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	OTU_106*	<i>Methanobacterium oryzae</i> (AB542752)	95.30	rice paddy soil (AB301403)	96.7	30.49	6186.67
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_87*	<i>Methanobacterium palustre</i> (AB542753)	94.40	<i>Methanobacterium palustre</i> (AB542753)	94.4	2.05	48
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_477*	<i>Methanobacterium lacus</i> (CP002551)	97.70	river floodplains soil (AJ607411)	100	0.37	46.00
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_375*	<i>Methanobacterium paludis</i> (CP002772)	93.80	rice root (AM746913)	99.2	0.12	9.00
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_303*	<i>Methanobacterium beijingense</i> (EF465106)	99.20	<i>Methanobacterium beijingense</i> (EF465106)	99.2	0.11	12
Methanobacteria mrtA	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	OTU_280*	<i>Methanobacterium espanolae mrtA</i> (AB542757)	90.70	rice Paddy soil (AB301398)	97.6	1.61	53.67
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_466*	<i>Methanobacterium espanolae mrtA</i> (AB542757)	89.20	upland pasture soil (DQ994875)	92.1	1.22	32
			<i>Methanobacterium</i>	OTU_557*	<i>Methanobacterium kanagiense mrtA</i> (AB551870)	97.60	<i>Methanobacterium kanagiense</i> (AB551870)	97.6	0.01	1.33

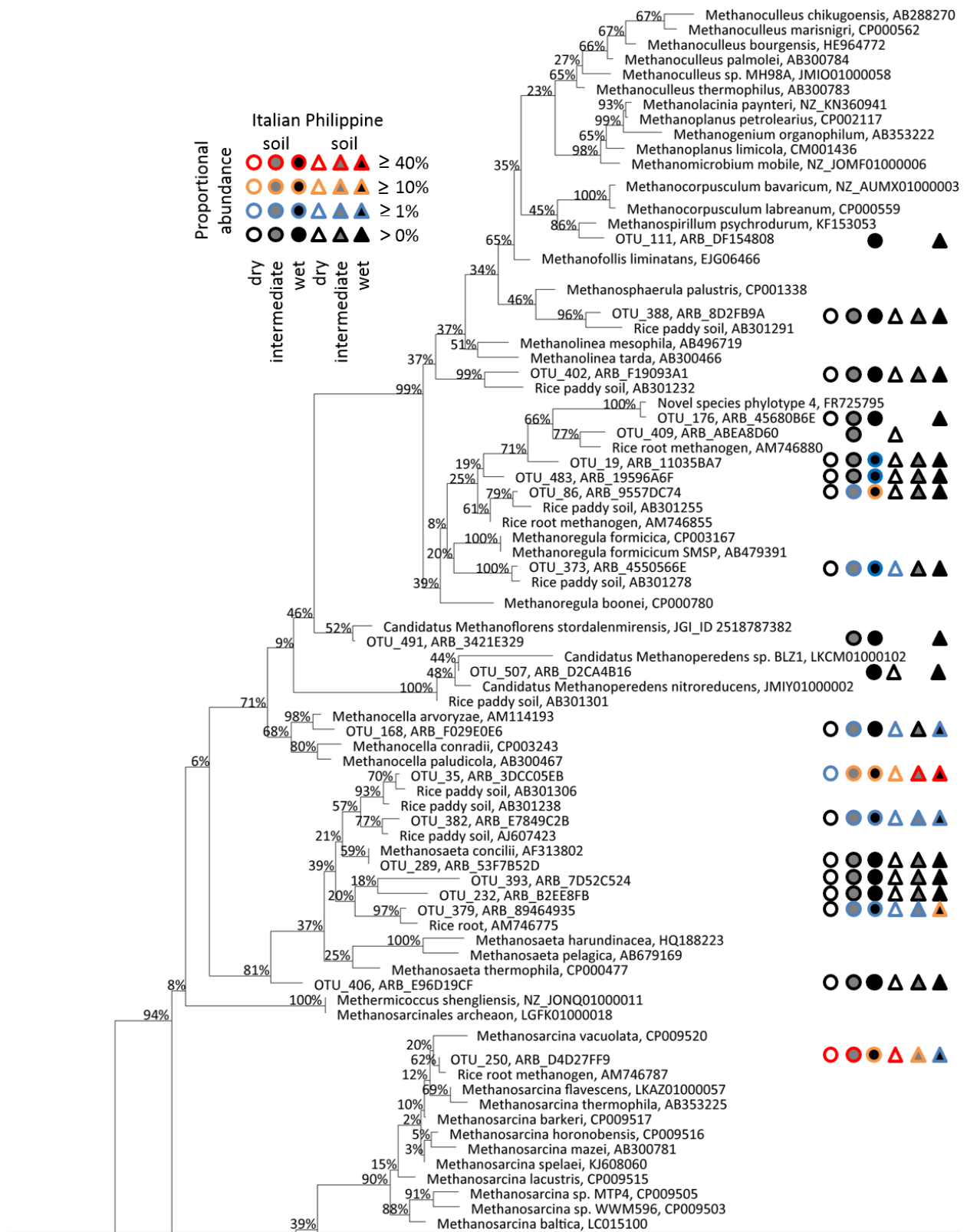
Fortsetzung Tabelle 3.5:

phylogenetic group				mcrA						
class	order	family	genus & species*	representativ mcrA OTU (84%)	nearest species strain match	% sequence similarity (AS)	nearest environmental sequence match	% sequence similarity (AS)	maximal contribution (average replicates)	maximal number of sequences (average of replicates)
			-	OTU_400	<i>Methanobacterium espanolae</i> mrtA (AB542757)	74.40	Everglades soil (DQ662588)	81.8	0.05	4.67
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae	-	OTU_373	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	83.20	rice paddy soil (AB301278)	97.7	5.87	420
			-	OTU_19	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	81.50	rice paddy soil (AM746880)	86.8	3.61	740.67
			-	OTU_176	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	79.4	fen soil (FR725795)	97.7	0.38	30.00
			-	OTU_409	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	81.4	Rice root (AM746880)	93.8	0.08	3.33
			<i>Methanoregula</i>	OTU_86	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	84.7	rice paddy soil (AB301255)	96.1	19.43	2780
			<i>Methanoregula</i>	OTU_483	<i>Methanoregula boonei</i> (CP000780)	84.7	rice root (AM746855)	93.1	2.12	278.33
			<i>Methanosphaerula</i>	OTU_388*	<i>Methanosphaerula palustris</i>	86.3	rice paddy soil (AB301291)	91.5	0.41	99.33
			<i>Methanosphaerula</i>	OTU_402	<i>Methanosphaerula palustris</i>	84.6	rice paddy soil (AB301232)	88.3	0.29	29.67
			<i>Methanospirillum</i>	OTU_111*	<i>Methanospirillum psychrodum</i> (KF153053)	92.3	<i>Methanospirillum psychrodum</i> (KF153053)	92.3	0.43	61.67
	Methanocellales	Methanocellaceae	<i>Methanocella</i>	OTU_168*	<i>Methanocella arvoryzae</i> (AM114193)	95.30	<i>Methanocella arvoryzae</i> (AM114193)	95.3	8.33	1659.67
		Methanoflorentaceae	<i>Methanoflorens</i>	OTU_491*	<i>Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis</i> (JGI_ID 2518787382)	94.50	fen soil (FR725759)	96.1	0.07	5.67
	Methanosarcinales	Methanoperedenaceae	<i>Methanoperedens</i>	OTU_507*	<i>Methanoperedens nitroreducens</i> (JMIY01000002)	96.12	rice paddy soil (AB301301)	96.8	0.04	2

Fortsetzung Tabelle 3.5:

phylogenetic group				<i>mcrA</i>						
class	order	family	genus & species*	representative <i>mcrA</i> OTU (84%)	nearest species strain match	% sequence similarity (AS)	nearest environmental sequence match	% sequence similarity (AS)	maximal contribution (average replicates)	maximal number of sequences (average of replicates)
		Methanosaetaceae	-	OTU_393	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	81.10	rice paddy soil (AJ607423)	84.1	1.39	209.67
			-	OTU_406	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	83.20	rice paddy soil (AB301306)	84.3	0.55	83
			-	OTU_232	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	84.10	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	84.1	0.33	64.67
			<i>Methanosae ta</i>	OTU_379*	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	86.40	rice root methanogen (AM746775)	96.2	20.59	6230.67
			<i>Methanosae ta</i>	OTU_382*	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	87.90	rice paddy soil (AJ607423)	96.2	6.12	1101.67
			<i>Methanosae ta</i>	OTU_289*	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	100	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	100	0.80	80.33
			<i>Methanosae ta</i>	OTU_35*	<i>Methanosaeta concilii</i> (AF313802)	89.30	rice paddy soil (AB301238)	96.1	66.50	20319.33
				Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	OTU_250*	<i>Methanosarcina vacuolata</i> (CP009520)	93.40	rice root methanogen (AM746787)	98.5
<i>Thermoplasma ta</i>	<i>Methanomassiliicoccales</i>	<i>Methanomassiliicoccaceae</i>	<i>Methanomassiliicoccus</i>	OTU_370*	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (HQ896500)	90	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (HQ896500)	90	15.89	987.66

Der phylogenetische Stammbaum des *mcrA*-Gens ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Der Übersichtlichkeit halber sind in der Abbildung nur 154 Sequenzen aufgelistet, obwohl der Baum mit einer Gesamtzahl von 569 Sequenzen berechnet wurde (siehe Tabelle 6.1 und 6.2 im Anhang). Der Anteil der jeweiligen OTU über die verschiedenen Feuchtigkeitsstufen in den Reisfeldböden variierte. Während die OTU 35 bei Inkubationen feuchterer Böden eher stark vertreten war, war die OTU 250 eher bei den trockeneren Bedingungen zu finden.



Fortsetzung Abbildung 3.25:

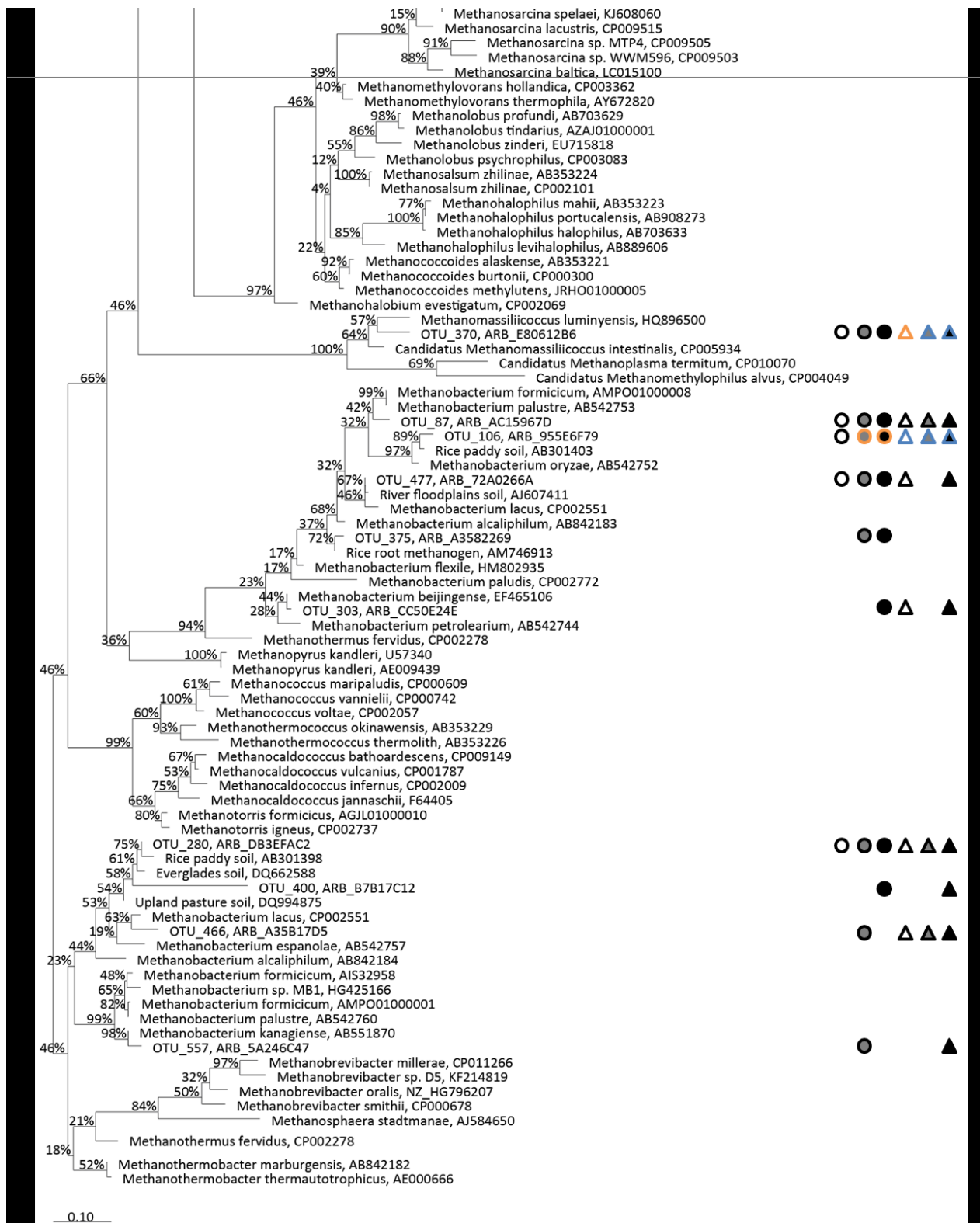


Abbildung 3.25: Phylogenetischer Stammbaum des *mcrA*-Gens. Der Anteil einer jeweiligen OTU bei den Inkubationen wurde mit verschiedenenfarbiger Umrandung des Symbols markiert. Eine rote Umrandung steht für über 40 %, eine gelbe für über 10 %, eine blaue für über 1 % und eine schwarze für 0 bis 1 % der relativen Häufigkeit der Sequenzen. Die innere, stärker werdende Schattierung demonstriert die ansteigenden Feuchtigkeitsstufen. Die beiden Reisfeldeböden können anhand des Symbols unterschieden werden: die Kreise illustrieren Inkubationen des italienischen und die Dreiecke die des philippinischen Reisfeldebodens.

Die Verteilung innerhalb der fünf Ordnungen mit den dazugehörigen Familien ist über die drei verschiedenen Feuchtigkeitsstufen in den ternären Diagrammen in Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 gezeigt. Bei Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens waren Vertreter der *Methanoregulaceae* eher bei den feuchten Inkubationen zu finden. Einen relativ großen Anteil machten die OTU 106 und OTU 35 aus, welche zu *Methanobacteriaceae* und *Methanosaetaceae* zählen, wobei letztere Gruppe noch etwas trockenere Bedingungen akzeptierte. Ähnlich trockenere Bedingungen akzeptierten auch Vertreter von *Methanocellaceae* mit der OTU 168. Unter trockensten Bedingungen war eindeutig die OTU 250, *Methanosarcinaceae*, die am stärksten dominierende Gruppe (Abbildung 3.26).

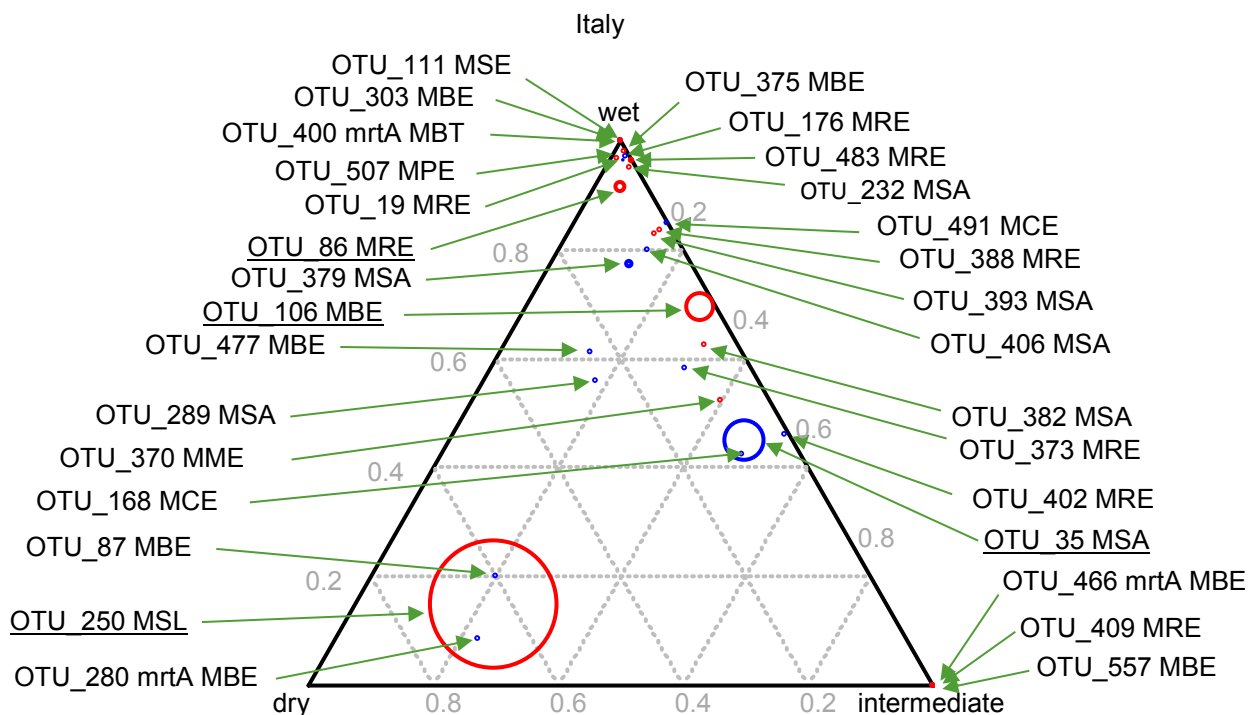


Abbildung 3.26: Verteilung der 30 OTU bei Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens in trockensten (17%), intermediären (54 %) und feuchten (100 %) Systemen. Die Ordnungen und Familien wurden wie folgt abgekürzt: MBT: *Methanobacteriales*, MSL: *Methanosarcinaceae*, MSA: *Methanosaetaceae*, MPE: *Methanoperedenaceae*, MBE: *Methanobacteriaceae*, MCE: *Methanocellaceae*, MRE: *Methanoregulaceae*, MME: *Methanomassiliicoccaceae*, MSE: *Methanospirillaceae*. Je größer der Kreis desto öfter war diese OTU in der Sequenzierung vertreten. Die vier häufigsten und damit wichtigsten Vertreter sind unterstrichen.

Bei Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens waren Vertreter der *Methanoregulaceae* in allen Proben zu finden, aber nicht sehr abundant. Die *Methanocellaceae* waren hier eher bei feuchten Inkubationen zu finden. Sehr starke Anteile hatten hier Vertreter der *Methanosaetaceae* mit den OTU 379 und 35, welche aber tendenziell eher die feuchten Inkubationen dominierten und unter ganz trockensten Bedingungen stark absanken. Die OTU 250, *Methanosarcinaceae*, war ebenfalls am stärksten unter trockensten Bedingungen zu finden. Im Vergleich zu den italienischen Bodeninkubationen war die Intensität der OTU 250 bei den inkubierten philippinischen Bodenproben

aber geringer. Außerdem gab es noch sieben weitere OTU unter trockenen Bedingungen, welche aber einen sehr niedrigen Anteil ausmachten (Abbildung 3.27).

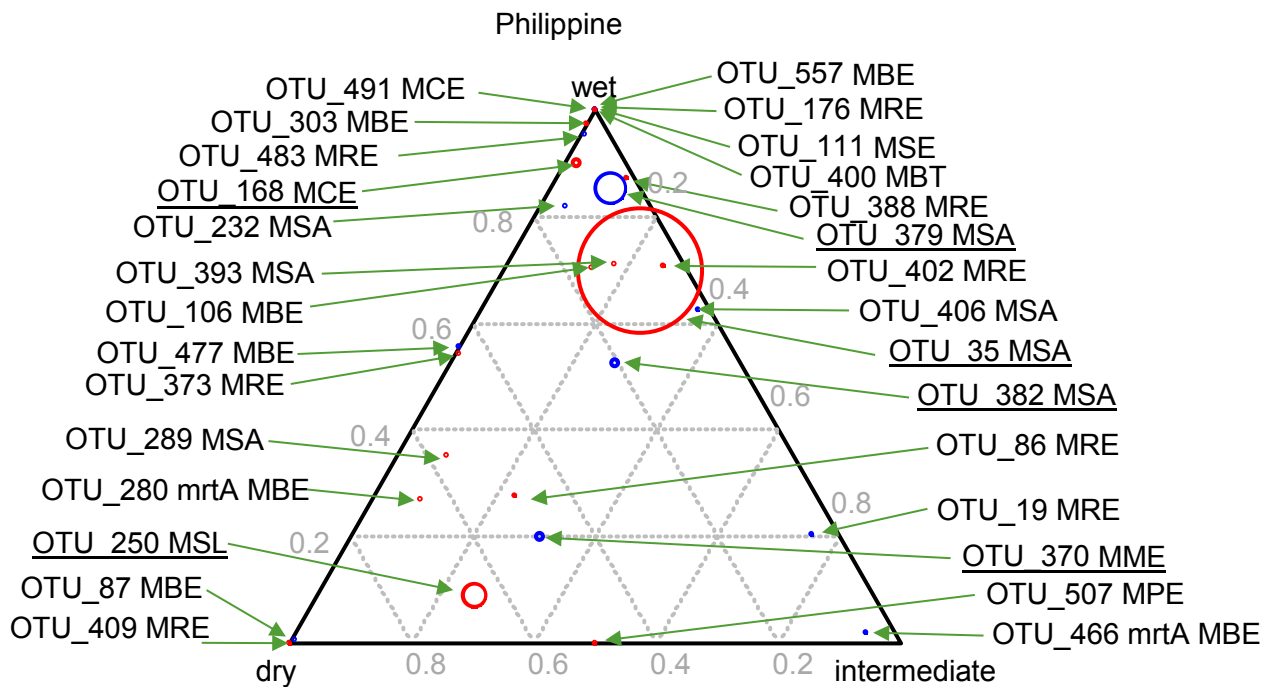


Abbildung 3.27: Verteilung der 29 OTU bei Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens in trockenen (40%), intermediären (50 %) und feuchten (100 %) Systemen. Die Ordnungen und Familien wurden wie folgt abgekürzt: MBT: *Methanobacteriales*, MSL: *Methanosarcinaceae*, MSA: *Methanosaetaceae*, MPE: *Methanoperedenaceae*, MBE: *Methanobacteriaceae*, MCE: *Methanocellaceae*, MRE: *Methanoregulaceae*, MME: *Methanomassiliicoccaceae*, MSE: *Methanospirillaceae*. Je größer der Kreis desto öfter war diese OTU in der Sequenzierung vertreten. Die sechs häufigsten und damit wichtigsten Vertreter sind unterstrichen.

3.4 Einfluss von Boden auflockernden Bewegungen im Inkubationsexperiment (technischer Ansatz)

Der Einfluss von Boden auflockernden Bewegungen der drei bewegten Systeme (gerollt, geschüttelt und magnetisch gerührt) wurde im Vergleich zu einer nicht bewegten Kontrolle in drei verschiedenen Umweltsystemen untersucht. Jedes bewegte System zeigte dabei einen negativen Einfluss zur nicht bewegten Kontrolle des jeweiligen Umweltsystems. Die Anzeichen unterschieden sich je nach der Art der Bewegung verschieden stark.

3.4.1 Allgemeine Bodenparameter in drei Umweltsystemen

Bestimmt wurde der Gesamtstickstoff-, Gesamtkohlenstoff- und Gesamtwasserstoffgehalt in den drei unbehandelten Umweltsystemen Faulschlamm-, Flusssediment- und Reisfeldbodenproben (Abbildung 3.28). In einer weiteren Messung wurden die Proben mit einer 2 M Salzsäurelösung angesäuert, um übermäßiges Carbonat zu entfernen. In den Faulschlamm Proben waren etwa 5 % anorganischer Kohlenstoff, wie Carbonat, vorhanden. Im Reisfeldboden und im Flusssediment war die Carbonatmenge gering und zeigte kaum eine Reduktion der Kohlenstoffmenge. Der Faulschlamm zeigte mit 25 % den höchsten Anteil an Gesamtkohlenstoff. Der Reisfeldboden zeigte einen Gesamtkohlenstoffanteil von circa 1 % und das Flusssediment etwas unter 1 %.

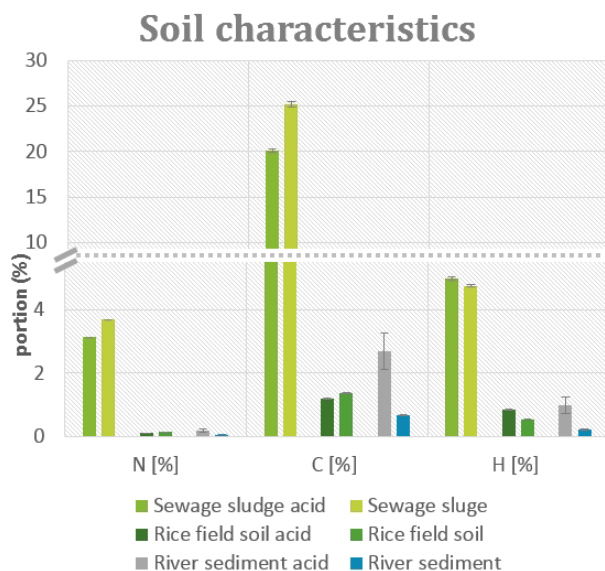


Abbildung 3.28: Allgemeine Bodenparameter (C, H und N) der drei Umweltsystemen: Faulschlamm (sewage sludge), Reisfeldboden (rice field soil) und Flusssediment (river sediment). Die angesäuerten (acid) Proben sind im Vergleich zu den unbehandelten Proben immer nebeneinander dargestellt. Die y-Achse zeigt den Anteil in %. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

Der Faulschlamm hatte mit 3 % Stickstoff- und 5 % Wasserstoffanteil ebenfalls die höchsten Werte, im Reisfeldboden und Flusssediment lag der Stickstoffanteil bei 0,1 % und der Wasserstoffanteil ebenfalls unter 1 %.

3.4.2 pH-Wert-Änderungen der drei Inkubationssysteme durch unterschiedliche Bewegung

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte am Ende der Inkubationsperiode nach 45 Tagen (Abbildung 3.29). Die gerollten, geschüttelten und nicht bewegten Inkubationen zeigten einen pH-Wert-Bereich von 7,1 bis 7,6. Die pH-Werte der magnetisch gerührten Inkubationsproben waren im Vergleich zu denen der anderen Inkubationsproben höher (pH 7,8 im Faulschlamm, pH 9,7 im Reisfeldboden und pH 9,4 im Flusssediment).

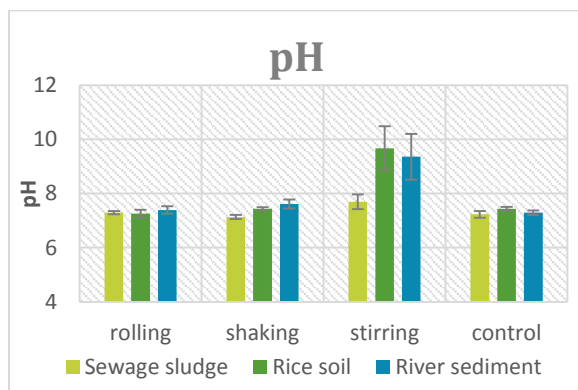


Abbildung 3.29: pH-Werte am Ende der Inkubationsperiode nach 45 Tagen der drei Umweltsystemen: Faulschlamm (sewage sludge), Reisfeldboden (rice field soil), Flusssediment (river sediment). Die bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking) und magnetisch gerührt (stirring) – im Vergleich zur nicht bewegten Kontrollproben (control). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

3.4.3 Einfluss der Bewegung auf die Methanproduktion bei den Inkubationsproben des Faulschlammes

Die Acetat- und Propionatkonzentrationen und die Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat in den Faulschlammproben sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Bereits in dem nicht inkubierten Faulschlamm waren die Acetatkonzentration mit 15 mM und die Propionatkonzentration mit 25 mM relativ hoch. Die Acetatwerte erhöhten sich auf bis zu 20–35 mM. Die Propionatwerte blieben mehr oder weniger konstant am Endpunkt der Inkubation (nach 45 Tagen). Die Kohlenstoffisotopensignatur im Endsignal wurde schwerer im Vergleich zum *In situ*-Signal (nicht inkubiertes Wasser-Faulschlammgemisch). Es ist auch erwähnenswert, dass die HPLC-Chromatogramme der inkubierten Faulschlammproben viele zusätzliche Peaks aufwiesen, welche nicht den verwendeten Standards zugeordnet werden konnten.

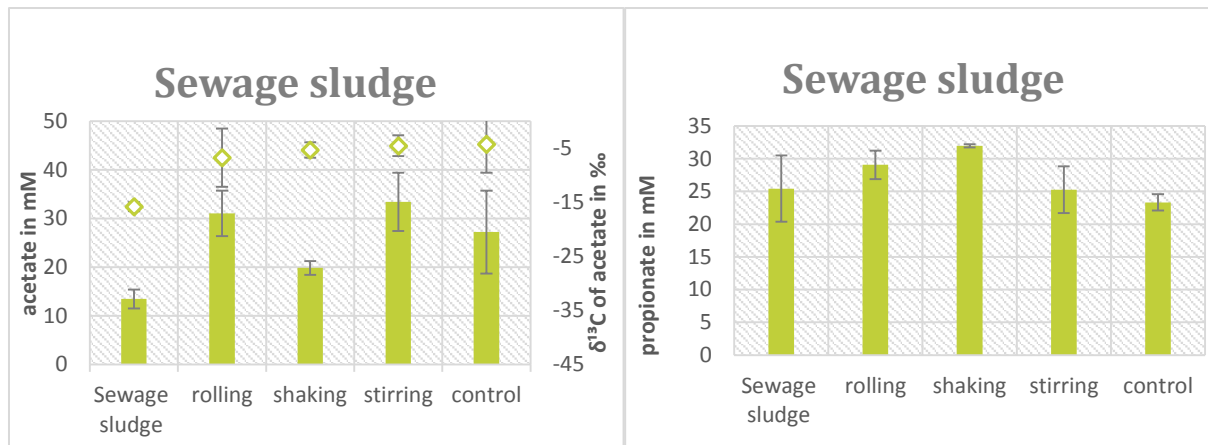


Abbildung 3.30: Acetat- und Propionatkonzentrationen und die Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat in den Faulschlammproben (sewage sludge). Dargestellt sind auf der x-Achse die *In situ*-Faulschlammproben (nicht inkubiert), die bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking) und magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegte inkubierte Kontrollproben (control) (Endpunkt der Inkubation nach 45 Tagen). Die linke y-Achse gibt die Fettsäurekonzentration in mM an und die rechte y-Achse die Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$, Symbol). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

Abbildung 3.31 zeigt die Gaskonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur im CH_4 und CO_2 in den Faulschlamminkubationen. Die Inkubationen zeigten mit steigender CH_4 -Produktion (Maximalwert von $480 \mu\text{mol g}^{-1}$) einen immer stärkeren Trend zu schwereren Kohlenstoffisotopensignaturen (-30‰), was einen gesteigerten Anteil von acetiklastischer Methanogenese andeutet. Die frühen Signale der Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$) im CH_4 waren im Vergleich zum Ende in ihrem Anteil stärker hydrogenotroph geprägt. Die höchste CH_4 -Produktion wurde im gerührten Faulschlamm beobachtet, gefolgt von der nicht bewegten Kontrollinkubation ($450 \mu\text{mol g}^{-1}$). Dem folgten die geschüttelten und gerollten Faulschlamminkubationen (401 und $415 \mu\text{mol g}^{-1}$). Die CO_2 -Konzentration erreicht ähnliche Endwerte von circa $390 \mu\text{mol g}^{-1}$ in allen Inkubationen mit einer Kohlenstoffisotopensignatur von -20‰ .

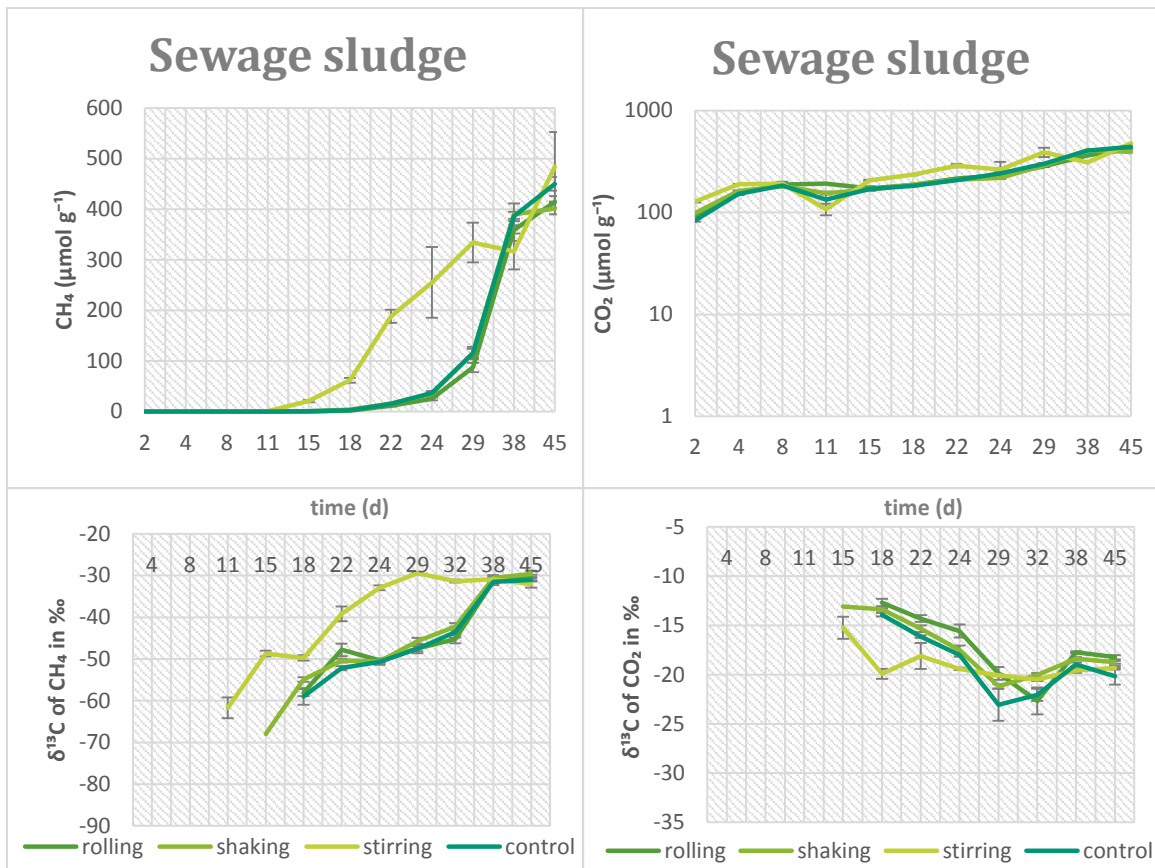


Abbildung 3.31: Gaskonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ und CO₂ in den Faulschlamminkubationen (sewage sludge). Dargestellt sind die Mittelwerte der bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking), magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegten Kontrollproben (control) über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3). Ein Gramm Boden bezieht sich auf das Trockengewicht.

3.4.4 Einfluss der Bewegung auf die Methanproduktion bei den Inkubationsproben des Reisfeldbodens

Die Konzentrationen von möglichen kurzkettigen Fettsäuren, wie Acetat und Propionat, waren im Reisfeldboden oft sehr niedrig und auch in manchen Fällen unter der Nachweisgrenze (Abbildung 3.32). In den *In situ*-Reisfeldbodenproben konnte knapp 0,2 mM Acetat gefunden werden und kein Propionat. In den bewegten Systemen mit der Roll- und Rührbehandlung konnten ähnliche hohe Acetatmengen gefunden werden. In der gerollten Inkubation konnte sogar etwas Propionat nachgewiesen werden. Die Acetatkonzentration in den geschüttelten und nicht bewegten Inkubationen war sehr niedrig. Die Kohlenstoffisotopensignatur in der Ausgangsprobe (-10 ‰) veränderte sich nicht bei den bewegten Inkubationen, nur bei der nicht bewegten Kontrollinkubation wurde eine Kohlenstoffisotopensignatur von circa -35 ‰ gemessen.

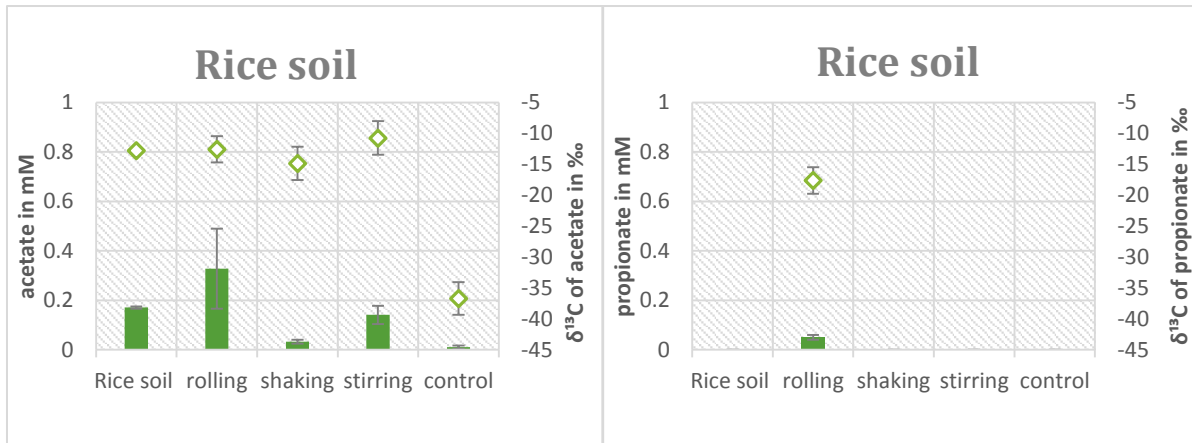


Abbildung 3.32: Acetat- und Propionatkonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur in den Reisfeldproben (rice soil). Dargestellt sind auf der x-Achse die *In situ*-Reisfeldproben (nicht inkubiert), die bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking) und magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegte inkubierte Kontrollproben (control) (Endpunkt der Inkubation nach 45 Tagen). Die linke y-Achse gibt die Fettsäurekonzentration in mM an und die rechte y-Achse die Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$, Symbol). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

Abbildung 3.33 zeigt die CH_4 - und CO_2 -Konzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur in den Reisfeldbodeninkubationen. Die höchsten CH_4 -Konzentrationen erreichten mit 11,2 und 13,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ die nicht bewegte Kontrolle und die gerührte Inkubationsprobe. Das Schütteln und Rühren der inkubierten Proben resultierte in einer ähnlich niedrigen Endkonzentration mit 8,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Die Signale der Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$) im CH_4 waren in ihrem Anteil tendenziell hydrogenotroph geprägt mit -57 bis -48 ‰. Die CO_2 -Endkonzentration erreichte rund 15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ bei allen Behandlungen, außer Rühren, hier konnte eine Endkonzentration von 11,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ erreicht werden. Die Isotopensignatur im CO_2 zeigte in den gerührten Inkubationen jedoch keine Veränderung gegenüber den anderen Inkubationen.

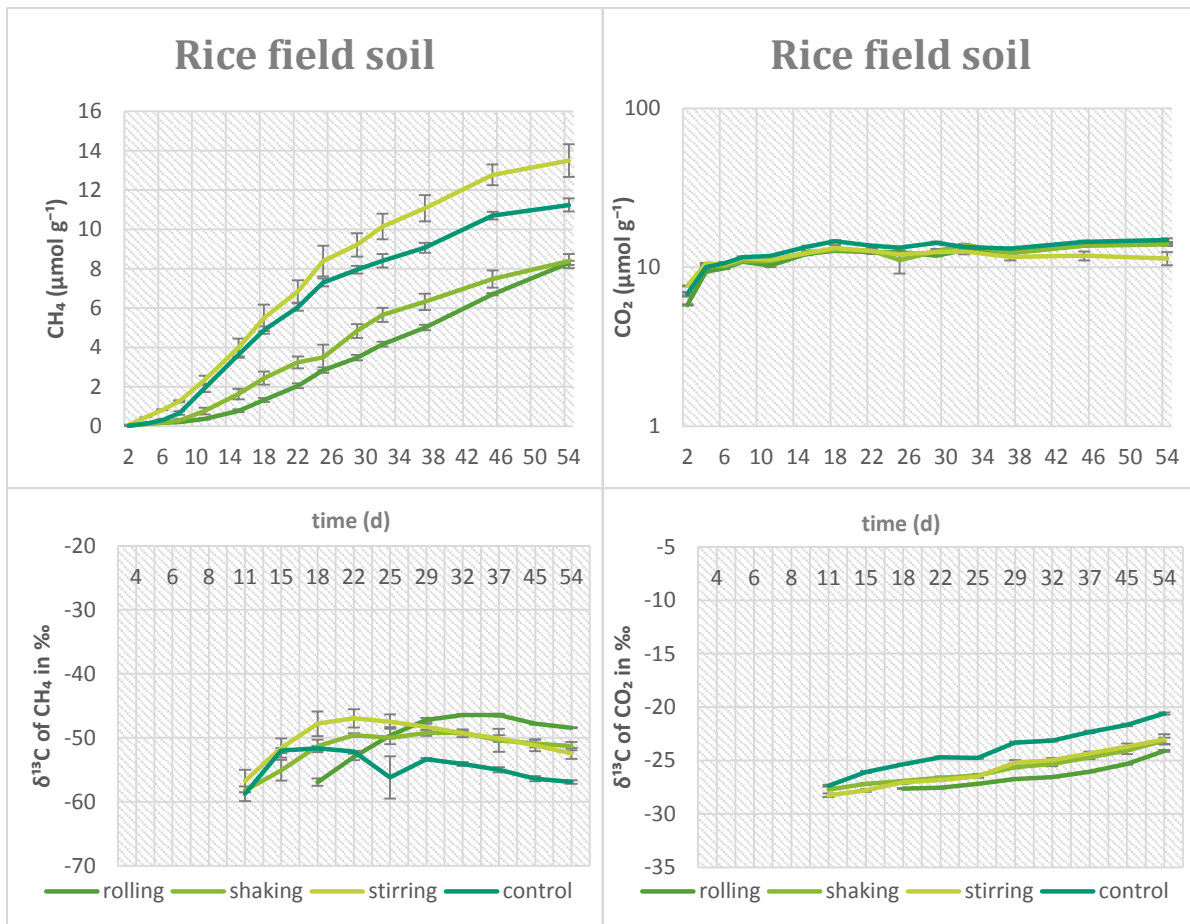


Abbildung 3.33: Gaskonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ und CO₂ in den Reisfeldbodeninkubationsproben (rice field soil). Dargestellt sind die Mittelwerte der Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking), magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegte inkubierte Kontrollproben (control), über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3). Ein Gramm Boden bezieht sich auf das Trockengewicht.

3.4.5 Einfluss der Bewegung auf die Methanproduktion bei den Inkubationsproben des Flusssediments

Die Acetat- und Propionatkonzentrationen und die Kohlenstoffisotopensignatur im Acetat in den Flusssedimentinkubationsproben sind in Abbildung 3.34 dargestellt. In den Flusssedimentproben zeigte die magnetisch gerührte Inkubationsprobe den deutlichsten Unterschied zu den anderen bewegten Systemen, hier waren große Acetat- und Propionatmengen zu erkennen. Die Kontrollprobe sowie das Rollen und Schütteln der Inkubationen konnten keine ähnlich hohen Acetat- und Propionatkonzentrationen hervorrufen. Die Acetat- und Propionatkonzentrationen waren unter 1 % oder lagen sogar unter der Nachweisgrenze. Die Kohlenstoffisotopensignatur lag in der gerührten Inkubation bei -19 ‰. In den Ausgangsproben, den gerollten, den geschüttelten und den nicht bewegten Inkubationsproben zeigte die Kohlenstoffisotopensignatur im Acetats keinen klaren Trend, sie blieb mehr oder weniger stabil bei -28 bis -24 ‰.

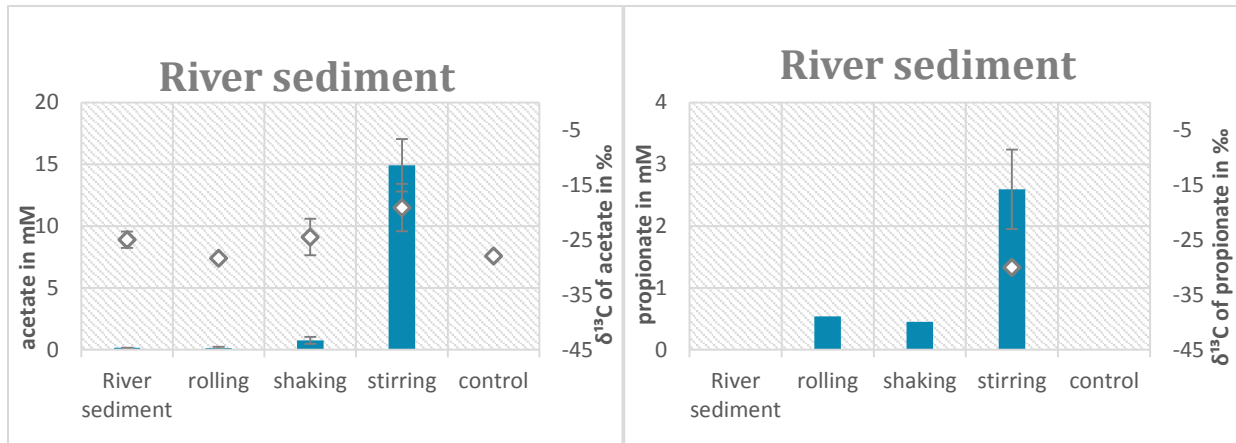


Abbildung 3.34: Acetat- und Propionatkonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur in den Flusssedimentproben (river sediment). Dargestellt sind auf der x-Achse die *In situ*-Flusssedimentproben (nicht inkubiert), die bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking) und magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegte inkubierte Kontrollproben (control) (Endpunkt der Inkubation nach 45 Tagen). Die linke y-Achse gibt die Fettsäurekonzentration in mM an und die rechte y-Achse die Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$, Symbol). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar ($n = 3$).

Die maximale CH_4 -Konzentration erreichte in der statischen Kontrolle $35 \mu\text{mol g}^{-1}$ mit einer Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$) im CH_4 von -55‰ . Bei den bewegten Inkubationen erreichten die geschüttelten und gerollten Proben $29 \mu\text{mol g}^{-1}$ und bei gerührten Bedingungen erreichten sie $8,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Abbildung 3.35). Die Kohlenstoffisotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}$) im CH_4 von den gerollten und geschüttelten Inkubationen zeigten mit -55‰ ähnliche Werte wie in der statischen Kontrolle, die gerührten Inkubationen zeigten deutlich hydrogenotrophe Signale mit -72‰ . Die CO_2 -Konzentrationen erreichten 21 bis $24 \mu\text{mol g}^{-1}$ in allen Inkubationen außer bei den gerührten. Hier wurde CO_2 verbraucht von anfangs $6,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ auf einen Endwert von $2,4 \mu\text{mol g}^{-1}$. Die Isotopensignatur im CO_2 in den gerührten Inkubationsproben zeigte eine Veränderung von -11 auf -21‰ gegenüber den anderen Inkubationen (-21 auf -10‰) (Abbildung 3.35).

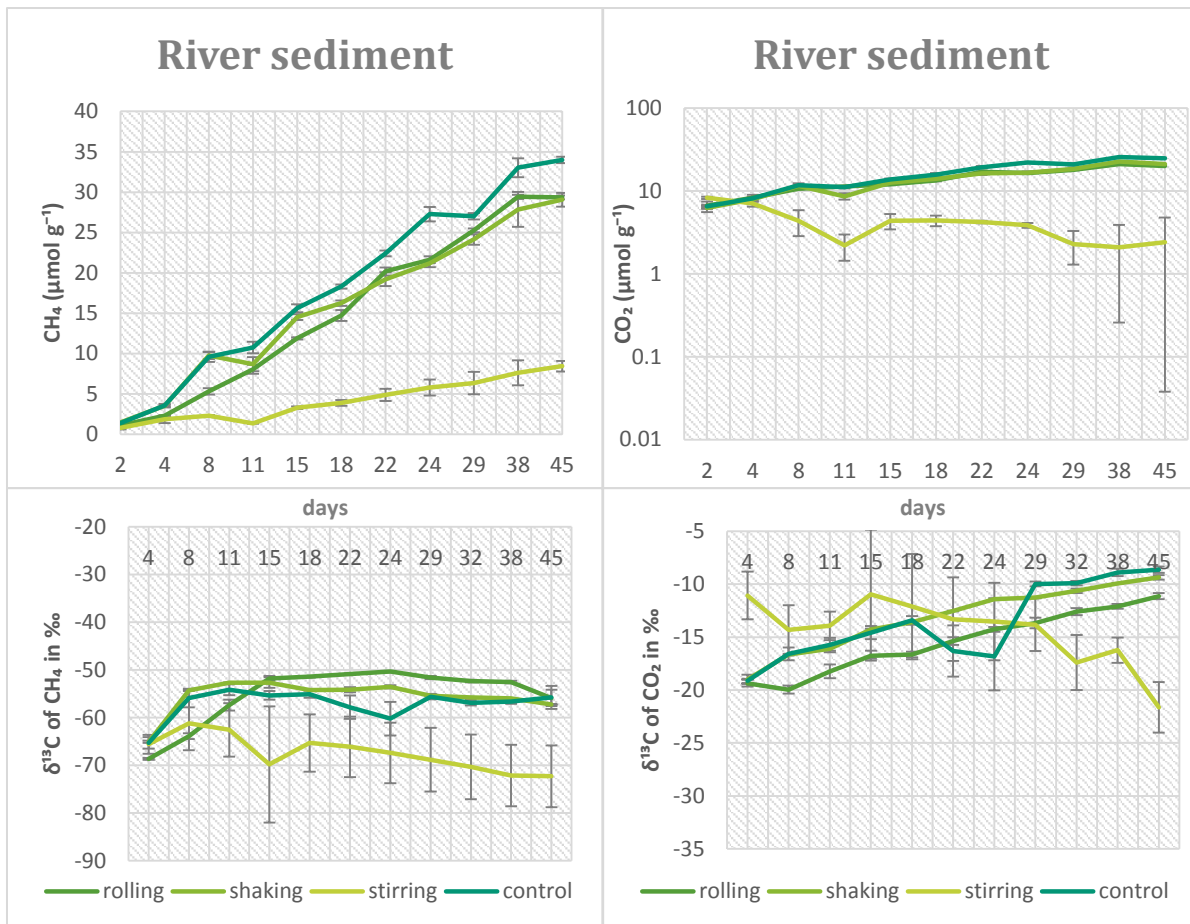


Abbildung 3.35: Gaskonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ und CO₂ in den Flusssedimentinkubationsproben (river sediment). Dargestellt sind die Mittelwerte der bewegten Inkubationsproben – gerollt (rolling), geschüttelt (shaking), magnetisch gerührt (stirring) – und die nicht bewegte inkubierte Kontrollproben (control) über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3). Ein Gramm Boden bezieht sich auf das Trockengewicht.

3.4.6 Mikrobielle Diversität des archaeellen 16S-rRNA-Gens

In den verwendeten Umweltsystemen wurde die T-RFLP-Methode angewandt, um die archaeellen Gemeinschaften der nicht bewegten Inkubationsproben miteinander zu vergleichen (Abbildung 3.36). Außerdem wurde die Gemeinschaft im Reisfeldboden anhand der Ausgangszusammensetzung und der bewegten Inkubation (Rühren) mit der statischen Kontrollinkubation verglichen (Abbildung 3.37). Verwendet wurden für die T-RFLP der vorwärtsmarkierte Primer 109f[fam] und der Rückwärtsprimer 934r (Tabelle 2.10). Die mikrobiellen Diversitäten innerhalb des Reisfeldbodens (selbe Ursprungsregion) waren sehr ähnlich zueinander, auch wenn die Bodenproben von verschiedenen Beprobungszeitpunkten verglichen wurden. Der Faulschlamm und die Flusssedimente zeigten eine sehr verschiedene Zusammensetzung der Lebensgemeinschaften im Vergleich zum Reisfeldboden (Abbildung 3.36). Auffällig bei dem Faulschlamm war die Dominanz von nur einer T-RF (*Methanosarcinaceae*). Insgesamt zeigte der Faulschlamm 7 verschiedene und die Flusssedimente 13 verschiedene T-RF, während im inkubierten Reisfeldboden 26 verschiedene T-RF gefunden werden konnten.

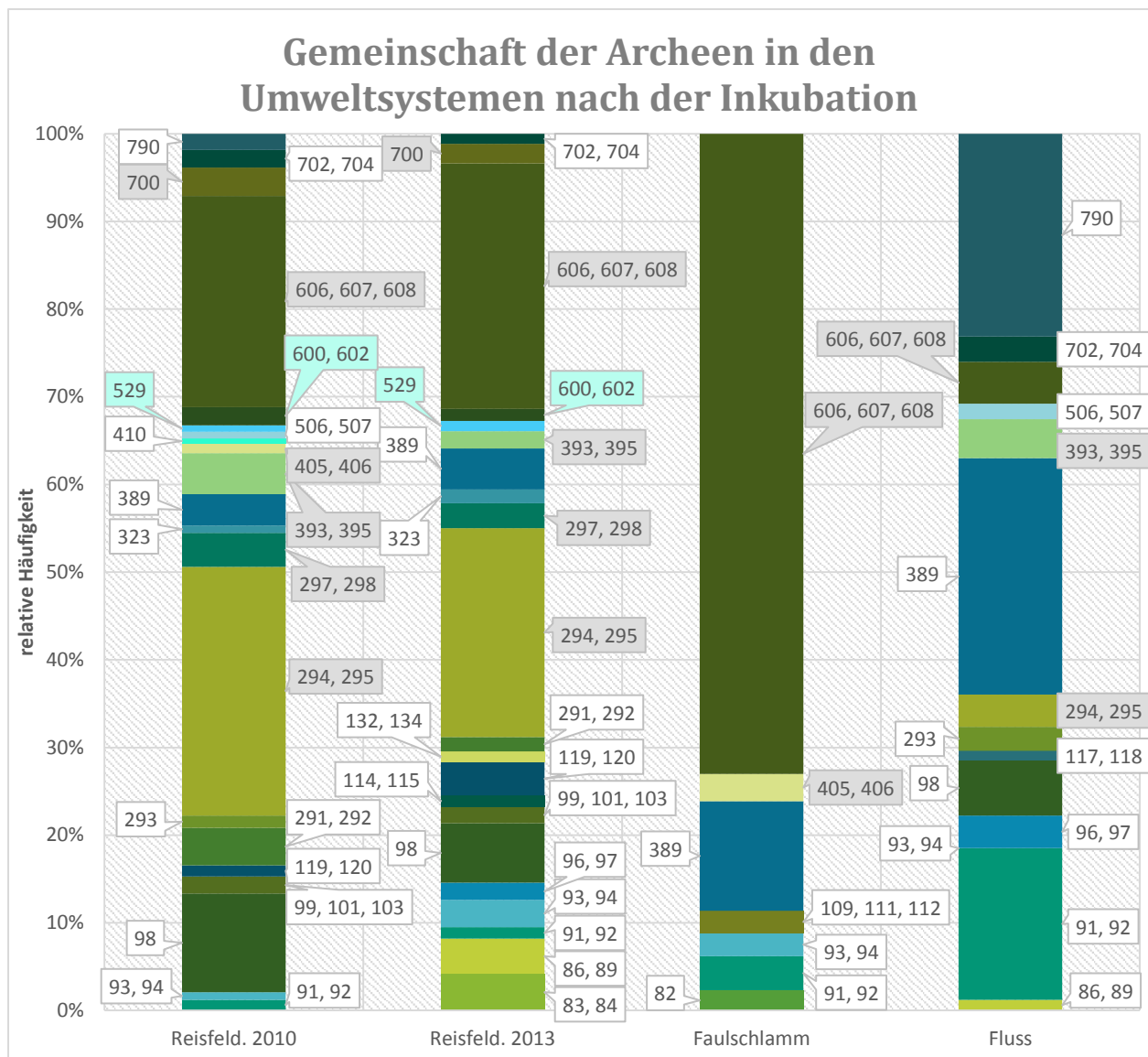


Abbildung 3.36: Gemeinschaft der Archeen am Ende des Inkubationsexperiments nach 45 Tagen unter nicht bewegten Bedingungen in den drei Umweltsystemen (Faulschlamm, Flusssediment und Reisfeldboden). Die T-RF sind in 29 verschiedene mögliche Gruppen aufgetrennt und anhand der verschiedenen Farben der jeweiligen Umweltsysteme dargestellt. Für jedes Umweltsystem wurde nur eine Probe analysiert oder dargestellt. (Für eine Zuordnung der T-RF siehe Tabelle 2.16).

Für eine Zuordnung der gefundenen T-RF können anhand von einer existierenden Klonbibliothek aus der Literatur und der Vorhersage von Schnittstellen aus Reinkulturen einige T-RF zugeordnet werden (Tabelle 2.16). In der Ausgangsprobe waren es im Reisfeldboden bereits 16 verschiedene T-RF. Auch die bewegten Inkubationen (16 T-RF) blieben ähnlich divers, auch wenn hier kleinere T-RF nicht etabliert waren im Vergleich zur statischen Inkubation (26 T-RF) (Abbildung 3.37).

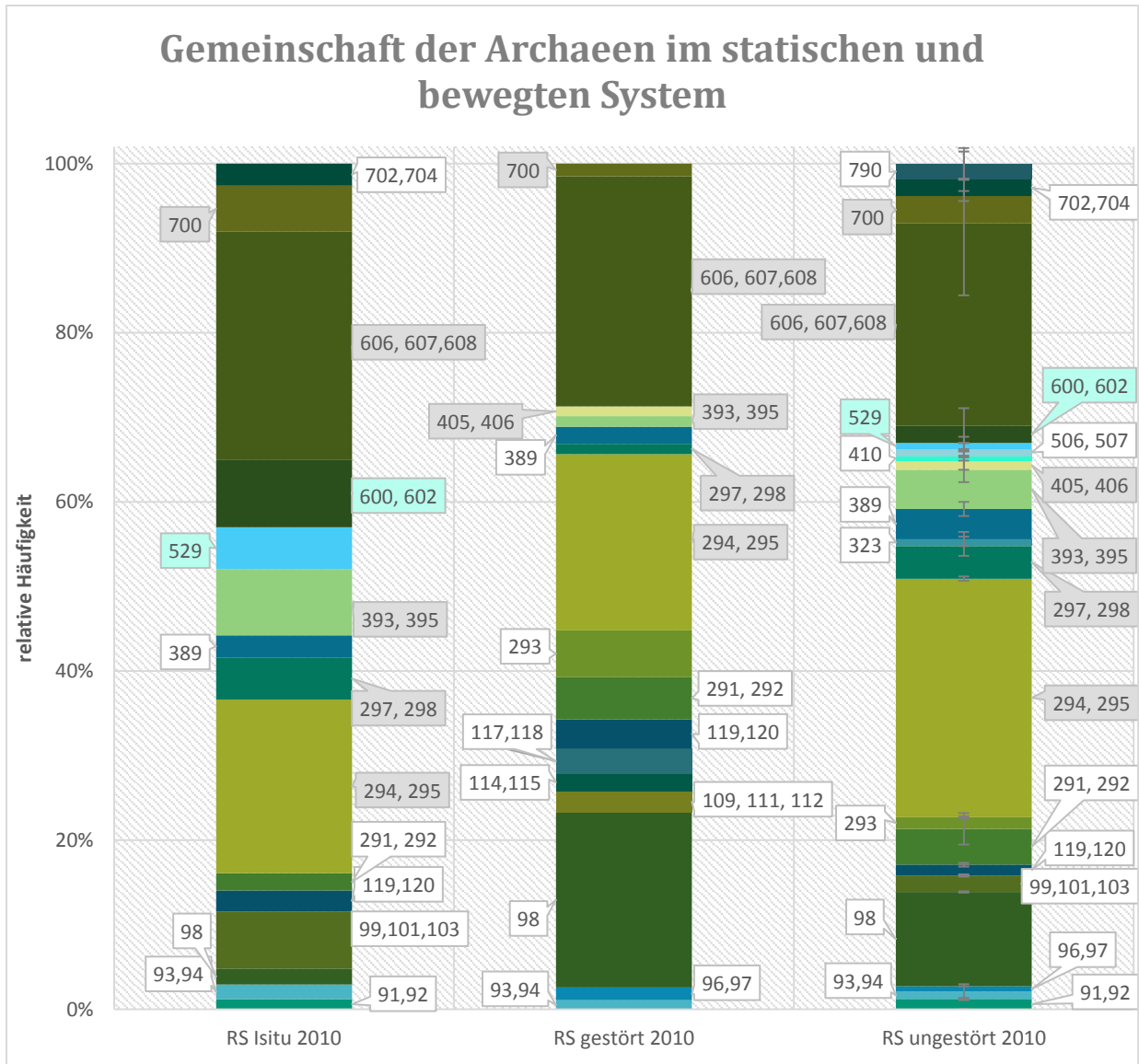


Abbildung 3.37: Gemeinschaft der Archaeen im statischen und bewegten (magnetisch gerührten) System der inkubierten Reisfeldbodenproben (RS) im Vergleich am Ende des Inkubationsexperiments nach 45 Tagen. Analysiert wurde die Gemeinschaft einmal je Inkubation, mit Ausnahme für die ungestörte Inkubation. Hier wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. (Für eine Zuordnung der T-RF siehe Tabelle 2.16).

Diskussion

In allen Umgebungen müssen mikrobielle Gemeinschaften Änderungen von Umweltbedingungen und die damit verbundenen Stressfaktoren tolerieren und sich dementsprechend anpassen. Die Stressfaktoren können unregelmäßig oder regelmäßig wiederkehren oder nahezu dauerhaft vorherrschen (Martin und Allgaier 2011). Je nach Störungsintensität kann Stress zu einem Vorteil für bestimmte Arten führen, nämlich für die stressresistenteren, die sich nicht von konkurrenzstarken Arten verdrängen lassen (Hunkeler u. a. 2006). Es entsteht eine Koexistenz. Hauptstressfaktoren wie z. B. extreme Temperaturschwankungen, verschiedene pH-Wert-Bereiche, anhaltende Trockenphasen und hohe Salzkonzentrationen wurden bereits für verschiedenste mikrobielle Gemeinschaften untersucht (Galinski und Trüper 1994; Storz und Hengge-Aronis 2000; Beales 2004; Brioukhanov und Netrusov 2007; Perreault u. a. 2007; Vriezen u. a. 2007; Oren 2011; Yuan u. a. 2011; Hao u. a. 2012; Kato u. a. 2014).

Im Mittelpunkt dieser Dissertation steht die Änderung der Aktivität und der Diversität der methanogenen Lebensgemeinschaften unter andauernden Stressbedingungen. Dafür wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Wasserverfügbarkeiten und von verschiedener Boden auflockernden Bewegungen genauer untersucht.

4.1 Einfluss verschiedener Wasserverfügbarkeiten im Inkubationsexperiment

Die mikrobielle Gemeinschaft im Reisfeldboden ist angepasst an geflutete und permanent sauerstofffreie Zustände, aber unter Austrocknung und bei zunehmender Belüftung muss sie sich an diese neuen Bedingungen, die Stressfaktoren darstellen, anpassen (Griffiths 2003, Vriezen u. a. 2007). Über die methanogene Gemeinschaft und deren Aktivität unter Trockenstress existieren nur wenige Studien (Li u. a. 2002; Ma und Lu 2011; Anderson u. a. 2012; Ma u. a. 2012; Ma u. a. 2013; Wagner u. a. 2013; Ye u. a. 2013). Im Hinblick auf die CH₄-Produktion konnte in Studien gezeigt werden, dass die Austrocknung oder eine kurze Trockenperiode die Methanemission in Reisfeldern reduzierte (Li u. a. 2002; Ma und Lu 2011). Reisfelder können als gutes Modellsystem dafür dienen, die mikrobielle Ökologie der anaeroben Nahrungskette besser zu verstehen.

Als Ergebnisse der bekannten Studien über Austrocknung und Wiederbefeuchtung kann zusammengefasst werden, dass Methanogene trockene Bedingungen sehr gut tolerieren können (Li u. a. 2002; Ma und Lu 2011; Anderson u. a. 2012; Ma u. a. 2012; Ma u. a. 2013; Wagner u. a. 2013; Ye u. a. 2013). Dennoch wurden in keiner dieser Studien die gezielte Austrocknung oder Wiederbefeuchtung und deren Auswirkungen auf die methanogene Gemeinschaft untersucht. Die

Leistungsfähigkeit und die genutzten Produktionswege der Methanogenen unterscheiden sich jedoch gegebenenfalls je nach Feuchtigkeitsstufe, sodass sich unter besonders trockenen Bedingungen die Zusammensetzung der Gemeinschaft oder zumindest die Aktivität dieser Gemeinschaft verändern. Darum sollte mit der vorliegenden Studie untersucht werden, wie sich die verschiedenen Feuchtigkeitsstufen auf die Zusammensetzung und die Aktivität der methanogenen Gemeinschaft auswirkten.

4.1.1 Methanogenes Potential

Die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Studie waren, dass ein Ansteigen der Wasserverfügbarkeit und Methanogenese positiv miteinander korrelieren. Für die CH₄-Produktion wurden – im Gegensatz zur CO₂-Produktion – etwas höhere Feuchtigkeitsstufen (> 40 %) benötigt. Die CO₂-Emission stieg bereits bei niedrigster Wiederbefeuchtung (> 17 %) des Bodens an. Kohlenstoffdioxid entsteht als Abbauprodukt bei den meisten mikrobiologischen Abbauprozessen (Soni 2007). Dabei fungiert CO₂ als Substrat für die hydrogenotrophe Methanogenese. In Böden, die methanogene Archaeen enthalten, wird CH₄ ausgehend von den beiden Hauptsubstraten H₂ und CO₂ (zu einem Anteil von 33 %) oder Acetat (zu einem Anteil von 66 %) gebildet (Conrad 1999; Fey u. a. 2004). Generell verhielten sich in der vorliegenden Studie im Inkubationsexperiment beide Reisfeldböden ähnlich, trotz der sehr unterschiedlichen Bodenparameter. So war beispielsweise die maximale Wasserhaltekapazität in dem lehmigen philippinischen Reisfeldboden etwa doppelt so hoch wie im sandigen italienischen Reisfeldboden.

Die Eigenschaften des italienischen Reisfeldbodens und auch die mikrobielle Gemeinschaft im vollkommen gefluteten Reisfeldboden sind bereits beschrieben worden (Ratering und Conrad 1998; Fey u. a. 2004; Conrad und Claus 2005; Conrad u. a. 2012; Pump und Conrad 2014). Auch der zweite Reisfeldboden, der philippinische, konnte bereits in früheren Studien (Kraus u. a. 2014; Weller u. a. 2014) hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht werden und spielt auch bei der Etablierung von neuen alternativen Bewässerungsmethoden eine wichtige Rolle (Mambani u. a. 1990; Rejesus u. a. 2011). Die Bodenparameter, wie z. B. die organische Kohlenstoffmenge, waren in diesem Boden recht stabil und konnten in anderen Studien ebenfalls so oder so ähnlich ermittelt werden (Breidenbach 2015). Tendenziell konnte aber im philippinischem Reisfeldboden innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte ein Anstieg der organische Kohlenstoffmenge von 1,2 % auf 1,8 % verzeichnet werden (Kraus u. a. 2014).

Für die Wasseraufnahme und -verfügbarkeit sind andere Eigenschaften wie z. B. die Porosität und die Bodenstruktur entscheidend. Aufgrund der variierenden Bodenart und -struktur (Pump 2013; Kraus u. a. 2014; Breidenbach 2015) der beiden untersuchten Reisfeldböden war es zu erwarten, dass es

bedingt durch die maximale Wasserhaltekapazität, die Bodendichte, die Bodenpartikeldichte und die Porosität zu unterschiedliche Ergebnisse kommt. Das Wasserpotential, welches die Bioverfügbarkeit von Wasser in einem System charakterisiert, steht in direktem Zusammenhang zum Porensystem des Bodens (Schroeder 1992). Die Verteilung von feinen und mittelgroßen Poren führt dazu, dass Wasser sehr gut am Boden haftet. Mit zunehmender Anzahl an großen Poren sinkt die Haftung und das überschüssige Wasser läuft, bedingt durch die Gravitationskraft, ab (Schroeder 1992). Dies ist die Erklärung dafür, dass der lehmige philippinische Reisfeldboden eine doppelt so hohe maximale Wasserhaltekapazität zeigte wie der sandige italienische Reisfeldboden. Eine hohe Wasserhaltekapazität könnte somit die Anzahl an anaeroben Mikrohabitaten fördern und so bessere Bedingungen für methanogene Abbauprozesse schaffen. Bei einer Wiederbefeuchtung befindet sich das Wasser zunächst in den großen und mittelgroßen Poren und gelangt unter Umständen nicht mehr in die feinen Poren und fließt schließlich ab. So lässt sich eine niedrigere Wasserverfügbarkeit in den feinen Poren erklären.

Entscheidend für die metabolische Aktivität der methanogenen Archaeen ist aber nicht nur die Wasserverfügbarkeit, sondern die Verfügbarkeit von Substraten im Boden, welche über den anaeroben Abbau von organischem Material gewonnen werden. Während speziell die hydrogenotrophen Methanogenen gasförmige Substrate nutzen, sind die acetiklastischen Methanogene und die fermentierenden Organismen zumeist auf gelöste Substrate angewiesen und könnten daher indirekt abhängig von der Wasserverfügbarkeit sein. In einer Studie von Raich und Tufekciogul (2000) konnte die produzierte Kohlenstoffdioxidmenge von einem Boden variieren, je nachdem mit welcher Pflanzengemeinschaft vorherrschte.

Auch kann sich die Qualität der verfügbaren Kohlenstoffverbindungen in den verschiedenen Böden unterscheiden (Reeves 1997). Der philippinische Reisfeldboden war mit 1,8 % um ein Drittel reicher an Kohlenstoff als der italienische Reisfeldboden (1,2 %). Die maximale Gesamt-CO₂-Produktion betrug 35,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ im inkubierten philippinischen Bodenproben und 20,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ bei den Inkubationen des italienischen Bodens. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte Kohlenstoffmenge auch in höheren Maßen umgesetzt werden konnte (Tabelle 3.2) und eventuell die umgesetzte Substratmenge im philippinischen Reisfeldboden überwog. Die um das Doppelte erhöhte Methanogenese im philippinischen Reisfeldboden verglichen mit dem italienischen Reisfeldboden, könnte auch auf eine höhere Qualität der vorliegenden Kohlenstoffverbindungen hinweisen. Inwiefern die Substratverfügbarkeit limitierend war, könnte durch eine Substratzugabe in zukünftigen Inkubationsexperimenten getestet werden. Durch die Analyse des organisch verfügbaren Materials mithilfe eines hochauflösenden Massenspektrometers könnten Informationen über die Komplexität der Vorläufermoleküle gewonnen werden, welche durch Abbau zu möglichen Substraten gespalten

werden. Dass die Substratqualität einen Einfluss auf die CH₄- und CO₂-Emission zeigen kann, wurde bereits in anderen methanogenen Umwelten, wie den tropischen Moorlandschaften, untersucht (Hoyos-Santillan u. a. 2016). Hier konnte für den anaeroben Abbau gezeigt werden, dass in der obersten Schicht die höchste Verfügbarkeit an Polysacchariden gegeben ist. Potenziell konnten dort in dieser Schicht unter anaeroben Inkubationen die größten CH₄- und CO₂-Mengen produziert werden.

Das maximale CH₄-Potential wurde bei einem völlig geflutetem Reisfeldboden erreicht. Die italienischen Reisfeldproben zeigten eine Rate von 0,2 μmol g⁻¹ d⁻¹ und die philippinischen Reisfeldproben zeigten eine Rate von 0,4 μmol g⁻¹ d⁻¹. Für den italienischen Reisfeldboden wurden in anderen Studien schon ähnliche Raten (0,2–0,5 μmol g⁻¹ d⁻¹) publiziert (Ratering und Conrad 1998; Ramakrishnan u. a. 2001; Wu u. a. 2002; Yuan u. a. 2014). Für den philippinischen Reisfeldboden konnten in einer Studie von Ramakrishnan und Kollegen (2001) verschiedene Raten für die verschiedenen Regionen beobachtet werden: 0,4 μmol (Luisiana), 0,47 μmol (Gapan) und 3,08 μmol g⁻¹ d⁻¹ (Pila). Diese Werte stimmen größtenteils mit denen in dieser Arbeit für den philippinischen Reisboden ermittelten Raten überein. Die CH₄-Produktionsraten zeigten bei niedrigen Feuchtigkeitsstufen bis 50 % Wassergehalt, prozentual zur maximalen Wasserhaltekapazität, ähnliche Werte. Erst bei höheren Wasserverfügbarkeiten stiegen die CH₄-Produktionsraten in den inkubierten philippinischen Bodenproben an im Vergleich zu den italienischen Bodeninkubationen. Dies deutet darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Wasser einen Einfluss auf den Umsatz von organischem Material hat und somit direkt oder indirekt auch auf die Methanogenese.

Durch eine Normalisierung der Gesamtgaskonzentration des CO₂ und des CH₄ gegen die maximalen Produktionen (Abbildung 3.4, Abbildung 3.8) konnte der Anstieg beider Gase in Abhängigkeit von der Wasserverfügbarkeit miteinander verglichen werden. Hierbei wurde für CO₂ bereits ein Anstieg ab 17 % Wassergehalt beobachtet, während der Anstieg des CH₄ erst über einem Wassergehalt von 40 % erfolgte. Es wäre also möglich, dass die methanogene Gemeinschaft direkt von der Wasserverfügbarkeit betroffen ist. Inwiefern das gebildete Substrat für die methanogene Gemeinschaft limitierend war, wurde für hydrogenotrophe und methylotrophe Methanogene nicht untersucht. Prinzipiell wäre es auch denkbar, dass der anaerobe Abbau bei niedrigen Wasserverfügbarkeiten in abgeänderter Form abläuft und ebenfalls andere funktionelle Gruppen des anaeroben Abbaus betroffen sind. Da aber bereits in sehr trockenen Inkubationen CO₂ nachgewiesen wurde, spricht dies für einen zumindest teilweise ablaufenden anaeroben Abbau. Generell ist über die anaerobe mikrobielle Gemeinschaft in Bezug auf die Wasserverfügbarkeit wenig bekannt, es existieren aber Studien über aerobe mikrobielle Gemeinschaften. In einer Studie von Griffiths und Kollegen (2003) konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Gemeinschaft in einem Grasboden resistent gegenüber Austrocknung und Wiederbefeuchtung war. Zwar konnte auch hier mit zunehmender

Austrocknung eine Abnahme des Substratumsatzes gezeigt werden, aber mit Wiederbefeuchtung konnten die physiologischen Funktionen wiederhergestellt werden (Griffiths u. a. 2003). In einer anderen Studie mit einem Forschungsschwerpunkt in Hinblick auf die methanotrophe Gemeinschaft konnte die Aktivität der Bakterien nach einer Austrocknung und anschließender Wiederbefeuchtung nicht wieder hergestellt werden (Schnell und King 1996). Durch Austrocknungsexperimente wurde also schnell klar, dass die methanotrophe Aktivität sehr schnell durch steigende Austrocknung inaktiviert wird (Jäckel u. a. 2001).

Interessant war, dass der philippinische Reisfeldboden nach der initialen CH₄-Produktion etwas länger eine verlangsamte CH₄-Produktion zeigte (bis Tag 21), während im Vergleich dazu die CH₄-Produktion in Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens schon früher gleichmäßiger anstieg (ab Tag 14). Eine Möglichkeit für die verlangsamte CH₄-Produktion in der Anfangsphase könnte die Verfügbarkeit von alternativen Elektronenakzeptoren wie z. B. Eisen (III) sein.

Die Gesamtmenge an Eisen war im philippinischen Reisfeldboden etwa doppelt so hoch wie im italienischen Reisfeldboden (Tabelle 4.1). Stabile methanogene Bedingungen sind erst unter sauerstofffreien Bedingungen erreicht, wenn Nitrat, Eisen (III) und Sulfat komplett zu Nitrit, Eisen (II) und Schwefelwasserstoff reduziert wurden und somit ein negatives Redoxpotential gegeben ist (Yao u. a. 1999; Conrad und Frenzel 2003). Möglicherweise können in den relativ trockenen Bodenproben noch alternative Elektronenakzeptoren vorhanden sein.

Bereits in mehreren Studien konnte diese initiale CH₄-Produktion beobachtet werden (Achnich u. a. 1995; Roy u. a. 1997; Yao und Conrad 1999). So startete die Methanogenese anfangs parallel zur Reduktion von Sulfat, Nitrat und Eisen (III), erst später aber ging sie in die exponentielle Phase über. Vermutet werden kann, dass zu Beginn für die Initiierung der Methanogenese genügend Elektronendonoren zur Verfügung standen. Die initiale Methanogenese stoppte, wenn die Gibbs-Energie einen Wert von über -26 kJ mol^{-1} aufwies (Yao und Conrad 1999). Anschließend stoppte die Methanogenese durch die Verfügbarkeit von Nitrat, Eisen (III) und Sulfat und startete erst wieder, wenn die alternativen Elektronenakzeptoren in ihrer reduzierten Form vorlagen. Diese initiale CH₄-Produktion wurde in Böden mit einer hohen methanogenen Populationsgröße beobachtet (Yao und Conrad 1999). Die rasante Methanogenese wird außerdem durch die Widerstandsfähigkeit der methanogenen Gemeinschaft gegenüber Austrocknung begünstigt (Mayer und Conrad 1990; Fetzer u. a. 1993; Joulain u. a. 1996; Ueki u. a. 1997). Beide Faktoren treffen anscheinend auch unter Bedingungen mit niedrigen Wasserverfügbarkeiten zu, da bereits bei niedrigsten Feuchtigkeitsgraden die CH₄-Produktion und die Zahl der *mcrA*-Transkripte ansteigen (Abbildung 3.3, Abbildung 3.7, Abbildung 3.19, Abbildung 3.20).

Auch gibt es Studien über eine mögliche syntrophe Beziehung einiger Methanogenen (*Methanosaeta harundinace*, *Methanosarcina barkeri*) mit einigen *Geobacter*-Arten (Rotaru u. a. 2014; Tang u. a. 2016). Vermutet werden kann, dass möglicherweise der Elektronentransfer über Pili eine wichtige Rolle für die CH₄-Produktion spielen kann (Rotaru u. a. 2014). In einer anderen Studie, der von Tang und Kollegen (2016), wird vermutet, dass *G. sulfurreducens* die initiale Methanogenese durch das Absenken des Redoxpotentials begünstigt. Diese Möglichkeit der syntrophen Beziehung wäre in der initialen Phase durchaus eine Erklärung. Dafür spricht, dass das Isotopensignal in trockeneren Proben sehr schnell acetiklastisch wird.

Tabelle 4.1 Bodentyp, pH-Wert und Gesamteisen im italienischen und philippinischen Reisfeldboden

variable	soil type	pH	Fe _{tot} (μmol gdw ⁻¹)	Reference
italian rice field soil	sandy loamy silt; Uls	5.8	554 (39438 ppmv)	Pump (2013)
philippine rice field soil	high clay silt; Ut4	6.3	1420 (66116 ppmv*)	Breidenbach (2015), *B. Breidenbach (personal communication, 27.02.2014)

Es konnte mit den gezeigten Versuchen nicht erklärt werden, inwieweit unter trockenen Bedingungen die alternativen Elektronenakzeptoren eine Rolle spielen. Dies sollte in Zukunft noch weiter untersucht werden. Anzunehmen ist aber, dass, sobald Methanogenese aus kompetitiven Substraten wie Acetat oder CO₂ und H₂ stattfand, die alternativen Elektronenakzeptoren bereits reduziert vorlagen.

Es existiert aber auch die Möglichkeit, dass CH₄ aus nicht kompetitiven Substraten wie Methanol, Methylaminen und Methylsulfiden gebildet wird. Eventuell werden diese Substrate bevorzugt bei der initialen CH₄-Produktion genutzt oder könnten besonders unter ungünstigen Bedingungen von Vorteil sein. Unter optimalen Bedingungen erfolgt die CH₄-Produktion hauptsächlich aus Acetat oder CO₂ und H₂ (Penger 2012) und nur 5 bis 10 % werden aus nicht kompetitiven Substraten wie Methanol, Methylaminen und Methylsulfiden gewonnen (Winfrey u. a. 1977; Lovley und Klug 1983; Nüsslein und Conrad 2000; Singh u. a. 2005; Jiang u. a. 2009). Methanol entsteht beim anaeroben Abbau von Pektin und Lignin und Methylamine werden aus Glycinbetain, Cholin, Trimethylaminen und Stickstoffoxiden gebildet (Kleber u. a. 1977; Fiebig und Gottschalk 1983; Capone und Kiene 1988; Galbally und Kirstine 2002; Kolb 2009). Diese Substrate können nicht von anderen anaeroben Mikroorganismen genutzt werden, aber methylotrophe Methanogene können daraus auch bei Vorhandensein alternativer Elektronenakzeptoren CH₄ bilden. In einzelnen Studien wurde auch beschrieben, dass quartäre Amine wie Cholin und Glycinbetain als direkte Substrate von

Methanogenen verwendet werden können (Watkins u. a. 2012; L'Haridon u. a. 2014; Watkins u. a. 2014).

In sehr speziellen Fällen können geringe CH₄-Mengen als Nebenprodukt entstehen, wie z. B. bei einigen Clostridien, welche auf L-Methionin wachsen (Rimbault u. a. 1988). Auch der thermophil lebende Mikroorganismus *Archaeoglobus sp.* kann etwas CH₄ emittieren (Mori u. a. 2008). Generell ist dies im Reisfeldboden aber eher unwahrscheinlich.

4.1.2 Isotopensignatur des Kohlenstoffs

Der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese konnte durch die Hemmung der acetiklastischen Methanogenese in philippinischen Reisfeldböden bestimmt werden. Die Daten der stabilen Kohlenstoffisotopenfraktionierung des CH₄ lassen vermuten, dass hydrogenotrophe Methanogenese bei allen Feuchtigkeitsstufen die dominierende CH₄-Produktion zu Beginn der Inkubationen darstellt. Am Ende der Inkubationen betrug der Anteil der hydrogenotroph produzierten CH₄-Menge in den gefluteten Bodenproben jedoch in etwa 30 % und in den inkubierten weniger feuchten Bodenproben noch bis zu 60 %. Der Anteil des hydrogenotroph produzierten CH₄ am Ende der Inkubationszeit entsprach mit 30 % dem erwarteten Prozentsatz, der bereits in früheren Studien über geflutete Reisfeldern erwähnt worden war (Fey u. a. 2004).

Bei geringen Wasserverfügbarkeiten wechselt die initiale CH₄-Produktion somit schneller von hydrogenotroph zu acetiklastisch. Möglich wäre hier, dass durch eine veränderte mikrobielle Aktivität der Fermentierer die Substratverfügbarkeit für die Methanogenese beeinflusst wird. Denkbar ist auch, dass der Wassermangel die Enzymaktivität verlangsamt oder in einigen sehr trockenen Fällen inhibiert. Das schnelle Abflachen des hydrogenotroph gebildeten CH₄ könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Produktionsweg unter trockenen Bedingungen nicht so stark favorisiert wird. Allerdings dominierte die acetiklastische Methanogenese nicht so stark wie bei feuchten Inkubationen.

Auffällig war bei den gehemmten Inkubationen die starke Fraktionierung in den feuchteren Proben, während sich die eher trockenen Proben weniger stark veränderten. In einer Studie von Penning (2005) wurde der Zusammenhang der Stärke der Fraktionierung mit der verfügbaren Energie in einem System beschrieben: Wenn viel Energie in einem System zur Verfügung steht, ist die Fraktionierung sehr gering bis kaum vorhanden und wenn sehr wenig Energie vorhanden ist, tritt eine sehr starke Fraktionierung auf. Übertragen könnte das für die vorliegende Arbeit bedeuten, dass unter trockeneren, nur leicht feuchten Bedingungen viel Energie in Form von Acetat und H₂ zur Verfügung stand und nur wenig von Konkurrenten genutzt werden konnte. Dadurch blieb die Fraktionierung sehr lange sehr gering, während im feuchten System die Energie in Form von Acetat und H₂ sehr schnell verbraucht war. In den trockeneren Proben konnte interessanterweise am Ende der Inkubationszeiten noch Acetat

detektiert werden. Die Acetatmengen bei den feuchten Inkubationen hingegen lagen am Ende immer sehr stark am Detektionslimit. Dass verfügbares Acetat verbraucht wurde, konnte auch durch Messung des Acetatisotopensignals gezeigt werden. In den feuchteren Proben zeigte sich, dass das Isotopensignal vom Acetat eher schwerer wurde und leichtes Acetat verbraucht wurde. In den gehemmten philippinischen Bodeninkubationen konnte eine Anhäufung von Acetat mit steigendem Wassergehalt beobachtet werden und das Acetatisotopensignal war tendenziell leichter als in den nicht gehemmten Proben. Unter trockenen Bedingungen gab es kaum Änderungen in der Menge des verfügbaren Acetats und auch das Isotopensignal schien sich nicht geändert zu haben. Dies könnte bedeuten, dass hier die Acetatmengen nicht ausreichend verbraucht werden konnten.

Der Fraktionierungsfaktor setzt sich zusammen aus dem Isotopenverhältnis des Substrats (z. B. CO_2) geteilt durch das Isotopenverhältnis des Produkts (z. B. CH_4). Um das Rechnen mit negativen Zahlen zu vermeiden, werden beide Isotopenverhältnisse vor dem Teilen mit 1000 addiert. Je nachdem wie stark gegen das schwere oder leichte Isotop diskriminiert wird, verändert sich der Fraktionierungsfaktor des mikrobiologischen Prozesses. Der angenäherte Fraktionierungsfaktor kann mit der produzierten Gesamtmethanmenge berechnet werden unter der Annahme, dass CH_4 hauptsächlich über den hydrogenotrophen oder den acetiklastischen Produktionsweg entsteht. Dieser angenäherte Fraktionierungsfaktor setzt sich aus dem Fraktionierungsfaktor des CH_4 aus dem CO_2 , dem Isotopenverhältnis des CH_4 aus dem Acetat und dem Anteil des gebildeten CH_4 aus dem CO_2 zusammen. Diese Annahme liefert eine grobe Idee bezüglich des Anteils der hydrogenotroph gebildeten Methanmenge (Conrad 2005). Dadurch ist der angenäherte Fraktionierungsfaktor eine gute Kenngröße, um verschiedene Umweltbedingungen zu vergleichen. Der italienische Reisfeldboden zeigte einen Trend von niedrigen Fraktionierungsfaktoren ($\alpha = 1,025$) in sehr trockenen Inkubationen über etwas höhere Fraktionierungsfaktoren (1,035) in mittelfeuchten Proben bis hin zu den höchsten Fraktionierungsfaktoren (1,04), welche eher nur unter gefluteten Bedingungen auftraten.

Bei den Inkubationen des philippinischen Bodens war der Trend nicht so klar zu erkennen. Hier zeigte nur die zu 40 % feuchte Inkubationsprobe einen etwas niedrigeren Fraktionierungsfaktor (1,035). Alle weiteren der philippinischen Inkubationsproben zeigten im Vergleich zu den italienischen Proben einen allgemein sehr viel stärker ausgeprägten Trend vom anfänglichen höheren hydrogenotrophen CH_4 -Anteil (Fraktionierungsfaktor 1,045) zum tendenziell höheren acetiklastischen CH_4 -Anteil (Fraktionierungsfaktor 1,04) am Ende der Inkubationsperiode.

Bei den Inkubationen des philippinischen Bodens waren die CO_2 -Konzentrationen aber wesentlich höher, wodurch eine kleine Veränderung in der Kohlenstoffisotopenzusammensetzung leichter überdeckt wird.

Eventuell ist auch die methanogene Gemeinschaft bei niedrigen Feuchtigkeitsstufen in ihrer Aktivität eingeschränkt, sodass nur noch einzelne Methanogene aktiv bleiben können und sich dadurch die Kohlenstoffisotopenfraktionierung verändert. Klar zugeordnet werden kann die Aktivität mithilfe der *mcrA*-Transkripte. Aber auch mithilfe des Vergleichs der Kohlenstoffisotopenfraktionierung der beiden untersuchten Reisfeldböden kann vermutet werden, dass in den philippinischen Reisfeldböden acetiklastische Methanogene, wie *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae*, einen sehr hohen Anteil an der aktiven Gemeinschaft ausmachten, da das CH₄-Isotopensignal unter allen Bedingungen sehr schnell schwerer wurde. Im italienischen Reisfeldboden zeigte sich zu Beginn ein ähnlicher Trend. Hier blieb das Signal in den feuchteren Bodenproben entweder gleich oder wurde am Ende der Inkubationszeit wieder leichter. Das lässt darauf schließen, dass die hydrogenotrophen Methanogenen während der gesamten Inkubation im Vergleich zur acetiklastischen Methanogenese relativ stark aktiv waren. Vermutlich sank der Anteil des hydrogenotroph gebildeten Methans mit niedrigeren Wasserverfügbarkeiten im italienischen Reisfeldboden ab.

In kaum einer Studie mit dem Fokus auf Austrocknung oder geringen Feuchtigkeitsverfügbarkeiten wurden die Veränderungen in der stabilen Kohlenstoffisotopenfraktionierung untersucht. Ausnahme hiervon ist eine Studie über den Effekt von Austrocknung und Wiederbefeuchtung im organischen Material in den Blattachsen von Bromelien (Brandt 2015; Brandt u. a. 2015; Brandt u. a. 2016). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Austrocknung der Anteil der acetiklastischen Methanogenese anstieg und der hydrogenotrophe Anteil abnahm (Brandt u. a. 2015). Wenn die Änderungen der stabilen Kohlenstoffisotopenfraktionierung im Reisfeldboden analysiert werden, können ähnliche Trends anhand der leichten Verschiebung des angenäherten Fraktionierungsfaktors angenommen werden. Somit gibt die stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung im CH₄ Hinweise auf die verwendeten Produktionswege der methanogenen Gemeinschaft.

Umfassende Studien über die Änderungen der stabilen Kohlenstoffisotopenfraktionierung existieren hingegen in anderen Umweltsystemen. Diese zeigten nicht diesen zeitlichen Verlauf (in Seen und Flüssen). Hier überwogen hydrogenotrophe Methanogene mit 66 % (Conrad 2005). Im Darm von Wiederkäuern herrschte sogar eine fast vollständige Dominanz von hydrogenotrophen Methanogenen (Nicholson u. a. 2007; Janssen und Kirs 2008). Eine Übersicht über die beobachteten Fraktionierungsfaktoren unter verschiedensten Umweltbedingungen wird in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2 Eine Zusammenfassung des angenäherten Fraktionierungsfaktors α in den verschiedenen Umweltsystemen. Für die jeweilige Berechnung dieses Fraktionierungsfaktors wurde hauptsächlich angenommen, dass das CH_4 aus dem CO_2 produziert wird; nur in einigen Studien war es möglich einen Fraktionierungsfaktor zu berechnen, wo CH_4 hauptsächlich aus Acetat gebildet wurde (aktualisiert nach Conrad, 2005).

environment	estimated or assumed values of		reference
	α_{app} acetate $\rightarrow \text{CH}_4$	α_{app} $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4$	
Japanese rice field		1.045	(Sugimoto und Wada 1993)
California rice field		1.052	(Chidthaisong u. a. 2002)
Thai rice field and swamps		1.073	(Nakagawa u. a. 2002)
Chinese, Thai and Italian rice soil		1.033–1.06	(Penning und Conrad 2007; Conrad u. a. 2012)
Italian rice field	1.00–1.021	1.06–1.073	(Krüger u. a. 2002; Conrad u. a. 2002; Fey u. a. 2004)
Uruguay rice field		1.041	(Scavino u. a. 2013)
Texas rice field		1.045–1.060	(Tyler u. a. 1997)
upland soil		1.02–1.063	(Angel u. a. 2012)
Japanese riparin forest		1.050	(Itoh u. a. 2008)
White Oak River		1.082	(Avery und Martens 1999)
Buck Hollow Bog		1.069	(Avery u. a. 1999)
Kings Bog		1.068	(Lansdown u. a. 1992)
Cape Lookout Bright sediment	1.032–1.034	1.056–1.062	(Blair und Carter 1992; Alperin u. a. 1992; Blair u. a. 1993)
16 tropical anoxic Lakes	1.048	1.059	(Conrad u. a. 2011)
Lake Kinnert		1.06–1.07	(Nüsslein u. a. 2003)
Lake Stechlin	1.032	1.045	(Conrad u. a. 2007)
Lake Große Fuchskuhle	1.035	1.049	(Conrad u. a. 2010)
Lake Kivu		1.055	(Pasche u. a. 2011)

4.1.3 Molekularbiologische Methoden

Die Veränderung der Populationsdynamik wurde mithilfe der Fingerprintingmethode (T-RFLP) auf Ebene des archaeellen 16S-rRNA-Gens untersucht. Die Veränderung der Wasserverfügbarkeit zeigte nur einen geringen Einfluss auf Ebene der Populationsdynamik von methanogenen Lebensgemeinschaften. Möglich wäre, dass die hohe Populationsanzahl auf Ebene des archaeellen 16S-rRNA-Gens oder *mcrA*-Gens eine große Menge von inaktiven Mikroorganismen beinhaltet.

Auf DNA-Ebene wurden insgesamt 27 verschiedene T-RF-Fragmente festgestellt und die Summe von den 10 wichtigsten dieser Fragmente stellte den größten Anteil (78–99 %) an der mikrobiellen Gemeinschaft dar. Die Zuordnung zur methanogenen Gemeinschaft konnte für 8 Fragmente (T-RF: 78, 88, 183, 184, 186, 282, 390, 392) getroffen werden und deren Gesamtanteil betrug 69–87 %. Insgesamt wurden unter allen Feuchtigkeitsstufen die vier methanogenen Ordnungen (*Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanocellales* und *Methanosarcinales*) detektiert. Die beschriebene methanogene Gemeinschaft im chinesischen Reisfeldboden während eines zyklischen Abwechslens von Austrocknung und vollkommener Flutung (Ma u. a. 2012) zeigte ähnliche Muster (*Methanocellaceae* (30 %), *Methanosaetaceae* (40 %), *Methanosarcinaceae* (27 %), und *Methanobacteriaceae* (3 %)). Daraus kann geschlossen werden, dass Reisfelder als Inokulum möglicherweise eine bereits an Trockenheit und Wiederbefeuchtung angepasste Gemeinschaft beinhalten, oder dass die DNA-Moleküle zu stabil sind, um zwischen aktiven und inaktiven Mikroorganismen unterscheiden zu können. Die Quantifikation auf DNA-Ebene blieb im Rahmen der vorliegenden Arbeit stabil. Dies konnte so ähnlich bereits in einer anderen Studie über die Aktivität der methanogenen Gemeinschaft während eines zyklischen Abwechslens von Austrocknung und vollkommener Flutung gezeigt werden (Ma u. a. 2012). Auf Genebene konnte dort ein nicht so starker Effekt durch den zyklischen Wechsel der Phasen beobachtet werden; stärker war hier der Effekt auf *mcrA*-Transkriptebene (Ma u. a. 2012). Vergleichend dazu konnte in der vorliegenden Studie der Langzeiteffekt von unterschiedlichen Feuchtigkeitsstufen auf die Gemeinschaft und deren Aktivität analysiert werden.

Dass die Wasserverfügbarkeit einen Einfluss auf die Aktivität der Methanogenen hat, konnte einerseits durch die Aktivitätsdaten, wie die CH₄-Produktion, und andererseits auch über die molekularen Untersuchungen der *mcrA*-Transkriptmengen und anhand der Sequenzierungsergebnisse (*mcrA*-Transkripte) gezeigt werden. Bei der Anpassung der Aktivität an die verschiedenen Feuchtigkeitsstufen scheinen sich einige trockenstress-tolerante Methanogene, wie *Methanosarcina vacuolata*, durchzusetzen. Dies ist anscheinend unabhängig von der Ausgangsgemeinschaft.

Methanosarcina vacuolata ist außerdem besonders flexibel in der Wahl möglicher Substrate. *Methanosarcina vacuolata* war neben *Methanoculleus palmolei* und *Methanocella arvoryzae* der einzige methanogene Organismen, der am Abbau von Aromaten aus Lignin beteiligt war (Kato u. a. 2015). Auch Vertreter von *Methanocella arvoryzae* konnten im Rahmen der vorliegenden Studie in den Inkubationsproben mit niedrigen Wasserverfügbarkeiten gefunden werden, neben vereinzelt auftretenden Vertretern der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanomassiliicoccus* und *Methanosaeta*. Generell passt die Aktivität der gefundenen Gruppen (siehe Sequenzierungsergebnisse in Kapitel 3.3.3) mit *Methanosarcina* im italienischen Boden und *Methanosarcina* und *Methanosaeta*

im philippinischen Boden zu dem gefundenen, zu einem erhöhten acetiklastischen Isotopensignal und zu einer anscheinend erhöhten Aktivität von *Methanosarcina* unter trockenen Bedingungen (Abbildung 3.9, Abbildung 3.11, Abbildung 6.4). Mithilfe der *mcrA*-Transkripte konnte die Aktivität von acetiklastischen und hydrogenotrophen Methanogenen in beiden Reisfeldeböden gefunden werden und mithilfe des CH₄-Isotopensignals konnte eine Abschätzung über den verwendeten Produktionsweg getroffen werden. Das doch sehr stark ausgeprägte CH₄-Isotopensignal passte gut zu der dominierenden Aktivität von *Methanosarcina*, besonders unter den sehr wenig feuchten Bedingungen.

Die Anzahl der Transkripte stieg schon durch eine leichte Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes an. Im philippinischen Reisfeldeboden verdoppelten sich die Kopienzahlen und im italienischen Reisfeldeboden stiegen die Transkripte pro Gramm Boden von 10⁶ auf bis zu 10⁸ an. In feuchteren Inkubationsproben wurden maximale Transkriptmengen von 10⁸–10⁹ pro Gramm Boden beobachtet. Die Transkriptmengen im philippinischen Boden waren immer etwas niedriger als die im italienischen Reisfeldeboden, obwohl die CH₄-Produktionsrate im philippinischen Boden etwa doppelt so hoch war wie im italienischen Reisfeldeboden. Interessanterweise zeigte bereits der trocken inkubierte philippinische Boden einen hohen Anteil an vermeintlich aktiven Methanogenen, nämlich eine Transkriptmenge von über 10⁶ Transkripten pro Gramm Boden. Die Transkriptmengen im nicht inkubierten philippinischen Reisfeldeboden (Probennahme ebenfalls im Frühjahr 2012) wurden zusätzlich in einer anderen Arbeit im Jahre 2013 und 2014 analysiert (Pledl 2014). Damals konnten 10⁷ Transkripte pro Gramm Boden (Trockengewicht) bestimmt werden. Diese Transkriptmengen konnten durch die aktuelle Arbeit (10⁶ Transkripte pro Gramm trockenen Boden) im Großen und Ganzen bestätigt werden. Anscheinend sinkt die Aktivität in trocken gelagertem Boden nicht unter ein bestimmtes Minimum und bleibt somit vermutlich über Jahre stabil auf diesem Level. Die hohen Transkriptmengen (10⁸ bis 10¹⁰ Transkripte pro Gramm Boden Trockengewicht) sinken unter optimalen Bedingungen anscheinend aber durch den Wechsel auf trockene aerobe Bedingungen innerhalb von einer Woche auf dieses Level ab (Pledl 2014). Es war leider technisch nicht möglich, die aktive methanogene Gemeinschaft im trockenen Boden zu sequenzieren, da die PCR-Effizienz den limitierenden Schritt darstellte und vermutlich die *mcrA*-Transkriptmengen nicht ausreichten für eine Sequenzierung. In einer Studie von Brandt und Kollegen (2014) konnte gezeigt werden, dass sich die Diversität und Häufigkeit der mikrobiellen Gemeinschaft im Waldboden und im Seesediment über 11 Tage nicht änderte, solange eine Lagerung bei niedrigen Temperaturen gegeben war. Aber bereits bei hohen Inkubationstemperaturen von 37 °C änderte sich die mikrobielle Zusammensetzung der Gemeinschaft. Über die Stabilität der mRNA gegenüber der rRNA ist im archaeellen System wenig bekannt. Angenommen wird, dass der Abbau der RNA Ähnlichkeiten aufweist mit dem Abbau der RNA in Eukaryoten (Evguenieva-Hackenberg und Klug 2009), aber auch noch einige Parallelen zu dem der

Bakterien (Clouet-d'Orval u. a. 2015). Dass sich der Abbau von der mRNA an die verschiedenen Wachstumsbedingungen im bakteriellen System anpasst, wurde bereits untersucht (Rauhut und Klug 1999). Generell kann aber gesagt werden, dass die rRNA stabiler ist als die mRNA (Maquat und Arraiano 2008).

Grundsätzlich konnte in der aktuellen Untersuchung mit dem Anstieg der Transkriptmenge auch ein Anstieg der CH₄-Produktion beobachtet werden, was auch schon in anderen Studien validiert werden konnte (Ma u. a. 2012). Interessanterweise waren aber die Transkriptmengen im philippinischen Boden immer etwas niedriger als die im italienischen Reisfeldboden, obwohl die CH₄-Produktionsrate im philippinischen Boden etwa doppelt so hoch war wie im italienischen Reisfeldboden.

Die vorliegenden Ergebnisse und die bisherigen aus der Literatur bekannten Resultate lassen vermuten, dass es unter schlechten Umweltbedingungen nur zu einer Regulierung der Aktivität der methanogenen Gemeinschaft kommt. Die variierenden Produktionsraten demonstrieren zwar, dass die Wasserverfügbarkeit die Aktivität beeinflusst, aber ob die Regulierung nur auf Ebene der Transkripte erfolgt oder zusätzlich auch auf Ebene der Proteinexpression, bleibt weiter unklar. Dies könnte bedeuten, dass die mikrobielle Gemeinschaft entweder nur die Aktivität reguliert und je nach Umweltbedingungen auf RNA-Ebene die Anzahl der Transkripte oder auf Proteinebene die Synthese der Proteine kontrolliert oder inaktiv verbleibt.

Für die methanogene Aktivität eignen sich besonders gut die Analysen der *mcrA*-Transkripte. Durch die Kombination von Untersuchungsergebnissen auf DNA-Ebene, wie z.B. der Zusammensetzung der Gemeinschaft, und der Analyse auf RNA-Ebene, nämlich der Transkripte, ergibt sich ein komplexes Gesamtbild. Aus methodischer Sicht wäre die Analyse der Expressionen der Transkripte und der somit verfügbaren Proteine die dritte mögliche Ebene. Doch in diesem Zusammenhang gibt es eine Einschränkung. Zwar liefert die Proteinextraktion aus komplexen Proben ausreichend hohe Proteinmengen, aber die schlechte Qualität und die Kontaminationen des Extraktes mit Hemmstoffen, wie z. B. Huminsäuren, stellen ein großes Problem für weitere Analysen dar (Keiblinger u. a. 2012). Zusätzlich ist die Zuordnung von Proteinen in Hinblick auf ihre phylogenetische Herkunft sehr schwierig zu interpretieren und es fehlen die für die Zuordnung benötigten Datenbanken (Keiblinger u. a. 2012). Aus diesem Grund ist die Anwendbarkeit der Analyse auf Transkriptebene vorteilhafter, auch wenn hier ebenfalls Grenzen durch noch fehlende Reinkultursequenzen und Referenzstammbäume bestehen.

Das Fehlen einer umfassenden Referenzstamm-Datenbank für die Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften erschwert die Auswertung von funktionellen Markergenen. Bei einer Übereinstimmung der *mcrA*-Aminosäuresequenz von über 85,7 und 75,7 % war eine Einteilung zur Art

(Genus) beziehungsweise zur Familie möglich (Hunger u. a. 2011). Zur Einteilung von *mcrA*-Nukleotidsequenzen wurde diesbezüglich ein Schwellenwert von 84 % empfohlen (Yang u. a. 2014). Die Zuordnung der methanogenen *mcrA*-Sequenzen erfolgt nicht durch einen generellen Klassifizierer, sondern durch phylogenetische Einordnung in einen Referenzstammbaum.

In Bezug auf die phylogenetische Rekonstruktion von Stammbäumen innerhalb der methanogenen Gruppen hat sich in den letzten Jahrzehnten viel geändert. Vor 2008 gab es die Ordnungen *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales* und *Methanomicrobiales*. Von Sakai und Kollegen (2008) wurde erstmals ein Vertreter der *Methanocellales* und von Borrel und Kollegen (2013) erstmals ein Isolat der *Methanomassiliicoccales* beschrieben. Durch die Analyse des *mcrA*-Gens können alle diese Gruppen in einem Stammbaum rekonstruiert werden. Nobu und Kollegen (2016) zeigten einen aktuellen *mcrA*-Stammbaum mit einer vergleichsweise sehr robusten Phylogenie. Dennoch unterscheidet sich dieser von einem *mcrA*-Stammbaum, welcher anhand des *Maximum-Likelihood*-Algorithmus noch vor drei Jahren berechnet wurde (Borrel u. a. 2013). Generell ist die Phylogenie gemäß der *mcrA*-Stammbäume relativ ähnlich zu der Phylogenie der 16S-rRNA (Abbildung 4.1), obwohl sich auch hier viel verändert hat wie Borrel und Kollegen (2016) mittels des Vergleichs der aktuellen phylogenetischen Gruppen mit denen vor dem Jahre 2012 zeigten. Allgemein lässt der Vergleich verschiedener Bäume den Schluss zu, dass die Cluster relativ stabil sind, aber die relative Position noch unklar ist. Der in der vorliegenden Studie gezeigte Baum (Abbildung 3.25) resultiert aus Sequenzen von hauptsächlich kultivierten Methanogenen. Da hierbei viele phylogenetische Gruppen noch nicht in Form von Umweltsequenzen berücksichtigt wurden, ist die relative Position nicht so aussagekräftig. Durch die Stabilität der Cluster ist jedoch trotzdem eine solide Zuordnung der in der vorliegenden Studie detektierten OTU auf Familien- oder Artebene möglich. Die Zuordnung auf Familien- und Artebene war für die gefundenen OTU sehr erfolgreich, viele konnten bis auf Artebene bestimmt werden (Tabelle 3.5).

Bei der Analyse der T-RFLP konnten *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae* als zwei große Gruppen identifiziert werden. Auf DNA-Ebene zeigte sich für *Methanosarcinaceae* ein leichter Aufwärtstrend von 25 % im Bezug auf die relative Häufigkeit unter feuchten Bedingungen und bis zu knapp 35 % unter trockeneren Bedingungen. Im Vergleich dazu stiegen die sequenzierten *mcrA*-Transkripte von *Methanosarcinaceae* von 30 % auf maximal 90 % an, was einen Anstieg in der Aktivität dieser Gruppe andeutet. Der relative Anteil an *Methanosaetaceae* auf DNA-Ebene bei feuchten Inkubationen des italienischen Reisfeldbodens betrug circa 18 % und sank auf circa 10 % in eher trockeneren Inkubationsproben ab. Die *mcrA*-Transkripte von *Methanosaetaceae* bei den jeweiligen Inkubationen sanken von 25 auf 5 %, was eine niedrigere Aktivität vermuten lässt. Dies zeigt, dass eine

kleine Änderung auf DNA-Ebene mit einer starken Anpassung der *mcrA*-Transkripte und somit einer deutlichen Veränderung der Aktivität einhergeht.

Bei Flutung des italienischen Reisfeldbodens konnten *mcrA*-Transkripte der methanogenen Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanomicrobiales* und *Methanocellales* gefunden werden. Für den philippinischen Reisfeldboden konnten *mcrA*-Transkripte der gleichen Ordnungen nachgewiesen werden. In gefluteten Boden war *Methanosarcinales*, mit einem relativen Anteil der Transkripte von 90 %, der dominanteste, was auf eine starke Aktivität von *Methanosarcinales* hinweist. Interessanterweise stiegen die *mcrA*-Transkripte der Familie *Methanomassiliicoccales* unter relativ trockenen Bedingungen auf einen relativen Anteil von 10 % an. Somit könnte die methylo trophische Methanogenese im philippinischen Reisfeldboden unter trockenen Bedingungen einen stärkeren Anteil an der CH₄-Produktion einnehmen. Unter feuchten Bedingungen konnten mehr *mcrA*-Transkripte von hydrogenotrophen Methanogenen, wie *Methanomicrobiales* (ca. ~1 %), *Methanobacteriales* (3 %) und *Methanocellales* (6 %), nachgewiesen werden. Das Isotopensignal deutete darauf hin, dass die hydrogenotrophe Methanogenese bei niedrigeren Wasserverfügbarkeiten abnahm.

Insgesamt konnte für beide Böden bei feuchten Inkubationen die Aktivität der acetiklastischen und hydrogenotrophen Methanogenen dargestellt werden. Es wurde deutlich, dass der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese mit niedrigerem Feuchtigkeitsgehalt abnahm. Einige Methanogene zeigten eine verringerte Leistungsfähigkeit (CH₄-Produktion) und eine verringerte Anzahl der analysierten *mcrA*-Transkripte bei Befeuchtungen mit wenig Wasser. Die acetiklastischen (*Methanosacetaceae* und *Methanosarcinaceae*) und methylo trophischen (*Methanomassiliicoccaceae* und *Methanosarcinaceae*) Methanogenen zeigten hingegen eine hohe Anzahl der analysierten *mcrA*-Transkripte bei niedrigen Feuchtigkeitsstufen. Die hohen Mengen an *mcrA*-Transkripten von *Methanosarcinaceae* und die in anderen Studien gezeigten Eigenschaften (z. B. beschrieb Zhang u. a., 2006, eine effektive Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies mithilfe von Genen wie der Superoxid-Dismutase) über die Widerstandsfähigkeit lassen vermuten, dass Archaeen der Familie *Methanosarcinales* resistenter gegen Austrocknung sind und bei Wiederbefeuchtung sehr schnell mit ihrer physiologischen Aktivität beginnen, ohne sich lange adaptieren zu müssen. Möglicherweise sind *Methanosarcinales* schon unter niedrigsten Feuchtigkeitsstufen aktiv. Für diese Vermutung spricht, dass bereits im trockenen Reisfeldboden hohe DNA- und RNA-Mengen von vermeintlich aktiven Methanogenen gefunden werden konnten. Denkbar wäre auch, dass die Substratverfügbarkeit unter den trockenen Bedingungen nicht so stark limitierend wirkte, da möglicherweise andere funktionelle Gruppen in ihrer Leistungsfähigkeit reduziert waren. Dafür würde die geringe Fraktionierung sprechen, welche in den wenig feuchten Inkubationsproben des philippinischen Reisfeldbodens relativ gering

war. Dies konnte vermutet werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass die mögliche Fraktionierung bei geringer verfügbarer Energie sehr groß, bei einer hohen Energieverfügbarkeit aber gering war (Penning 2005).

Resümierend kann festgestellt werden, dass die Wiederbefeuchtung unabhängig von den unterschiedlichen Bodenparametern einen Einfluss auf die Aktivität und den Produktionsweg der methanogenen Gemeinschaft hat. Grundsätzlich ist die Diversität im Boden auf DNA-Ebene stabil und die Änderungen passieren auf der Transkriptebene. Prinzipiell ist ebenfalls ein Einfluss auf die Fermentation zu vermuten, sodass der anaerobe Abbau möglicherweise in abgeänderter Form stattfindet. Fermentation erfolgt vermutlich schon bei wesentlich niedrigeren Feuchtigkeitsstufen. Dass alternative Prozesse stattgefunden haben, wurde vermutet, sodass bei niedrigen Feuchtigkeitsstufen erst die alternativen Elektronenakzeptoren verbraucht wurden und anschließend die gezeigte Methanogenese stattfand.

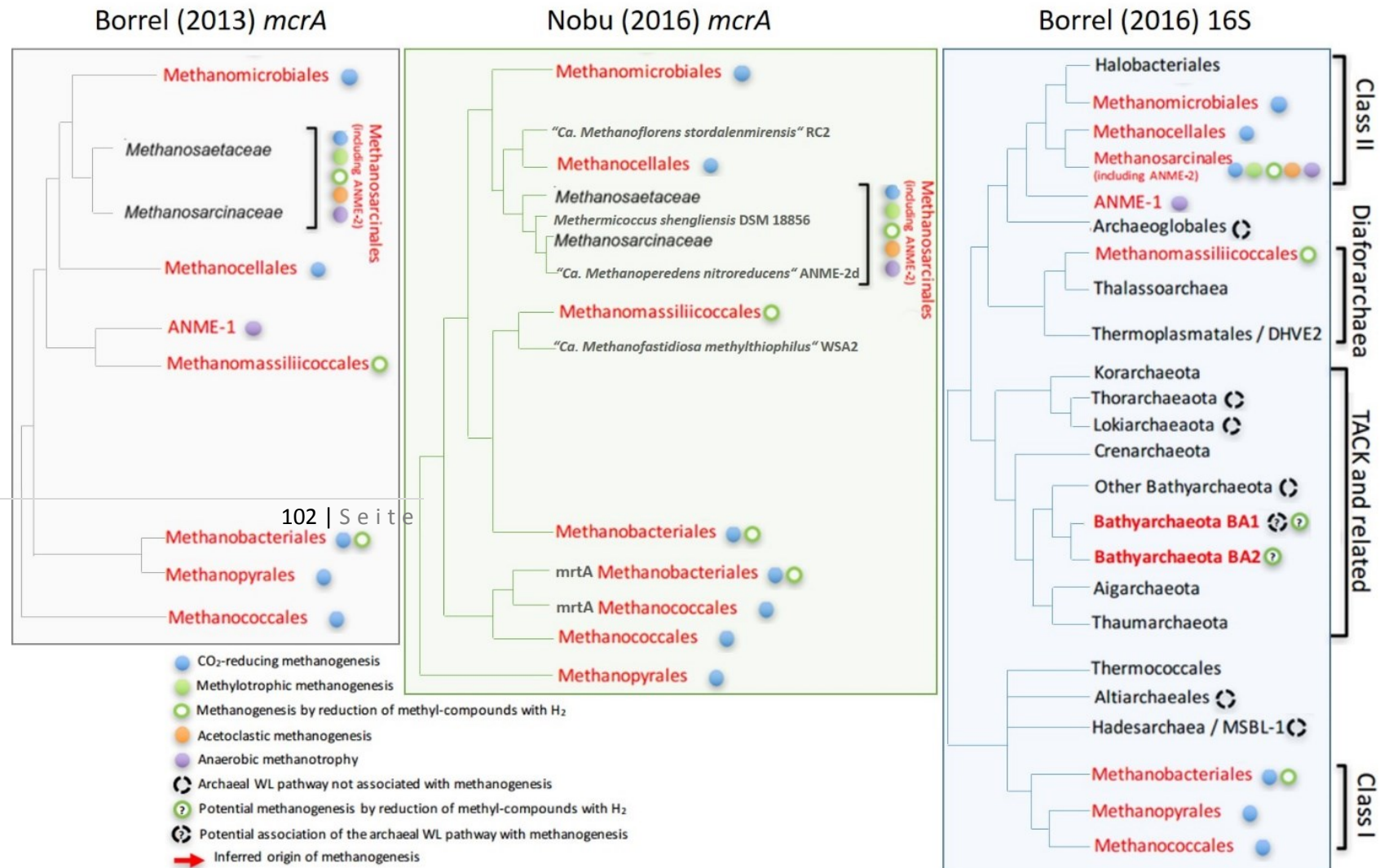


Abbildung 4.1: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der Hauptgruppen der Methanogenen im Vergleich; die zwei linken Stammbäume basieren auf dem Schlüsselenzym *mcrA* und der rechte Stammbaum auf dem 16S-rRNA-Gen. Modifiziert in Anlehnung an Borrel und Kollegen (2013), Nobu und Kollegen (2016) und Borrel und Kollegen (2016).

4.2 Einfluss von Boden auflockernden Bewegungen im Inkubationsexperiment (technischer Ansatz)

In einem weiteren Projekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion und Produktivität von drei verschiedenen methanogenen Gemeinschaften in verschiedenen bewegten Systemen untersucht (gerollt, geschüttelt oder magnetisch gerührt) sowie als Kontrolle unbewegte Umweltproben. In großen technischen Systemen wie in Kläranlagen oder bei Großfermentern ist die Bewegung oft ein wichtiger Faktor für eine effiziente Umsetzung des organischen Materials. Auch unter Laborbedingungen, wie z. B. bei aeroben Flüssigkulturen, wird das Durchmischen durch Bewegung oft genutzt. Aber die Intensität und die Art des Durchmischens zeigen viele Variationen. In nur wenigen Studien wurde die CH₄-Produktion unter verschiedenen Bewegungsstärken im Reisfeld oder Faulschlamm untersucht (Dannenbergh u. a. 1997; Lins und Illmer 2012). Die Studien resultierten in unterschiedlichen Empfehlungen für die jeweiligen Umweltproben. Bisher ist kaum etwas darüber bekannt, wie die methanogene Gemeinschaft auf mechanische Stressfaktoren reagiert. Eventuell haben Methanogene aus bewegten Systemen Vorteile in ihrer Produktivität gegenüber der methanogenen Zusammensetzung aus eher wenig bewegten Systemen. Hinweise auf eine Störung bestimmter methanogener Gruppen liefert möglicherweise der Produktionsweg. Wobei eine Vermutung wäre, dass die acetiklastischen Methanogenen am stärksten negativ durch Bewegung beeinflusst werden. Da sie potenziell eher in Gemeinschaften mit anderen Mikroorganismen zusammen leben, kann Bewegung dieses Gefüge negativ beeinflussen. So wurde in einer Studie von Mayerhofer und Kollegen (1992) beschrieben, dass *Methanosarcina mazei* in einer Lamina wächst und diese nicht ausbildet, wenn die Kultur geschüttelt wird. Allerdings sind die Zellen im Einzelzellstadium sehr instabil, wohingegen die Zellaggregate als relativ robust gelten (Harris 1987; Lange und Ahring 2001). Nicht nur diese Zellaggregate, sondern auch mögliche syntrophe Beziehungen, wie z. B. von einigen Methanogenen (*Methanosaeta harundinace*, *Methanosarcina barkeri*) mit einigen *Geobacter*-Arten (Rotaru u. a. 2014; Tang u. a. 2016) oder die Assoziation von einigen hydrogenotrophen Methanogenen mit Wasserstoffproduzierenden Fermentieren (Stams und Plugge 2009), könnten durch die Bewegung gestört werden. In der Studie von Padmasiri und Kollegen (2007) wurden die hydrogenotrophen Methanogenen durch erhöhte Scherkräfte in Kombination mit einer erhöhten Substratverfügbarkeit nicht negativ, sondern positiv beeinflusst, während sich die relative Verteilung der sonst überwiegend acetiklastischen Methanogenen bei dieser erhöhten Durchflussraten in Kombination mit einer erhöhten Substratverfügbarkeit verringerte. Das Mischen fördert die Geschwindigkeit der Hydrolyse und der Fermentation wie Stroot und Kollegen (2001) feststellten. Eventuell können sich diese hydrogenotrophen und methylo-trophen Methanogenen durch die Störung besonders gut behaupten und gegebenenfalls ist die Bewegungsart dafür entscheidend.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse aufführen: Das nicht bewegte System war in den meisten Fällen das mit der höchsten Aktivität und der höchsten Diversität. Die bewegten Systeme hingegen haben teilweise die Aktivität der Methanogenen vermindert, und selten auch mal verbessert. Dies war aber sehr stark von dem gewählten Umweltsystem abhängig. Die vorliegenden Ergebnisse und die bisherigen aus einer Studie von Dannenberg und Kollegen (1997) erzielten Resultate lassen vermuten, dass die gewählte Intensität der Bewegung besonders entscheidend für die Aktivität der Methanogenen ist.

4.2.1 Umweltsysteme im Vergleich (Bodenparameter, pH-Wert, Fettsäuren, Methanproduktion, Kohlenstoffisotopensignatur, Diversität)

Unter statischen Bedingungen lässt sich die Gesamtmethanproduktion folgendermaßen vergleichen: Die höchste CH₄-Produktion war im Faulschlamm zu verzeichnen, danach folgte die des Flusssediments und an dritter Stelle stand die CH₄-Produktion der methanogenen Gemeinschaft, die im Reisfeldboden lebt. Als Grundlage für die CH₄-Produktion ist der Gesamtkohlenstoffgehalt zu nennen. Dieser war im Faulschlamm 200-mal so hoch wie im Reisfeldboden. Im Vergleich zum niedrigsten Ökosystem (Reisfeld) war im Faulschlamm die Gesamtmethanproduktion etwa 100-mal so hoch. Bei dem Flusssediment war die Gesamtkohlenstoffmenge vergleichbar mit der des Reisfeldbodens, aber auch hier konnte eine höhere Gesamtmethanproduktion als im Reisfeldboden festgestellt werden. Der hier genutzte italienische Reisfeldboden zeigte eine Rate von 0,35 μmol g⁻¹ d⁻¹. Diese CH₄-Produktionsrate lässt sich mit anderen, ähnlichen Studien vergleichen: Dort konnten im Reisfeldboden Raten von 0,2 bis 0,5 μmol g⁻¹ d⁻¹ beobachtet werden (Ratering und Conrad 1998; Wu u. a. 2002; Yuan u. a. 2014). Bei Inkubationen vom Faulschlamm konnte unter nicht bewegten Bedingungen Raten von 11,8 μmol g⁻¹ d⁻¹ erzielt werden. Durch die sehr variable Zusammensetzung des Faulschlammes und die stark schwankende verfügbare Kohlenstoffmenge je nach dem gewählten Mischverhältnis kann die Rate, bezogen auf ein Gramm Trockengewicht, nur schwer mit anderen Studien verglichen werden. Deshalb wird in dem Zusammenhang immer nur das Verhältnis von der gebildeten CH₄-Menge bezogen auf die Gesamtmenge an organischen Substraten angegeben (Rojas u. a. 2010). Im Flusssediment konnte eine CH₄-Produktionsrate von 1 μmol g⁻¹ d⁻¹ gezeigt werden, wobei die CH₄-Produktionsrate recht ähnlich im Vergleich zu anderen Flüssen war. Mach und Kollegen (2015) konnten eine etwas niedrigere CH₄-Produktionsrate (0,2 μmol g⁻¹ d⁻¹) in einem tschechischen Fluss nachweisen, und Avery und Martens (1999) beschrieben eine CH₄-Produktionsrate von 0,5 μmol g⁻¹ d⁻¹. In den einzelnen Umweltsystemen schwankte der Gehalt an organischem Kohlenstoff (Abbildung 3.28). Um die CH₄-Produktionsraten der einzelnen Umweltsysteme besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Raten auf ein Gramm des organischen Kohlenstoffs bezogen. Nach dieser neuen Berechnung hatte der Reisfeldboden mit 29 μmol g_{OrgKohlenstoff}⁻¹ d⁻¹ die niedrigste CH₄-Produktionsrate, gefolgt von der des Flusssediments mit 38 μmol g_{OrgKohlenstoff}⁻¹ d⁻¹ und die höchste CH₄-Produktionsrate zeigte der

Faulschlamm mit $59 \mu\text{mol g}_{\text{OrgKohlenstoff}}^{-1} \text{d}^{-1}$. Anzunehmen wäre auch in diesem Experiment, dass nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der vorliegenden Kohlenstoffverbindungen ein weitere wichtige Faktoren sein könnten, die sich wesentlich in den drei Umweltsystemen voneinander unterscheiden.

Die drei Umweltsysteme zeigten im Vergleich eine unterschiedliche Zusammensetzung und Verteilung in ihrer archaeellen Gemeinschaft (Abbildung 3.36). Die Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft im Faulschlamm war mit 70 % dominiert von *Methanosarcinales*. Ähnliche Zusammensetzungen mit einer Dominanz an acetiklastischen Methanogenen im Faulschlamm konnten bereits in anderen Studien gefunden werden (Padmasiri u. a. 2007; Wilkins u. a. 2015). Als Vertreter der hydrogenotrophen Methanogenese dominierten im Faulschlamm oft Methanogene der Familie *Methanomicrobiales* (Padmasiri u. a. 2007; Wilkins u. a. 2015). Die Zusammensetzung der Archaeen im Flusssedimente war weniger von acetiklastischen Methanogenen, sondern vielmehr von hydrogenotrophen Methanogenen geprägt. Hauptsächlich konnten im Flusssediment mögliche T-RF mit den Ordnungen *Methanosarcinales* (5 %), *Methanomicrobiales* (5 %) und *Methanocellales* (4 %) in Verbindung gebracht werden. Viele T-RF konnten allerdings nicht zugeordnet werden. Ähnliche Zusammensetzungen einer hydrogenotrophen methanogenen Gemeinschaft konnte für einem tschechischen Fluss (Sitka) beschrieben werden (Mach u. a. 2015).

Die Diversität im Reisfeldboden zeigte die höchste Anzahl an verschiedenen Methanogenen und sie beinhaltete sowohl viele acetiklastische als auch hydrogenotrophe Methanogene. Die Zusammensetzung konnte in vielen Studien, anhand von Gemeinschaftsanalysen im Reisfeldboden, in ähnlicher Weise dargestellt werden (Großkopf u. a. 1998; Lueders und Friedrich 2000; Ramakrishnan u. a. 2001; Chin u. a. 2003; Wu u. a. 2009).

4.2.2 Vergleich eines bewegten Systems mit einem statischen System

Die Bewegungen Rollen und Schütteln zeigten wenig negative Auswirkungen im Vergleich zur Kontrollprobe auf die Methanproduktion. Die mechanisch gerührten Inkubationsproben zeigten den deutlichsten Unterschied zur unbewegten Kontrolle. In den mechanisch gerührten Proben konnten beim Faulschlamm und beim Reisfeld positive Effekte und beim Flusssediment sehr stark negative Effekte erzielt werden. In einer ähnlichen Studie von Dannenberg und Kollegen (1997) war der Einfluss des mechanischen Rührens in einem Inkubationsexperiment mit Reisfeldboden ebenfalls untersucht worden. Hier hatte sich gezeigt, dass bei einer höheren Intensität (500 statt 120 rpm, welche in der vorliegenden Studie genutzt wurden) die Bewegung einen sehr stark negativen Effekt auf die Methanproduktion hatte (Dannenberg u. a. 1997). In der vorliegenden Studie hingegen konnte nur beim Rühren des Flusssediments ein sehr stark negativer Effekt beobachtet werden. Am auffälligsten

beim Flusssediment war die sehr körnige (steinige) Zusammensetzung. Dies lässt vermuten, dass die mechanische Zerreibung durch die mechanische Rührbewegung sehr stark von der Zusammensetzung und der Korngröße abhängig sein könnte, was aber bisher nur unzureichend untersucht wurde.

Dass durch die Scherkräfte beim Mischen und Rühren eine Schädigung der Zellen eintrat, konnte in eine Studie von Hoffmann und Kollegen (2008) gezeigt werden. Durch eine zu starke mechanische Zerreibung können zusätzlich die syntrophen Beziehungen gestört werden. Ein zu starkes Mischen führte sogar zu einer erhöhten Anzahl toter Zellen (Vavilin und Angelidaki 2005). Sobald die Intensität niedrig genug ist, dass die Zellen nicht mehr zerstört werden, können positive Effekte auftreten, wie im aktuellen Fall beim Rühren des Faulschlammes gezeigt. Dass ein Wachstum von kokkoiden Zellen durch das minimale Mischen des Faulschlammes im Faulturm gefördert werden konnte, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Vavilin und Angelidaki 2005). Ebenfalls zeigten Lins und Illmer (2012), dass unter starken Mischen der physikalische, zerstörende Effekt negativ wirkte, aber unter moderater Bewegung wurde eine Förderung der CH₄-Produktion beobachtet. Dabei förderte Bewegung vermutlich die Hydrolyse und die Fermentation (Stroot u. a. 2001), woraus eine erhöhte Substratverfügbarkeit resultierte.

So führt das Zerreiben von Mineralien führt bei entsprechend hohen Intensitäten zu einer Erhöhung der Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff und Stickstoff (Carter und Stewart 1995). Gerade beim Faulschlamm sind Mineralien in Flocken eingeschlossen und es ist förderlich, wenn diese durch das Rühren zerrieben werden. Sobald aber zu viele harte Steine oder eine grobe Körnung im Boden vorhanden sind, ist dies nur schwer möglich.

Es kann abschließend festgestellt werden, dass mithilfe der vorliegenden Arbeit keine endgültige Aussage bezüglich positiver oder negativer Wirkung bei mechanischem Stress gegeben werden kann, da viele Eigenschaften der Bodenphysik sowie die rheologischen Effekte nicht bekannt waren und somit nicht beleuchtet wurden.

Wegen der die hier erzielten Ergebnisse kann vermutet werden, dass die gewählte Bewegungsintensität nicht ausreichte, um syntrophe Beziehungen oder Zellaggregate zu schädigen. Durch die bessere Durchmischung im Rahmen anderer Studien konnten eventuell Fermentierer schneller organische Substrate umbauen oder ihre Produktionsmenge und damit die Verfügbarkeit für die Methanogenen erhöhen. Die Methanogenen schienen durch Bewegung nicht in ihrer Aktivität und Zusammensetzung beeinflusst zu werden. Diese Vermutung trifft allerdings nicht für die mechanisch gerührte Inkubation des Flusssediments zu. Hier wurden möglicherweise die Zellaggregate besonders von *Methanosarcinales* durch die mechanische Reibung der grobkörnigen Kieselpartikel stark negativ

beeinträchtigt. Das bedingt vermutlich, dass nur ein eher hydrogenotrophes Signal im CH₄ beobachtet werden konnte.

4.3 Generelle Betrachtungen

In der vorliegenden Arbeit wurde für mehrere Umweltsysteme getestet, ob die gewählten andauernden Stressbedingungen zu Veränderungen führten. Durch die Analyse der Aktivität der gesamten methanogenen Gemeinschaft konnte gezeigt werden, dass auch bei niedriger Wiederbefeuchtung schon eine geringe CH₄-Produktion stattfand. Dabei konnte besonders die veränderte Aktivität in Abhängigkeit von der Wasserverfügbarkeit verfolgt werden. Die Aktivität von hydrogenotrophen Methanogenen schien am stärksten von den trockeneren Bedingungen beeinträchtigt zu werden. Es entwickelte sich in beiden Böden eine Dominanz der relativen Häufigkeit der Transkripte, welche *Methanosarcinales* zugeordnet werden konnten. Ebenfalls zeigten sich mit ansteigender Bodenfeuchtigkeit Änderungen des CH₄-Isotopensignals. Gerade bei den gehemmten Inkubationen konnten nur unter feuchten Bedingungen sehr leichte Kohlenstoffisotope im CH₄ beobachtet werden. Die Populationen auf Ebene des 16S-rRNA-Gens wurden durch die variierende Verfügbarkeit von Wasser nur wenig beeinflusst. Generell spricht die starke Veränderung der Methanproduktionsraten und der ansteigenden Transkripte für eine Anpassung der Aktivität und weniger für eine Änderung der gesamten Diversität. Der hohe Anstieg der Transkripte (bis zum 100-Fachen) in den inkubierten wenig feuchten Reisfeldbodenproben und die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass insbesondere Vertreter der *Methanosarcinales* schon bei niedrigsten Feuchtigkeitsstufen aktiv werden können.

Die Kombination von klassischen analytischen Methoden und molekularbiologischen Methoden vervollständigt das Gesamtbild über die Diversität der methanogenen Gemeinschaft und deren Aktivität unter andauernden Stressbedingungen. Die gewonnenen Einblicke erweitern das Wissen über die stabile Kohlenstoffisotopenfraktionierung und den möglichen Einfluss auf den Produktionsweg durch die Stressbedingungen, wie beispielhaft für die verringerte Leistungsfähigkeit (CH₄-Produktion) und die verringerte Anzahl an vorhandenen Transkripten von einigen methanogenen Gruppen gezeigt wurde. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen verdeutlichen außerdem, dass bisher wenig darüber bekannt ist, wie sich die Aktivität der Methanogenen unter nicht optimalen Bedingungen anpasst.

4.4 Ausblick und offene Fragestellungen, geplante Experimente

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den Einfluss von andauernden Stressbedingungen auf die CH₄-Produktion, die methanogenen Abbauege und die aktive mikrobielle methanogene Gemeinschaft ergaben sich neue Fragen. Diese könnten Thema zukünftiger Versuche sein:

1. Der Einfluss alternativer Elektronenakzeptoren auf die initiale Methanogenese, da anscheinend unter bestimmten Bedingungen Methanogene parallel aktiv sein können. Ausgeschlossen werden könnten die alternativen Elektronenakzeptoren in einem Versuch, in dem die alternativen Elektronenakzeptoren im Reisfeldboden bereits reduziert vorliegen, z. B. durch eine anaerobe Vorinkubation und dem anschließenden anaeroben Austrocknen.
2. Empfehlenswert wäre auch die Bestimmung des Umsatzes von markiertem Methanol oder methylierter Verbindungen durch Methanogene bei nicht gefluteten Bodenproben; dies könnte Aufschluss liefern über ihren Anteil an der initialen und der gesamten CH₄-Produktion.
3. Die Bestimmung der Qualität der organischen Substrate könnte Aufschluss geben, wie stark die Methanogene unter geänderten Umweltbedingungen von den Produkten der Fermentation beeinflusst werden.
4. Es wäre ferner interessant zu untersuchen, inwieweit andere funktionelle Gruppen des anaeroben Abbaus, außer der methanogenen Gemeinschaft, in ihrer Aktivität und Produktivität durch die niedrige Wasserverfügbarkeit beeinflussbar sind.
5. Die Bestimmung der Transkriptstabilität sollte unter verschiedenen Bedingungen, wie z. B. bei unterschiedlichen Wasserverfügbarkeiten, untersucht werden. Möglicherweise variiert die Stabilität innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft und bleibt auf einem Minimum aktiv.

Literaturangaben

- Achtnich C, Bak F, Conrad R (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol Fertil Soils* 19:65–72. doi: 10.1007/BF00336349
- Alperin MJ, Blair NE, Albert DB, et al (1992) Factors that control the stable carbon isotopic composition of methane produced in an anoxic marine sediment. *Glob Biogeochem Cycles* 6:271–291. doi: 10.1029/92GB01650
- Alvarado A, Montañez-Hernández LE, Palacio-Molina SL, et al (2014) Microbial trophic interactions and *mcrA* gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Front Microbiol* 5:597. doi: 10.3389/fmicb.2014.00597
- Anderson KL, Apolinario EE, Sowers KR (2012) Desiccation as a long-term survival mechanism for the archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 78:1473–1479. doi: 10.1128/AEM.06964-11
- Angel R (2010) Methane turnover in desert soils. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Angel R, Claus P, Conrad R (2012) Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J* 6:847–862. doi: 10.1038/ismej.2011.141
- Angel R, Matthies D, Conrad R (2011) Activation of methanogenesis in arid biological soil crusts despite the presence of oxygen. *PLoS ONE* 6:e20453. doi: 10.1371/journal.pone.0020453
- Aschenbach K, Conrad R, Reháková K, et al (2013) Methanogens at the top of the world: occurrence and potential activity of methanogens in newly deglaciated soils in high-altitude cold deserts in the Western Himalayas. *Front Microbiol* 4:359. doi: 10.3389/fmicb.2013.00359
- Avery GB, Martens CS (1999) Controls on the stable carbon isotopic composition of biogenic methane produced in a tidal freshwater estuarine sediment. *Geochim Cosmochim Acta* 63:1075–1082. doi: 10.1016/S0016-7037(98)00315-9
- Avery GB, Shannon RD, White JR, et al (1999) Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenesis on the $\delta^{13}\text{C}$ values of pore water methane in a Michigan peatland. *Glob Biogeochem Cycles* 13:475–484. doi: 10.1029/1999GB900007
- Baptiste É, Brochier C, Boucher Y (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1:353–363.
- Barcina I, Lebaron P, Vives-Rego J (1997) Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol Ecol* 23:1–9. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00385.x
- Beales N (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 3:1–20. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x
- Beckmann S, Manefield M (2014) Acetoclastic methane formation from Eucalyptus detritus in pristine hydrocarbon-rich river sediments by *Methanosarcinales*. *FEMS Microbiol Ecol* 90:587–598. doi: 10.1111/1574-6941.12418

- Belder P, Bouman BAM, Cabangon R, et al (2004) Effect of water-saving irrigation on rice yield and water use in typical lowland conditions in Asia. *Agric Water Manag* 65:193–210. doi: 10.1016/j.agwat.2003.09.002
- Berger U, Heyer J (1989) Untersuchungen zum Methankreislauf in der Saale. *J Basic Microbiol* 29:195–213. doi: 10.1002/jobm.3620290402
- Biddle JF, Cardman Z, Mendlovitz H, et al (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME J* 6:1018–1031. doi: 10.1038/ismej.2011.164
- Bitton G (1994) Wastewater microbiology. Wiley, New York, US
- Blair NE, Boehme SE, Carter Jr WDC (1993) The carbon isotope biogeochemistry of methane production in anoxic sediments: 1. Field observations. In: *Biogeochemistry of global change*. Springer US, S 574–593
- Blair NE, Carter WD (1992) The carbon isotope biogeochemistry of acetate from a methanogenic marine sediment. *Geochim Cosmochim Acta* 56:1247–1258. doi: 10.1016/0016-7037(92)90060-V
- Blaser M, Conrad R (2016) Stable carbon isotope fractionation as tracer of carbon cycling in anoxic soil ecosystems. *Curr Opin Biotechnol* 41:122–129. doi: 10.1016/j.copbio.2016.07.001
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, et al (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407:623–626. doi: 10.1038/35036572
- Borrel G, Adam PS, Gribaldo S (2016) Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biol Evol* evw114. doi: 10.1093/gbe/evw114
- Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, et al (2013) Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol* 5:1769–1780. doi: 10.1093/gbe/evt128
- Brambilla E, Djao ODN, Daligault H, et al (2010) Complete genome sequence of *Methanoplanus petrolearius* type strain (SEBR 4847 T). *Stand Genomic Sci* 3:203. doi: 10.4056/sigs.1183143
- Brandt FB (2015) Methanogenesis in phytotelmata: Microbial communities and methane cycling in bromeliad tanks and leaf axils of oil palms. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Brandt FB, Breidenbach B, Brenzinger K, Conrad R (2014) Impact of short-term storage temperature on determination of microbial community composition and abundance in aerated forest soil and anoxic pond sediment samples. *Syst Appl Microbiol* 37:570–577. doi: 10.1016/j.syapm.2014.10.007
- Brandt FB, Martinson GO, Conrad R (2016) Bromeliad tanks are unique habitats for microbial communities involved in methane turnover. *Plant Soil* 1–13. doi: 10.1007/s11104-016-2988-9
- Brandt FB, Martinson GO, Pommerenke B, et al (2015) Drying effects on archaeal community composition and methanogenesis in bromeliad tanks. *FEMS Microbiol Ecol* 91:1–10. doi: 10.1093/femsec/fiu021
- Brand WA (1996) High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 31:225–235.

- Breidenbach B (2015) Rice plants, drainage and crop rotation influence the methanogenic community in rice field soil. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Brioukhanov AL, Netrusov AI (2007) Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review. *Appl Biochem Microbiol* 43:567–582. doi: 10.1134/S0003683807060014
- Brown AD (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, Chichester
- Brune A (2010) Methanogens in the digestive tract of termites. In *(Endo) symbiotic methanogenic archaea*. Springer-Verlag, Heidelberg, DE, S 81–100
- Brune A, Friedrich M (2000) Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Curr Opin Microbiol* 3:263–269. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00087-4
- Burggraf S, Huber H, Stetter KO (1997) Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47:657–660. doi: 10.1099/00207713-47-3-657
- Calow PP (2009) *River biota: diversity and dynamics*. John Wiley & Sons, New York, US
- Cao H, Zhang W, Wang Y, Qian P-Y (2015) Microbial community changes along the active seepage site of one cold seep in the Red Sea. *Front Microbiol* 6:739 doi: 10.3389/fmicb.2015.00739
- Capone, DG, Kiene RP (1988) Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol Oceanogr* 33:725–749.
- Carter MR, Stewart BA (1995) *Structure and organic matter storage in agricultural soils* (Vol. 8). CRC Press, Boca Raton, Florida
- Chao A, Lee S-M, Chen TC (1988) A generalized Good's nonparametric coverage estimator. *Chinese Journal of Mathematics* 16:189-199
- Chen J, Yin X (2013) Stratified communities of methanogens in the Jiulong River estuarine sediments, southern China. *Indian J Microbiol* 53:432–437. doi: 10.1007/s12088-013-0397-9
- Chen Y-H, Prinn RG (2005) Atmospheric modeling of high- and low-frequency methane observations: Importance of interannually varying transport. *J Geophys Res Atmospheres* 110:D10303. doi: 10.1029/2004JD005542
- Chidthaisong A, Chin K-J, Valentine DL, Tyler SC (2002) A comparison of isotope fractionation of carbon and hydrogen from paddy field rice roots and soil bacterial enrichments during CO₂/H₂ methanogenesis. *Geochim Cosmochim Acta* 66:983–995. doi: 10.1016/S0016-7037(01)00812-2
- Chin K-J, Lueders T, Friedrich MW, et al (2003) Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb Ecol* 47:59–67. doi: 10.1007/s00248-003-2014-7
- Chin K-J, Lukow T, Stubner S, Conrad R (1999) 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. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00659.x

- Clouet-d'Orval B, Phung DK, Langendijk-Genevaux PS, Quentin Y (2015) Universal RNA-degrading enzymes in Archaea: Prevalence, activities and functions of β -CASP ribonucleases. *Biochimie* 118:278–285. doi: 10.1016/j.biochi.2015.05.021
- Conrad R (2005) Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Org Geochem* 36:739–752. doi: 10.1016/j.orggeochem.2004.09.006
- Conrad R (2007) Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, New York, US, S 1–63
- Conrad R (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep* 1:285–292. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x
- Conrad R (2002) Control of microbial methane production in wetland rice fields. *Nutr Cycl Agroecosystems* 64:59–69. doi: 10.1023/A:1021178713988
- Conrad R (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 28:193–202. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00575.x
- Conrad R, Chan O, Claus P, Casper P (2007) Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnol Oceanogr* 52:1393–1406.
- Conrad R, Claus P (2005) Contribution of methanol to the production of methane and its ^{13}C -isotopic signature in anoxic rice field soil. *Biogeochemistry* 73:381–393. doi: 10.1007/s10533-004-0366-9
- Conrad R, Claus P, Casper P (2010) Stable isotope fractionation during the methanogenic degradation of organic matter in the sediment of an acidic bog lake, Lake Grosse Fuchskuhle. *Limnol Oceanogr* 55:1932–1942.
- Conrad R, Claus P, Chidthaisong A, et al (2014a) Stable carbon isotope biogeochemistry of propionate and acetate in methanogenic soils and lake sediments. *Org Geochem* 73:1–7. doi: 10.1016/j.orggeochem.2014.03.010
- Conrad R, Frenzel P (2003) Flooded Soils. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, US,
- Conrad R, Ji Y, Noll M, et al (2014b) Response of the methanogenic microbial communities in Amazonian oxbow lake sediments to desiccation stress. *Environ Microbiol* 16:1682–1694. doi: 10.1111/1462-2920.12267
- Conrad R, Klose M, Claus P (2002) Pathway of CH_4 formation in anoxic rice field soil and rice roots determined by ^{13}C -stable isotope fractionation. *Chemosphere* 47:797–806. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00120-0
- Conrad R, Klose M, Lu Y, Chidthaisong A (2012) Methanogenic pathway and archaeal communities in three different anoxic soils amended with rice straw and maize straw. *Front Microbiol* 3:4. doi: 10.3389/fmicb.2012.00004
- Conrad R, Noll M, Claus P, et al (2011) Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments. *Biogeosciences* 8:795–814. doi: 10.5194/bg-8-795-2011

- Cowan D, Meyer Q, Stafford W, et al (2005) Metagenomic gene discovery: past, present and future. *TRENDS Biotechnol* 23:321–329. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.001
- Dannenberg S, Wudler J, Conrad R (1997) Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* 22:257–263. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00378.x
- de Angelis MA, Scranton MI (1993) Fate of methane in the Hudson River and estuary. *Glob Biogeochem Cycles* 7:509–523. doi: 10.1029/93GB01636
- Degens BP (1998) Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biol Biochem* 30:1989–2000. doi: 10.1016/S0038-0717(98)00071-6
- de Macario EC, Macario AJL (2003) Stress Response in Bacteria: Heat Shock. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, US
- Demirel B, Scherer P (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7:173–190. doi: 10.1007/s11157-008-9131-1
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The lipids of archaebacteria. *Prog Lipid Res* 27:153–175.
- Dowell F, Cardman Z, Dasarathy S, et al (2016) Microbial communities in methane-and short chain alkane-rich hydrothermal sediments of Guaymas Basin. *Front Microbiol* 7:17. doi: 10.3389/fmicb.2016.00017
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, et al (2012) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1902–1907. doi: 10.1099/ijs.0.033712-0
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67:190–197. doi: 10.1128/AEM.67.1.190-197.2001
- Dzyuba AV, Eliseev AV, Mokhov II (2012) Estimates of changes in the rate of methane sink from the atmosphere under climate warming. *Izv Atmospheric Ocean Phys* 48:332–342. doi: 10.1134/S0001433812020041
- Edgar RC (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10:996–998. doi: 10.1038/nmeth.2604
- Eme L, Doolittle WF (2015) Archaea. *Curr Biol* 25:R851–855. doi: 10.1016/j.cub.2015.05.025
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, et al (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464:543–548. doi: 10.1038/nature08883
- Evguenieva-Hackenberg E, Klug G (2009) RNA degradation in Archaea and Gram-negative bacteria different from *Escherichia coli*. *Prog Mol Biol Transl Sci* 85:275–317. doi: 10.1016/S0079-6603(08)00807-6
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376. doi: 10.1007/BF01734359

- Fetzer S, Bak F, Conrad R (1993) Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiol Ecol* 12:107–115.
- Fey A, Claus P, Conrad R (2004) Temporal change of ¹³C-isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures. *Geochim Cosmochim Acta* 68:293–306. doi: 10.1016/S0016-7037(03)00426-5
- Fiebig K, Gottschalk G (1983) Methanogenesis from choline by a coculture of *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 45:161–168.
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Biol* 20:406–416. doi: 10.1093/sysbio/20.4.406
- Frenzel P, Bosse U (1996) Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. *FEMS Microbiol Ecol* 21:25–36. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00330.x
- Frenzel P, Thebrath B, Conrad R (1990) Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* 73:149–158.
- Friedrich MW (2005) Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing archaea. *Methods Enzymol* 397:428–442.
- Galbally IE, Kirstine W (2002) The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J Atmospheric Chem* 43:195–229. doi: 10.1023/A:1020684815474
- Galinski EA, Trüper HG (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15:95–108. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x
- Gao X, Olapade OA, Leff LG (2005) Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquat Microb Ecol* 40:51–60. doi: 10.3354/ame040051
- Garcia PL, Forterre P (2000) Thermal stress in hyperthermophiles. In: *Bacterial Stress Responses*. ASM Press
- Gelwicks JT, Risatti JB, Hayes JM (1994) Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis. *Appl Environ Microbiol* 60:467–472.
- Glissman K, Chin K-J, Casper P, Conrad R (2004) Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature. *Microb Ecol* 48:389–399. doi: 10.1007/s00248-003-2027-2
- Goenrich M, Duin EC, Mahlert F, Thauer RK (2005) Temperature dependence of methyl-coenzyme M reductase activity and of the formation of the methyl-coenzyme M reductase red2 state induced by coenzyme B. *J Biol Inorg Chem* 10:333–342. doi: 10.1007/s00775-005-0636-6
- Goevert D, Conrad R (2009) Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 75:2605–2612. doi: 10.1128/AEM.02680-08
- Gray ND, Miskin IP, Kornilova O, et al (2002) Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ Microbiol* 4:158–168. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00280.x

- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2003) Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl Environ Microbiol* 69:6961–6968. doi: 10.1128/AEM.69.12.6961-6968.2003
- Großkopf R, Janssen PH, Liesack W (1998) 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.
- Guerra LC (1998) *Producing more rice with less water from irrigated systems*. IWMI 5:24.
- Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, et al (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 62:668–675.
- Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, et al (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* 69:5483–5491. doi: 10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003
- Hao LP, Lü F, Li L, et al (2012) Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. *Bioresour Technol* 126:418–424. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.072
- Harde H (2011) *Was trägt CO₂ wirklich zur globalen Erwärmung bei?: Spektroskopischen Untersuchungen und Modellrechnungen zum Einfluss von H₂O, CO₂, CH₄ und O₃ auf unser Klima*. BoD – Books on Demand
- Haroon MF, Hu S, Shi Y, et al (2013) Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* 500:567–570. doi: 10.1038/nature12375
- Harris JE (1987) Spontaneous disaggregation of *Methanosarcina mazei* S-6 and its use in the development of genetic techniques for *Methanosarcina* spp. *Appl Environ Microbiol* 53:2500–2504.
- Hartmann A, Schmid M, Tuinen D van, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235–257. doi: 10.1007/s11104-008-9814-y
- Henckel T, Jäckel U, Conrad R (2001) Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* 34:279–291. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00778.x
- Hoffmann RA, Garcia ML, Veskiar M, et al (2008) Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. *Biotechnol Bioeng* 100:38–48. doi: 10.1002/bit.21730
- Hoyos-Santillan J, Lomax BH, Large D, et al (2016) Quality not quantity: Organic matter composition controls of CO₂ and CH₄ fluxes in neotropical peat profiles. *Soil Biol Biochem* 103:86–96. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.08.017
- Hunger S, Schmidt O, Hilgarth M, et al (2011) Competing formate- and carbon dioxide-utilizing prokaryotes in an anoxic methane-emitting fen soil. *Appl Environ Microbiol* 77:3773–3785. doi: 10.1128/AEM.00282-11
- Hunkeler D, Goldscheider N, Rossi P, Burn C (2006) *Biozönosen im Grundwasser: Grundlagen und Methoden der Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften*. Bundesamt für Umwelt.

- Itoh M, Ohte N, Koba K, et al (2008) Analysis of methane production pathways in a riparian wetland of a temperate forest catchment, using $\delta^{13}\text{C}$ of pore water CH_4 and CO_2 . *J Geophys Res Biogeosciences* 113:G03005. doi: 10.1029/2007JG000647
- Jabłoński S, Rodowicz P, Łukaszewicz M (2015) Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1360–1368. doi: 10.1099/ijs.0.000065
- Jäckel U, Schnell S, Conrad R (2001) Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH_4 . *Soil Biol Biochem* 33:965–971. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00248-0
- Janssen PH, Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* 74:3619–3625. doi: 10.1128/AEM.02812-07
- Javor B (1989) *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Springer Science & Business Media
- Jiang N, Wang Y, Dong X (2009) Methanol as the primary methanogenic and acetogenic precursor in the cold Zoige wetland at Tibetan plateau. *Microb Ecol* 60:206–213. doi: 10.1007/s00248-009-9602-0
- Joulian C, Ollivier B, Neue H-U, Roger PA (1996) Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France): 1. Methanogenesis and related microflora. *Eur J Soil Biol* 32:61–70.
- Kato S, Chino K, Kamimura N, et al (2015) Methanogenic degradation of lignin-derived monoaromatic compounds by microbial enrichments from rice paddy field soil. *Sci Rep* 5. doi: 10.1038/srep14295
- Kato S, Sasaki K, Watanabe K, et al (2014) Physiological and transcriptomic analyses of the thermophilic, aceticlastic methanogen *Methanosaeta thermophila* responding to ammonia stress. *Microbes Environ* 29:162–167. doi: 10.1264/jsme2.ME14021
- Keiblinger KM, Wilhartitz IC, Schneider T, et al (2012) Soil metaproteomics – comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biol Biochem* 54:14–24. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.05.014
- Ke X, Lu Y, Conrad R (2014) Different behaviour of methanogenic archaea and *Thaumarchaeota* in rice field microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 87:18–29. doi: 10.1111/1574-6941.12188
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res* 29:181–184. doi: 10.1093/nar/29.1.181
- Kleber H-P, Seim H, Aurich H, Strack E (1977) Verwertung von Trimethylammoniumverbindungen durch *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Microbiol* 112:201–206. doi: 10.1007/BF00429336
- Kogure K, Wada M (2005) Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes Environ* 20:191–199.
- Kolb S (2009) Aerobic methanol-oxidizing Bacteria in soil. *FEMS Microbiol Lett* 300:1–10. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01681.x

- Kotelnikova S, Macario AJL, Pedersen K (1998) *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *Int J Syst Bacteriol* 48:357–367. doi: 10.1099/00207713-48-2-357
- Koubová A, Goberna M, Šimek M, et al (2012) Effects of the earthworm *Eisenia andrei* on methanogens in a cattle-impacted soil: A microcosm study. *Eur J Soil Biol* 48:32–40. doi: 10.1016/j.ejsobi.2011.09.007
- Kraus D, Weller S, Klatt S, et al (2014) A new LandscapeDNDC biogeochemical module to predict CH₄ and N₂O emissions from lowland rice and upland cropping systems. *Plant Soil* 386:125-149. doi: 10.1007/s11104-014-2255-x
- Krüger M, Eller G, Conrad R, Frenzel P (2002) Seasonal variation in pathways of CH₄ production and in CH₄ oxidation in rice fields determined by stable carbon isotopes and specific inhibitors. *Glob Change Biol* 8:265–280. doi: 10.1046/j.1365-2486.2002.00476.x
- Krummen M, Hilker AW, Juchelka D, et al (2004) A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:2260–2266. doi: 10.1002/rcm.1620
- Kuivila KM, Murray JW, Devol AH, et al (1988) Methane cycling in the sediments of Lake Washington. *Limnol Oceanogr* 33:571–581.
- Lange M, Ahring BK (2001) A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol Rev* 25:553–571. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00591.x
- Lang K (2014) Diversity, ultrastructure, and comparative genomics of “*Methanoplasmatales*”, the seventh order of methanogens.
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *Syst Appl Microbiol* 7:253–257. doi: 10.1016/S0723-2020(86)80015-7
- Lansdown JM, Quay PD, King SL (1992) CH₄ production via CO₂ reduction in a temperate bog: A source of ¹³C-depleted CH₄. *Geochim Cosmochim Acta* 56:3493–3503. doi: 10.1016/0016-7037(92)90393-W
- Lemke T, van Alen T, Hackstein JHP, Brune A (2001) Cross-epithelial hydrogen transfer from the midgut compartment drives methanogenesis in the hindgut of cockroaches. *Appl Environ Microbiol* 67:4657–4661. doi: 10.1128/AEM.67.10.4657-4661.2001
- Le Quéré C, Moriarty R, Andrew RM, et al (2015) Global Carbon Budget 2015. *Earth Syst Sci Data* 7:349–396. doi: 10.5194/essd-7-349-2015
- L’Haridon S, Chalopin M, Colombo D, Toffin L (2014) *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1978–1983. doi: 10.1099/ij.s.0.058289-0
- Li C, Qiu J, Frohling S, et al (2002) Reduced methane emissions from large-scale changes in water management of China’s rice paddies during 1980–2000. *Geophys Res Lett* 29:1972. doi: 10.1029/2002GL015370

- Lins P, Illmer P (2012) Effects of volatile fatty acids, ammonium and agitation on thermophilic methane production from biogas plant sludge in lab-scale experiments. *Folia Microbiol* 57:313–316. doi: 10.1007/s12223-012-0132-7
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516–4522.
- Lovley DR, Klug MJ (1983) Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 45:1310–1315.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, et al (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32:1363–1371. doi: 10.1093/nar/gkh293
- Lueders T, Chin K, Conrad R, Friedrich M (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. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00179.x
- Lueders T, Friedrich M (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 66:2732–2742. doi: 10.1128/AEM.66.7.2732-2742.2000
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiol* 148:3521–3530.
- Lü Z, Lu Y (2012) *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil. *PLoS ONE* 7:e35279. doi: 10.1371/journal.pone.0035279
- Mach V, Blaser MB, Claus P, et al (2015) Methane production potentials, pathways, and communities of methanogens in vertical sediment profiles of river Sitka. *Front Microbiol* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00506
- Maclean JL, Dawe DW (2002) *Rice almanac: Source book for the most important economic activity on earth*. Int. Rice Res. Inst.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) Brock Biology of microorganisms, 12. edn. *International Microbiology*, 11:65-73
- Ma K, Conrad R, Lu Y (2012) Responses of methanogen *mcrA* genes and their transcripts to an alternate dry/wet cycle of paddy field soil. *Appl Environ Microbiol* 78:445–454. doi: 10.1128/AEM.06934-11
- Ma K, Conrad R, Lu Y (2013) Dry/wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 79:4932–4939. doi: 10.1128/AEM.00850-13
- Ma K, Lu Y (2011) Regulation of microbial methane production and oxidation by intermittent drainage in rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* 75:446–456. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01018.x
- Mambani B, Datta SKD, Redulla CA (1990) Soil physical behaviour and crop responses to tillage in lowland rice soils of varying clay content. *Plant Soil* 126:227–235. doi: 10.1007/BF00012826

- Maquat LE, Arraiano C (2008) *RNA Turnover in Bacteria, Archaea and Organelles*. Academic Press
- Marcon E, Hérault B (2015) entropart: An R Package to Measure and Partition Diversity. *J Stat Softw* 67:i08. doi: 10.18637/jss.v067.i08
- Margesin R, Schinner F (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73–83. doi: 10.1007/s007920100184
- Martin K, Allgaier C (2011) *Ökologie der Biozönosen* Springer-Verlag.
- Matin A (2001) Stress response in bacteria. In: *Encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.,
- Mayerhofer LE, Macario AJ, Macario EC de (1992) Lamina, a novel multicellular form of *Methanosarcina mazei* S-6. *J Bacteriol* 174:309–314.
- Mayer HP, Conrad R (1990) Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* 6:103–111. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03930.x
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Merkl R (2015) *Bioinformatik: Grundlagen, Algorithmen, Anwendungen*. John Wiley & Sons
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31–46. doi: 10.1038/nrg2626
- Meyer D, Zeileis A, Hornik K (2006) The strucplot framework: visualizing multi-way contingency tables with vcd. *J Stat Softw*. doi: 10.18637/jss.v017.i03
- Mondav R, Woodcroft BJ, Kim E-H, et al (2014) Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat Commun* 5. doi: 10.1038/ncomms4212
- Mori K, Maruyama A, Urabe T, et al (2008) *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:810–816. doi: 10.1099/ijs.0.65422-0
- Nakagawa F, Yoshida N, Sugimoto A, et al (2002) Stable isotope and radiocarbon compositions of methane emitted from tropical rice paddies and swamps in Southern Thailand. *Biogeochemistry* 61:1–19. doi: 10.1023/A:1020270032512
- Neue H-U, Roger PA (1993) Rice agriculture: factors controlling emissions. In *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change*. Springer Berlin Heidelberg, S 254–298
- Nicholson M, Evans P, Joblin K (2007) Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microb Ecol* 54:141–150. doi: 10.1007/s00248-006-9182-1
- Nobu MK, Narihiro T, Kuroda K, et al (2016) Chasing the elusive *Euryarchaeota* class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J*. doi: 10.1038/ismej.2016.33

- Nölling J, Pihl TD, Vriesema A, Reeve JN (1995) Organization and growth phase-dependent transcription of methane genes in two regions of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* genome. *J Bacteriol* 177:2460–2468.
- Nüsslein B, Conrad R (2000) Methane production in eutrophic Lake Plusssee : seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. *Arch Für Hydrobiol* 149:597–623.
- Nüsslein B, Eckert W, Conrad R (2003) Stable isotope biogeochemistry of methane formation in profundal sediments of Lake Kinneret (Israel). *Limnol Oceanogr* 48:1439–1446.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al (2016) vegan: Community Ecology Package.
- Oren A (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst* 4:2. doi: 10.1186/1746-1448-4-2
- Oren A (2011) Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* 13:1908–1923. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x
- Ortiz-Llorente MJ, Alvarez-Cobelas M (2012) Comparison of biogenic methane emissions from unmanaged estuaries, lakes, oceans, rivers and wetlands. *Atmos Environ* 59:328–337. doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.05.031
- Padmasiri SI, Zhang J, Fitch M, et al (2007) Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Res* 41:134–144. doi: 10.1016/j.watres.2006.09.021
- Pasche N, Schmid M, Vazquez F, et al (2011) Methane sources and sinks in Lake Kivu. *J Geophys Res Biogeosciences* 116:G03006. doi: 10.1029/2011JG001690
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A (2012) “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78:8245–8253. doi: 10.1128/AEM.02193-12
- Penger JS (2012) Einflüsse auf die Kohlenstoffisotopenfraktionierung in methanogenen Systemen. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Peng J, Lü Z, Rui J, Lu Y (2008) Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 74:2894–2901. doi: 10.1128/AEM.00070-08
- Penning H (2005) Fraktionierung stabiler Isotope durch anaerobe Bodenmikroorganismen. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Penning H, Conrad R (2007) Quantification of carbon flow from stable isotope fractionation in rice field soils with different organic matter content. *Org Geochem* 38:2058–2069. doi: 10.1016/j.orggeochem.2007.08.004
- Pernthaler J (2013) Freshwater microbial communities. In: *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, S 97–112
- Perreault NN, Andersen DT, Pollard WH, et al (2007) Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian High Arctic. *Appl Environ Microbiol* 73:1532–1543. doi: 10.1128/AEM.01729-06

- Pester M, Schleper C, Wagner M (2011) The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* 14:300–306. doi: 10.1016/j.mib.2011.04.007
- Peters V, Conrad R (1995) Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl Environ Microbiol* 61:1673–1676.
- Pihl TD, Sharma S, Reeve JN (1994) Growth phase-dependent transcription of the genes that encode the two methyl coenzyme M reductase isoenzymes and N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase in *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. *J Bacteriol* 176:6384–6391.
- Pleidl P (2014) Stabilität von *mcrA* Transkripten im Reisfeldboden. Bachelorarbeit, Marburg
- Pratscher J, Dumont MG, Conrad R (2011) Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proc Natl Acad Sci* 108:4170–4175. doi: 10.1073/pnas.1010981108
- Proctor LM, Lai R, Gunsalus RP (1997) The methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1 possesses a high-affinity glycine betaine transporter involved in osmotic adaptation. *Appl Environ Microbiol* 63:2252–2257.
- Pump J (2012) Carbon translocation and methane emission in flooded rice microcosms with a manipulated root microbiome. Doctoral Thesis, Philipps-Universität Marburg
- Pump J, Conrad R (2014) Rice biomass production and carbon cycling in ¹³C₂ pulse-labeled microcosms with different soils under submerged conditions. *Plant Soil* 384:213–229. doi: 10.1007/s11104-014-2201-y
- Raghoebarsing AA, Pol A, van de Pas-Schoonen KT, et al (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440:918–921. doi: 10.1038/nature04617
- Raich JW, Tufekciogul A (2000) Vegetation and soil respiration: Correlations and controls. *Biogeochemistry* 48:71–90. doi: 10.1023/A:1006112000616
- Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield PF, et al (2001) Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol Ecol* 37:175–186. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00865.x
- Ratering S, Conrad R (1998) Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *Glob Change Biol* 4:397–407. doi: 10.1046/j.1365-2486.1998.00162.x
- Rauhut R, Klug G (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23:353–370.
- Reeve JN, Nölling J, Morgan RM, Smith DR (1997) Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J Bacteriol* 179:5975–5986.
- Reeves DW (1997) The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil Tillage Res* 43:131–167. doi: 10.1016/S0167-1987(97)00038-X
- Rejesus RM, Palis FG, Rodriguez DGP, et al (2011) Impact of the alternate wetting and drying (AWD) water-saving irrigation technique: Evidence from rice producers in the Philippines. *Food Policy* 36:280–288. doi: 10.1016/j.foodpol.2010.11.026

- Rimbault A, Niel P, Virelizier H, et al (1988) L-Methionine, a precursor of trace methane in some proteolytic clostridia. *Appl Environ Microbiol* 54:1581–1586.
- Robinson PM, Roberts MF (1997) Effects of osmolyte precursors on the distribution of compatible solutes in *Methanohalophilus portucalensis*. *Appl Environ Microbiol* 63:4032–4038.
- Rojas C, Fang S, Uhlenhut F, et al (2010) Stirring and biomass starter influences the anaerobic digestion of different substrates for biogas production. *Eng Life Sci* 10:339–347. doi: 10.1002/elsc.200900107
- Rotaru A-E, Shrestha PM, Liu F, et al (2014) Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 80:4599–4605. doi: 10.1128/AEM.00895-14
- Roy R, Klüber HD, Conrad R (1997) Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol Ecol* 24:311–320. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00448.x
- Sakai S, Ehara M, Tseng I-C, et al (2011a) *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family *Methanoregulaceae* fam. nov. within the order *Methanomicrobiales*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1389–1395. doi: 10.1099/ijs.0.035048-0
- Sakai S, Imachi H, Hanada S, et al (2008) *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage „Rice Cluster I“, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:929–936. doi: 10.1099/ijs.0.65571-0
- Sakai S, Takaki Y, Shimamura S, et al (2011b) Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order *Methanocellales*. *PLoS ONE* 6:e22898. doi: 10.1371/journal.pone.0022898
- Sarkar D (2008) *Lattice: multivariate data visualization with R*. Springer Science & Business Media, New York, US
- Scavino AF, Ji Y, Pump J, et al (2013) Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environ Microbiol* 15:2588–2602. doi: 10.1111/1462-2920.12161
- Schink B, Stams AJM (2006) Syntrophism among Prokaryotes. In: *The Prokaryotes*, 3. edn. Springer, New York, US, S 309–335
- Schnell S, King GM (1996) Responses of methanotrophic activity in soils and cultures to water stress. *Appl Environ Microbiol* 62:3203–3209.
- Schroeder D (1992) *Bodenkunde in Stichworten*. Borntraeger, Berlin/Stuttgart
- Seviour RJ, Blackall LL (1999) *The microbiology of activated sludge*. Springer Science & Business Media.
- Sha C, Mitsch WJ, Mander Ü, et al (2011) Methane emissions from freshwater riverine wetlands. *Ecol Eng* 37:16–24. doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.07.022
- Shao G-C, Deng S, Liu N, et al (2014) Effects of controlled irrigation and drainage on growth, grain yield and water use in paddy rice. *Eur J Agron* 53:1–9. doi: 10.1016/j.eja.2013.10.005

- Sigee D (2005) Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. *Freshwater Microbiology*, John Wiley & Sons
- Simpson GL, Team RC, Bates DM, Oksanen J (2016) permute: Functions for Generating Restricted Permutations of Data.
- Singh N, Kendall MM, Liu Y, Boone DR (2005) Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2531–2538. doi: 10.1099/ijs.0.63886-0
- Soni SK (2007) *Microbes: a source of energy for 21st century*. New India Publishing, S 271–299
- Springer E, Sachs MS, Woese CR, Boone DR (1995) Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 45:554–559. doi: 10.1099/00207713-45-3-554
- Stams AJM, Plugge CM (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 7:568–577. doi: 10.1038/nrmicro2166
- Steinberg LM, Regan JM (2008) Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl Environ Microbiol* 74:6663–6671. doi: 10.1128/AEM.00553-08
- Storz GT, Hengge-Aronis R (2000) *Bacterial stress responses*. ASM Press
- Stroot PG, McMahan KD, Mackie RI, Raskin L (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—I. digester performance. *Water Res* 35:1804–1816. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00439-5
- Sugimoto A, Wada E (1993) Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: Contributions of acetate and CO₂H₂. *Geochim Cosmochim Acta* 57:4015–4027. doi: 10.1016/0016-7037(93)90350-6
- Tabbal DF, Bouman BAM, Bhuiyan SI, et al (2002) On-farm strategies for reducing water input in irrigated rice; case studies in the Philippines. *Agric Water Manag* 56:93–112. doi: 10.1016/S0378-3774(02)00007-0
- Tang J, Zhuang L, Ma J, et al (2016) Secondary Mineralization of Ferrihydrite Affect Microbial Methanogenesis in *Geobacter/Methanosarcina* Co-cultures. *Appl Environ Microbiol* AEM.01517–16. doi: 10.1128/AEM.01517-16
- Thauer RK (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson:1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144:2377–2406. doi: 10.1099/00221287-144-9-2377
- Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, et al (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 6:579–591. doi: 10.1038/nrmicro1931
- Tuong TP, Bouman B a. M, Mortimer M (2005) More rice, less water —Integrated approaches for increasing water productivity in irrigated rice-based systems in Asia. *Plant Prod Sci* 8:231–241. doi: 10.1626/pp.s.8.231

- Tyler SC, Bilek RS, Sass RL, Fisher FM (1997) Methane oxidation and pathways of production in a Texas paddy field deduced from measurements of flux, $\delta^{13}\text{C}$, and δD of CH_4 . *Glob Biogeochem Cycles* 11:323–348. doi: 10.1029/97GB01624
- Ueki A, Ono K, Tsuchiya A, Ueki K (1997) Survival of methanogens in airdried paddy field soil and their heat tolerance. *Water Sci Technol* 36:517–522. doi: 10.1016/S0273-1223(97)00563-5
- Vakhlu J, Sudan AK, Johri BN (2008) Metagenomics: future of microbial gene mining. *Indian J Microbiol* 48:202–215. doi: 10.1007/s12088-008-0033-2
- Valentine DL, Chidthaisong A, Rice A, et al (2004) Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. *Geochim Cosmochim Acta* 68:1571–1590. doi: 10.1016/j.gca.2003.10.012
- Vavilin V a., Angelidaki I (2005) Anaerobic degradation of solid material: Importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. *Biotechnol Bioeng* 89:113–122. doi: 10.1002/bit.20323
- Vriezen JAC, Bruijn FJ de, Nüsslein K (2007) Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl Environ Microbiol* 73:3451–3459. doi: 10.1128/AEM.02991-06
- Wagner D, Schirmack J, Ganzert L, et al (2013) *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation and freeze-thaw resistant methanogenic archaeon isolated from a Siberian permafrost-affected soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2986–2991. doi: 10.1099/ij.s.0.046565-0
- Wang JS, Logan JA, McElroy MB, et al (2004) A 3-D model analysis of the slowdown and interannual variability in the methane growth rate from 1988 to 1997. *Glob Biogeochem Cycles* 18:GB3011. doi: 10.1029/2003GB002180
- Watanabe T, Kimura M, Asakawa S (2009) Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biol Biochem* 41:276–285. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.10.025
- Watkins AJ, Roussel EG, Parkes RJ, Sass H (2014) Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococcoides* spp.). *Appl Environ Microbiol* 80:289–293. doi: 10.1128/AEM.03076-13
- Watkins AJ, Roussel EG, Webster G, et al (2012) Choline and N,N-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78:8298–8303. doi: 10.1128/AEM.01941-12
- Weller S, Kraus D, Ayag KRP, et al (2014) Methane and nitrous oxide emissions from rice and maize production in diversified rice cropping systems. *Nutr Cycl Agroecosystems* 1–17. doi: 10.1007/s10705-014-9658-1
- Wilkins D, Lu X-Y, Shen Z, et al (2015) Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal 16S rRNA genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Appl Environ Microbiol* 81:604–613. doi: 10.1128/AEM.02566-14
- Winfrey MR, Nelson DR, Klevickis SC, Zeikus JG (1977) Association of hydrogen metabolism with methanogenesis in Lake Mendota sediments. *Appl Environ Microbiol* 33:312–318.
- Wu L, Ma K, Li Q, et al (2009) Composition of archaeal community in a paddy field as affected by rice cultivar and N fertilizer. *Microb Ecol* 58:819–826. doi: 10.1007/s00248-009-9554-4

- Wu X-L, Chin K-J, Conrad R (2002) Effect of temperature stress on structure and function of the methanogenic archaeal community in a rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* 39:211–218. doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00923.x
- Yamamoto K, Tamaki H, Cadillo-Quiroz H, et al (2014) Complete genome sequence of *Methanoregula formicica* SMSPT, a mesophilic hydrogenotrophic methanogen isolated from a methanogenic upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Genome Announc* 2:e00870–14. doi: 10.1128/genomeA.00870-14
- Yang S, Liebner S, Alawi M, et al (2014) Taxonomic database and cut-off value for processing *mcrA* gene 454 pyrosequencing data by MOTHUR. *J Microbiol Methods* 103:3–5. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.006
- Yao H, Conrad R (1999) Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biol Biochem* 31:463–473. doi: 10.1016/S0038-0717(98)00152-7
- Yao H, Conrad R, Wassmann R, Neue HU (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* 47:269–295. doi: 10.1007/BF00992910
- Ye Y, Liang X, Chen Y, et al (2013) Alternate wetting and drying irrigation and controlled-release nitrogen fertilizer in late-season rice. Effects on dry matter accumulation, yield, water and nitrogen use. *Field Crops Res* 144:212–224. doi: 10.1016/j.fcr.2012.12.003
- Yuan Q, Pump J, Conrad R (2014) Straw application in paddy soil enhances methane production also from other carbon sources. *Biogeosciences* 11:237–246. doi: 10.5194/bg-11-237-2014
- Yuan Y, Conrad R, Lu Y (2011) Transcriptional response of methanogen *mcrA* genes to oxygen exposure of rice field soil. *Environ Microbiol Rep* 3:320–328. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00228.x
- Zelege J, Sheng Q, Wang J-G, et al (2013) Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2013.00243
- Zhang G, Tian J, Jiang N, et al (2008) Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I. *Environ Microbiol* 10:1850–1860. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01606.x
- Zhou J, He Z, Yang Y, et al (2015) High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.02288-14
- Zhu C, Zhang J, Tang Y, et al (2011) Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. *Microbiol Res* 166:27–35. doi: 10.1016/j.micres.2010.01.004
- Zhu G, Jetten MSM, Kusch P, et al (2010) Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1043–1055. doi: 10.1007/s00253-010-2451-4
- Zinder SH (1993) Physiological Ecology of Methanogens. In: *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Chapman & Hall, London, GB, S 128–208

Zhang W, Culley D, Nie L, Brockman F (2006) DNA microarray analysis of anaerobic *Methanosarcina barkeri* reveals responses to heat shock and air exposure. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:784–790. doi: 10.1007/s10295-006-0114-3

Ergänzende Informationen

Methanogenic potential

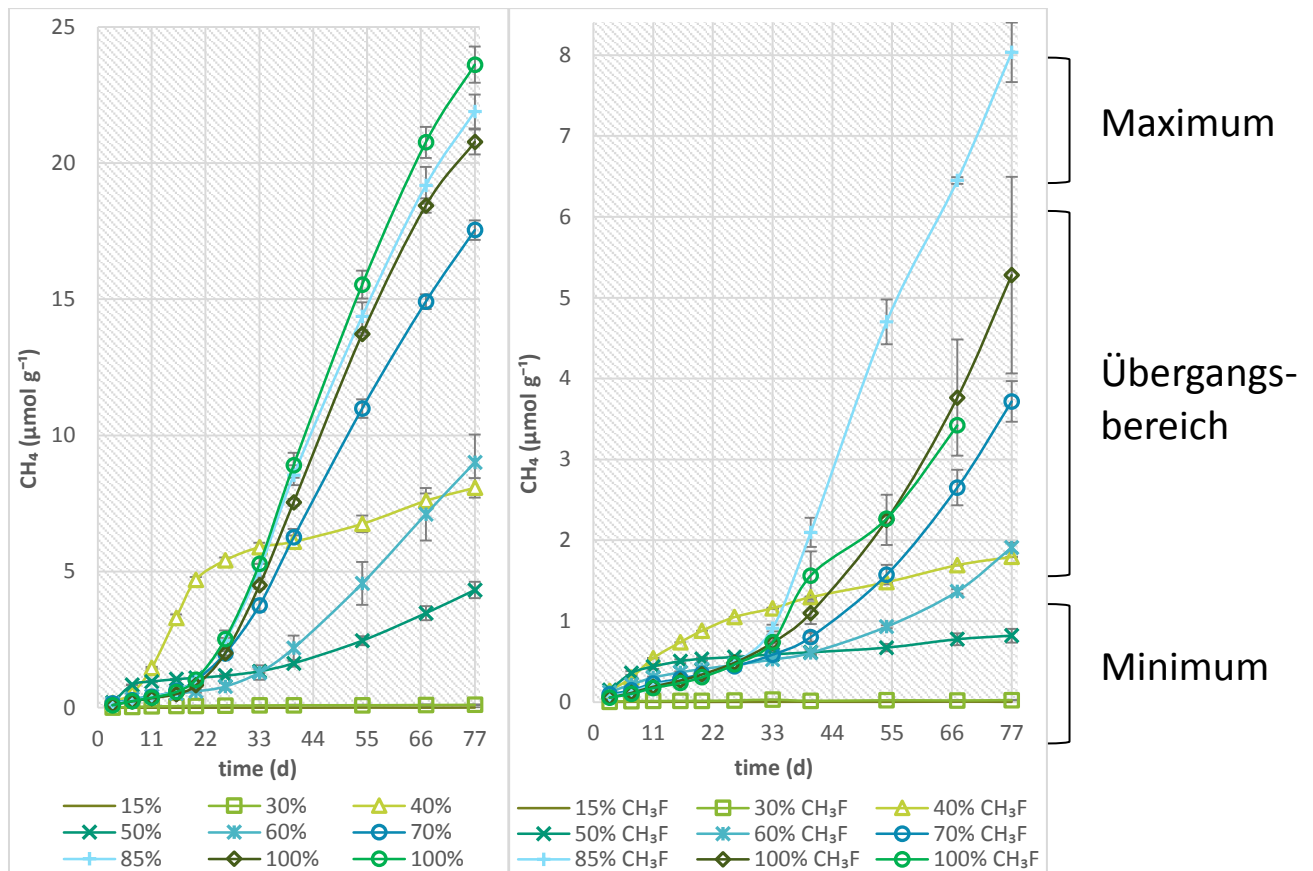


Abbildung 6.1: Methanproduktion im Verlauf eines 77-tägigen Inkubationsexperiments des philippinischen Reisfeldbodens mit unterschiedlichen Wassergehalten unter reiner N₂ Atmosphäre (links) und N₂ Atmosphäre mit 2 % CH₃F (rechts). Mit höherem Wassergehalt erreichte die CH₄-Produktion höhere Werte und wurde je nach Feuchtigkeit in drei Gruppen eingeteilt. Die minimale Gruppe zeigte nur eine geringfügige CH₄-Menge, die Übergangsguppe zeigte mit höheren prozentualen Wassermengen eine gestiegene CH₄-Menge, und die maximale Gruppe bei der eine Sättigung von über 85 % erreicht war zeigte die maximale CH₄-Produktion unabhängig vom überschüssigen Wasser. Die CH₄-Konzentrationen der gehemmten Inkubationen waren circa ein Drittel der nicht gehemmten CH₄-Menge. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3).

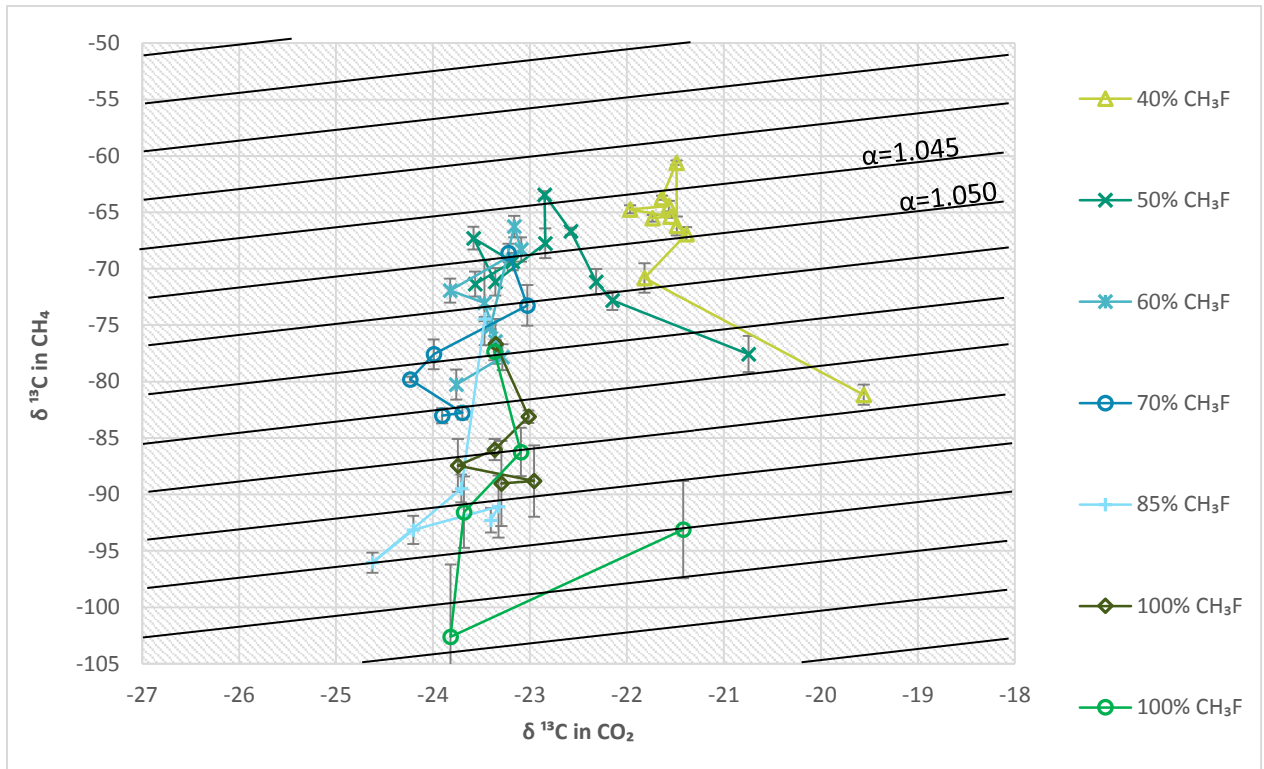


Abbildung 6.2: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ über die Kohlenstoffisotopensignatur im CO₂ in den mit CH₃F gehemmten Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. SE n =3. Die schrägen Hilfslinien zeigen den Fraktionierungsfaktor α. Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel: $\alpha = (\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} + 10^3) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} + 10^3)$.

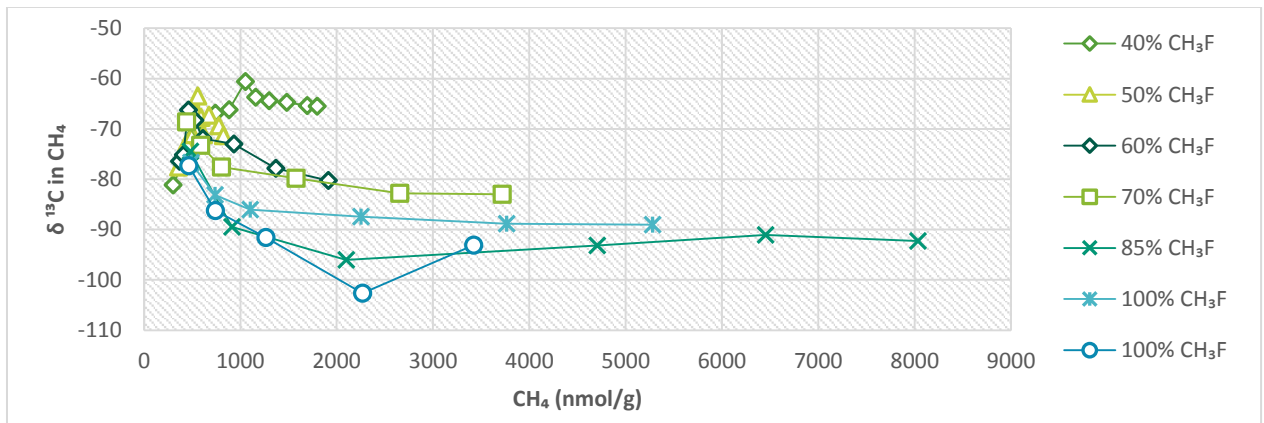


Abbildung 6.3: Auftragung der Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ über die CH₄-Konzentration (nmol/g) in den mit CH₃F gehemmten Inkubationen des philippinischen Reisfeldbodens mit verschiedenen Wasserverfügbarkeiten. SE n =3.

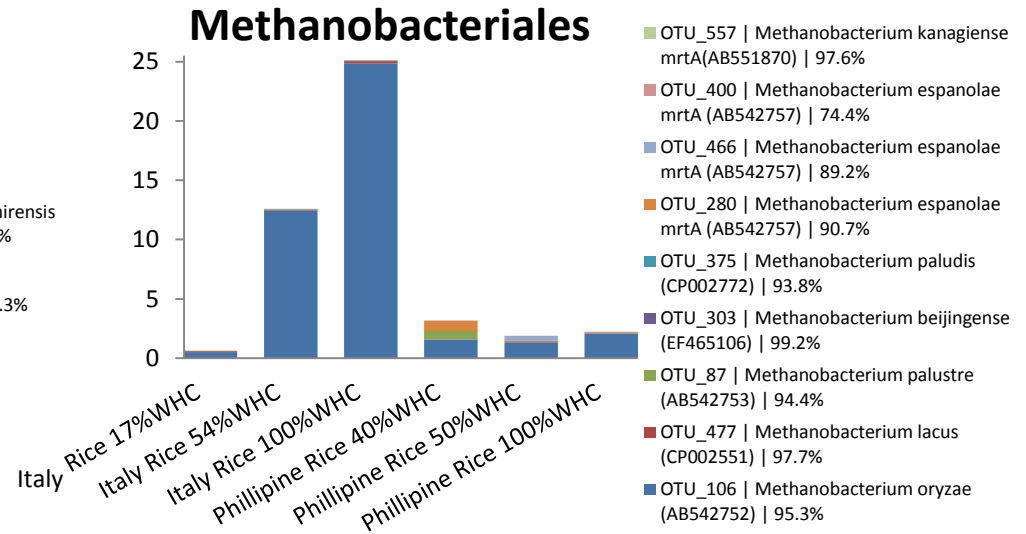
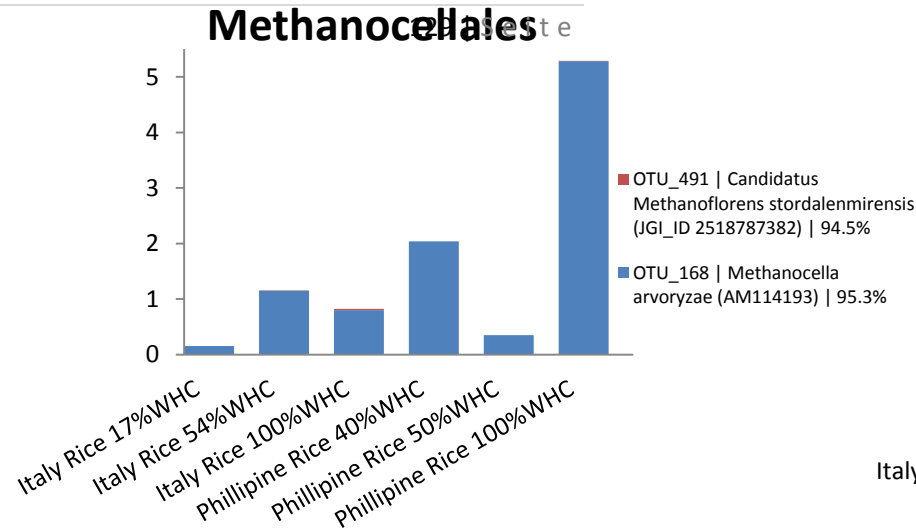
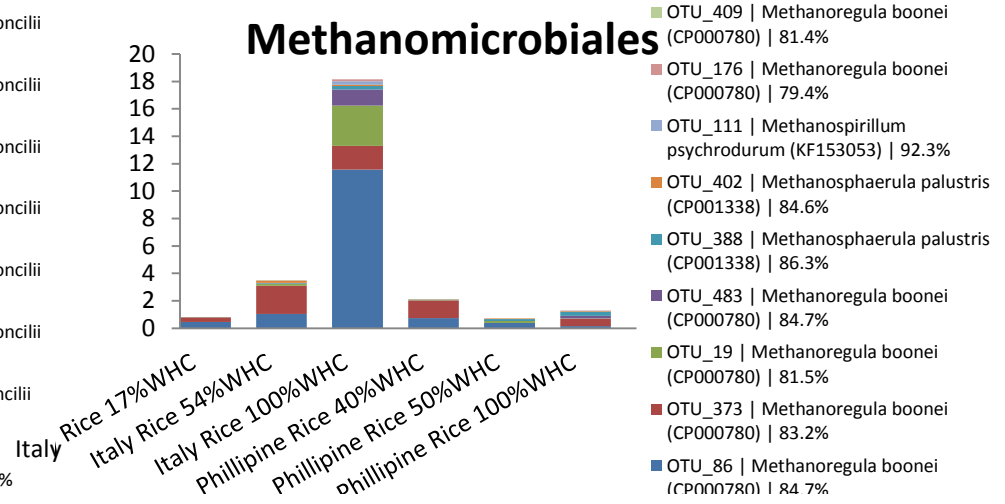
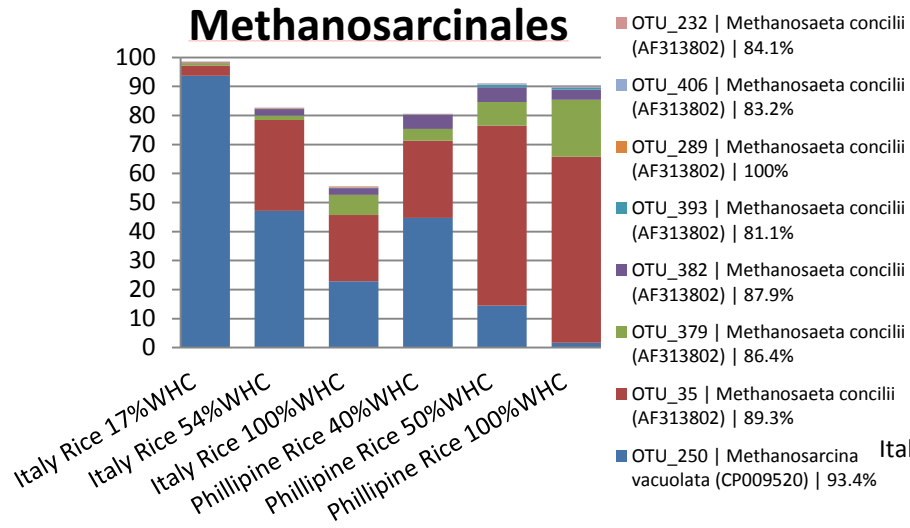


Abbildung 6.4: Verteilung der OTUs auf Artsebene innerhalb der Ordnung über die verschiedenen Feuchtigkeitsstufen

Tabelle 6.1: Liste der gezeigten Spezies im Stammbaum

Liste der Spezies (gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanosarcina</i> sp.	AKB16955
<i>Methanosarcina</i> sp.	AKB23569
<i>Methanosarcina baltica</i>	LC015100
<i>Methanosarcina lacustris</i>	AKB73417
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	CP009520
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	AKB45682
<i>Methanococcoides burtonii</i>	ABE53268
<i>Methanococcoides alaskense</i>	AB353221
<i>Methanococcoides methylutens</i>	KGK99495
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	AEH60719
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	AB353224
<i>Methanohalophilus mahii</i>	AB353223
<i>Methanohalophilus halophilus</i>	AB703633
<i>Methanohalophilus portucalensis</i>	AB908273
<i>Methanohalophilus levihalophilus</i>	AB889606
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	ADI73798
<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	AGB49863
<i>Methanomethylovorans thermophila</i>	AY672820
<i>Methanolobus tindarius</i>	ETA68796
<i>Methanolobus profundus</i>	AB703629
<i>Methanolobus zinderi</i>	EU715818
<i>Methanolobus psychrophilus</i>	CP003083
<i>Methanosarcina thermophila</i>	AB353225
<i>Methanosarcina flavescens</i>	KPL45056
uncultured methanogenic	AM746787
OTU_250	ARB_D4D27FF9
OTU_393	ARB_7D52C524
OTU_232	ARB_B2EE8FB
OTU_382	ARB_E7849C2B
Rice paddy soil	AJ607423
Rice paddy soil	AB301306
Rice paddy soil	AB301238
OTU_35	ARB_3DCC05EB
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	ADQ42341
<i>Methanosaeta pelagica</i>	AB679169
<i>Methanosarcinales archaeon</i>	KUK30039
<i>Methermicoccus shengliensis</i>	WP_042686202
<i>Methanosaeta thermophila</i>	CP000477
OTU_289	ARB_53F7B52D
Rice root	AM746775
OTU_379	ARB_89464935
OTU_406	ARB_E96D19CF
Rice paddy soil	AB301278
OTU_373	ARB_4550566E
<i>Methanoregula boonei</i>	ABS55100
<i>Methanoregula boonei</i>	CP000780
<i>Methanoregula formicicum SMSP</i>	AB479391
<i>Methanoregula formicica</i>	AGB03601
OTU_86	ARB_9557DC74
Rice paddy soil	AB301255
OTU_483	ARB_19596A6F
Rice root methanogen	AM746855
Rice paddy soil	AB301232
OTU_402	ARB_F19093A1
Rice paddy soil	AB301398
Everglades soil	DQ662588
Upland pasture soil	DQ994875
<i>Methanosphaerula palustris</i>	CP001338
<i>Methanosphaerula palustris</i>	ACL17594

Fortsetzung Tabelle 6.1:

Liste der Spezies (gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
OTU_388	ARB_8D2FB9A
Rice paddy soil	AB301291
Rice root methanogen	AM746880
OTU_409	ARB_ABEA8D60
Novel species phylotype 4	FR725795
OTU_176	ARB_45680B6E
OTU_19	ARB_11035BA7
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	ADN37161
<i>Methanolacinia paynteri</i>	WP_048152823
<i>Methanogenium organophilum</i>	AB353222
<i>Methanoplanus limicola</i>	CM001436
<i>Methanomicrobium mobile</i>	WP_042705994
<i>Methanoculleus</i> sp.	KDE55049
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	ABN56546
<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	AB288270
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	CCJ36661
<i>Methanofollis liminatans</i>	WP_004037742
<i>Methanofollis liminatans</i>	EJG06466
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	ABN07725
<i>Methanocorpusculum bavaricum</i>	WP_042697841
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	ABN07237
<i>Methanospirillum psychrodurum</i>	KF153053
OTU_111	ARB_DF154808
<i>Methanolinea mesophila</i>	AB496719
<i>Methanolinea tarda</i>	AB300466
<i>Candidatus Methanoperedens nitroreducens</i>	KPQ44219
OTU_507	ARB_D2CA4B16
<i>Candidatus Methanoperedens nitroreducens</i>	KCZ72673
Rice paddy soil	AB301301
<i>Methanocella conradii</i>	AFC99668
OTU_168	ARB_F029E0E6
<i>Methanocella arvoryzae</i>	AM114193
<i>Candidatus Methanoflorens stordelmirensis</i>	JGI_ID 2518787382
OTU_491	ARB_3421E329
<i>Candidatus Methanomethylophilus alvus</i>	AGI85144
<i>Candidatus Methanoplasma termitum</i>	AIZ56101
<i>Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis</i>	AGN26871
OTU_370	ARB_E80612B6
OTU_106	ARB_955E6F79
Rice paddy soil	AB301403
<i>Methanobacterium oryzae</i>	AB542752
OTU_87	ARB_AC15967D
<i>Methanobacterium formicicum</i>	EKF85363
OTU_477	ARB_72A0266A
River floodplains soil	AJ607411
<i>Methanobacterium lacus</i>	CP002551
<i>Methanobacterium alcaliphilum</i>	AB842183
<i>Methanobacterium paludis</i>	AEG19065
OTU_375	ARB_A3582269
Rice root methanogen	AM746913
OTU_303	ARB_CC50E24E
<i>Methanobacterium beijingense</i>	EF465106
<i>Methanobacterium petrolearium</i>	AB542744
<i>Methanothermus fervidus</i>	CP002278
<i>Methanopyrus kandleri</i>	AAB02003
<i>Methanopyrus kandleri</i>	AAM01870
<i>Methanococcus vannielii</i>	CP000742
<i>Methanococcus maripaludis</i>	CP000609
<i>Methanococcus voltae</i>	CP002057

Fortsetzung Tabelle 6.1:

Liste der Spezies (gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	AB353226
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	F64405
<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i>	AIJ05899
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	CP001787
<i>Methanocaldococcus infernus</i>	ADG12951
<i>Methanotorris igneus</i>	AEF96774
<i>Methanotorris formicicus</i>	EHP88088
<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	AB353229
OTU_557	ARB_5A246C47
<i>Methanobacterium kanagiense</i>	AB551870
<i>Methanobacterium</i> sp. MB1	HG425166
<i>Methanobacterium formicicum</i>	AIS32958
<i>Methanobacterium formicicum</i>	EKF86694
<i>Methanobacterium palustre</i>	AB542760
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	AB842182
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AAB85618
OTU_400	ARB_B7B17C12
OTU_280	ARB_DB3EFAC2
<i>Methanobacterium espanolae</i>	AB542757
OTU_466	ARB_A35B17D5
<i>Methanobacterium lacus</i>	ADZ10495
<i>Methanobacterium alcaliphilum</i>	AB842184
<i>Methanothermus fervidus</i>	ADP77533
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	CAE48306
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	ABQ87107
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	ALT69134
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	AHY86395
<i>Methanobrevibacter oralis</i>	WP_042694806
<i>Methanosarcina horonobensis</i>	AKB76567
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AKB82918
<i>Methanosaeta concilii</i>	AF313802
<i>Methanoculleus palmolei</i>	AB300784
<i>Methanothermus fervidus</i> DSM	Q49174.2
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> strain B10	HQ896500
<i>Methanobacterium flexile</i>	HM802935
<i>Methanobacterium palustre</i>	AB542753
<i>Methanoculleus thermophilus</i>	AB300783
<i>Methanosarcina spelaei</i>	KJ608060
<i>Methanosarcina mazei</i>	AB300781
<i>Methanocella paludicola</i>	AB300467

Tabelle 6.2: Liste der nicht gezeigten Spezies im Stammbaum

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanosarcina mazei</i>	AKB66618
<i>Methanosarcina mazei</i>	AKB60059
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG85282
<i>Methanosarcina mazei</i>	AB300778
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH76062
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH18783
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH39631
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG71159
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG64413
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG67311
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH85360
<i>Methanosarcina mazei</i>	AKB39067
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH16978
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG45275
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG46903
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG54177

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH13924
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH00295
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH68122
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH91309
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH72101
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG56697
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH73015
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH63259
<i>Methanosarcina mazei</i>	AY260440
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG61643
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG12285
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH21679
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKI06430
<i>Methanosarcina mazei</i>	AKB69962
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG29722
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG81000
<i>Methanosarcina mazei</i>	WP_048037303
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG02659
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH12264
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG99302
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH38327
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKI05469
<i>Methanosarcina mazei</i>	WP_048037134
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH92177
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH54165
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG90190
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG53133
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH45043
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG85196
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	NZ_JQLR01000001
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH02412
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH67631
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH90701
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH05437
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH36874
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG90640
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH53563
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH33871
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH24864
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH32764
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG44131
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH62729
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	WP_048050667
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG09132
<i>Methanosarcina mazei</i>	AB300782
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG04930
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKH82100
<i>Methanosarcina mazei</i>	WP_048048304
<i>Methanosarcina mazei</i>	AGF96667
<i>Methanosarcina sp.</i>	AB288268
<i>Methanosarcina sp.</i>	AB288292
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048125107
<i>Methanosarcina sp.</i>	AKB20360
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048177090
<i>Methanosarcina lacustris</i>	AY260443
<i>Methanosarcina lacustris</i>	WP_048124207
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AKB53099
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKG14500
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKG24939
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKI00430

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKG24248
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048131296
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKG08643
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048172209
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKG19560
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048141827
<i>Methanosarcina sp.</i>	KKH49356
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	WP_048123270
<i>Methanococcoides burtonii</i>	WP_011500403
<i>Methanococcoides methylutens</i>	NZ_CP009518
<i>Methanococcoides methylutens</i>	WP_048193230
<i>Methanococcoides methylutens</i>	NZ_JRHO01000005
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	WP_013898158
<i>Methanohalophilus mahii</i>	WP_013037080
<i>Methanohalophilus mahii</i>	ADE36137
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	WP_013194366
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	ADI73798.1
<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	WP_015325028
<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	AY260437
<i>Methanolobus tindarius</i>	NZ_AZAJ01000001
<i>Methanolobus tindarius</i>	WP_023845930
<i>Methanolobus psychrophilus</i>	WP_015052760
<i>Methanolobus psychrophilus</i>	AFV23037
<i>Methanosarcina thermophila</i>	AKB13402
<i>Methanosarcina thermophila</i>	WP_048167432
<i>Methanosarcina flavescens</i>	WP_054299716
<i>Methanosarcina flavescens</i>	NZ_LKAZ01000057
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	WP_014586065
<i>Methanosaeta harundinacea 6Ac</i>	AET63880.1
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	AET63880
<i>Euryarchaeota archaeon</i>	KUK04994
<i>Methanosaeta thermophila</i>	ABK14360
<i>Methanosaeta concilii</i>	WP_013718622
<i>Methanosaeta concilii</i>	AEB67565
<i>Methanoregula boonei</i>	WP_012106121.1
<i>Methanoregula boonei</i>	NC_009712
<i>Methanoregula boonei</i>	WP_012106121
<i>Methanoregula formicica</i>	WP_015286563
<i>Methanosphaerula palustris</i>	WP_012618913
<i>Methanosphaerula palustris</i>	EU296536
<i>Methanosphaerula palustris E1-9c</i>	ACL17594.1
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	CP002117
<i>Methanolacinia petrolearia DSM11571</i>	ADN37161.1
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	WP_013330338
<i>Methanoplanus limicola DSM2279</i>	EHQ36916.1
<i>Methanoplanus limicola</i>	WP_004079635
<i>Methanoplanus limicola</i>	EHQ36916
<i>Methanoregula formicica</i>	WP_048111146
<i>Methanoregula formicica</i>	AGB01930
<i>Methanolacinia paynteri</i>	WP_048153025
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	WP_013329918
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	ADN36741
<i>Methanofollis liminatans</i>	WP_004039455
<i>Methanofollis liminatans</i>	EJG07654
<i>Methanofollis ethanolicus</i>	AB703644
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	WP_011843221
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	ABN56311
<i>Methanoculleus marisnigri JR1</i>	ABN56311.1
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	CP000562
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	CCJ36444

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	WP_014867419
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300785
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300786
<i>Methanoculleus sp.</i>	WP_048114200
<i>Methanoculleus sp.</i>	KLK89043
<i>Methanoculleus sp.</i>	WP_048179676
<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	AB300779
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288291
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288267
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288288
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288285
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288284
<i>Methanoculleus sp.</i>	AB288287
<i>Methanoculleus sp.</i>	KLK89249
<i>Methanoculleus sp.</i>	WP_048180309
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	WP_011843456
<i>Methanoculleus sp.</i>	KDE55005
<i>Methanoculleus sp.</i>	WP_048114231
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	WP_014867635
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF	ABD41854.1
<i>Methanospirillum hungatei</i>	CP000254
<i>Methanospirillum hungatei</i>	ABD41854
<i>Methanospirillum hungatei</i>	AF313805
<i>Methanospirillum hungatei</i>	WP_011449112
<i>Methanocorpusculum sp.</i>	AY260447
<i>Methanocorpusculum sp.</i>	AY260446
<i>Methanocorpusculum parvum</i>	AY260445
<i>Methanocorpusculum bavaricum</i>	WP_042699351
<i>Methanocorpusculum parvum</i>	AY260444
<i>Methanocorpusculum sp.</i>	AY260448
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	WP_011833928
<i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z	ABN07725.1
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	CP000559
<i>Methanocorpusculum sp.</i>	AB288290
<i>Methanocorpusculum sp.</i>	AB288289
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	WP_011833440
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	AY260441
<i>Methanolinea tarda</i>	WP_007314361
<i>Methanolinea tarda</i>	AB300466
<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	BAF56441.1
<i>Candidatus Methanoperedens</i>	WP_048089615
<i>Methanocella conradii</i>	WP_014405506
<i>Methanocella paludicola</i>	BAI60588
<i>Methanocella arvoryzae</i>	CAJ37204
<i>Methanocella arvoryzae</i>	WP_012035370
<i>Candidatus Methanomethylophilus</i>	WP_015504293
<i>Methanoculleus sp.</i>	CDF30177
<i>Candidatus Methanomethylophilus</i>	KUE73676
<i>Candidatus Methanomethylophilus</i>	WP_058747716
<i>methanogenic archaeon</i>	AHY86393
<i>Candidatus Methanoplasma</i>	AI256101
<i>Candidatus Methanoplasma</i>	CP010070
<i>Candidatus Methanoplasma</i>	WP_048111444
<i>Candidatus Methanomassiliicoccus</i>	CP005934
<i>Candidatus Methanomassiliicoccus</i>	WP_048134048
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	WP_019176774
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	WP_019176774
<i>Methanobacterium formicicum</i>	CEL25616
<i>Methanobacterium sp.</i>	AB288286

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanobacterium</i> sp.	KUK74998
<i>Methanobacterium formicicum</i>	AIS31752
<i>Methanobacterium</i> sp.	AB288269
<i>Methanobacterium formicicum</i>	WP_048072491
<i>Methanobacterium formicicum</i>	CEA13258
<i>Methanobacterium formicicum</i>	WP_004031277
<i>Methanobacterium lacus</i>	WP_013643956
<i>Methanobacterium lacus</i>	ADZ08605
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	ALT69783
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	WP_058739998
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	AHY86399
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	WP_012956722
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	ADC47774
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	WP_048202874
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	EEE42042
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	ABQ87220
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	WP_011954235
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	WP_019262578
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	CDF29506
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	EFC93211
<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i>	WP_040682084
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	AGN17395
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	WP_016359092
<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	WP_042708239
<i>Methanobacterium paludis</i>	WP_013826564
<i>Methanobacterium paludis</i>	CP002772
<i>Methanobacterium</i> sp.	DQ677519
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	WP_054834881
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	AB300777
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	WP_042703044
<i>Methanothermobacter tenebrarum</i>	AB523786
<i>Methanobacterium aarhusense</i>	AY386125
<i>Methanobacterium congolense</i>	AB542748
<i>Methanobacterium aggregans</i>	KP006500
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AAA73445
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	O27232
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AAB85653
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	WP_010876788
<i>Methanobacterium bryantii</i>	AF313806
<i>Methanobacterium</i> sp.	WP_048081846
<i>Methanobacterium espanolae</i>	AB542749
<i>Methanobacterium ivanovii</i>	EF465107
<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	AB300780
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	ADL59127
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	CAA30639
<i>Methanothermus fervidus</i>	ADP77583
<i>Methanothermus fervidus</i>	WP_013413861
<i>Methanothermus fervidus</i>	P12971
<i>Methanothermus fervidus</i>	AAA72197
<i>Methanopyrus kandleri</i>	1E6V_D
<i>Methanopyrus kandleri</i>	1E6V_A
<i>Methanopyrus kandleri</i>	Q49605
<i>Methanococcus vanniellii</i>	1307300C
<i>Methanococcus vanniellii</i>	AAA72598
<i>Methanococcus vanniellii</i>	WP_011972678
<i>Methanococcus vanniellii</i> SB	ABR54777.1
<i>Methanococcus vanniellii</i>	ABR54777
<i>Methanococcus vanniellii</i>	P07961
<i>Methanococcus maripaludis</i>	WP_011171503
<i>Methanococcus maripaludis</i>	AEK20582

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanococcus maripaludis</i>	CAF31115
<i>Methanococcus maripaludis</i>	WP_013999870
<i>Methanococcus maripaludis</i>	WP_011867796
<i>Methanococcus maripaludis</i>	CP000609.1
<i>Methanococcus maripaludis</i> C5	ABO34334.1
<i>Methanococcus maripaludis</i>	WP_011977191
<i>Methanococcus maripaludis</i>	ABR65873
<i>Methanococcus maripaludis</i>	WP_012193868
<i>Methanococcus maripaludis</i>	ABX01925
<i>Methanococcus voltae</i> A3	ADI36785.1
<i>Methanococcus voltae</i>	ADI36785
<i>Methanococcus voltae</i>	WP_013180513
<i>Methanococcus voltae</i>	P11559
<i>Methanococcus voltae</i>	1515346E
<i>Methanococcus voltae</i>	CAA30633
<i>Methanococcus aeolicus</i>	WP_011973976
<i>Methanococcus aeolicus</i>	ABR56844
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	WP_018153522
<i>Methanocaldococcus</i> sp.	ADC69992
<i>Methanocaldococcus</i> sp.	WP_012980900
<i>Methanocaldococcus fervens</i>	WP_015791493
<i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86	ACV24756.1
<i>Methanocaldococcus fervens</i>	ACV24756
<i>Methanocaldococcus fervens</i>	CP001696
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Q58256
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	AAB98851
<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i>	WP_048202038
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	ACX72017.1
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	ACX72017
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	WP_012819563
<i>Methanocaldococcus infernus</i>	WP_013099697
<i>Methanocaldococcus villosus</i>	WP_004590263
<i>Methanocaldococcus villosus</i>	ENN96460
<i>Methanotorris igneus</i>	AB353228
<i>Methanotorris igneus</i>	WP_013799373
<i>Methanotorris formicicus</i>	WP_007043982
<i>Methanotorris formicicus</i>	AB353227
<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	AEH06926
<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	WP_013867110
<i>Methanotorris igneus</i>	WP_013798610
<i>Methanotorris igneus</i>	AEF96001
<i>Methanotorris formicicus</i>	WP_048115624
<i>Methanotorris formicicus</i>	EHP86352
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	WP_018154763
<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i>	WP_048201553
<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i>	AIJ05353
<i>Methanocaldococcus</i> sp.	ADC69118
<i>Methanocaldococcus</i> sp.	WP_012980029
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	L77117.1
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Q60391
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	AAB98063
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	WP_015733272
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	ACX73052
<i>Methanobacterium</i> sp.	EKQ54655
<i>Methanobacterium formicicum</i>	CEA13436
<i>Methanobacterium formicicum</i>	CP006933
<i>Methanobacterium formicicum</i>	LN515531
<i>Methanobacterium formicicum</i>	LN734822
<i>Methanobacterium</i> sp.	CDG65904
<i>Methanobacterium</i> sp.	WP_023992931

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanobacterium formicicum</i>	CEL25802
<i>Methanobacterium formicicum</i>	WP_048072649
<i>Methanobacterium formicicum</i>	WP_048085732
<i>Methanobacterium sp.</i>	KUK73120
<i>Methanobacterium formicicum</i>	WP_004029250
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	CP001710.1
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	U09990
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	WP_010876753
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	ADL59091
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	P21110
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	WP_013296302
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	P58815
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	ADL59091.1
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AAA73439
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AAB85618.1
<i>Methanothermobacter sp. CaT2</i>	AP000666
<i>Methanothermobacter sp.</i>	WP_048175703
<i>Methanothermobacter sp.</i>	BAM70270
<i>Methanobacterium sp.</i>	WP_048080940
<i>Methanobacterium lacus</i>	WP_013645846
<i>Methanothermus fervidus</i>	Q49174
<i>Methanothermus fervidus</i>	CP002278.1
<i>Methanothermus fervidus</i>	WP_013413811
<i>Methanothermus fervidus</i>	CAA50044
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> DSM 3091	AJ584650
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	WP_011405931
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	ABC56731
<i>Methanosphaera sp.</i>	AHY86396
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	WP_011954158
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	WP_058739388
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	AHY86400
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	AHY86398
<i>Methanosarcina barkeri</i>	WP_048120720
<i>Methanosarcina siciliae</i>	AKB30557
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AKB58795
<i>Methanobacterium sp.</i>	WP_023992801
<i>Methanobacterium sp.</i>	WP_048191628
<i>Methanosarcina sp.</i>	WP_048157992
<i>Thermoplasmatales archaeon</i>	AGI47474
<i>Thermoplasmatales archaeon</i>	WP_015491991
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AAZ69867
<i>Methanosarcina barkeri</i>	P07962
<i>Methanococcoides methylutens</i>	WP_048204805
<i>Methanococcoides methylutens</i>	AKB84612
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	WP_049780206
<i>Methanoculleus thermophilus</i>	AF313804
<i>Methanosarcina thermophila</i>	AKB15963
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	AHY86394
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	WP_011024419
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	WP_013296337
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	P11558
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	E28544
<i>Methanosarcina siciliae</i>	AKB38845
<i>Methanosarcina siciliae</i>	AKB34449
<i>Methanosarcina siciliae</i>	WP_048174272
<i>Methanobacterium sp.</i>	EKQ53862
<i>Methanobacterium sp.</i>	CDG65773
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG61523
<i>Methanomicrobiales archaeon</i>	KUL02431
<i>Methanococcoides burtonii</i> DS	ABE53268.1

Fortsetzung Tabelle 6.2:

Liste der Spezies (nicht gezeigt im Baum)	Protein/Nucleotid Locus
<i>Methanosarcina barkeri</i>	CAA68357.1
<i>Methanothermus fervidus</i> DSM	ADP77533.1
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	ADL59091.1
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	P11558.3
<i>Methanothermobacter</i> sp.	WP_048175731
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG70782
<i>Methanosarcina</i> sp.	ALK04706
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Y00158
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	AE010299
<i>Methanobacterium alcaliphilum</i>	AB542746
<i>Methanosarcina horonobensis</i>	AB288266
<i>Methanosarcina subterranea</i>	AB288268
<i>Methanosarcina siciliae</i>	CP009508
<i>Methanosarcina siciliae</i>	CP009507
<i>Methanosarcina siciliae</i>	CP009506
<i>Methanothermobacter</i> sp.	BAM70306
<i>Methanomassiliicoccales archaeon</i>	KQM10793
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AKJ39604
<i>Methanosarcina barkeri</i>	AKB49358
<i>Methanosarcina barkeri</i>	WP_048108547
<i>Methanosarcina barkeri</i>	WP_011305916
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG26908
<i>Methanosarcina horonobensis</i>	WP_048136663
<i>Methanosarcina mazei</i>	WP_011033189
<i>Methanosarcina mazei</i>	KKG35127
<i>Methanosarcina lacustris</i>	AY260438
<i>Methanosarcina lacustris</i>	AY260439
<i>Methanosarcina mazei</i>	WP_048044585
<i>Methanosarcina mazei</i>	AKB63269
<i>Methanosarcina mazei</i>	AAM30936
<i>Methanosarcina barkeri</i>	CAA68357
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	AAM07885
<i>Methanosarcina</i> sp.	AKB49151
<i>Methanosarcina</i> sp.	AB288266
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	AHY86397

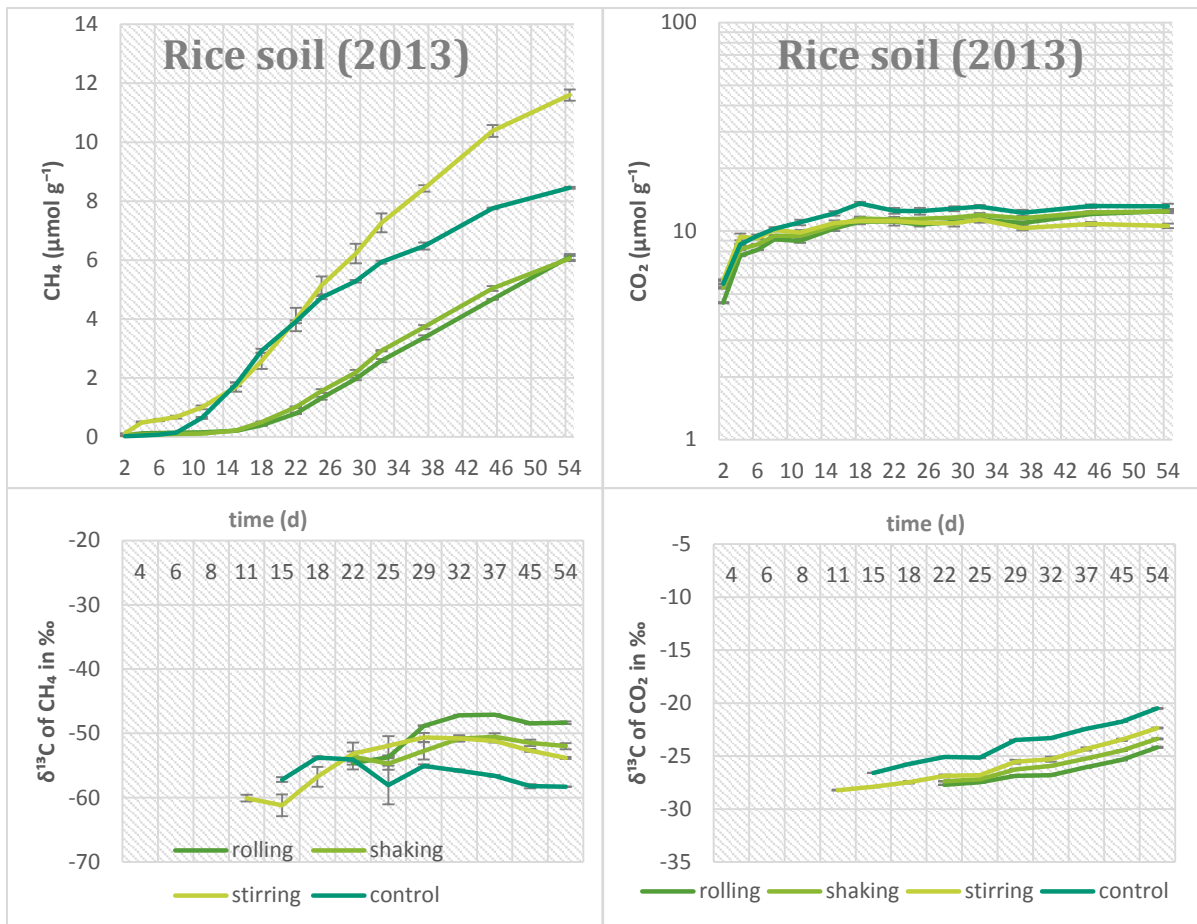


Abbildung 6.5: Gaskonzentrationen und deren Kohlenstoffisotopensignatur im CH₄ und CO₂ in den Reisfeldbodeninkubationen (rice field soil) vom Beprobungsjahr 2013. Dargestellt sind die Mittelwerte der Inkubation, rollen (rolling), schütteln (shaking), magnetisch gerührt (stirring) und die nicht bewegte Kontrollinkubation (control), über die Zeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar (n = 3). Ein Gramm Boden bezieht sich auf das Trockengewicht.

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum / -ort 25.06.1988 in Leinefelde
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig, 1 Kind (geboren am 15.06.2015)

Studium

Seit 10.2012 Philipps-Universität, Marburg
Studiengang: Promotionsstudium
Abschluss: 10.2016

10.2010 - 10.2012 Philipps-Universität, Marburg
Studiengang: Molecular and Cellular Biology
Abschluss: Master of Science

10.2007 - 09.2010 Georg August Universität, Göttingen
Studiengang: Biologie
Abschluss: Bachelor of Science

Schulausbildung St. Josef Gymnasium, Dingelstädt

Abschluss: Abitur

Universitäre Zusatzqualifikationen

Seit 04.2013 Mitglied des Graduiertenzentrums Lebens- und Naturwissenschaften
(MARA - Marburg University Research Academy)

Seit 01.2013 Member of the Integrated Research Training Group (IRTG) of the SFB 987
„Microbial Diversity in Environmental Signal Response“

Wissenschaftliche Weiterbildungen und Workshops

11.2014 "Writing Scientific Publications in Life and Natural Sciences"

10.2014 "Creating Publication Quality Graphics using R"

12.2013 Workshop (Soft Skills)

11.2013 Anerkannter Fortbildungslehrgang als Beauftragte für die
Biologische Sicherheit (BBS) gemäß §15 GenTSV

09.2013 „My Manuscript is Ready to be submitted – What Next?“

12.2012 Introduction to R

01.2012 & 02.2013 FISH Workshop, Einführung in ARB

01.2012 & 02.2012 Functional gene Workshop

Publikationsliste

Aschenbach, K., Conrad, R., Reháková, K., Doležal, J., Janatková, K., and Angel, R. (2013). Methanogens at the top of the world: occurrence and potential activity of methanogens in newly deglaciated soils in high-altitude cold deserts in the Western Himalayas. *Front. Microbiol.* 4, 359. doi:10.3389/fmicb.2013.00359.

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

03.2014	„Marburg Meeting on Microbiology“ in Marburg (SFB 987), Posterpräsentation
09.2013	Retreat Graduiertenschule SFB, Posterpräsentation
03.2013	VAAM-Jahrestagung 2013 zusammen mit der KNVM in Bremen, Posterpräsentation mit dem Titel „Methanogens at the top of the world“
03.2013	VAAM-Jahrestagung 2012 in Tübingen, Posterpräsentation

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, welche mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Conrad für die Möglichkeit an diesem Thema zu arbeiten, für seine Betreuung, die konstruktiven Gespräche und für alle Anregungen und Denkanstöße bedanken. Ein weiterer Dank geht an Dr. Werner Liesack, Prof. Dr. Michael Bölker und Prof. Dr. Birgit Ziegenhagen für ihre Beteiligung an meiner Prüfungskommission sowie meinem Thesis-Komitee.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Martin Blaser, Dr. Kristof Brenzinger, Dr. Vanessa Tripp, Peter Claus und Melanie Klose, sowie auch allen Mitgliedern der AG Conrad für die hilfreichen Ratschläge, die technische Unterstützung und die positive Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren danke ich Dr. Martin Blaser für seinen wissenschaftlichen Rat und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein Dankeschön auch an alle weiteren Mitglieder des Departments Biogeochemie, welche mich während meiner Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Ein grenzenloser Dank geht an meine und Martins Familie, die mir durch ihre Unterstützung und Beistand die Arbeitszeiten ermöglicht haben, um trotz der Doppelbelastung diese Arbeit zu vollenden. Ein besonderer Dank geht an meine kleine Familie mit meinem kleinen Mann Leo und meinem langjährigen Freund Martin für die unermüdliche Unterstützung, Geduld, Großzügigkeit, Hilfe, Beistand und Liebe.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Methanogene Lebensgemeinschaften unter Stressbedingungen“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg | Oktober 2016